

## BRUCELLA BAKTERİLERİNDE İN-VİTRO ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞI

Bülent SÜMERKAN

Bruselloz primer olarak evcil hayvanların bir hastalığı olmakla beraber Akdeniz havzası ve Güney Amerika başta olmak üzere bir çok ülkede toplum sağlığını olumsuz yönde etkileyen bir hastaluktur. Bazı ülkeler alıcıları ciddi önlemlerle hastalığı neredeyse eradike etmişlerdir. Ancak süt ve süt ürünleri endüstrisi tam oturmamış, hayvan hareketleri kontrol altında tutulamayan bazı ülkelerde hastalık endemik hatta hiperendemiktir (13).

Bir şekilde hayvanlardan insanlara geçen bu infeksiyonun tedavi süresi diğer birçok infeksiyon hastalığının tedavi süresine göre daha uzundur ve kabul görmüş tedavi protokollerine rağmen belli oranlarda relaps görülmektedir (14).

İn-vitro testlerin sonuçlarına bakıldığındır *Brucella* bakterilerinde tedavide kullanılan ilaçların çoğuna direnç görülmemektedir. Hatta relaps sonrası izole edilen bakterilerde bile, tedavide kullanılan ilaçlar tekrar test edildiğinde de yine direnç görülmemektedir (4). Relapsın ya da tedavideki başarısızlığın sorumlusu olarak bakterilerin hücre içi patojen olmaları düşünülmektedir. Bakteriler fagosit edildikleri makrofaj vb. hücrelerde canlılıklarını sürdürmeye, tedavi amacıyla verilen ilaçlar bu bölgeye ulaşamamakta veya ulaşabilseler de bakterileri bazı nedenlerle inhibe edememektedirler. Böylece antibiyotikler uzun süreli verilmemişinde fagosit edildikleri hücrelerde gizlenen bakteriler bir şekilde açığa çıkıp relaps ya da tedaviye yanıtızlığa neden olmaktadır (14).

*Brucella*'ların fakültatif hücre içi paraziti olmaları tedavide hücre içine girebilen antibiyotikleri kullanmayı gerektirir ve bu antibiyotiklere rağmen hastalığın uzun sürmesine ve belli oranlarda da relapslara yol açar. Günümüzde en etkili tedavi protokolleri içerisinde doksisiklinin rifampisin ya da streptomisin ile kombinasyonu yer alır. Bu ilaçların toksik ve yan etkileri özellikle gebelerde ve çocuklarda problem yaratır. Ek olarak uzun süreli oral doksisiklin ve kas içi verilen streptomisin hasta uyumunda sorun yaratmaktadır. Yine de tam anlamıyla relapslar önlenmemektedir. Bu nedenlerle bruselloz tedavisinde yeni antibiyotiklerin ki, bunlar içerisinde bir kısmı hücre içine iyi penetre olabilen ilaçlardır, araştırılması gündeme gelmektedir. Örnek olarak vermek gereklirse yeni fluorokinolonlar ağızdan alındığında iyi biyoyararlanım gösteren, yüksek doku konsantrasyonlarına ulaşan, hücre içine çok iyi ve fazla miktarda penetre olabilen ilaçlardır. Bu tip ilaçlar *Brucella* gibi hücre içi organizmaların neden olduğu infeksiyonların tedavisinde kullanılmak üzere iyi birer adaylardır (11,17).

Günümüzde dünyanın birçok yerinde uygulanmakta olan rutin antibiyotik duyarlılık testleri ile ilgili yöntemler hızlı üreyen, besin gereksinimi karmaşık olmayan bakterilere göre standardize edilmiştir. Bugün dünyada birçok ülkede kabul görmüş olan NCCLS standartları içerisinde *S.pneumoniae*, *H.influenzae* ve *N.gonorrhoeae* gibi güç üreyen bakterilerin duyarlılık testleri standardize edilmiştir. Ancak diğer güç üreyen *Helicobacter*, *Campylobacter* ve *Brucella* gibi bakteriler için henüz tam anlamıyla oturmuş standart yöntemler geliştirilemediğinden klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bu bakterilere rutin duyarlılık testleri önerilmemektedir. Bununla birlikte yeni ilaçların keşfedilmesi ve keşfedilen bu ilaçların yukarıda sayılan nedenlerle bruselloz tedavisine aday ilaçlar olması, mevcut ilaçların durumlarının araştırılacak olması rutin dışında araştırma amaçlı olarak

*Brucella* bakterileri için de duyarlılık testleri yapılmasını gerektirmektedir. Ancak yapılan testlerin sonuçlarının nasıl yorumlanacağı açık değildir. Bu bakteriler için direnç ya da duyarlılık sınır değerleri tam olarak belirlenmemiştir. Hatta streptomisin için sınır değer hiç bir bakteri için NCCLS'te yer almamaktadır. Bilindiği gibi sınır değerlerin farklı infeksiyon bölgelerinde hesaplanması çoğu kez olanaklı olmadığından bu hesaplamalarda formüller genellikle serum için önerilmiştir (15). Öte yandan bruselloz tedavisinde verilen ilaçlar kombine verildiğinden ilaç etkileşimlerini in-vitro incelemek de yararlı olacaktır.

*Brucella* bakterileri polimiksin B, basitrasin, sikloheksimid, nalidiksik asit, nistatin ve vankomisin gibi antibiyotik ve antifungal ajanlara dirençli bakterilerdir. *Brucella* bakterilerini flora içeren kültürlerden izole etmek amacıyla hazırlanan selektif besiyerlerine bu ilaçlar eklenir. Buna karşılık tetrasiklinler, aminoglikozitler, ko-trimoksazol, fluorokinolonlar, azitromisin ve diğer makrolidler ve birçok beta-laktam antibiyotik *Brucella* izolatlarına in-vitro etkili ilaçlardır (13). Ancak bu mikroorganizmaların intrafagositik yaşamları nedeniyle brusellozun tedavisi için in-vitro etki gereklidir ancak yeterli olmayan bir koşuldur.

*Brucella* bakterileri ile ilgili yapılmış duyarlılık çalışmalarına bakıldığından disk difüzyon yöntemiyle yapılmış çalışmalarla kuşku ile yaklaşmak gereklidir. Şu anda rutin duyarlılık testlerinde kullanımda bulunan 30 mg doksisiklin, 30 mg streptomisin, 5 mg rifampisin yüklenmiş diskler ile çalışıldığında 60-70 mm'ye varan zon çapları elde edilmektedir (yayınlanmış bilgi). Bu kadar büyük zon çapları ile disk difüzyon yönteminde direnç ya da duyarlılık sınır değerleri hakkında bir yorumda bulunmak en azından bu disklerle kolay olmasa gereklidir. Bu nedenlerle *Brucella*'lar ile ilgili duyarlılık testlerinde ancak dilişyon (sıvı ya da agar) yöntemleri ile yapılmış olan duyarlılık test sonuçları bize fikir verebilir.

Khan ve arkadaşları (9) ofloksasin, siprofloksasin ve difloksasin gibi kinolonlarla 47 *Brucella melitensis* suçu üzerinde yaptıkları çalışmada kinolonlar içerisinde ofloksasını ( $MIC_{90}=0.02$  mg/mL) diğerlerine göre daha etkili bulmuşlardır. Bu çalışmada ko-trimoksazol, streptomisin, tetrasiklin ve rifampisine direnç bulunmamıştır. Araştırmacılar yöntem olarak sıvı dilişyon yöntemini kullanmışlardır.

Rubinstein ve arkadaşları (12) 86 klinik *B.melitensis* izolatı üzerinde yaptıkları çalışmada minosiklin, streptomisin, ko-trimoksazol, rifampisin ile birlikte siprofloksasin, pefloksasin, ofloksasin, fleroxasin ve sparfloksasını test etmişler, konvansiyonel ilaçlar arasında minosiklini, kinolonlar arasında ise siprofloksasını en etkili ilaç olarak bulmuşlardır. Suşlar arasından rastgele birini seçerek ilaçların öldürme hızlarına bakmışlar ve konvansiyonel ilaçlar arasında en hızlı öldüren ilaç olarak streptomisini (<12 saat) bulmuşlardır. Yine kombinasyonlardaki öldürme hızlarına baktıklarında en hızlı öldüren kombinasyonların streptomisini kombinasyonlar (streptomisin + siprofloksasin, streptomisin + minosiklin, streptomisin + rifampisin) olduğunu göstermişlerdir.

Garcia-Rodriguez ve arkadaşları (7) 62 *Brucella* kökeninde yaptıkları çalışmada konvansiyonel ilaçlar (streptomisin, rifampisin, terasiklin, ko-trimoksazol) ile rifapentini ve eritromisin ile birlikte yeni makrolidleri (roksitromisin, azitromisin, klaritromisin ve diritromisin) agar dilişyon yöntemiyle test etmişlerdir. Makrolidler arasında azitromisin ile klaritromisin etkili bulunurken roksitromisin, diritromisin ve eritromisin etkisiz bulunmuştur. Rifapentin ise rifampisine benzer etki göstermiştir. Bu çalışmada da test edilen konvansiyonel ilaçlara dirençli suş bulunmamıştır.

Sümerkan ve arkadaşları (16) 52 *Brucella melitensis* klinik izolatında agar dilişyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada test ettiğleri kinolonlar arasında sırasıyla siprofloksasin ( $MIC_{90}=0.5$  mg/mL), ofloksasin ( $MIC_{90}=1$  mg/mL), pefloksasin ( $MIC_{90}=4$  mg/mL) ve norfloksasını ( $MIC_{90}=4$  mg/mL) etkili bulmuşlardır. Bu çalışmada BOS'a geçebilen sefa-losporinler de test edilmiş, sırasıyla en etkili olarak seftizoksim, seftriakson ve sefotak-

sim bulunmuş ( $MIC_{90}=0.25$ , 1 ve 2 mg/mL), sefuroksim yeterli etkiyi göstermemiştir ( $MIC_{90}=32$  mg/mL). Bu çalışmada test edilen konvansiyonel ilaçlara (tetrasiklin, doksisiklin, streptomisin, rifampisin, ko-trimoksazol) dirençli suş bulunmamışken, eritromisin ( $MIC_{90}=32$  mg/mL) etkisiz bulunmuştur.

Kinsara ve arkadaşları (10) Suudi Arabistan'da yaptıkları çalışmada *Brucella melitensis* suşlarında (n=37) ko-trimoksazole % 62 oranında direnç bildirmiştir. Ancak çalışma disk difüzyon ile yapıldığı için sonuçlarına belki de kuşku ile bakılabilir.

Relapsların ya da tedavideki başarısızlığın nedeni olarak kullanılan kombinasyonlarla antagonist olabilir mi düşüncesi akla gelebilir. Evrensel ve Sümerkan (5) doksisiklin + siprofloksasin, doksisiklin + rifampisin, doksisiklin + azitromisin, siprofloksasin + rifampisin ve rifampisin + azitromisin kombinasyonlarının etkisini 42 *B.melitensis* suşu üzerinde in-vitro araştırmışlar, yöntem olarak iki boyutlu "checkerboard" agar dilişyon yöntemi kullanmışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre en fazla sinerjizm (% 33) doksisiklin + azitromisin kombinasyonunda görülmüştür. Siprofloksasin + rifampisin ve doksisiklin + siprofloksasin kombinasyonlarında sinerjizm gözlenmemiştir. Bu çalışmada doksisiklin + azitromisin ve siprofloksasin + rifampisin kombinasyonlarında % 24 oranında antagonist bulunmuştur. Yine Akova ve arkadaşları (2) 20 *B.melitensis* suşu ile yaptıkları bir çalışmada rifampisin + azitromisin ve ofloksasin + rifampisin kombinasyonlarında streptomisin + doksisiklin ve rifampisin + doksisiklin kombinasyonlarına göre daha az oranda sinerjizm bulmuşlardır. Oysa Akova ve arkadaşlarının (3) yaptığı bir klinik çalışmada, tedavide kullandıkları siprofloksasin + rifampisin kombinasyonu rifampisin + doksisiklin kombinasyonu ile kıyaslandığında relaps açısından herhangi bir fark bulunmamıştır.

Bu bilgiler ışığında acaba sorun makrofajlar içerisinde fagolizozom pH'sının 5 dolaylarında olmasından mı kaynaklanmaktadır? Diğer bir deyişle ilaçlar hücre içine iyi penetre olsalar bile pH 5'te etkileri mi azalmaktadır? Bu hipotezle birlikte bazı in-vitro çalışmalarla hücre içine iyi geçebilen ilaçlar *Brucella* bakterilerine karşı in-vitro olarak pH 5'te test edilmiştir. Garcia-Rodriguez ve arkadaşları (6) kinolonların etkisini pH 5'te test ettiklerinde pH 7'ye göre daha düşük bulmuşlardır, yani pH 5'te MIK değerleri pH 7'dekine oranla daha yüksek bulunmuştur. Akova ve arkadaşları (1) yaptıkları çalışmada pH 5'te test edilen antibiyotiklerde rifampisin dışındakilerde (azitromisin, eritromisin, streptomisin, doksisiklin, siprofloksasin ve ofloksasin) MIK değerlerinin yükseldiğini göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar kombinasyonlarla yaptıkları çalışmada asidik pH'nın rifampisin + doksisiklin kombinasyonuna olumsuz etkisini bulurken, streptomisin + doksisiklin kombinasyonuna olumsuz yönde etki gösterilememiştir.

Bütün bunlara bakıldığından relaps ya da tedavideki başarısızlık oranları in-vitro sonuçlarla tam olarak paralel gitmemektedir.

*Brucella*'lar ile laboratuvara emniyet kabinleri olmadan çalışmak laboratuvar çalışanları açısından son derece risklidir. Özellikle dilişyon yöntemleri hem zaman alıcı hem de infeksiyon riskini artıran yöntemlerdir. Disk difüzyon yöntemi kolaydır ancak standardize değildir. Acaba E test yöntemi ile duyarlılık testleri yapılabilir mi? Bu konuda Gür ve arkadaşları (8) çalışmalarında mikrodilişyon yöntemi ile E test yöntemini karşılaştırmışlar, E test yöntemini ofloksasin ve siprofloksasin için % 82, rifampisin için % 91, azitromisin için % 95 ve doksisiklin için % 100 oranında mikrodilişyon yöntemiyle uyumlu bulmuşlardır.

Sonuç olarak *Brucella* bakterileri hücre içi patojenler olduğundan doku ya da hücre kültüründe yapılmadığı sürece herhangi bir duyarlılık testinin klinik etkiyi öngörmesi mümkün olamamaktadır. Hatta hayvan deneyleri bile bu konuda yetersiz kalabilmektedir. İn-vitro çalışmalarla bakıldığından konvansiyonel antibiyotiklere de, yeni antibiyotiklerin bir bölümune de direnç yoktur. Ancak sorun hangi antibiyotiğin seçilmesinden çok hangi dozlarda ve ne kadar süreyle verileceğindedir.

## KAYNAKLAR

- 1- Akova M, Gür D, Akalın HE, Kocagöz T, Livermore DM: In vitro activities of antibiotics and combinations against *Brucella melitensis* at different pH levels, *7<sup>th</sup> ECCMID*, Abstract No.523, Vienna (1995).
- 2- Akova M, Gür D, Livermore D M, Kocagöz T, Akalın H E: In vitro activities of antibiotics alone and in combination against *Brucella melitensis* at neutral and acidic pHs, *Antimicrob Agents Chemother* 43:1298 (1999).
- 3- Akova M, Uzun Ö, Akalın HE, Hayran M, Ünal S, Gür D: Quinolones in treatment of human brucellosis: comparative trial of ofloxacin-rifampin versus doxycycline-rifampin, *Antimicrob Agents Chemother* 37:1831 (1993).
- 4- Ariza J, Bosch J, Gudiol F, Linares J, Viladrich PF, Martin R: Relevance of in vitro antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* to relapse rate in human brucellosis, *Antimicrob Agents Chemother* 30:958 (1986)
- 5- Evranel N, Sümerkan B: In vitro activity of antibiotics and combinations against *Brucella melitensis*, *Clin Microbiol Infect* 3:503 (1997).
- 6- Garcia - Rodriguez JA, Garcia Sanchez JE, Trujillano I: Lack of effective bactericidal activity of new quinolones against *Brucella* spp., *Antimicrob Agents Chemother* 35:756 (1991).
- 7- Garcia - Rodriguez JA, Munoz Bellido JL, Fresnadillo MJ, Trujillano I: In vitro activities of new macrolides and rifapentine against *Brucella* spp., *Antimicrob Agents Chemother* 37:911 (1993).
- 8- Gür D, Kocagöz S, Akova M, Ünal S: Comparison of E test to microdilution for determining in vitro activities of antibiotics against *Brucella melitensis*, *Antimicrob Agents Chemother* 43:2337 (1999).
- 9- 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* 33:1409 (1989).
- 10- Kinsara A, Al-Mowallad A, Osoba AO: Increasing resistance of *Brucellae* to co-trimoxazole, *Antimicrob Agents Chemother* 43:1531 (1999).
- 11- Kocagöz S, Altun B, Gür D, Ünal S, Akova M: In vitro activities of new quinolones against *Brucella melitensis* isolated in a tertiary care hospital in Turkey, *40<sup>th</sup> ICAAC*, Abstracts Book, p. 188, Toronto (2000).
- 12- Rubinstein E, Lang R, Shasha B, Hagar B, Diamantstein L, Joseph G, Anderson M, Harrison K: In vitro susceptibility of *Brucella melitensis* to antibiotics, *Antimicrob Agents Chemother* 35:1925 (1991).
- 13- Shapiro DS, Wong JD: Brucella, "Murray PR, Baron EJ, Pfaffer MA, Tenover FC, Yolken RH (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 7.baskı" kitabında s. 625, ASM Press, Washington D.C. (1999).
- 14- Solera J, Martinez-Alfaro E, Espinosa A: Recognition and optimum treatment of brucellosis, *Drugs* 53:245 (1997).
- 15- Sümerkan B: Antibiyotik duyarlılık testleri ve standartizasyon, *Flora* 1:24 (1996).
- 16- Sümerkan B, Doğanay M, Bakışkan V, Fazlı ŞA, Aygen B: Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Brucella melitensis*, *Doğa-Tr J Medical Sciences* 18:17 (1993).
- 17- Trujillano - Martin I, Garcia - Sanchez E, Martinez IM, Fresnadillo MJ, Garcia-Sanchez JE, Garcia - Rodriguez JA: In vitro activities of six fluoroquinolones against *Brucella melitensis*, *Antimicrob Agents Chemother* 43:194 (1999).