

Embriyolu Yumurtalarda Deneysel *Salmonella enteritidis* Infeksiyonlarına Karşı Gentamisin ve Enrofloksasin Kombinasyonunun Terapötik ve Olası Toksik Etkilerinin Araştırılması

Saeid Akbarzadeh KOLAHİ, Oya KELEŞ

İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, 34851, İstanbul-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 02.02.2001

Özet: Deneysel olarak infekte edilen embriyolu yumurtalarda *Salmonella enteritidis*'in kontaminasyon düzeyleri üzerine gentamisin ve enrofloksasin kombinasyonunun etkinliği araştırıldı. Yumurtalara uygulanacak konsantrasyonları saptamak için antibiyotiklerin antibakteriyel aktiviteleri seri dilüsyon şeklinde yapılan broth makrodilüsyon yöntemi ile incelendi. Gentamisin ve enrofloksasinin *in vitro* etkileşim testleri ise iki antibiyotik için *Salmonella enteritidis*'e karşı additif etkiye neden olduğunu gösterdi. Antibiyotik kombinasyonunun *in vivo* etkisini incelemek amacıyla ısı farklılığına bağlı daldırma yöntemi kullanılarak *Salmonella enteritidis* ile infekte edilen yumurtalara gentamisin, enrofloksasin ve kombinasyonun *in vitro* minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) enjekte edildi. Diğer iki grup da pozitif ve negatif kontrol olarak kullanıldı. İnkübasyon süresinin sonunda infekte edilen yumurtalardan sadece antibiyotik verilen gruplarda civciv elde edildi ve civciv çıkma oranı gentamisin, enrofloksasin ve kombinasyon için sırasıyla %35, %52 ve %65 olarak saptandı. Kuluçkadan sonra sistemik otopsileri yapılan civcivlerin içorganlarından *Salmonella enteritidis* izole edildi. Bununla beraber antibiyotik kombinasyonu uygulanan grupta *Salmonella enteritidis*'in izolasyon oranı, antibiyotiklerin tek başına verildiği gruplardan daha düşük bulundu. Diğer yandan kombinasyon grubundaki patolojik bulgular hiçbir işlem uygulanmayan kontrol grubuna benzerlik gösterdi. Bu sonuçlar deneysel olarak infekte edilen yumurtalarda *Salmonella enteritidis* infeksiyonlarının gentamisin ve enrofloksasin kombinasyonu ile kontrol altına alınabildiğini gösterir.

Anahtar Sözcükler: Gentamisin, Enrofloksasin, Kombinasyon, *Salmonella enteritidis*, Yumurta

Investigation of Therapeutic and Possible Toxic Effects of Gentamicin and Enrofloxacin in Combination against Experimental *Salmonella enteritidis* Infection in Embryonated Eggs

Abstract: The efficacy of the combination of gentamicin and enrofloxacin on the reduction of *Salmonella enteritidis* contamination rates in embryonated eggs that were experimentally infected was studied. In order to determine the optimum concentration of the combination for egg injection, the antibacterial activities of these antibiotics were tested *in vitro* against *Salmonella enteritidis* by the serial broth macrodilution method. The *in vitro* interaction test of gentamicin and enrofloxacin has indicated that these two antibacterial agents had an additive effect against *Salmonella enteritidis*. In order to examine the effect of the combination of gentamicin and enrofloxacin *in vivo* the eggs that were infected with *Salmonella enteritidis* by temperature-differential dipping were injected *in vitro* with a minimum inhibitory concentration (MIC) of gentamicin, enrofloxacin, or both drugs. The other two groups were used as positive and negative controls. After the incubation period, hatching was only observed from groups given the antibiotic among the groups infected with *Salmonella enteritidis* and the percentage of hatching was 35%, 52%, and, 65% in groups given gentamicin, enrofloxacin, or both drugs, respectively. *Salmonella enteritidis* was isolated from the visceral organs of these chicks after being necropsied following hatching. However, *Salmonella enteritidis* detection rates in the group treated with the combination was lower than in groups treated with either drug alone. On the other hand, pathologic findings in the combination group were virtually the same in the uninfected and untreated control. These results indicate the value of gentamicin and enrofloxacin in combination for controlling *Salmonella enteritidis* infection in experimentally infected eggs.

Key Words: Gentamicin, Enrofloxacin, Combination, *Salmonella enteritidis*, Egg

Giriş

Salmonellosis, kanatlılarda gelişim bozukluğu ve ölümlerin yanısıra embriyotoksik ve teratojenik etkilere de sahip olan zoonoz nitelikli bir infeksiyondur. İnsanlarda salmonella ile kontamine kanatlı ürünlerinin

tüketilmesi sonucu meydana gelen gıda zehirlenmeleri ve hayvanlardaki infeksiyonların yaygınlığının, etkenlerin yumurtaya geçiş özelliğinden kaynaklandığı saptanmıştır (1,2,3). Yumurtaların genellikle kabuk kontaminasyonu ile infekte olduğu, daha düşük oranda ise ovaryum ve

peritonda lokalizasyon sonucu etkenlerin, vertikal yolla yumurtaya geçtiği belirlenmiş ve özellikle damızlık yumurtalarda inkübasyon süresince %32'ye kadar ulaşan embriyo ölümlerine neden olduğu saptanmıştır (3,4). *Salmonella* enfeksiyonlarını kontrol altına almak amacıyla yumurta kabuğuna klorheksidin, etanol, lugol ve kuaterner amonyum solüsyonu uygulamasının *salmonella* penetrasyonunu önemli düzeyde azalttığı bilinmektedir (5). Buna rağmen mikroorganizmanın kabuk kontaminasyon ile yumurtaya geçişini engellemek amacıyla daha etkin bir çözüm olarak embriyolu yumurtaların antibiyotik çözeltilerine daldırılması ve bu çözeltiler ile spreyleme yapılması gibi standart yöntemler kullanılmaktadır (3,6). Doğal veya deneysel yolla infekte edilen yumurtalarda tilosin, neomisin, spektinomisin gibi birçok antibiyotiğin etkinliği incelenmiş ve en çok tercih edilen bileşiğin gentamisin olduğu belirlenmiştir (7). *Salmonella* etkenleri ile infekte yumurtaların gentamisin içeren solüsyonlara daldırılması sonucu antibiyotiğin yumurta içinde hızlı bir dağılım göstermesi ve etkenlerin en fazla izole edildiği yumurta kısımları olan kabuk ve kabukaltı zarında yumurta içeriğine göre daha yüksek konsantrasyonlarda birikimi gibi faktörler terapötik etkinliğin gerekçesi olarak kabul edilmektedir (4). Yapılan bir araştırmada 25 farklı *Salmonella* serotipi ile deneysel olarak infekte edilen hindi yumurtalarının 1000 ppm gentamisin solüsyonuna daldırılması sonucu enfeksiyon oranının %80'den %2'ye düştüğü belirlenmiştir (7). Antibiyotiklerin enfeksiyonlara karşı sağladıkları bu başarıya rağmen bilinçsizce kullanılmaları, dirençli suşların gelişimine ve besin zinciri aracılığıyla tüketiciye yansması sonucu çeşitli kalıntı sorunlarının ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Ayrıca kullanılan antibiyotiklerin dozuna bağlı olarak embriyotoksikite ile ilgili bulgularda da artış saptanmıştır. Bu doğrultuda yapılan bir araştırmada *Salmonella typhimurium*'un dirençli bir türü ile embriyolu yumurtalarda yapılan deneysel enfeksiyonlarda gentamisinin MİK değerlerinden çok daha yüksek konsantrasyonları yumurtalara enjekte edilmiş ve gentamisinin tüm dozları ile embriyotoksik etki belirlenmiştir (4). Benzer şekilde *Salmonella* türlerine karşı etkinliği bilinen enrofloksasinin 0,25 ve 2,5 mg/kg dozları ile embriyolarda sırasıyla %10 ve %40 oranında ölümlerin gerçekleştiği saptanmıştır (8).

Etkin bir sağaltım sağlamak amacıyla antibiyotiklerin yüksek dozlarda kullanımı sonucu toksik etkilerinin ortaya çıkabileceği gözönüne alındığında gentamisin ve enrofloksasin kombinasyonu ile güvenli bir sağaltım

gerçekleştirmek olasıdır. Bu nedenle gentamisin ve enrofloksasinin *in vivo* koşullarda etkileşim şeklinin ve aynı zamanda *Salmonella* serotipleri arasında en çok yayılım gösteren ve etkili bir tür olduğu bildirilen (9) *Salmonella enteritidis*'e karşı sağaltım etkinliği yönünden aktivitesinin incelenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot

Deneysel grupları

Çalışmada 140 adet spesifik patojen free (SPF) embriyolu tavuk yumurtası kullanıldı ve yumurtalar amaca bağlı olarak 5 gruba ayrıldı. Antibiyotiklerin sağaltım etkinliğini incelemek amacıyla 1. grup dışındaki diğer deney grupları *S. enteritidis* ile deneysel olarak kontamine edildi.

1. grup yumurtalara hiçbir uygulama yapılmaksızın embriyo gelişimi için inkübasyona bırakıldı ve diğer deney gruplarına göre pozitif kontrol olarak kullanıldı. (n=20)

2. grup, sadece *S. enteritidis* ile infekte edilerek deneysel enfeksiyonun yanısıra antibiyotikler ile elde edilen bulguları değerlendirmek için negatif kontrol olarak kullanıldı (n=20)

3. ve 4. gruplardaki embriyolu yumurtalara sırasıyla gentamisin ve enrofloksasin uygulanarak antibiyotiklerin *S. enteritidis*'e karşı terapötik ve toksik etkileri incelendi (n=30)

5. grupta ise her iki antibiyotiğin birlikte kullanımının *in vivo* aktivitesi değerlendirildi (n=40)

Mikroorganizma ve besiyerleri : Antibiyotiklerin *in vitro* etkinliğini belirlemek ve deneysel kontaminasyon sağlamak için *S. enteritidis*'in referans suşu (ATCC 4931) kullanıldı.

Antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) saptanmasında 20-25 mg/L Ca⁺⁺ ve 2,5 mg/L Mg⁺⁺ içerecek şekilde hazırlanan ve pH'sı 7,2-7,4'e ayarlanan Müller-Hinton Broth besiyeri ile çalışıldı. Ayrıca zenginleştirme besiyeri olarak Selenit F ve SS Agar ile *Salmonella* türlerinin iyi üreyebildiği MacConkey's Agar kullanıldı.

Sıvı besiyerinde bakteriyel üreme sonucu oluşan bulanıklığın içerdiği bakteri sayısının yaklaşık değeri McFarland yöntemine göre belirlendi (10). Buna göre bakteriyel inokulumun yoğunluğu, antibiyotiklerin MİK değerlerini saptamak amacıyla 5x10⁵, yumurtaların kontaminasyonu için 1x10⁶ CFU/ml olacak şekilde hazırlandı.

Antibiyotiklerin *in vitro* antibakteriyel aktivite testleri: Gentamisin ve enrofloksasinin bireysel MİK değerleri, Broth makrodilüsyon yöntemi ile ve her test 2 kez tekrarlanarak NCCLS'ye göre saptandı (11). Gentamisin 256 - 0,015 µg/ml, enrofloksasin ise 6,4-0,0003 µg/ml konsantrasyon sınırları içinde seri şekilde iki kez dilüe edildi. Bütün tüpler 16 saat 37°C etüvde inkübasyona bırakıldı ve üremenin gözle görülmediği en düşük ilaç konsantrasyonu antibiyotiklerin MİK değeri olarak saptandı.

Gentamisin ve enrofloksasinin birlikte kullanımı sonucu ortaya çıkabilecek etkileşimi incelemek için kombinasyonunun MİK değerleri Broth makrodilüsyon tekniği kullanılarak checkerboard titrasyonu ile belirlendi. Ayrıca kantitatif bulguların matematiksel ifade ile değerlendirilmesi için Fraksiyonel İnhibisyon Konsantrasyon indeksi kullanıldı (12).

Antibiyotiklerin *in vivo* antibakteriyel aktivitesi: Gentamisin ve enrofloksasinin *S. enteritidis* ile infekte embriyolu yumurtalardaki aktivitesini incelemek için deneysel kontaminasyon yapıldı. Bu amaçla bakterilerin yumurta kabuğundan geçişi, ısı farklılığını esas alan daldırma yöntemi ile sağlandı (13). Kontrol grubu hariç 120 adet yumurta 3 saat süresince 37°C de etüvde ısıtıldı. Bu işlemi takiben yaklaşık 6°C'ye kadar soğutulmuş 10⁶ CFU/ml içeren *Salmonella enteritidis* suspansiyonu içine 5 dakika süre ile daldırıldı. Kontamine edilen yumurtalar 37°C'de %75 nem içeren etüvde kurutuldu.

Antibiyotiklerin bireysel ve kombine kullanımı sonucu *in vitro* olarak saptanan MİK değerlerinin *in vivo* koşullarda etkinliğini belirlemek için hazırlanan antibiyotik solüsyonları yumurtalara enjekte edildi (14,15). Yumurta içeriğinin yaklaşık 55 ml ve yumurtaya enjekte edilecek solüsyon miktarının 0.2 ml olduğu gözönüne alınarak antibiyotiklerin stok solüsyonları hazırlandı ve yumurtaya uygulama sonucunda her ml hacim yumurta için minimum inhibitör konsantrasyon sağlanmış oldu. Antibiyotik solüsyonlarının yumurtalara uygulama işlemi, yumurta kabuğunun hava boşluğu üzerindeki kısmına karşılık gelecek şekilde açılan ufak bir delikten yapıldı. Antibiyotik solüsyonları, steril çalışma koşullarında hava boşluğuna yakın albümin içine enjektör ile verildi ve delik tekrar steril parafin ile kapatıldı. Kontrol grubu da dahil olmak üzere tüm yumurtalar standart koşullarda inkübasyona bırakıldı.

S. enteritidis'in varlığını saptamak için inkübasyonun 2, 4 ve 7. günlerinde yumurtaların farklı kısımlarından

(kabuk, kabuk altı zarı, albümin ve yumurta sarısı) 22. günde civcivlerin iç organlarından alınan örneklerde izolasyona gidildi ve izolasyon oranları belirlendi (10).

Kuluçka süresinin sonunda (22. günde) tüm deney gruplarındaki civciv ve az gelişmiş embriyolar patolojik yönden incelendi. Bu amaçla 1. gruptan 4 adet canlı civciv, 2. gruptan 4 adet embriyo ile 3, 4 ve 5. gruptan sırasıyla 5, 8 ve 12 canlı civcive servikal dislokasyon yapıldı. Sistemik otopsilerden sonra akciğer, karaciğer, dalak böbrek ve sindirim organlarından doku örnekleri alındı ve %10'luk formol solüsyonunda tesbit edildi. Parafin bloklama işlemini takiben kesitler alınarak hematoksil-eozin ile boyandı ve ışık mikroskobu ile incelendi (16).

Bulgular

Gentamisin ve enrofloksasin kombinasyonlarının *S. enteritidis*'e karşı *in vitro* antibakteriyel aktivitesi ile ilgili bulgular Şekil 1'de gösterilmiştir. Antibiyotiklerin *S. enteritidis*'e karşı bireysel MİK değerlerini saptamak amacıyla yapılan seri dilüsyonlarda bakteriyel üremenin gözle görülebilir düzeyde inhibe olduğu en düşük konsantrasyonlar sırasıyla 1 ve 0,025 mg/ml olarak belirlendi.

Gentamisin ve enrofloksasinin birlikte kullanımı ile bireysel MİK değerlerinde iki kat azalma olduğu; gentamisin MİK'i 0,5 µg/ml'ye enrofloksasinin ise 0,0125 µg/ml'ye düştüğü belirlendi. Bu sonuçlara göre FİK indeksi, antibiyotiklerin bireysel FİK indekslerinin toplamı olarak ifade edilen FİK (G + E) İndeksi = FİK (G) + FİK (E) = G/MİK(G) + E/MİK(E) formül ile 1,0 olarak saptandı ve kombinasyonun *S. enteritidis*'e karşı additif etkiye sahip olduğu belirlendi.

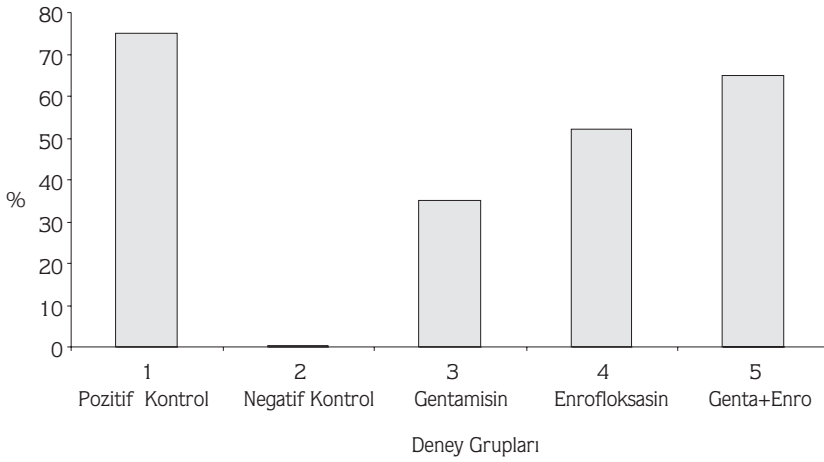
Antibiyotik kombinasyonunun *in vivo* etkinliğini belirlemek için yumurtalar öncelikle deneysel kontaminasyon yönünden incelendi. *S. enteritidis* infeksiyonu, infekte edilen ve antibiyotik uygulaması yapılmayan 2. grupta bakterinin izole edilmesi ile doğrulandı. İnkübasyonun 2. gününde kabuk ve kabukaltı zarından, 4. gününde kabuk altı zarı ve 7. gününde kabukaltı zarı ile albüminden alınan örneklerde *S. enteritidis*'in varlığı saptandı. Yumurta sarısına ait örneklerde ise izolasyon yapılamadı.

Yumurtalardaki embriyonal gelişimi belirlemek amacıyla inkübasyonun 6. gününde yapılan karanlık saha muayenelerinde embriyolu yumurta oranının %60-67,5

Gentamisin µg/ml	0,0003	0,0007	0,0015	0,003	0,006	0,0125	0,025	0,05	0,1
4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5	+	-	-	-	-	*	-	-	-
0,25	+	+	+	+	+	-	-	-	-
0,125	+	+	+	+	+	-	-	-	-
0,06	+	+	+	+	+	-	-	-	-
0,03	+	+	+	+	+	-	-	-	-
0,015	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Şekil 1. Gentamisin ve enrofloksasin kombinasyonunun *S. enteritidis*'e karşı *in vitro* antibakteriyel aktivitesinin checkerboard tekniği ile incelenmesi sonucu elde edilen bakteriyel üreme bulguları.

* Gentamisin ve enrofloksasinin birlikte kullanımı sonucu bakteriyel üremenin gözle görülmediği en düşük konsantrasyon değerleri.



Şekil 2. Deney gruplarında canlı civciv sayılarının embriyolu yumurtalara oranları.

arasında değiştiği saptandı. Kuluçka süresinin sonunda her gruptaki canlı civciv sayısının embriyolu yumurtalara göre oranı bulundu (Şekil2). Deneyin 22. Gününde, kontrol grubundaki 12 adet embriyolu yumurtadan 3 adet az gelişmiş embriyo ve 9 adet canlı civciv elde edildi. Deneysel infeksiyon yapılan 2. gruptaki 13 adet embriyolu yumurtada 4 adet az gelişmiş embriyo bulundu ve geri kalan yumurtalarda kokuşma saptandı. Gentamisin uygulanan ve 20 adet embriyolu yumurta bulunan 3. gruptan 4 adet çok az gelişmiş embriyo, 6 adet az gelişmiş embriyo, 7 adet canlı civciv elde edildi ve geri kalan yumurtalarda kokuşma saptandı. Enrofloksasin uygulanan 4. gruptaki 19 adet embriyolu yumurtadan 3 adet çok az gelişmiş embriyo, 6 adet az gelişmiş embriyonun yanısıra 10 adet canlı civciv elde edildi. Antibiyotik kombinasyonları uygulanan 5. deney grubundaki 26 adet embriyolu yumurtada ise 17 adet canlı civciv, 4 adet çok az gelişmiş ve 6 adet az gelişmiş embriyo bulundu.

Antibiyotik uygulanan deney gruplarından 3'er civcivin kursak içeriği, kloakal swap, mide, barsak, kalp, karaciğer ve akciğerlerine ait örneklerin bakteriyolojik incelemeleri sonucu üreyen koloni sayısına göre izolasyon oranları belirlendi. Kokuşmuş yumurtalardan alınan örneklerin tümünde *S. enteritidis* izole edildi. 3. gruptaki civcivlerin iç organlarından alınan örneklerde en yüksek bakteri sayısı sırasıyla kloakal swap, kursak, mide, barsak ve karaciğerde (yaklaşık 10,000 koloni/ml) saptandı. Akciğer ve kalpte ise daha az sayıda (yaklaşık 4,000 koloni/ml) *S. enteritidis* izole edildi. 4. grupta bir civcive ait örneklerde düşük sayıda (yaklaşık 1,000 koloni/ml) 5. grupta ise bir civcivin sadece barsak ve kursak içeriğinde (<1,000 koloni/ml) *S. enteritidis* izole edilebildi.

Kuluçka süresinin sonunda civcivlerin sistemik otopsilerinin yapılması ile elde edilen patolojik bulgular, gruplara göre incelendiğinde;

1. grup: Mikroskopik incelemeler sonucunda karaciğer, akciğer ve kalpte gözlenen hafif hiperemi dışında başka bir patolojik lezyona rastlanmadı.

2. grup: Bütün civcivlere ait karaciğerlerde çok yoğun kanama, farklı büyüklükte fokal koagülasyon ve liquifikasyon nekroz alanları gözlemlendi. Ayrıca paraneoplazmik hücre stoplazmalarında yaygın vakuolizasyon saptandı. Kalpte ise yoğun kanamalı ve ödemli görüntüler olduğu, kas liflerinin birbirinden ayrıldığı ve yer yer liflerde erimelerin olduğu gözlemlendi. Bağırsakların propria mukozasındaki villiler ile submukoza tabakasında belirgin dökümlerin yanısıra akciğerler başta olmak üzere diğer organlarda belirgin kanama tablosunun geliştiği saptandı.

3. grup: İncelenen 5 adet civcivden bir tanesinin organlarında herhangi bir patolojik lezyona rastlanmamasına rağmen diğer 4 civcivin karaciğerlerinde hiperemi ve bazı paraneoplazmik hücre stoplazmalarında vakuolizasyonların geliştiği belirlendi. Kalp, böbrek, akciğer ve barsaklarda yaygın bir hipereminin varlığı saptandı.

4. grup İncelenen 8 adet civcivin 5 tanesinin karaciğerlerinin bazı paraneoplazmik hücrelerinde vakuolizasyon geliştiği ve damarların eritrositlerle dolu olduğu gözlemlendi. Diğer organlarda ise çok yoğun olmayan hiperemi tablosu dikkati çekti. Üç civcivde ise organlardaki hafif hiperemi dışında patolojik bir lezyon bulunmadı..

5. grup: Bu grupta incelenen 12 adet civcivin 8 tanesinin organlarında herhangi bir lezyona rastlanmamasına rağmen 4 civcivin başta karaciğer olmak üzere kalp, böbrek, dalak ve barsaklarında fazla yoğun olmayan hiperemi saptandı.

3, 4, ve 5. gruplardaki civcivlerde yapılan otopsilerde eklem, kıkırdak ve kemiklerde herhangi bir makroskopik bulguya rastlanmadı.

Tartışma

Son yıllarda *S. enteritidis*'e bağlı infeksiyonlar, hem insan sağlığı açısından hem de kanatlı yetiştiriciliği sektöründe büyük bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Ülkemizde *S. enteritidis* infeksiyonlarının yaygınlığını incelemek amacıyla kanatlı ürünlerinde *Salmonella* etkenlerinin izolasyonu yapılmış ve dört farklı bölgeden elde edilen 6238 tavuğa ait karkas ve organ örneklerinde *S. enteritidis* izolasyon oranının tüm *Salmonella* türlerine göre %58 olduğu saptanmıştır (17). Yumurtalar

yönünden kontaminasyonu incelemek amacıyla kanatlı damızlık sürülerinde *S. enteritidis* ile yapılan çalışmalarda ise etkenlerin fekal yolla yumurta kabuğuna penetre olduğu ve ayrıca ovaryum dokuları aracılığıyla yumurtaya geçtiği belirlenmiştir (4). İnsan ve hayvanlarda *Salmonella* infeksiyonlarının yaygınlığı ve önemi gözönüne alınarak yumurtalarda deneysel *S. enteritidis* infeksiyonlarına karşı etkin tedavi yöntemleri araştırıldı.

Yumurtalara infeksiyon etkenlerinin deneysel yolla geçişi, kontamine edilen steril yumurta kabukları ve tahta parçaları gibi portörler ile yumurtaların teması sonucu gerçekleştirilmektedir. Kontaminasyon amacıyla kullanılan diğer yöntem ise ısı farklılığı sonucu yumurta kabuğu porlarının genişlemesi ve bakterilerin penetrasyonu esasına dayanır. Bu iki yöntemin kontaminasyon sağlama yönünden başarı düzeyleri kıyaslanması sonucunda ısı farklılığına bağlı daldırma işleminde izolasyon oranının daha yüksek olduğu saptanmıştır (13,18). Bu nedenle çalışmamızda *S. enteritidis* ile deneysel infeksiyon oluşturmak için daldırma yöntemi kullanıldı. Yapılan araştırmalarda kontamine yumurtalarda etkenlerin varlığını saptamak için yumurta kabuk ve kabuk altı zarının bakteriyel kültürünün yapılmasının gerekliliği vurgulandığından (13,18) inkübasyonun 2., 4. ve 7. günlerinde yumurtaların bu yapısal kısımlarında, 22. günde ise embriyo ve civcivlere ait örneklerde etkenlerin izolasyon ve identifikasyonu ile deneysel infeksiyon doğrulandı.

Antibiyotiklerin *S. enteritidis*'e karşı *in vitro* etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan incelemelerde gentamisin ve enrofloksasinin MİK değerlerinin düşük olduğu saptandı. Elde edilen bu değerler, aminoglikozit ve florokinolonların *Salmonella* etkenlerine karşı güçlü aktiviteye sahip olduğu yönündeki bulgular (2,6,19) ile paralel doğrultudadır. Enrofloksasin'in çok düşük dozları (0,025 mg/ml) ile *S. enteritidis*'in üremesi inhibe edilmesine rağmen aynı etkinin, gentamisin'in daha yüksek dozları (1 mg/ml) ile ortaya çıktığı ve enrofloksasine duyarlılığın daha fazla olduğu saptandı. Antibiyotiklerin birlikte kullanımı ile elde edilen MİK değerlerinin ise bireysel kullanıma göre 2 kat azaldığı ve bu iki antibiyotiklerin additif etkileşime yol açabileceği belirlendi. Ancak bu yönde yapılan araştırmalarda florokinolonların birçok antibiyotik ile birlikte kullanımının genellikle antagonizmaya (12), aminoglikozitler ile de Enterobacteriaceae'lere karşı additif etkileşime neden olabileceği bildirilmektedir (19). Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, antibiyotikler

arasındaki etkileşimin doza ve bakteri türüne bağlı olarak değişmesi ve belirli bir kombinasyonun her koşulda sadece antagonist veya sinerjik etkiye yol açmasının söz konusu olamayacağı görüşü (20) ile açıklanabilir.

Antibakteriyel etkinliğin nicel yönden değerlendirilmesini sağlayan MİK, aynı zamanda dozun hesaplanmasında da önceliği olan bir kriter (21) olduğu bilindiğinden embriyolu yumurtalarda antibiyotiklerin *in vivo* etkinliğinin belirlenmesi için bireysel ve kombine MİK değerleri kullanıldı.

Antibiyotiklerin birlikte kullanımı sonucu *S. enteritidis* enfeksiyonlarının en karakteristik bulgusu olan embriyo

ölümlerinin önemli düzeyde azalması ve pozitif kontrol grubuna yakın civciv çıkma oranı saptanması kombinasyonun yararlılığının göstergesidir. Bunun yanısıra civcivlerde yapılan patolojik incelemelerde iç organlarda nekrotik ve hemorajik odaklar ile kombinasyonunun, antibiyotiklerin bireysel kullanımına göre daha güçlü antibakteriyel etkinlik sağladığı kanısına varıldı.

Sonuç olarak enrofloksasin ve gentamisin birlikte kullanımı *S. enteritidis*'e bağlı kanatlı enfeksiyonlarında alternatif bir sağaltım seçeneği olabilir.

Kaynaklar

1. Food and Drug Administration: Update: *Salmonella enteritidis* Infections and *Salmonella enteritidis* Grade A Shell Eggs. MMWR, 1988; 37, (32): 495-498.
2. Gast, R.K.: Paratyphoid Infections. In: Calenk, B.W. (Editor), Disease of Poultry 10th ed., Iowa, USA, Iowa State University Press, 97-111, 1997.
3. Williams, E.J.: Avian Salmonellosis. In: Calenk, B.W. (Editor), Disease of Poultry, 3th ed., Iowa, USA, Iowa State University Press, 65-129, 1991.
4. Snoeyenbos, G.H., Carlson, V.L.: Gentamicin efficacy against *Salmonellae* and *Arizonae* in eggs as influenced by administrated route and test organism. Avian Dis. 1973; 17, (4): 673- 682
5. Himathongkham, S., Riemann, H., Ernst, R.: Efficacy of disinfection of shell eggs externally contaminated with *Salmonella enteritidis*. Implications for egg testing. Int. J. Food Microbiol. 1999; 49, (3): 161-167.
6. Huber, W.G.: Aminoglycosides, Macrolides, Lincosamides, Polymyxins, Chloramphenicol and Other Antibacterial Drugs. In: Booth, N. H., McDonald, L.E. (Editor), Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 6th ed., USA, Iowa State University Press, 822-847, 1988.
7. Saif, Y.M., Shelly, S.M.: Effect of Gentamicin sulfate dip on *Salmonella* organism in experimentally infected turkey eggs. Avian Dis. 1973; 17, (3): 574-581.
8. Zengin, H.: Enrofloksasin'in Kaz Yumurtalarında Embriyotoksitesi ile Kaz Palazlarının çeşitli Dokular Üzerinde Etkisi . Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1996, Doktora Tezi.
9. Food and Drug Administration: Update: *Salmonella enteritidis* Infections and Shell Eggs. MMWR 1990; 39, (50): 909-912.
10. Çetin, E.T.: Genel ve pratik mikrobiyoloji. 3. Baskı, İstanbul, Sermet Matbaası, 1973.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards.: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighth informational supplement. NCCLS document M 100-S7, vol. 17 No 1 and No 2, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa, 1998.
12. Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C.: Antimicrobial combinations. In: Lorian, V. (Editor), Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 432-492, 1991.
13. Jodas, S.: Behandlungsverfahren zur Bekämpfung von *Salmonella enteritidis* bei künstlich infizierten Bruteiern (Legehybriden). München, 1992, Doktora tezi.
14. McCapes, R.H., Yamanato, R.: Injecting antibiotics into turkey hatching eggs to eliminate *Mycoplasma meleagris* infection. Avian Dis. 1975; 19, (3): 506-514.
15. McCapes, R.H., Yamanato, R., Ghazikhanian, G., Dungan, R.H., Ortmayer, H.B.: Antibiotic eggs injection to eliminate disease. I. Effect of injection methods on turkey hatchability. Avian Dis. 1976; 21, (1): 57-68.
16. Luna, L.G.: Manual of histologic stain methods of the armed forces institute of pathology. 3th Ed., McGraw-Hill Book Company, New York, USA, 1968.
17. Bekar, M., Ayaz, Y., Akman, A., Yazicioğlu, N., Uysal, Y., Tekin, C., Ergün, A., İdeş, Z., Korkut, N., Miroğlu, M., Arslan, A.: Tavuk mezbahalarının *Salmonella* yönünden taranması. Etiik Vet. Mikrobiyol. Derg. 1993; 7, (4): 1-23.
18. Hafez, H.M., Woernle, H., Mandl, J.: Desinfektionsversuche mit *Salmonella senftenberg* unter Verwendung von Eischalen als Keimtrager. Dtsch. Tierarztl. Wschr. 1991; 98, 132-134.
19. Harold, C., Neu, M.D., Nai-Xun, M.D.: *in vitro* activity of fleroxacin in combination with other antimicrobial agents. Am. J. Med. 1993; 94, 3A9S-3A16S.
20. Kayaalp, O.: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 1.cilt, 7.baskı, Ankara, Feryal Matbaacılık, 1994.
21. Amsterdam, D.: Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In: Lorian, V. (Editor); Antibiotics in Laboratory medicine. Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 53-105, 1991.