



***BRUCELLA SPP.*'YE KARŞI KULLANILAN ANTİBİYOTİKLERİN  
E-TEST KOMBİNASYON METODU İLE SİNERJİK, ADİTİF VE  
ANTAGONİST ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Halim KAYSADU  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Yusuf YAKUPOĞULLARI

**MALATYA 2013**

**TEŞEKKÜR**

Tez çalışmam ve eğitimim süresince benden ilgi, destek ve katkılarını esirgemeyen, yapıcı eleştiri ve önerilerinden faydalandığım, başta danışman hocam Doç. Dr. Yusuf YAKUPOĞULLARI ve Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. İbrahim Halil ÖZEROL'a, ve eğitimimde her zaman katkı ve desteklerini gördüğüm hocalarım Prof. Dr. Mehmet Sait TEKEREKOĞLU, Prof. Dr. Selma AY, Prof. Dr. Çiğdem KUZUCU ve Doç. Dr. Barış OTLU'ya, şükran duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, her zaman desteklerini esirgemeyen birlikte ihtisas yaptığım tüm asistan arkadaşlarıma ve diğer çalışma arkadaşlarıma; manevi desteğini esirgemeyen eşim Zehra ve dostlarıma teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Dr. Halim KAYSADU

## İçindekiler

Özet .....	1
Abstract.....	3
<b>1.GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>5</b>
1.1. Tarihçe .....	5
1.2.Morfolojik Özellikleri .....	5
1.3. Bakterinin Türleri .....	6
1.4. İdentifikasyon .....	7
1.5. Kültür Özellikleri .....	7
1.6. Biyokimyasal Özellikler .....	8
1.7. Antijenik Yapı.....	8
1.7.1. Yüzey Antijenleri.....	9
1.7.2. Dış Membran Proteinleri .....	9
1.8. Epidemiyoloji.....	9
1.9. Korunma .....	13
1.10. Patogenez .....	13
1.11. Konak İmmünitesi .....	14
1.12. Klinik Bulgular .....	14
1.13. Komplikasyonlar .....	15
1.13.1.Gastrointestinal Sistem .....	15
1.13.2. Hepatobiliyer Sistem.....	15
1.13.3. İskelet Sistemi .....	15
1.13.4. Sinir Sistemi .....	16
1.13.5. Kardiyovasküler Sistem .....	16
1.13.6. Solunum Sistemi .....	16
1.13.7. Genitoüriner Sistem .....	17
1.13.8. Gebelik .....	17
1.13.9. Hematolojik Komplikasyonlar .....	17
1.13.10. Deri Lezyonları .....	17
1.13.11. Göz Lezyonları .....	17
1.14. Klinik Tanı .....	18
1.14.1. Bruselloz Tanısında İncelenen Örnekler .....	18
1.15. Brusellozun Kesin Tanısında Direkt ve İndirekt Yöntemler .....	18
1.15.1. Direkt Tanı .....	18
1.15.2. İndirekt Tanı .....	20
1.16. Tedavi .....	24
1.16.1. Antimikrobiyallerin Kombine Kullanım İlkeleri.....	24
1.16.2. Antibiyotik Kombinasyonlarının İn Vitro Etkinliğini Ölçen Testler .....	24
1.17. Bruselloz Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler .....	30
1.17.1. Tetrasiklinler .....	30
1.17.2. Rifampin .....	31
1.17.3. Aminoglikozitler .....	31
1.17.4. Kinolonlar .....	32

1.17.5. Trimetoprim/Sulfametoksazol (TMP-SMZ, Kotrimoksazol).....	33
1.17.6. Sefalosporinler Tetrasiklinler .....	34
1.18. İmmünoterapi .....	34
1.19. Brusellozda Kullanılan Antibiyotiklerin Farmakokinetik ve Farmakodinamiği .....	34
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>37</b>
2.1. Kullanılan Besiyerleri.....	37
2.1.1. Kanlı agar besiyeri .....	37
2.1.2. Çikolatamsı agar .....	38
2.1.3. Crystiensen üre agar.....	38
2.2. Kültür, İzolasyon ve İdentifikasyon .....	38
2.2.1. Gram Boyama Yöntemi .....	39
2.2.2. Katalaz ve Oksidaz Reaksiyonları .....	39
2.2.3. Üreaz Deneyi .....	40
2.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi ve Etest Kombinasyon Yöntemi .....	40
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>42</b>
<b>4. TARTIŞMA .....</b>	<b>46</b>
<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>60</b>
<b>Tabolar ve Şekiller</b>	
Tablo 1. Brucella Türleri ve Kaynakları .....	6
Tablo 2. Brucella Türlerinin İdentifikasyon Özellikleri .....	7
Tablo 3. Türkiye’de Brucella Vaka-Ölüm Sayıları .....	11
Tablo 4. Türkiye’de Brucella’nın bulaşayolları .....	12
Tablo 5. Antibiyotiklerin MİK değerleri .....	42
Tablo 6. Antibiyotik Kombinasyonların İn vitro Etkinlikleri .....	45
Şekil 1. Dünyada Brucella İnsidansı.....	10
Şekil 2. Disk Difüzyon Yöntemi .....	25
Şekil 3. Dama Tahtası Yöntemi .....	26
Şekil 4. Kinetik Öldürme Yöntemi.....	26
Şekil 5. Etest Kombinasyon Yöntemi .....	27
Şekil 6. Plazma Konsantrasyon Eğrileri .....	35
Şekil 7. Doksisisiklin MİK Dağılımı .....	43
Şekil 8. Rifampin MİK Dağılımı.....	43
Şekil 9. Streptomisin MİK Dağılımı.....	44
Şekil 10. SXT MİK Dağılımı .....	44
Şekil 11. Siprofloksasin MİK Dağılımı .....	45

**Kısaltmalar**

**S:** Smooth

**R:** Rough

**H<sub>2</sub>S:** Hidrojen Sülfür

**CO<sub>2</sub>:** Karbondioksit

**M:** Mukoid

**LPS:** Lipopolisakkarit

**OMP:** Outer Membrane Protein

**SDS:** Sodyum Dodesil Sulfat

**RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism

**PCR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Hidrojen peroksit

**PMNL:** Polimorfonükleer Lökositler

**IFN- $\gamma$ :** İnterferon-gamma

**TNF- $\alpha$ :** Tümör nekroz faktör-alfa

**IL:** İnterlökin

**Ig:** İmmüoglobulin

**DSÖ:** Dünya Sağlık Örgütü

**STA:** Standart Tüp Aglütinasyon

**RTD:** Rutin Test Dilüsyonu

**ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**KFT:** Kompleman Fiksasyon Testi

**MİK:** Minimal İnhibitör Konsantrasyon

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**DOX:** Doksisisiklin

**STP:** Streptomisin

**CIP:** Siprofloksasin

**RF:** Rifampin

**SXT=TMP/SMZ:** Trimetoprim/sulfametoksazol

**FK:** Farmakokinetik

**FD:** Farmakodinamik

**FIC:** Fraksiyone İnhibitör Konsantrasyon İndeksi

## Özet

Özellikle retiküloendotelial sistem hücreleri içinde yerleşerek süregen enfeksiyonlara neden olan brusellalar, insanlar için önemli bir morbidite ve bazen de mortalite nedenidir. Klinikte Brusellozis tedavisi için genellikle ikili veya üçlü antibiyotik kombinasyonu uygulanmakla birlikte bu kombinasyonların in vitro etkinlikleri hakkında yeterince bilgi mevcut değildir.

Bu çalışmada, *Brucella spp.* türlerine karşı kullanılan antibiyotik kombinasyonlarının in vitro etkinliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamıza 2010-2012 yılları arasında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında kan kültürlerinden izole edilen 40 *Brucella spp.* suşu alındı. Bu suşlara karşı doksisisiklin, rifampin, ko-trimoksazol, streptomisin ve siprofloksasin olmak üzere toplam 5 farklı antibiyotiğin etkinliği Etest ile çalışıldı. Bu antibiyotiklerden klinik uygulamada en sık kullanılmakta olan doksisisiklin-rifampin; rifampin-kotrimoksazol; doksisisiklin-streptomisin; siprofloksasin-kotrimoksazol ve siprofloksasin-streptomisin olmak üzere toplam 5 farklı kombinasyonun in vitro aktivitesi Etest kombinasyon yöntemi ile araştırıldı. Elde edilen sonuçlar fraksiyone inhibitör konsantrasyon İndeksi (FIC) kullanılarak değerlendirildi ve sinerjik, aditif ve antagonist etkileri hesaplandı.

Çalışmamıza alınan 40 izolata karşı MİK düzeyi en düşük antibiyotik kotrimoksazol (0.016 µg/ml) olarak bulunurken, MİK düzeyi en yüksek antibiyotik rifampin (1.5 µg/ml) olarak saptandı. MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri dikkate alındığında suşlara karşı çalışılan antibiyotiklerden en etkin bulunandan en az etkin olana doğru sıralama şöyle bulundu: Ko-trimoksazol 0.032 µg/ml ve 0.064 µg/ml; doksisisiklin 0.064 µg/ml ve 0.094µg/ml; siprofloksasin 0.094 µg/ml ve 0.75 µg/ml; streptomisin 0.25 µg/ml ve 0.50 µg/ml; ve rifampin 0.50 µg/ml ve 0.75 µg/ml. Doksisisiklin-rifampin kombinasyonu çalışılan tüm suşlarda (%100) sinerjik etki gösterirken, rifampin-kotrimoksazol kombinasyonu iki suшта antagonist (%5) etki gösterdi. Siprofloksasin-streptomisin ve rifampin-kotrimoksazol kombinasyonlarının suşlara karşı sinerjik etki oranları sırasıyla %57.5 ve %52.5 olarak saptandı. Doksisisiklin-streptomisin ve siprofloksasin-kotrimoksazol kombinasyonlarının sinerjik etki oranları ise sırasıyla %32.5 ve %25 olarak saptandı.

Çalışmamızda in vitro en etkin antibiyotik olarak kotrimoksazol saptanmışken en yüksek minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) düzeyleri rifampinde görülmüştür.

Ancak, kotrimoksazolün diğer antibiyotiklerle olan kombinasyonlarında sinerjik etkisi düşük olarak saptanmış, aksine, rifampinin doksisisiklin kombinasyonu ise tüm suşlara karşı sinerjik etki göstermiştir. Bu bağlamda *Brucella* türlerine karşı antimikrobiyal duyarlılık testlerinde tekli antibiyotik duyarlılığının yanında kombinasyon aktivitelerinin in vitro saptanması faydalı olacağı kanısındayız.

# Investigation of Synergistic, Additive and Antagonist Effect of Antimicrobial Combinations Used for *Brucella spp.*, with Etest Combination Method

## Abstract

The genus *Brucella* causing chronic infections via involving the reticuloendothelial system cells is a significant morbidity and sometimes mortality reason for human. In routine clinical practice, antimicrobial combinations consisting two or three antibiotics are used, however, there is less data about the in vitro activity of these combinations.

In this study, in vitro activity of antimicrobial combinations those are used against to *Brucella spp.* was aimed.

A total 40 *Brucella spp.* strains were included in this study, which were isolated from blood cultures in Medical Microbiology Laboratory of Inonu University Tugut Ozal Medical Center between 2010 and 2012. In vitro activities of five antibiotics such as doxycycline, rifampin, cotrimoxazole, streptomycine and ciprofloxacin were studied with Etest strips. From these drugs, in vitro activities of five commonly-used combinations including doxycycline-rifampin, rifampin-cotrimoxazole, doxycycline-streptomycine, ciprofloxacin-cotrimoxazole and ciprofloxacin-streptomycine were investigated with Etest combination method. The obtained data was evaluated with FIC index, and synergistic, additive and antagonsit effects of these drugs were calculated.

While the lowest MİK of the drug against to studied strains was detected as cotrimoxazole (as, 0.016 µg/ml), the highest MİK of the drug was detected as rifampin (as, 1.5 µg/ml). Regarding the MİK<sub>50</sub> and MİK<sub>90</sub> values, the most effective and less effective rank of the antibiotics was listed as follows: cotrimoxazole 0.032 µg/ml and 0.064 µg/ml; doxycycline 0.064 µg/ml and 0.094µg/ml; ciprofloxacin 0.094 µg/ml and 0.75 µg/ml; streptomycine 0.25 µg/ml and 0.50 µg/ml; and rifampin 0.50 µg/ml and 0.75 µg/ml. The combination of doxycycline-rifampin showed synergistic activity to all studied strains (%100), and the combination of rifampin-cotrimoxazole exhibited antagonist activity for two strains (5%). The ratio of synergistic activities of



ciprofloxacin-streptomycin and rifampin-cotrimoxazole combinations were found as 57.5% and 52.5%, orderly.

In this study, cotrimoxazole was found as the most active antibiotic, but rifampin was associated with the highest MİK levels. However, lower ratios of synergistic activity were observed with the combinations of cotrimoxazole. In contrast, rifampin showed excellent synergistic activity to all studied strains, particularly in the combination of doxycycline. In this context, in addition to the antimicrobial susceptibility test performed for each antibiotic, it will be beneficial to measure the in vitro activity of the combinations against *Brucella*.

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Tarihçe

*Brucella spp.*'nin neden olduğu Bruselloz hastalığından ilk olarak Hippocrates M.Ö. 5.yy'da söz etmiştir. Günümüze değin "Dalgalı Humma" (Ondülan ateşi), "Akdeniz Humması", "Malta Humması" ve "Gibraltar Huması" gibi değişik isimler kullanılan Bruselloz, 1859'da Marston tarafından ilk kez "*Mediterranean gastric remitten fever*" adıyla tanımlanmıştır. Onsekizinci ve 19. yy'da Malta'daki İngiliz askerleri arasında önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olması ile hastalığın klinik bulguları ve seyri daha iyi tanınır hale gelmiştir (1). Binsekizyüzseksenaltıda Sir David Bruce, ilk kez brusella etkenini izole etmiş ve *Micrococcus melitensis*'i olarak adlandırmıştır (2). Binsekizyüzdoksanbeşte sığırlarda abortus etkeni olarak *Bacillus abortus* tanımlanmış (3,4) ve Zammit tarafından 1905'te Malta'da Bruselloz'un kaynağının keçiler olduğu ortaya konarak, pastörize edilmemiş keçi sütünü tüketilmesi engellenmiş ve hastalığın insidansında dramatik azalmalar sağlanmıştır (5). Bin dokuz yüz on sekiz yılında bakteriyi ilk olarak tanımlayan kişinin ismine atfen etken "*Brucella melitensis*" olarak adlandırılmıştır. Organizmanın tür ismi ise hastalığın ilk defa Malta Adası'nda görülmesinden dolayı Romen dilinde malta anlamına gelen "*melita*" kelimesinden alınmıştır (6).

Huddleston 1929'da, domuzlardan izole ettiği suşu *B. suis* olarak tanımlamıştır (7,8). Bin dokuz yüz elli üçte koyunlarda *Brucella ovis*, 1957'de ratlardan *B.neotomae* izole edilmiştir. *Brucella ovis* ve *Brucella neotomoe* insanlar için patojen kabul edilmemiştir (6). Bindokuzyüzaltmışsekizde Carmichael ve Bruner köpeklerde *Brucella canis* 'i tanımlamışlardır (9,10).

Ülkemizde Dr.Hüsamettin Kural ve Mahmut Sabit Akalın tarafından 1915 yılında ilk Bruselloz olgusu bir askerde saptanmıştır. Koyunlarda *B. melitensis* ilk defa Aktan ve Köylüoğlu tarafından 1944 yılında Bandırma Merinos çiftliğinde saptanmıştır. Ülkemizde sığırlarda ilk izolasyon 1931-32 yıllarında Berke tarafından bildirilmiştir (11). Yine Türkiye'de insan ve hayvanlarda Bruselloz'un serolojik yöntemlerle saptanması Golem tarafından 1943 yılında yapılmıştır (12).

### 1.2. Morfolojik Özellikleri

Brusella türleri 0.5-0.7 µm eninde, 0.6-1.5 µm boyunda, Gram negatif kok, kokobasil şeklinde, sporsuz, aerop veya mikroaerofil bakterilerdir. Tekli, ikili, kısa zincirler veya küçük kümeler halinde bulunurlar (13). Kendilerine özgün Brownian

hareketi olarak isimlendirilen yerinde titreşim hareketi yaparlar. S koloni ve mukoid koloni oluşturan suşlarda gösterilebilen kapsül, pasajlarla ve R koloni şekillerinde kaybolmaktadır (13). Zayıf asitlerle dekolorizasyona dirençli olduklarından modifiye Ziehl-Neelsen boyama tekniği ile açık kırmızı renkte boyanırlar. Kültürlerde tek tek rastlanmasına karşın dokulardan yapılan boyamalarda kümeler halinde görülürler (15).

### 1.3. Bakterinin Türleri

*B.melitensis* (biovar 1,2,3); koyun ve keçilerde, *B.abortus* (biovar1,2,3,4,5 ve 9); sığır ve mandalarda ve *B.suis* (biovar1,2,3,4,5); domuzlarda enfeksiyon yapmaktadır. *B.canis* köpeklerde enfeksiyona neden olurken insanlarda nadiren hastalık yapar. *B.neotoma* ratlarda; *B.ovis* ise koyunlardan enfeksiyon yapmaktadır. *B. neotomae* ve *B.ovis* insanda patojen değildir ve her iki etkenin birer biyotipi mevcuttur (14,16).

Brusella türleri ve konakları Tablo 1’de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Bruselloz etkenleri, konaklar ve insanda hastalık yapma durumu. Enfeksiyon kaynakları (17).

Tür	Konak Hayvan	İnsanlarda Hastalık
<b>Eski Türleri</b>		
<i>B. melitensis</i>	Keçi, koyun, deve	(+) En yaygın
<i>B. abortus</i>	Sığır, deve, buffalo, geyik	(+) 2. yaygın
<i>B. suis</i>	Domuz, yabani tavşan, ren geyiği, kemirgen	(+)
<i>B. canis</i>	Köpekgiller	(+)
<i>B. ovis</i>	Koyun	(-)
<i>B. neotomae</i>	Kemirgen	(-)
<b>Yeni Türler</b>		
<i>B. ceti</i>	Balina, yunus balığı, domuz balığı, fok	NöroBruselloz, spondilit ve laboratuvar kaynaklı
<i>B. pinnipedialis</i>	Ayı balığı	(+)
<i>B. microti</i>	Kırmızı tilki, tarla faresi	(-)
<i>B. inopinata</i>	Bilinmiyor	Prostetik meme implant enfeksiyonu

## 1.4. İdentifikasyon

Brusella türlerinin biyotip düzeyindeki identifikasyonları başlıca 6 temel test ile yapılmaktadır. Bunlar;

- A) CO<sub>2</sub> gereksinimi
- B) Hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) üretimi
- C) Bazik fuksin ve tiyonin boya ile inhibisyona duyarlılık
- D) Monospesifik A, M ve R anti-serumları ile aglutinasyon
- E) Üreaz aktivitesi
- F) Bakteriofajlara duyarlılık

Brusella türlerinin tanımlanmasında kullanılan özellikler Tablo 2’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** Brucella türlerinin identifikasyon özellikleri (18, 20, 23).

Tür	Biovar	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S	Üreaz	Boyalarda Üreme					Aglütinasyon			Tb fajı erime		Konak
					Thionin			Fuksin		Anti A	Anti M	Anti R	RTD	10 <sup>3</sup> x RTD	
					a	b	c	b	c						
<i>B. melitensis</i>	1	-	-	D	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	Koyun
	2	-	-	D	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Keçi
	3	-	-	D	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	İnsan
<i>B. abortus</i>	1	+,-	+	1-2h	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	Sığır
	2	+	+	1-2h	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	
	3	+,-	+	1-2h	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	
	4	+,-	+	1-2h	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	İnsan
	5	-	-	1-2h	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	
	6	-	-,+	1-2h	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	
	7	-	-,+	1-2h	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
	8	+	-	1-2h	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	
	9	-,+	+	1-2h	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	
<i>B. suis</i>	1	-	+	0-30dk	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	Domuz
	2	-	-	0-30dk	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	Domuz
	3	-	-	0-30dk	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	Dmz, İnsan
	4	-	-	0-30dk	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	R. geyikleri
	5	-	-	0-30dk	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	Kemiriciler
<i>B. neotomae</i>	1	-	+	0-30dk	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	N. lepida
<i>B. ovis</i>	1	+	-	0	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Koç
<i>B. canis</i>	1	-	-	0-30dk	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	Köpek

## 1.5. Kültür Özellikleri

Brusella türleri, değişken beslenme gereksinimi olan intrasellüler bakterilerdir. İzolasyonda kompleks besiyerlerinin kullanılması gerekir (13). Brusella türlerinin üretilmesi için antibiyotikli-glikozlu-serumlu buyyon/ agar, brusella buyyonu ve agarı, çikolotamsı agar, albuminli buyyon ve agarı, kanlı jelöz gibi besiyerleri

kullanılabilmektedir (20). Besiyerlerindeki 2-3 günlük kolonileri küçük, yuvarlak, kabarık, saydam, şebnem tanesine benzeyen, kaygan ve S tipi koloni şeklindedir. Altı-yedi gün sonunda koloniler matlaşır ve ayrılmaya başlarlar. Eski kültürlerde R koloniler oluşur. R koloni formundakiler yassı, daha büyük çapta, mat ve granüllü bir yüzeye sahiptirler. S, R koloni tipi dışında ayrıca, intermedier (I) ve mukoid (M) özellik gösteren koloni tipleri vardır. Antibiyotik ve kimyasal madde ile karşılaşması sonrasında L formları meydana gelebilir (20).

## 1.6. Biyokimyasal Özellikler

Aerop ve mikroaerofil bakteriler olan *Brusella*'ların CO<sub>2</sub> ile üremeleri hızlanır. Özellikle *B.abortus* ilk izolasyonda % 5-10 CO<sub>2</sub>' li ortama ihtiyaç duyar. Optimal üreme ısı 37 °C olmakla birlikte, 10-40 °C arasında da üreyebilirler. Koloniler inkübasyondan 2-3 gün sonra görülebilir, 4-5 gün sonra 2-3 mm çapa ulaşırlar. Zengin besiyerlerinde düzgün kenarlı, konveks, nemli, parlak koloniler oluştururlar (20). *Brusella* türleri 60 °C de 10 dakika, %1 fenol eriğinde ise 15 dakikada canlılıklarını yitirirler. Sütte 17 gün, tereyağında 141 gün, dondurmalarda 1 ay, içme suyunda 8 °C de 57 gün 25°C de ise 10 gün, toprakta 10 hafta, keçi peynirinde +4 ile +8°C de 180 güne kadar canlı kalabilir. Pastörizasyon ile yeterli korunma sağlanabilmektedir (21).

*Brusella* türleri; *B.ovis*, *B.neotomae* ve *B.abortus*'un bazı suşları hariç oksidaz pozitif olup tüm suşlarında katalazı olumludur (7). *B.neotomae* dışında, besiyerlerinde karbondihidratlardan asit oluşturmazlar. H<sub>2</sub>S ve üreaz aktiviteleri değişkendir. *B.ovis* hariç nitratları indirgerler (13). Birçok *brusella* suşu polimiksin, sefalosporin, basitrasin, linkomisin ve nistatine dirençli olduğu halde çoğu gentamisin, tetrasiklin ve rifampine duyarlıdır (5,13). Diğer birçok gram negatif bakterilerin aksine *Brucella spp.*'nin hücre duvarında pilus, fimbria ve kapsül gibi kompleks yapılar bulunmaz.

*Brucella*'larda plazmid saptanmamıştır. Bakteride pilus bulunmadığından konjugasyon bildirilmemiştir. *Brucella*'ların faj enfeksiyonunu sonrası antibiyotiklere direnç geliştirdiklerinden transdüksiyon yaptıkları kabul edilmektedir. Nadir de olsa transformasyona uğradıkları bildirilmiştir (22).

## 1.7. Antijenik Yapı

*Brucella*'ların antijenik yapıları türlere göre farklılıklar göstermektedir. Ultrasantrifugasyon ya da dondurma-çözme işlemleri ile elde edilen karışım immunelektroforeze tabi tutulduğunda 20'den fazla antijen-antikor reaksiyonunun

varlığı görülür. Farklı suşlarla yapılan çalışmalarda, birçok *Brucella* antijeninin tüm suşlarda ortak olarak bulunduğunu bildirilmekle birlikte sadece somatik-LPS (lipopolisakkarid) antijenlerinin S tipinden olan ve olmayan suşlarda önemli farklılıklar gösterdiği ve dış membran proteinlerinin ise farklı türlerde değişik yapılarda oldukları gösterilmiştir. Major antijen olan LPS antijenleri hücre yüzeyinde yer aldıkları halde, protein antijenlerinin büyük kısmı hücre içinde bulunur (25,26)

### 1.7.1. Yüzey Antijenleri

*Brucella*'larda hücre zarı; gram negatiflerde olduğu gibi sitoplazmik membran periplazmik aralık ve dış membrandan oluşur. Smooth brusella lipopolisakkaritleri; Lipid A, core oligosakkariti ve O polisakkaritinden (OPS) oluşur (22). OPS zinciri, A ve M olarak tanımlanan iki epitop içerir. Farklı epitoplar oluşturan bu iki değişik konfigürasyon A ve M antijenlerini oluşturur. A antijeni *B. suis* ve *B. abortus*'ta; M antijeni ise *B. melitensis*'te fazla miktarda saptanmaktadır. A/M oranı *B. melitensis*'te 1/20 iken, *B. abortus*'ta 20/1 olarak tespit edilmiştir (27). Bu antijenler aglütinasyon reaksiyonlarından sorumludur. Bu epitoplar OPS'den yoksun R tipi suşlarda yoktur. Lipopolisakkaritin yapısı S tipi suşlar ve diğer gram negatif bakteriler arasında çapraz reaksiyona yol açar (20). *Brucella* cinsi bakteri antijenleri *E. coli* 0:116 ve 0:157, *Francisella tularensis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae* ve *Yersinia enterocolitica* 09 gibi bakteriler ile serolojik çapraz reaksiyon verirler.

### 1.7.2. Dış Membran Proteinleri

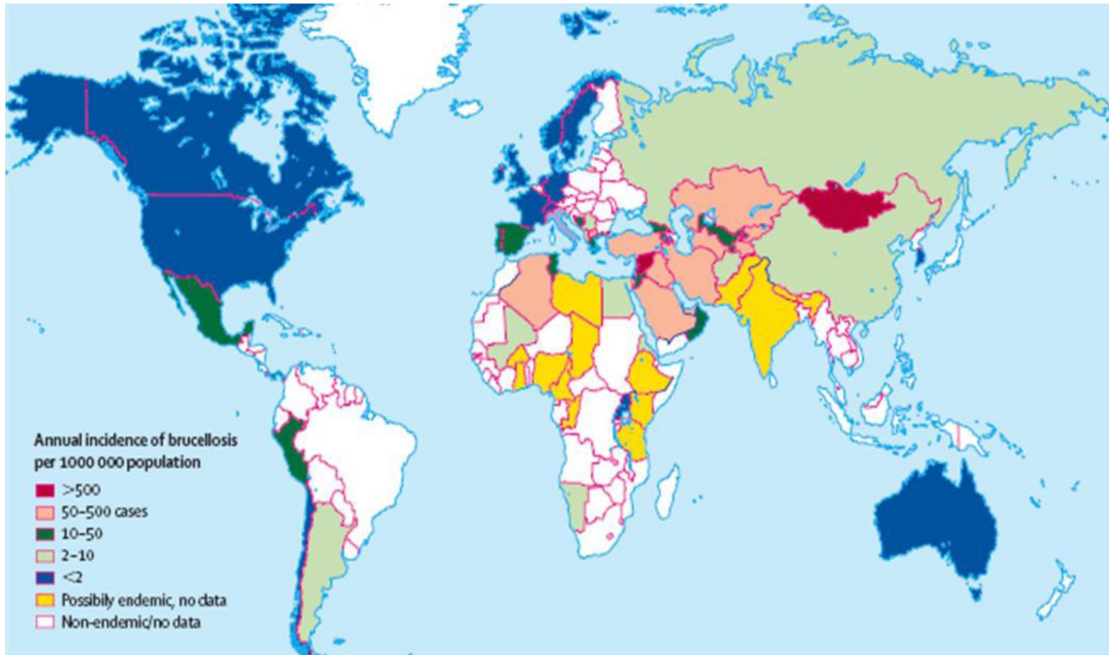
*Brucella spp.*'nin diğer önemli virulans faktörleri olan dış membran proteinleri (OMP) grup 1 (88-94 kDa), grup 2 (35-40 kDa) ve grup 3 (25-30 kDa) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Grup 2 proteinleri aynı zamanda porin proteinleri olarakta bilinmektedir. *Brucella spp.*'nin dış membranı fosfotidiletanolamin yerine fosfotidilkolinden zengindir. Bu özellik nedeni ile bakterinin LPS tabakasına polimiksin gibi antibiyotiklerin bağlanamadığı ve dolayısı ile söz konusu antibiyotiklere karşı bu bakteride doğal direnç olduğu belirtilmektedir. OMP2 porin protein profillerinin *Brucella* türlerini sınıflandırmada kullanılabileceği bildirilmektedir (23).

## 1.8. Epidemiyoloji

En sık görülen zoonotik hastalıklardan biri olan Brusellozda doğrudan veya dolaylı hayvan teması ile bulaş söz konusudur. Hastalık tüm dünyada görülebilmekle birlikte Akdeniz ülkeleri, Arap yarımadası, Hindistan, Meksika, Orta ve Güney

Amerika'da daha yoğundur. Gelişmiş ülkelerde (Kuzey ve Batı Avrupa ülkelerinin büyük çoğunluğu, Avustralya, Yeni Zelanda ve Kanada) Bruselloz eradike edilmiş olsa da gelişmekte olan ülkelerde hala önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre her yıl dünyada 500.000 yeni vaka belirlenmektedir (1).

Brusellozun dünya üzerindeki dağılımı Şekil 1'de görülmektedir.



**Şekil 1.**Dünyada Bruselloz insidansı (37).

Sağlık Bakanlığı verilerine göre Türkiye'de 1970 yılında 37 olarak bildirilen olgu sayısı (0.1/100000), 2005 yılına gelindiğinde 14644'e ulaşmıştır (20.32/100000) (38). Bu istatistiksel artışın, hastalığın prevalansındaki artıştan çok bildirim ve tanı koyma oranlarındaki artıştan kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Ülkemizde hastalık bildirimlerinin halen yeterli düzeyde olmadığı dikkate alınırsa, gerçek Bruselloz prevalansı sanıldığından daha yüksek olduğu söylenebilir.

Sağlık Bakanlığı istatistik verilerine göre ülkemizde yılda 10810 yeni vaka (morbidite hızı 16,43/100000) bildirilirken, Bruselloz nedeniyle ölüm 0-3 (mortalite hızı 0-0,05/1000000) arasında değişmektedir (T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, 2006). Toplam 147.391 Bruselloz olgusunun bölgelere göre analizlerinin yapıldığı bir çalışmada, Türkiye'nin güneydoğusunda artış eğilimi görülürken, özellikle 9 ilde (Diyarbakır, Mardin, Şırnak, Siirt, Batman, Bitlis, Muş, Van ve Hakkari) Bruselloz olgularında bir kümeleşme olduğu saptanmıştır. Bu durumun

bölgelerdeki çiftlik hayvanlarının (sığır, koyun, keçi de dahil olmak üzere) sayısı ile doğru orantılı olduğu gösterilmiştir (24)

Türkiye’de Bruselloz vaka-ölüm sayıları Tablo 3’de gösterilmiştir.

**Tablo-3.** Bruselloz Vaka ve Ölüm Sayıları, Morbidite ve Mortalite Hızları, Türkiye (1975-2006) (24, 29)

Yıllar	Yıl Ortası Nüfus	Vaka Sayısı	Morbidite Hızı(/100.000)	Ölüm Sayısı	Mortalite Hızı (/1.000.000)
1975	40.078.000	69	0,17	0	0
1980	44.438.000	186	0,42	0	0
1985	50.306.000	1.177	2,34	0	0
1990	57.582.446	5.003	8,69	2	0,03
1995	63.206.510	8.506	13,46	9	0,14
2000	67.844.903	10.742	15,83	6	0,09
2001	69.081.716	15.510	22,45	2	0,03
2002	70.415.064	17.765	25,23	1	0,01
2003	71.772.771	14.572	20,3	0	0
2004	71.152.000	18.264	25,67	2	0,03
2005	72.065.000	14.644	20,32	1	0,01
2006	65.789.167	10.810	16,43	3	0,05
2007		11649	0	0	0
2008		9896	0	0	0
2009		9324	0	0	0

Hastalık etkeni olarak ülkemizde en sık *B.melitensis* izole edilmektedir. Ulaşılabilen yayınlara göre Türkiye’de *B. suis*’e bağlı Bruselloz bildirimine rastlanmamıştır. Brusella bakterileri hayvanlarda yaşam boyu kalmakta ve kronik enfeksiyona yol açmaktadır. Brusella insanlara; pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketimi, infekte aerosollerin inhalasyonu, konjunktivaya inokulasyon ve enfekte hayvan sekresyonlarının bütünlüğü bozulmuş dokulara direkt teması ile bulaşır. İnsandan insana bulaş çok nadir olsada literatürde cinsel yolla bulaştığı ileri sürülen vakalar bildirilmiş ve meni kültüründe bakteri üretilmiş (30). Literatürde intrauterin geçtiği tahmin edilen bir olgu bildirilmiştir. Çiftçilikle uğraşan 26 yaşında bir



anneninin intrauterin gelişme geriliği ile doğan bebeğinde yapılan araştırmalar sonucu akut Bruselloz saptanmıştır. Bu olgu ile Brusellozun intrauterin geçebileceği sonucuna varılmıştır (28). Ülkemizde Bruselloz için temel bulaş kaynağı pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketimidir (31, 32). Hayvancılıkla uğraşanlar, veteriner hekimler, sağlık çalışanları, mezbaha işçileri, et sanayisinde çalışanlar Bruselloz açısından riskli gruplardır. Yapılan seroepidemiolojik çalışmalarda; Bruselloz açısından riskli olan kasaplar, besiciler, mezbaha ve mandıra çalışanları gibi meslek gruplarında %8,6-25, risk grubunda olmayanlarda %2,8 oranında seropozitiflik bildirilmiştir (33, 34). Türkiye’de hastalık genelde, koyunların yavrulama dönemleri ile peynir yapımının arttığı ilkbahar ve yaz aylarında daha siktir (35, 36).

Hastalık daha çok genç ve orta yaşlı erişkinleri tutmaktadır (1). Ülkemizde Bruselloz tanısı alan vakaların %50-60’ı 20-50 yaş arasında, %10-15’i çocuklarda, %10’u 65 yaş üzerindedir(35, 36, 39).

Brusellozun ülkemizdeki olası geçiş yolları tablo 4’te gösterilmiştir.

**Tablo 4.** Türkiyede Brusellozisin Bulaş Yolları (40).

<b>Bulaş Yolu (%)</b>	<b>Hatipoğlu<sup>25</sup> Ankara (n=202)</b>	<b>Taşova<sup>26</sup> Adana (n=238)</b>	<b>Koşar<sup>27</sup> Isparta (n=280)</b>	<b>Taşbakan<sup>28</sup> İzmir (n=109)</b>	<b>Gür<sup>29</sup> Diyarbakır (n=283)</b>	<b>Demirdağ<sup>30</sup> Elazığ (n=146)</b>
Çiğ süt ve süt ürünü kullanımı	94.6	53	30	67.9	72	76.7
Hayvancılık, mesleksel temas	70.3	31	90	29.4	47	-
Laboratuvar teması	-	-	1	3.3	6	-
Bilinmeyen	2.4	16	13	-	36	-

## 1.9. Korunma

İnsan Brusellozunun kontrolü için evcil hayvanlarda hastalığın kontrolü ve eliminasyonu gereklidir. Etkili canlı bakteri aşılı *B.abortus* (suş 19) ve *B. melitensis* (suş Rev-1) türleri ile hazırlanmıştır. *B. suis* veya *B. canis*'e ile hazırlanan aşı yoktur.

İnsanlara Brusellozun bulaşının önlenmesi, süt ve süt ürünlerinin pastörize edilerek kullanılması veya sütlerin iyi kaynatıldıktan sonra tüketilmesi gerekmektedir. Toplumda çiğ süt tüketilmemelidir (41, 42).

Laboratuvar kaynaklı bulaşın önlenmesinde enfekte materyalle temasın önlenmesi için eldiven, gözlük, maske ve önlük gibi kişisel koruyucu ekipmanların kullanılması önerilmekte ve özellikle kültür plaklarının yeterli biyogüvenlikli oratmalarda (BSL-2 laminer akım kabinleri) açılması önerilmektedir (43, 44).

## 1.10. Patogenez

*Brucella* türleri ile gelişen enfeksiyonlar oldukça ciddi klinik tablolara neden olabilmektedir. Konağın immün ve beslenme durumu, enfeksiyöz inokulumun miktarı ve muhtemel bulaş yolu hastalığın gidişatını belirleyici etkenlerdir. Örneğin; mide sıvısı pH'sının düşük olması *B.abortus* ve *B.melitensis* ile gelişebilecek enfeksiyonların önlenmesinde etkili bulunmuştur (45). Benzer olarak antiasit kullanımı besin kaynaklı enfeksiyon gelişmesinde olumsuz etkiye bulunabilmektedir (46)

Fakültatif hücre içi patojenler olan *Brucellalar*, konak fagositer hücreleri içinde yaşama ve çoğalma kapasitesine sahiptirler. *Brucella*'nın polimorf nüveli lökositlerin intrasellüler öldürme mekanizmalarından, lizozim içindeki primer ve sekonder granüllerin degranülasyonlarının önleyerek ve myeloperoksidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sistemini engelleyerek kaçtığı düşünülmektedir. Ayrıca Cu-Zn superoxide dismutase enzimi ile serbest oksijen radikallerini etkisiz hale getirdiği sanılmaktadır (47). Bakteriler lizozomal enzimlere dirençlidir. Fagozom-lizozom birleşmesi ve apoptozisin önlenmesi ile mononükleer hücreler içinde yaşamaları kolaylaşır (48, 49). *B.melitensis*, PMNL içindeki bakteri öldürücü mekanizmalara direnç gösterir. Bu olayda, bakterinin içerdiği adenin ve guanozin monofosfat etkinliği ile PMNL'nin degranülasyonunun önlenmesinin önem taşıdığı sanılmaktadır. *B.suis* invaziv etkilidir fokal nekroz ve süpürasyonlara sebep olur. *B.abortus* daha az invaziv olup hafif bir hastalık tablosuna yol açar ve invaze olduğu organda nekroz ve süpürasyon içermeyen granülomlar oluşturur. *B.canis* insanda bakteriyemi, lenfadenopati, splenomegali ve hafif bir hastalık

tablosu oluşturur (50). Enfeksiyon sonrası *Brucella*; dalak, karaciğer, lenf nodları ve kemik iliği gibi retiküloendotelial sistem organlarında kalabilir.

Th<sub>1</sub> hücre tipi aracılı immünite ve makrofajların aktivasyonu ile virülan *Brucella* suşları elimine edilir. Makrofajlarda antibrucella aktivitesi gösteren ana sitokinler; tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), TNF- $\gamma$ , interlökin-1(IL-1) ve IL-12 dir (51). Brusellanın baskın immünojen antijeni ve ana virülans belirteci S-LPS'dir. Nonsmooth suşlar normal serumda lizise daha duyarlı olup düşük virülansa sahiptirler. *B.canis* ve *B.ovis* gibi vahşi suşların kısıtlı bir konak yelpazesi olup diğer türleri infekte etme kapasiteleri sınırlıdır (52).

### 1.11. Konak İmmünitesi

Domuz ve sığırlarda *Brucella* enfeksiyonuna karşı doğal direnç rapor edilmiştir. Doğuştan dirençli sığırlardaki makrofajlar *B.abortus*'un intrasellüler replikasyonunu daha iyi kontrol etmektedir (53). Bu veriler; sığır homolog Nramp 1(doğal direnç ile ilişkili makrofaj proteini 1) murine geninin Bruselloz direncini belirlemek için major gen olduğu hipotezini desteklemektedir (54). Brusellozda kazanılmış immün cevap IgM antikorların enfeksiyonun birinci haftasında görülmesi ile karakterizedir. Bunu ikinci hafta sonunda IgG sentezi izler (55). İyileşme ile IgM ve IgG antikorları düşüş gösterir. IgG antikorlarının yüksek seyretmesi relaps veya kronik enfeksiyonu gösterir (56, 57).

### 1.12. Klinik Bulgular

Bruselloz ateş, baş ağrısı, bel ağrısı, iştahsızlık, huzursuzluk ve terleme gibi özgül olmayan semptomlara neden olmaktadır. Hastalığın başlangıcı sinsi ya da akut olabilmekle birlikte, genellikle mikroorganizmanın alınmasından sonra iki ila dört hafta içinde gerçekleşir. Uzun süre tedavi edilmemiş hastalarda ondülan ateş paterni gözlenir. Bazı hastalar kötü kokulu terleme ve tuhaf ağız tadı şikayeti ile hastaneye başvurur. Depresyon yaygın bir semptom olup diğer semptomların şiddeti ile ilişkisizdir. Somatik şikayetlerin çokluğuna oranla fiziksel şikayetler azdır. Hastaların %10-20'sinden azında lenfadenopati bildirilmiş olup %20-30 hastada hepatomegali ve splenomegali saptanmıştır (58).

Bruselloz tüm organ ve sistemlerin etkilendiği sistemik bir enfeksiyondur. Hastalığın süresi ve şiddetine göre Bruselloz akut, subakut ve kronik olarak sınıflandırılmıştır (23). Tedaviyi takiben, hastalığın relapsı ile ilişkili ya da ilişkisiz semptomların nüksü görülebilir (59). Bakteriyolojik relaps; tedavinin durdurulmasından

sonra ve antibiyotik direnci ile ilişkisiz olarak 3 ile 6 ay arasında görülebilir (60). Kronik Brusellozda genellikle kemik, dalak, karaciğer gibi organlarda persistan enfeksiyon odakları görülür (61). Kronik Brusellozda ateş gibi objektif semptomlar tekrarlayabilir. Önemli laboratuvar bulgularından biri yüksek titrede Ig G persistansıdır (57,62). Bazı hastalarda gecikmiş nekahat ile birlikte antikor titrelerinde yükselme ve objektif hastalık bulguları olmaksızın persistan ve nonspesifik şikâyetler görülmektedir. Bu gecikmiş nekahat süreci çok az anlaşılabilmeyle birlikte bazı otoriteler önceden var olan Brusellozun şiddetlenmesini temsil ettiğine inanmaktadırlar (63,64).

### **1.13. Komplikasyonlar**

#### **1.13.1. Gastrointestinal Sistem**

Bruselloz hastalarının %70 inden fazlasında anoreksi, kusma, karın ağrısı, diyare ya da kabızlık ve bulantı gibi şikâyetler ortaya çıkabilir. Peyer plaklarının inflamasyonu ile birlikte intestinal mukozada hiperemik patolojik lezyonlar izlenebilir. *B.melitensis* ile enfeksiyon sonrası kolit gelişen hastalarda histolojik ve radyolojik olarak akut ileit tablosu gösterilebilir (65,66).

#### **1.13.2. Hepatobiliyer Sistem**

Hepatik tutulum Bruselloz hastalarında sık görülmesine rağmen transaminaz değerlerinde yükselme olmayabilir. Hepatik patoloji spektrumu etyolojik ajana göre çeşitlilik gösterir. Örneğin *B.abortus* enfeksiyonu sarkoidozdan ayırlamayacak derecede granülomlarla karakterizedir (67). *B.melitensis*'te ise viral hepatite benzeyen küçük, diffüz, belirgin olmayan inflamasyon alanlarında mononükleer hücrelerle çevrelenmiş nekrotik alanlar görülür (68). Hepatit tablosu antibiyoterapi ile geriler. *B.suis* ve *B.melitensis*'te karaciğer ve dalakta cerrahi girişim gerektirebilecek kronik süperatif abseler görülebilir (69,70). Brusellozda nadiren de olsa pankreatit, spontan peritonit ve akut kolesistit görülebilir.

#### **1.13.3. İskelet Sistemi**

Osteoartiküler komplikasyonların, hastanın yaşı ve bakterinin türüne bağlı olarak %10 ila %80 dolayında olduğu gösterilmiştir (58). Sakroileit (71) ve spondilit (72) en sık görülen görülen komplikasyonlar olup bu bölgeler aynı zamanda tutulumun en sık olduğu yerlerdir. Radyolojik bulguların geç ortaya çıkmasına rağmen kemik taramasında erken zamanda inflamasyon gösterilebilir. Bilgisayarlı tomografi; eklem hasarı, vertebral osteomyelit ve paraspinal abselerin gösterilmesinde kullanılır (73).

Fazla yük taşıyan eklemlerde (özellikle kalça, diz ve ayak bileği) küçük eklemlere oranla daha fazla efüzyon görülür. Bu efüzyon lenfositten zengin olup ancak yarısında brusella izole edilebilir (74). Enfeksiyon sonrası spondiloartrit, bursit, tenosinovit ve eklem protezi inflamasyonu da gösterilmiştir (75).

#### **1.13.4. Sinir Sistemi**

Depresyon ve dikkatte azalma Bruselloz hastalarında sık görülmekle birlikte santral sinir sistemi invazyonu %5'ten az hastada görülür. NöroBruselloz başlığı altında; menenjit, ensefalit, miyelit, radikülönöronit, beyin absesi, epidural abse, granülom, demiyelinizasyon ve meningovasküler sendromlar görülebilir. Akut ya da kronik menenjit en sık görülen sinir sistemi komplikasyonu olmakla birlikte klinik olarak multiple skleroza benzer (76,77, 78). Serebrospinal sıvı analizinde lenfositik pleositoz, artmış protein ve düşük ya da yüksek glikoz seviyeleri saptanabilir. Gram boyama genellikle negatif olmakla birlikte etken, olguların %25'inden azında kültürle izole edilebilir. Bununla birlikte tanı, serebrospinal sıvıda spesifik antikorların saptanması ile konur (79). Tedavi edilmiş nöroBrusellozun prognozu iyi olmakla birlikte nadir de olsa nörolojik sekel vakaları bildirilmiştir (80).

#### **1.13.5. Kardiyovasküler Sistem**

Endokardit hastaların %2'sinden azında görülür fakat Bruselloz ilişkili ölümlerin çoğunun sebebi bu hastalıktır (81). Efektif tedavi ve kalp kapak replasmanı cerrahisi öncesinde brusella endokarditi ölümcül seyredebilmektedir (82). Aortik kapak en fazla tutulan kapak olup doğal ve prostetik kapakların her ikisinde de gösterilmiştir. Perikardit ve beyin, aorta ve diğer damarlardaki mikotik anevrizmalar sekonder komplikasyonlardır. Derin ven trombozu akut Brusellozda nairin görülen bir komplikasyondur (83). Yeni kan kültürü teknikleri ve ekokardiyografi erken tanı şansını artırıp cerrahi gereksinimini azaltmıştır (84).

#### **1.13.6. Solunum Sistemi**

İnhaler yolla bulaş en sık mezbahalarda görülür. Solunum yolları tutulumu; radyolojik bulgusu olmayan grip benzeri sendromdan bronşit, bronkopnömoni, akciğer nodülleri, abse, yaygın lezyonlar, hiler adenopati ve plevral efüzyon-ampiyeme kadar uzanır (85). Nadiren de olsa etken, balgam kültürü ve gram boyaması ile saptanabilir.

### 1.13.7. Genitoüriner Sistem

Brusella etkeni idrardan elde edilebilmesine rağmen Brusellozda renal komplikasyonlar nadirdir. İnterstisyel nefrit, pyelonefrit, glomerülonefrit ve IgA nefropatisi bu hastalarda tanımlanmıştır. Nadiren de olsa tüberküloza benzeyen kalsiyum depozitli renal abse vakaları da tanımlanmıştır (86). Erkek hastaların %20'sinden fazlasında genellikle tek taraflı ve normal idrar sedimentli epididimorşit gösterilmiştir (87).

### 1.13.8. Gebelik

Hayvanlarda gebelik esnasında oluşan Bruselloz hastalığı genellikle abortusla sonuçlanır. Hayvanlarda eritritol bulunan dokuların varlığı hayvanın brucella'ya karşı duyarlı hale gelmesinde rol oynar. Bruselloz insanlarda da abortus nedeni olabilmekte birlikte diğer bakteriyemik enfeksiyonlardan önemli bir farklılık göstermez. *B.melitensis*'in endemik olduğu bölgelerde hamile kadınlar arasında abortus oranının yüksek olduğu ve erken tanı ve hızlı tedavinin fetal hayatı koruduğuna yönelik bilgiler vardır (88).

### 1.13.9. Hematolojik Komplikasyonlar

Brusellozda anemi, lökopeni, trombositopeni ve pıhtılaşma sorunları gibi hematolojik bulgular ortaya çıkabilir. Bu bulgular genellikle hafif seyretmekle birlikte tedavi ile kısa sürede geriler (89). Yüzdeyetmişbeşten fazla olguda kemik iliğinde granülomlar saptanmıştır. Nadiren ciddi trombositopeniyle birlikte kutanöz purpura ve mukozal kanamalar görülebilir. Etyolojiye bağlı olarak hipersplenizm, reaktif hemofagositoz ya da trombositlerin immün parçalanması izlenebilir (90).

### 1.13.10. Deri Lezyonları

Bruselloz hastalarının yaklaşık %5'inde deri lezyonları görülür. Kızarıklık, papül, ülser, abse, eritema nodozum, peteşi, purpura ve vaskülit gibi sıklıkla nonspesifik ve geçici lezyonlar görülmektedir (91). Enfekte hayvanlarla temas halinde bulunan veterinerlerde kontak dermatit sık rastlanan bir deri lezyonudur (92).

### 1.13.11. Göz Lezyonları

Bruselloz hastalarında çok çeşitli göz lezyonları raporlanmıştır. Üveit sıklıkla geç bir komplikasyon olup kronik iridosiklit, nummuler keratit, multifokal koroidit ve optik nörite bağlı gelişebilir (93). Brucella üveiti enfeksiyondan bağımsız immün

yanıtla oluşup sistemik kortikosteroidle tedavi edilir. Nadiren brusellanın vitröz sıvıdan izolasyonu ve endojen endoftalmitis vakaları saptanmıştır (94).

## 1.14. Klinik Tanı

Tanıda hastanın hikayesi, fiziki muayenesi, radyolojik bulgular ve laboratuvar verileri gereklidir. Kesin tanı mikrobiyolojik yöntemlerle elde edilen bulgular sonunda belirlenmektedir. *Brucella*'nın hücre içi yerleşen bakteri olması, insanlarda klasik belirtileri dışında her türlü hastalığı taklit etmesi, bakteri izolasyonundaki bazı güçlükler, alt tipleri, alışılmış serolojik ve fizyolojik yollarla birbirinden ayırmanın zorluğu, hastalığın klinik ve serolojik tanısında bazı güçlükleri beraberinde getirmektedir. Rutin laboratuvar incelemelerinde sıklıkla anemi, lökopeni, lenfomonositoz, nadiren trombositopeni, hemolitik anemi, yaygın intravasküler koagülasyon, pansitopeni şeklinde hematolojik bozukluklar gözlenmektedir. Sedimentasyon hızı ortalama olarak 35-40 mm/h'dir. Karaciğerde sık yerleşim gösterdiklerinden, karaciğer fonksiyon testlerinde yükselmeler saptanabilir. Hastanın yüksek ateşli olduğu dönemde idrarda febril albüminüri, ürobilinojen artışı görülebilir (95).

### 1.14.1. Bruselloz Tanısında İncelenen Örnekler

Brusellozda kültür alınan örneklerin başında kan ve kemik iliği, daha az olarak da dalak ve karaciğer biyopsileri, abse, BOS, eklem, periton ve perikard sıvıları ve idrar örnekleri bulunmaktadır (13). Kültür için alınan bakteriyolojik örnekler en geç 2 saat içerisinde uygun besiyerlerine ekilmelidir. Eğer bu süre içinde ekimlerin yapılması mümkün olamayacaksa 4-10 °C'de bekletilmesi gerekmektedir. Serolojik çalışmalar amacıyla en sık alınan örnek ise serumdur. Akut dönemde serolojik çalışmalar için serum örneklerinin hastalığın başlangıcında; iyileşme döneminde ise akut dönemden 21 gün sonra alınması uygundur (96).

## 1.15. Brusellozun Kesin Tanısında Direkt ve İndirekt Yöntemler

### 1.15.1. Direk Tanı

#### 1.15.1.1. Kültür

Brusellozun tanısında altın standart etkenin kan, kemik iliği veya diğer doku kültürlerinde üretilmesidir. Hastanın klinik seyri ve komplikasyon gelişimi doğrultusunda idrar, eklem mayi, beyin omurilik sıvısı, lenf bezi ponksiyonu ile alınan

sıvı, apse materyali, diğer vücut sıvıları ve dokularından kültür yapılabilir. İlk izolasyonlarda bakteriler yavaş ürediklerinden 30 gün bekletilmeden kültürler üreme olmadığı nedeniyle atılmamalıdır (4, 7, 14, 21, 53, 54).

Kullanılan metod ve inkübasyon süresinin uzunluğuna bağlı olarak kan kültürlerinden izolasyon oranı % 15-70 arasında değişmektedir. İntraselüler bir patojen olan brusellaların, kemik iliği kültürleri, kan kültürüne göre daha yüksek oranda izolasyon imkanı vermektedir. Gotuzzo ve arkadaşları (56) kemik iliği kültürlerinde %92, kan kültürlerinde %70 oranında üreme saptamıştır. Ancak kemik iliği kültürü invaziv bir yöntem olduğundan tanı zorluğu olan hastalarda kullanılır. Antibiyotik kullanımı etkenin izolasyon oranını düşürmektedir (4, 33).

Brusellaların 30-35 günü bulan kültür süresi otomatize kan kültür sistemleri (BACTEC, Dupont, Isolator vb.) ile çok kısalmıştır. *Brucella* izolasyon süresi ayrıca lizis santrifigasyon yöntemi ve düşük miktarda bakteri saptayabilen diğer sistemlerle kısaltılabilir. Lizis santrifigasyon yöntemi ile üremenin artırılması için santrifüj aşamasında organizmaların konsantrasyonu sağlanır, ardından kan hücrelerinin osmotik lizisi yapılır. Ekim, agar besiyerine veya kan kültür şişesine yapılır (57, 58). Bir çok çalışmada otomatize sistemlerle inkübasyon süresini 21 gün olarak belirlendiğinde, örneklerde tespit oranının %100'e yakın olduğu bildirilmiştir (23, 59, 60).

Patojen brusella türleri yavaş ürer otomatize kan kültür sistemi ile bakteri ilk yedi gün içerisinde yaklaşık %90 oranında izole edilebilir, ancak negatif sonuç alınan kültürlerin 2-3 hafta sonra tekrar pasajlarının yapılması önerilmektedir (97, 98). Laboratuvar çalışanlarına aerosol yolu ile bulaşabileceği için tüm çalışmalar biyolojik güvenlik kabiniinde yapılmalıdır (99).

#### **1.15.1.2. Moleküler Tanı**

Brusellanın tür seviyesinde identifikasyonunda geleneksel yöntemler, karmaşık, yoğun emek istemekte ve yavaş üremesinden dolayı da sonuçlar birkaç günde alınmaktadır. Moleküler yöntemler, canlı organizmalarla çok az temasa olanak sağlaması ve hızlı bir şekilde sonuca ulaşılması ile identifikasyonunun konvansiyonel yöntemlerine alternatif bir yöntem olarak kabul edilebilir. Brusellozun tanısında PZR hızlı, kolay, spesifik ve düşük maliyetli bir yöntemdir. PZR yöntemi Bruselloz tanısında büyük ilerlemeler kaydedilmesine yol açmıştır. PZR ile *Brucella*'nın bütün türlerde korunan genetik bir lokusu (BCSP13 veya 16S rRNA genleri) aracılığıyla cins seviyesinde saptanabilmektedir. Aynı zamanda PCR ile omp43, omp31, 16SrRNA geni



23S ile 16S bölgesi, ısı şok protein genleri ve perosamine sentetaz genleri hedef alınarak brusella türleri ayırt edilebilmektedir. Kültürde üretilen bakterilere PZR ile identifikasyon yapılabilmekte fakat doku, kan, semen gibi örneklerden PZR ile nükleik asit saptaması oldukça güç olmaktadır (100-101).

## **1.15.2. İndirek Tanı Yöntemleri**

### **1.15.2.1. Hızlı Aglutinasyon Testleri**

#### **1.15.2.1.1. Rose-Bengal**

Bruselloz tanısının kısa sürede konulmasını sağlayan *B.abortus* 99 suşunun boyalı antijen olarak kullanıldığı bir lam aglutinasyon testidir. Lam üzerine 0.003 ml antijen ve aynı miktarda hasta serumu damlatılır. Dört dakika süre ile karıştırılıp aglutinasyon olup olmadığı değerlendirilir. Pozitif bulunduğu anda standart tüp aglutinasyon testi (SAT) ile doğrulanmalıdır (13).

#### **1.15.2.1.2. Tam Kan Lam Aglutinasyonu**

Hayvan Brusellozunun epidemiyolojik olarak taranması amacıyla kullanılmaktadır. Lam aglutinasyon deneyi (SPOT testi) yoğun *Brucella* bakteri süspansiyonundan hazırlanmış antijenin bir damlası üzerine, parmak ucundan alınan bir damla kan damlatıldığında, aglutinasyonun görülmesi prensibine dayanır. Bu testin özgüllük ve duyarlılığı tüp dilüsyon metoduna benzer olsa da, çevresel koşullardan etkilenmesi nedeniyle tercih edilmez (20).

#### **1.15.2.1.3. Mikroaglutinasyon**

Safranin O gibi çeşitli boyalarla boyanan *Brucella* antijenlerinin kullanıldığı, daha kısa inkübasyon zamanı ve daha az antijen gerektiren bir testtir (1).

#### **1.15.2.1.4. Kart Test**

Hayvan serumunu değerlendirmek için hazırlanmış, tamponlanmış, boyanmış bakteri süspansiyonunun kullanıldığı makroskopik bir aglutinasyon testidir (103).

### **1.15.2.2. Tüp Aglutinasyon**

#### **1.15.2.2. 1. SAT (Wright Aglutinasyon)**

Standart Tüp Aglutinasyon testi (STA) Bruselloz tanısında kullanılan standart serolojik testtir. İlk kez Wright tarafından 1897 yılında uygulanan test, *B. abortus* S99 veya *B. abortus* 1119 kökenlerinden alınan bakterilerin, ısı ile öldürülmüş fenollü

süspansiyonundan elde edilen antijenin, hasta serumunun ardışık dilüsyonları ile karşılaştırılması esasına dayanır. Bu antijen *B. abortus*, *B. suis* ve *B. melitensis*'e karşı oluşmuş antikorlar tarafından aglütine edilir. Tanı için titrenin 1:100 ve üzerinde olması ve 10-14 gün sonra titrenin yüksek bulunması anlam taşır. Uygun antibiyotik tedavisine rağmen vakaların %5-72'sinde STA test titrasyonları iki yıla kadar yüksek kalabilmektedir (104).

#### **1.15.2.2.2. Rivanol veya 2 Merkapto-etanol**

STA testinde tüm immünoglobulinlerin titresi belirlenir. Hastalığın ilk haftasında ortaya çıkan IgM, 3. ayda en yüksek düzeye ulaşır. Hastalığın başlangıcında yükselmeye başlayan IgG ise 6-8 haftada en yüksek düzeye ulaşır. IgG antikorlarının titresini bilirleyebilmek için, IgM'in 2-merkapto-etanol'e duyarlılığından faydalanılır. Aglütinasyon testi, serum fizyolojik yerine rivanol veya 0.05 M 2-merkapto-etanol konulduğunda IgM'deki bisülfid köprülerini kırarak antikorları depolimerize eder ve bunların aglütinasyon etkinliklerini yok ederler. Sonuçta, elde edilen sonuç sadece IgG antikorlarına ait olacaktır.

Rivanol veya 2-merkapto-etanol ile işlem görmüş serumlarla yapılan aglütinasyon deneylerinde müspetliğin devam etmesi IgG antikorlarına bağlı olup hastalığın süregenleştiği anlamını taşır. Önce olumlu iken bu işlemlerden sonra olumsuz sonuç alınması ilk aglütinasyonun IgM antikorlarına bağlı olduğu anlamını taşır. Bruselloz tedavisinden sonra IgG antikorlarının yükselen titrelere çıkması olgunun kronikleştiği ve tedavinin sürdürülmesi gerektiği anlamını taşır (95).

#### **1.15.2.2.3. Coombs'lu Aglutinasyon Testi**

Klinik olarak Bruselloz belirtileri olduğu halde yapılan aglütinasyon deneylerinin olumsuz olması, Brusellozda sık rastlanan bir durumdur. Bu durumun en olası nedeni antikorların antijenlere bağlandıkları halde aglütinasyon reaksiyonu oluşturmasını engelleyen mekanizmanın bulunmasıdır (20). Bloke edici ya da blokan antikorlar olarak tanımlanan bu tip immunoglobulinlerin varlığında, antijen-antikor birleşmesi gerçekleşmekte, fakat aglütinasyon meydana gelmemektedir. Bu antikorlar Coombs serumu (antihuman immünglobulin) kullanılmak suretiyle ortaya çıkarılır. Ortama ilave edilen coombs reaktifi, gerçek seropozitifliğin ortaya çıkmasını sağlar (20).

Özellikle kronik Brusellozda bazen antikorlar blokan tiptedir. Blokan antikorlar IgG ya da IgA yapısındadır. İlk kez Griffiths tarafından 1947'de tanımlanmıştır. Smooth

LPS'e karşı oluşan antikorlardır ve IgG1 ve IgG2 izotipleridir (105). Coombs testinde, STA testinde aglütinasyon görülmeyen tüpler, serum fizyolojik ile üç defa yıkayıp yeniden süspansiyon yapıldıktan sonra, her tüpe bir damla Coombs serumu damlatılır. Otuz yedi santigrat derecede 24 saat bekletildikten sonra test değerlendirilir. Böylece blokan antikorların etkisi ortadan kaldırılmış olur. Bu testin özellikle düşük titrede antikor içeren veya negatif sonuç alınan kronik olguların belirlenmesinde önemi vardır (95, 20, 106).

Hastalığın erken ve geç dönemlerinde, yüksek miktarda antikor bulunan serumlarda daha sık olmak üzere prezon postzon sorunu ve diğer bloke edici fenomenler nedeniyle yanlış negatif sonuçlar elde edilebilir. Prezon (antikor), postzon(antijen) sorunu ve blokan antikorlara bağlı gelişebileceği gibi, ortamda eşit miktarlarda antijen ve antikor bulunmamasına bağlı olarak da ortaya çıkabilir. Özellikle serum yüksek titrede antikor içerdiği zaman aglütinasyon düşük serum dilusyonlarında maskelenebilir. Bu duruma “antikor fazlalığı zonu” veya “prezon”, antijen fazlalığı durumunda ise “postzon” adı verilir. Ancak serum örnekleri sulandırılmalarının oldukça ileri oranlarda tutulması ile prezon ve postzon olayı önlenir (20).

#### **1.15.2.2. 4. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

Akut ve kronik Bruselloz tanısında immünglobulin sınıflarının profilini veren hızlı, yüksek duyarlılık, özgül ve güvenilir bir yöntemdir (107). NöroBruselloz vakalarında, BOS'da antikor aramak için ELISA testi uygun bir yöntemdir (96). Son zamanlarda geliştirilen ‘Competitive Enzyme Immunoassay (CELISA)’ testinin özgüllüğü %96,5-100; duyarlılığı ise %94,8-100 arasında bulunmuştur. İnsan Brusellozunun tanısında uygun bir test olduğu ve bir doğrulama testi olarak kullanılabilirliği bildirilmektedir (108).

#### **1.15.2.2.5. Kompleman Fiksasyon Testi (KFT)**

KFT en duyarlı ve en özgül konvansiyonel serolojik yöntem olması nedeniyle Bruselloz tanısında doğrulama testi olarak kabul edilmektedir. STA testi sonuçlarının yetersiz kaldığı veya negatif olduğu durumlarda inkübasyon dönemi, geç kronik safha veya aşılmalarda KFT önemli bir tanı yöntemidir (1).

#### **1.15.2.2.6. Brucellacapt ®**

Bir hemaglütinasyon yöntemidir. Kuyucuklar insan kaynaklı IgG, IgM ve IgA antikorlarına karşı antikorlarla (Coombs' antikorları) kaplıdır. Kuyucuklarda

sulandırılan hasta serumu üzerine boyalı *B.abortus* antijeni damlatılır ve 24 saat 37<sup>0</sup>C’de inkübasyon sonrasında reaksiyon değerlendirilir. *Brucella*’ya karşı oluşan her üç tip antikor ve blokan antikorları da tespit ettiği için saptadığı titreler STA ve Coombs’ yöntemine göre daha yüksek, duyarlılık ve özgüllüğü de bu yöntemlere göre daha fazladır (109).

#### **1.15.2.2.7. Brucella Dipsitick Test**

Brusella spesifik IgM antikorlarının araştırılması için yararlıdır. Uygun laboratuvar şartları olmayan yerlerde ve kırsal bölgede hızlı tanı testi olarak kullanılabilir (106).

#### **1.15.2.2.8. İndirekt Fluoresan Antikor Testi (IFA)**

Özel bir lam üzerine tespit edilen brusella antijeni üzerine, hasta serumu eklenip inkübasyon ve yıkama işlemleri uygulanmaktadır. Antijen –antikor birleşmesini göstermek için, fluoresan madde ile işaretlenmiş insan anti-globulin serumu kullanılmaktadır. Duyarlı ve özgül bir testtir (20).

#### **1.15.2.2.9. Radioimmunoassay (RIA)**

Duyarlılığı yüksek bir testtir. İmmunglobulin gruplarını ayrı ayrı tespit edebilmesi nedeniyle akut ve kronik olguların ayırt edilmesine olanak sağlar (110).

#### **1.15.2.2.10. Deri Testleri**

Brusellozda allerjik deri testleri, tamamlayıcı test olarak yararlı olmaktadır. En sık kullanılanı ise “Brucellergen” deri testidir. Brucellergen bir nükleoprotein kompleksi olup deri içine şırınga edildikten sonra 24 saat içerisinde enjeksiyon yerinde kızarıklık, ödem ve endurasyon oluşması, kişinin brusellaya karşı aşırı duyarlı olduğunu gösterir. Hastaların birçoğunda bu test pozitif ise de, negatif olması Bruselloz tanısından uzaklaştırmaz (13).

#### **1.15.2.2.11. Hayvan Deneyleri**

Kobaylar brusellaya karşı duyarlıdır. İncelenecek materyal periton içi, kas içi veya konjunktivanın da dahil olduğu herhangi bir yol ile inoküle edilir. Deneyde iki kobay kullanılır. Bunlardan birisi inokülasyondan 3 hafta, diğeri 6 hafta sonra öldürülür. Otopside; dalak, karaciğer ve lenf bezlerinde miliyer nekrotik odaklar görülür. Periton içi-inokülasyondan sonra erkek kobaylarda orşit gelişir, gebe dişi kobaylar ise düşük yaparlar (13).

### 1.15.2.2.12. Radyolojik Tetkikler

İskelet sistemi tutulumu olan olgularda radyolojik tetkikler yararlıdır. Radyolojik değişiklikler en çok vertebra korpuslarının kenarlarında dikkat çekicidir. İntervertebral aralıklarda daralma %90 vakada saptanabilir. Vertebral osteomyelit, sakroileit veya artritten şüphelenilen olgularda ilgili bölge bilgisayarlı tomografi (BT) veya magnetik rezonans (MR) ile görüntülenmelidir. Organ ve eklem tutulumlarının belirlenmesinde radyoizotop maddeler ile yapılan sintigrafik tetkikler tanı koydurucudur. Tc99m MDP (metilen difosfonat) kemik sintigrafisi Bruselloza bağlı osteoartiküler komplikasyonların teşhisinde oldukça kullanışlıdır (111).

## 1.16. Tedavi

### 1.16.1. Antimikrobiyallerin Kombine Kullanım İlkeleri

Enfeksiyon hastalıklarının çok büyük bölümü tek bir antimikrobiyal ile tedavi edilebilir. Bazı durumlarda birden fazla antimikrobiyalin birlikte kullanılması gerekebilir. Bunun sonucunda da dirençli bakteri kökenlerinin gelişimi, istenmeyen etkilerin ortaya çıkması, ekonomik kayıp gibi önemli olumsuz etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle kombinasyon tedavisi uygulanacağı zaman buna neden gerek görüldüğü iyice belirlenmeli ve o amaca yönelik en uygun kombinasyon için seçim yapılmalıdır.

Kombinasyon tedavi endikasyonları (112, 113):

- 1) Etkin bir antimikrobik etki alanı sağlamak
- 2) Bakterilerde antimikrobiklere karşı direnç gelişimini yavaşlatmak.
- 3) Antimikrobiklerin toksik etkilerini azaltmak.
- 4) Polimikrobiyal enfeksiyonların tedavisi.
- 5) Sinerjizm elde etmek

Sinerjizm: Antibiyotikler tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen etkilerin toplamından daha fazla etki.

Aditif etki: Antibiyotikler tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen etkilerin toplamına eş etki.

Antagonist etki: Antibiyotikler tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen etkilerin toplamından daha düşük etkiyi ifade eder.

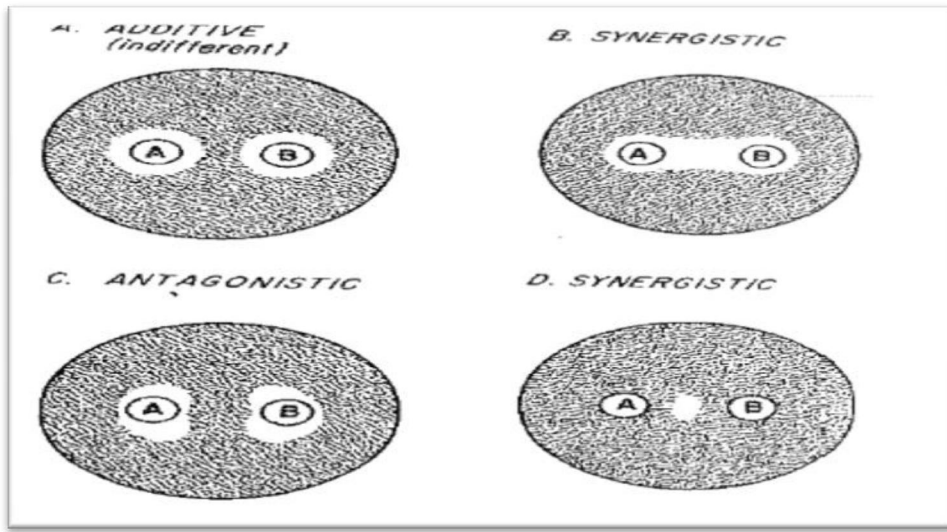
### 1.16.2. Antibiyotik Kombinasyonlarının İn Vitro Etkinliğini Ölçen Testler

1. Disk difüzyon yöntemi (Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi)

2. Checkerboard (Dama tahtası) yöntemi
3. Zamana bağlı öldürme (time-kill) yöntemleri
4. Etest yöntemi

#### 1.16.2. 1. Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi

Çift disk sinerji yöntemi; diskler arası mesafe, diskler tek tek çalışıldığında elde edilen zon çaplarının toplamına eşit ya da daha fazla olmasına dikkat edilmelidir. İnkubasyon sonrası değerlendirmede iki zon çapının birbirine bakan tarafında genişleme ya da köprü oluşumu sinerji olarak tanımlanmaktadır.

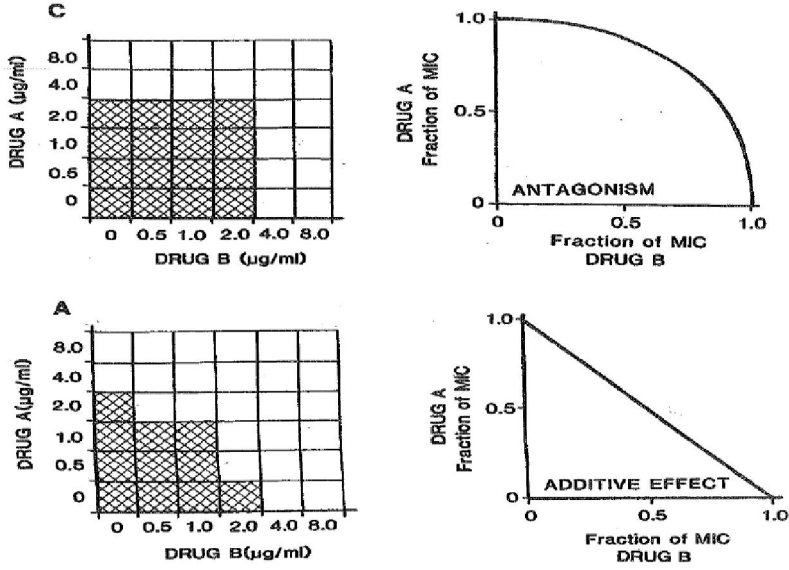


Şekil 2. Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi(114).

#### 1.16.2.2. Checkerboard (dama tahtası) Yöntemi

Her ilaç önceden çalışılarak MİK değerleri saptanır, saptanmış olan MİK değerlerinin en az iki kat yüksek konsantrasyonun başlanarak en az  $\frac{1}{4}$  konsantrasyona kadar dilüsyona devam edilmelidir. İki kat artan dilüsyonlarla çalışmak değerlendirmede kolaylık sağlayacaktır. Mikro dilüsyon yöntemi ile bakterisidal etki de çalışılabilir.

Eğer mikroplak kullanılıyorsa birinci ilaç dilisyonları plağın enine, ikinci ilaç dilüsyonları plağın boyuna yerleştirilir. Böylece birinci ilacın her bir sütun için konsantrasyonu sabit kalırken, ikinci ilacın her bir satır için sabit kalacaktır. Dama tahtası çalışmasının değerlendirilmesi Şekil 3.'te gösterilmektedir.



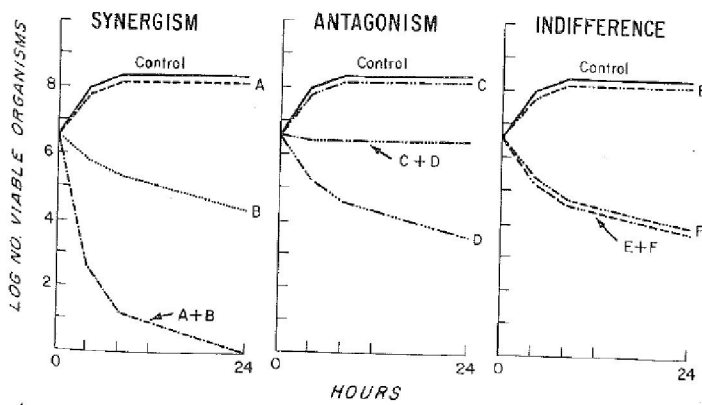
Şekil 3. Checkerboard (dama tahtası) yöntemi (114).

### 1.16.2. 3. Zamana Bağlı Öldürme (time-kill) Yöntemleri (kinetik öldürme eğrisi)

Vakit alan, zahmetli bir testdir. İlaçların tek tek ve kombine olduğu tüplere ekim yapılır. Yirmi dört saatlik inkübasyon sırasında belli aralıklarla katı besiyerine pasajlanır. Sonuçlar semilogaritmik kağıta işaretlenir. Değerlendirme;

-24 saatte en yüksek etkiden 100 kat daha fazla bakteri ölümü gerçekleşmiş ise sinerjik etki

-100 kat daha az bakterisidal etki görülür ise antagonist etki den bahsedilir



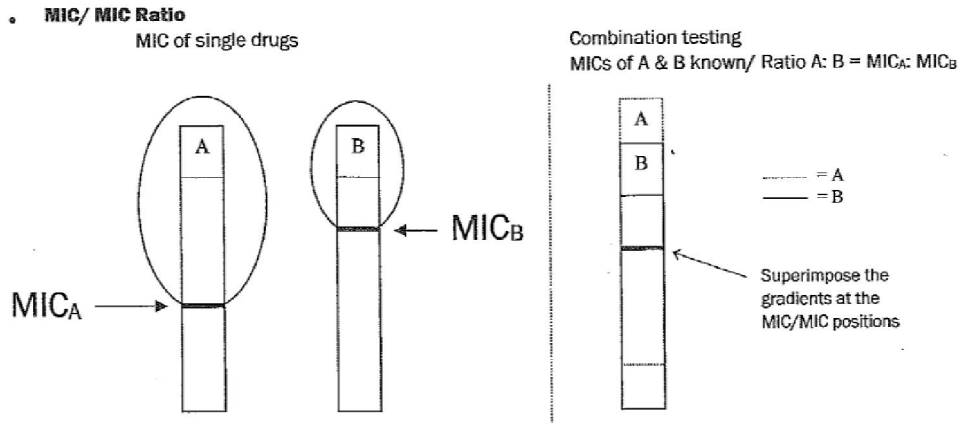
Şekil 4. Kinetik öldürme eğrisi grafikleri (114).

#### 1.16.2.4. Etest yöntemi

E test metodu ile çalışmak çok pratik ve zaman kazandırıcı olması nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir. Plağa ekim yaptıktan sonra iki ilaca ait stripler yerleştirilir. Daha sonra aynı plağın diğer bir bölgesine ilaçlardan birine ait ikinci bir strip daha yerleştirilir. Oda ısısında 1 saat bekleddikten sonra birinci ilaca ait, ikinci yerleştirilen strip kaldırılır ve bu yere antimikrobiyal konsantrasyon değeri eşit olacak şekilde ikinci ilaca ait ikinci strip yerleştirilir ve bu plak inkübasyona bırakılır.

Strip değıştirirken şu hususlara dikkat edilmesi testin doğruluğu açısından önem taşır:

I. İlk sribin başlangıç ve bitiş yerleri plağın arkasından işaretlenmelidir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta iki sribin MİK değeri nin örtüşecek şekilde yerleştirilmesidir. Örneğin her iki strip de 256 µg değeri nden başlıyorsa, ilk sribin kaldırıldığı yerin aynı izinin üstüne koymak yeterlidir. Ancak, ikinci sribin ilaç konsantrasyon değeri 32 µg'den başlıyorsa ilk konulan sribin 32 µg değeri nin geldiği yer işaretlenerek, ikinci sribin de 32 µg değeri nin aynı yere gelmesi sağlanmalıdır. Bunun için önce yüksek konsantrasyondan başlayan strip yerleştirilmeli, daha sonra düşük konsantrasyondan başlayan strip, bir önceki sribin başlama noktasından içeriye doğru kaydırılarak aynı konsantrasyon değeri ni aynı hizaya gelecek şekilde ayarlanmalıdır.



Şekil 5. E test Kombinasyon yöntemi(114)

II. Her bir ilacın Etest stripleri tek başına olacak şekilde aynı plağa yerleştirilmelidir. Hazırlanan plak bir gecelik inkübasyona bırakılır. Her bir antimikrobiyalın hem tek başına verdikleri MİK değeri ve aynı iki strip olacak şekilde yerleştirildiklerinde elde edilen MİK değeri ni belirlenir. Elde edilen sonuçlar, Fraksiyonel İnhibitör



Konsantrasyon (FIK) İndeksi kullanılarak değerlendirilir. Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon şu şekilde hesaplanır;

- $FIC (A+B) = (MİK AB / MİK A) + (MİK AB / MİK B)$
- $\leq 0.5$  sinerji
- $> 0.5 - < 1.0$  aditif etki
- $> 1.0 - < 2.0$  değişiklik yok
- $\geq 4$  ise antagonizm olarak raporlanır (115,116,117,118,119,120, 121)

İn vitro testlerin sonuçlarına bakıldığında Bruselloz tedavisinde kullanılan ilaçların çoğunda direnç görülmemektedir. Hatta nüks sonrası izole edilen bakterilerde dahi in vitro direnç bildiren çalışma sayısı çok düşüktür. Relapsın ya da tedavide başarısızlığın sorumlusu olarak bakterilerin hücre içi patojen olmaları düşünülmektedir. Bakteriler fagosite edildikleri makrofaj vb. hücrelerde canlılıklarını sürdürmekte, tedavi amacıyla kullanılan ilaçlar bu bölgeye ulaşamamakta veya ulaşabilseler de bakterileri inhibe edememektedir. Böylece fagosite edildikleri hücrelerde gizlenen patojenler daha sonra serbest kalıp relaps ya da tedaviye yanıtızsızlığa neden olabilmektedir.

Brusellaların fakültatif hücre içi parazit olmaları nedeniyle tedavilerinde hücre içi etkili antibiyotik kullanmak gerekir. Ancak bu antibiyotiklere rağmen hastalık uzun bir süreç alır ve belli oranlarda relapslara yol açar. Günümüzde en etkili tedavi protokolleri içerisinde doksisisiklinin, rifampin ya da streptomisin ile kombinasyonu yer almaktadır. Bu ilaçların toksik olmaları ve yan etkileri gebelerde ve çocuklarda kullanım sınırlamasına neden olur. Uzun süreli oral doksisisiklin ve intramusküler streptomisin kullanımı hasta uyumunda sorunlara neden olmaktadır.

Yeni fluorokinolonlar ağızdan alındığında iyi biyoyararlanım gösteren, yüksek doku konsantrasyonlarına ulaşan, hücre içine çok iyi ve fazla miktarda penetre olabilen ilaçlardır. Bu ilaçlar brusellanın neden olduğu enfeksiyon tedavisinde yeni tedavi protokolleri içerisinde yer almaktadır (126, 127, 128, 129,130).

Günümüzde dünyanın birçok yerinde uygulanmakta olan rutin antibiyotik duyarlılık testleri ile ilgili yöntemler hızlı üreyen, besin gereksinimi karmaşık olmayan bakterilere göre standardize edilmiştir. Bugün birçok ülkede kabul görmüş olan "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) standartları içerisinde *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria gonorrhoeae* gibi güç üreyen bakterilerin duyarlılık testleri standardize edilmiş, ancak diğer güç üreyen *Helicobacter spp.*, *Campylobacter spp.* ve *Brucella spp.* gibi bakteriler için henüz tam anlamıyla kabul görmüş standart yöntemler bulunmamaktadır. Yeni ilaçların

keşfedilmesi ve bulunan bu ilaçların Bruselloz tedavisinde kullanılabilecek olması, mevcut ilaçların durumlarını araştırmak amacıyla brusella için duyarlılık testlerinin yapılmasını gerektirmektedir. Ancak yapılan testlerin sonuçlarının nasıl yorumlanacağı kesin olarak aydınlatılmamıştır (122).

Brucella'da antibiyotik direnç gelişiminin mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Bunun en temel nedenlerinden biri bakterinin plazmidinin olmayışıdır (123). Diğer bir neden ise bu etken için rutin olarak in vitro duyarlılık testlerinin yapılmaması ve genel bir ilaç duyarlılık standardının oluşturulmamasıdır. Dolayısıyla brusellanın in vitro duyarlılık profilinin saptanması ve direnç gözlenen etkenlerde moleküler mekanizmaların detaylandırılmasına gereksinim bulunmaktadır(124).

Bruselloz tedavisinde tetrasiklinler (doksisisiklin), aminoglikozidler (streptomisin, gentamisin, netilmisin), rifampin, trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMZ), kinolonlar (ofloksasin, siprofloksasin) ve seftriakson kullanılmaktadır (125). Dünya Sağlık örgütü, doksisisiklin (200 mg/gün)-rifampin (600-900mg/gün, oral) kombine 6 haftalık tedaviyi önermektedir (126). Doksisisiklin ve streptomisin kombinasyonu da kullanılan etkili bir rejimdir. Sekiz yaşından küçük çocuklarda trimetoprim-sulfametoksazol ile aminoglikozid kombinasyonu başarılı bulunmuştur (1).

Tetrasiklinden doksisisikline geçilmesi, kombinasyonların doksisisiklin 6 hafta+streptomisin 2 veya 3 hafta şeklinde, veya doksisisiklin+rifampin 6 hafta olarak düzenlenmesine yol açmıştır. Bu arada streptomisin yerine alternatif aminoglikozidler aranmaya başlamıştır (127, 128). Yapılan çalışmalarla doksisisiklin 45gün+streptomisin 14 gün tedavisinin etkinliğine eş değer, doksisisiklin 45 gün+gentamisin 7 gün veya doksisisiklin 45 gün+netilmisin 7 gün kombinasyonları, aminoglikozidlerin kullanım süresini kısaltmakta ve yan etkilerin azaltmasına neden olmaktadır. Ayrıca günde tek doz aminoglikozid uygulamaları poliklinik hastalarında uyumunun sağlanmasına katkıda bulunmaktadır (129, 130).

NöroBruselloz tedavisinde kullanılan ilaçlar beyin omurilik sıvısına (BOS) iyi geçebilme özelliği olan ve tercihen bakterisid etki gösteren ajanlar olmalıdır. NöroBruselloz tedavisinde en uygun tedavi rejimi ve süresi konusunda kesin bir fikir birliği yoktur. Yine de doksisisiklinle beraber rifampin, TMP-SMZ, seftriakson, streptomisin, gentamisin, siprofloksasinin ikili veya üçlü olarak 3-9 ay süreyle kullanılması önerilmektedir (131, 132).

Bruselloz olgularının %10'nunda antimikrobiyal tedavi sonrası relaps görülebilir. Brusellozda relapslar çoğunlukla antibiyotik direncine değil, yetersiz ve yanlış antibiyotik kullanımına bağlıdır. Relaps Bruselloz, tedavi tamamlandıktan sonraki bir yıl içinde benzer semptom ve bulguların yinelenmesi olarak tanımlanmıştır. Relaps Bruselloz tedavisinde daha önce uygulanan tedavi kombinasyonu tekrarlanabilir, üçlü antibiyotik kombinasyonu verilebilir veya tedavi süresi 6 haftadan uzun olarak planlanabilir. Fakat bunların hiç birisi üzerinde tam bir fikir birliği yoktur (133, 134). Son dönemlerde kinolon kullanımı önerilmekte olup, relaps oranlarının yüksekliği nedeniyle ancak kombine tedavi şeklinde önerilmektedir (135, 136).

## **1.17. Bruselloz Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler**

### **1.17.1. Tetrasiklinler**

Bakterilerin 30S ribozomları ile birleşerek protein sentezini inhibe ederler. Etkileri bakteriostatiktir. En yeni tetrasiklinler doksisisiklin ve minosiklin'dir (137).

Tetrasiklinler MİK değerinin düşük olması, aktivitelerinin klinikte kullanılan diğer tüm antibiyotiklerden daha yüksek olması ve intrasellüler penetrasyonlarının çok iyi olması sebebiyle tedavide ilk basamakta seçilecek antibiyotiklerdir (138, 139). Doksisisiklin, tetrasiklinler içerisinde yağda en fazla eriyen yapıda olması, tok olarak 12 saat arayla kullanılabilmesi, kan-beyin bariyerini en iyi geçebilen tetrasiklin grubu olması ve lökositler içine daha fazla penetrasyonu nedeniyle tercih edilmektedir (138, 1). Tetrasiklinler, plasentayı geçer, fetal diş ve kemiklerde renk değişikliklerine ilaveten gelişme bozukluğu ve kemik deformiteleri yapabilir. Bebekler ve 8 yaşın altındaki çocuklarda dişlerde gelişme bozukluğuna yol açabilirler. Gebelerde ve dişlerde kalıcı sarı lekelenmelere yol açması nedeniyle 8 yaş altındaki çocuklarda kullanılmaları önerilmez (140).

Tetrasiklinlere karşı direncin potansiyel mekanizması kromozal ya da plazmid kaynaklı olabilir. Direnç gelişiminde ilacın dışa atım, ribozomal korunma ve ilacın enzimlerle modifikasyonu olmak üzere üç mekanizma rol oynar. Başlıca rol oynayan direnç mekanizması ilacın dışarı efluks pompalarıyla atımı ya da ilacın hücre içinde birikmesinin önlenmesidir. Ribozomal korunmada sentezlenen bir takım proteinler tetrasiklinlerin hedef bölgeye bağlanmasına engel olurlar. Ancak brusellada terasiklin direnci konusunda kapsamlı çalışmalar azdır (141).

### 1.17.2. Rifampin

Baktesid etkili bir antibiyotiktir. DNA ya bağımlı RNA polimerazı inhibe ederek DNA transkripsiyonunu başlatan zinciri engellerler (137). Rifampin hücre içine çok iyi penetre olup, yüksek anti-brusella aktivite gösterir. Rifampinin monoterapisi direnç gelişimi nedeniyle önerilmemektedir. Tek başına kullanıldığında %2-10 oranında başarısızlık saptanmıştır. Rifampin intrasellüler öldürme yeteneği sayesinde brusella enfeksiyonlarında kombine tedavide kullanılır. Bu nedenle doksisisiklin veya TMP-SMZ ile kombine edilerek kullanılır. Gebelerde ve çocuklarda da kullanılabilir bir ajandır (140).

Rifampinler özellikle de rifampin sitokrom p450 mikrozomal enzimlerini indükler ve beraber uygulandığında bu yolla metabolize olan ilaçların düzeylerinin terapötik seviyelerinin altına inmesine neden olurlar. Bu durumda yakın klinik takip, ilaç seviyesi takibi ve alternatif bir ajan seçimi yapılabilir (142).

Rifampin direnci, RNA polimerazın beta alt birimini kodlayan rpoB geninde tek basamaklı mutasyonlardan birinin gerçekleşmesi ile olur. Bu mutasyonların çoğu polimerazın rifampin bağlayan bölgesindeki aminoasitlerde olur. MİK düzeyi, çapraz direnç oranı gibi sonuçtaki direnç özellikleri, mutasyonun olduğu yer ve tipe bağlı olarak değişkenlik gösterir. Direnç sadece rpoB genindeki mutasyonlara bağlı değildir. Bazı bakterilerde rifampin permeabilitesinde azalma vardır ve bu azalma derecesinde direnç görülür (143).

### 1.17.3. Aminoglikozitler

Aminoglikozitlerin bakterisidal etkileri üç aşamada gerçekleşir (144):

1. Bakteri hücre membranına iyonik bağlanma
2. Enerjiye bağımlı fazda hücre içine giriş
3. Ribozoma bağlanma

Bakteriyel 30S ribozomal subünite geri dönüşümsüz olarak bağlanarak protein sentezini inhibe eden bakterisidal ajanlardır. Aminoglikozidlere bağlanmış ribozomda protein sentezi sırasında mRNA translasyonu olamayacağından hücre ölümü meydana gelir (145).

Ribozoma bağlanma, enerji ve oksijen bağımlı bir olaydır. Aminoglikozid grubu ilaçların serum konsantrasyonu MİK değerinin altına düşse de bakterisidal etki devam etmektedir. Bu olay postantibiyotik etki olarak adlandırılır (141). Aminoglikozitler

brusellaya karşı orta derecede aktiviteye sahiptirler. Tetrasiklinlerle kombinasyonları sinerjik etki yapar (138).

Tüm aminoglikozidler insanda sekizinci kranial siniri hasarı yapabilme potansiyeline sahiptir. Sıklıkla geri dönüşsüz olan bu yan etki, ilaç kesildikten sonra bile görülebilir ve tekrarlanan kullanımlarda birikime neden olabilir (146). İlacın dezavantajlarından biri terapötik indeksinin dar olmasıdır. Katyonik yapıda olması nedeniyle oral formu bulunmamaktadır (141).

Aminoglikozitlere karşı direnç gelişiminde üç mekanizma rol alır. Bunlardan birincisi ve en önemlisi ilacın enzimatik modifikasyonudur. Burada rol alan enzimler, asetiltransferaz, nükleotidiltransferaz ve fosfotransferazdır. Bu enzimleri kolayan genler genellikle plazmid kökenli olup bir bakteriden diğerine aktarılabilir. İkincisi ribozomal hedefte meydana gelen değişiklikler sonucunda direnç gelişebilir. Üçüncü mekanizma ise membranda bulunan transport sistemlerinde meydana gelen değişiklikler sonucunda antibiyotik penetrasyonunda azalma ya da dışa atım pompalarıyla ilacın atılması yoludur (141).

#### **1.17.4. Kinolonlar**

Kinolonlar duyarlı bakteride bakterisidal etki gösterirler. Bu etkileri konsantrasyona bağlıdır. Bakterisidal etkilerini DNA sentezini hızlı bir şekilde inhibe ederek ve olasılıkla ilave bazı diğer mekanizmalarla yaparlar. Çok yüksek konsantrasyonlarda RNA ve protein sentezini inhibe ettikleri ve bakteriyostatik oldukları da saptanmıştır

Kinolonların bakteri hücresinde iki hedefi vardır. Bu her iki hedef de DNA girazdır (topomeraz II ve topomeraz IV) (147, 148).

Etkilerini DNA girazı inhibe ederek gösterir. Etkileri bakterisidaldir. Kinolonların ve özellikle ofloksasilinin Brusellaya karşı in vitro etkinliği mükemmel olup makrofaj ve lökositler içine rahatlıkla geçebilirler (149). Brusellaya karşı in vitro yüksek aktiviteye sahip ilaçlardır. İntrasellüler penetrasyonlarının iyi olması avantaj olmakla beraber, tek başlarına kullanımlarında yüksek relaps oranları nedeniyle ancak kombine tedavi rejimlerinde yer verilmelidir (139, 140).

Kinolonlara karşı direnç kromozomal mutasyon sonucunda gelişir. Başlıca direnç mekanizmaları enzim yapısında değişiklik meydana gelmesi ve ilacın hücre içine girişinin azalmasıdır. DNA giraz enzimi A ve B olmak üzere iki kısma ayrılır. A'yı kodlayan gen *gyrA*, B'yi kodlayan gen ise *gyrB*'dir. Değişim A bölgesinde görülürse

yüksek düzeyde kinolon direnci görülür ve tüm kinolonlara karşı direnç gelişir. Eğer mutasyon B bölgesinde olursa kinolonların hepsine karşı direnç gelişmeyebilir. Kromozomal mutasyon sonucu gelişen bir diğer direnç mekanizması gram-negatif bakterilerin dış membranında yer alan porinlerde meydana gelen değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır. Porinlerde meydana gelen değişim nedeniyle ilacın bakteri hücrelerine girişinde azalma meydana gelir (141).

Günümüzde kinolonları parçalayan ya da inaktive eden bir enzim saptanmamıştır. Bunun yanında son zamanlarda plazmid aracılı kinolon direnci gündeme gelmektedir. Plazmid tarafından kodlanan *gmr* geni DNA giraz ve topoizomeraz IV'ü kinolonların etkisinden koruyucu etki göstermektedir (148).

#### **1.17.5. Trimetoprim/Sulfametoksazol (TMP-SMZ, Kotrimoksazol)**

Sülfonamidler, bakterilerde dihidrofolat enzimini, TMP ise dihidrofolat redüktazı inhibe eder. Folat metabolizmasındaki bu ardışık inhibisyon sonucunda bakteriyel DNA sentezi engellenir (150).

Sulfonamidler bakteriyel folik asit sentezi için gerekli olan ve yapı olarak paraamino benzoik asite (PABA) benzeyen sulfanilamidden türetilmektedir. Eklenen bir çok bileşik sayesinde kimyasal bir çeşitliliğe sahiptir. Bu kimyasal çeşitliliğe rağmen etki mekanizmaları aynıdır. Tetrahidropiteroik asit sentetaz enzimini kompetitif olarak inhibe ederek, folik asit sentezini birinci basamakta engellerler. Bakteriyostatik etkiye sahiptirler (151).

Sulfonamidlere mutasyonlar sonucu direnç geliştirebilirler. PABA aşırı üretimi veya dihidropteroatın yapısal değişikliği ile sulfonamidlere azalmış afinite gelişebilir. Plazmid yoluyla ilaca dirençli enzimlerin kodlanması veya bakteriyel hücre geçirgenliğinin azalması ile de direnç gelişebilir. Gebeliğin son üç ayında bebekte kernikterusa neden olması nedeniyle bu yaş grubunda kullanılması sınırlıdır (152).

Trimetoprim bakteriyel folik asit sentezi sırasında sulfanamidlerin etkilediği basamaktan bir sonraki basamak olan, dihidrofolat redüktaz sentetaz enzimini inhibe ederek bakteriyostatik etki gösterir. Folik asit ve sonuç olarak da bakteriyel DNA sentezinin ardışık basamaklarda inhibisyonu ile geniş spektruma sahip güçlü bir antimikrobiyal etki sağlanmış olur. Sulfametoksazol ile kombinasyonları sinerjik etki gösterir. Direnç, gelişmekte olan ülkelerde daha fazladır. TMP-SMZ brucelloza etkilidir, ancak direnç giderek artmaktadır (151,152). Brusellozlu gebe ve sekiz yaş altındaki çocuklarda tercih edilmesi yanında tek başına kullanıldığında %40-50'ye

varan nüks oranı bildirilmesi nedeniyle kombinasyon şeklinde kullanılması önerilen bir antibiyotiktir (140).

Trimetoprimin insanlarda teratojenitesi bildirilmemiştir, ancak hamilelerde kullanımı önerilmez (151).

### **1.17.6. Sefalosporinler**

Sefalosporinler, duyarlı mikroorganizmaların PBP'lerine bağlanarak bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan sentezini bozarlar. Ayrıca, hücre zarındaki otolitik enzimleri tetikleyerek bakterisidal etki yaparlar (153). Üçüncü kuşak sefalosporinlerden sefotaksim, seftriakson ve seftizoksim brusellaya karşı in vitro etkili ajanlardır. Bunlardan en etkili sefalosporin ise seftriaksondur. Seftriakson, özellikle Nörobruselloz vakalarında ve gebelerde kombine tedavide tercih edilir (1). Tetrasiklinin kontrendike veya kotrimoksazol tedavisinin başarısız olduğu durumlarda da kullanımı önerilmektedir (41).

Sefalosporinlere karşı direnç mekanizmaları;

1. Beta-laktamaz üretimi: Bu enzimleri kodlayan gen plazmid ya da kromozomal kaynaklı olabilir.
2. Duvar geçirgenliğinde azalma: Dış membran proteinlerinde olan değişiklikler sonucunda antibiyotiğin hücre içine alımı azalabilir.
3. Periplazmik aralıktan efluks ile ilacın dışarıya pompalanması.
4. PBP lerdeki değişiklikler: Kromozomal mutasyon sonucunda bakterinin PBP'lerinin moleküler yapısında değişiklik meydana gelebilir. Buna bağlı afinite azalması görülür (141).

### **1.18. İmmünoterapi**

Bir immünomodülatör olan levamizolün kronik Bruselloz tedavisinde antibiyotiklerle kombinasyonu ümit verici bulunmuştur. Levamizol'ün bu etkisi muhtemelen hem T hücre fonksiyonunu hem de monosit fagositozunu artırmasıyla ilişkilidir (139, 140).

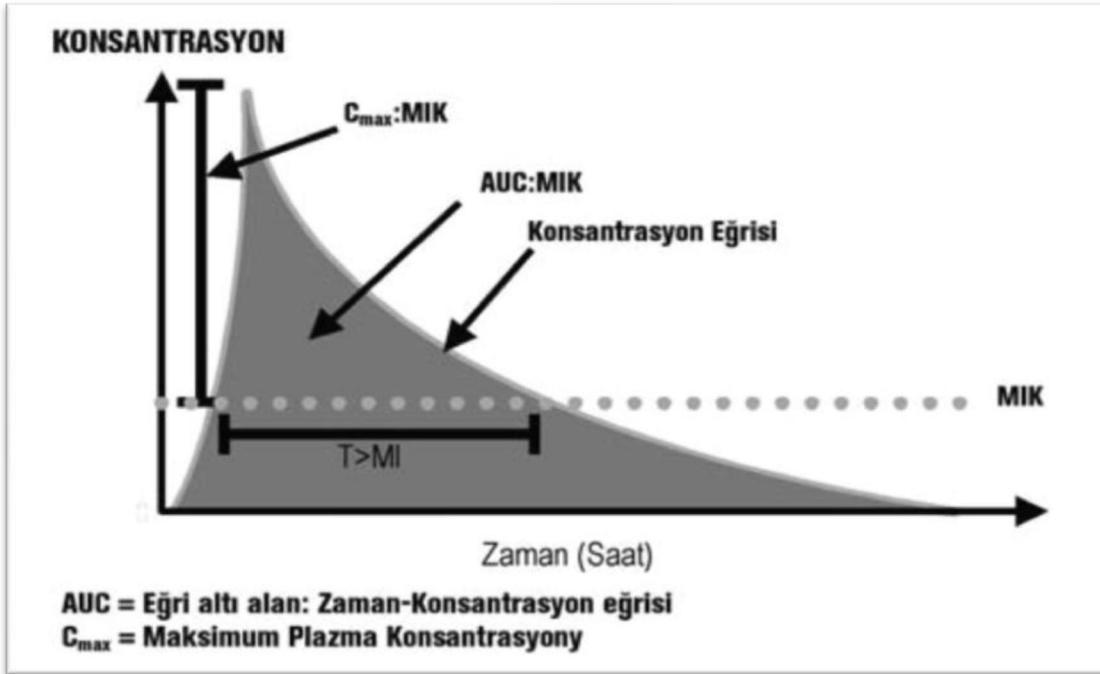
### **1.19. Brusellozda Kullanılan Antibiyotiklerin Farmakokinetik ve Farmakodinamiği**

Antibiyotikleri diğer hemen tüm ilaçlardan ayıran temel özelliği; diğer tüm ilaçların organizmaya organizma için verilmeleri söz konusu iken, antibiyotiklerin organizmaya başka bir organizma (mikroorganizmalar) için verilmeleridir. Bu farklılık

antibiyotiklerin farmakokinetik (FK) ve de özellikle farmakodinamik (FD) kavramlarında ciddi farklılık oluşmasına neden olur. Farmakokinetik özellikler bir ilacın organizmaya alımı, organizma dokularında dağılımı ve atılımı gibi kavramları incelerken, FD ise miktarı ile etkinliği arasındaki ilişkiyi inceler (154, 155).

Doğal olarak herhangi bir ilacın organizmaya verilişinden sonra özellikle istenilen organ ve dokularda, hatta istenilen hücre içi gibi nokta hedeflerde ve yine istenilen konsantrasyonlarda bulunması beklenir. Diğer ilaçlarda bu beklenti beklenen farmakolojik etkinin görülmesi biçimindedir ve başka faktörlerden bağımsızdır. Antibiyotiklerde ise bu etki genel FK/FD kavramlarının dışında hedef mikroorganizmanın söz konusu antibiyotiğe duyarlılığına da bağımlıdır. Söz konusu antibiyotik mikroorganizma ile karşılaştığında onu “öldürecek, ya da en azından üremesini durduracak” süre ve konsantrasyonda bulunmalıdır. Bu değer in vitro koşullarda tarifi yapılan MiK ve minimal bakterisidal konsantrasyondur (MBK). Başka bir deyişle antibiyotiklerin FK/FD değerlerinde mikroorganizmanın MiK/MBC değeri bir bağımsız değişken olarak rol alır (154).

Bu değişkenin klasik doz eğrisi içindeki yeri Şekil 6’da özetlenmiştir.



**Şekil 6.** Antibiyotiklerin Plazma Konsantrasyon Eğrileri (155)

Yukarıdaki şekilden de anlaşılacağı gibi konsantrasyon eğrisi/MiK ilişkisinde üç önemli parametre vardır: Antibiyotik düzeyinin MiK üzerinde kaldığı süre,  $C_{max}$ 'ın



MİK düzeyine oranı ve AUC'nin MİK'e oranı. Bu açıdan bakıldığından da bazı antibiyotiklerin antibakteriyel etkilerinin antibiyotiğin Cmax düzeyi ile; bazılarının MİK'in üzerinde kaldığı süre ile bazılarının ise her ikisine de bağlı olduğu anlaşılmıştır. Her koşulda değişmez gibi duran temel kavram antibiyotiğin plazma (daha da doğrusu infekte doku) konsantrasyonunun MİK değerinin üstünde olmasıdır. Bu temel farmakodinamik kavramlar antibiyotik kullanım stratejilerini yakından etkilemişlerdir (156). Antibiyotiklerin FD özelliklerini etkileyen bir diğer önemli faktör de antibiyotik sonrası etkidir (postantibiyotik etki: PAE). PAE, mikroorganizmaların in vitro koşullarda ortamdaki antibiyotiğin uzaklaşmasından sonra bile antibakteriyel etkinin devam etmesidir (157).

Antibiyotiklerin FK özellikleri FD özelliklere kıyasla diğer ilaçlardan büyük farklılıklar göstermez. Burada önemli olan antibiyotiğin istenen FD değerlerde enfeksiyonun söz konusu olduğu dokuya ulaşabilmesidir. Kapiller damarlara ulaşan bir antibiyotik plazmada mevcut proteinlere, önemli ve belirli bir ölçüde de serum albuminlerine bağlanır. Bu bağlanma antibiyotiği kapiller yatakta tutar. Kapillerleri terk eden antibiyotik bu proteinlere bağlanmamış serbest antibiyotiktir (158).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Turgut Özal Tıp Merkezi'nde izole edilen *Brucella spp.* suşlarına karşı klinik olarak uygulanan kombinasyon tedavilerinin in vitro sinerji, aditif ya da antagonist etkilerinin Etest kombinasyon yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamıza 2010-2012 yılları arasında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında kan kültürlerinden izole edilen *Brucella spp.* suşları alınmıştır. Bir hastada birden fazla yapılan izolasyonlardan sadece bir tanesi çalışmaya alınmıştır. Her suş izolasyon ve identifikasyon sonrasında Skim Milk (Oxoid, UK) sıvı besiyerinde çalışma zamanına kadar bekletilmek üzere  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Çalışmanın yapılacağı zaman stoklanan suşlar kanlı agar (Oxoid, UK) ve çikolotamsı agara pasajlanarak tekrar üretildi.

Bu çalışmada Brusellozis tedavisinde kullanılan doksisisiklin, rifampin, ko-trimoksazol, streptomisin ve siprofloksasin olmak üzere toplam 5 farklı antibiyotik test edildi. Bu antibiyotiklerden klinik uygulamada en sık kullanılmakta olan doksisisiklin-rifampin; rifampin-ko-trimoksazol; doksisisiklin-streptomisin; siprofloksasin-ko-trimoksazol ve siprofloksasin-streptomisin olmak üzere toplam 5 farklı kombinasyonun in vitro aktivitesi araştırıldı.

### 2.1. Kullanılan Besiyerleri

#### 2.1.1. Kanlı agar besiyeri

Tripticase veya peptone 15gr

Soya enzimatik hidrolizatı 5gr

NaCl 5gr

Agar 15gr

Distile su 1000 ml, pH:7.3

Kullanıma hazır toz halindeki besiyeri üretici firma önerileri doğrultusunda tartılarak distile su içine bırakıldı ve daha sonra sıcak suda kaynatılarak eritildi. Otoklavda  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dakika steril hale getirildi ve  $50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutuldu. Defibrine koyun kanından her 1 litre besiyeri için 70 ml eklendi. Sıvı halde bulunan besiyeri karıştırılarak homojen hale getirildi ve steril petri kaplarına kalınlıkları 4 mm olacak şekilde döküldü (20).

### 2.1. 2. Çikolatamsı agar

Proteose peptone 7,5 gr

Polypeptone 7,5 gr

Nişasta (buğday) 1 gr

NaCl 5 gr

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 gr

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 gr

Agar 10 gr

Distile su 1000 ml, pH. 7.3

Kullanıma hazır toz halindeki besiyeri üretici firma önerileri doğrultusunda tartılarak distile su içine bırakıldı ve daha sonra sıcak suda kaynatılarak eritildi. Otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 15 dakika steril hale getirildi ve 70<sup>0</sup>C'ye soğutulup içine 50-100 ml defibrine koyun kanı eklendi. Karıştırılarak steril petri kaplarına kalınlıkları 4 mm olacak şekilde döküldü (20).

### 2.1.3. Crystensen üre agar

Üre baz eriyiği

Peptone 1 gr

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 gr

NaCl 5 gr

D-Glucose 1 gr

Üre 20 gr

Fenol kırmızısı 12 mg

Saf su 100 ml

pH: 6.8

Agar eriyiği

Agar 15 gr

Distile su 900 ml

Önce üre baz eriyiği hazırlandı. Agar eriyiği sıcak suda kaynatılarak eritildi. Otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 15 dakika steril hale getirildi. Besiyeri 50<sup>0</sup>C'ye soğutulduktan sonra üzerine üre baz eriyiği ilave edildi. Karıştırılıp steril cam tüplere 4-5 ml hacimde döküldü (20).

## 2.2. Kültür, İzolasyon ve İdentifikasyon

Kan kültürleri: Hastaların ateşli oldukları dönemde yarım saat arayla, en az 2 adet alınarak otomatize BACT/ALERT 3D (BioMerieux, Fransa) cihazında 7 gün

süreyile inkübe edildi. Sistemin pozitif sinyal verdiği kan kültürü şişelerinden kanlı agar ve çikolatamsı agar besiyerine pasaj yapıldı. Pasajlardan birisi aerob, diğeri %5-10 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Besiyerinde 48 veya 72 saatlik inkübasyon sonucunda üreyen 2-3 mm çapında küçük, yuvarlak, saydam, düzgün kenarlı, hemolizsiz, pigmentsiz, şebnem tanesine benzeyen kolonilerden gram boyama yapıldı. Gram negatif kok veya kokobasil şeklinde görülen, katalaz ve oksidaz pozitif, McConkey agarda üremeyen, üç şekerli demirli (TSI) besiyerinde H<sub>2</sub>S oluşumu ile siyah pigment oluşturan ve Christensen üre agarda üreaz aktivitesi gösteren bakteriler *Brucella spp.* olarak tanımlandı (20).

### 2.2.1. Gram Boyama Yöntemi

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

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

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

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

-Son aşamada ise preperat üzerine zıt boya olarak sulu fuchsin damlatılıp yine 1 dakika bekletildi ve yıkandı. Preperatlar havada kurutulup immersiyon objektifi ile incelendi (20).

### 2.2.2. Katalaz ve Oksidaz Reaksiyonları

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

Oksidaz deneyi için hazır oksidaz test stripleri (Oxoid, UK) kullanıldı. Test stribi yüzeyine kanlı agarda üremiş olan koloniler temas ettirilip, 5-30 saniye bekledikten sonra mor-siyah renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (20).

### 2.2.3. Üreaz Deneyi

Üre agarı brusella kolonilerinden iğne öze ile tek koloni alınarak çizgi ekim yapıldı. Besiyerleri 37°C'de inkübe edildi, birer saat aralıklarla besiyerindeki renk değişimi kızarıklık olup olmadığı yönünde kontrol edildi (20).

### 2.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi ve Etest Kombinasyon Yöntemi

İzolatların MİK değerleri; streptomisin (SM), rifampin (RIF), doksasiklin (DOX), trimetoprin-sulfametoksazol (SXT) siprofloksasin (CIP) için Etest stripleri (BioMerieux, Fransa) kullanılarak araştırıldı. Antibiyotik stripleri çalışma amına kadar -20 °C'de saklandı. Etestler kullanılmadan önce 30 dakika oda ısısında bekletildi. Her brusella izolatı için, katı besiyerinde üreyen kolonilerden 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyon hazırlandı. Süspansiyondan 10 µl alınarak 120 mm'lik plaklarda bulunan %5 koyun kanı eklenmiş Mueller Hinton Agar (Merck, Germany) yüzeyine yayıldı (159).

İnokülasyon yapılmış olan plaklara test edilecek ilaçlara ait Etest striplerinden aplikatörü yardımıyla yerleştirildi. İlk aşamada, bir plağa kombine edilecek antibiyotiklere ait ikişer E test sribi (antibiyotik A ve antibiyotik B) yapıştırıldı ve plaklar 1 saat oda ısısında bekletildi. Sonrasında, A antibiyotiğine ait ikinci E test sribi kaldırılıp yerine antimikrobiyal gradiyenti eşit olan değerler örtülecek şekilde B antibiyotiğine ait Etest sribi; B antibiyotiğine ait ikinci strip kaldırılarak ve yine aynı özelliğe dikkat edilerek üzerine A antibiyotiğine ait ikinci Etest sribi yapıştırıldı. Plaklar 35 °C'de, aerobik ortamda 24 ve 48 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İlk 24 saatlik değerlendirmede, çalışılan izolatın test edilen A ve B antibiyotiğine karşı olan MİK değerleri saptandı. Kırk sekiz saatlik toplam inkübasyon sonunda ise kombinasyon yapılmış olan alandaki MİK düzeyleri okundu. Sonuçta, çalışılan her bir suş için A ve B antibiyotiklerine karşı MİK değerleri ve hem AB ve hem de BA kombinasyonu sonucunda elde edilen MİK değerleri saptanmış oldu. Bu işlemler yapılırken özellikle ilk sribin başlangıç ve bitiş yerleri plağın arkasından işaretlendi ve iki sribin MİK değerlerinin örtülecek şekilde yerleştirilmesi sağlandı. Çalışılan her bir suşa ait kombine edilen antimikrobiallerin sinerjik, aditif veya antagonist etki gösterip-göstermediği FIC (Fraksiyone İnhibitör Konsantrasyon İndeksi) indeksi kullanılarak saptandı. FIC indeksinin saptanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$FIC (A+B) = (MİK AB / MİK A) + (MİK AB / MİK B)$$

Elde edilen sonuçlar aşağıdaki değerlendirme kriteri uyarınca yorumlandı

$\leq 0.5$  sinerji

$> 0.5 - < 1.0$  aditif etki

$> 1.0 - < 2.0$  değişiklik yok

$\geq 4$  antagonist (114-121).

Tetrasiklin ve streptomisin MİK değerleri CLSI'nin *Brucella spp.* için önerdiği breakpoint değerlerine göre rifampin, trimetoprin-sufametoksazol ve siprofloksasin MİK değerleri CLSI'nin, güç üreyenler için önerdiği breakpoint değerlerine göre yorumlandı (122).

Çalışmada kontrol suşu olarak CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)'nin önerileri doğrultusunda *B.abortus* 03036, *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 standart suşları kullanıldı (122).

### 3. BULGULAR

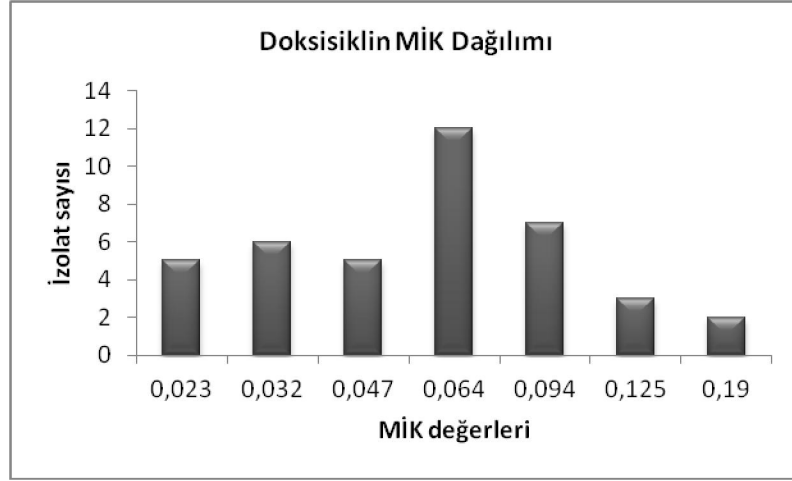
Tugut Özal Tıp Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda Haziran 2010 ve Aralık 2012 tarihleri arasında kan kültürlerinden izole edilen toplam 40 *Brucella spp.* suşu çalışmaya alındı. Etest yöntemi ile suşların doksisisiklin, rifampin, ko-trimoksazol, streptomisin, ve siprofloksasine karşı olan duyarlılıkları MİK düzeyinde saptandı. Çalışılan antibiyotiklerin elde edilen MİK değerleri, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> düzeyleri Tablo 5'te gösterilmiştir.

**Tablo 5.** Antibiyotiklerin MİK değerleri, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> ve düzeyleri.

<b>Antibiyotik</b>	<b>Mic<sub>50</sub></b> (µg/ml)	<b>Mic<sub>90</sub></b> (µg/ml)	<b>Değer Aralığı</b> (µg/ml)	<b>CLSI Breakpoint</b>
<b>Doksisiklin</b>	0,064	0,094	0,023-0,19	≤1
<b>Rifampin</b>	0,50	0,75	0,25-1,5	ND
<b>SXT</b>	0,032	0,064	0,016-0,094	≤2
<b>Streptomisin</b>	0,25	0,5	0,064-0,75	≤8
<b>Siprofloksasin</b>	0,094	0,125	0,047-0,25	ND

Çalışılan 40 brucella izolatu içinde 5 suşun doksisisiklin için MİK değeri 0.023 µg/ml olarak bulundu. Bu değer çalışmamızda saptanan en düşük doksisisiklin MİK değeri idi. İki suşta da aynı antibiyotik için en yüksek MİK değeri 0.19 µg/ml olarak ölçüldü.

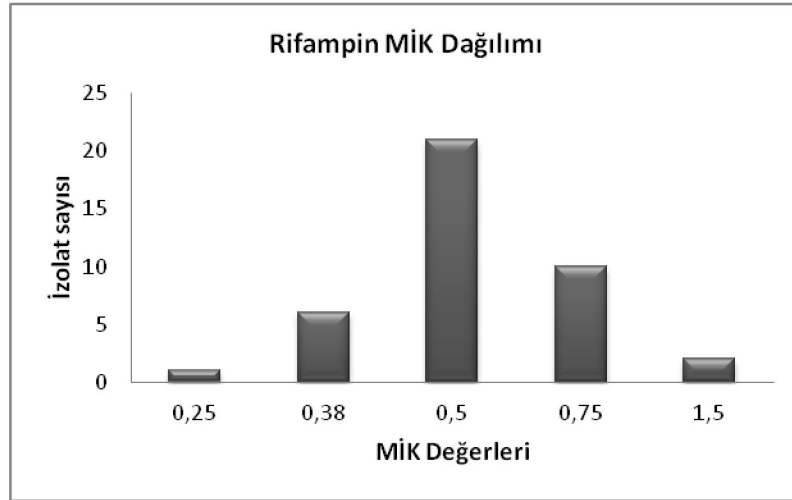
Suşların doksisisiklin için elde edilen MİK değerlerinin suşlara göre dağılımı Şekil 7'de gösterilmiştir.



**Şekil 7.** Suşların doksisiklin MİK dağılımı

Çalışılan izolatlar içinde 1 suşun rifampin için MİK değeri 0.25  $\mu\text{g/ml}$  olarak saptandı. Bu değer çalışmamızda rifampin için saptanan en düşük MİK değeri idi. İki suşta da aynı antibiyotik için en yüksek MİK değeri 1.5  $\mu\text{g/ml}$  olarak ölçüldü.

Suşların rifampin için elde edilen MİK değerlerinin suşlara göre dağılımı Şekil 8’de gösterilmiştir.

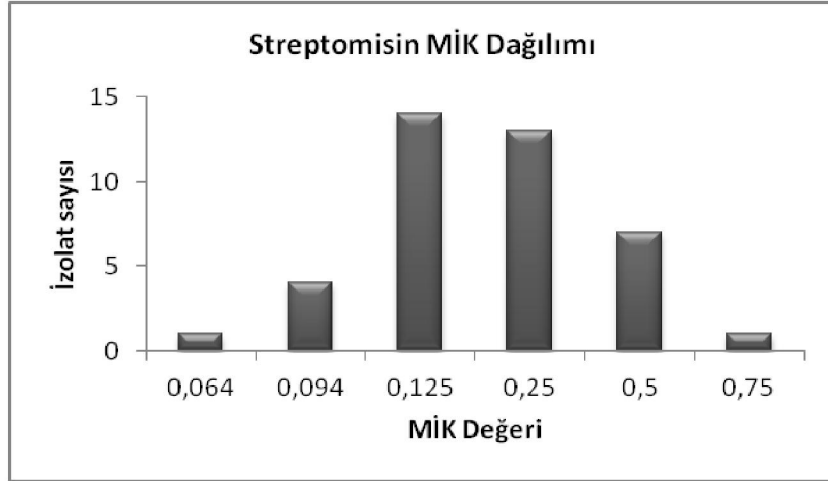


**Şekil 8.** Suşların rifampin MİK dağılımı

Çalışılan 40 brusella izolatı içinde bir suşun streptomisin için MİK değeri 0.064  $\mu\text{g/ml}$  olarak bulundu. Bu değer saptadığımız en düşük streptomisin MİK değeri idi. Bir suşta da aynı antibiyotik için en yüksek MİK değeri 0.75  $\mu\text{g/ml}$  olarak saptandı.

Suşların streptomisin için elde edilen MİK değerlerinin suşlara göre dağılımı Şekil 9’da gösterilmiştir.

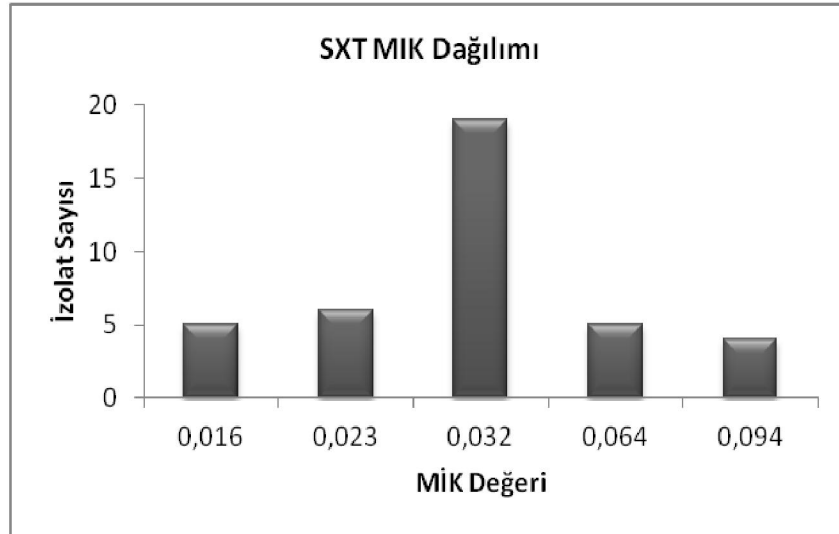




**Şekil 9.** Suşların streptomisin MİK dağılımı

Çalışılan izolatlar içinde 5 suşun SXT için MİK değeri 0.016 µg/ml olarak bulundu. bu değer çalışmamızda saptadığımız en düşük SXT MİK değeri idi. Dört suşta da aynı antibiyotik için en yüksek MİK değeri 0.094 µg/ml olarak ölçüldü.

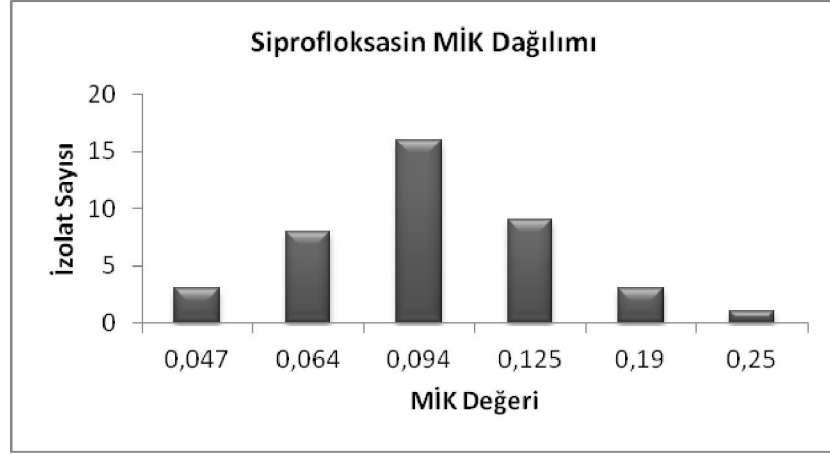
Suşların SXT için elde edilen MİK değerlerinin suşlara göre dağılımı Şekil 10'de gösterilmiştir.



**Şekil 10.** Suşların SXT MİK dağılımı

Çalışılan 40 brusella izolatı içinde 3 suşun siprofloksasin için MİK değeri 0.047 µg/ml olarak bulundu. bu değer çalışmamızda saptadığımız en düşük siprofloksasin MİK değeri idi. Bir suşta da aynı antibiyotik için en yüksek MİK değeri 0.25 µg/ml olarak bulundu.

Suşların siprofloksasin için elde edilen MİK değerlerinin suşlara göre dağılımı Şekil 11'de gösterilmiştir.



**Şekil 11.** Suşların siprofloksasin MİK dağılımı.

Yaptığımız çalışmada doksisisiklin-rifampin kombinasyonu çalışılan tüm suşlarda (%100) sinerjik etki gösterirken, rifampin-kotrimoksazol kombinasyonu iki suшта antagonist (%5) etki gösterdi. Siprofloksasin-streptomisin ve rifampin-ko-trimoksazol kombinasyonlarının suşlara karşı sinerjik etki oranları sırasıyla %57.5 ve %52.5 olarak saptandı. Diğer taraftan, doksisisiklin-streptomisin ve siprofloksasin-ko-trimoksazol kombinasyonlarının sinerjik etki oranları %32.5 ve %25 olarak saptandı. Çalışılan suşlara karşı kullanılan kombinasyonların in vitro etkinlikleri Tablo 6’da gösterilmiştir.

**Tablo 6.** Kombinasyonların in vitro etkinlik sonuçları.

Antibiyotik Kombinasyonları	Sinerji Test Sonuçları (n%)				Toplam Suş
	Antagonizma	İndiferens	Aditif Etki	Sinerji	
<b>DOX-RİF</b>	-		-	40 (%100)	40
<b>RİF-SXT</b>	2 (%5)	5 (%12,5)	12 (%30)	21 (%52,5)	40
<b>DOX-STP</b>	-	11 (%27,5)	16 (%40)	13 (%32,5)	40
<b>CİP-SXT</b>	1 (%2,5)	9 (%22,5)	20 (%50)	10 (%25)	40
<b>CİP- STP</b>	-	3 (%7,5)	14 (%35)	23 (%57,5)	40

#### 4. TARTIŞMA

Bruselloz, evcil ve yabani hayvanlarda *Brucella* cinsine ait mikroorganizmalar tarafından oluşturulan zoonotik bir hastalıktır. Hayvanlarda özellikle uterus, meme ve testis gibi genital organlara yerleşerek düşük, infertilite ve süt veriminde azalmaya neden olan genellikle kronik seyirli bir enfeksiyon oluşturduğu ve böylelikle ekonomik kayıplara neden olduğu gösterilmiştir (215).

Uluslararası Sistemik Bakteriyoloji Komitesi, *Brucella* Taksonomisi Altkomitesi, *Brucella* cinsi içerisinde; *B.melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti* ve *B. inopinata* sp. nov. adlı 10 farklı tür bildirmiştir (216). Fenotipik karakterler, faj tipleri, boyalara karşı olan duyarlılık, CO<sub>2</sub> gereksinimi, H<sub>2</sub>S üretimi gibi metabolik özelliklere göre ise türler ve biovarlar belirlenmiştir (10,11). *B.melitensis* (biovar 1,2,3): koyun ve keçilerde; *B.abortus* (biovar 1,2,3,4,5 ve 9): sığır ve mandalarda ve *B.suis* (biovar 1,2,3,4,5): domuzlarda enfeksiyon yapmaktadır. İnsanlarda hastalık etkeni olan türler *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* ve *B. canis*'tir. İnsanlarda en sık hastalığa neden olan tür *B. melitensis* olarak bulunmuş ve başlıca koyun ve keçilerde hastalık yaptıktan sonra bunlara ait ürünlerle insanlara geçtiği gösterilmiştir. İkinci sıklıkta insanlarda hastalığa neden olan tür *B. abortus* ise başlıca sığırlardan insanlara bulaşmakta, hayvancılıkla uğraşılan bölgelerde daha sık görülmektedir. *B. suis* ve *B. canis* sırasıyla domuz ve köpekten insanlara bulaşmakta ve enfeksiyonlarına özellikle bu hayvanlarla çalışanlarda sporadik olarak rastlanmaktadır (1).

Zoonototik hastalık etkeni olan *Brucella*, hasta hayvanların dışkı, süt ve atık yavru zarları ile çevreye bulaşıp, insanlarda ve diğer hayvanlarda hastalık oluştururlar. Ahır veya ağıl içinde hayvanlar arasında bulaşma; ağız, deri, göz yolu, çiftleşme veya sağım sırasındaki hatalar sonucu meme yoluyla olur. *Brucella* etkenini taşıyan gebe hayvanlar doğum sırasında atık fetüs zarları ve suları ile çevreye bulaştırırlar. *Brucella* bu atıklardan sonra en çok fetusa ait doku ve organlarda yoğun bir şekilde bulunduğu saptanmıştır. *Brucella* taşıyan hasta hayvanların çoğunun ilk haftalarda bazen aylarca süt ve vajinal akıntı gibi sekretlerle etkeni yoğun bir şekilde çıkardıkları bildirilmiştir (217).

Aerop veya mikroaerofil olan *Brucella* türleri gram-negatif kok-kokobasil görünümünde kapsülsüz, sporsuz, 10–40 °C arasında üreyebilen bakterilerdir (13). Brusella türleri genellikle kültürlerden yapılan boyamalarda tek tek görülmelerine

karşın dokulardan yapılan boyamalarda kümeler halinde görüldüğü saptanmıştır (15). Kültürde koloniler ancak inkübasyondan 2–3 gün sonra görünür büyüklüğe ulaşır; 4–5 gün sonra 2–3 mm çapında koloniler haline gelirler. Zengin besiyerlerinde genellikle düzgün kenarlı, konveks, nemli, parlak koloniler oluşturdukları saptanmıştır (20).

Brusella türleri, konak fagositer hücreleri içinde yaşama ve çoğalma yeteneğine sahip, fakültatif hücre içi patojenlerdir. Brusellanın polimorf nüveli lökositlerin intrasellüler öldürme mekanizmalarından, lizozim içindeki primer ve sekonder granüllerin degranülasyonlarını önleyerek ve myeloperoksidaz-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sistemini engelleyerek kaçtığı düşünülmektedir. Ayrıca Cu-Zn süperoksid dismutaz enzimi ile serbest oksijen radikallerini etkisiz hale getirdiği öngörülmektedir (47). Fagozom-lizozom birleşmesi ve apoptozun önlenmesi ile mononükleer hücreler içinde yaşamaları kolaylaştığı saptanmıştır (48, 49). *B.melitensis*, içerdiği adenin ve guanozin monofosfat etkinliği ile PMNL'nin degranülasyonunu önleyerek öldürücü mekanizmalara direnç gösterdiği bildirilmiştir (50).

Brusella insanlara; pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketimi, enfekte aerosollerin inhalasyonu, konjunktivaya inokulasyon ve enfekte hayvan sekresyonlarının bütünlüğü bozulmuş dokulara direkt teması ile bulaşır. İnsandan insana bulaş çok nadir olsada literatürde cinsel yolla bulaştığı ileri sürülen vakalar bildirilmiş ve meni kültüründe bakteri üretilebilmiştir (39).

Ülkemizde Bruselloz için temel bulaş kaynağı pastörize edilmemiş süt ve süt ürünlerinin tüketimidir (31, 32). Hayvancılıkla uğraşanlar, veteriner hekimler, sağlık çalışanları, mezbaha işçileri, et sanayisinde çalışanlar Bruselloz açısından riskli gruplardır. Yapılan seroepidemiolojik çalışmalarda; Bruselloz açısından riskli olan kasaplar, besiciler, mezbaha ve mandıra çalışanları gibi meslek gruplarında %9-25, risk grubunda olmayanlarda %2-3 oranında seropozitiflik bildirilmiştir (33, 34). Türkiye'de hastalık genelde, koyunların yavrulama dönemleri ile peynir yapımının arttığı ilkbahar ve yaz aylarında daha siktir (35, 36). Hastalık daha çok genç ve orta yaşlı erişkinleri tutmaktadır (159). Ülkemizde Bruselloz tanısı alan vakaların %50-60'ı 20–50 yaş arasında, %10-15'i çocuklarda, %10'u 65 yaş üzerindedir (35, 39). İnsan Brusellozu, enfekte hayvanlarla doğrudan ya da dolaylı temas ile bulaşır. Bu nedenle insanlarda enfeksiyonun önlenmesi ve kontrolü, bu temas zincirinin kırılması ve hayvan rezervuarlarında enfeksiyonun kontrolü ve eliminasyonuna bağlıdır (29). Ayrıca çiğ süt tüketiminden kaçınılması, süt ve süt ürünlerinin pastörize edilerek kullanılması veya sütlerin iyi kaynatıldıktan sonra tüketilmesi gerekmektedir (41, 42).

Önemli bulaş yollarından biri olan laboratuvar bulaşı sıklıkla yayınlarda yer almaktadır. Laboratuvar kaynaklı bulaşın önlenmesinde enfekte materyalle temas ihtimali durumunda eldiven, gözlük, maske ve önlük kullanılmalı, kültür plakları koklanmamalıdır (43, 44).

Bruselloz ile mücadelenin en kolay ve ekonomik yolu hayvanların aşılmasıdır. Aşılama programını başarıyla uygulayan; Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika ülkeleri ve Yeni Zelanda'da, Bruselloz eradikasyonu başarılı olmuştur (37). Yunanistan'da yapılan araştırmada kaynatmadan yapılan taze peynirlerin tüketimiyle Bruselloz arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Ayrıca Bruselloz olgularının azaltılması için birincil hedefin hastalığın hayvanlardan eradike edilmesi olduğu ve hayvan aşılamalarının gerekliliği vurgulanmıştır (219).

Bruselloz özellikle Portekiz, İspanya, Güney Fransa, İtalya, Yunanistan, Türkiye ve Kuzey Afrika ülkelerinin yer aldığı Akdeniz ülkeleri, Arap yarımadası, Hindistan, Meksika, Orta ve Güney Amerika'da hiperendemiktir (161, 162). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre her yıl dünyada 500.000 yeni vaka belirlenmektedir (11). İngiltere, Kuzey ve Batı Avrupa ülkelerinin büyük çoğunluğu, Avustralya, Yeni Zelanda ve Kanada'da Bruselloz eradike edilmiştir (161, 162).

Bruselloz, Sağlık Bakanlığı Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirimi Sisteminde A Grubu Bildirimi Zorunlu Hastalıklar Listesinde yer almaktadır. Hastalık, ağırlıklı olarak Doğu Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve İç Anadolu Bölgelerimizde görülmekle birlikte ülkemizin hemen her bölgesinden vaka bildirimleri yapılmaktadır (25). Sağlık Bakanlığı verilerine göre ülkemizde 1970 yılında 37 olarak bildirilen olgu sayısı (0.1/100000), 2005 yılına gelindiğinde 14644'e ulaşmıştır (20.32/100000) (38). Bu istatistiksel artışın nedeni hastalığın prevalansındaki artıştan çok bildirim ve tanı koyma oranlarındaki artıştan kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Ülkemizde hastalık bildirimlerinin halen yeterli düzeyde olmadığı dikkate alınır, olasılıkla gerçek Bruselloz prevalansı sanıldığından daha yüksektir. Hastalık, ülkemizde hemen her bölgeden bildirilmektedir. Bruselloz Türkiye'de endemik olarak görülmekte olup 2002 de bildirilen vaka sayısı 17744 iken 2009 yılında 9324 vaka bildirim yapılmıştır. 2002'den 2009 gelindiğinde Bruselloz vakalarında yaklaşık %50 civarında bir azalma söz konusudur (24,29).

Ülkemizde Bruselloz özellikle, hayvancılığın yoğun olarak yapıldığı Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yaygındır. Doğu Anadolu bölgemizde yüksek riskli hastalarda yapılan bir çalışmada; seropozitiflik oranının %27-30 olduğu belirtilmektedir

(220). Sağlık Bakanlığı 2005 yılı verilerine göre Siirt, Van, Iğdır, Batman, Ardahan ve Aksaray Bruselloza bağlı morbiditenin en fazla olduğu illerdir (166). Ülkemizin coğrafi konumu özellikle Bruselloz'un endemik olduğu doğu ve güneydoğu komşularından bulaş için bir risk faktörüdür. Dünyada endemik bölgelerde bildirilen Bruselloz insidansı (yeni olgu hızı) yüz binde  $<0.01$  ile  $>200$  arasında değişmektedir (10). Ülkemizde Bruselloz insidansı yüz binde 26, İran'da 24, Irak'ta 28 ve dünyanın en yüksek insidansına sahip olan Suriye'de yüz binde 161 ile ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Ancak gerçek insidansın yanlış tanı ve eksik bildirimle ilgili olarak bildirilenden 25 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir (10, 14).

Klasik olarak Bruselloz, etkenin ağız yoluyla vücuda alınması sonrası gelişir. Bakteri, mideden geçerek bağırsaklara ulaşır ve penetre olarak Peyer plaklarında çoğalmaya başlar. Buradan itibaren venöz ve lenfatik akım yoluyla yayılarak portal ven aracılığı ile karaciğere ulaşır. Burada çoğalmaya devam eden etken, bakteriyemi yaparak tüm vücuda dağılır. Daha sonra lenf bezleri, dalak ve diğer retikuloendotelial organ ve dokularda çoğalmaya devam eder.

Bruselloz'da bulgular sinsi veya akut olabilmekte, genellikle mikroorganizmanın alımından sonra 2 ila 4 hafta içinde ortaya çıkmaktadır. Hastalık subklinik bulgulardan, ateş, terleme, lenfadenopati, iştahsızlık, yorgunluk, artrit, hepato-splenomegali ve nörolojik bulgular gibi çeşitli non-spesifik bulgulara kadar değişebilen klinik gösterebilir. Hastalığın en sık lokalize komplikasyonu; periferik, sakroiliak veya spinal eklemlerin inflamasyonlarıdır. Kardiyovasküler, gastrointestinal ve nörolojik sistem etkilenebilir (33, 58).

Young'ın çalışmasında; Bruselloz, tüm organ ve sistemlerin etkilendiği sistemik bir enfeksiyon olarak tanımlanmıştır. Brusellozun, hastalığın süresi ve şiddetine göre, akut, subakut ve kronik olarak sınıflandırıldığı ifade edilmiştir (23). Kronik Brusellozda genellikle kemik, dalak, karaciğer gibi organlarda persistan enfeksiyon odakları görülür (61). Hepatik tutulum Bruselloz hastalarında sık görülmesine rağmen transaminaz derecelerinde yükselme olmayabilir. Hepatik patoloji spektrumu etyolojik ajana göre çeşitlilik gösterir (67). Osteoartiküler komplikasyonların, hastanın yaşı ve bakterinin türüne bağlı olarak %10 ila %80 dolayında olduğu gösterilmiştir (58).

Brusellozda radyolojik bulgular geç ortaya çıkmasına rağmen kemik taramasında erken dönemde inflamasyon gösterilebilir. Bilgisayarlı tomografi eklem hasarı, vertebral osteomyelit ve paraspinal abselerin gösterilmesinde faydalı olduğu bildirilmiştir (73). Depresyon ve dikkatte azalma Bruselloz hastalarında sık görülmekle

birlikte santral sinir sistemi invazyonu %5'ten az hastada görülür. NöroBrusellozda; menenjit, ensefalit, miyelit, radikülönöronit, beyin absesi, epidural abse, granülom, demiyelinizasyon ve meningovasküler sendromlar görülebilir (76, 77). Hastaların %2'sinden azında görülen endokardit, Bruselloza bağlı ölümlerin en sık sebebidir (81). En sık aortik kapak tutulur (83).

Brusellozda anemi, lökopeni, trombositopeni ve pıhtılaşma sorunları gibi hematolojik bulgular ortaya çıkabilir. Bu bulgular genellikle hafif seyretmekle birlikte tedavi ile kısa sürede gerileyebilir (86). Bruselloz hastalarının yaklaşık %5-10'unda deri lezyonları gözlenebilir, enfekte hayvanlarla temas eden veterinerlerde kontak dermatit'e sık rastlanabilir (91, 92). Bruselloz hastalarında, üveit sıklıkla geç bir komplikasyon olabilir ve kronik iridosiklit, multifokal koroidit ve optik nörite bağlı gelişebilir (93).

Bruselloz tanısı genellikle öykü, klinik ve serolojik bulgular ile konulmakta, ancak kesin tanı için etkenin kan veya diğer vücut sıvıları kültürlerinde üretilmesi gerekmektedir (241). Bakterinin çok yavaş üremesi, özel kültür koşullarını gerektirmesi nedeniyle, hızlı tanı için serolojik yöntemler kullanılmaktadır. Serolojik testler, tanıda önemli rol oynamaktadır (165). İntraselüler bir patojen olan brusellanın, kan kültürlerinden izolasyon oranı %15-70 arasında değişmektedir, kemik iliği kültürleri, kan kültürüne göre daha yüksek oranda izolasyon imkanı sağlamaktadır (56). Ancak kemik iliği aspirasyon materyalinin eldesi kan kültürü materyaline göre daha zor olduğu için, kemik iliği kültürü klinikte tercih edilmemektedir.

STA testinde tüm immünoğlobulinlerin titresini belirler. IgG antikorlarının titresini belirleyebilmek için 2-merkaptto-etanol testinden faydalanılır. Tedavi sonrası IgG antikorlarının titrelerinin yükselmesi Bruselloz'un kronikleştiği anlamını taşımaktadır (95).

Klinik olarak Bruselloz belirtileri olduğu halde yapılan aglütinasyon testlerinin negatif olmasına sık rastlanılmaktadır. Coomb's serumu (anti-human immünoğlobulin) kullanılarak aglütinasyon ortaya çıkarılabilmektedir (20). Son geliştirilen 'Competitive Enzyme Immunoassay (CELISA) testinin özgüllüğü %96.5-100; duyarlılığı ise %94.8-100 arasında bulunmuştur. İnsan Brusellozunun tanısında uygun bir test olduğu ve bir doğrulama testi olarak kullanılabilceği bildirilmektedir (108).

Brucella serolojik tanısında kullanılan testlerden STA, Coomb's ve Brucellacapt'ın sırası ile duyarlılıkları; %73, %100, %96 ve özgüllükleri; %100, %100, %97,5'tir. Brucellacapt maliyet etkin olmamasına rağmen, STA ile Bruselloz tanısı

konulamamış hastalarda, hızlı tanı olanağı sağlar. Brucellacapt ve Coomb's testlerinin duyarlılıkları ve özgüllükleri birbirine yakın bulunmuştur (166).

Brusellanın fakültatif hücre içi parazit olması nedeniyle DSÖ tedavide hücre içine etkili antibiyotik kullanımını önermektedir. Günümüzde en etkili tedavi protokolü; doksisisiklinin, rifampin veya streptomisin kombinasyonudur (5, 167). Ancak ilaçların yan etkileri nedeniyle gebe ve çocuklarda kullanım sınırlaması bulunmaktadır. Yeni tedavi protokolleri içerisinde; ağızdan alındığında iyi biyoyararlanım gösteren, yüksek doku konsantrasyonlarına ulaşan, hücre içine çok iyi penetre olabilen fluorokinolonlar yer almaktadır (192, 196, 197).

Bruselloz olgularının %10-15'inde antimikrobiyal tedavi sonrası relaps görülebilir. Brusellozda relapslar çoğunlukla antibiyotik direncine bağlı değil, yetersiz ve yanlış antibiyotik kullanımını sonucu gelişebilir. Relaps sonrası Bruselloz tedavisinde daha önce uygulanan tedavi kombinasyonu tekrarlanabilir, üçlü antibiyotik kombinasyonu verilebilir veya tedavi süresi 6 haftadan uzun süre olarak önerilebilir. Ancak bunların hiç birisi üzerinde tam bir fikir birliği yoktur (133, 134).

Dünya Sağlık örgütü, doksisisiklin (200 mg/gün)-rifampin (600-900mg/gün, oral) kombinasyonunu 6 haftalık tedavi şeklinde önermektedir. Sekiz yaşından küçük çocuklarda trimetoprin-sulfametoksazol ile aminogilikozyd kombinasyonu başarılı bulunmuştur (1). Akut Bruselloz teşhisi alan 8 yaş üzeri çocuklar ve yetişkinlerde: 45 günlük tedavi süresince; günde 2 defa 100 mg doksisisiklin'e ek olarak 14-21 gün 15 mg/kg streptomisin veya 7-14 gün 3-5 mg/kg gentamisin ya da 45 gün günde 600-900 mg rifampin tedavi protokolü tavsiye edilmektedir. Bu tedavi protokolüne alternatif olarak 42 gün boyunca günlük 600 mg rifampin'e ek olarak 42 gün (günde 2 defa 400 mg ofloksasin ya da günde 2 defa 750 mg siprofloksasin) kinolon ya da 2 ay süreyle günde 2 defa 100 mg doksisisiklin'e ek olarak günde 2 defa trimetoprim sulfometoksazol ya da 6-8 hafta süreyle günlük doksisisiklin ya da minosiklin monoterapisi önerilebilir.

Akut Bruselloz teşhisi alan 8 yaş altı çocuklar: 45 gün boyunca günde 2 defa 5 mg/kg trimetoprim sulfometoksazol'e ek olarak 7 gün 5-6 mg/kg/gün gentamisin veya 45 gün boyunca 15mg/kg/gün rifampin'e ek olarak 7 gün 5-6 mg/kg gentamisin tedavi protokolü tavsiye edilmektedir. Gebelikte gelişen Bruselloz olguları: 45 gün süreyle 600-900 mg/gün rifampin tedavi protokolü tavsiye edilmektedir. Buna alternatif olarak ise 45 gün 600 mg/gün rifampin'e ek 45 gün günde 2 defa trimetoprim sulfametoksazol kullanılabilir. Fokal enfeksiyonlarda (endokardit, spondilit, menenjit, paraspinal abse):6-52 hafta süresince günde 2 defa 100 mg doksisisiklin ve 600 mg rifampin'e ek



olarak 14–21 gün süresince günlük 1 gr streptomisin ya da 3–5 mg/kg gentamisin tavsiye edilmektedir. Alternatif tedavi protokolu olarak trimetoprim sulfametoksazol'e ek günde 2 defa 750 mg siprofloksasin ya da günde 2 defa 400 mg ofloksasin kullanılabilir (167).

Bruselloz tedavisinde kullanılan ilaçların çoğuna, in-vitro direnç gözlenmemektedir. Hatta relaps sonrasında izole edilen bakterilerde bile direnç gözlenmemiştir. Relapsın ve tedavide başarısızlığın nedeni olarak bakterinin hücre içi patojen olması öne sürülmektedir (122). Brusellozda temel sorun tedavinin yetersiz kalması ve relapstır. Tedavinin yetersiz kalması dirençten çok kullanılan antibiyotiklerin farmakokinetik ve farmakodinamik etkileri ile ilişkilidir (167, 190).

Çoğu olguda tedavinin yetersiz kalması; yetersiz doz antibiyotik kullanımı, tedavinin kısa kesilmesi ve hasta uyumsuzluğundan kaynaklanmaktadır. Relaps, sıklıkla enfeksiyonun başlangıcından bir yıl sonra meydana gelmektedir, ve genellikle hastanın hücrel immün yanıtının relaps oluşumunda önemli olduğu düşünülmektedir (168, 169). Ayrıca aminoglikozidlerin parenteral uygulanma zorlukları, tüberkülozun problem olduğu ülkelerde rifampin direnç tehlikesi, tedavinin başlamasından birkaç gün sonra semptomların kaybolması ile başlayan tedavi uyumu sorunu, kırsal kesimlerde hasta takibinde gözlenen zorluklara bağlı olarak relapslar gözlenmektedir (169, 170). Brusellaya karşı başlangıç tedavisinin kombine antimikrobiyaller kullanılarak yapılması, monoterapi ve alternatif tedavilerin nadiren uygulanması ve denenmesine neden olmuştur. Ayrıca Bruselloz; endokardit, nöroBruselloz veya spondilit gibi osteoartiküler enfeksiyonlarla komplike olabilmektedir. Böyle vakalarda tedavinin daha agresif ve daha uzun süreli olması gerekmektedir (170).

Brusella tedavisi sonrasında %10-15 relaps görülmektedir. Bu relapsın nedeninin, ilaç direncine mi bağlı olduğu yoksa tedaviye uyumsuzluktan mı kaynaklandığını belirlemek için in vitro testlere başvurulabilir (133, 134).

Birçok sinerji çalışmasında Checkerboard, time-kill yöntemleri kullanılmıştır. Ancak bu testler rutin klinik kullanım için zor ve zaman alıcı yöntemlerdir. Bu nedenle basit ve klinik laboratuvarlarda uygun olan Etest metodu genelde rutin kullanımda uygulanmaktadır (173, 174).

Etest yöntemi sadece kantitatif antimikrobiyal duyarlılığı ortaya koymakla kalmaz ayrıca mikroorganizmalara karşı kombine antimikrobiyal sinerjik aktiviteyi de ortaya koymaktadır (173, 175-177).

Yaptığım literatür araştırmalarında, yeni ve konvansiyonel antibiyotikler ile brusella izolatları üzerinden birçok çalışma yapılmasına rağmen, geleneksel ve konvansiyonel olarak kullanılan antibiyotiklerin kombinasyon rejimleri için in vitro sinerjik aktivitelerini ölçen ve karşılaştıran çalışmaların yok denecek kadar az. Bu durumun en önemli nedeni etkenin coğrafi dağılımının göreceli olarak dar olması, izolasyonunun zor olması ve halen standardizasyon sorunlarının bulunmasıdır. Sinerjik aktivite test yöntemleri tekrarlanabilirlik ve yorumlanma açısından standardize edilmemiş olduğu için, farklı çalışmalar ile bu yöntemin sonuçlarını karşılaştırmak son derece zordur.

Çalışmamızda, Etest yöntemini kullanarak geleneksel ve yeni antimikrobiyal kombinasyonların etkinliğini değerlendirmek amaçlanmıştır. 40 *Brucella* izolatı üzerinde Etest predifüzyon tekniği kullanılarak, beş farklı antibiyotik ve kombinasyonlarının (DOX-RIF, RIF-SXT, DOX-STR, CIP-SXT ve CIP-STR), üretici firma tavsiyesi doğrultusunda minimum inhibitör konsantrasyon, MİK<sub>50</sub>, MİK<sub>90</sub> ve fraksiyonel inhibitör konsantrasyon indeksi (FIC) belirlenmiştir.

MİK<sub>90</sub> değerine göre en duyarlı antibiyotik SXT(MİK<sub>90</sub> 0,032 µg/ml) iken DOX MİK<sub>90</sub> 0,064 µg/ml, CIP MİK<sub>90</sub> 0,125 µg/ml, STR MİK<sub>90</sub> 0,5 µg/ml ve RIF MİK<sub>90</sub> 0,75 µg/ml olarak saptanmıştır. Rifampin en yüksek MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerine sahiptir.

Türkiye’ de farklı yıllarda yapılan çalışmalarda MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri dikkate alındığında genel bağlamda en duyarlı antimikrobiyal ajan SXT’dir. Kılıç ve arkadaşlarının 16 *B. melitensis* izolatında yaptığı çalışmada SXT, MİK<sub>50</sub> değeri 0,064µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,094 µg/ml olarak belirlemiştir (179). Baysan ve arkadaşlarının 37 *Brucella spp.* izolatında yaptığı çalışmada SXT, MİK<sub>50</sub> değeri 0,047 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,094 µg/ml olarak bildirmiştir (180). Alışkan ve arkadaşlarının 65 *B.melitensis* izolatında yaptığı çalışmada SXT, MİK<sub>50</sub> değeri 0,012 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,023 µg/ml olarak belirtmiştir (178). Türkiye de SXT direnci %2 den az oranda belirlenmesine rağmen (181) dünya genelinde belirgin oranda SXT direncine rastlanılmıştır (182). Montejon ve arkadaşlarının yaptığı SXT’nin tek başına kullanıldığı klinik çalışmada 64 hastaya 6 ay süresince SXT verilmiş ve tedavi oranı %81 olarak saptanmıştır. Yaklaşık olarak %18 hastada ise yan etki, tedavi başarısızlığı, nüks veya tedavinin tamamlanmaması sebeplerinden dolayı değişikliğine gidilmiştir (183). Lubani ve arkadaşlarının 161 çocuk üzerinde yaptığı başka bir çalışmada SXT ile tedavi sonrasında relaps oranını %30 olarak bildirmişlerdir (184).

Çalışmamızda MİK<sub>50</sub>(0.5), MİK<sub>90</sub>(0.75) olarak bulunduğumuz rifampin MİK değeri en yüksek antimikrobiyal ajan olarak belirlenmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda rifampin MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri ≤1 olarak tesbit edilmiştir. Bu veriler çalışmamızda bulduğumuz sonuçları desteklemektedir. Şengöz ve arkadaşlarının 43 *Brucella* izolatı ile yaptığı çalışmada rifampin, MİK<sub>50</sub> değeri 0,75 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 1 µg/ml olarak belirlenmiştir (160). Eşel ve arkadaşlarının 74 *B. melitensis* izolatı ile yaptığı çalışmada rifampin, MİK<sub>50</sub> değeri 0,50 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 1 µg/ml olarak belirlenmiştir (185). Altay G.'nin 70 *Brucella spp.* izolatı ile yaptığı çalışmada rifampin, MİK<sub>50</sub> değeri 0,75 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 1 µg/ml olarak belirlenmiştir (159). Baykam ve arkadaşlarının 42 *Brucella spp.* izolatı ile yaptığı çalışmada rifampin, MİK<sub>50</sub> değeri 0,75 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 1 µg/ml olarak belirlenmiştir (181). Lubani ve arkadaşlarının yaptığı birkaç çalışmada Rifampin tek başına kullanılmış. Tek başına rifampin tedavisinin tüberküloz rezistansına sebep olma riski nedeni ile bu tür çalışmaların yapılması durdurulmuştur (184). Rifampin'in MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri yüksek saptanmasına rağmen çalışmamızda kombinasyon tedavilerinde ciddi sinerjik etkinlik gösterdiği saptanmıştır.

Türkiye'de ve yurt dışında değişik yıllarda Etest ve mikrodilüsyon yöntemi ile yapılan çalışmalarda doksisiklin MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri düşük bulunmuştur. Altay'ın 70 *Brucella spp.* izolatı ile yaptığı çalışmada doksisiklin MİK<sub>50</sub> değeri 0,023 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,064 µg/ml olarak belirlenmiştir (159). Şengöz ve arkadaşlarının 43 *Brucella spp.* izolatı ile yaptığı çalışmada doksisiklin MİK<sub>50</sub> değeri 0,023 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,090 µg/ml olarak belirlenmiştir (160). Alışkan ve arkadaşlarının 65 *Brucella spp.* izolatı ile yaptığı çalışmada doksisiklin MİK<sub>50</sub> değeri 0,016 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,032 µg/ml olarak belirlenmiştir (178). Kılıç ve arkadaşlarının 16 *Brucella spp.* izolatı ile yaptığı çalışmada doksisiklin MİK<sub>50</sub> değeri 0,094 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değerini 0,25 µg/ml olarak bildirmiştir (179).

Baysan ve arkadaşlarının 37 *Brucella spp.* izolatı ile yaptığı çalışmada doksisiklin MİK<sub>50</sub> değerini 0,047 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değerini 0,125 µg/ml olarak bildirmiştir (180). Baykam ve arkadaşlarının 42 *Brucella spp.* izolatı ile yaptığı çalışmada doksisiklin MİK<sub>50</sub> değeri 0,032 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,064 µg/ml olarak belirlenmiştir (181). Eşel ve arkadaşlarının 74 *B.melitensis* izolatı ile yaptığı çalışmada doksisiklin MİK<sub>50</sub> değeri 0,03 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,06 µg/ml olarak belirlenmiştir (185). Rolain ve arkadaşlarının *Brucella spp.* izolatlarında yaptığı çalışmada doksisiklin MİK<sub>50</sub> değeri 0,06 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,25 µg/ml olarak belirlenmiştir (187). Rubinstain ve arkadaşlarının 86 *Brucella melitensis* izolatı ile yaptığı çalışmada doksisiklin MİK<sub>50</sub>

değeri 0,25 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,4 µg/ml olarak belirlenmiştir (188). Hoe'nin 85 *Brucella abortus* izolatu ile yaptığı çalışmada doksisisiklin MİK<sub>50</sub> değeri 0,125 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,125 µg/ml olarak belirlenmiştir (189).

Klinik olarak yapılan çalışmalardan biri olan, Lubani ve arkadaşlarının oksitetrasiklin ile doksisisiklin şeklinde iki tedavi yöntemini denedikleri çalışmada; nüks oranının tedavi süresiyle ters orantılı olduğu gösterilmiş ve çalışmada belirgin oranda relaps gözlenmiştir. Tedavi süresini sekiz haftaya uzattıklarında relaps gelişimi gözlenmemiştir (184). 1993 yılında Montejo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada hastalara altı haftalık tedavi süresince düzenli olarak 200 mg parenteral oral (p.o.) doksisisiklin uygulanmıştır. 71 hasta üzerinde yapılan çalışmada nüks oranı %14 olarak bulunmuştur (183). Bruselloz tedavisinde tek başına doksisisiklin kullanımı son bilgilere göre dikkate alınmalı ve bu tedavinin olduğu yeni çalışmalara yer verilmelidir (190).

Çalışmamızda siprofloksasin'in MİK değerlerine bakıldığında *Brucella* suşlarına karşı etkinliği SXT ve DOX ile kıyaslanacak derecede düşük olarak belirlenmiştir. Türkiyede ve yurt dışında yapılan çalışmalarda siprofloksasin'in MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri genelde düşük bulunmuştur. Alışkan ve arkadaşlarının 65 *Brucella spp.* izolatu ile yaptığı çalışmada, siprofloksasin MİK<sub>50</sub> değeri 0,094 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,125 µg/ml olarak belirlenmiştir (178). Turan ve arkadaşlarının 82 *Brucella melitensis* izolatında yaptığı çalışmada, siprofloksasin MİK<sub>50</sub> değeri 0,094 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,19 µg/ml olarak belirlenmiştir (191). Baykam ve arkadaşlarının 42 *Brucella spp.* izolatu ile yaptığı çalışmada, siprofloksasin MİK<sub>50</sub> değeri 0,094 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,19 µg/ml olarak belirlenmiştir (181). Rubinstain ve arkadaşlarının 86 *Brucella melitensis* izolatu ile yaptığı çalışmada, siprofloksasin MİK<sub>50</sub> değeri 0,4 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,8 µg/ml olarak belirlenmiştir (188).

Yeni kuşak florokinolonlar, oral biyoyararlanımlarının iyi olması, yüksek doku konsantrasyonlarına ulaşmaları, hücre içine penetrasyonları ve *Brucella* türlerine in vitro etkinlikleri nedeniyle Bruselloz tedavisinde ilgi çeken antimikrobiyallerdir (192). Doğanay ve Aygen'in 14 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada; 3–6 hafta boyunca 12 saatte bir 500mg siprofloksasin tedavisi uygulamışlar, tedavi sonrasında hastaların 3'ünde (%21) relaps bildirmişlerdir (193). 1992'de Al Sibai ve arkadaşlarının 6–12 hafta siprofloksasin ile tedavi gören 16 hasta üzerinde yaptıkları randomize olmayan prospektif çalışmada %27 oranında nüks gözlenmiştir (194). Yapılan çalışmalarda; tedavide florokinolonların tek başına kullanıldıkları vakalarda yüksek oranda relaps

görülmekte olduğu, Bruselloz tedavisinde tek başına kullanılmalarının uygun olmadığı, ancak *Brucella* izolatlarına karşı invitro etkinliklerinin çok iyi olduğu varsayımı nedeniyle kombine tedavi rejimlerinde kullanılabileceğini şeklinde yorumlanmaktadır (195). Çalışmamızda streptomisin için MİK<sub>50</sub> (0.25) ve MİK<sub>90</sub> (0,5) değerleri belirlenen duyarlılık aralığında bulundu. Diğer çalışmalara bakıldığında STR, duyarlılık aralığında bulunmasına rağmen bazı çalışmalarda önemli derecede düşük MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri bildirilmiştir. Altay'ın 70 *Brucella spp.* izolatu ile yaptığı çalışmada, streptomisin MİK<sub>50</sub> değeri 0,50 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,75 µg/ml olarak belirlenmiştir (159). Eşel D. ve arkadaşlarının 74 *B. melitensis* izolatu ile yaptığı çalışmada, streptomisin MİK<sub>50</sub> değeri 0,50 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,50 µg/ml olarak belirlenmiştir (185). Rolain ve arkadaşlarının *Brucella spp.* izolatları ile yaptığı çalışmada, streptomisin MİK<sub>50</sub> değeri 1 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 2 µg/ml olarak belirlenmiştir (187). Şengöz ve arkadaşlarının 43 *Brucella spp.* izolatu ile yaptığı çalışmada, Streptomisin MİK<sub>50</sub> değeri 0,5 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 0,75 µg/ml olarak belirlenmiştir (160). Garcia Rodriguez ve arkadaşlarının 62 *Brucella spp.* izolatu ile yaptığı çalışmada, Streptomisin MİK<sub>50</sub> değeri 2 µg/ml; MİK<sub>90</sub> değeri 4 µg/ml olarak belirlenmiştir (213).

1940'ların sonundan bugüne kadar kombine antibiyotiklerin Bruselloz tedavisinde kullanılması ile birlikte monoterapi birçok yayında önerilmemektedir (199).

Brusella tedavisinde DSÖ'nün önerdiği kombine antibiyotiklere, izolatlar genellikle klinik olarak duyarlı bulunmakla birlikte, invitro sinerji testleri her zaman klinikle uyumlu olmayabilir. Time-Kill, checkerboard ve Etest çok yaygın kullanılan invitro sinerji yöntemleridir (180). *Brucella* izolatları için invitro antimikrobiyal kombinasyonun etkinliğini belirleyen çok az sayıda çalışma mevcuttur (173, 188, 200). *Brucella* izolatlarına karşı antimikrobiallerin sinerjik etkilerini ve invitro duyarlılıklarını belirlemek için kullanılan Etest metodu, laboratuvara az iş yükü ve daha az zaman gerektirdiği için uygun bir yöntemdir. Ancak hala standart bir sinerji test metodu oluşturulmamıştır (173, 201).

Kılıç ve arkadaşlarının yaptığı 16 *Brucella melitensis* izolatında Etest kombinasyon yöntemi ile yaptığı çalışmada olduğu gibi çalışmamızda da in vitro sinerjik etkinin araştırıldığı kombinasyonlar içinde en yüksek etkinlik DOX-RİF (%100) olarak saptanmıştır (179). Orhan ve arkadaşlarının 16 *Brucella melitensis* izolatında Etest ve checkerboard yöntemi ile yapmış olduğu çalışmadan edinilen bulguları değerlendirdiğimizde de Etest metodu ile DOX-RİF sinerjik etkinliği (%94), checkerboard method ile DOX-RİF sinerjik etki (%63) saptanmıştır (173). Akova ve

arkadaşlarının checkerboard method ile çalıştıkları 20 *Brucella spp.* izolatının 17'sinde DOX-RİF kombinasyonunda sinerjik etki, iki izolatta aditif etki, bir izolatta indifferans etkinlik tesbit etmişlerdir (202).

Çalışmamızda RİF-SXT kombinasyonunun sinerjik etkisi %52.5, aditif etkisi %30, indifferans etkisi %12.5, antagonistik etkisi %5 oranında bulunmuştur. Kılıç ve arkadaşları ise sinerjik etkinliği %88 oranında, aditif etkinliği %13 olarak saptamışlardır (179). Orhan ve arkadaşlarının çalışmasında ise sinerjik etkinlik %38, aditif etkinlik %19, indifferans etkinlik %44 olarak belirlenmiştir. Checkerboard metodu ile sinerjik etki %13, aditif etki %31, indifferans etki %56, antagonistik etki ise %6 oranında saptanmıştır (214).

DOX-STP kombinasyonunun çalışmamızdaki sinerjik etkinliği %32.5, aditif etkinliği %40, indifferans etkinliği %27.5 olarak belirlendi. Benzer çalışmalardan biri olan Kılıç ve arkadaşlarının çalışmasında ise sinerjik etkinlik görülmezken aditif etkinlik %12.5, indifferans etkinlik %68.75, antagonistik etkinlik ise %18.75 oranında bulunmuştur (179).

Al-Dahouk D. ve arkadaşlarının time-kill metodu ile DOX-RİF ve DOX-STP arasında yaptıkları kombinasyon çalışmasında ise DOX ile STP kombinasyonunda sinerjik etki izlenmemiştir (203). Dizbay ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada DOX-STP arasında sinerjik etki bulunmamış, %19 oranında antagonizma bildirmişlerdir (176). Ancak Orhan G. ve arkadaşlarının Checkerboard metodu ile %44, Etest metodu ile %69 sinerjik etki belirlemişlerdir. Checkerboard metodu ile %31, Etest metodu ile %6 antagonizma belirlenmiştir (173). Akova MD ve arkadaşları Checkerboard metodu ile %90 sinerjik etki belirlemişlerdir (204).

CİP-SXT kombinasyonunun çalışmamızdaki sinerjik etkinliği %25, aditif etkinliği %50, indifferans etkinliği %22.5 antagonistik etkinliği ise %2.5 olarak bulundu. Kılıç S. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise sinerjik etkinlik %44, aditif etkinlik %56 oranında bulunmuş olup indifferans ve antagonistik etkinlik bulunamamıştır (179). CİP ile SXT'nin MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri yapılan çalışmalarda çok düşük bulunmuştur. CİP-SXT Brusellozun tedavisinde birinci basamak olarak kullanılmasa da klasik tedavide nüks ve yan etki oluştuğu zaman alternatif tedavi ya da birinci basamak tedavi ile kombine edilebilir (179). Kronik osteomyelit olgularında DOX ve RİF'e ek olarak CİP kullanımı ile tedavide başarılı sonuçlar alınan birçok vaka bildirilmiştir (205).

CİP-STP kombinasyonunun çalışmamızdaki sinerjik etkinliği %57.5 aditif etkinliği %35, indifferans etkinliği %7.5 olarak bulundu. Yine Kılıç ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sinerjik ve antagonistik etkinlik saptanamamış olup aditif etkinlik %7, indifferans etkinlik %94 oranında bulunmuştur (179).

Yaptığımız çalışmada in vitro sonuçları ile klinik ilişki kurulmamasına rağmen klinik olarak yapılan diğer çalışmalarda doksisisiklin ve streptomisin kombinasyonunun, doksisisiklin ve rifampin kombinasyon tedavisine göre hem relaps hem de tedavi başarısızlığı açısından daha üstün olduğunu bildirilmektedir (DOX-RİF relaps oranı yaklaşık 22%, DOX-STP relaps oranı ise yaklaşık 8%). Yan etki açısından ise bu kombinasyonların birbirlerine karşı avantajları bildirilmemiştir (190). Aminoglikozidlerin parenteral kullanılması gerekliliğinden dolayı özellikle sağlık personelinin sınırlı olduğu ülkelerde bu tedavi şekli sorun yaratabilir (206). Yapılan çeşitli çalışmalarda, hastalarda en sık kullanılan tedavi kombinasyonunun doksisisiklin ve rifampin olduğu bildirilmektedir (207, 208). Ko-trimokzasol ve rifampin kombinasyonunun tedavisi çocuklarda iyi sonuçlar vermiş fakat bu tedavinin rifampine direnç geliştirme riski nedeniyle erişkinlerde yeterli sonuçlar elde edilememiştir (184, 209, 210).

*Brucella*'larda in-vitro duyarlılık testlerine yönelik standart bir yöntem olmaması; test sonuçlarının pH, inokulum miktarı ve besiyeri gibi pek çok faktörden etkilenmesi ve relaps ile direnç arasında bir bağlantı bulunmaması nedeniyle rutinde duyarlılık testi uygulanmamaktadır (60, 211). Günümüzde çok sayıda antibiyotik duyarlılık yöntemi mevcuttur. Kantitatif sonuç veren yöntemler farmakodinamik yorumlama bakımından daha güvenilirdir (212). Antimikrobialeri diğer ilaçlardan ayıran önemli özelliklerden biri, etkilerinin verildikleri konağa değil, patojen mikroorganizmalara yönelik olmasıdır. Konak, mikroorganizma ve ilaç arasındaki ilişki diğer ilaçlara göre daha karmaşık ve farklıdır. Antibiyotiklerin konaktaki metabolizması (farmakokinetik özellikleri) ve dağılımı (farmakodinamik özellikleri) tedavi başarısı için önemlidir. Brusella tedavisinde hem monoterapi hem de kombine tedavide kullanılan antibiyotiklerin in vitro olarak etkinliğini ölçen standart bir metod olmaması nedeniyle ucuz olması ve kullanım kolaylığı açısından genellikle Etest yöntemi kullanılmaktadır.

Çalışmamızda Etest yöntemi ile in vitro olarak *Brucella* izolatlarının en düşük MİK<sub>50</sub>, MİK<sub>90</sub> değeri SXT, DOX, CİP ve STP için belirlenmiştir. Monoterapide hastanın yaşı, kliniği, hamilelik, fokal bir odak olup olmadığı, ilaçların kullanım kolaylığı, yan etkilerini dikkate alarak yetişkinlerde relaps riski olmayan hastalara DOX veya SXT

akut Brusellozda veya profilaktik olarak önerilebilir. Alternatif olarak florokinolonların, oral biyoyararlanımlarının iyi olması, yüksek doku konsantrasyonlarına ulaşmaları, hücre içine penetrasyonları ve *Brucella* türlerine in vitro etkileri nedeniyle Bruselloz tedavisinde kullanılabilirliğini desteklemek amacıyla, ek in vitro ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Brusella izolatlarında rifampinin MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerinin yüksek bulunmasına rağmen ikinci en etkili sinerjik ve aditif etki rifampin ile trimetoprim-sulfametoksazol kombinasyonunda belirlenmiştir. Klinik olarak yapılan çalışmalarda sekiz yaş altı çocuklarda uygun doz ve 3-5 hafta süre ile verilen RİF-SXT kombinasyonların relaps oranı %4-8 olarak tesbit edilmiş ancak tedavi süresi 8 haftaya uzatıldığında relaps görülmemiştir (184).

Çalışmamızda CIP-SXT ve RİF-SXT nin antagonistik etkileri sırayla %2.5 ve %5 olarak saptanmıştır. Kılıç ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada DOX-STP kombinasyonunun antagonistik etkisi %19 olarak bildirilmiştir (179). Orhan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise Etest metodu ile DOX-STP kombinasyonunun antagonistik etkinliği %6, checkerboard metodu ile %13 oranında bulunmuş olup, RİF-SXT kombinasyonunun antagonistik etkisi %7 olarak belirlenmiştir (173).

Bununla birlikte *Brucella* için invitro olarak yapılmış kombine çalışmalar sınırlı olduğundan elimizde yeterince veri yoktur. Ancak klinik olarak yapılan çalışmalarda; tedavide kullanılan antibiyotiklere karşı, relaps gelişen vakalarda direnç bildirilmemiştir.

Bruselloz tedavisi; yüksek tedavi başarısızlığı ve relapslar nedeniyle hala büyük bir problemdir. Mikroorganizmanın fagositik hücreler içinde canlılığını sürdürebilmesi nedeniyle tedavinin kombine, aynı zamanda hücre içine penetre olabilen ve asidik ortamda etkinlik gösterebilen antibiyotiklerin kullanılması gereklidir.

Bu çalışmada araştırmaya alınan suşlar içinde kotrimoksazol en etkin; ve rifampin en yüksek MİK düzeyine sahip ajan olarak bulunmasına rağmen, doksisisiklin-rifampinin kombinasyonunun in vitro ortamda en iyi sinerjik etki gösterdiği saptanmıştır. Klinik tedavi planlanırken, etken izole edilmiş ise, kullanılacak antimikrobiyal kombinasyonunun etkinliğinin test edilmesi tedavinin başarılı olarak yönlendirilebilmesi için faydalı olacaktır.



## 5. KAYNAKLAR

1. Young EJ, Principles and Practice of Infectious Diseases, Vol. 2. 5th edn. 2000; 2386-2393.
2. Bruce D. Note on the discovery of a microorganism in Malta Fever. Practitioner. 1987; Vol:36:161-170.
3. Bang B. The etiology of epizootic abortion. The Journal of Comparative Pathology and Therapeutics. 1897; 10: 125-150.
4. Evans AC. Further Studies on Bacterium Abortus and Related Bacteria: II. A Comparison of Bacterium Abortus with Bacterium Bronchisepticus and with the Organism Which Causes Malta Fever. *J. Infect. Dis.* 1918; 22(6): 580-593.
5. Sözen TH. Bruselloz İnfeksiyon Hastalıkları. Ed. Topçu AV, Söyletir G, Doğanay M. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul 1996; 486-491.
6. VVilfert CM. Brucella İn: Zinsser Microbiology Edited by: Joklik WK. 20th edition Appleton and Lange, Connecticut. 1992; 609-614.
7. Huddleston, I. Forest, Differentiation of the species of the genus Brucella. Technical Bull, No: 100 Bacteriological section, Michagan Agricultural experiment station.1929.
8. Traum, J. Report of tile Chief of the Bureau of Animal Industry. U.S.Department of Agriculture, Washington D.C. 1914; 30
9. Carmichael LE. Burner DW. Characteristics of a newly recognized species of Brucella responsible for infectious canine abortions. *Comell vet.* 1968; 48: 579-592.
10. Mantur BG, Amarnath SK, Shinde RS. Review of clinical and laboratory features of human Brucellosis. *Indian J Med Microbiol.* 2007; 25(3): 188–202.
11. T.C. Tarım Bakanlığı Veteriner İşleri Genel Müdürlüğü: ‘Sığırlarda Brusellosis ve Tüberkülozis Mücadele Projesi-14 yıllık’ Tarım Bakanlığı Brusellosis ve Tüberkülozis Şubesi, Ankara. 1965.
12. Golem SB: Memleketimizdeki insan ve ehli hayvanlarda Brucella bakımından serolojik araştırma, *Türk Hıfsız. Tecr. Biol. Mec.* 1943; 1:105.
13. Baysal B. Brucella. Ustaçelebi Ş(ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji I.Baskı: Öncü Basımevi.* Ankara. 1999; 571-577.
14. Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet Microbiol* 2002; 90(1–4): 81–110.
15. Aydın N.*Brusella* enfeksiyonları, *Özel Mikrobiyoloji, Bakteriyel enfeksiyöz Hastalıklar*, A.Ü.Vet. Fak. Yayınları No.386, Ankara. A.Ü.Basımevi. 1982; 225-254

16. Gotuzzo E. and Cellillo C. *Brucella*. In: Infectious Diseases, Gorbach, S.L., J.G. Bartlett and N.R. Blacklow, (Eds.). 2nd Edn. W.B. Saunders Company. Philadelphia.1998; 1837-1845.
17. International Journal of Antimicrobial Agents Volume 36, Supplement 1, November 2010, Pages S8–S11
18. Alton GG. Jones LM. Pietz DE. Laboratory Techniques in Brucella. World Health Organization, Geneva 1975.
19. Al-Mariri A. Ultraviolet C lethal effect on *Brucella melitensis*. New Microbiol. 2008;31:47–55.PubMed PMID: 18437841
20. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. BarışYayıncılık Fakülteler Kitabevi. İzmir. 2002; 475-478.
21. Türkçapar N. Kurt H. Brucelloz. Ed. Uzun O. Ünal S. Güncel Bilgiler Işığında İnfeksiyon Hastalıkları Cilt 2. Ankara. Bilimsel Tıp Yayınevi. 2002; 1015-1024.
22. Corbel MJ. Microbiology of the genus *Brucella*. In: Young EJ, Corbel MJ, eds. Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects. Boca Raton, FL: CRC Press. 1989: 54-67
23. Young EJ. An overview of human brucellosis. Clin. Infect. Dis. 1995; 21: 283-289
24. Demirel R, Erdoğan S, Sözen, M A. Determination of high risk regions of human Brucellosis in Turkey using exploratory spatial Analysis. Türkiye Klinikleri J. Med. 2009; 29: 25-35.
25. Baron JE, Peterson LR, Finegold SM. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. St. Louis, Missouri: Mosby. Mycobacteria. 1994; 590–633.
26. Corbel MJ: International Committee on brucellosis, Sixth Report. Technical Reports Series 740. WHO, Geneva, 1986.
27. Ustaçelebi Ş. Temel ve klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi. 1999; 571-577.
28. Elkiran O, Kocak G, Karakurt C, Kuzucu C. *Brucella* myocarditis in a 3-month-old: probable transplacental transmission.
29. Zoonotik Hastalıklar Hizmetiçi Eğitim Kitabı, Ankara, 2010
30. Öztürk R, Sosyal F, Altaş K. Sperm kültüründe *Brucella melitensis* üretilen bir epididimo-orşit Bruselloz olgusu. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 1993; 23: 148-50
31. Palanduz A, Palanduz S, Güler K, Güler N. Brucellosis in a mother and her young infant: probable transmission by breast milk. Int J Infect Dis. 2000; 4(1): 55-6.
32. Çelebi S, Hacımustafaoğlu M, Yılmaz E. Çocuklarda nöroBruselloz: üç vaka takdimi. Çocuk Sağ Hast Derg 2004; 47 (1): 46-9.

33. Altındış M. Afyon Bölgesi besicilerinde, kasaplarda, süt ürünleri toplayıcısı ve imalathanelerinde çalışanlarda Bruselloz seropozitifliği. *İnfeksiyon Dergisi*. 2001; 15: 11-15.
34. Büke ÇA, Çiçeklioğlu M, Erdem İ, Özacar T ve ark. Süt ürünleri işleyicilerinde Bruselloz prevalansı ve Brusellozu bilme durumu. *İnfeksiyon dergisi*. 2000; 14: 321-5.
35. Gür A, Geyik MF, Dikici B, Nas K ve ark. Complications of brucellosis in different age groups: A study of 283 cases in Southeastern Anatolia of Turkey. *Yonsei Medical Journal*. 2003; 44: 33-44.
36. Göktaş P. Erzincan bölgesinde Bruselloz olgularında artış. *İnfeksiyon Dergisi*. 1990; 4: 475-81.
37. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 91-9.
38. Sağlık Bakanlığı verileri ([www.saglik.gov.tr](http://www.saglik.gov.tr) İstatistikler/Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Çalışma Yıllığı 2005).
39. Taşova Y, Saltoğlu N, Yılmaz G, İnal S. Bruselloz: 238 erişkin olgunun klinik, laboratuvar ve tedavi özelliklerinin değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi*. 1998; 12: 307-12.
40. Yüce A, Çavuş AS, Türkiye’de Bruselloz: Genel bakış. *Klimik Derg*. 2006; 19(3):87–97
41. Doğanay M, Aygen B. Human brucellosis: an overview. *Int J In Inect Dis*. 2003; 7: 173–182.
42. Young EJ. *Brucella species*. In: Mandell GL, Benett JE, Dolin R (eds). Elsevier Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2005; 2669-2674.
43. Robichaud S, Libman M, Behr M, Rubin E. Prevention of laboratory-acquired brucellosis. *Clin Infect Dis*. 2004; 38(12):119-22.
44. Dornand J, Gross A, Lafont V, Liautard J, Oliaro J, Liautard JP. The innate immune response against *Brucella* in human. *Vet Microbiol*. 2002; 90(1–4): 383–94.
45. Morales-Otero P. Further attempts in experimental infection of man with a bovine strain of *Brucella abortus*. *J Infection Dis*. 1933; 52:54-59.
46. Arnow PM, Smaron M, Ormiste V. Brucellosis in a group of travelers to Spain. *JAMA*. 1984; 251: 505-507.

47. Orduna A, Orduna C, Eiros M, et al. Inhibition of the degranulation and myeloperoxidase activity of human polymorphonuclear neutrophils by *Brucella melitensis*. *Microbiologia*.1991; 7: 113-119.
48. Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, et al. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infect Immun*. 2003; 71: 1481-90.
49. Fernandez-Prada CM, Zelazowska EB, Nikolich M, et al. Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: Bacterial surface o-polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infect Immun*. 2003; 71: 2110-2119.
50. Jiang X, Baldwin CL. Iron Augments Macrophage-Mediated Killing of *Brucella abortus* Alone and in Conjunction with Interferon Gamma. *Cell Immunol*. 1993; 148(2): 397-407.
51. Golding B, Scoot DE, Scharf O, et al. Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes Infect*.2001; 3: 43-48.
52. Corbel MJ. Microbiological aspect. In: Madkour MM.Madkour's *Brucellosis*. NewYork: Springer-Verlag. 2001; 51-64.
53. Adams LG, Templeton JW. Genetic resistance to bacterial diseases in animals. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot*.1998; 17: 200-219.
54. FENG J, LI Y, HASHAD M. et al. Bovine natural resistance associated macrophage protein 1 (Nrampl) gene. *Genome Res*.1996; 6: 956-964.
55. Ariza J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, Gudiol F. Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis*. 1992; 14: 131-140.
56. Pellicer T, Ariza J, Foz A, et al. Specific antibodies detected during relapse of human brucellosis. *J Infect Dis*.1988; 157: 918-924.
57. Gazapo E, Lahoz JG, Subiza JL, et al. Changes in Ig M and IgG antibody concentrations in brucellosis over time: Importance for diagnosis and follow-up. *J Infect Dis*.1989; 159: 219-225.
58. Colmenero JD, Reguera MJ, Martos F, et al. Complications associated with *Brucella melitensis* infection: A study of 530 cases. *Medicine*.1996; 75: 195-211.
59. Ariza J,Corredoira J,Pallares R,et al. Characteristics of and risk factor for relapse of brucellosis in human. *Clin Infect Dis*.1995; 20: 1241-1249.

60. 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.
61. Spink WW. What is chronic brucellosis? *Ann Intern Med.* 1951; 35: 258-274.
62. Young EJ. Serologic diagnosis of human brucellosis: Analysis of 214 cases by agglutination test and review of the literature. *Rev Infect Dis.* 1991; 13: 359-372.
63. Imboden JB, Canter A, Cluff LE, Trever RW. Brucellosis. III. Psychologic aspects of delayed convalescence. *AMA Arch. Intern Med.* 1959; 103(3): 406-414.
64. Cluff LE. Medical aspects of delayed convalescence. *Rev Infect Dis.* 1991; 13: 138-140.
65. Petrella R, Young EJ. Acute brucella ileitis. *Am J Gastroenterol.* 1988; 83: 80-82.
66. Jorens PG, Michielsen PP, Van den Ender EJ, et al. A rare cause of colitis: *Brucellamelitensis*. *Dis. Colon Rectum.* 1991; 34: 194-196.
67. Spink WW, Hoffbauer FW, Walker WW, et al. Histopathology of the liver in human brucellosis. *J Lab Clin Med.* 1949; 34: 40-58.
68. Young EJ. Brucellosis hepatitis: The absence of granulomas. *Ann Intern Med.* 1979; 91: 414-415.
69. Ariza J, Pigrau C, Canas C, et al. Current understanding and management of chronic hepatosplenic suppurative brucellosis. *Clin Infect Dis.* 2001; 32: 1024-1033.
70. Colmenero J, Queipo-Ortuno MI, Reguera JM, et al. Chronic hepatosplenic abscesses in brucellosis. Clinico-therapeutic features and molecular diagnostic approach. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; 42: 159-167.
71. Ariza J, Pujol M, Valverde J, et al. Brucellar sacroiliitis: Findings in 63 episodes and current relevance. *Clin Infect Dis.* 1996; 16: 761-765.
72. Solera J, Lozano E, Martinez-Alfaro E, et al. Brucellar spondylitis: Review of 35 cases and literature survey. *Clin Infect Dis.* 1999; 29(6): 1440-1449.
73. Bahar RH, Al-Subaili AR, Mouse AM, et al. Brucellosis: Appearance on skeletal imaging. *Clin Nucl Med.* 1988; 13: 102-106.
74. Khateeb MI, Araj GF, Majeed SA, et al. Brucella arthritis: A Study of 96 cases in Kuwait. *Ann Rheum Dis.* 1990; 49: 994-998.
75. Weil Y, Mattan Y, Liebergall M, et al. Brucella prosthetic joint infection: A report of 3 cases and a review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2003; 36: e81-86.
76. Bouza E, Garcia de la Torre M, Parras F, et al. Brucellar meningitis. *Rev Infect Dis.* 1987; 9: 810-822.

77. McLean DR, Russell N, Khan MY. Neurobrucellosis: Clinical and therapeutic features. *Clin Infect Dis.* 1992; 15: 582-590.
78. Murrell TGC, Matthews BJ. Multiple sclerosis-One manifestation of neurobrucellosis? *Med Hypoth.* 1990; 33: 43-48.
79. Sanchez-Sousa A, Torre C, Campell MG, et al. Serological diagnosis of neurobrucellosis. *J Clin Pathol.* 1990; 43: 79-81.
80. Bucher A, Gaustad P, Pape E. Chronic neurobrucellosis due to *Brucella melitensis*. *Scand J Infect Dis.* 1990; 22: 223-226.
81. Al-Harhi SS. The morbidity and mortality patterns of *Brucella* endocarditis. *Int J Cardiol.* 1989; 25: 321-324.
82. Jacobs F, Abramowicz D, Vereerstraeten P, et al. *Brucella* endocarditis: The role of combined medical and surgical treatment. *Rev Infect Dis.* 1990; 12: 740-744.
83. Odeh M, Pick N, Oliven A. Deep venous thrombosis associated with acute brucellosis. *Angiology.* 2000; 51: 253-256.
84. Cohen N, Golik A, Alon I, et al. Conservative treatment for *Brucella* endocarditis. *Clin Cardiol.* 1997; 20: 291-294.
85. Garcia-Rodriguez JA, Garcia-Sanchez JE, Munos Bellido JL, et al. Review of pulmonary brucellosis: case report on brucellar pulmonary empyema. *Diag Microbial Infect Dis.* 1989; 11: 53-60.
86. Zinneman HH, Hall WH. Chronic renal brucellosis. *N Engl J Med.* 1961; 265: 872-875.
87. Navarro-Martinez A, Solera J, Corredoira J, et al. Epididymo-orchitis due to *Brucella melitensis*: a retrospective study of 59 patients. *Clin Infect Dis.* 2001; 33: 2017-2022.
88. Khan MY, Mah MW, Memish ZA. Brucellosis in pregnant women. *Clin Infect Dis.* 2001; 32: 1172-1177.
89. Crosby E, Llose L, Quesada M, et al. Hematologic changes in brucellosis. *J Infect Dis.* 1984; 150: 419-424.
90. Young EJ, Tarry A, Genta RM, et al. Thrombocytopenic purpura associated with brucellosis: Report of 2 cases and literature review. *Clin Infect Dis.* 2000; 31: 904-909.
91. Ariza J, Servitje O, Pallares R, et al. Characteristic cutaneous lesions in patients with brucellosis. *Arch Dermatol.* 1989; 125: 380-383.
92. Milionis H, Christou L, Elisaf M. Cutaneous manifestations in brucellosis: Case report and review of the literature. *Infect.* 2000; 28: 124-126.

93. Walker J, Sharma OP, Rao na. Brucellosis and uveit. *Am J Ophthalmol.* 1992; 114: 374-375.
94. Al Faran MF. *Brucella melitensis* endogenous endophthalmitis. *Ophthalmologica.* 1990; 201: 19-22.
95. Sümerkan B. *Brucella* Türleri; Willke A, Söyletir G, Doğanay M (eds). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi cilt 2.* Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul. 2002; 1647-1652.
96. Aktaş O. Brusellozda Mikrobiyolojik Tanı. *ANKEM derg.* 2003; 17(3):
97. Winn WC Jr, Allen SD, Janda WM, et al (eds). *Miscellaneous Fastidious Gram-Negative Bacilli.* In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia. 2006; 429-548.
98. Ozturk R, Mert A, Kocak F. The diagnosis of brucellosis by use of BACTEC 9240 blood culture system. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2002; 44: 133-5.
99. Noviello SR, Gallo M, Keelly R, Limberger K, et al. Laboratory-acquired brucellosis. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10: 1848-1850.
100. Bogdanovich T, Skurnik M, Lubeck PS, Ahrens P, Hoorfar J. Validated 5' nuclease PCR assay for rapid identification of the genus *Brucella*. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 2261-2263.
101. Rijpens NP, James G, Van Asbroeck M, Rossau R, and Herman L. M. F. Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62: 1683-1688.
102. T.C Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri, Sağlık Bakanlığı Matbaası, Ankara, 1995.
103. Alton GG, Jones LM, Pietz DE: *Laboratory Techniques in Brucellosis.* Second edition, WHO monograph series No:55, Geneva, 1975.
104. Noparstek E, Block CS, Slavin S: Transmission of brucellosis by bone Marrow transplantation. *The Lancet,* 1982; 1: 574-575.
105. Geyik F. M. Brusellozun Klinik Formları. *Klinik Dergisi.* 30 Mart-3 Nisan İstanbul Kongresi Kitabı. 2003; 209-210.
106. Altuğlu I, Zeytinoğlu A, Bilgiç A, Kancıoğlu S, Karakartal G, Smiths H, Evaluation of *Brucella* dipstick assay for the diagnosis of acute brucellosis. *Diag Microbiol Intect Dis.* 2002; 44: 241-243.

107. Araj GF, Brown GM, Haj MM, Madhvan NV. Assessment of Brucellosis Card test in screening patients for brucellosis. 1988; 100(3): 389-398.
108. Lucero NE, Foglia L, Ayala SM, Gall D, Nielsen K: Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis, *J Clin Microbiol* 1999; 37(10): 3245-3248
109. Orduna A, Almaraz A, Prado A, et al. Evaluation of an immunocapture-agglutination test (Brucellacapt) for serodiagnosis of human brucellosis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 4000-5.
110. Parrat D, Nielsen KH, White RG, Payne DJH: Radioimmunoassay of IgM, IgG And Iga Brucella Antibodies. *Lancet.* 1977; 21;1(8021): 1075-8.
111. Hoşoğlu S, Kaya H, Çobaner A, Ayaz C, Yılmaz S, Özbek N. Brusellozda kemik sintigrafisinin önemi. *Klimik Dergisi.* 1998; 3: 92-94.
112. Moellering RC, Eeliopulus GM, Principles of anti-infective therapy. In: Mandel, GL, Douglas RG, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases.* New York: Churchill Livingstone Inc, 2005; 242.
113. Allan JD Jr. Antibiotic combinations. *Med Clin North Am.* 1987; 71(6):1079-91.
114. Prof. Dr. İftihar Köksal, XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi 11 Kasım 2010  
Girne
115. White RL, Burgess DS, Mandduru M. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(8): 1914-8.
116. Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balcı İ. Synergy test by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(1):140-3.
117. Odds FC. Synergy, antagonism, and What the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52(1):1. Epub 2003 Jun 12.
118. Bonaface CR, White RL, Friedrich LV, Bosso JA. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagn Microbial Infect Dis.* 2000; 38(1): 43-50.
119. Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, et al. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between



antifungal agents tested against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49(2): 345–51.

120. Yılmaz G, Güner R, Kaklıkkaya N, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında çeşitli antibiyotiklerin in-vitro sinerji testleri, Poster no; 158, EKMUD Kongresi, 2010.

121. Etest references on file at AB BIODISK, please request via [techsupport@abbioidisk.se](mailto:techsupport@abbioidisk.se)

122. Clinical And Laboratory Standards Institute, ISBN: 978-975-6058-74-9, Jan. 2009.

123. Moreno E, Moriyón I. Genus *Brucella*. In M. Dworkin (ed.), *The prokaryotes: an evolving microbiological resource for the microbiological community*. Springer, New York N.Y. 2001

124. Young EJ. *Brucella* species. In V.L. Yu, T.C. Merigan, Jr. and S.L. Barriere (ed.). *Antimicrobial Therapy and Vaccines*. The Williams & Wilkins Co Baltimore, Md. 1999; 71-89.

125. Cengiz AT. Bruselloz'da korunma ve tedavi. Bruselloz simpozyumu. Prof. Dr. Kemal Özsan Tıp Günleri-1. Ankara, 2000; 57-67.

126. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* 1997; 3: 213-221.

127. Colmenero JD, Reguera JM, Cabrera FB, Cisneros JM, Orjuela DL, Fernandez J. Serology, clinical manifestations and treatment of brucellosis in different age groups, *Infection* 1990; 18: 152-5.

128. Solera J, Rodriguez ZM, Geijo P, et al. Doxycycline-rifampin versus doxycycline streptomycin in treatment of human brucellosis due to *Brucella melitensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2061-7.

129. Solera J, Espinosa A, Geijo P, et al. Treatment of human brucellosis with netilmicin and doxycycline. *Clin Infect Dis.* 1996; 22: 441-5.

130. Solera J, Espinosa A, Martinez-Alfaro E, et al. Treatment of human brucellosis with doxycycline and gentamycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 80-4.

131. Sözen TH. Bruselloz: In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (editörler). *İnfeksiyon Hastalıkları*. 1. Baskı, İstanbul: Alemdar Ofset. 1996; 486-91.

132. Akdeniz H, Irmak H, Anlar O, Demiröz AP. Central nervous system brucellosis: Presentation, diagnosis and treatment. *J Infect.* 1998; 36: 297-301.

133. Pappas G, Seitaridis S, Akritidis N, Tsianos E. Treatment of brucella spondylitis: lessons from an impossible meta-analysis and initial report of efficacy of a fluoroquinolone-containing regimen. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2004; 24: 502-7.

134. Kizilkilic O, Turunc T, Yildirim T, Demiroglu YZ, Hurcan C, Uncu H. Successful medical treatment of intracranial abscess caused by *Brucella* spp. *Journal of Infection* 2005; 51: 77-80.
135. Pechere JC. Quinolones in intracellular infections. *Drugs* 1992; 45(3): 29-36.
136. Quadri SM, Akhtor M, Ueno Y, al-sibai MB. Susceptibility of *brucella mellitensis* to fluoroquinolones. *Drugs Exp Clin Res.* 1989; 15(10): 483-5.
137. Leblebioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. Güncel bilgiler ışığında Antibiyotikler. I.Baskı. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi.2003.
138. Gotuzzo E, Cellillo C. *Brucella*. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds). *Infectious Diseases*. 2nd Edition. W.B. Saunders Co. Philadelphia, 1992; 1513-1521.
139. Hall H.W. Modern Chemotherapy for Brusellosis in Humans. *Rev Infect Dis.* 1990; 12(6): 1060.
140. Özşüt H. Bruselloz tedavisi. *Klinik Derg.* 1990; 3(1): 26-29.
141. Özkuyuncu C. Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1 Klinik Bakteriyoloji El Kitabı, Güneş Tıp Kitapevleri. Ankara. 2009: 33
142. Callfee DP. Rifamycins In: Mandeel GL, Bennet JE, Dobin R.(eds)*Principles and Practice of Infectious*. 6th Edition. 2005.
143. Cambell EA, Korzheva N, Mustaev A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerasa. *Cell.* 2001; 104(6): 901–12.
144. Gilbert DN. Aminoglycosides In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R(ed). *Principles and Practice of Infectious Disease*, New York,6. Ed. Elsevier-Churchill Livingston, 2005; 328.
145. Davis J E.Resistance to amynoglycosides: mechanisms and frequency. *Rev Infect Dis.* 1983; 5(2): 261-267.
146. Fee WE Jr. Aminoglycoside ototoxicity in the human. *Laryngoscope.* 1980; 90(24): 1-19.
147. Hooper DC. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin Infect Dis.* 2000; 31 (2): 24–8
148. Hooper DC. Quinolones. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R(ed) *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6th ed. Philadelphia, Elsevier Chirchill Livingstone. 2005; 451
149. Lang R, Rubinstein E. Quinolones for the treatment of brucellosis. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29: 357-60.

150. Hitchings GH. Mechanism of action of trimethoprim-sulfamethoxazole. *J Infect Dis.* 1973; 128:433-6.
151. Zinner SH, Mayer KH. Sulfonamides and Trimethoprim In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R.(eds). *Principles and Practice of Infectipous Diseases.* 6th Edition. Philadelphia: Elsevier-Chirchill Livingstone, 2005; 440-51.
152. Huovinen P, Sundstrom L, et al. Trimethoprim and sulfonamide resistanse. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39(2): 279–89.
153. Waxman DJ, Strominger JL. Penicilin-binding proteins and the mecanism of action of beta-lactam antibiotics. *Annu Rev Biochem.* 1983; 52: 825-69.
154. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis.* 1998; 26(1): 1–10.
155. Nedim ÇAKIR, Antibiyotiklerin Farmakokinetik veFarmakodinamiği. KLİMİK XIII. TÜRK KLİNİK MİKROBİYOLOJİ VE İNFEKSİYON HASTALIKLARI KONGRESİ. 2007
156. Jaffe WA, Schroeter AL, Reynolds GH, et al. Pharmacokinetic Determinants of Penicillin Cure of Gonococcal Urethritis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1979; 15(4): 587–91.
157. Craig WA, Ebert SC. Continuous infusion of b-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36(12): 2577–83.
158. Nedim ÇAKIR, Antibiyotiklerin Farmakokinetik ve Farmakodinamiği. KLİMİK XIII. TÜRK KLİNİK MİKROBİYOLOJİ VE İNFEKSİYON HASTALIKLARI KONGRESİ. 2007
159. Altay G. Kültür Pozitif 70 Bruselloz Hastasının Klinik ve Laboratuvar Verilerinin Değerlendirilmesi & Antibiyotik Duyarlılıklarının Etest Yöntemi İle İncelenmesi(Uzm Tezi). Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği. İstanbul. 2008; 34.
160. Şengöz G, Yaşar KK, Kutlu SB ve ark. *Brucella* Suşlarının Streptomisin, Rifampin, Siprofloksasin ve Tetrasiklin İçin Etest Duyarlılık sonuçları. *Mikrobiyol Bul.* 2006; 40(3): 265–8.
161. Food and Agriculture Organization-World Health Organization. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis (sixth report). WHO Technical Report Series No. 740. Geneva, World Health Organisation. 1986; 56-57.
162. Pappas G, Christou L, Akritidis N, et al. Brucellosis. *N Engl J Med.* 2005; 352(22): 2325–36.

164. Demirel R, Erdoğan S, Sözen, M A. Determination of high risk regions of human Brucellosis in Turkey using exploratory spatial Analysis. *Turkiye Klinikleri J. Med.* 2009; 29: 25-35.
165. Smits HL, Abdoel TH, Solera J, Clavijo E, Diaz R. Immunochromatographic Brucella-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003; 10(6): 1141–6.
166. Casao MA, Navarro E, Solera J. Evaluation of Brucellacapt for the diagnosis of human brucellosis. Experimental Research Unit, General Hospital of Albacete, c/Hermanos Falcó s/n, 02006 Albacete, Spain.
167. Solera J. Update on brucellosis: therapeutic challenges. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 36 (1): 18–20.
168. Madkour MM. Treatment. In: Madkour MM, (ed): *Madkour's Brucellosis*. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag. 2001; 241-261.
169. Pappas G, Solera J, Akritidis N. New approaches to the antibiotic treatment of brucellosis. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 26(2): 101–5.
170. Ariza J, Bosilkovski M, Cascio A, et al. Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: The Ioannina recommendations. *PLOS medicine.* 2007; 4(12): 1872–8.
171. Solera J, Martínez-Alfaro E, Espinosa E. Recognition and optimum treatment of brucellosis. *Drugs.* 1997; 53(2): 245–56.
172. Akova M. Brusellozis tedavisi. *Ankem Dergisi.* 2001; 15: 575–6.
173. Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balci I. Synergy tests by Etest and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(1): 140–3.
174. Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, et al. Comparison of Etest, checkerboard dilution and timekill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 49: 345–51.
175. Bonapace CR, White RL, Friedrich LV. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagn Microbio. Infect Dis.* 2000; 38(1): 43-50.
176. Dizbay M, Kilic S, Hizel K, Arman D. Tigecycline: its potential for treatment of brucellosis. *Scand J Infect Dis.* 2007; 39 (5); 432–4.

177. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and Etest. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(8): 1914–8.
178. Alışkan H, Turunç T, Demiroğlu YZ ve ark. *Brucella melitensis*'in in vitro Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2008; 42(1): 125–9.
179. Kilic S, Dizbay M, Hizel K ve ark. *In Vitro Synergistic Activity of Antibiotic Combinations Against Brucella melitensis* using Etest Methodology. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2008; 39: 233-237 ISSN 1517-8382
180. Baysan BO, Ongut G, Ogunc D ve ark. Evaluation of in activities of Tigecycline and various Antibiotics against *Brucella* spp. *Pol J Microbiol.* 2010; 59(1): 55–60.
181. Baykam N, Esener H, Ergonul O ve ark. In vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella* species. *Int J Antimicrob Agents.* 2004; 23(4): 405–7.
182. Memish Z, Mah MW, Al Mahmoud S, et al. *Brucella* bacteraemia: Clinical and laboratory observations in 160 Patients. *J. Infect.* 2000; 40(1): 59–63.
183. Montejo JM, Alberola I, Gonzalez Zarate P, et al. Open, randomized therapeutic trial of six antimicrobial regimens in the treatment of human brucellosis. *Clin Infect Dis.* 1993; 16(5): 671–676.
184. Lubani MM, Dudin KI, Sharda DC, et al. A multicenter therapeutic study of 1100 children with brucellosis. *Pediatr Infect Dis J.* 1989; 8(2): 75–8.
185. Eşel D, Sümerkan B, Ayangil D ve ark. *Brucella melitensis* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesinde Agar Dilüsyon Ve Etest Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *ANKEM Derg.* 2004; 18(4): 196–9.
186. Rubinstein ER, Lang R, Shasha B, et al. In vitro susceptibility of *Brucella melitensis* to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35(9): 1925–7.
187. Rolain JM, Maurin M, Raoult D. Bactericidal effect of antibiotics on *Bartonella* and *Brucella spp.*: clinical implications. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 46(5): 811–4.
188. Rubinstein E, Lang R, Sasha B, Hagar B, et al. In vitro susceptibility of *Brucella melitensis* to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35(9): 1925–7.
189. Heo EJ, Kang SI, Kim JW, Her M, et al. In vitro activities of antimicrobials against *Brucella abortus* isolates from cattle in Korea during 1998-2006. *J Microbiol Biotechnol.* 2012; 22(4): 567-70.
190. Soli's Garcí'a del Pozo J, Solera J. Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials in the Treatment of Human Brucellosis. *PloS One.* 2012; 7(2): e32090. doi:10.1371.

191. Turan H, Arslan H, Azap OK, et al. In vitro antibacterial activity of tigecycline in comparison with doxycycline, ciprofloxacin and rifampicin against *Brucella spp.* Int J Antimicrob Agents. 2007; 30 (2): 186–93.
192. Akova M, Uzun Ö, Akalin HE, Hayran M, Ünal S, Gür D. Quinolones in the treatment of human brucellosis. Comparative trial of ofloxacin-rifampin versus doxycycline-rifampin. Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37(9): 1831-4.
193. Doganay M, Aygen B. Use of ciprofloxacin in the treatment of brucellosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1992; 11(1): 74–5.
194. Al-Sibai MB, Halim MA, el-Shaker MM, Khan BA, Qadri SM. Efficacy of ciprofloxacin for treatment of *Brucella melitensis* infections. Antimicrob Agents Chemother. 1992; 36(1): 150–2.
195. Lang R, Banai M, Lishner M, Rubinstein E. Brucellosis. Int J Antimicrob Agents. 1995; 5(4): 203–8.
196. Garcia-Rodriguez JA, Munoz Bellidio JL, Fresnadillo JM, Trujillano I. In vitro activities of new Macrolides and Rifepentine against *Brucella Spp.* Antimicrob Agents Chemother. 1993; 37(4): 911-3.
197. Lopez-Merino A, Contreras-Rodriguez A, Migranas-Ortiz R, et al. Susceptibility of Mexican *Brucella* isolates to moxifloxacin, ciprofloxacin and other antimicrobials used in the treatment of human brucellosis. Scand J Infect Dis. 2004; 36(9): 636–8.
198. Trujillano-Martin I, Garcia Sanchez E, Martinez IM, et al. In vitro activities of six new Fluoroquinolones against *Brucella melitensis*. Antimicrob Agents Chemoter. 1999; 43(1): 194-5.
199. Skalsky K, Yahav D, Bishara J, Pitlik S, Leibovici L, et al. Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. BMJ. 2008; 336(7646): 701–4.
200. Akova MD, Gur D, Livermore DM, Kocagöz T, Akalin HE. In vitro activities of antibiotics alone and in combination against *brucella melitensis* at neutral and acidic pHs. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43(5): 1298-1300.
201. Gur D, Kocagöz S, Akova M, Unal S. Comparison of Etest to microdilution for determining in vitro activities of antibiotics against *Brucella melitensis*. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43(9): 2337-40.
202. Akova MD, Gur D, Livermore DM, Kocagöz T, Akalin HE. In vitro activities of antibiotics alone and in combination against *brucella melitensis* at neutral and acidic pHs. Antimicrob Agents Chemother. 1999; 43(5): 1298-1300.

203. Al Dahouk S, Hagen RM, Nockler K, Tomaso H, et al. Failure of a shortterm antibiotic therapy for human brucellosis using ciprofloxacin. A study on in vitro susceptibility of *Brucella* strains. *Chemotherapy*. 2005; 51(6): 352–6.
204. Akova MD, Gur D, Livermore DM, Kocagöz T, Akalin HE. In vitro activities of antibiotics alone and in combination against *brucella melitensis* at neutral and acidic pHs. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43(5): 1298-1300.
205. Yorgancigil H, Yayli G, Oyar O. Neglected of osteoarticular *Brucella* Infection of the knee. *Croat Med J*. 2003; 44(6): 761–3.
206. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. Human brucellosis. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7(12): 775–86.
207. Pappas G, Siozopoulou V, Akritidis N, Falagas ME. Doxycycline-rifampin: physicians' inferior choice in brucellosis or how convenience reigns over science. *J Infect*. 2007; 54(5): 459–62.
208. Buzgan T, Karahocagil MK, Irmak H, Baran AI, Karsen H, et al. Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature. *Int J infect Dis*. 2010; 14(6): 469–78.
209. Hasanjani Roushan MR, Mohraz M, Janmohammadi N, Hajjahmadi M. Efficacy of cotrimoxazole and rifampin for 6–8 weeks of therapy in childhood brucellosis. *Pediatr Infect Dis J*. 2006; 25(6): 544–5.
210. Hasanjani Roushan MR, Esmailnejad Gangi SM, Asgarzadeh Ahmadi SA. Comparison of the efficacy of two months of treatment with cotrimoxazole plus doxycycline vs co-trimoxazole plus rifampin in brucellosis. *Swiss med Wkly*. 2004; 134(37–38): 564–8.
211. Gur D, Kocagoz S, Akova M, Unal S. Comparison of Etest to microdilution for determining in vitro activities of antibiotics against *Brucella melitensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43(9): 2337.
212. Murray PR, Witebsky FG: The clinician and the microbiology laboratory, “Mandell, Douglas, and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th ed. 2009” kitabında, internet erişimi 8 Mart 2010.
213. Garcia-Rodriguez JA, Munoz Bellido JL, Fresnadillo MJ, Trujillano I. In vitro activities of new macrolides and rifampentine agents *Brucella* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993; 37(4): 911-913.

214. Turkmani A, Ioannidis A, Christidou A, Psaroulaki A, et al. In vitro susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to eleven antibiotics. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006; 5: 24.
215. Aydın N: *Brucella* enfeksiyonları. In, Aydın N, Paracıklıoğlu J (Eds): *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*. pp. 145-163, İlke-Emek Yayınları, Ankara, 2006.
216. Scholz HC, Nöckler K, Göllner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al-Dahouk S, Kämpfer P, Cloeckert A, Maquart M, Zygmunt MS, Whatmore AM, Pfeiffer M, Huber B, Busse HJ, De BK: *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 801-808, 2010.
217. Yüce A, Çavuş SA. Türkiye’de Bruselloz: Genel Bakış. *Klinik Derg.* 2006;19(3):87–97
218. Şimşek H. [Brucellosis]. *Aylık Epidemiyoloji Raporu.* 2004; 3(2):89.
219. Bikas C, Jelastopulu E, Leotsinidis M, Kondakis X. Epidemiology of human brucellosis in a rural area of north-western Peloponnese in Greece. *Eur J Epidemiol.* 2003;18(3): 267–74.)
220. Ceylan E, Irmak H, Buzgan T, Karahocagil MK, Evirgen O, Sakarya N. Van iline bağlı bazı koylerde insan ve hayvan popülasyonunda Bruselloz seroprevalansı. *Van Tıp Derg.* 2003;10(1): 1–5