

BRUCELLA MELITENSIS SUŞLARININ ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİNDE AGAR DİLÜSYON VE E-TEST YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI*

Duygu EŞEL, Bülent SÜMERKAN, Demet AYANGİL, Murat TELLİ

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KAYSERİ

ÖZET

Klinik örneklerden izole edilen 74 B.melitensis suşunun altı farklı antibiyotiğe duyarlılıkları NCCLS agar dilüsyon referans yöntemi ve E-test yöntemi ile araştırılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Bütün izolatlar seftriakson (MİK ≤ 1 µg/ml), siprofloksasin (MİK ≤ 0.5 µg/ml), doksisisiklin (MİK ≤ 0.125 µg/ml), streptomisin (MİK ≤ 2 µg/ml) ve trimetoprim-sulfametoksazole (TMP-SMZ) (MİK ≤ 0.5/9.5 µg/ml) duyarlı iken suşların 14'ünün (% 19) NCCLS'in Haemophilus türleri için belirlediği sınır değerler dikkate alındığında rifampisine azalmış duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. İki yöntem arasında iki kat dilüsyon içerisindeki uyum (essential agreement) seftriakson için % 99, siprofloksasin için % 95, doksisisiklin için % 98, rifampisin için % 97, streptomisin için % 88 olarak bulunmuştur. En düşük uyum TMP-SMZ'de görülmüştür (% 27).

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

Anahtar sözcükler: antibiyotik duyarlılığı, Brucella melitensis, E-test

SUMMARY

Comparison of Agar Dilution Method and E-test in the Determination of Antibiotic Susceptibility of Brucella melitensis Strains

The patterns of antimicrobial susceptibility of 74 clinical isolates of Brucella melitensis to six antimicrobial agents were determined by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) agar dilution reference method and E-test. The results obtained by the agar dilution method were compared to those generated by the E-test agar gradient diffusion method. All B. melitensis isolates were found to be susceptible to ceftriaxone (MICs ≤ 1 µg/ml), ciprofloxacin (MICs ≤ 0.5 µg/ml), doxycycline (MICs ≤ 0.125 µg/ml), streptomycin (MICs ≤ 2 µg/ml), and trimetoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) (MICs ≤ 0.5/9.5 µg/ml). Of the isolates, 14 (19 %) were intermediately resistant to rifampicin according to the NCCLS breakpoints for Haemophilus spp. The essential agreements between two methods within two-doubling dilution were 99 % for ceftriaxone, 95 % for ciprofloxacin, 98 % for doxycycline, 97 % for rifampicin, and 88 % for streptomycin. The lowest agreement was seen with TMP-SMX (27 %). In conclusion, discrepancies between the two test methods limits the use of E-test as an alternate susceptibility testing method for B.melitensis.

Key words: antibiotic susceptibility, Brucella melitensis, E-test

Yazışma adresi: Duygu Eşel, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KAYSERİ
Tel.: (0352) 437 76 81

e-posta: eseld@erciyes.edu.tr

Alındığı tarih: 09.08.2004, revizyon kabulü: 21.10.2004

* 6.Antimikrobik Kemoterapi Günleri'nde sunulmuştur (8-10 Nisan 2004, İstanbul).

GİRİŞ

Bruselloz, Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkelerinde sık görülen, hem hayvanlarda hem de insanlarda infeksiyon oluşturan bir infeksiyon hastalığıdır. Bruselloz, etkenin ağız yoluyla alınması, deri ve mukozadaki sıyrıklar yoluyla direkt teması ya da inhalasyonla bulaşır⁽¹⁹⁾. Hastalık sırasında sıklıkla karaciğer, hematolojik sistem, kemikler, eklemler, genitoüriner sistem, santral sinir sistemi ve kalp tutulur⁽³⁾. Bruselloz tedavisinde en etkili tedavi rejimi doksisisiklinin streptomisin veya rifampisinle kombinasyonudur⁽²²⁾.

Brucella spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları ile ilgili çalışmalar olmakla birlikte^(5,7,10,18,21), henüz standardize edilmiş bir test yöntemi ya da sonuçların yorumlanmasına yönelik bir kılavuz yoktur.

Bu çalışmada, bruselloz tedavisinde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin *B.melitensis* izolatları için MİK'lerinin agar dilüsyon yöntemi ile belirlenmesi ve E-test yönteminin *B.melitensis* suşlarının duyarlılıklarının belirlenmesinde alternatif bir test yöntemi olarak kullanılıp kullanılmayacağına değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteriler

Eylül 2001-Kasım 2002 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Hastanesi Bakterioloji Laboratuvarı'nda izole edilen 74 *B.melitensis* suşu çalışmaya alınmıştır. Suşların 66'sı kan, 2'si beyin omurilik sıvısı, 2'si periton sıvısı, 2'si eklem sıvısı, 1'i lenf nodu ve 1'i de kemik iliği kültürlerinden izole edilmiştir. Suşlar standart mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlanmış⁽¹⁹⁾ ve çalışma zamanına dek -70°C'de % 20 gliserol içeren triptik soy broth içerisinde saklanmıştır.

Agar dilüsyon yöntemi

Çalışmada kullanılan trimetoprim, sülfametoksazol ve streptomisin IE Ulagay; seftriakson Roche; rifampisin Lepetit-

Sifar; siprofloksasin ve doksisisiklin ise Fako ilaç firmalarından potensi belli aktif maddeler olarak temin edilmiş ve NCCLS⁽¹⁵⁾ tarafından önerilen çözücü ve sulandırıcılar kullanılmıştır. MİK'ların belirlenmesi NCCLS referans agar dilüsyon yöntemine göre⁽¹⁵⁾ ve % 5 koyun kamı içeren Mueller-Hinton agarda (Oxoid, UK) yapılmıştır. Bütün antibiyotiklerin bu besiyeri içerisinde 0.03 µg/ml'den 32 µg/ml'ye kadar olan dilüsyonları elde edilmiştir. TMP-SMZ hazırlanması sırasında trimetoprimin sulfametoksazole oranı 1/19 olarak ayarlanmıştır.

Hazırlanan bakteri süspansiyonlarından son inokulum 10⁴ CFU/spot olacak şekilde besiyeri yüzeyine inokulasyon yapılmış ve besiyerleri 35°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Antibiyotik içermeyen besiyerleri üreme kontrolü olarak kullanılmıştır. Bakteriyel üremenin gözlenmediği en düşük dilüsyon MİK olarak belirlenmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 kalite kontrol suşları olarak kullanılmıştır.

E-test yöntemi

E-test yöntemi üretici firmanın (AB Biodisk, İsviçre) önerileri doğrultusunda ve % 5 koyun kamı içeren Mueller-Hinton agarda yapılmıştır. Besiyerleri 35°C'de 48 saat inkübe edilmiştir.

Sonuçların yorumlanması

Seftriakson, siprofloksasin, TMP-SMZ ve rifampisin etkisinin belirlenmesinde NCCLS'in⁽¹⁶⁾ *Haemophilus* türleri için belirlediği sınır değerler kullanılırken, doksisisiklin için yine NCCLS'in stafilokok sınır değerleri kullanılmıştır. Streptomisin ise Fransız Mikrobiyoloji Cemiyeti Antibiyogram Komitesi'nin⁽¹³⁾ sınır değerlerine göre değerlendirilmiştir. Değerlendirmede kullanılan sınır değerler tablo 1'de gösterilmiştir.

İstatistik

Agar dilüsyon ve E-test yöntemleri ile elde edilen MİK'ler arasındaki farklılıklar Wilcoxon signed-rank test kullanılarak değerlendirilmiştir. P değerinin ≤ 0.05 olması farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir.

Tablo 1: *B.melitensis* suşları için agar dilüsyon ile elde edilen MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri ve MİK aralıkları.

Antibiyotik	MİK (µg/ml)			Yorumlama kategorisine giren suşların yüzdesi			Sınır değerler (µg/ml)		
	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK aralığı	S	I	R	S	I	R
Seftriakson	0.25	0.5	0.125-1	100			≤2	-	-
Siprofloksasin	0.25	0.25	0.125-0.5	100			≤1	-	-
Doksisisiklin	0.06	0.125	0.03-0.125	100			≤4	8	≥16
Rifampisin	0.5	2	0.06-2	81	19		≤1	2	≥4
Streptomisin	0.5	1	0.25-2	100			≤8	-	≥16
TMP-SMZ	0.25/4.75	0.5/9.5	≤0.016/0.296-0.5/9.5	100			≤0.5/9.5	1/19-2/38	≥4/76

S: duyarlı, I: orta duyarlı, R: dirençli

BULGULAR

Agar dilüsyon yöntemiyle test edilen antibiyotiklerin 74 *B.melitensis* suşu için agar dilüsyonla elde edilen MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri ve MİK aralıkları tablo 1’de, E-test ile elde edilenler ise tablo 2’de gösterilmiştir. Suşların tamamı rifampisin dışındaki antibiyotiklere duyarlı bulunmuştur. Kullanılan sınır değerlere göre suşların 14’ü (% 19) rifampisine orta düzeyde dirençli bulunmuştur.

Tablo 3’de E-test MİK sonuçları ile agar dilüsyon MİK sonuçları karşılaştırılmıştır. Genel olarak rifampisin ve seftriakson dışında, E-test yöntemiyle elde edilen MİK’lar agar dilüsyonla elde edilenlerden daha düşük bulunmuştur. En fazla uyumsuzluk TMP-SMZ’de görülmüştür. TMP-SMZ için iki yöntem arasındaki esansiyel uyum 1 log₂ dilüsyonda % 7, 2 log₂ dilüsyonda % 27 olarak bulunmuştur.

MİK sonuçları karşılaştırıldığında sadece rifampisinde iki yöntem arasında uyum gözlenmiştir (Tablo 3). Bununla birlikte, agar dilüsyonla rifampisine orta düzeyde dirençli bulunan suşlardan sadece biri E-test ile orta düzeyde dirençli bulunmuştur.

TARTIŞMA

Bruselloz, Kayseri ve yöresinde hiperendemiktir ve çok değişik klinik şekillerle karşımıza çıkmaktadır⁽³⁾. Bu hastalığın

tedavisinde uzun süre kombine antibiyotik kullanımı gerekmektedir. *Brucella*’lar hücre içi mikroorganizmalar olduğundan kombinasyonda kullanılan antibiyotiklerden en az birinin hücre içine penetrasyonu iyi olan antibiyotiklerden seçilmesi zorunludur⁽²⁰⁾. İnsan brusellozunda ilk tedavi seçeneği doksisisiklin ile streptomisin veya rifampisin kombinasyonudur⁽²²⁾. Bu kombinasyonlar ile en hızlı öldürme (2 saat içinde) gerçekleşirken, diğer kombinasyonlarla bakteri ölümü 96 saate kadar gecikebilmektedir⁽¹⁸⁾.

Özellikle hamilelikte rifampisinle kombine edilebilecek bir diğer ilaç da doku penetrasyonu iyi olan azitromisindir^(7,12). Bu çalışmada suşların % 19’u rifampisine orta düzeyde dirençli bulunmuş olmakla birlikte, doksisisiklin ve azitromisinle görülen sinerjistik aktivite sayesinde in-vivo etkili olabilmektedir⁽⁷⁾.

Florokinolonlar hücre içi penetrasyonu iyi ve *Brucella*’lara etkili antibiyotiklerdir^(8,18). Bununla birlikte doksisisiklin ve siprofloksasin veya rifampisin ve siprofloksasin kombinasyonları ile sinerjistik aktivite görülmemektedir⁽⁷⁾. Diğer çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da kinolonlarla elde edilen MİK’lar çok düşüktür ancak, relaps oranlarının yüksek olması^(4,6) ve asidik pH’da inaktive olma özellikleri⁽¹⁾ nedeniyle monoterapide kullanılmaları sakıncalıdır.

Özellikle nörobruselloz olgularının tedavisinde, beyin-omurilik sıvısına geçişlerinin iyi olması nedeniyle üçüncü kuşak sefalosporinler doksisisiklin ve rifampisinle kombinasyon

Tablo 2: *B. melitensis* suşları için E-test ile elde edilen MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri ve MİK aralıkları.

Antibiyotik	MİK (µg/ml)			Yorumlama kategorisine giren suşların yüzdesi *		
	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK aralığı	S	I	R
Seftriakson	0.25	1	0.06-1	100		
Siprofloksasin	0.125	0.125	0.03-0.25	100		
Doksisisiklin	0.03	0.06	0.016-0.125	100		
Rifampisin	0.5	1	0.03-2	99	1	
Streptomisin	0.5	0.5	0.016-1	100		
TMP-SMZ	0.03/0.593	0.06/1.187	0.002/0.037-0.5/9.5	100		

*Tablo 1’de kullanılan sınır değerlere göre

Tablo 3: Agar dilüsyon ve E-test yöntemleriyle elde edilen MİK sonuçlarının karşılaştırılması.

Antibiyotik	Agar dilüsyon yöntemiyle bulunan MİK’ların E-test ile bulunanlarla kıyaslandığında (±) dilüsyonlara denk gelen suş sayısı										% uyum		p değeri*
	≤-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	≥+4	1 log ₂ dilüsyon	2 log ₂ dilüsyon		
Seftriakson	0	0	2	10	26	21	14	1	0	77	99	0.002	
Siprofloksasin	0	4	23	39	8	0	0	0	0	64	95	<0.001	
Doksisisiklin	0	1	19	23	23	7	1	0	0	72	99	<0.001	
Rifampisin	1	1	3	13	20	28	8	0	0	82	97	0.962	
Streptomisin	5	4	14	18	18	14	1	0	0	68	88	<0.001	
TMP-SMZ	28	24	15	5	0	0	0	1	0	7	27	<0.001	

* Wilcoxon signed rank testine göre

halinde kullanılmakta ve etkili olmaktadır⁽²¹⁾. Bu çalışmada da suşların tamamı seftriaksona duyarlı bulunmuştur.

Bazı çalışmalarda TMP-SMZ'ün tetrasiklin veya streptomisin ile kombinasyonu önerilmektedir⁽¹⁴⁾. Bu çalışmada olduğu gibi birçok diğer çalışmada da TMP-SMZ'e dirençli *B.melitensis* suşu bulunamamıştır^(17,21). Bununla birlikte, Kinsara ve ark.⁽¹¹⁾ Kirby-Bauer disk diffüzyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada klinik *B.melitensis* izolatlarının % 38'inin TMP-SMZ'e dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Ancak ön çalışmalar sırasında edindiğimiz tecrübelerle göre elde edilen zon çaplarının çok büyük olması ve disk diffüzyonla dilüsyon metodu arasında uyum bulunamaması nedeniyle, *Brucella* suşlarında disk diffüzyon yöntemiyle duyarlılık çalışılmasının doğru olmadığı düşünülmüştür.

Brucella'larda in-vitro duyarlılık testlerine yönelik standart bir yöntem olmaması; test sonuçlarının pH, inokulum miktarı ve besiyeri gibi pek çok faktörden etkilenmesi^(9,10) ve relaps ile direnç arasında bir bağlantı bulunmaması⁽²⁾ nedeniyle rutin duyarlılık testi uygulanmamaktadır. Bununla birlikte, bazı antibiyotiklerin *Brucella* suşlarına in-vitro aktivitesini değerlendirmek üzere araştırmalar sürmektedir.

Dilüsyon yöntemlerine göre daha kısa zamanda ve kolay uygulanabilir bir yöntem olan E-test agar gradyent yöntemi, *Brucella*'larda duyarlılık araştırmalarında kullanılmaktadır^(5,10). Gür ve ark⁽¹⁰⁾ E-test sonuçlarının sıvı mikrodilüsyon sonuçları ile % 82-100 uyumlu olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise agar dilüsyon ile E-test sonuçları uyumlu bulunmamıştır. Bu durum kullanılan besiyeri farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

Sonuç olarak, yöremizde izole edilen *B.melitensis* suşları tedavide kullanılan antibiyotiklere in-vitro duyarlıdır. Özellikle TMP-SMZ için iki yöntem arasında 2 log₂ dilüsyonda bile uyum çok düşüktür. E-test yöntemiyle sadece rifampisin için agar dilüsyonla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle E-test yönteminin *B.melitensis* suşlarının duyarlılık durumlarının incelenmesinde kullanımı sınırlıdır.

KAYNAKLAR

1. Akova M, Gur D, Livermore DM, Kocagoz T, Akalin HA: In vitro activities of antibiotics alone and in combination against *Brucella melitensis* at neutral and acidic pHs, *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1298-300.
2. 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;30:958-60.
3. Aygen B, Doganay M, Sumerkan B, Yildiz O, Kayabas U: Clinical manifestations, complications and treatment of brucellosis: a retrospective evaluation of 480 patients, *Med Mal Infect* 2003;32:485-93.
4. Badawi Al-Sibai M, Halim MA, El-Shaker MM, Khan BA, Hussain Qadri SM: Efficacy of ciprofloxacin for treatment of *Brucella melitensis* infections, *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:150-2.
5. Bodur H, Balaban N, Aksaray S et al: Biotypes and antimicrobial susceptibilities of *Brucella* isolates, *Scand J Infect Dis* 2003;35:337-8.
6. Doganay M, Aygen B: Use of ciprofloxacin in the treatment of brucellosis, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;11:74-5.
7. Evrensel N, Sumerkan B: In vitro activity of antibiotics and combinations against *Brucella melitensis*, *Clin Microbiol Infect* 1997;3:503-6.
8. Garcia-Rodriguez JA, Garcia Sanchez JE, Trujilano I, Garcia Sanchez E, Garcia Garcia MI, Fresnadillo MJ: Susceptibilities of *Brucella melitensis* isolates to clinafloxacin and four other new fluoroquinolones, *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1194-5.
9. Garcia-Rodriguez JA, Garcia Sanchez JE, Trujilano I: Lack of effective bacterial activity of new quinolones against *Brucella* spp, *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:756-9.
10. 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.
11. Kinsara A, Al-Mowallad A, Osoba AO: Increasing resistance of *Brucellae* to co-trimoxazole, *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1531.
12. Lang R, Shasha B, Ifrach N, Tinman S, Rubinstein E: Therapeutic effects of roxithromycin and azithromycin in experimental murine brucellosis, *Chemotherapy* 1994;40:252-5.
13. Members of the SFM Antibiogram Committee: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Report 2003, *Int J Antimicrob Agent* 2003;21:364-91.
14. Montejo JM, Alberola I, Glez-Zarate P, Alvarez A, Canovas A, Aguirre C: Open randomized therapeutic trial of six antimicrobial regimens in the treatment of human brucellosis, *Clin Infect Dis* 1993;16:671-6.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically-Fourth edition: Approved Standard M7-A4, NCCLS, Wayne, PA (1997).
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twelfth Informational Supplement M100-S12, NCCLS, Wayne, PA (2002).
17. Qadri SM, Akhtar M, Ueno Y, al-Sibai MB: Susceptibility of *Brucella melitensis* to fluoroquinolones, *Drugs Exp Clin Res* 1989;15:483-5.
18. Rubinstein E, Lang R, Shasha B et al: In vitro susceptibility of *Brucella melitensis* to antibiotics, *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1925-7.
19. Shapiro DS, Wong JD: *Brucella*, "Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds): Manual of Clinical Microbiology, 7. baskı" kitabında s. 625-31, ASM Press, Washington, DC (1999).
20. Solera J, Martinez-Alfaro E, Espinosa A: Recognition and optimum treatment of brucellosis, *Drugs* 1997;53:245-56.
21. Sumerkan B, Doganay M, Bakiskan V, Fazlı SA, Aygen B: Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Brucella melitensis*, *Turkish J Med Sci* 1993;18:17-22.
22. Young EJ: *Brucella* species, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases, 5. baskı" kitabında s. 2386-90, Churchill Livingstone, Philadelphia (2000).