

Wistar ırkı ratlardan izole edilen *Escherichia coli*'lerin filogenetik analizi

H. Kaan MÜŞTAK¹, Ebru TORUN¹, İnci Başak KAYA¹, Elif Ergüven KAYA², Şeyda DİKER²,
Elvan ANADOL², Elçin GÜNAYDIN³

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

²Gazi Üniversitesi, Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi, Ankara

³Etlık Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü, Yetiştirme Hastalıkları Teşhis Laboratuvarı, Ankara

Geliş Tarihi / Received: 28.11.2013, Kabul Tarihi / Accepted: 27.12.2013

Özet: Doğal ortamlarında yaşayan ratlardan (*Rattus* spp.), insanlara ve duyarlı hayvanlara birçok hastalık etkeninin geçtiği bilinmektedir. İnsanlarda önemli sistemik hastalıklara yol açan ve diğer memeli hayvanlar gibi ratların da doğal konakçısı olduğu bilinen *Escherichia coli* (*E.coli*), önemli bir zoonotik etkidir. Ancak laboratuvar hayvanı olarak kullanılan ratlar ile ilgili özellikle ülkemizde yeterli veri bulunmamaktadır. Diğer hayvan türlerinde olduğu gibi laboratuvar ortamında yetiştirilen ratlardan da izole edilen *E.coli*'lerin genotipik ve fenotipik özelliklerinin bilinmesi, *E.coli* kökenli enfeksiyonların önlenmesinde önemlidir. Bu çalışmada, deney hayvanı olarak kullanılan Wistar ırkı ratlardan elde edilen fekal örneklerde *E.coli* varlığı ve izole edilen *E.coli*'lerin dahil oldukları filogenetik gruplar araştırılmıştır. Bu amaçla, 112 rattan toplanan dışkıdan klasik kültür yöntemiyle izole edilen 61 *E.coli* suşuna, chuA, yjaA, arpA ve trpA genlerine ve TspE4.C2 DNA fragmentine, spesifik primerlerin kullanıldığı PCR yöntemi uygulandı. Elde edilen sonuçlara göre 43/61 (%70.4) suş B1 grubuna (kommensal), 18/61 (%29.5) suş ise B2 grubuna (ekstraintestinal) dahil olarak bulundu. Yapılan bu çalışma ile Türkiye'de ilk kez ratlardan izole edilen *E.coli*'lerin filogrup analizleri yapılarak, ağırlıklı olarak B1 grubunda yer aldıkları ve kommensal özellikte oldukları saptandı.

Anahtar kelimeler: *E.coli*, filogenetik analiz, Wistar rat

Phylogeny of *Escherichia coli* isolated from Wistar rats

Abstract: It is already known that several bacterial agents can be transmitted from rats (*Rattus* spp.) that live in natural habitats to human beings and susceptible animals. *Escherichia coli* (*E.coli*) which cause systemic diseases in humans and naturally found in rats like other mammals are important zoonotic agents. Nevertheless, there are few reports on rats which are used as laboratory animal. Like other animal species, it is important to know phenotypic and genotypic features of *E.coli* isolated from laboratory animals in order to prevent infections due to *E.coli*. In this study the presence of *E.coli* isolated from faeces of Wistar rats and the phylogeny of these strains were investigated. For this purpose, 61 *E.coli* strains isolated from faeces of 112 rats were investigated for the presence of chuA, yjaA, arpA and trpA genes and a DNA fragment known as TspE4.C2, by PCR. The results showed that 43/61 (70.4%) and 18/61 (29.5%) strains belong to B1 (commensal) and B2 (extraintestinal) groups, respectively. For the first time in this study *E.coli* isolated from rats were phylogrouped, assigned as B1 group and designated as commensal *E.coli* in Turkey.

Key words: *E.coli*, phylogenetic analysis, Wistar rat

Giriş

Ratlar (*Rattus* spp.) tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de laboratuvar hayvanı olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar. Doğal ortamlarında ve laboratuvar koşullarında yaşayan ratlarda klinik olarak hastalık tablosu gözlenirse de, ratların birçok zoonotik hastalık etkeninin doğal konağı olduğu (*Salmonella* serotipleri, *Yersinia pestis*, *Leptospira* spp., *Helicobacter* spp., *Mycoplasma* spp. ve *Escherichia coli*), insanlara ve duyarlı hayvanlara

bu hastalıkların geçerek enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir [1]. Laboratuvar ratlarında bu etkenlerin bulunması, özellikle bu hayvanlarla çalışan personelin taşıdığı risk açısından önemlidir [5,10]. *Escherichia coli* (*E.coli*) insanlar ve ratların da dahil olduğu pek çok hayvanın gastrointestinal sisteminin normal florasının bir üyesidir [3]. Hayvanların doğumlarından sonra gastrointestinal sistemlerinde kolonize olur ve hayvanların yaşamı boyunca gastrointestinal sistem florasında kalır [7]. Birçok

E.coli suşu bağırsak mukozasına penetre olmadığı sürece konakta kommensal olarak bulunabilmektedir [7,11]. Fakat patojen özellik gösteren bazı *E.coli* suşları insan ve hayvanlarda, başta diyare olmak üzere çeşitli intestinal enfeksiyonlar ile üriner sistem enfeksiyonları, meningitis, septisemi gibi ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olabilmektedir [3]. Patojen *E.coli* suşları zoonotik özellikte olup, insanlara, çeşitli evcil ve yabani hayvanların dışkıları ile direkt temas veya kontamine gıdaların tüketilmesi sonucu bulaşabilmektedir. Bu sebepten, taşıyıcı veya hasta hayvanlarla temas halindeki insanlar muhtemel risk altındadır [6,11]. Ancak laboratuvar hayvanı olarak kullanılan ratlar ile ilgili özellikle ülkemizde yeterli veri bulunmamaktadır.

Diğer hayvan türlerinde olduğu gibi laboratuvar ortamında yetiştirilen ratlardan da izole edilen *E.coli*'lerin genotipik ve fenotipik özelliklerinin bilinmesi, *E.coli* kökenli enfeksiyonların önlenmesinde önemlidir. 1980'lerden günümüze kadar yapılan çalışmalar, *E.coli* suşlarının çeşitli genetik alt yapılara sahip olduğunu ve bu alt yapılara göre filogenetik sınıflara ayrıldıklarını göstermiştir [4]. İlk filogenetik sınıflandırma, multi-lokus enzim elektroforez (MLEE) yöntemi ile yapılan çalışmalar sonrasında, *E.coli* suşlarının A, B1, B2, C, D ve E ile gösterilen altı ana filogenetik gruba ayrılması ile ortaya çıkmıştır. Daha sonrasında yapılan analizler sonucunda ise *E.coli* suşlarının dört ana filogenetik grupta toplandığı (A, B1, B2 ve D) görülmüştür. Sınıflandırılmayan suşlar ise E grubunda dahil edilmiştir [2,3]. Bununla beraber, ekstraintestinal enfeksiyondan sorumlu suşların daha çok B2 ve D grubuna ait olduğu, birçok kommensal suşun ise B1 ve A grubuna ait olduğunu gösterilmiştir. Bu çalışmalar çeşitli filogruplardaki suşların fenotipik ve genotipik özelliklerindeki farklılık ve hastalık oluşturma yetenekleri üzerine bilgi edinmemizi sağlamaktadır [3,4]. Bununla beraber 2000'lerden sonra *E.coli*'ye ait multi-lokus sekans tiplendirme (MLST) ve tüm genom sekans verilerinin çoğaltılması ile filogruplar tekrar incelenmiş ve *E.coli*'ye ait yedi filogrup (A, B1, B2, C, D, E, F) ve *Escherichia* cinsine ait bir filogrup (*Escherichia* clade I) olmak üzere sekiz filogrup tanımlanmıştır. *Escherichia* clade 1 filogrubunun ise, *E.coli*'den fenotipik olarak ayırt edilmesi olanaksız olan fakat genetik olarak ayrılabilen *Escherichia*'nın yeni türlerinin içene almasından dolayı *E.coli*'nin bir filogrubu olarak dikkate alınması gerektiği ortaya konmuştur [4].

Bu çalışmada, deney hayvanı olarak kullanılan Wistar ırkı ratlardan elde edilen fekal örneklerde *E.coli* varlığı ve izole edilen *E.coli*'lerin dahil oldukları filogenetik grupların belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bakteriyel İzolasyon: Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi, Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi, Ankara'da kontrollü şartlarda ve kafes ortamında barındırılan 112 adet rattan toplanan dışkı örnekleri *E.coli* varlığı yönünden araştırıldı. Cary-Blair Transport Medium (Oxoid; CM0519) içeren steril plastik kaplara her bir rattan alınan 1 gr sabah dışkısı, %5 koyun kanı eklenmiş Kanlı Agar (Oxoid; CM0271), MacConkey Agar (Oxoid; CM0007) ve Eosin Methylene Blue Agar (Oxoid; CM0069)'da, 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, şüpheli üç dört koloni alınarak Gram boyama ve standart biyokimyasal testler yapıldı [11]. Filogrupların belirlenmesinde kullanılmak üzere tüm *E.coli* izolatları %20 gliserol eklenmiş Brain Heart Infusion Broth (Oxoid; CM1135)'da -80°C'de saklandı. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Dalı'na ait suş koleksiyonundan alınan *E.coli* AVMC92-35 suşu pozitif kontrol olarak tüm testlerde kullanıldı.

***Escherichia coli* suşlarının filogruplandırılması:** İdentifiye edilen *E.coli*'lerden DNA ekstraksiyonu için kit kullanım talimatlarına uygun olarak DNA izolasyon kiti (QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen, Cat no: 51104) kullanıldı. İzole edilen DNA'ya, Clermont ve ark. (2013)'nin metoduna göre quadruplex PCR yöntemi uygulanarak *E.coli* suşlarının filogrup analizi gerçekleştirildi [4]. Buna göre, her primerden 0.2 µM (Tablo 1), 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. Amplifikasyon koşulları: 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takip eden 30 siklus, denatürasyon 94°C'de 10 sn, bağlanma 59°C'de (group E için 57°C) 20 sn, uzama 72°C'de 10 sn ve 72°C'de 5 dk son uzama aşaması olarak uygulandı. Amplifiye olan ürünler, UV altında %1.5 agaroz (Prona, EU) jel elektroforezi sonucu görüntüledi. Quadruplex PCR sonuçları, genetik belirleyiciler olan chuA, yjaA ve arpA genleri ile TSPE4.C2 DNA fragmanın

var ve/veya yok olma durumuna göre değerlendirildi. Grup E ve grup C'nin belirlenmesinde sırasıyla, ArpAgpE.f, ArpAgpE.r ile trpAgpC.1, trpAgpC.2

primer dizileri kullanıldı (Tablo 1) [9]. Aynı zamanda, grup E ve C'nin belirlenmesinde internal kontrol kullanıldı [4].

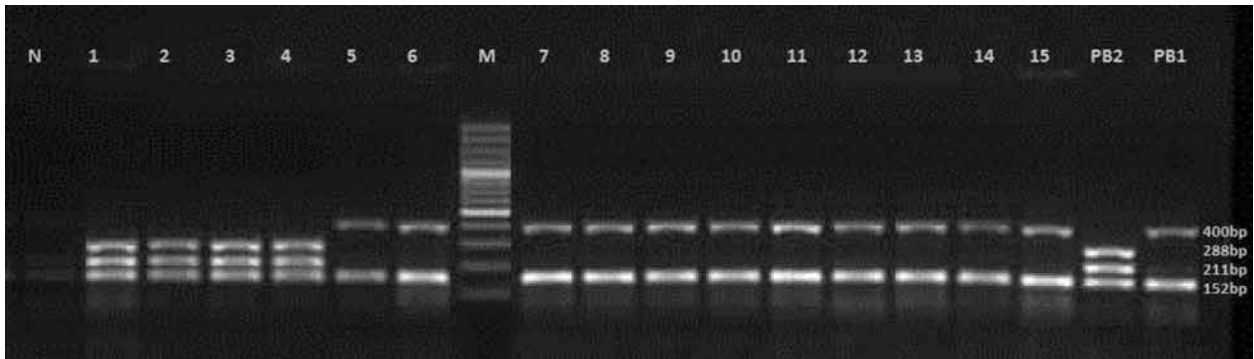
Tablo 1. Hedef gen bölgeleri, uygulanan metot, primer sekansları ve PCR ürün büyüklüğü.

| Metod | Primer | Gen | Sekans | PCR ürünü (bp) |
|-----------------|------------|-------------|--------------------------|----------------|
| Quadruplex | chuA.1b | <i>chuA</i> | ATGGTACCGGACGAACCAAC | 288 |
| | chuA.2 | | TGCCGCCAGTACCAAAGACA | |
| | yjaA.1b | <i>yjaA</i> | CAAACGTGAAGTGTCAGGAG | 211 |
| | yjaA.2b | | AATGCGTTCCTCAACCTGTG | |
| | TspE4C2.1b | TspE4.C2 | CACTATTTCGTAAGGTCATCC | 152 |
| | TspE4C2.2b | | AGTTTATCGCTGCGGGTCGC | |
| | AceK.f | <i>arpa</i> | AACGCTATTCGCCAGCTTGC | 400 |
| | ArpA1.r | | TCTCCCCATACCGTACGCTA | |
| Group E | ArpAgpE.f | <i>arpa</i> | GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC | 301 |
| | ArpAgpE.r | | GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG | |
| Group C | trpAgpC.1 | <i>trpA</i> | AGTTTTATGCCAGTGCAG | 219 |
| | trpAgpC.2 | | TCTGCGCCGGTCACGCC | |
| Internalcontrol | trpBA.f | <i>trpA</i> | CGGCGATAAAGACATCTTCAC | 489 |
| | trpBA.r | | GCAACGCGGCCTGGCGGAAG | |

Bulgular

Laboratuvar hayvanı olarak yetiştirilen 112 rattan toplanan dışkılarından klasik kültür yöntemi ile 61 (%54.4) *E.coli* şusu izole edildi. Elde edilen quad-

ruplex PCR sonuçlarına göre; 43/61 (%70.4) suş B1 grubuna (kommensal), 18/61 (%29.5) suş ise B2 grubuna (ekstraintestinal) dahil olarak bulundu (Şekil 1).



Şekil 1. Agaroz jel elektroforez sonucu. N, negatif kontrol; M, Moleküler marker (100-1500 bp); PB2, B2 pozitif kontrol; PB1, B1 pozitif kontrol; 1-4, B2 pozitif örnekler (152, 211, 288 bp); 5-15 B1 pozitif örnekler (152, 400 bp).

Tartışma ve Sonuç

Escherichia coli bütün sıcakkanlı hayvanların gastrointestinal sistemlerinde bulunan ve gıda kaynaklı enteritislere birçok ekstraintestinal hastalığa ka-

dar değişen enfeksiyonların etiyolojisinde yer alan zoonotik bir bakteri türüdür. Diyareye neden olan *E.coli*'ler virulens özelliklerine, patojenite mekanizmalarına ve klinik semptomlarına göre entero-

toksijenik *E.coli* (EPEC), enteropatojenik *E.coli* (EPEC), enteroaggregative *E.coli* (EAaggEC), enteroinvasive *E.coli* (EIEC), enterohemorragik *E.coli* (EHEC) ve Shiga (Vero) toksin üreten *E.coli* (STEC/VTEC)'ler olmak üzere 5 temel patogru-ba ayrılmaktadır [8,12]. Son yıllarda yapılan çalışmalar hayvan kökenli *E.coli*'lerin üriner sistem enfeksiyonları gibi ekstraintestinal enfeksiyonlardan sorumlu olduklarını ortaya koymuşlardır [8]. Hayvanlarda ve insanlarda çok çeşitli enfeksiyonlara neden olduğu bilinen *E.coli*'lerin fenotipik ve genotipik özelliklerinin bilinmesi enfeksiyonların önlenmesinde ve tedavisinde önem taşımaktadır. Bu çalışmada son yıllarda hastalık modelleme ve enfeksiyon patogenezi gibi çeşitli denemelerde kullanımı artan rat dışkılarında *E.coli* prevalansının belirlenmesi ve izole edilen *E.coli*'lerin filogrup analize göre sınıflandırmalarının yapılması amaçlandı.

Bu çalışmada 112 adet rattan toplanan dışkıdan %54.4 (61/112)'luk izolasyon oranı elde edilmiştir. Elde edilen quadruplex PCR sonuçlarına göre 43/61 (%70.4) suşun B1 grubuna (kommensal), 18/61 (%29.5) suşun ise B2 grubuna (ekstraintestinal) dahil oldukları anlaşılmıştır. Daha önce birçok hayvan türünden izole edilen *E.coli*'ler ile ilgili filogruplandırma çalışmaları yapılmış olmasına rağmen deney hayvanı olarak kullanılan ratlarda ilk kez bu çalışma ile filogruplandırma yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre izole edilen *E.coli*'lerin çoğunlukla patojen olmayan kommensal B1 grubuna dahil oldukları saptanmıştır.

Laboratuvar hayvanı olarak kullanılan ratlar ile ilgili özellikle ülkemizde yeterli veri bulunmamaktadır. Ülkemizde laboratuvar hayvanı kullanımının arttığı düşünüldüğünde, bu hayvanlar ile çalışan personelin içinde bulunduğu riskin bilinmesi gerekmektedir. Diğer hayvan türlerinde olduğu gibi laboratuvar ratlarından da izole edilen *E.coli*'lerin genotipik ve fenotipik özelliklerinin bilinmesi, *E.coli* kökenli enfeksiyonların önlenmesinde önemlidir. Yapılan bu çalışma ile ratlardan izole edilen

E.coli'lerin filotiplendirmeleri, Türkiye'de ilk kez yapılarak, ağırlıklı olarak B1 grubunda yer aldıkları ve kommensal özellikte oldukları saptandı.

Kaynaklar

1. **Baker DG**, (1998). *Natural Pathogens of Laboratory Mice, Rats, and Rabbits and Their Effects on Research*. Clin Microbiol Rev. 11, 231-266.
2. **Chaudhuri RR, Henderson IR**, (2012). *The evolution of the Escherichiacoli phylogeny*. Infect Genet Evol. 12, 214-226.
3. **Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E**, (2000). *Rapid and Simple Determination of the Escherichiacoli Phylogenetic Group*. Appl Environ Microbiol. 66, 4555-4558.
4. **Clermont O, Christenson J K, Denamur E, Gordon D M**, (2013). *The Clermont Escherichiacoli phylo-typing method revised: improvement of specificity and detection of new phylo-groups*. Environ Microbiol Rep. 5, 58-65.
5. **Fox JG, Lipman NS**, (1991). *Infections transmitted by large and small laboratory animals*. Infect Dis Clin North Am. 5, 131-63.
6. **Gülhan T, İlhan Z, Aksakal A, Solmaz H, Ekin İH**, (2009). *Hayvan Orijinli Escherichiacoli Suşlarının Enterotoksin Tiplerinin (LT, ST) Belirlenmesi*. YYU Vet Fak Derg. 20, 27-31.
7. **Gyles CL, Fairbrother JM**, (2010). *Escherichiacoli İn: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals Fourth Edition Ed.: Gyles C L, Prescott J F, Songer J G, Thoen C O, Blackwell Publishing p: 267-308*
8. **Hammerum AM, Heuer OE**, (2009). *Human health hazards from antimicrobial-resistant Escherichiacoli of animal origin*. Food Safety. 48: 916-21.
9. **Lescat M, Clermont, O, Woerther PL, Glodt J, Dion S, Skurnik D**, (2012). *Commensal Escherichiacoli strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure*. Environ Microbiol Rep. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2012.00374.x.
10. **Livingston RS, Riley LK**, (2003). *Diagnostic testing of mouse and rat colonies for infectious agents*. Lab Anim (NY). 32, 44-51
11. **Quin P J, Carter M E, Markey B, Carter G R**, (1999). *Clinical Veterinary Microbiology*. Elsevier Health Sciences p: 220-225.
12. **Wasteson Y**, (2001). *Zoonotic Escherichiacoli*. Acta Vet Scand Suppl. 95, 79-84.