

KISA BİLDİRİ:
BRUCELLA MELITENSIS'İN İN VİTRO ANTİBİYOTİK
DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI

SHORT COMMUNICATION:
 INVESTIGATION OF IN VITRO ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF
BRUCELLA MELITENSIS

Hikmet ALIŞKAN¹, Tuba TURUNÇ², Yusuf Ziya DEMİROĞLU²
Şule ÇOLAKOĞLU¹, Hande ARSLAN²

ÖZET: Bu çalışmada, brusellozun endemik olduğu bölgemizde, klinik örneklerden izole edilen *Brucella melitensis* suşlarının, klasik tedavi rejimlerinde kullanılan antibiyotiklere ve ayrıca kinolonlara karşı in vitro duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Hastaların kan ve kemik iliği kültürlerinden izole edilen toplam 65 *B. melitensis* suşuna karşı trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMX), rifampin, doksisisiklin, siprofloksasin, ofloksasin, sparfloksasin ve levofloksasinin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK₅₀ ve MİK₉₀) değerleri E-test yöntemi (AB Biodisk, Sweden) ile belirlenmiştir. Çalışmamızda en etkili antimikrobiyal ajanın TMP-SMX (MİK₉₀=0.023 mg/L) olduğu bulunmuş, bunu doksisisiklinin (MİK₉₀=0.032 mg/L) izlediği görülmüştür. Kinolonlar arasında ise en aktif antibiyotiğin sparfloksasin (MİK₉₀=0.064mg/L) olduğu, bunu takiben levofloksasin ve siprofloksasin (MİK₉₀=0.125 mg/L) ile ofloksasinin (MİK₉₀=0.50 mg/L) yer aldığı saptanmıştır. Test edilen antibiyotikler içerisinde rifampin en yüksek MİK₉₀ değeri göstermiş (MİK₉₀=1.5 mg/L), sekiz izolatin rifampine orta duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak TMP-SMX ve doksisisikline karşı çalışmamızda ciddi bir direnç problemi ile karşılaşılma, ancak tüberküloz ve bruselloz tedavisinde kullanılan rifampin için dikkatli olunması gerektiği belirlenmiştir. İleride karşılaşılabilecek direnç problemlerinden kaçınmak için, *Brucella* türlerinin antibiyotik duyarlılıklarının belirli aralıklarla kontrol edilmesinin gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Brucella melitensis, bruselloz tedavisi, antibiyotik duyarlılık.

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate the in vitro susceptibilities of *Brucella melitensis* clinical isolates against antibiotics used in conventional treatment regimens and additionally against quinolones. A total of 65 *B. melitensis* strains isolated from blood and bone marrow specimens of patients who were admitted to an university hospital localized in a region endemic for brucellosis. Minimum inhibitory concentration values (MIC₅₀ and MIC₉₀) of trimethoprim-sulphamethoxazole (TMP-SMX), rifampin, doxycycline, ciprofloxacin, ofloxacin, sparfloxacin and levofloxacin for *B. melitensis*

¹ Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (hikmetuncu@hotmail.com)

² Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

isolates have been detected by using E-test (AB Biodisk, Sweden). In our study the most effective antimicrobial agent was found to be TMP-SMX ($MIC_{90}=0.023$ mg/L) followed by doxycycline ($MIC_{90}=0.032$ mg/L). With regard to fluoroquinolones, the most active antibiotic was sparflaxacin ($MIC_{90}=0.064$ mg/L), followed by levofloxacin and ciprofloxacin ($MIC_{90}=0.125$ mg/L), and ofloxacin ($MIC_{90}=0.50$ mg/L). Rifampin exhibited the highest MIC_{90} value (1.5 mg/L), and eight isolates yielded intermediate resistance to rifampin. There was no serious resistance problem for TMP-SMX and doxycycline in our study, however, enough care should be taken for the use of rifampin which is frequently used for the treatment of tuberculosis and brucellosis which are endemic in our country. As a result, the antimicrobial susceptibilities of *Brucella* species should be determined periodically to avoid the possible development of resistance problems in the future.

Key words: Brucella melitensis, brucellosis therapy, antibiotic susceptibility.

GİRİŞ

Bruselloz, özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaygın olarak görülen bir zoonozdur^{1,2}. Hastalık, Türkiye’de endemik olarak görülmekte olup, Sağlık Bakanlığı verilerine göre 2004 yılında ülkemizde yaklaşık 18.000 bruselloz olgusu bildirmiştir³. Bakteri hücre içinde yerleştiğinden, enfeksiyonun tedavisinde, hücre içine penetre olabilen ve orada aktivite gösterebilen antibiyotiklerin seçilmesi gereklidir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), doksisisiklinin 6 hafta süreyle streptomisin (2-3 hafta) veya rifampin ile (6 hafta) birlikte kullanılmasını önermektedir¹. Bu kombinasyonlar brusellozun endemik olduğu bölgelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Brusellozun endemik olduğu bölgelerde, tüberküloz görülme oranının da yüksek olduğu düşünülürse, rifampin kullanımının toplumda direnç gelişimini artırabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Kombine tedavilerin gerekliliği ve tedavi süresinin uzunluğu, bruselloz tedavisinde yeni ilaç arayışlarını gündeme getirmiştir⁴. Kinolon grubu ilaçlar, brusellozun tedavisinde alternatif olarak kullanılabilen geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Yüksek oral yararlanımlarının olması, dokuda yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmeleri, hızlı bakteri öldürme etkileri ve yan etkilerinin daha az olması nedeniyle hücre içi yerleşimli patojenlerin tedavisinde kullanılabilecek ajanlardır⁵. Çalışmamızda, brusellozun endemik olarak görüldüğü bölgemizde, klinik örneklerden izole edilen *Brucella melitensis* suşlarına karşı, klasik tedavi rejimlerinde yer alan antibiyotikler ile birlikte kinolon grubu antibiyotiklerin in vitro etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, Mayıs 2003-Kasım 2004 döneminde Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde akut bruselloz ön tanısı ile takip edilen hastaların kan ve kemik iliği örneklerinden otomatize sistem ile (BACTEC 9050, Becton Dickinson, Maryland) izole edilen 65 *Brucella* suşu değerlendirildi. Daha önce bruselloz için tedavi almamış hastalardan alınan bir örnek çalışmaya alındı. Tanımlama, konvansiyonel yöntemlerle yapıldı¹. İzolatların doksisisiklin, trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMX), rifampin, siprofloksasin, ofloksasin,

sparfloksasin ve levofloksasine karşı duyarlılıkları E-test (AB Biodisk, Solna, İsveç) yöntemi ile belirlendi⁶. Kontrol olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşları kullanıldı. Minimum inhibitor konsantrasyon (MİK) değerleri, üretici firmanın önerilerine göre okundu ve CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)'ın yavaş üreyen bakteri standartlarına göre değerlendirildi⁷.

BULGULAR

Çalışmaya alınan tüm suşlar *B.melitensis* olarak tanımlanmış ve MİK değerleri en düşük TMP-SMX için, en yüksek rifampin için saptanmıştır (Tablo I). MİK₉₀ değerlerine göre en aktif kinolonun sparfloksasin olduğu, bunu levofloksasin ve siprofloksasinin izlediği görülmüştür (Tablo I). CLSI kriterlerine göre 8 izolat rifampine orta duyarlı olarak bulunurken, bunun dışındaki tüm izolatlar çalışılan tüm antibiyotiklere karşı duyarlı bulunmuştur.

Tablo I. Çalışılan Antibiyotiklerin *B.melitensis* İzolatları (n =65) için MİK (mg/L) Değerleri

Antibiyotikler	MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀
Siprofloksasin	0.047-0.25	0.094	0.125
Ofloksasin	0.094-0.50	0.25	0.50
Sparfloksasin	0.012-0.125	0.032	0.064
Levofloksasin	0.047-0.19	0.064	0.125
Doksisiklin	<0.016-0.064	0.016	0.032
Rifampin	0.50-1.50	0.75	1.50
TMP-SMX	0.002-0.19	0.012	0.023

TARTIŞMA

Kinolonlar, diğer birçok hücre içi yerleşimli mikroorganizma enfeksiyonlarının tedavisinde kullanıldığı gibi bruselloz tedavisinde de kullanılabilen ajanlardır^{4,5}. Yapılan çalışmalarda, sadece siprofloksasin tedavisi ile %33, ofloksasin+rifampin ya da siprofloksasin+rifampin kombinasyon tedavilerinde ise %16 oranında başarısızlık saptanırken, siprofloksasin+doksisiklin kombinasyonunda ve pefloksasinin çeşitli kombinasyonlarında tedavi başarısızlığı belirlenmemiştir^{5,8-15}. Kinolon grubu antibiyotiklerin yan etkilerinin bruselloz tedavisinde kullanılan diğer ilaçlara göre daha az olduğu ve özellikle bu grup içerisinde levofloksasinin en az yan etkiye sahip olduğu ifade edilmektedir^{13,16}. Kinolonların in vitro etkinliği ile ilgili olarak yapılan az sayıdaki çalışmada, MİK₉₀ değeri sparfloksasin için 0.12-1.5 mg/L, levofloksasin için 0.5-2 mg/L olarak bildirilmiştir¹⁷⁻¹⁹. Çalışmamızda test edilen kinolonlar içerisinde in vitro koşullarda en aktif antibiyotik sparfloksasin (MİK₉₀ 0.064mg/L) olarak saptanmış, bunu siprofloksasin ve levofloksasin (MİK₉₀ 0.125 mg/L) izlemiştir. Saptadığımız MİK değerlerinin diğer çalışmalarda bildirilen değerlerden düşük olduğu izlenmektedir. Bu sonuç, bu antibiyotiklerle tedavi denemelerinin yapılabileceğini düşündürmektedir; zira her iki antibiyotik için in vivo koşullarda yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan çalışmalar,

siprofloksasin için MiK_{90} değerlerini 0.19-2 mg/L, ofloksasin için 0.02-2.5 mg/L aralığında vermektedir¹⁷⁻²⁵. Çalışmamızda test edilen kinolonlar içerisinde en yüksek MiK_{90} değeri ofloksasin için (0.50 mg/L) bulunmuştur.

Brucella türlerinin antibiyotik duyarlılık paterni ülkeden ülkeye, hatta bölgeden bölgeye farklılık göstermektedir. TMP-SMX için bildirilen MiK_{90} değerleri 0.38-6.3 mg/L aralığındadır ve bu antibiyotiğin *Brucella* türlerine karşı in vitro koşullarda direnç probleminin olduğu bildirilmektedir^{6,17,19,20,22,24,25}. Çalışmamızda TMP-SMX için saptanan MiK_{90} değeri (0.023 mg/L), ülkemizden Bodur ve arkadaşları²² (0.38 mg/L) ile Baykam ve arkadaşları²² (1.5 mg/L) tarafından bildirilen değerlerden oldukça düşüktür. Bu durum bölgemizde TMP-SMX için direnç probleminin olmadığını düşündürmektedir. Bir diğer olasılık ise, çalışmaya alınan *B.melitensis* suşlarının, daha önce hastalığa yönelik tedavi almayan olgulardan izole edilen suşlar olması olabilir. Rifampin için bildirilen MiK_{90} değerleri ise 0.5-4.0 mg/L arasında değişmektedir^{17,20-23}. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, *Brucella* izolatlarının %2.3'ü²⁶ ve %9.5'i²³ rifampine orta duyarlı olarak bildirilirken, çalışmamızda izolatların %12.3'ü orta duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Bölgemizde *Mycobacterium tuberculosis* için rapor edilen rifampin direnç oranının %7.5²⁷ olması, tüberküloz için endemik olan bölgemizde toplum sağlığı için önemli bu iki hastalıkta kullanılan rifampine karşı direncin ileride ciddi problemler oluşturabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, bruselloz tedavisinde sıklıkla kullanılan antibiyotiklere karşı düzenli olarak in vitro duyarlılık çalışmalarının yapılması, tedavi stratejilerinin belirlenmesinde önem taşımaktadır. Çalışmamızda in vitro koşullarda kinolonlara karşı saptanan düşük MiK değerlerinin, uygun antibiyotik tedavisine rağmen kronikleşme ve relaps oranının yüksek olduğu, ülkemiz gibi endemik bölgelerde bruselloza karşı yeni tedavi rejimlerinin geliştirilmesinde yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Young EJ. *Brucella* species, pp: 2386-93. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 2000, 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
2. Andropoulos P, Tsironi M, Deftereos S, Aessopos A, Assimakopoulos G. Acute brucellosis: presentation, diagnosis, and treatment of 144 cases. Int J Infect Dis 2007; 11: 52-7.
3. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı 2004 Yılı Temel Sağlık Servisi İstatistik Verileri. www.saglik.gov.tr
4. Solera J, Martinez-Alfaro E, Espinosa A. Recognition and optimum treatment of brucellosis. Drugs 1997; 53: 245-56.
5. 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: 150-2.
6. Gur D, Kocagoz S, Akova M, Unal S. Comparison of E test to microdilution for determining in vitro activities of antibiotics against *Brucella melitensis*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2337.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 8th Informational Supplement. 1998. Document M100-S8, Vol.18. CLSI/NCCLS, Wayne, PA.
8. Pappas G, Christou L, Akritidis N, Tsianos EV. Quinolones for brucellosis: treating old diseases with new drugs. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 823-5.

9. Agalar C, Usubutun S, Turkyilmaz R. Ciprofloxacin and rifampicin versus doxycycline and rifampicin in the treatment of brucellosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18:535-8.
10. 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. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 502-7.
11. Kadikoylu G, Tuncer G, Bolaman Z, Sina M. Brucellar orchitis in innerwest Anatolia Region of Turkey. A report of 12 cases. *Urol Int* 2002; 69: 33-5.
12. Saltoglu N, Tasova Y, Inal AS, Seki T, Aksu HS. Efficacy of rifampicin plus doxycycline versus rifampicin plus quinolone in the treatment of brucellosis. *Saudi Med J* 2002; 23: 921-4.
13. Akova M, Uzun O, Akalin HE, Hayran M, Unal S, Gur D. Quinolones in treatment of human brucellosis: comparative trial of ofloxacin-rifampin versus doxycycline-rifampin. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37:1831-4.
14. Bayindir Y, Sonmez E, Aladag A, Buyukberber N. Comparison of five antimicrobial regimens for the treatment of brucellar spondylitis: a prospective, randomized study. *J Chemother* 2003; 15: 466-71.
15. Karabay O, Sencan I, Kayas D, Sahin I. Ofloxacin plus rifampicin versus doxycycline plus rifampicin in the treatment of brucellosis: a randomized clinical trial *BMC Infect Dis* 2004; 23: 18.
16. Carbon C. Comparison of side effects of levofloxacin versus other fluoroquinolones. *Chemotherapy* 2001; 47: 44-8.
17. Rubinstein E, Lang R, Shasha B, et al. In vitro susceptibility of *Brucella melitensis* to antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:1925-7.
18. Kocagoz S, Akova M, Altun B, Gur D, Hascelik G. In vitro activities of new quinolones against *Brucella melitensis* isolated in a tertiary-care hospital in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 240-2.
19. Trujillano-Martin I, Garcia-Sanchez E, Martinez IM, Fresnadillo MJ, Garcia-Sanchez JE, Garcia-Rodriguez JA. In vitro activities of six new fluoroquinolones against *Brucella melitensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:194-5.
20. Khan MY, Dizon M, Kiel FW. Comparative in vitro activities of ofloxacin, difloxacin, ciprofloxacin, and other selected antimicrobial agents against *Brucella melitensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 1409-10.
21. Akova M, Gur D, Livermore DM, Kocagoz T, Akalin HE. In vitro activities of antibiotics alone and in combination against *Brucella melitensis* at neutral and acidic pHs. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1298-300.
22. Bodur H, Balaban N, Aksaray S, et al. Biotypes and antimicrobial susceptibilities of *Brucella* isolates. *Scand J Infect Dis* 2003; 35:337-8.
23. Baykam N, Esener H, Ergonul O, Eren S, Celikbas AK, Dokuzoguz B. In vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella* species. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23: 405-7.
24. Yamazhan T, Aydemir S, Tunger A, Serter D. In vitro activities of various antimicrobials against *Brucella melitensis* strains in the Aegean Region in Turkey. *Med Princ Pract* 2005; 14: 413-6.
25. Alp E, Koc RK, Durak AC, et al. Doxycycline plus streptomycin versus ciprofloxacin plus rifampicin in spinal brucellosis. *BMC Infect Dis* 2006; 11: 72.
26. Sengöz G, Yaşar KK, Kutlu SB, Durdu YB, Ozdemir R, Nazlican O. E-test susceptibility results of *Brucella* strains for streptomycin, rifampicin, ciprofloxacin and tetracycline. *Mikrobiyol Bul* 2006; 40: 265-8.
27. Colakoglu S, Uncu H, Turunc T, Demiroglu YZ, Arslan H. *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının antitüberküloz ilaç direnç oranları: Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi. XXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 12-16 Eylül 2006, Belek, Antalya. Kongre Kitabı, s. 154.