

Kanatlı Kökenli *Escherichia coli*'lerin Filogruplandırılması*

Mehmed Omerovic, H. Kaan Müştak

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Dışkapı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 01.03.2018, Kabul Tarihi / Accepted: 02.05.2018

Özet: Filogruplandırma, *Escherichia coli* suşlarının karakteristik özelliklerinin anlaşılması, enfeksiyonların önlenmesi, kontrol edilmesi ve yeni tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada, kanatlı kökenli avian patojenik *E. coli* (APEC) ve avian fekal *E. coli* (AFEC) suşlarının filogruplandırılması amaçlandı. Çalışmada 150 adet APEC ve 150 adet AFEC suşunun filogruplandırılması kuadrupleks PCR metodu ile gerçekleştirildi. Çalışma sonucu 150 APEC suşunun 4'ü 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 belirlenirken 37 (%24.66) suş gruptandırılmadı. İncelenen 150 AFEC suşunun ise 5'i A (%3.33), 8'i B₁ (%5.33), 16'sı B₂ (%10.66), 16'sı 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 gruptandırılırken 51 (%34) gruptandırılmadı. *Escherichia coli* enfeksiyonlarının önlenmesi amacıyla geliştirilecek olan aşılarda yersel suşların kullanılması ve bu suşlara ait özelliklerin belirlenmesi gerektiği bilinmektedir. Bu nedenle, elde edilen sonuçlar epidemiyolojik açıdan önem taşımaktadır. Bununla birlikte çalışma sonunda, genotipik olarak çeşitlilik gösteren *E. coli* suşlarından, özellikle APEC suşlarının, daha detaylı genotipik analizler yapılarak yeni filogrupların araştırılması gerektiği vurgulandı.

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

Phylogrouping of *Escherichia coli* Strains Originated From Poultry

Abstract: 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 avian pathogenic *E. coli* (APEC) and avian fecal *E. coli* (AFEC). A total of 150 samples of APEC and 150 samples of AFEC were analyzed and phylogrouped using quadruplex PCR method. Among the APEC samples, it was determined that 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, 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. It is known that the use of terrestrial strains in vaccines to be developed in order to prevent *E. coli* infections and the properties of these strains should be determined. The results obtained for this reason are of epidemiological importance. 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.

Giriş

Kanatlı hayvanlarda, *Escherichia coli* suşları, kanatlı sektöründe bağırsak dışı enfeksiyonlara (ekstraintestinal) veya bağırsak enfeksiyonlarına (intestinal) yol açarak ciddi ekonomik kayıplara neden olabilmektedir [4, 10]. Kanatlılarda, bağırsak enfeksiyonlarına neden olan ve dışkıdan izole edilen, fekal, fakültatif patojen *E. coli* suşları avian fekal *E. coli* (AFEC) olarak isimlendirilmektedir. Avian patojenik *E. coli* (APEC) suşları ise, kommensal olarak, sağlıklı hayvanların bağırsak florasında bu-

lunan bakteriler olup, vücudun çeşitli organ ve sistemlerine yerleşerek ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olmaktadır [4].

Diğer hayvanlarda ise, bağırsak enfeksiyonlarına neden olan intestinal *E. coli* suşlarının ortak adı, ishal yapan (Diyarejenik) *E. coli* (DEC)'dir. Barsak patotipleri ise, enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteropatogenik *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.*

*Bu makale ilk yazarın yüksek lisans tezinden hazırlanmıştır.

Yazışma adresi / Correspondence: H. Kaan Müştak, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Dışkapı, Ankara E-posta: kaanmustak@gmail.com

coli (DAEC)'dir. Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC)'ler kommensal olarak, sağlıklı hayvanların bağırsak florasında yer alır. Bu bakteri grubunda septisemik patojenik *E. coli* (SEPEC), üropatojenik *E. coli* (UPEC), meme patojenik *E. coli* (MPEC) ve rahim enfeksiyonlarına neden olan endometriyal patojenik *E. coli* (EnPEC) bulunur [4].

Escherichia coli patotipleri ile yapılan karşılaştırmalı genomik analizler ve epidemiyolojik çalışmalar *E. coli*'nin genetik yapısını ortaya çıkarmış ve *E. coli* içerisinde genotipik olarak farklı filogrupların varlığına işaret ederek bu türde geniş bir alt-yapının var olduğunu göstermiştir [6, 11]. Yapılan çalışmalara göre, *E. coli* suşları, 4 ana filogenetik gruptan birine girmektedir. Bunlar A, B₁, B₂ ve D'dir. Bu dört filogrubun birbirinden farklılaştığı fenotipik özellikler ise farklı şekerleri metabolize etme yeteneği, antibiyotik direnç profilleri ve büyüme hızı-sıcaklık ilişkisidir. Ekstraintestinal patojenik suşlar genellikle B₂ ve D; kommensal suşlar ise A ve B₁ gruplarında yer almaktadır. *Escherichia coli* popülasyonlarının filogenetik analizlerinde ayırım gücünü artırmak için çeşitli genetik markerlar ile A₀, A₁, B₁, B₂, B₃, D₁ ve D₂ altgrupları oluşturulmuştur [1, 2].

Filogenetik grupların (A, B₁, B₂ ve D) belirlenmesi için *chuA* ve *yjaA* genleri ile TspE4C2 DNA fragmentinin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli yöntem kullanılmaktadır. 2013 yılında geliştirilen ve *arpA* geni de eklenerek yapılan kuadrupleks PCR tabanlı filogrup belirleme metoduyla 8 filogrup (A, B₁, B₂, C, D, E, F ve *E. coli* klan 1) belirlenebilmiştir. Bu yöntemle belirlenen yeni gruplar içerisinde yer alan Grup C, B₁ grubu ile yakın ilişkili olmasına rağmen farklı genotipte suşları da içermektedir. Grup E, eskiden sınıflandırılmamış suşları içeren yeni bir grup olarak tanımlanmış, grup F, B₂'nin kardeş grubu olarak belirlenmiştir. *Escherichia* Clade I ise fenotipik olarak *E. coli*'den ayırt edilemeyen ancak genotipik olarak farklı bir filogrup olarak tanımlanmıştır [1, 2]. Clermont ve ark. [2], filogruplandırma sonucunda herhangi bir gruba girmeyen *E. coli* suşlarını "gruplandırılmayan" şeklinde gruplandırmış ve bu suşlara MLST (Multilocus sequence typing) yapılmasını önermişlerdir.

Filogruplandırma, *E. coli* suşlarının özelliklerinin belirlenmesi suretiyle enfeksiyonların önlen-

mesi, kontrol edilmesi ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır [2]. Bu çalışmada, kanatlı kökenli *E. coli* (APEC ve AFEC) suşlarının filogruplandırılması ve elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metot

Kullanılan Suşlar

Bu çalışmada, 2015-2017 yılları arasında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kanatlı Hayvan Hastalıkları Laboratuvarına gönderilmiş olan *E. coli* şüpheli, septisemi sonucu ölen tavuklara ait iç organlardan (kalp, karaciğer, dalak) izole ve identifiye edilen 150 APEC suşu kullanıldı. Bununla birlikte, 150 AFEC suşu ise, yine aynı yıllar arasında aynı kümeslerden gelmiş olan altlık ve dışkı örneklerinden izole ve identifiye edildi (Tablo 1). İzole ve identifiye edilen *E. coli* suşları daha sonra kullanılmak amacıyla %20 gliserin ilave edilmiş TSB (Merck, Almanya)'de süspanse edilerek -80°C'de saklandı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji 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.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan suş sayıları ve bu suşların örneklenen organlara göre dağılımı.

Organ	APEC	AFEC	Toplam
Kalp	53	-	53
Karaciğer	56	-	56
Dalak	41	-	41
Altlık	-	68	68
Dışkı	-	82	82
Toplam	150	150	300

Escherichia coli Filogruplarının Belirlenmesi

Bu çalışmada, kanatlı kökenli *E. coli*'lerin filogruplandırılması amacı ile Clermont ve ark. [2]'nin uyguladığı kuadrupleks PCR yöntemi kullanıldı. Bu amaçla, Thermo Scientific GeneJET Genomik

DNA Purification Kiti ile DNA ekstraksiyonu yapılan 300 *E. coli* suşuna ait DNA'da bulunan gen bölgeleri Tablo 2'de gösterilen primerler ile çoğaltıldı. Reaksiyon, her primerden 0.2 µM, 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 içerisinde gerçekleştirildi. Amplifikasyon için

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 uygulandı [2]. Agaroz jel elektroforez sonucu elde edilen bant görüntüleri Biyo-görüntüleme sistemi (Syngene) kullanılarak değerlendirildi.

Tablo 2. Kuadrupleks PCR için kullanılan primelerin dizileri, bağlandıkları spesifik gen bölgeleri ve PCR ürünlerinin uzunlukları [2].

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	<i>TspE4C2</i>	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152
	TspE4C2.2b		AGTTTATCGCTGCGGGTTCGC	
	AceK.f	<i>arpA</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400
ArpA1.r		TCTCCCCATAACCGTACGCTA		
Grup E	ArpAgpE.f	<i>arpA</i>	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	301
	ArpAgpE.r		GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	
Grup C	trpAgpC.1	<i>trpA</i>	AGTTTTATGCCAGTGCGAG	219
	trpAgpC.2		TCTGCGCCGGTACGCCC	
Internal Kontrol	trpBA.f	<i>trpA</i>	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489
	trpBA.r		GCAACGCGGCCTGGCGGAAG	

Grup A, C, B₁, B₂, D, E, Clade I ve F gruplarının belirlenmesinde *chuA*, *yjaA* ve *arpA* genleri ile TSPE4C2 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 tekli 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 yönteminin kontrolü için internal kontrol kullanıldı [2].

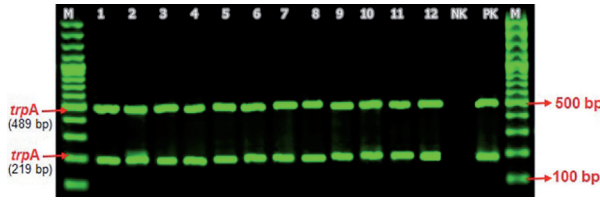
Bulgular

İzole edilen *E. coli* suşlarında *arpA*, *chuA*, *yjaA*, TspE4.C2 (kuadrupleks PCR) ve *arpA*, *trpA*, (Grup

C ve E) genlerinin varlığı araştırıldı. Bu genlerin bulunup bulunmamasına göre *E. coli* suşlarının filogruplandırılması yapıldı (Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3).



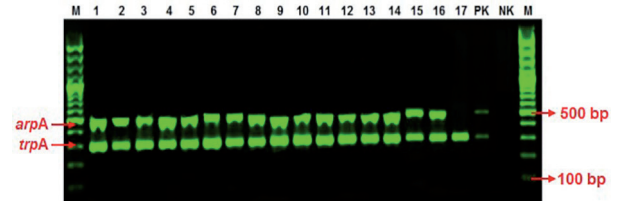
Şekil 1. Kuadrupleks PCR jel elektroforez görüntüsü. *arpA* (400 bp), *chuA* (288 bp), *yjaA* (211 bp) ve TspE4.C2 (152 bp) genleri. 1-2, A pozitif örnekler (+,-,-,-); 3-9, B₁ pozitif örnekler (+,-,-,+); 10-14, B₂ pozitif örnekler (-,+,+/-,+,-,+,-); 15-18, F pozitif örnekler (-,+,-,-); M, moleküler marker;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

İncelen 150 APEC suşunu 4'ü A (%2,66), 43'ü B₁ (%28,66), 38'i B₂ (%25,33), 2'i C (%1,33), 18'i E (%12), 5'i F (%3,33), 1'i Clade I (%0,66), 2'si negatif (%1,33) olarak belirlendi. Geriye kalan 37 örnek ise gruplandırılmadı (Tablo 3). İncelenen 150

APEC suşunun ise 5'i A (%3,33), 8'i B₁ (%5,33), 16'sı B₂ (%10,66), 16'sı C (%10,66), 1'i D (%0,66), 27'si E (%18,00), 9'u F (%6,00), 3'ü Clade I veya Clade II (%2,00) olarak belirlendi. Geriye kalan 51 örnek ise belirlenmiş bir gruba girmedi (Tablo 3).



Şekil 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.

Tablo 3. APEC ve AFEC suşların filogruplandırılma sonuçları.

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 Sayı (%)	AFEC 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)	-

Tartışma ve Sonuç

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 [10]. Filogruplandırma ise *E. coli* suşlarının genotipik olarak sınıflandırılmasında kullanılan ve bu sayede

E. coli'lerin özelliklerinin anlaşılması ile enfeksiyonların önlenmesi, kontrol edilmesi ve yeni tedavi yöntemlerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

Ekstraintestinal *E. coli* enfeksiyonlarından sorumlu olduğu bilinen B₂ ve D gruplarının [9], kommensal olan A veya B₁ grupları ile karşılaştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır [5, 8]. Fernanda ve ark. [3]'nin 149 APEC suşunu Clermont ve ark. [1]'nin metoduna göre filogruplandıkları çalışmalarında 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 çalışmada da benzer sayıda (n: 150) APEC suşu araştırılmış olup, Fernanda ve ark. [3]'nin yaptığı çalışmaya göre, B₁ (%28,66) ve F (%3,33) grupları yönünden benzer, ancak A (%2,66), B₂ (%25,33), D (%0,00) ve E (%12,00) grupları yönünden farklı sonuçlar gözlemlendi. Buna göre B₂ ve E grupları daha yüksek, A grubu düşük oranda belirlenirken D grubu tespit edilemedi. Kümes için APEC kontrol programlarındaki farklılıklar veya tavuk yetiştiriciliği için alınan ülkesel önlemler bazı kümeslerde patojen bazı ülkelerde ise kommensal APEC suşlarının baskın olduğunu göstermektedir [3, 5, 8]. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, incelenen APEC'lerin içerisinde kommensal suşlar kadar ekstraintestinal suşların da bulunduğunu ve patojen suş sayısının azaltılması yönünde gerekli biyogüvenlik önlemlerinin alınması gerektiğini gösterdi. Buradan çıkarılan diğer bir sonuç ise APEC'lere ilişkin koruma programlarının geliştirilmesinde yapılacak araştırmalarda filogruplandırma yönteminin de kullanılmasının uygun olacağı yönünde oldu.

Logue ve ark. [7], 452 adet APEC ve 199 adet AFEC suşunu tripleks PCR ile filogruplandıkları çalışmalarında [2] 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 oranlarında bildirmişlerdir. Aynı örnekleri kuadrupleks PCR metoduna göre [1] 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 gruplandırılmayanları %0,22 oranında; AFEC suşlarını ise 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 oranında belirlerken gruplandırılmayan grubunda AFEC suşu bulamamışlardır. Bu

çalışmanın sonucunda bulunan APEC ve AFEC, F ve E yoğunluğu ile Logue ve ark. [7]'nin çalışmasından elde ettikleri sonuçlara benzerlik gösterirken, herhangi bir filogruba dahil olmayan (gruplandırılmayan) suş sayısı daha yüksek oranda (APEC %24,66, AFEC %34,00) bulundu. Ayrıca APEC suşları içinde F grubu (% 3,33) daha düşük ve AFEC suşları içinde E grubu (%18,00) daha yüksek oranda bulundu. Bu farklılıkların, bölgesel suşlara ait genotipik farklılıklardan dolayı olduğu düşünüldü. Bu durum aşı uygulamalarında bölgesel suş seçiminin önemini bir kez daha ortaya koymuştur. Ayrıca bu çalışmada AFEC suşlarının filogruplandırılması sonucunda ekstraintestinal patojen suşları içeren B₂ grubu %10,66 oranında bulundu. Gerek bu çalışmada elde edilen sonuçlar, gerekse Logue ve ark. [7]'nin yaptıkları çalışmada AFEC suşları arasında dikkate değer oranda ekstraintestinal *E. coli* suşunun varlığı gösterilerek elde edilen sonuçların diğer çalışmalar ile uyumlu olduğu tespit edildi.

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 yerel suşların kullanılarak bu suşlara ait özelliklerin de belirlenmesinin gerektiği anlaşıldı.

Escherichia coli enfeksiyonları, dünyanın her yerinde ve 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 çalışmada elde edilen sonuçlar, AFEC suşları arasında patojen ekstraintestinal suşların yüksek oranda bulunduğunu gösterdi. Bu sonuç APEC suşlarının kökeninin kümes materyali olabileceği veya dışkıyla çıkartılan APEC suşlarının çevrede bulunarak diğer hayvanlara bulaşmada önemli olabileceğini gösterdi. Çalışmamızda 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.

Kaynaklar

1. Clermont O, Stephane B, Edouard B, (2000). *Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group*. Applied Environ Microbiol. 4555-4558.
2. Clermont O, Julia KC, Erick D, David MG, (2013). *The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups*. Environ Microbiol Rep. 5(1), 58-65.
3. 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*. Sci World J. 4 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/258424>.
4. Gyles CL, Fairbrother JM, (2010). *Escherichia coli*. Carlton LG, John FP, Glenn S, Charles OT. eds. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Fourth edition. Blackwell Publishing, Hoboken, New Jersey, ABD. p. 267 – 307.
5. 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.
6. Köhler CD, Dobrindt U, (2011). *What defines extraintestinal pathogenic Escherichia coli?* Int J Med Microbiol. 301, 642-647.
7. 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.
8. Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, Elion J, Denamur E, (1999). *The link between phylogeny and virulence in Escherichia coli extra-intestinal infection*. Infect Immun. 67, 546–553.
9. 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. 10(6), 584-591.
10. Rasidbegovic E, Kavazovic A, (2008). *Gljivične i bakterijske bolesti ptica*. Veterinarski fakultet, Sarajevo univerzitet, Bosna i Hercegovina. p: 73-86.
11. Whittam TS, Ochman H, Selander RK, (1983). *Geographic components of linkage disequilibrium in natural populations of Escherichia coli*. Mol Biol Evol, 1, 67–83.