



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



KANATLI KÖKENLİ *ESCHERICHIA COLI*'LERİN FİLOGRUPLANDIRILMASI

Mehmed OMEROVİC

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK

ANKARA

2017

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ**

**KANATLI KÖKENLİ *ESCHERICHIA COLI*'LERİN
FİLOGRUPLANDIRILMASI**

Mehmed OMEROVİC

**MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI YÜKSEK
LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. H. Kaan MÜŞTAK**

ANKARA

2017

İÇİNDEKİLER

İçindekiler	ii
Önsöz	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	v
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tarihçe	1
1.2. Etiyoloji	2
1.2.1. Patogenezde Rol Oynayan Virülens Faktörler	5
1.2.2. <i>Escherichia coli</i> 'nin Serolojik Özellikleri	8
1.2.3. <i>Escherichia coli</i> Genotipleri	10
1.3. Epidemiyoloji	11
1.4. Teşhis	12
1.5. Sağlatım ve Koruma	13
2. GEREÇ ve YÖNETEM	14
2.1. Gereç	14
2.1.1. Örnekleri Toplanması	14
2.1.2. Besiyerleri	15
2.1.3. DNA Ekstrasyonunda Kullanılan Maddeler	15
2.1.4. PCR'da Kullanılan Maddeler	15
2.1.5. PCR'da Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	16
2.2. Yöntem	16
2.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon	16
2.2.2. DNA Ekstrasyon	17
2.2.3. <i>Escherichia coli</i> Filogruplarının Moleküler Yöntemlerle Tespit	18
2.2.4. Elektroforez ve Görüntüleme	20
2.2.5. Filogrupların Belirlenmesi	20

3. BULGULAR	21
3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları	21
3.2. PCR Bulguları	21
4. TARTIŞMA	24
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	26
ÖZET	27
SUMMARY	28
KAYNAKLAR	29
ÖZGEÇMİŞ	33



ÖNSÖZ

Enterobacteriaceae familyasının, *Escherichia* cinsinin özelliklerini taşıyan *Escherichia coli* hayvanlarda ve insanlarda ciddi infeksiyonlara neden olmaktadır. Aynı zamanda zoonotik özellikleri nedeniyle de önem taşımaktadır. *E. coli* türlerinin, virulens faktörlerine göre farklı patotipleri mevcuttur. Patojenik ve patojenik olmayan *E. coli*'nin filogruplandırılması için son dönemde birçok çalışma yapılmıştır. İlk kez 2000 yılında Clermont ve ark. tarafından *E. coli*'lerin filogruplandırılması yapılmış ve A, B1, B2, D grupları olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. 2013 yılında güncellenen yöntem ile 8 farklı (A, B1, B2, C, D, E, F, Clade I) *E. coli* filogrubu saptanmıştır.

Filogruplandırma, *E. coli* suşlarının karakteristik özelliklerinin anlaşılması, enfeksiyonların önlenmesi, kontrol edilmesi ve yeni tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada, avian patojenik *Escherichia coli* (APEC) ve avian fekal *Escherichia coli* (AFEC) suşlarının filogruplandırılması ve elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlandı (Clermont ve ark., 2013).

Yüksek lisans öğrenimim süresince büyük desteklerini gördüğüm danışman hocam Doç. Dr. H. Kaan Müştak'a, eğitimim ve tez aşamasında katkılarından dolayı başta Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. K. Serdar Diker olmak üzere, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli tüm öğretim üyelerine ve çalışma arkadaşlarıma, eğitimimin ve tezimin her aşamasında sevgili annem, babam ve kız arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Ayrıca, yüksek lisans öğrenimim süresince lisansüstü programı bursiyeri olduğum Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na bizlere ve bilime verdiği katkılardan dolayı teşekkürlerim sunarım.

SİMGELER ve KISALTMALAR

-	Eksi
%	Yüzde
≥	Büyük eşit
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
AFEC	Avian fecal <i>Escherichia coli</i>
APEC	Avian patojenik <i>Escherichia coli</i>
bp	Base pair
CO ₂	Karbondioksit
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
EMB	Eosin-methylen blue
H ₂	Hidrojen
H ₂ S	Hidrojen sülfür
KDa	Kilodalton
LT	Thermo labil
MC	MacCankey
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
MLST	Multilocus sequence typing
mM	Milimolar

O/F	Oksidasyon/Fermentasyon Testi
°C	Santigrad derece birimi
PCR	Polymerase Chain Reaction
sn	Saniye
ST	Thermo stabil
Stx	Shiga toksin
TSI	Triple Sugar Agar



ŞEKİLLER

Şekil 3.1. Kuadrupleks PCR jel elektroforez görüntüsü	22
Şekil 3.2. Grup C PCR jel elektroforez görüntüsü	23
Şekil 3.3. Grup E PCR jel elektroforez görüntüsü	23



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Kullanılan örneklerle ilgili bilgiler	15
Çizelge 2.2. <i>Escherichia coli</i> 'nin identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal testler	18
Çizelge 2.3. Primelerin baz dizileri, bağlandıkları spesifik gen bölgeleri, PCR ürünlerinin uzunlukları (Clermont ve ark., 2013)	20
Çizelge 3.1. Genlerinin bulunmasına göre <i>E. coli</i> suşların filogruplandırılması	24

1. GİRİŞ

1.1. Tarihçe

Escherichia coli, ilk kez 1884 yılında Theodor Escherich tarafından izole edilmiştir. *E. coli* ilk olarak *Bacterium coli commune* (*B. coli*) adıyla adlandırılmıştır. Bu adlandırma Castellani ve Chalmers tarafından ilk olarak 20. yüzyılın başlarında yapılmıştır. Sonrasında Theodor Escherich anısına adı *E. coli* olarak değiştirilmiştir. Daha sonra bu mikroorganizmanın sıcakkanlı hayvanların bağırsak saprofitik florasının baskın bir fakültatif anaerobik bakterisi olduğu kanıtlanmış ve bağırsak fizyolojisinin korunmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Naglic ve ark., 2005).

Kanatlılarda patojenik *E. coli* suşları organ ve organ sistemlerinde farklı hastalık belirtilerine sebep olabilir: omfalitis (sarı kesesi enfeksiyonu), koligranulama, hava kesesi enfeksiyonu, avian selülit, şişkin baş sendromu, peritonit, salpingitis, ostemyelitis/sinovitis, panoftalmitis. Broylarında *E. coli* suşları abdomen ve diğer organlarda nekrotize dermatitis ile karakterize selülit gibi semptomlar oluşturur. Selülit ile ilişkili lezyonlar kanatlı sektörde karkasın kabul edilmemesi sonucu ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Koliseptisemisi, *E. coli* suşlarının neden olduğu en önemli hastalıktır. Koliseptisemisinin ilk tanımlaması 1907 yılında yapılmıştır. İlk kez 1894 yılında Lignieres tarafından ölü kanatlı hayvanlarda kalp, karaciğer ve dalaktan *E. coli* izole edildiği açıklandı. Enteritis ve paraliz ile kanatlı hayvanlarda karakterize olan hastalıktan 1923 yılında *E. coli* izolasyonu yapılmıştır. 1938 ve 1965 arasında koligranuloma (Hjarre hastalığı) ve *E. coli*'nin neden olduğu diğer hava kesesi yangısı, omfalitis, panoftalmitis, peritonitis ve salpingitis enfeksiyonları da tanımlanmıştır (Rasidbegovic ve Kavazovic, 2008).

Kanatlılarda özellikle Avian Patojenik *Escherichia coli* (APEC) olarak adlandırılan patotip, kolibasilozise neden olmaktadır. Aynı zamanda kanatlı sektöründe APEC suşları ekstraintestinal veya intestinal hastalığına sebep olup, yüksek mortalite ve morbidite ile ciddi ekonomik kayıplara neden olurlar (Rasidbegovic ve Kavazovic, 2008).

Gıda ve sularda varlığının tespit edilmesi fekal kontaminasyonun bir göstergesi olup bu yüzden “koliform bakteriler” olarak tanımlanırlar. Koliform grubu bakteriler tanım olarak Gram negatif, fakültatif anaerob, spor oluşturmeyen, hızlı üreme gösteren ve laktozdan 48 saat içinde gaz oluşturan bakterilerdir. Bu bakteriler Eozin Methylene Blue Agar (EMB)’da koyu yeşil metalik yansıma yapan koloniler oluşturur. *Enterobacteriaceae* içinde bu tanıma giren çok sayıda bakteri vardır. Bunlar, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.* ve *Klebsiella spp.*’dir (Naglic ve ark., 2005).

1.2. Etiyoloji

Escherichia coli, Bacteria aleminin, Proteobacteria bölümü, Gamma protobacteria sınıfı, Enterobacteriales takımı, *Enterobacteriaceae* ailesi ve *Escherichia* cinsi içerisinde yer alan bir bakteridir. *Escherichia* cinsi içerisinde yedi tür vardır. Bunlar: *E. coli*, *E. adecarboxylata*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulnaris*, *E. blattae* ve *E. alberti*. Bu türler arasında yaygın, patojen ve veteriner hekimlik açısından en önemli olanı *E. coli*’dir (Ana ve ark., 2015 ve Naglic ve ark., 2005).

Escherichia coli, Gram negatif, tamamen boya alan, spor oluşturmeyen bakteridir. Genellikle $2-3 \times 0,6$ µm büyüklüğünde bir çomaktır. Sıvı kültürlerde hızlı üreyerek, tek başına ya da çiftler halinde görülür. Birçok suşu hareketlidir ve peritrik flagellaya sahiptir. *E. coli* aerobik ya da anaerobik olarak 18-44°C aralığında

üreyebilmektedir. Genellikle kapsül veya mikrokapsüle sahiptir ve bazı suşlar bol polisakkarit yapıda mukoid madde üretmektedir (Sussman,1997).

Escherichia coli birçok besin ortamında kolay üremektedir. Nutrient agar ve kanlı agarda 37°C’de 24 saat içinde konveks, düzgün kenarlı ve renksiz (S tipli) koloniler görülebilmektedir. Bazı suşları kanlı agarda hemoliz oluşturmaktadır. *E. coli* laktozu ayrıştırdığı için MacConkey (MC) agarda pembe renkli koloniler oluştururken, EMB agarda yeşil metalik parlama veren koloniler meydana getirmektedir. Nutrient buyyonda, 24 saatte 37°C’de bulanıklık yaparak üremektedir (İzgür, 2006 ve Naglic ve ark., 2005).

Escherichia coli çoğalmak için basit şekerleri kullanma yeteneğine sahiptir. *E. coli*’nin farklı biyokimyasal faaliyetleri vardır. Glikoz ve diğer karbonhidratları (maltoz, mannitol, ksiloz, gliserol, ramnoz, sorbitol, vs) piruvat ve gaz üreterek fermente eder. Piruvattan laktik asetat ve formik asit üretir. Formik asidi CO₂ ve H₂’ye dönüştür. İndol, metil-red ve katalaz testlerinde pozitif sonuç verirken, Voges-Proskauer, üreaz ve oksidaz testlerinde negatiflik gösteren, fermentatif bir bakteridir (Doyle, 1989). Bu biyokimyasal faaliyetlerin çoğu *Escherichia* genusu içerisinde bulunan türler için ortaktır (Alexander ve ark., 2000).

Escherichia coli birkaç toksin salgılayabilmektedir. Bunlar: enterotoksinler (LT ve ST), nörotoksinler, endotoksinler ve sitotoksik nekroz faktörü (CNF)’dür. Ancak APEC’ler, diğer patojenik *E. coli*’lerden daha az toksijeniteye sahiptirler. Bazı APEC suşları LT ve ST enterotoksinleri gibi toksin sentezlerlerken bazı APEC suşları da Shiga-toksin (Stx) benzeri verotoksin sentezler (Fantinatti ve ark., 1994).

Genellikle *E. coli* suşlarının patojenik olmadığı düşünülmektedir. Ancak *E. coli*, vücudun çeşitli yerlerinde fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Patojenik *E.*

coli'ler oluşturduğu hastalığın türüne ve sahip olduğu virülens özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır. Ancak patojenik suşlarla, patojenik olmayan suşları ayırmak için kullanılan tek özellik virülens genleri değildir. Bu genlerin fenotipik olarak ifadesinin seviyesi daha önemlidir. *E. coli* suşları bağırsak dışı enfeksiyonlara (ekstraintestinal) ve bağırsak enfeksiyonlarına (intestinal) neden olanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Carlton ve ark., 2010).

Bağırsak enfeksiyonlarına neden olan *E. coli* suşlarının ortak adı, ishal yapan (Diyarejenik) *E. coli* (DEC)'dir ve aşağıdaki izolatların patotiplerini içerir: enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Vero- veya Shiga-toksin üreten *E. coli* (VTEC veya STEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) ve diffuz aderent *E. coli* (DAEC). Ekstraintestinal suşların ortak adı, ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC)'dir. ExPEC'ler, kommensal olarak, sağlıklı hayvanların bağırsak florasında bulunan fakültatif patojen bakterilerdir. Kolonizasyon, invazyon ve mide-bağırsak sisteminin dışındaki bölümlerde hastalığa neden olan virülens faktörlerine sahiptir. ExPEC grubuna dahil olarak, septisemik patojenik *E. coli* (SEPEC), üropatojenik *E. coli* (UPEC) ve avian patojenik *E. coli* (APEC) vardır. Son yıllarda bu gruba iki yeni hayvan patojen grubu daha eklenmiştir; meme bezinin enfeksiyonuna neden olan, meme patojenik *E. coli* (MPEC) ve rahim enfeksiyonlarına neden olanlar, endometriyal patojenik *E. coli* (EnPEC). ETEC suşlarının aksine, ExPEC ve EPEC suşları hayvanların normal bağırsak florasını oluşturan, fırsatçı patojenler olarak kabul edilmektedirler (Carlton ve ark., 2010).

1.2.1. Patogenezde Rol Oynayan Virülens Faktörleri

Adezinler

Bakterinin hücre duvarında bulunan ince, saç benzeri adeziv organellerdir. Bu virülens faktörleri, başka bir hücreye ya da yüze yapışmada veya yapışmanın kolaylaştırılmasında rol oynar. Diğer hücrelere veya yüzeylere bakteriyel hücrelerin yapışma işlemi, adezinler olarak adlandırılır (Cantekin ve İzgür, 2015). Yapışma bakteriyel patogenezde çok önemli bir faktördür. Kanatlılarda üst solunum sistemi UPEC'ler arasında tip 1 fimbria adezinlerini içermektedir (Wooley ve ark., 1998). Tip 1 fimbria üst solunum yolunda ilk kolonizasyonda görev alır. P fimbria diğer organlarda da derin bakteriyel kolonizasyonda mevcut olabilir. Ancak APEC suş patojenitesinde P fimbrianın rolü tam olarak çözülememiştir. *E. coli* hücrelerinin yüzeyinde bulunan kıvrık fimbria ince ve kıvrımsı ve ekstraselüler matriksin proteinlerine bakteriyolojik bağlanmadan sorumlu, ayrıca dış çevre koşullarına da dayanıklılık sağlar. Kıvrık fimbrianın ekspresyonundan ve kodlanmasından sorumlu genler *csdBAC* ve *CSGA EFG* dir. AC / 1 fimbria ve tip 1 benzeri fimbria gibi diğer adezinler APEC suşları arasından tanımlanmıştır (La Ragione ve Woodward, 2002). Fimbria F17, Afa, Sfa ve Eae DNA ilişkili sekans varlığı, APEC suşları arasında bu adezinlerin APEC'lerin hücre yüzeyinde bulunabileceğini gösterir (McPeake ve ark. 2005) ve bu suşların patogenezisine dahil olduğunu göstermektedir.

Sıcaklık Duyarlı Hemaglutinin

Sıcaklık duyarlı hemaglutinin (TSH) tavuk eritrositleri varlığında APEC suşları tarafından eksprese edilen bir proteindir ve hemaglutinasyon aktivitesi 26°C'de olup 42°C'de baskılanmaktadır (Provence ve Curtiss III, 1994). TSH serin proteaz ototransporter protein 140 kDa prekürsör olarak sentezlenir ve bakteri periplazmasında

2 subunit olarak ayrılır. 33 kDa ağırlığında olan bir subunit dış membranda bulunur ve mesajcı gibi görev görür ve 106 kDa ağırlığında olan diğer subunit ekstraselüler çevreye salınır. 106 kDa'luk subunit dış membranda geçici olarak bulunur ve enfeksiyonun başlangıç aşamasında bakteriyel adezyona aracılık eder (Stathopoulos ve ark., 1999). Onun salgılanmasından sonra 106 kDa'luk subunit muhtemelen karakteristik proteolitik bir aktivite ortaya koymakta ve bu da TSH proteini proteolitik aktiviteli ve adeziv özellikli çok fonksiyonlu protein haline getirmektedir. Bu gen yüksek moleküler ağırlıklı plazmidlerde lokalize olmaktadır (Dozis ve ark., 2000); esas olarak ise Col V plazmidinde ve sıklıkla APEC suşlarında mevcuttur. Çünkü APEC patojenitesinde TSH gen ilişkisinden APEC suşlarının belirlenmesinde moleküler bir marker olarak yararlanılmaktadır (Ewers ve ark., 2004).

Demir Kazanım Sistemi

APEC suşları özellikle konakçı içinde düşük demirli ortamlarda yaşamaya ve büyümeye demir kazanım sistemi sayesinde devam edebilirler (Dho ve Lafont, 1984). Bakteriyel demir kazanım sistemi mekanizması sideroforların üretimini sağlar ki bunlar da konakçıda demir şelatları görevi görürler. Bilinen 2 tip siderofor vardır; fenolat ve hydroxamate. Aerobaktin, plasmid operon tarafından kodlanan bir hydroxamate siderofordur (Gibson ve Magrath, 1969). Bu siderofor ayrıca mantarlar, enteroinvaziv *E. coli* ve APEC suşları arasında bulunmaktadır (Dho ve Lafont, 1984). Bir günlük civcivlerde APEC suşlarında büyüme kabiliyeti ve letalite kabiliyeti ile düşük demir konsantrasyonu arasında pozitif bir ilişki gözlemlenmiştir. Ayrıca Linggood ve ark. (1987) ile Silveira ve ark. (2002); APEC suşlarının demir alım sistemini baskımlarken, patojenik olmayan suşların baskılamadığını ortaya koymuşlardır. *uucA* ve *fepC* genleri, APEC suşları arasında bulunan diğer demir kazanım sistemleri ile ilgili genlerdir (Okeke ve ark., 2004). Araştırma grupları tarafından yapılan çalışmada patojenik avian *E. coli* suşları arasında ilgili genler ile yüksek sıklıkta demir alımının olduğu gözlemlenmiştir. APEC suşları arasında demir kazanım sistemi plasmid genleri (Sabri ve ark., 2006) veya kromozomal patojenite adaları tarafından sağlanmaktadır (Kariyawasam ve ark., 2006).

Kolisinler

Escherichia coli tarafından eksprese edilen bu proteinler ilgili veya benzer türlerde bakteriyel büyümeyi inhibe ederler. Kolisinler 2 subunitten oluşurlar. Birincisi bakteriyel hücre lezyon oluşumunu sağlarken diğeri bakteriyi kendi kolisinlerine karşı korur. Kolisinler plasmidde lokalize olan farklı genler tarafından kodlanabilir ve sıklıkla Col plasmidi olarak adlandırılırlar. APEC suşları tarafından eksprese edilen kolisinlerden Ia, Ib, E1, E2, E3, I, K, B ve V en güçlü olanlarıdır (Silveira ve ark., 2002). APEC suşlarının çoğu Kolisin V plasmidine sahiptir (Wray ve Woodward, 1997).

Kapsül

Bazı *E. coli* suşları hücre yüzeylerinde bakterinin immun sistemini destekleyen N-asetil muramik asit kapsülüne sahiptir (Jann ve Jann, 1977).

Serum Direnci

APEC suşlarında bakterinin direncini yüzeyindeki LPS, kapsül, Col V kolisin ve diğeri membran proteinleri sağlamaktadır. Serotip, kanatlı türü ve lezyon orjinine rağmen APEC patojenitesinin Iss faktör (artmış serum süresi) ile ilgili olmasını iss geninin non patojenik suşlara kıyasla patojenik suşlarda bulunmasına bağlamaktadırlar (Lynne ve ark., 2007).

Toksinler

Bazı APEC suşları, LT ve ST enterotoksinleri gibi toksin sentezlerlerken bazı APEC suşları da Stx gibi verotoksin sentezlerler (O'Brien ve ark., 1982). APEC suşlarının Vero hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi Parreira ve Yano (1998) tarafından gözlenmiştir. Stx genini selülitis, septisemi ve şişkim baş sendromlu tavuk ve hindilerden izole edilen farklı *E. coli* suşlarından tanımlanmıştır. Aynı yazarlar APEC suşlarından eksprese olan vakuol benzeri toksin varlığını belirtmişler ve bu toksin patojenite adalarına ait olan *vat* geni tarafından kodlanmaktadır. Daha sonra diğer APEC suşlarında da bu genin varlığı tespit edilmiştir. APEC suşları arasındaki diğer virulens faktörleri de patojenite adaları (Parreira ve Gyles 2003) ve eritrosit lokuslarıdır (La Ragione ve Woodward, 2002).

1.2.2. *Escherichia coli*'nin Serolojik Özellikleri

E. coli'nin alt türlerinin sınıflandırılması, bakterilerin yüzeyindeki antijenik yapıların çeşitliliğine dayanır. Serotiplendirme için ilk şemayı Kaufmann geliştirmiştir ve bu serotiplendirme *E. coli*'nin somatik (O), flagellar (H) ve kapsüler (K) antijenlerine göre yapılır (Kostakioti ve Stathopoulos, 2004).

O antijeni dış hücre zarını oluşturan lipopolisakkarit yapıda, ısıya dirençli yüzey antijenidir. 100°C'de 2 saat süresince termostabil kalabilir. O antijeni, beş ya da daha fazla sayıda farklı polisakkarit grubu tarafından oluşturulmaktadır. Bu yüzden bugüne kadar 180'den fazla farklı O grubu izole edilmiştir. O antijeni *Enterobacteriaceae* ailesindeki mikroorganizmaların birçoğunda vardır. Bunun sonucu olarak da çapraz reaksiyonlar görülebilmektedir. Örneğin, *E. coli*'nin O antijeni, bazı *Shigella* ve *Salmonella* türlerinin O antijenleri ile çapraz reaksiyon oluşturmaktadır. Bu çapraz reaksiyonlardan dolayı, antikor saptanmasına dayanan testlerde yalancı pozitiflik vermektedir (Orskov ve ark., 1984).

1945 yılında Kauffmann ve Vahlne kapsül antijenini göstermek için bir sembol olarak K antijeni kavramını ortaya atmıştır. K antijeni de, polisakkarit (N-asetil neuramik asit) yapıdadır. Ayrıca, Kauffmann ve Vahlne (1945) K antijeninin üç farklı tipini tanımlamışlardır (A, B ve L). Bunlar tiplerine göre asidik ortama ve farklı sıcaklıklara dayanıklıdır. Örneğin, A tipinin inaktivasyonu için 121°C sıcaklık ve 1 saatlik zaman gereklidir. Fakat B ve L tipleri 100°C'de inaktive olabilmektedir. Bir *E. coli* suşu, 2 farklı K antijen tipi içerebilir. Örneğin, birincisi B ile gösterilen (K87); ikincisi L ile gösterilen (K88). Toplamda 60 farklı K antijeni olduğu kabul edilmektedir. Serotiplendirmede O ve H antijenleri kullanılırken, K antijeni kullanılmamaktadır (Kaufmann, 1947).

H antijenleri flagellanın bir parçasıdır ve bu yüzden hareketli *E. coli* suşlarında bulunur. Çevreden ilk izole edilen *E. coli* suşlarının çoğu hareketsiz veya kısmen hareketlidir. Bu yüzden H antijenine bağlı serotiplendirme güvenilir değildir. Bunun için suşlar seçici yarı katı agar pasajlanır. Bu sayede hareket ve H antijeni üretiminin zenginleştirilmesi sağlanır. Bugüne kadar 56 H antijeni tespit edilmiştir. Bazı *E. coli* suşlarının serotiplerini tanımlamak için bu üç antijen kullanılmaktadır. Örneğin, *E. coli* O18:K1:H7. Fakat zamanla K antijeni serotiplendirmede kullanılmamaya başlanmıştır. Sonuç olarak, *E. coli*'nin farklı suşlarını ayırt etmek için kullanılan en ayırt edici antijenler O ve H antijenlerdir. O ve H antijenleri farklı virülens gruplarına göre sıralanabilir ve konak hayvanın türüne göre kategorize edilebilir (Orskov ve ark., 1984).

Bir diğer antijen olan fimbrial (F) antijenler, proteinöz moleküler yapılar bilinmeden önce K antijenleri olarak tanımlanmıştır. Fakat kendi yapılarının ortaya çıkmasıyla K antijen profilinden ayrılmıştır. F antijeni ise tek tek suşları tanımlanmak için kullanılmaktadır (Parreira ve Gyles, 2003).

1.2.3. *Escherichia coli* Genotipleri

1980'lerin başlarında Whittam ve ark. (1983)'ün yaptığı çalışma, *E. coli* genetik yapısını ortaya çıkarmıştır. Daha sonraki çalışmalar, *E. coli* alt türleri veya filogrupların varlığına işaret ederek bu türde geniş bir altyapının var olduğunu göstermiştir. Bu gruplar çoklu enzim elektroforezi tarafından, enzim kodlayan genlerin allellik varyasyonlarının belirlenmesine dayanarak tanımlanmıştır. Ayrıca genom boyutunun filogruplar arasında değiştiği görülmüştür. *E. coli* suşları, 4 ana filogenetik gruptan birine girmektedir. Bunlar A, B1, B2 ve D'dir. 4 filogrupla ilgili olan fenotipik karakteristikler ise farklı şekerleri metabolize etme yeteneği, antibiyotik direnç profilleri ve büyüme hızı-sıcaklık ilişkisidir. Genom büyüklüğü değişkenliği 4 filogrup A-B1 suşlarında, B2-D suşları arasındaki değişkenliğe kıyasla daha azdır ve B2-D grubu daha fazla virülens faktörüne sahiptir. 4 filogruptan ekstraintestinal hastalığa neden olabilen bir suş ele alındığında çeşitli genlerin var olup olmadığı değişkenlik gösterir. A-B1 ve B2-D kardeş gruplardır. Bu filogruplar kendi ekolojik nişlerinde farklı yaşam öyküsü, şeker metabolizması, antibiyotik direnç profili ve büyüme aralığı gibi bazı karakteristiklerde farklılaşırlar. Ekstraintestinal patojenik suşlar genellikle B2 ve D; kommensal suşlar ise A ve B1 gruplarında yer almaktadır (Clermont ve ark., 2000).

Escherichia coli populasyonlarının analizlerinde ayırım gücünü artırmak adına genetik markerlar ile A₀, A₁, B₁, B₂, B₂₃, D₁ ve D₂ altgruplar oluşturmuşlardır. Filogenetik grupların kapasitesinin, konak beslenmesi, vücut ağırlığı ve iklim ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Bazı yazarlar ise, konak ve *E. coli* suşları arasında genetik yapıyı şekillendiren bir ilişki olduğunu belirtmiştir (Fernanda ve ark., 2015; Clermont ve ark., 2000).

Filogenetik gruplar, hem kompleks hem de zaman harcayan teknikler olan çoklu enzim elektroforezi (multilocus enzyme electrophoresis) veya ribotiplendirme ile

belirlenir. Basit ve hızlı olarak tripleks PCR ile A, B1, B2 ve D olmak üzere filogenetik gruplandırma yapılmaktadır. Bu metot, *chuA* geninin *yjaA* adlı gen veya TspE4.C2 DNA fragmenti ile kombinasyonuna dayanmaktadır. 2013 yılında geliştirilen ve *arpA* geni de eklenerek yapılan kuadrupleks PCR tabanlı filogrup oluşturma metoduyla 8 filogrup (A, B1, B2, C, D, E, F ve *E. coli* klan 1) elde edilmektedir. Grup C ise B1 grubu ile yakın ilişkili olmasına rağmen bu grupta farklı suşlar bulunmaktadır. Eskiden sınıflandırılmamış suşlar arasında olan Grup E ise yeni bir grup olarak tanımlanmıştır. Grup F, B2'inin kardeş grubu olarak tayin edilmektedir. *Escherichia* Clade I fenotipik olarak *E. coli*'den ayırt edilemeyen ancak genotipik olarak farklı bir filogrup olarak tanımlanmıştır (Clermont ve ark., 2000 ve Clermont ve ark., 2013). Clermont ve ark. (2013), filogruplandırma sonucunda herhangi bir gruba girmeyen *E. coli* suşlarını "gruplandırılmayan" şeklinde gruplandırmış ve bu suşlara MLST (Multilocus sequence typing) yapılmasını önermişlerdir.

1.3. Epidemiyoloji

Escherichia coli hayvanların ve insanların sindirim sistemi florasında normal olarak bulunan bir bakteridir. Kanatlıların doğal bağırsak florasında 10^6 /gram konsantrasyonda bulunabilmektedir. Cıvcilerde, normal flora gelişimi olmayan kuşlarda ve alt sindirim sisteminde bu sayı daha yüksek olmaktadır (Rasidbegovic ve Kavazovic, 2008).

Escherichia coli üreme ve gelişmeye yardımcı olurken, diğer bakterileri de baskılayan, faydalı bir bakteridir. Ancak, bazı hastalık olgularında *E. coli* primer ya da sekonder etken olabilmektedir. Tavuklardaki kolibasillosis hastalığında *E. coli* primer ya da sekonder etken olarak bulunmaktadır. Kolibasillosis çok yaygın bir hastalıktır. Tüm kanatlı hayvanların farklı yaş kategorilerinde gözlenebilmektedir. Genç hayvanlar genellikle akut enfeksiyon sonucunda sepsisemiden ölmektedirler. Damızlık tavuklarda sepsisemik peritonitis önemli bir ölüm nedenidir (Naglic ve ark., 2005).

Escherichia coli ile direkt vertikal bulaşma olabilmektedir. Embriyoların ve civcivlerin hayatlarının ilk günlerinde ve haftalarında yüksek mortaliteden sorumludur. Fekal kontaminasyon ile enfeksiyonda yumurta ana kaynaktır. Yumurtalar kloakadan geçerken veya kirli altlığa düştüklerinde de kontamine olabilmektedir. Ayrıca, horizontal bulaşma da olabilmektedir. Horizontal bulaşma diğer kanatlılarla temas veya su ve zeminin dışkıyla kontaminasyonu yoluyla da etken alınmaktadır. Bu bulaşmada sindirim ve solunum sistemi önemli rol oynamaktadır. Solunum sistemiyle bulaşmada *E. coli* ya tozlarla ya da altlıktan inhalasyon yoluyla alınmaktadır ve oradan yayılmaktadır. Sindirim sistemiyle alınan etken ise genellikle sonuç olarak ishale neden olmaktadır. Ayrıca, bulaşma mekanik vektörlerle de (kemirgenler, aksesuar ve ayakkabı) olabilmektedir (Rasidbegovic ve Kavazovic, 2008).

1.4. Teşhis

Escherichia coli enfeksiyonlarının teşhisini için klinik ve histopatolojik değişiklikler değerlendirilmektedir. Ancak kesin teşhis için etken izolasyon ve identifikasyonu yapılmalıdır. *E. coli*'nin izolasyon ve identifikasyonunun yapılması için tipik kolibasiloz lezyonlarından örnek alınmalıdır. Örnekler alınırken fekal kontaminasyonun olması önlenmelidir. Teşhis için laboratuvara gönderilen örnekler steril kaplarda ve soğuk zincir ile gönderilmelidir. Laboratuvara gelen örnekten bir öze dolusu alınarak %5'lik koyun kanlı agara, MC ve EMB agara ekim yapılmalıdır. Besi yerleri aerobik koşullarda 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmelidir. İnkübasyon sonrası EMB agarda metalik yeşil renkli düzgün kenarlı koloniler, MC agarda ise parlak pembe renkli düzgün kenarlı koloniler gözlenmelidir. Mikroskopik bakıda Gram negatif çomaklar görülmelidir. Ayrıca *E. coli* için spesifik olan biyokimyasal testler (indol, H₂S, Metil Red, Voges Proskaver, karbonhidrat fermentasyonu vb) ile identifikasyon yapılmalıdır. Serolojik yöntemler ile teşhis yapabilmek için üretilen *E. coli*'nin antijenik özellikleri göz önüne alınmalıdır (Rasidbegovic ve Kavazovic, 2008).

1.5. Saęaltım ve Koruma

Escherichia coli'nin neden olduğu enfeksiyonların önlenmesi için spesifik ve nonspesifik koruma yöntemlerinin uygulanması gerekmektedir. Uygulamalarda hastalığın önlenmesi için hijyen kurallarından yararlanılmalıdır. Korumada dezenfeksiyon önemli bir faktördür. Ayrıca tesislerin biyolojik dinlenme süresi ve bu süreçteki temizliği enfeksiyondan korunmada önemli bir rol oynamaktadır. Koruma amacıyla aşilar (inaktive edilmiş, canlı, rekombinat-mutant) ve pasif immunizasyon yöntemleri kullanılmalıdır. Kolibasillozisin tedavisinde 19. yüzyılın ortalarından itibaren antibiyotikler kullanılmaya başlanmıştır. Kuluçkalık yumurtaların dışkı ile kontaminasyonu *E. coli*'nin bulaşmasındaki en önemli faktördür. Bu nedenle hijyen kurallarının iyi uygulanması ve bu konu ile ilgili prosedürlerin sürdürülmesi gerekmektedir. Ayrıca korumada yem ve su kontrolü önemlidir çünkü yem ve su kaynakları bulaşmada rol oynayabilmektedir (Naglic ve ark., 2005 ve Rasidbegovic ve Kavazovic, 2008).

Filogrulandırma, *E. coli* suşlarının karakteristik özelliklerinin anlaşılması, enfeksiyonların önlenmesi, kontrol edilmesi ve yeni tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada, kanatlı kökenli *E. coli* (APEC ve AFEC) suşlarının filogrulandırılması ve elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlandı (Clermont ve ark., 2013).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Örneklerin Toplanması

2015-2017 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kanatlı Hayvan Laboratuvarına gönderilmiş olan *E. coli* şüpheli, septisemi sonucu ölen tavuklara ait iç organlardan (kalp, karaciğer, dalak) izole ve identifiye edilen 150 adet APEC suşu kullanıldı. Bununla birlikte, 150 adet AFEC suşu ise, yine aynı yıllar arasında aynı kümeslerden gelmiş olan altlık ve dışkı örneklerinden izole ve identifiye edildi. Sonuç olarak toplam 300 adet örnek, materyal olarak kullanıldı (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Kullanılan örneklerle ilgili bilgiler.

Materyalin Toplandığı Yer	Kanatlı Hayvan		Toplam
	APEC	AFEC	
Kalp	53	-	56
Karaciğer	56	-	47
Dalak	41	-	48
Altlık	-	68	68
Dışkı	-	82	82
Toplam	150	150	300

2.1.2. Besi Yerleri

Bu çalışmada etken izolasyonu ve identifikasyonu için %5 koyun Kanlı Agarı, MacConkey (Oxoid) ve Eosin Metilen Blue Agar (Oxoid), Metil Red (Oxoid), Voges Proskauer Medium (Oxoid) ve izole edilen suşların toplanması için Nutrient Agar (Oxoid) kullanıldı. İzolasyonu ve identifikasyonu yapılan suşları -20°C’de saklanmak için %20 Gliserin içeren Triptik Soy Broth (TSB) (Oxoid) kullanıldı.

2.1.3. DNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Maddeler

İdentifiye edilen *E. coli*’lerden DNA ekstraksiyonu için kit kullanım talimatlarına uygun olarak DNA izolasyon kiti (Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit, #K0721, #K0722) kullanıldı.

2.1.4. PCR'da Kullanılan Maddeler

PCR’da Etanol (%95’lik), Tris Borik asit EDTA (TBE), 10xPCR Buffer, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP (EACH), Taq DNA polimeraz, Praimerler, Agarose, Ethidium Bromide, 6xLoading Dye kullanıldı.

2.1.5. PCR’da Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Bu çalışmada, hassas terazi (scaltec, SBC41), santrifüj (Thermo SCIENTIFIC, Micro CL21), steril kabin (laminar flow) (Thermo SCIENTIFIC, Class II, Safety Cabinet), vorteks (Thermo SCIENTIFIC), spektrofotometre ND-1000 (NanoDrop) DNA Thermal Cycler (Thermo SCIENTIFIC), Jel elektroforez cihazı ve güç kaynağı (Blu POWER 500), UV transillüminatörlü bilgisayarlı görüntüleme sistemi (Syngene), Termal printer (Sony) kullanıldı.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

Escherichia coli izolasyonu için gönderilen örneklerden bir öze dolusu alınarak %5 koyun Kanlı agar, MC ve EMB agara ekimler yapıldı ve aerobik olarak 37°C’de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası şekillenen kolonilerin makroskopik ve mikroskopik morfolojileri incelenerek etken için spesifik olan (indol, H₂S, Metil Red, Voges Proskauer vb.) biyokimyasal testler ile identifikasyonları yapıldı (Çizelge 2.2). İzole ve identifiye edilen *E. coli* suşları daha sonra kullanılmak amacıyla %20 gliserinli TSB’de süspanse edilerek -20 ve -80°C’de saklandı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’na ait suş koleksiyonundan alınan A grubu için *E. coli* AVMC92-01, B1 grubu için *E. coli* AVMC92-02, B2 grubu için *E. coli* AVMC92-03, C grubu için *E. coli* AVMC92-04, D grubu için *E. coli* AVMC92-05, E grubu için *E. coli* AVMC92-06 ve F grubu için *E. coli* AVMC92-07 suşu pozitif kontrol olarak tüm testlerde kullanıldı (Naglic ve ark., 2005).

Çizelge 2.2. *Escherichia coli*'nin identifikasyonunda kullanılan biyokimyasal testler (Naglic ve ark., 2005).

Kullanılan Testler	Testlerin Sonuçları
Oksidaz	-
Katalaz	+
İndol	+
Metil Red	+
Voges-Proskauer	-
Sitrat	-
TSI Agar (karbonhidrat fermentasyonu, laktoz, sukroz, glukoz)	+ / + / +
H ₂ S	-
Gaz oluşumu	+
Üre Testi	-
O/F Testi	Fermentatif
37°C'de hareketlilik testi	+

2.2.2. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonunda ticari Thermo Scientific GeneJET Genomik DNA Purification Kiti kullanıldı. Protokol olarak kit prosedürü içerisinde bulunan, Gram negatif bakteriler için DNA Purifikasyonu protokolü seçildi. Bu prosedüre göre DNA ekstraksiyonu aşağıda belirtildiği gibi yapıldı.

- 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne 2×10^9 'u geçmeyecek şekilde bakteri hücresi toplandı ve 10 dk 5000 xg'ı geçmeyecek şekilde santrifüje tabi tutuldu. Süpernatant atıldı.
- Pelet tekrar 180 µL digestion süspansiyonu içinde süspanse edildi. 20 µL Proteinaz K solüsyonu ilave edilip homojen bir süspansiyon elde etmek için vorteks ile iyice karıştırıldı.
- Numune lize olana kadar ara ara vorteks yapıp termomikser kullanılarak 56°C'de inkübe edildi. 20 µL RNase A solüsyonu eklendi, vortekslenerek karıştırıldı ve karışım oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.

- Numuneye 200 µL Lizis solüsyonu eklendi. Homojen bir karışım elde edilinceye kadar yaklaşık 15 sn vorteksenerek iyice karıştırıldı.
- 400 µL %50 etanol eklenip vorteks ile karıştırıldı.
- Hazırlanan lizat bir toplama tüpüne alındı ve GeneJet Genomik DNA Purification Kitine aktarıldı. Kolam 6000 xg'da 1 dk santifüj edildi. Akışkan çözeltiyi içeren toplama tüpü atıldı. GeneJet Genomic DNA Purification kolonu yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne yerleştirildi. Kolonlar her kullanımdan sonra sıkıca kapatıldı.
- 500 µL Wash Buffer I (etanol eklenmiş) eklendi. 1 dk boyunca 8000 xg olacak şekilde santrifüj edildi. Akışkan kısım boşaltıldı ve saflaştırma kolonu tekrar toplama sütununa yerleştirildi.
- 500 µL Wash Buffer II (etanol eklenmiş) GeneJet Genomik DNA saflaştırma kolonuna eklendi. 3 dk boyunca maksimum hızda (≥ 1200 xg) santrifüje tabi tutuldu. Akışkan çözeltiyi içeren toplama tüpü atıldı ve GeneJet Genomik DNA Arıtma Sütunu steril 1,5 ml'lik mikrosantifüj tüpüne (ependorfa) aktarıldı.
- Genetik DNA'yı elemek için, 200 µL Elution Buffer, GeneJet Genomic DNA saflaştırma sütununun zar merkezine eklendi. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilip 1dk boyunca 8000 xg'da santrifüj edildi.
- Spin kolon atılarak 1,5 ml'lik ependorfa içerisinde saf DNA elde edildi. Ekstraksiyonu yapılan DNA örnekleri işlemleri yapılanaya kadar -20°C'de saklandı.

2.2.3. *Escherichia coli* Filogruplarının Moleküler Yöntemlerle Tespiti

Bu çalışmada, kanatlı kökenli *E. coli*'lerin filogruplandırılması amacı ile Clermont ve ark. (2013)'nin uyguladığı kuadrupteks PCR yöntemi kullanıldı. Bu amaçla, izolasyonu, identifikasyonu ve DNA ekstraksiyonu yapılan 300 adet *E. coli* suşuna ait DNA'ların konsantrasyonları spektrofotometre ile ölçülerek, amplifikasyonda kullanılacak olan template DNA miktarları ortaya konuldu. Kullanılan primerler Clermont ve ark. (2013) tarafından belirlenen gen dizilerinden seçildi. Kullanılan primerlerin baz dizileri, ilgili gen bölgeleri ve ürün uzunlukları

Çizelge 2.3'te sunulmuştur. PCR karışımı her primerden 0.2 µM (Çizelge 2.3), 200 µM dNTP, 2.5 µl PCR reaksiyon buffer, 3 mM MgCl₂, 2 U Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific; EP0402) ve 1 µl template DNA'nın bulunduğu 25 µl PCR karışımı hazırlandı.

Filogrulandırma için kullanılan primerler ile bağlanma sıcaklıklarının farklılık göstermesi nedeniyle ilk olarak gradient PCR yapıldı. Gradient PCR ile 55-60°C arasında çalışıldı ve optimum bağlanma sıcaklıkları seçildi. En uygun sıcaklık olarak belirlendi ve çalışma boyunca kullanıldı. Amplifikasyon koşulları: 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takip eden 30 siklus (grup E ve C için 28 siklus), denatürasyon 94°C'de 5 sn, bağlanma 60°C'de (grup E ve C için 57°C) 20 sn, uzama 72°C'de 5 sn ve 72°C'de 5 dk son uzama aşaması olarak uygulandı (Clermont ve ark., 2013).

Çizelge 2.3. Primellerin baz dizileri, bağlandıkları spesifik gen bölgeleri, PCR ürünlerinin uzunlukları (Clermont ve ark., 2013).

Metod	Primer	Gen	Sekans	PCR Ürünü (bp)
Kuadrupleks	chuA.1b	<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288
	chuA.2		TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
	yjaA.1b	<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTGTCAGGAG	211
	yjaA.2		AATGCGTTCCTCAACCTGTG	
	TspE4C2.1b	TspE4.C2	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152
	TspE4C2.2b		AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	
	AceK.f	<i>arpA</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400
	ArpA1.r		TCTCCCCATACCGTACGCTA	
Grup E	ArpAgpE.f	<i>arpA</i>	GATTCATCTTGTCAAAATATGCC	301
	ArpAgpE.r		GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	
Grup C	trpAgpC.1	<i>trpA</i>	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	219
	trpAgpC.2		TCTGCGCCGGTCACGCC	
Internal Kontrol	trpBA.f	<i>trpA</i>	CGGCGATAAAGACATCTTAC	489
	trpBA.r		GCAACGCGGCCTGGCGGAAG	

2.2.4. Elektroforez ve Görüntüleme

Amplifiye edilen her bir örnekten 10 µl alınıp 2 µl 6xLoading Dye solüsyonu ile karıştırılarak, 20 cm'lik % 1,5 agaroz (BIOMAX) içeren yüklendi. Jeldeki birinci göze 5 µl DNA Marker (Thermo Scientific) konularak 180 voltta 60 dk elektroforez işlemi gerçekleştirildi (Yamoto ve ark., 1995). Biyo-görüntüleme sistem (Syngene) kullanılarak jeldeki örnekler görüntülendi.

2.2.5. Filogrupların Belirlenmesi

Grup A, C, B1, B2, D, E, Clade I ve F gruplarının belirlenmesinde *chuA*, *yjaA* ve *arpA* genleri ile TspE4.C2 DNA fragmanı kullanıldı. Kuadrupleks PCR sonucu bu genlerin bulunması ve/veya bulunmamasına göre gruplar belirlendi. Kuadrupleks PCR sonucunda grup A veya C, D veya E ve E veya Clade I çıkan suşların hangi gruba dahil olduğunu tespit etmek için ayrıca konvansiyonel PCR yapıldı. Grup E ve grup C'nin belirlenmesinde ise sırasıyla, ArpAgpE.f, ArpAgpE.r ile trpAgpC.1, trpAgpC.2 primer dizileri kullanıldı. Aynı zamanda, grup E ve C'nin belirlenmesinde PCR yönteminde yeterli miktar ampikon oluşup oluşmadığını test etmek amacıyla internal kontrol kullanıldı (Clermont ve ark., 2013). Filogruplandırma sonucunda gruplandırılmayan suşların ileri teşhisi için Clermont ve ark. (2013)'nın önerdiği MLST yöntemi uygulanmadı.

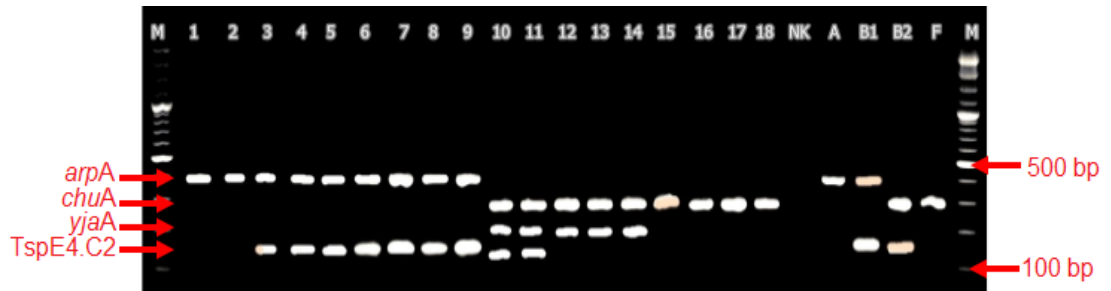
3. BULGULAR

3.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

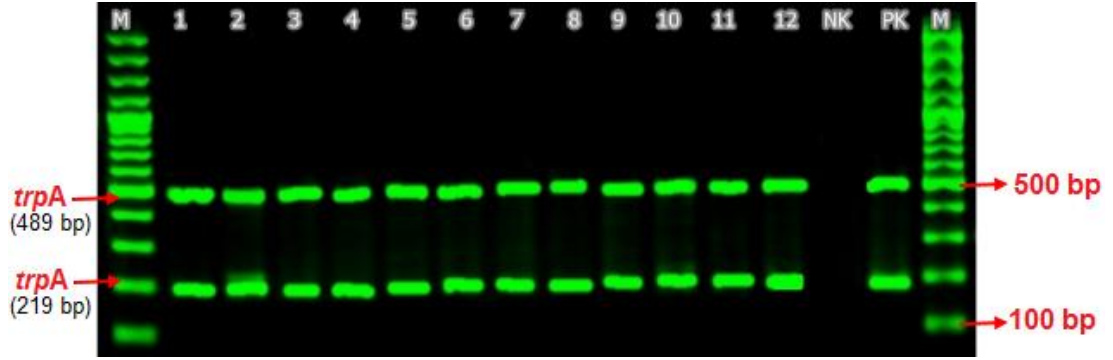
Tez çalışması süresince 189 adet organ (kalp, karaciğer, dalak) ve 195 adet dışkı ve altlık örneği APEC ve AFEC varlığı yönünden sırasıyla incelendi. İzole ve identifiye edilen toplam 150 adet APEC, 150 adet AFEC suşu seçilerek kullanıldı.

3.2. PCR Bulguları

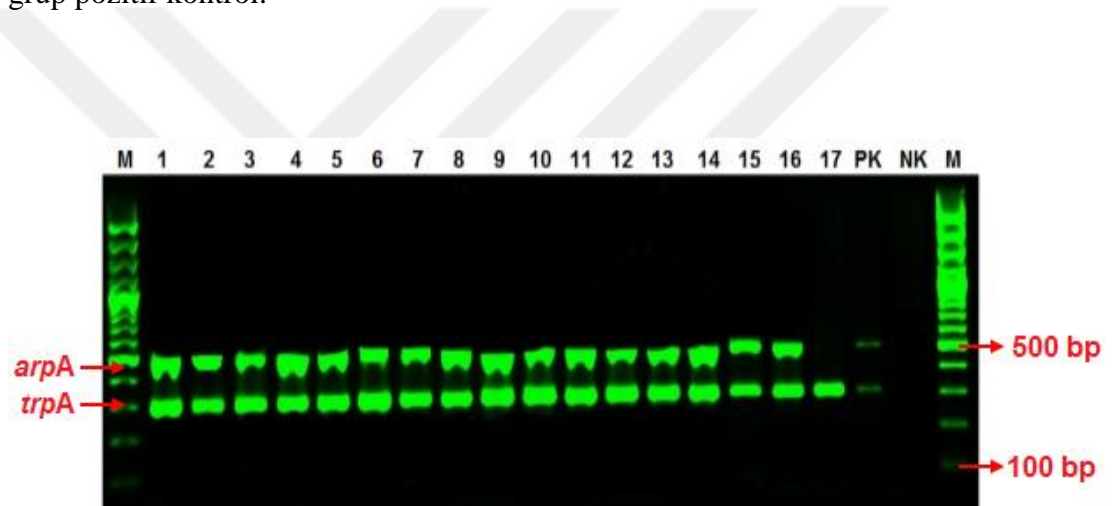
İzole edilen *E. coli* suşlarında *arpA*, *chuA*, *yjaA*, TspE4.C2 (kuadrupleks PCR) ve *arpA*, *trpA*, (Grup C ve E PCR) genlerinin varlığı araştırıldı. Bu genlerin bulunup bulunmamasına göre *E. coli* suşlarının filogruplandırılması yapıldı (Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3).



Şekil 3.1. Kuadrupleks PCR jel elektroforez görüntüsü; *arpA* (400 bp), *chuA* (288 bp), *yjaA* (211 bp) ve TspE4.C2 (152 bp) genleri. 1-2, **A** pozitif örnekler (+,-,-,-); 3-9, **B1** pozitif örnekler (+,-,-,+); 10-14, **B2** pozitif örnekler (-,+,,+/-,+,-,-); 15-18, **F** pozitif örnekler (-,+,-,-); **M**, moleküler marker; **NK**, negatif kontrol; **A**, A grup pozitif kontrol; **B1**, B1 grup pozitif kontrol; **B2**, B2 grup pozitif kontrol ve **F**, F grup pozitif kontrol.



Şekil 3.2. Grup C PCR jel elektroforez görüntüsü: *trpA* (489 bp) ve *trpA* (219 bp) genleri. 1-12, C pozitif örnekler; **M**, moleküler marker; **NK**, negatif kontrol; **PK**, C grup pozitif kontrol.



Şekil 3.3. Grup E PCR jel elektroforez görüntüsü: *trpA* (489 bp) ve *arpA* (301 bp) genleri. 1-17, E pozitif örnekler; **M**, moleküler marker; **NK**, negatif kontrol; **PK**, E grup pozitif kontrol.

İncelen 150 adet APEC suşunun 4 tanesi A (% 2,66), 43 tanesi B₁ (% 28,66), 38 tanesi B₂ (% 25,33), 2 tanesi C (% 1,33), 18 tanesi E (% 12), 5 tanesi F (% 3,33), 1 tanesi Clade I (% 0,66), 2 tanesi negatif (% 1,33) olarak belirlendi. Geriye kalan 37 örnek ise gruplandırılmadı (Çizelge 3.1).

Ayrıca, incelenen 150 adet AFEC suşunun 5 tanesi A (% 3,33), 8 tanesi B₁ (% 5,33), 16 tanesi B₂ (% 10,66), 16 tanesi C (% 10,66), 1 tanes D (% 0,66), 27 tanesi E (% 18), 9 tanesi F (% 6), 3 tanesi Clade I veya Clade II (% 2) olarak belirlendi. Geriye kalan 51 örnek ise henüz belirlenmiş bir gruba girmedi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Genlerinin bulunmasına göre *E. coli* suşların filogruplandırılması.

Kuadrupleks PCR				Filogrup	İncelenen suşlar			
<i>arpa</i> (400 bp)	<i>chuA</i> (288 bp)	<i>yjaA</i> (211 bp)	TspE4.C2 (152 bp)		APEC		AFEC	
					Sayı	%	Sayı	%
+	-	-	-	A	4	2,66	-	-
+	-	+	-	A	-	-	5	3,33
+	-	-	+	B1	43	28,66	8	5,33
-	+	-	+	B2	4	2,66	-	-
-	+	+	+	B2	28	18,66	5	3,33
-	+	+	-	B2	6	4	11	7,33
+	-	+	-	C	2	1,33	16	10,66
+	+	+	-	Clade I	1	0,66	14	9,33
-	-	+	-	Clade I veya II	-	-	3	2
+	+	-	+	D	-	-	1	0,66
+	+	-	-	E	18	12	27	18
-	+	-	-	F	5	3,33	9	6
+	-	+	+	gruplandırılmayan	27	18	9	6
+	+	+	+	gruplandırılmayan	10	6,66	42	28
-	-	-	-	Negatif	2	1,33	-	-
Toplam:					150	100	150	100

4. TARTIŞMA

Escherichia coli tüm sıcakkanlı hayvanların ve insanların gastrointestinal sistemlerinde en yaygın görülen mikroorganizmalardan biridir. *E. coli*, hem hayvanlarda hem de insanlarda yaraların fırsatçı enfeksiyonlarından ciddi sistemik enfeksiyonlara kadar değişen çeşitlilikte hastalıklara neden olmaktadır. APEC patotiplerinin neden olduğu ekonomik kayıplar ve etkenin zoonoz karakteri kanatlı endüstrisi için büyük önem teşkil etmektedir (Rasidbegovic ve Kavazovic, 2008).

Daha önceki çalışmalar, ekstraintestinal *E. coli* enfeksiyonlarından B2 ve D gruplarının, A veya B1 gruplarına göre daha fazla izole edildiğini göstermiştir (Picard ve ark., 1999 ve Johnson ve Steel, 2000). Bu tez çalışmasının sonucunda ise APEC suşlarının % 28,66'sı B1 grubuna % 25,33'ü B2 grubuna dahil olduğu belirlenerek B1 grubunun daha fazla oranda izole edildiği görüldü. Bu farklılığın nedeninin incelenen suşların toplandığı bölgedeki çevresel faktörler olduğu düşünüldü. Bilindiği üzere B2 ve D grupları patojen APEC suşlarını içermektedir (Ramadan ve ark., 2016). Ancak, Kariyawasam ve ark. (2007)'nin yapmış oldukları çalışmada, APEC suşlarının genellikle A 36 (% 37,89) grubuna ve B1 11 (% 11,58) grubuna dahil olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar, APEC suşlarında A ve D gruplarını düşük oranda belirlediklerinden dolayı, APEC suşlarının virülensinin yalnızca kromozomal farklılıklardan dolayı olmadığını vurgulamışlardır. Bu tez çalışmasında da benzer olarak A grubunda 4 adet (% 2,66) APEC suşu belirlenirken D grubuna dahil olan APEC suşu belirlenemedi.

Fernanda ve ark. (2015)'nin yaptıkları çalışmada 149 adet APEC suşunu Clermont ve ark. (2013) metoduna göre filogruplandırmıştır. Sonuç olarak APEC suşlarının A (% 42,95), B1 (% 34,22), B2 (% 2,01), C (%6,71), D (% 4,02), E (% 4,02) ve F (% 6,04) grubuna dahil olduğunu göstermiştir. Bu tez çalışmasında da benzer sayıda (n: 150) APEC suşu araştırılmış olup sonuç olarak, Fernanda ve ark. (2015) yaptığı çalışmaya göre, B1 ve F grupları yönünden benzer, ancak A, B2, D ve E

grupları yönünden farklı sonuçlar gözlemlendi. Buna göre B2 ve E grupları daha yüksek, A ve D grupları ise daha düşük oranda tespit edildi. Bu sonuçlar, bu tez çalışmasında incelenen APEC suşlarının Fernanda ve ark. (2015)'nin yaptıkları çalışmada araştırdıkları APEC suşlarına göre daha yüksek virulense sahip olduğunu gösterdi.

Logue ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada 452 adet APEC ve 199 adet AFEC suşunu Clermont ve ark. 2000 ve 2013 yıllarında geliştirdikleri metotlara göre inceleyip filogruplandırmıştır. Tripleks PCR (Clermont ve ark., 2000) metoduna göre APEC suşlarını A (% 38,05), B1 (% 17,25), B2 (% 15,92) ve D (% 10,05); AFEC suşlarını A (% 45,22), B1 (% 28,14), B2 (% 16,58) ve D (% 10,05) şeklinde filogruplandırmıştır. Aynı örnekleri kuadrupleks PCR (Clermont ve ark., 2013) metoduna göre tekrar filogruplandırmış ve APEC suşlarını A (% 10,17), B1 (% 18,58), B2 (% 15,26), C (% 27,65), D (% 5,08), E (% 3,31), F (% 19,26), Clade I (% 0,44) ve gruplandırılmayan (% 0,22); AFEC suşlarını A (% 36,18), B1 (% 28,64), B2 (% 11,05), C (% 6,53), D (% 7,03), E (% 4,52), F (% 4,02) ve Clade I (% 2,01) olarak belirlerken gruplandırılmayan grubunda AFEC suşu bulamamışlardır. Bu tez çalışmasının sonucunda bulunan APEC ve AFEC, F ve E yoğunluğu ile Logue ve ark. (2017) çalışmasından elde ettikleri sonuçlara benzerlik gösterirken herhangi bir filogruba dahil olmayan (gruplandırılmayan) suş sayısı daha yüksek oranda (APEC % 24,66, AFEC % 34) gözlemlendi. Ayrıca APEC suşları içinde F grubu (% 3,33) daha düşük ve AFEC suşları içinde E grubu (% 18) daha yüksek oranda bulundu. Bu farklılıkların, bölgesel suşlara ait genotipik farklılıklardan dolayı olduğu düşünülmüş olup aşı uygulamalarında bölgesel suş seçiminin önemini bir kez daha ortaya koymuştur.

Ayrıca bu çalışmada AFEC suşlarının filogruplandırılması sonucunda ekstraintestinal patojen olan B2 grubu % 10,66 oranında bulundu. Gerek bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, gerekse yapılan diğer çalışmalar sonucunda (Logue ve ark., 2017) AFEC suşları arasında dikkate değer oranda ekstraintestinal *E. coli* suşunun varlığı gösterilerek elde edilen sonuçların diğer çalışmalar ile uyumlu olduğu tespit edildi.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tavuk organlarından, dışkılarından ve altlıklardan izole edilen *E. coli* suşlarının filogruplandırılması amacı ile yapılan bu çalışmada bulgular kısmında verilen sonuçlara ulaşıldı. Bu çalışmada toplam 150 APEC ve 150 AFEC olmak üzere toplam 300 *E. coli* suşunun izolasyonu ve identifikasyonu yapıldı. Filogruplandırma için Clermont ve ark. (2013) yöntemi kullanıldı. Filogruplandırma sonucunda APEC suşları içinde en yüksek oranda B1 grubu (% 28,66), en düşük oranda Clade I grubu (% 0,66) bulundu. AFEC suşlarında ise en yüksek oranda E grubu (% 18), en düşük oranda D grubu (% 1) bulundu.

Türkiye dışındaki ülkelerde yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlar tavuklarda *E. coli* enfeksiyonlarının önlenmesi için yapılacak olan koruma ve kontrol programlarının geliştirilmesi ve bu amaçla en çok kullanılan biyolojik korunma faktörü olan aşı için bölgesel farklılıkların önemli olduğu ve aşı geliştirilmesinde mutlaka yersel suşların ve bu suşlara ait özelliklerin belirlenmesi gerektiği anlaşıldı. *Escherichia coli* enfeksiyonları, dünyanın her yerinde özellikle de kanatlı yetiştiriciliğinde önlenemeyen bir enfeksiyondur. Kümes dezenfeksiyonu ve biyogüvenlik kurallarına uyulması; hem kanatlı sağlığının korunması hem de gıda zinciri yoluyla insanlara bulaşmasının engellenmesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, AFEC suşları arasında patojen ekstraintestinal suşların yüksek oranda bulunduğunu gösterdi. Bu sonuç APEC suşları olarak tanımlanan kanatlı patojeni olan *E. coli* suşlarının kökeninin kümes materyali olabileceği veya dışkıyla çıkartılan APEC suşlarının çevrede bulunarak diğer hayvanlara bulaşmada önemli olabileceğini gösterdi.

Bu çalışmada izole edilen APEC ve AFEC suşlarından herhangi bir gruba dahil olmayan suşların yüksek oranda belirlenmesi farklı *E. coli* genotiplerinin bulunabileceğini ve daha detaylı genotipik analizler yapılarak yeni filogrupların araştırılması gerektiğini göstermiştir.

ÖZET

Kanatlı Kökenli *Escherichia coli*'lerin Filogruplandırılması

Filogruplandırma, *E. coli* suşlarının karakteristik özelliklerinin anlaşılması, enfeksiyonların önlenmesi, kontrol edilmesi ve yeni tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

Bu çalışmada kanatlı kökenli *E. coli* (APEC ve AFEC) suşlarının filogruplandırılması amaçlandı. Çalışmada identifiye edilen 150 adet APEC ve 150 adet AFEC suşunun filogruplandırılması kuadrupleks PCR (Clermont ve ark., 2013) metodu ile araştırıldı. Filogruplandırma sonucu incelenen 150 adet APEC suşunun 4'u A (% 2,66), 43'ü B₁ (% 28,66), 38'i B₂ (% 25,33), 2'si C (% 1,33), 18'i E (% 12), 5'i F (% 3,33), 1'i Clade I (% 0,66), 2'si negatif (% 1,33) olarak gruplandırıldı ve gruplandırılmayan 37 (% 24,66) suş tespit edildi. İncelenen 150 adet AFEC suşunun 5'i A (% 3,33), 8'i B₁ (% 5,33), 16'si B₂ (% 10,66), 16'si C (% 10,66), 1'i D (% 0,66), 27'si E (% 18), 9'u F (% 6), 3'ü Clade I veya Clade II (% 2) olarak gruplandırıldı ve gruplandırılmayan 51 (% 34) suş tespit edildi.

Escherichia coli enfeksiyonlarının önlenmesi amacıyla geliştirilecek olan aşılarda mutlaka yersel suşların kullanılması ve bu suşlara ait özelliklerin belirlenmesi gerektiği anlaşıldı. Bununla birlikte genotipik olarak çok çeşitlilik gösteren *E. coli* suşlarının, özellikle APEC suşlarının, daha detaylı genotipik analizler yapılarak yeni filogrupların araştırılması gerektiği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: AFEC, APEC, *Escherichia coli*, filogruplandırma.

SUMMARY

Phylogrouping of *Escherichia coli* strains originated from poultry

Phylogrouping has a major role to understand the characteristic features of *E. coli* strains, control and establishment of new treatment methods.

This study was aimed to phylogrouping the strains of *E. coli* (APEC ve AFEC) of avian origin. A total of 150 samples of APEC and 150 samples of AFEC were analyzed and phylogrouped using quadruplex PCR (Clermont et al., 2013) method. Among the APEC samples under study, 4 (% 2,66) belonged to group A, 43 (% 28,66) belonged to group B1, 38 (% 25,33) belonged to group B2, 2 (% 1,33) belonged to group C, 18 (% 12) belonged to E, 5 (% 3,33) belonged to group F, 1 (% 0,66) belonged to Clade I, 2 (% 1,33) were negative and 37 (% 24,66) was ungrouped. On the other hand among AFEC samples under study, 5 (% 3,33) belonged to A group, 8 (% 5,33) belonged to B1, 16 (% 10,66) belonged to B2 group, 16 (% 10,66) belonged to C group, 1 (% 0,66) belonged to D group, 27 (% 18) belonged to E group, 9 (% 6) belonged to F group, 3 (% 2) belonged to Clade I or Clade II and 51 (% 34) were ungrouped.

The applications of local vaccine strains is unique in order to prevent *E. coli* infections, but firstly the characteristics of these strains should be determined. In addition, regarding *E. coli* strains, especially APEC, which show genotypic diversity, more research needs to be done to investigate new phylogroups.

Key words: AFEC, APEC, *Escherichia coli*, phylogrouping,

KAYNAKLAR

- ALEXANDER M, BLOOM B, HOPWOOD D, HULL R, IGLEWSKI B, LASKIN A, STEPHEN O, SCHAECHTER M, SUMMERS W (2000). Encyclopedia of microbiology – second edition. *The Rockefeller University, New York*, 260-269.
- ANA LFM, JENNIFER NW, MICHAEL C, SCOTT JH (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options, *Nature Reviews Microbiology (NRM)* **13**: 269–284.
- CANTEKIN Z, IZGÜR M (2015). Kanatlı Orijinli *Escherichia coli* suşlarının virülens özelliklerinin fenotipik ve moleküler metotlarla belirlenmesi. *Van Veterinary Journal*, **26 (2)**: 71-76.
- CARLTON LG, JOHN FP, GLENN S, CHARLES OT (2010). Pathogenesis of *Bacterial Infections in Animals*, 267 – 307.
- CLERMONT O, JULIA KC, ERICK D, DAVID MG (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups, *Environmental Microbiology Reports*, 58-65.
- CLERMONT O, STE'PHANE B, EDOUARD B (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group, *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. 4555–4558.
- DHO M, LAFONT JP (1984). Adhesive properties and iron uptake abilities in *E. coli* lethal and non-lethal for chicks. *Avian Dis.* **28**: 1016-1025.
- DOYLE PM (1989). Foodborne Bacterial Pathogens. Food Research Institute University of Wisconsin-Madison; *Marcel Dekker, Inc., New York U.S.A.* 235-262.
- DOZIS CM, DHO-MOULIN M, BREE A, FAIRBROTHER JM, DESAUTEL C, CURTISS III R (2000). Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect. Immun.* **68**: 4145-4154.
- EWERS C, JANSSEN T, KIESSLING S, PHILIPP HC, WIELER LH (2004). Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Vet. Microbiol.* **104**: 91-101.

- FANTINATTI F, SILVEIRA WD, CASTRO AFP (1994). Characteristics associated with pathogenicity of avian septicaemic *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* **41**: 75-86.
- FERNANDA MC, DINIZ SA, SILVA MX, JAMILI MSM, BARBOSA SM, LAGE AP, HEINEMANN MB (2015) Phylogenetic Group Determination of *Escherichia coli* Isolated from Animals Samples. *Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal Article*, ID 258424, **4**: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/258424>
- GIBSON F, MAGRATH DI (1969). The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by *Aerobacter aerogenes* 62-I. *Biochim. Biophys. Acta.* **152**: 175-184.
- IZGÜR M (2006) *Escherichia coli* İnfeksiyonları. Aydın N, Paracıkoğlu J eds. Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). *İlke-Emek Yayınları, Ankara.* p. 110-116.
- JANN K, JANN BJ (1977). Capsules of *Escherichia coli*, p.113-143. In: Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli: Mechanisms of virulence.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- JOHNSON JR, STELL AL (2000) Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* **181**: 261–272.
- KARIYAWASAM S, JOHNSON TJ, NOLAN LK (2006). The *pap* operon of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1 is located on a novel pathogenicity island. *Infect. Immun.* **74**:744-749.
- KARIYAWASAM S, SCACCIANOCE JA, NOLAN LK (2007) Common and specific genomic sequences of avian and human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as determined by genomic subtractive hybridization. *BMC Microbiol* **7**:81.
- KAUFFMANN F, VAHLNE G (1945). Ueber die Bedeutung des serologischen Formenwechsels für die Bakteriophagenwirkung in der Coli-Gruppe. *Acta Pathol. Microbiol.Scand.* **22**:119-137.
- KAUFMANN F (1947). The serology of the coli group. *Journal of Immunology* **57**: 71-100.
- KOSTAKIOTI M, STATHOPOULOS C (2004); Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun.* **72**:5548-5554.
- LA RAGIONE RM, WOODWARD MJ (2002). Virulence factor of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res. Vet. Sci.* **73**:27-35.

- LINGGOOD MA, ROBERTS M, FORD S, PARRY SH, WILLIAMS PH (1987). Incidence of the aerobactin iron uptake system among *Escherichia coli* isolates from infections of farm animals. *J. Gen. Microbiol.* **133**:835-842.
- LOGUE CM, WANNEMUEHLER Y, NICHOLSON BA, DOETKOTT C, BARBIERI NL, NOLAN LK (2017). Comparative Analysis of Phylogenetic Assignment of Human and Avian ExPEC and Fecal Commensal *Escherichia coli* Using the (Previous and Revised) Clermont Phylogenetic Typing Methods and its Impact on Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Classification. *Front. Microbiol.* **8**: 283. doi: 10.3389/fmicb.2017.00283.
- LYNNE AM, SKYBERG JA, LOGUE CM, DOETKOTT C, FOLEY SL, NOLAN LK (2007). Characterization of a series of transconjugant mutants of an avian pathogenic *Escherichia coli* isolate for resistance to serum complement. *Avian Dis.* **51**: 771-776.
- MCPEAKE SJW, SMUTH JA, BALL HJ (2005). Characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) associated with colisepticaemia compared to faecal isolates from healthy birds. *Vet. Microbiol.* **110**:245-253.
- NAGLIC T, HAJSIG D, MADIC J, PINTER LJ (2005). Veterinarska mikrobiologija, Veterinarski fakultet Zagreb, Hrvatska 58 – 6.
- O'BRIEN AD, LAVECK GD, THOMPSON MR, FORMAL SB (1982). Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **146**:763-769.
- OKEKE IN, SCALETSKY ICA, SOARS EH, MACFARLANE LR, TORRES AG (2004). Molecular epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **42**:36-44.
- ORSKOV F, NR KRIEG, HOLT JG (1984). Bergey's manual of systematic bacteriology (eds). *Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A.* 420-423.
- PARREIRA VR, GYLES CL (2003). A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infect. Immun.* **64**:3118-3126.
- PARREIRA VR, YANO T (1998). Cytotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from chickens with swollen head syndrome (SHS). *Vet. Microbiol.* **62**:11-119.
- PICARD B, SEVALI GARCIA, J, GOURIOU, S, DURIEZ, P, BRAHIMI, N, BINGEN, E, *et al.* (1999) The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extra-intestinal infection. *Infect Immun* **67**: 546–553.

- PROVENCE DL, CURTISS III R (1994). Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* **62**:1369-1380.
- RAMADAN H, AWAD A, ATEYA A (2016). Detection of phenotypes, virulence genes and phylotypes of avian pathogenic and human diarrheagenic *Escherichia coli* in Egypt, *J Infect Dev Ctries* 2016; 10(6):584-591. doi:10.3855/jidc.7762.
- RASIDBEGOVIC E, KAVAZOVIC A (2008). Gljivične i bakterijske bolesti ptica, p. 73-86. *Veterinarski fakultet, Sarajevo univerzitet, Bosna i Hercegovina.*
- SABRIM, LEVEILLÉ S, DOZOIS CM (2006). A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiol.* **152**:745-758.
- SILVEIRA WD, FERREIRA A, BROCCHI M, HOLLANDA LM, CASTRO AFP, YAMADA AT LANCELLOTTI M (2002). Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet. Microbiol.* **85**:47-53.
- STATHOPOULOS C, PROVENCE DL, CURTISS III R (1999). Characterization of the avian *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. *Infect. Immun.* **67**:772-781.
- SUSSMAN M (1997). *Escherichia coli* – Mechanisms of virulence, *Cambridge University Press, U.K.*
- WHITTAM TS, OCHMAN H, SELANDER RK (1983). Geographic components of linkage disequilibrium in natural populations of *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* **1**: 67–83.
- WOOLEY RE, GIBBS PS, BROWN TP, GLISSON JR, STEFFENS WL, MAURER JJ (1998). Colonization of the chicken trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11. *Avian Dis.* **42**:194-198.
- WRAY C, WOODWARD MJ (1997). *Escherichia coli* infections in farm animals, p.49-84. In: Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli* Mechanisms of Virulence. *Cambridge University Press, Cambridge, UK.*
- YAMAMOTO S, TERAJ A, YURI K, KURAZONO H, TAKEDA Y, YOSHIDA O (1995). Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **12**:85-90.

ÖZGEÇMİŞ

1- BİREYSEL BİLGİLER

Ad: Mehmed
Soyad: Omerovic
Doğum Yeri ve Tarihi: Tuzla-Bosna Hersek, 12.11.1990
Uyruk: Bosna Hersek
Medeni Durum: Bekar
İletişim Adresi ve Telefon: Lipje bb, 75358 Srebrenik Bosna Hersek
Cep: +905531851553
Cep: +38761659005
e-mail: mesa_as@hotmail.com

2- EĞİTİM

- a) Ankara Üniversitesi Tömer Türkçe Ve Yabancı Dil Araştırma Ve Uygulama Merkezi, Türkçe Öğrenim (2014-2015)-ANKARA
 - b) Saraybosna Üniversitesi, Veteriner Fakültesi (2009-2014)-SARAYBOSNA
 - c) Poljoprivredna i medicinska škola Brčko Lisesi, Lisesi (2005-2009)-BRČKO DISTRIKT
 - d) Osnovna škola Duboki Potok, İlköğretmin Okulu (1997-2005)-SREBRENİK
- Yabancı Dil:** Türkçe ve İngilizce

3- UNVAN

- a) Veteriner Hekim-2014