

TAVUKLARDAN İZOLE EDİLEN ÇOKLU DİRENÇLİ SALMONELLA GALLINARUM SUŞLARINDA PLAZMİD ELİMİNASYONU

Ömer M. ESENDAL¹

Mustafa ARDA²

Asiye ŞAHİN DAKMAN³

Ömer AKAY²

Müjgan İZGÜR²

Plasmid Elimination In Multiple Resistant Salmonella gallinarum Strains Isolated From Chickens

Summary: This study was designed to determine plasmid-associated multiple antibiotic resistance in Salmonella gallinarum strains by plasmid elimination. Among 84 S. gallinarum isolates, 34 (40.5%) were found to possess multiple resistance against two or more of the following antibiotics: gentamicin, neomycin, erythromycin, streptomycin, ampicilin, tetracycline, trivetrin, nalidixic acid and carbenicillin. In order to eliminate plasmids from these multiple resistant strains, 16 randomly selected isolates were treated with acridine orange (AO) (100 µg/ml) and incubated at elevated temperature (42.5°C). Antibiotic susceptibilities of the isolates were re-determined with 7-day intervals during the period of 28 days of incubation with AO and 50 days of incubation at elevated temperature. Two of the isolates tested were cured with AO and lost their resistances against erythromycin and nalidixic acid. Meanwhile, eight isolates, including the two that had been cured with AO, were cured by incubation at elevated temperature and lost their resistances against erythromycin, ampicilin, nalidixic acid and carbenicillin. In conclusion, it was found that, heat treatment gave better results than acridine orange treatment in the elimination of plasmids, and among 16 S. gallinarum strains tested, eight isolates (50 %) showed plasmid-associated resistance against antibiotics.

Key words: Salmonella gallinarum, antibiotic resistance, plasmid elimination

Özet: Bu çalışmada, plazmid eliminasyonu ile Salmonella gallinarum suşlarında plazmide bağlı çoklu antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi amaçlandı. İncelenen 84 S. gallinarum izolatından 34'ünün (%40.5) gentamisin, neomisin, eritromisin, streptomisin, ampisilin, tetrasiklin, trivetrin, nalidiksik asit ve karbenisilin gibi antibiyotiklerden iki veya daha fazlasına karşı çoklu dirençli oldukları saptandı. Çoklu dirençli bu S. gallinarum suşlarından rasgele seçilen 16 adedine plazmid eliminasyonu amacıyla acridine orange (AO) ile muamele (100 µg/ml) ve yüksek ısıda (42.5°C) inkübasyon işlemleri ayrı ayrı uygulandı. Yirmisekiz günlük AO ve 50 günlük ısı ile muamele işlemleri sırasında yedi günde bir, suşların antibiyotik duyarlılık profilleri test edildi. Yirmisekiz günlük AO ile muamele işlemi sonucunda suşların ikisinde plazmid eliminasyonu gerçekleştirildi ve bu iki suş eritromisin ve nalidiksik aside karşı dirençliliklerini kaybetti. Yüksek ısıda 50 günlük inkübasyon işleminde, AO ile muamele sonucunda plazmid eliminasyonu yapılan iki

¹ Doç.Dr. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Prof.Dr. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Araş.Gör. Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyon.

suş da dahil olmak üzere, sekiz suşta plazmid eliminasyonu gerçekleştirildi ve bu suşlar eritromisin, ampisilin, nalidiksik asit ve karbenisiline karşı dirençliliklerini kaybetti. Sonuç olarak, yüksek ısıda uzun süreli inkübasyon yönteminin plazmid eliminasyonunda acridine orange yöntemine göre daha iyi netice verdiği ve test edilen çoklu dirençli 16 S. gallinarum suşundan sekiz adedinde (% 50) antibiyotik dirençliliğinin plazmidlere bağlı olduğu ortaya konuldu.

Anahtar Kelimeler: *Salmonella gallinarum, antibiyotik dirençliliği, plazmid eliminasyonu*

Giriş

Klinik materyallerden izole edilen bakterilerin antimikrobiyel maddelere karşı direnç göstermeleri, dirençlilik (R) plazmidlerinin varlığı ve kromozomal direnç mekanizmaları tarafından belirlenmektedir (12, 13, 20, 21). Bakterileri antimikrobiyel maddelere karşı dirençli hale getiren genler, bakterilerin kromozomları üzerinde bulunabilecekleri gibi, plazmid adı verilen küçük DNA segmentleri üzerinde de taşınırlar. Dirençlilik genlerinin plazmidler üzerinde bulunması ve bu plazmidlerin bir bakteriden diğerine aktarılabilme yeteneğinde olmaları, dirençlilik genlerinin bakteri popülasyonları arasında yayılmasında plazmidlerin temel vektörler olduklarını göstermiştir (14). Bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç göstermesinde en yaygın mekanizma, plazmidler tarafından tayin edilen dirençliliktir. Plazmidler tarafından tayin edilen direnç sonucunda, bakteriler antibiyotik yapısını bozan enzim aktivitesini kazanırlar, bakteri yüzeyindeki antibiyotik reseptörleri bozulur ve permeabilitede şekillenen değişikliklere bağlı olarak bakterinin antibiyotik emiliminde azalma meydana gelir. Kromozomal dirençte ise, genellikle, sadece bakteri yüzeyindeki antibiyotik reseptörlerinde bozulmalar şekillenir (10, 20).

Çeşitli bakterilerilerin antibiyotik dirençlilikleri ve R plazmidlerinin varlığı üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda, *Salmonella gallinarum* suşlarındaki ampisilin (20), *Escherichia coli* suşlarındaki tetrasiklin, streptomisin ve kanamisin (3), *Pasteurella haemolytica* suşlarındaki ampisilin (2), *Campylobacter jejuni* ve *C. coli* suşlarındaki tetrasiklin (5), *Staphylococcus aureus* suşlarındaki kloramfenikol (6), *S. hyicus* suşlarındaki makrolid ve linkosamid (18), *Bordetella avium* suşlarındaki streptomisin,

tetrasiklin ve sülfonamid (9) ve *Actinobacillus pleuropneumoniae* suşlarındaki streptomisin ve sülfonamid (19) dirençliliklerinin plazmidler tarafından belirlendikleri ortaya konulmuştur.

Bakterilerde plazmidlerin eliminasyonu amacıyla çeşitli kimyasal maddeler ve fiziksel yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan kimyasal maddeler arasında acridine orange (AO) (8, 11, 16, 20), ethidium bromide (EB) (8, 11, 16, 18, 20), sodyum dodesil sülfat (SDS) (20) ve acriflavine (11) gibi interkrelativ bileşikler, novobiocin, nalidiksik asit (16) ve rifampicin (11) gibi antibiyotikler ve EDTA-tris-antibiyotik karışımları (20) ve EB ve novobiocin kombinasyonları (1, 7, 15) bulunmaktadır. Bakteri hücrelerinde DNA'nın baz çiftleri arasına girerek DNA ve RNA polimeraz aktivitelerini inhibe eden EB ve AO ile birlikte, bakteri yüzeyindeki pilusları lize ederek hücre membranı ile ilişkili olan R ve F plazmidlerinin tahrib olmalarına neden olan SDS (11, 20) ve bakteriyel DNA gyrase ile etkileşerek DNA replikasyonunu inhibe eden novobiocin (16), plazmid eliminasyonu amacıyla en çok kullanılan kimyasal maddelerdir.

Plazmid eliminasyonu amacıyla en çok kullanılan fiziksel faktör ise ısıdır (1, 3, 8, 15, 16, 17, 18).

Bu çalışmada, tavuklardan izole edilen çoklu dirençli *S. gallinarum* suşlarında plazmid eliminasyonu yoluyla plazmidlerin varlığının ortaya konulması ve plazmid eliminasyonunda acridine orange ile muamele ve yüksek ısıda inkübasyon yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metot

S. gallinarum suşları: Çalışmada, tavuklardan izole ve identifiye edilen 84 S. gallinarum suşu arasından, çoklu dirençliliğin saptanması için 34 çoklu dirençli S. gallinarum suşundan rasgele seçilen 16 adedi plazmid eliminasyonu denemelerinde kullanıldı.

Antibiyotik diskleri: Çalışmada, tavuklardan izole ve identifiye edilen S. gallinarum suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının test edilmesinde gentamisin (10µg/ml) (Gm), neomisin (30µg/ml) (Nm), eritromisin (15µg/ml) (Ery), streptomisin (10µg/ml) (Sm), ampisilin (10µg/ml) (Amp), tetrasiklin (13µg/ml) (Tc), trivetrim (25µg/ml) (Tv), nalidiksik asit (30µg/ml) (NA) ve karbenisilin (100µg/ml) (Car) disklerinden (Difco) yararlanıldı.

Antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi: Çalışmada kullanılan 84 S. gallinarum suşunun antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde Kirby-Bauer disk diffüzyon yöntemi kullanıldı (4).

Plazmid eliminasyonu: Çoklu dirençli 16 S. gallinarum suşunda dirençlilik plazmidlerinin eliminasyonu amacıyla, Anjanappa ve ark.'nın (1) bildirdikleri yöntemlere göre, acridine orange ile muamele ve yüksek ısıda uzun süreli inkübasyon işlemleri uygulandı.

Acridine orange ile plazmid eliminasyonu için, çoklu dirençli S. gallinarum suşlarının 6-8 saatlik taze buyyon kültürlerinden, içinde 100 µg/ml acridine orange bulunan nutrient buyyonlara pasajlar yapılarak kültürler 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kültürlerden yine içinde 100 µg/ml acridine orange bulunan nutrient buyyonlara ekim yapılarak kültürler 37°C'de 48 saat süreyle ve daha sonra da iki günde bir pasajları yapılarak 28 gün süreyle inkübe edildi. Her hafta kültürlerden MacConkey agara ekimler yapılarak tek koloni izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen tek kolonilerden taze MacConkey agarlara nokta tarzında ekimler yapılarak petriyeler 37°C'de 4-6 saat inkübe edildi ve bu şekilde ana kültürler

hazırlandı. Haftada bir kez ana kültürlerden hazırlanan taze buyyon kültürleri, bakterinin dirençli bulunduğu antibiyotiklerin uygun konsantrasyonlarını içeren ve içermeyen MacConkey agarlara ekildi ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda MacConkey agarlardaki üreme durumları değerlendirilerek suşların antibiyotik duyarlılıkları ve plazmid eliminasyonu durumları önceden bildirildiği şekilde incelendi (1, 8, 20).

Yüksek ısıda uzun süreli inkübasyon ile plazmid eliminasyonunda, çoklu dirençli S. gallinarum suşları 42.5°C'de 50 gün süreyle üretildi. Bu 50 günlük inkübasyon süresince suşların hergün taze nutrient buyyona pasajları yapıldı. Pasajlar sırasında 7 gün aralıklarla suşların antibiyotik duyarlılıkları ve plazmid eliminasyonu durumları aşağıda açıklandığı şekilde değerlendirildi.

Sonuçların değerlendirilmesi: Acridine Orange ile 28 günlük muamele ve yüksek ısıda (42.5°C) 50 günlük inkübasyon sonucunda, antibiyotik içeren agarda üremeyen fakat antibiyotiksiz MacConkey agarda üreyen kolonilerde plazmid eliminasyonunun gerçekleştirildiği sonucuna varıldı.

Bulgular

Antibiyotik duyarlılık profilleri: Tavuklardan izole ve identifiye edilen 84 S. gallinarum suşundan 34'ü (% 40.5) çoklu dirençli bulundu ve bu 34 suştan rasgele seçilen 16'sı plazmid eliminasyonu amacıyla denemelerde kullanıldı. Denemelerde kullanılan 16 çoklu dirençli S. gallinarum suşunun yapılan antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre 10 farklı duyarlılık profili gösterdikleri saptandı. İncelenen suşlardan 6'sı eritromisin, ampisilin ve karbenisiline; 2'si eritromisin, streptomisin ve nalidiksik aside; 1'er adedi de eritromisin ve ampisiline; ampisilin ve karbenisiline; eritromisin, ampisilin ve nalidiksik aside; eritromisin, ampisilin, trivetrim ve karbenisiline; eritromisin ve trivetrimine;

ampisilin ve nalidiksik aside; tetrasiklin ve nalidiksik aside ve ampisilin ve tetrasikline duyarlı bulundu. Test edilen suşların antibiyotik duyarlılık profilleri Tablo-1'de gösterilmiştir.

Acridine orange muamelesi ile plazmid eliminasyonu: Çoklu dirençli 16 *S. gallinarum* suşunun 28 gün boyunca içinde 100 µg/ml acridine orange bulunan nutrient buyyonda üretilmesi sonucunda suşlardan ikisinde (%12.5) eritromisin ve nalidiksik asit dirençlilik plazmidlerinin eliminasyonu

gerçekleştirildi. Deneme sonucunda 22 nolu suшта eritromisin ve nalidiksik asit dirençliliği yedinci günden itibaren elimine edilmeye başlandı ve 21. günden itibaren test edilen 50 koloniden tümünün eritromisin ve nalidiksik aside duyarlı hale geldiği belirlendi. Benzer şekilde 26 nolu suшта da eritromisin ve nalidiksik asit dirençliliği 14. günden itibaren elimine edilmeye başlandı ve 28. günden itibaren test edilen 50 koloniden tümünün eritromisin ve nalidiksik aside duyarlı hale geldiği belirlendi (Tablo 2).

Tablo-1. Test suşlarının antibiyotik duyarlılık profilleri.
Table-1. Antibiotic susceptibility profiles of test strains.

Suş no	Gm	Nm	Ery	Sm	Amp	Tc	Tv	NA	Car
10,21, 34,45, 48,51	S	S	R	S	R	S	S	S	R
22,26	S	S	R	R	S	S	S	R	S
12	S	S	R	S	R	S	S	S	S
17	S	S	S	S	R	S	S	S	R
24	S	S	R	S	R	S	S	R	S
39	S	S	R	S	R	S	R	S	R
44	S	S	R	S	S	S	R	S	S
77	S	S	S	S	R	S	S	R	S
78	S	S	S	S	S	R	S	R	S
79	S	S	S	S	R	R	S	S	S

Gm: Gentamisin, Nm: Neomisin, Ery: Eritromisin, Sm: Streptomisin, Amp: Ampisilin
Tc: Tetrasiklin, Tv: Trivetrin, NA: Nalidiksik asit, Car: Karbenisilin, S: Duyarlı, R: Dirençli

Tablo-2. Acridine orange muamelesi ile çoklu dirençli *S. gallinarum* suşlarında dirençlilik (R) plazmidlerinin eliminasyonu.

Table-2. Elimination of resistance (R) plasmids from multiple resistant *S. gallinarum* strains by acridine orange treatment.

Suş no. ^a	Günlere göre eliminasyon sıklığı ^b				
	1 ^c	7	14	21	28
22 (Ery)	0/50 ^d	28/50	32/50	50/50	50/50
(NA)	0/50	31/50	41/50	50/50	50/50
26 (Ery)	0/50	0/50	35/50	29/50	50/50
(NA)	0/50	0/50	38/50	50/50	50/50

a: 16 çoklu dirençli *S. gallinarum* suşundan 2'inde plazmid eliminasyonu, b: 100µg/ml acridine orange içeren nutrient buyyonda 28 gün inkübasyon, c: 7 gün aralıklarla yapılan kontroller, d: plazmid eliminasyonu gerçekleştirilen koloni sayısı / incelenen koloni sayısı.

Yüksek ısıda inkübasyon ile plazmid eliminasyonu: Çalışmada kullanılan çoklu dirençli 16 *S. gallinarum* suşunun 42.5°C'de 50 gün boyunca nutrient buyyonda üretilmesi sonucunda suşlardan sekizinde (%50)

ampisilin, eritromisin, nalidiksik asit ve karbenisilin dirençlilik plazmidlerinin eliminasyonu gerçekleştirildi. Deneme sonucunda 12 ve 21 nolu suşlarda ampisilin dirençliliğinin sırasıyla 21. ve 14. günlerden

İtibaren elimine edilmeye başlanıp 35. ve 28. günlerden itibaren test edilen 50 koloniden tümünün ampisiline duyarlı hale geldiği; benzer şekilde, 22 ve 26 nolu suşlarda eritromisin ve nalidiksik asit dirençliliğinin sırasıyla 7. ve 14. günlerden itibaren elimine edilmeye başlandığı, 21. ve 28. günden itibaren suşların eritromisin ve nalidiksik aside; 24 nolu suşta ampisilin ve eritromisin dirençliliğinin 21. günden itibaren elimine edilmeye

başlandığı ve 49. günde suşların ampisilin ve eritromisine; 34 ve 51 nolu suşlarda karbenisilin dirençliliğinin 21. günden itibaren elimine edilmeye başlandığı ve 42. günden itibaren suşun karbenisiline ve 48 nolu suşta da eritromisin dirençliliğinin 21. günden itibaren elimine edilmeye başlandığı ve 28. günden itibaren suşun eritromisine tamamen duyarlı hale geldiği belirlendi (Tablo 3)

Tablo-3. 42.5°C'de inkübe edilen çoklu dirençli *S. gallinarum* suşlarında dirençlilik (R) plazmidlerinin eliminasyonu.

Table-3. Elimination of resistance (R) plasmids from multiple resistant *S. gallinarum* strains by incubation at elevated temperature (42.5°C).

Suş no. ^a	Günlere göre eliminasyon sıklığı ^b								
	1 ^c	7	14	21	28	35	42	49	50
12 (Amp)	0/50 ^d	0/50	0/50	23/50	41/50	50/50	50/50	50/50	50/50
21 (Amp)	0/50	0/50	42/50	48/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50
22 (Ery)	0/50	28/50	32/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50
(NA)	0/50	31/50	41/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50
24 (Amp)	0/50	0/50	0/50	11/50	28/50	33/50	45/50	50/50	50/50
(Ery)	0/50	0/50	0/50	31/50	46/50	50/50	50/50	50/50	50/50
26 (Ery)	0/50	0/50	35/50	29/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50
(NA)	0/50	0/50	38/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50
34 (Car)	0/50	0/50	0/50	22/50	38/50	44/50	50/50	50/50	50/50
48 (Ery)	0/50	0/50	0/50	36/50	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50
51 (Car)	0/50	0/50	0/50	27/50	41/50	46/50	50/50	50/50	50/50

a: 16 çoklu dirençli *S. gallinarum* suşundan 8'inde plazmid eliminasyonu, b: 42.5°C'de 50 gün süreyle inkübasyon c: 7 gün aralıklarla yapılan kontroller, d: plazmid eliminasyonu gerçekleştirilen koloni sayısı / incelenen koloni sayısı.

Tartışma ve Sonuç

Bakterilerde antibiyotik dirençliliğinin genetik belirleyicileri, ekstrasözomal olarak plazmidler üzerinde yer almaktadırlar (12). Antibiyotik dirençliliğini belirleyen bu plazmidler çeşitli kimyasal maddelerle muamele (1, 8, 11, 15, 16, 18, 20) veya yüksek ısılarla inkübasyon ile (1, 3, 8, 15, 16, 17, 18) bakteri hücrelerinden elimine edilebilirler.

Bakterilerde plazmid eliminasyonu amacıyla en çok kullanılan kimyasal maddeler arasında AO, EB, SDS, rifampicin, novobiocin ve EDTA gibi maddeler bulunmaktadır. Johnston ve Richmond (11),

penisilin direnç plazmidini taşıyan *Staphylococcus aureus* 8325 suşunda plazmid eliminasyonuna yönelik yaptıkları bir çalışmada, 10⁵ bakteri/ml yoğunluğundaki bakteri kültürüne 0.01 µg/ml rifampicin katılması ve 35°C'de bir gece inkübe edilmesi ile inceledikleri 1011 koloniden 163'ünde (%16) penisilin direnç plazmidinin elimine edildiğini bildirmişlerdir. Wooley ve ark. (20), dirençlilik plazmidlerinin eliminasyonunda çeşitli kimyasal maddelerin etkilerini inceledikleri bir çalışmada, üriner kanal infeksiyonu bulunan bir attan izole edilen *E. coli* 1898 suşunda, AO ile muameleden sonra tetrasiklin, streptomisin ve kanamisin çoklu dirençliliğinde bir azalma oluştuğunu fakat EB ile muameleden sonra

çoklu antibiyotik dirençliliğinde bir azalma şekillenmediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, tek başına EDTA-tris kombinasyonunun, antibiyotik dirençlilik plazmidini elimine ettiğini ve EDTA-tris'in başka bir kimyasal ajan ile kombinasyonunun ise izolatin çoğalma sıklığını azalttığını ve hücre duvarı permeabilitesinde artış meydana getiren EDTA'nın AO, EB ve SDS gibi kimyasal maddelerin plazmid eliminasyon etkisini güçlendirdiğini bildirmişlerdir. Taylor ve Levine (16), 30°C'de novobiocin ile muamele veya sadece 37°C'de inkübasyon sonucunda E. coli suşlarındaki dirençlilik plazmidlerinin elimine edilebileceklerini bildirmişlerdir. Poppe ve Gyles (15), salmonella'ların virulensinde rol oynayabilecek plazmidlerin elimine edilmesinde çeşitli kimyasal maddeleri kullandıkları bir çalışmada, 17 salmonella suşundan sadece 6'sında plazmid sağaltımının gerçekleştirildiğini, bu altı suştan 2'sinde ethidium bromide, 2'sinde ethidium bromide ve novobiocin karışımı ve 2'sinde de imipramine ve metilen mavisi karışımı ile muamele sonucunda plazmidlerin elimine olduklarını, öte yandan acridine orange, tek başına novobiocin, SDS veya rifampicin ile plazmid eliminasyonunun şekillenmediğini bildirmişlerdir.

Bakterilerdeki plazmidlerin eliminasyonu amacıyla en çok kullanılan fiziksel faktör ise ısıdır.

Salmonella suşlarının üreyebilecekleri maksimum ısı derecesi 45.5°C'dir ve bu ısı derecesinde inkübasyonla, doğal olarak antibiyotik dirençliliğini kodlayan plazmidler elimine edilebilir (1, 15). Bu ısı derecesinde hem küçük (1.5 MDa) hem de büyük (120 MDa) plazmidler ile aynı şekilde, hem kendiliğinden aktarılabilen hem de kendiliğinden aktarılamayan plazmidlerin elimine edilebilecekleri bildirilmiştir (15). Terawaki ve ark. (17), dirençlilik plazmidlerinin eliminasyonunda inkübasyon ısısının etkisini incelemek üzere, klinik materyallerden izole ettikleri Proteus vulgaris, Escherichia coli ve S. typhimurium suşlarının 100'er kolonisi üzerinde yaptıkları bir

çalışmada, 100 P. vulgaris suşundan 1'inde (eliminasyon sıklığı, %1) 37°C'de meydana gelen eliminasyon dışında, test ettikleri suşların hiçbirisinde 25 ve 37°C'lerde beş günlük pasaj sonunda plazmid eliminasyonu şekillenmediğini, 42°C'de yaptıkları inkübasyon sonucunda ise P. vulgaris kolonilerinden 15'inde (eliminasyon sıklığı, %15); E. coli kolonilerinden 24 saat sonunda 7'sinde (eliminasyon sıklığı, %7), 48 saat sonunda 45'inde (eliminasyon sıklığı, %45) ve beş gün sonunda ise tümünde (eliminasyon sıklığı, %100); S. typhimurium kolonilerinden de 24 saat sonunda 6'sında (eliminasyon sıklığı, %6) ve 96 saat sonunda ise 87'sinde (eliminasyon sıklığı, %87) kanamisin dirençlilik plazmidinin elimine edildiğini bildirmişlerdir. Barrow ve ark. (3) da, 42°C'de 18 saatlik inkübasyon sonunda S. gallinarum suşlarında ampisilin direnç plazmidinin elimine edilebildiğini bildirmişlerdir.

Plazmid eliminasyonunda kimyasal ve fiziksel yöntemleri karşılaştıran çeşitli araştırmacılar, kimyasal maddelerin kullanılmasıyla plazmid eliminasyonunun nadiren şekillendiğini, buna karşın, kimyasal maddelerle kıyaslandığında yüksek ısıda inkübasyon yönteminin plazmid eliminasyonunda çok daha geçerli ve kullanışlı olduğunu bildirmişlerdir (1, 15). Anjanappa ve ark. (1), çoklu antibiyotik dirençliliği gösteren iki S. gallinarum saha izolatu ve bunlardan elde ettikleri transkonjugatları ile yaptıkları bir çalışmada, 100 µg/ml EB, 200 µg/ml novobiocin ve 100;200 µg/ml EB + novobiocin karışımının ve 45°C'de uzun süreli inkübasyonun plazmid eliminasyonu üzerindeki etkinliklerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, kimyasal ajanlarla plazmid eliminasyonunun nadiren şekillendiğini; test ettikleri iki saha suşunda ve bunlardan elde ettikleri bir transkonjugatta EB ve novobiocinle muamele sonucunda plazmid eliminasyonu gerçekleştirdiklerini ancak, diğer transkonjugatta EB ve novobiocin'in plazmid eliminasyonunda etkisiz kaldıklarını bildirmişlerdir. Diğer taraftan araştırmacılar, 45°C'lik ısıda inkübasyon ile test ettikleri dört suşda da plazmidlerin elimine edildiklerini, yüksek

ısıda inkübasyonda plazmid eliminasyonunun saha izolatlarında 15. günden itibaren, bunların transkonjugatlarında ise 20. ve 30. günlerden itibaren görülmeye başladığını açıklamışlardır. Benzer bulgular Poppe ve Gyles (15) tarafından da bildirilmiştir. Araştırmacılar, salmonella'larda plazmid eliminasyonu amacıyla çeşitli kimyasal ve fiziksel yöntemleri kullandıkları bir çalışmada, test ettikleri 17 salmonella suşundan 6'sında kimyasal yöntemlerle, 14'ünde ise fiziksel yöntemlerle plazmid eliminasyonunun gerçekleştirildiğini, 17 suştan 2'sinde ethidium bromide, 2'sinde ethidium bromide ve novobiocin karışımı ve 2'sinde de imipramine ve metilen mavisi karışımı ile muamele sonucunda plazmid eliminasyonu şekillendiğini, öte yandan, 45.5°C'de inkübasyon yöntemi ile test edilen 17 suştan 14'ünde plazmidlerin elimine edildiklerini ortaya koymuşlardır. Wegener ve Schwarz (18) ise, yaptıkları plazmid eliminasyon çalışmaları ile, sağlıklı ve eksudatif epidermitisli domuz yavrularından izole edilen çoklu dirençli 59 *S. hyicus* suşundan 55'indeki makrolid ve linkosamid ve 12'sindeki tetrasiklin dirençliliğinin plazmidlere bağlı olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar plazmid eliminasyonu amacıyla, EB ile muamele ve 42°C'de inkübasyon işlemlerini uygulamışlar ve yüksek ısıda inkübasyon işleminin, EB'in plazmid eliminasyon yeteneğini arttırdığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, tavuklardan izole ve tanımlanmış 84 *S. gallinarum* suşundan 34'ü (%40.5) çoklu antibiyotik dirençli bulunmuş ve bu 34 suştan rasgele seçilen 16'sı, plazmid eliminasyonu yolu ile, dirençlilik plazmidlerinin varlığı yönünden test edilmiştir. Test edilen 16 *S. gallinarum* suşunda dirençlilik plazmidlerinin eliminasyonu amacıyla, 100 µg/ml acridine orange içeren nutrient buyyonda 28 gün ve ayrıca normal nutrient buyyonda 42.5°C'de 50 gün süreyle inkübasyon işlemleri ayrı ayrı uygulanmıştır. Acridine orange ile 28 gün muameleden sonra 16 suştan 2'sinde (%12.5) eritromisin ve nalidiksik asit dirençlilik plazmidleri elimine edilmiş ve suşlardan birisi 14. diğeri de 21. günden sonra adı geçen

antibiyotiklere karşı duyarlı hale gelmiştir. Diğer taraftan, 42.5°C'de 50 gün süreyle inkübe edilen 16 suştan ise 8'inde (%50) çoklu antibiyotik dirençlilik plazmidleri elimine edilmiş ve suşlardan ikisi 14. ve 21. günlerden sonra ampisiline, ikisi 7. ve 14. günlerden sonra eritromisin ve nalidiksik aside, birisi 21. günden sonra ampisilin ve eritromisine, ikisi 21. günden sonra karbenisiline ve birisi de 21. günden sonra eritromisine karşı duyarlı hale gelmiştir.

Elde edilen bu bulgular diğer araştırmacıların sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Anjanappa ve ark. (1) ve Poppe ve Gyles'in (15) bildirdikleri gibi bu çalışmada da, plazmid eliminasyonunda kimyasal yöntemler etkisiz kalmış, acridine orange ile muamele sonucunda sadece iki suşta (%12.5) plazmid eliminasyonu gerçekleştirilirken, yüksek ısıda uzun süreli inkübasyon işlemi sonucunda sekiz suşta (%50) çoklu antibiyotik dirençlilik plazmidleri elimine edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada, test edilen *S. gallinarum* suşlarından %50'sinde çoklu antibiyotik dirençliliğinin plazmidler tarafından belirlendiği ve *S. gallinarum* saha suşlarında çoklu antibiyotik dirençlilik plazmidlerinin eliminasyonunda yüksek ısıda (42.5°C) uzun süreli pasaj (50 gün) yönteminin acridine orange ile muameleye oranla daha iyi neticeler verdiği kanısına varıldı.

Kaynaklar

1. **Anjanappa, M., Harbola, P.C., Verma, J.C.** (1993) *Elimination (curing) of R-plasmids in Salmonella gallinarum and their trans conjugants*. Indian Vet J, 70: 10-13.
2. **Azad, A.K., Coote, J.G., Parton, R.** (1992) *Distinct plasmid profiles of Pasteurella haemolytica serotypes and the characterization and amplification in Escherichia coli of ampicillin-resistance plasmids encoding ROB-1 β-lactamase*. J Gen Microbiol, 138: 1185-1196.

3. **Barrow, P.A., Simpson, J.M., Lovell, M.A., Binns, M.M.** (1987) *Contribution of Salmonella gallinarum large plasmid toward virulence in fowl typhoid*. Infect Immun, **55**: 388-392.
4. **Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Truck, M.** (1966) *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. Am J Clin Pathol, **45**: 493-496.
5. **Bradbury, W.C., Munroe, D.L.G.** (1985) *Occurrence of plasmids and antibiotic resistance among Campylobacter jejuni and Campylobacter coli isolated from healthy and diarrheic animals*. J Clin Microbiol, **22**: 339-346.
6. **Cardoso, M., Schwarz, S.** (1992) *Chloramphenicol resistance plasmids in Staphylococcus aureus isolated from bovine subclinical mastitis*. Vet Microbiol, **30**: 223-232.
7. **Chikami, G.K., Fierer, J., Guiney, D.G.** (1985) *Plasmid-mediated virulence in Salmonella dublin demonstrated by use of a Tn5-oriT construct*. Infect Immun, **50**: 420-424.
8. **Colombo, M.M., Leori, G., Rubino, S., Barbato, A., Cappuccinelli, P.** (1992) *Phenotyping features and molecular characterization of plasmids in Salmonella abortusovis*. J Gen Microbiol, **138**: 725-731.
9. **Cutter, D.L., Luginbuhl, G.H.** (1991) *Characterization of sulfonamide resistance determinants and relatedness of Bordetella avium R plasmids*. Plasmid, **26**: 136-140.
10. **Guillot, J.F.** (1990) *Bases moléculaires et épidémiologiques de l'antibiorésistance bactérienne*. Ann Rech Vét, **21**: 1-11.
11. **Johnston, J.H., Richmond, M.H.** (1970) *The increased rate of loss of penicillinase plasmids from Staphylococcus aureus in the presence of rifampicin*. J Gen Microbiol, **60**: 137-139.
12. **Lacey, R.W.** (1975) *Antibiotic resistance plasmids of Staphylococcus aureus and their clinical importance*. Bacteriol Rev, **39**: 1-32.
13. **Ngoma, M., Suzuki, A., Takashima, I., Sato, G.** (1993) *Antibiotic resistance of Escherichia coli and Salmonella from apparently healthy slaughtered cattle and pigs, and diseased animals in Zambia*. Jpn J Vet Res, **41**: 1-10.
14. **O'Brien, T.F., DiGiorgio, J., Parsonnet, K.C., Kass, E.H., Hopkins, J.D.** (1993) *Plasmid diversity in Escherichia coli isolated from processed poultry and poultry processors*. Vet Microbiol, **35**: 243-255.
15. **Poppe, C., Gyles, C.L.** (1988) *Tagging and elimination of plasmids in Salmonella of avian origin*. Vet Microbiol, **18**: 73-87.
16. **Taylor, D.E., Levine, J.G.** (1979) *Characterization of a plasmid mutation affecting maintenance, transfer and elimination by novobiocin*. Molec Gen Genet, **174**: 127-133.
17. **Terawaki, Y., Takayasu, H., Akiba, T.** (1967) *Thermosensitive replication of a kanamycin resistance factor*. J Bacteriol, **94**: 687-690.
18. **Wegener, H.C., Schwarz, S.** (1993) *Antibiotic-resistance and plasmids in Staphylococcus hyicus isolated from pigs with exudative epidermitis and from healthy pigs*. Vet Microbiol, **34**: 363-372.
19. **Willson, P.J., Deneer, H.G., Potter, A., Albritton, W.** (1989) *Characterization of a streptomycin-sulfonamide resistance plasmid from Actinobacillus pleuropneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, **33**: 235-238.
20. **Wooley, R.E., Dickerson, H.W., Simmons, K.W., Shotts, E.B., Brown, J.** (1986) *Effect of EDTA-tris on an Escherichia coli isolate containing R plasmids*. Vet Microbiol, **12**: 65-75.
21. **Wooley, R.E., Spears, K.R., Brown, J., Nolan, L.K., Dekich, M.A.** (1992) *Characteristics of conjugative R-plasmids from pathogenic avian Escherichia coli*. Avian Dis, **36**: 348-352.