

Sığır karkas orijinli *Escherichia coli* O157 izolatlarının rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-polimeraz zincir reaksiyonu ile genotiplendirilmesi

Ertan Emek ONUK¹, Gökhan İNAT², Arzu FINDIK³, İnci Ülkü ÇELİKEL⁴, Alper ÇİFTÇİ³

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi ¹Klinik Öncesi Bilimler Bölümü, ²Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, ³Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun; ⁴Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 08.04.2010, Kabul Tarihi / Accepted: 16.06.2010

Özet: Bu çalışma, sığır karkas orijinli 32 adet *Escherichia coli* O157 izolatının iki farklı random primerin (M13 ve ERIC2) kullanıldığı rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) metodu ile genotiplendirilmesi ve farklı primer bağlanma ısılarının (32, 36, 38 ve 40°C) RAPD bant paternleri üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır. İzolatlar M13 primeri ile 7, ERIC2 primeri ile 5 farklı genotip içerisinde dağıldı. Çalışmada kullanılan primer bağlanma ısılarının RAPD bant paternlerinin çeşitliliğini dikkate değer bir şekilde etkilemediği görüldü. Sonuç olarak *E. coli* O157 izolatları arasındaki çeşitliliklerin belirlenmesinde M13 primerinin daha uygun olduğu ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilir olduğu belirlendi.

Anahtar sözcükler: *Escherichia coli* O157, genotiplendirme, primer bağlanma ısı, RAPD-PCR.

Genotyping of beef carcass isolates of *Escherichia coli* O157 by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction

Summary: This study was performed to genotype 32 *E. coli* O157 isolates originating from bovine carcasses by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) methods using two different random primers (M13 and ERIC2) and to evaluate the effect of the different (32, 36, 38 and 40°C) annealing temperatures on RAPD band patterns. Isolates were distributed into 7 and 5 different genotypes using M13 and ERIC2 primers, respectively. It was observed that different annealing temperatures used in this study had not considerable effect on RAPD band variability. In conclusion, it was determined that M13 primer was more convenient to detect genetic variability among *E. coli* O157 isolates and was useful in epidemiological studies.

Key words: *Escherichia coli* O157, genotyping, primer annealing temperature, RAPD-PCR.

Giriş

Escherichia coli türünün birçok üyesi, insan ve hayvanların gastro-intestinal kanalında kommensal olarak bulunmaktadır. Ancak, immun sistemi baskılanmış konakçılarda veya gastro-intestinal bariyerin bozulduğu durumlarda patojenik olmayan *E. coli* suşları bile enfeksiyona neden olabilmektedir (16).

E. coli'nin antijenik yapısı oldukça komplikedir ve özellikle, patojen suşlarda bu yapılar önem taşımaktadır. Geleneksel olarak *E. coli* suşlarının karakterizasyonu O (somatik), K (kapsül) ve H (flagella) antijenlerine göre serotiplendirme esasına dayanarak yapılmaktadır (17). İnsan ve hayvanlarda enterik hastalıklara neden olan patojenik *E. coli* suşları; enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC),

enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), enteroagregatif *E. coli* (EAaggEC) ve diffüzadeziv *E. coli* (DAEC) olarak gruplandırılmaktadır (16, 6). Bunlardan EHEC grubu aynı zamanda verositotoksijenik *E. coli* (VTEC) olarak da bilinmektedir (6).

Verositotoksin üreten *E. coli*'ler insan patojenidir ve insanlarda nonspesifik diyare, hemorajik kolitis (HC) ve hemolitik üremik sendroma (HUS) neden olmaktadır (8, 10). Bu grup içerisinde en yaygın olarak görülen serotip *E. coli* O157'dir (4). İnsanlarda enfeksiyon nedeni olarak ilk sırada kesim sırasında sığır dışkıyla kontamine olmuş etlerin yeterince pişirilmeden tüketilmesi gösterilmektedir. (6, 20) Ayrıca insandan insana temas yoluyla veya kontamine su ile de bulaşmanın olduğu bildirilmektedir (6). VTEC suşları hayvanlarda yaygın bir dağılım göstermekte ve özellikle ruminantların

bu grubun doğal rezervuarı olduğu düşünülmektedir (11).

Shiga toksin üreten *E. coli* O157 suşları arasında ayırım yapmak bu grubun klonal doğası nedeniyle oldukça karmaşıktır (9). Günümüze kadar *E. coli* suşlarının karakterizasyonu ve genotiplendirilmesinde pulsed-field jel elektroforezis (PFGE), ribotiplendirme, faj ile tiplendirme (7), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) amplikonlarının restriksiyon endonükleaz analizi (9) ve sekans analizi (2) gibi çok çeşitli moleküler tabanlı metotlar kullanılmıştır. Bu metotlar ile izolatlar arasındaki farklılıklar ortaya konulabilmesine rağmen maliyetlerinin yüksek olması, yoğun iş gücü ve zaman gerektirmesi gibi nedenler bu metotların kullanımlarını sınırlamaktadır.

RAPD-PCR metodu basit, duyarlı ve nispeten düşük maliyetinden dolayı genetik çeşitlilik/farklılık çalışmalarında uygulanabilen, iyi bilinen (22, 23) ve bakterilerin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan (25) DNA tabanlı bir tekniktir. RAPD metodunun yüksek hıza sahip olması, tiplendirme çalışmalarında ilk gösterge olarak kullanılması gerekliliğini ortaya koymaktadır (19). Bu teknik çok çeşitli patojen mikroorganizmanın moleküler olarak tiplendirilmesinde ve epidemiyolojik çalışmalarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (13, 18). Bu çalışmanın amacı sığır karkaslarından izole edilmiş olan *E. coli* O157 suşlarını RAPD metodu ile genotiplendirmek, aynı seroguruba ait suşlar arasındaki genetik farklılıkları ortaya koymak ve RAPD analizi üzerine primer bağlanma ısısının etkisini belirlemektir.

Materyal ve Metot

Bakteri suşları ve DNA ekstraksiyonu: Çalışmada Samsun ilinde 2 farklı mezbahada kesilen sığırların karkaslarından izole edilmiş ve serotiplendirilmiş olan toplam 32 adet *E. coli* O157 suşu kullanıldı. Suşların DNA ekstraksiyonu kaynatma yöntemiyle yapıldı. İzolatlar Triptik Soy Agar'da 37°C'de 24 saat kültüre edildi. Üreyen saf koloniler, 500 µl steril distile su içeren DNase/RNase free ependorf tüplerinde süspansiyon edildi. Süspansiyonlar 100°C'lik su banyosunda 10 dk bekletildi. Kaynatma sonrasında 9000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra, süpernatantlar DNase/RNase free ependorf tüplerine ak-

tarıldı ve çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

RAPD-PCR ile genotiplendirme: *E. coli* O157 suşlarının RAPD paternlerinin belirlenmesi amacıyla ERIC-2 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') ve M13 (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') primerleri kullanıldı. Amplifikasyon aşaması Versalovic ve ark. (26) tarafından bildirilen metodun modifiye edilmesiyle gerçekleştirildi. Bu aşamada her bir primer için ayrı ayrı olmak üzere DEPC-treated water, 1×PCR Buffer, 2.5 mM Mg-Cl₂, 200 µM her bir dNTP, 2.5U Taq DNA polimeraz, 25 pmol primer ve 5 µl template DNA içeren 25 µl'lik bir RAPD master karışımı oluşturuldu. Bu karışım 94°C'de 5 dk ön denatürasyonu takiben 94°C'de 1 dk denatürasyon, 36°C'de 1 dk primer bağlanma, 72°C'de 3 dk uzama olmak üzere 40 siklus ve 72°C'de 7 dk final uzama koşullarında amplifikasyon işlemine tabi tutuldu. Amplifikasyon ürünleri etidium bromid (2µg/ml) içeren %1.5'lük agaroz jel elektroforezi sonrasında UV transilluminatör ile görüntüledi.

Primer bağlanma ısısının RAPD paternlerin çeşitliliğine olan etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla 32, 36, 38 ve 40°C primer bağlanma ısılarında amplifikasyon siklusu uygulandı.

Oluşan RAPD paternlerinin dendogramları UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) ile CHEF-DR® III, Quantity One® yazılımı (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) kullanılarak çizildi. Suşlar arasındaki genetik ilişki %70 benzerlik katsayısı göz önüne alınarak belirlendi.

Tekrarlanabilirlik: RAPD analizinin tekrarlanabilirliğini değerlendirmek üzere, rastgele 5 suş seçildi ve analizler her iki primer (M13 ve ERIC 2) kullanılarak arka arkaya 3 kez tekrarlandı.

Bulgular

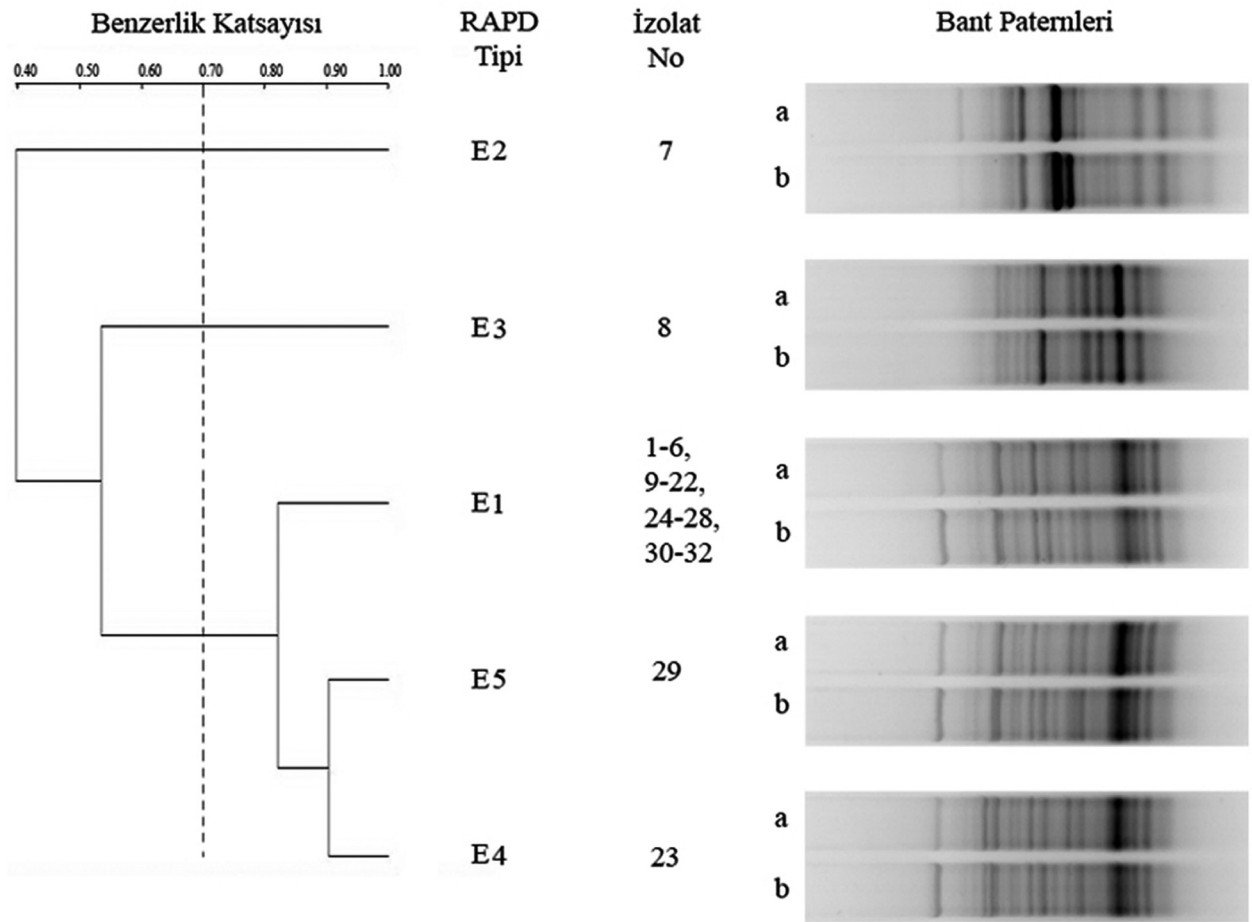
Toplam 32 adet *E. coli* O157 izolatının hem ERIC-2 hem de M13 primerleri ile değişken bant paternleri verdiği saptandı. Amplifikasyon aşamasında farklı primer bağlanma ısılarının (32, 36, 38 ve 40°C) kullanılması ile oluşturulan siklusların, her iki primer ile elde edilen RAPD bant paternlerinin çeşitliliğini dikkate değer bir şekilde etkilemediği belirlendi.

RAPD metodunda ERIC-2 primerinin kullanılması ile beş farklı RAPD bant paterni saptandı (Tip

E1-E5). İzolatlar %70 benzerlik katsayısına göre iki "unique" tip (E2 ve E3 nolu genotip) ve bir küme içerisinde gruplandı. Bu kümenin üç genotip (E1, E5 ve E4 no'lu genotip) içerdiği belirlendi. İzolatların 28 adetinin (%87.5) predominant tip olan E1 genotipine dahil olduğu, diğer genotiplerde ise birer adet izolatın (%3.125) bulunduğu saptandı (Şekil 1). RAPD genotiplerinin %36 ile %90.3 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiği belirlendi (Tablo 1). ERIC-2 primeri ile belirlenen RAPD-PCR tiplerine dahil edilen izolat numaraları Şekil 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. ERIC-2 primerinin kullanıldığı RAPD-PCR'de genetik benzerlik matrisi (benzerlik katsayısı %70).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 100.0 | 38.1 | 48.6 | 84.5 | 79.8 |
| 2 | 38.1 | 100.0 | 46.6 | 36.0 | 37.9 |
| 3 | 48.6 | 46.6 | 100.0 | 55.0 | 56.7 |
| 4 | 84.5 | 36.0 | 55.0 | 100.0 | 90.3 |
| 5 | 79.8 | 37.9 | 56.7 | 90.3 | 100.0 |



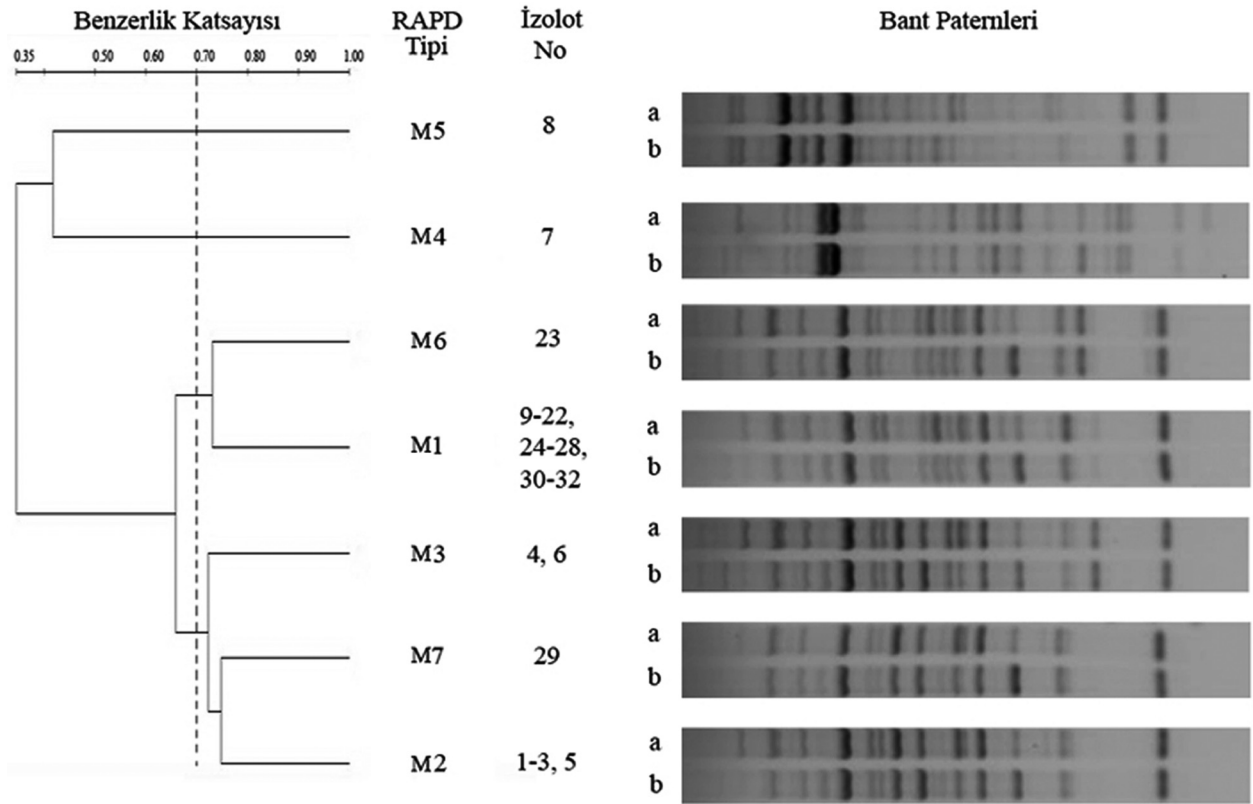
Şekil 1. ERIC-2 primeri ile oluşturulmuş örnek RAPD-PCR paternleri ve bu paternlerden elde edilmiş UPGMA dendrogramı. a: 40°C annealing sıcaklığı kullanılarak elde edilmiş RAPD bantları, b: 32°C annealing sıcaklığı kullanılarak elde edilmiş RAPD bantları.

M13 primeri ile izolatların %22 ile %74.8 arasında değişen oranlarda benzerlik gösteren (Tablo 2) yedi farklı RAPD bant paterni (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7) oluşturduğu belirlendi. İzolatlar %70 benzerlik katsayısına göre iki "unique" tip (M5 ve

M4 no'lu genotipler) ve iki küme içerisinde gruplandı. İlk kümenin, iki genotip (M6 ve M1 no'lu genotipler), ikinci kümenin ise üç genotip (M3, M7 ve M2 no'lu genotip) içerdiği belirlendi (Şekil 2). M13 primeri ile yapılan RAPD-PCR'da M1, predominant

tip olarak belirlendi ve izolatlardan 22 (%68.75), 4 (%12.5) ve 2 (%6.25) adetinin sırasıyla M1, M2 ve M3 no'lu genotipe dahil olduğu M4, M5, M6 ve M7 no'lu genotiplerde ise sadece 1'er (%3.125) adet izolatın bulunduğu belirlendi. M13 primeri ile belirlenen RAPD-PCR tiplerine dahil edilen izolat numaraları Şekil 1'de gösterilmektedir.

Tekrarlanabilirlik: Her iki primerle arka arkaya yapılan 3 RAPD analizi sonunda aynı bant paternleri belirlendi ve tekrarlanabilirlik %100 olarak bulundu.



Şekil 2. M13 primeri ile oluşturulmuş örnek RAPD-PCR paternleri ve bu paternlerden elde edilmiş UPGMA dendogramı. a: 40°C annealing sıcaklığı kullanılarak elde edilmiş RAPD bantları, b: 32°C annealing sıcaklığı kullanılarak elde edilmiş RAPD bantları.

Tartışma ve Sonuç

Önceleri barsak kanalının zararsız bir florası olarak önemsenmeyen *E. coli*, son yıllarda insan ve hayvanlarda hastalığa neden olma yeteneğindeki dikkate değer değişkenliği nedeniyle patojenik bir tür olarak görülmektedir (16). *E. coli* türünün üyeleri insanlarda nonspesifik diyare, HC, HUS, sepsis ve

Tablo 2. M13 primerinin kullanıldığı RAPD-PCR'de genetik benzerlik matrisi (benzerlik katsayısı %70).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 100.0 | 72.6 | 72.8 | 33.8 | 46.8 | 73.1 | 69.0 |
| 2 | 72.6 | 100.0 | 71.1 | 22.1 | 38.2 | 55.7 | 74.8 |
| 3 | 72.8 | 71.1 | 100.0 | 29.4 | 40.5 | 65.6 | 73.5 |
| 4 | 33.8 | 22.1 | 29.4 | 100.0 | 41.8 | 31.8 | 22.0 |
| 5 | 46.8 | 38.2 | 40.5 | 41.8 | 100.0 | 49.5 | 32.1 |
| 6 | 73.1 | 55.7 | 65.6 | 31.8 | 49.5 | 100.0 | 59.6 |
| 7 | 69.0 | 74.8 | 73.5 | 22.0 | 32.1 | 59.6 | 100.0 |

menenjitis gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir (5, 8, 10). İnsanlarda hastalık oluşturan STEC (=VTEC) grubuna ait serotiplerin sayısının artmasına rağmen, *E. coli* O157 serotipi bu gruptaki baskın serotip olmaya devam etmektedir (1).

E. coli O157 ile ilgili epidemiyolojik araştırmalar, çoğu kez basit ve birçok laboratuvara uygulanabilir ayırt edici tiplendirme metodunun eksik-

liğinden dolayı aksamaktadır. Faj tiplendirmesinin kullanışlı olduğu ancak referans laboratuvarlar ile kısıtlı olduğu bildirilmiştir. Son yirmi yıldır, PCR tabanlı genotiplendirme metotları, bakteriyel tiplendirme şemalarında önemli bir rol oynamıştır. Bu PCR tabanlı metotlardan biri olan RAPD-PCR'in kolaylığı ve fazla sayıda izolatuvarın analizinde sağladığı faydadan dolayı kullanışlı bir metot olduğu kanıtlanmıştır (3, 15). Bu teknikte rastgele seçilmiş DNA bölgeleri genellikle 10 nükleotid uzunluğundaki oligonükleotid primerlerin kullanıldığı PCR metodu ile amplifiye edilmektedir (24). Bu tip amplifikasyonda komplike DNA ekstraksiyon ve saflaştırma teknikleri gerekmemektedir. Türlerin kesin nükleotid sekansının bilinmesine de gerek yoktur. Bu tiplendirme metodu, çoklu yanlış eşleşmelere izin verecek düşük ısı aralıklarında hedef sekansa primer bağlanması temeline dayanmaktadır (25).

Günümüze kadar çeşitli kaynaklardan izole edilmiş *E. coli* O157 suşlarının RAPD-PCR ile genotiplendirilmesine ve moleküler karakterizasyonuna ilişkin çeşitli araştırmalar yapılmıştır (12, 21). Bununla birlikte Türkiye'de *E. coli* O157 suşlarının RAPD-PCR analizine ilişkin bilgiye rastlanmamıştır. Çeşitli kaynaklardan izole edilen *E. coli* O157 suşlarının RAPD-PCR ile tiplendirilmesinde, 1247, 1290 (9), M13, ERIC-1, ERIC-2 (3), DAF4 (27) gibi çeşitli primerler kullanılmıştır. Bu çalışmada ise ERIC-2 ve M13 primerleri kullanılarak, sığır karkas orijinli *E. coli* O157 izolatlarının RAPD paternleri belirlendi.

Tutenel ve ark. (21)'nin yaptığı bir çalışmada, 25 adet sığır karkasından izole edilen ve ayrıca biri domuz karkasından ve biri de sığır kıymasından izole edilen toplam 27 adet *E. coli* O157 suşu, ready-to-go-RAPD analiz primeri kullanılarak tiplendirilmiş ve %77.36 benzerlik düzeyinde 6 farklı RAPD paterni belirlenmiştir. Birch ve ark. (3) tarafından yapılan ve *E. coli* izolatlarının RAPD ile genotiplendirildiği çalışmada ise, kullanılan 6 farklı primerden sadece ikisinin (M13 ve 970-11) kullanışlı olduğu ve M13 ile 5 RAPD tipi belirlendiği, ERIC-2 primerinin de dahil olduğu diğer 3 primerin identik bant paternleri verdiği, birinin ise sadece 2 patern oluşturduğu bildirilmiştir. Bu araştırmacılar RAPD tiplerini %95 benzerlik düzeyinde değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada, M13 ve ERIC-2 primerleri ile gerçekleştirilen RAPD analizleri sonunda sırasıyla 5 ve 7 farklı RAPD paterni %70 benzerlik düzeyi

esas alınarak belirlendi. Birch ve ark. (3)'nin bildirdiği bulgular ile bu çalışmanın bulguları arasındaki farklılığın, temel alınan benzerlik eşik değerlerindeki farklılık ile suşlar arası çeşitlilik farklılıklarından kaynaklanmış olabileceği düşünüldü.

Vogel ve ark. (27), *E. coli* suşlarının epidemiyolojik olarak tiplendirmesinde RAPD-PCR, ribotiplendirme ve serotiplendirme yöntemlerini karşılaştırmalı olarak kullanmışlardır. Epidemiyolojik olarak ilişkisiz olan 32 adet *E. coli* izolatını, M13 ve DAF4 primerlerinin kullanıldığı RAPD ile 29 farklı tipe ayırmışlardır. Bu çalışmada tespit edilen RAPD tip sayısının Vogel ve ark. (27)'nin yaptığı çalışmada belirlenmiş tip sayısına göre daha az olması, bu çalışmadaki izolatların aynı bölgeden (Samsun İli) ve aynı bölgede bulunan mezbahalara gelen sığır karkaslarından izole edilmiş olmasına bağlanabilir.

Bu çalışmada, ERIC2 primeri ile elde edilen RAPD tipleri içinde predominant olduğu belirlenen E1 tipinin toplam 28 (1-6, 9-22, 24-28, 30-32 no'lu suşlar) izolat içerdiği, bununla birlikte M13 primeri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR'de aynı izolatların M1 (9-22, 24-32 no'lu suşlar), M2 (1-3, 5 no'lu suşlar) ve M3 (4, 5 no'lu suşlar) genotiplerine dağıldığı belirlendi. Ayrıca benzerlik matriksi incelendiğinde, M13 ile yapılan RAPD-PCR analizinin hem izolatlar arasındaki heterojeniteyi daha açık bir şekilde ortaya koyduğu hem de izolatların çeşitliliğini ortaya koymada ERIC primerine göre daha kullanılabilir olduğu saptandı.

PCR'de primer bağlanma ısısı yüksek olduğunda, primer bağlanma problemleri ortaya çıkarken, düşük primer bağlanma ısıları, yanlış eşleşmeler neden olmaktadır (14). Bu çalışmada dört farklı primer bağlanma ısısının (32, 36, 38 ve 40°C), her iki primer ile gerçekleştirilen RAPD-PCR paternlerini dikkate değer şekilde değiştirmedeği belirlendi. Bu bulgu, ERIC-2 ve/veya M13 primeri kullanarak yapılacak RAPD-PCR analizlerinde, bu dört primer bağlanma ısısından herhangi birinin kullanılabilceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, sığır karkas orijinli *E. coli* O157 izolatlarının moleküler genetik ayırımında kullanılan RAPD-PCR analizinin hızlı, basit ve tekrarlanabilir bir teknik olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca RAPD-PCR analizinde kullanılan M13 primerinin izolatlar arasındaki çeşitliliği belirlemede daha yararlı olduğu belirlenmiş ve benzer çalışmalarda kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. **Armstrong GL, Hollingsworth J, Morris GJ**, (1996). *Emerging foodborne pathogens: Escherichia coli O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world*. Epidemiol Rev. 18, 29-51.
2. **Ateba CN, Bezuidenhout CC**, (2008). *Characterisation of Escherichia coli O157 strains from humans, cattle and pigs in the North-West Province, South Africa*. Int J Food Microbiol. 128, 181-188.
3. **Birch M, Denning DW, Law D**, (1996). *Rapid genotyping of Escherichia coli O157 isolates by random amplification of polymorphic DNA*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 15, 297-302.
4. **Chapman PA**, (1999). *Escherichia coli O157: 14 years' experience*. Stewart DD, Flint HJ. eds. *Escherichia coli O157 in Farm Animals*. CABI Publishing, New York. p.99-121.
5. **Eisenstein BI, Jones GW**, (1988). *The spectrum of infections and pathogenic mechanisms of Escherichia coli*. Adv Intern Med. 33, 231-52.
6. **Erol İ**, (2007). *Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi*. Ankara: Pozitif Matbaacılık Ltd. Şti., p 78-92.
7. **Grif K, Karch H, Schneider C, Daschner FD, Beutin L, Cheasty T, Smith H, Rowe B, Dierich MP, Allerberger F**, (1998). *Comparative Study of Five Different Techniques for Epidemiological Typing of Escherichia coli O157*. Diagn Microbiol Infect Dis. 32, 165-176.
8. **Griffin PM, Tauxe RV**, (1991). *The epidemiology of infections caused by Escherichia coli O157:H7, other enterohaemorrhagic E. coli, and the associated hemolytic uremic syndrome*. Epidemiol Rev. 13, 60-98.
9. **Hopkins KL, Hilton A**, (2001). *Restriction endonuclease analysis of RAPD-PCR amplicans derived from Shiga-like toxin-producing Escherichia coli O157 isolates*. J Med Microbiol. 50, 90-95.
10. **Karmali MA**, (1989). *Infection by Verocytotoxin-producing Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 2, 15-38.
11. **Karmali MA, Gannon V, Jan M, Sargeant JM**, (2010). *Verocytotoxin-producing Escherichia coli (VTEC)*. Vet Microbiol. 140, 360-370.
12. **Krüger A, Padola NL, Parma AE, Lucchesi PMA**, (2006). *Intrasero-type diversity among Argentinian verocytotoxigenic Escherichia coli detected by random amplified polymorphic DNA analysis*. J Med Microbiol. 55, 545-549.
13. **Lawung R, Charoenwatanachokchai A, Cherdtrakulkiat R, Thammapiwan S, Mungniponpan T, Bülow L, Prachayasittikul V**, (2010). *Antibiograms and randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reactions (RAPD-PCR) as epidemiological markers of gonorrhoea*. J Clin Lab Anal. 24(1), 31-37.
14. **McPherson MJ, Moller SG**. (2000) *PCR*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited.
15. **Moore JE, Watabe M, Millar BC, McMahon MA, McDowell DA, Rooney RJ, Loughrey A, Goldsmith CE**, (2008). *Molecular characterisation of verocytotoxigenic Escherichia coli O157:H7 by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) typing*. Br J Biomed Sci. 65(3), 161-163.
16. **Nataro JP, Kaper JB**, (1998). *Diarrheagenic Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 11, 142-201.
17. **Orskov I, Orskov F, Jann B, Jann K**, (1977). *Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of Escherichia coli*. Bacteriol Rev. 41, 667-710.
18. **Ramalivhana JN, Obi CL, Samie A, Labuschagne C, Weldhagen GF**, (2010). *Random amplified polymorphic DNA typing of clinical and environmental Aeromonas hydrophila strains from Limpopo province*. South Africa J Health Popul Nutr. 28(1), 1-6.
19. **Renders N, Romling U, Verbrugh H, Van Belkum A**, (1996). *Comparative Typing of Pseudomonas aeruginosa by Random Amplification of Polymorphic DNA or Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA Macrorestriction Fragments*. J Clin Microbiol, 34(12), 3190-3195.
20. **Russell JB, Diez-gonzales F, Jarvis GN**, (2000). *Invited review: Effects of diet shifts on Escherichia coli in cattle*. J Dairy Sci. 83, 863-873.
21. **Tutenel AV, Pierard D, Van Hoof J, Cornelis M, De Zutter L**, (2003). *Isolation and molecular characterization of Escherichia coli O157 isolated from cattle, pigs and chickens at slaughter*. Int J Food Microbiol, 84, 63-69.
22. **Welsh J, McClelland M**, (1990). *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*. Nucleic Acids Res. 18, 7213-7218.
23. **Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV**, (1990). *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. Nucleic Acids Res. 18, 6531-6535.
24. **Vaneechoutte M**, (1996). *DNA fingerprinting techniques for microorganisms*. Mol. Biotechnol. 6, 115-142.
25. **Venugopal G, Mohapatra S, Salo D, Mohapatra S**, (1993). *Multiple mismatch annealing: Basis for random amplified polymorphic DNA fingerprinting*. Biochem Biophys Res Commun. 197, 1382-1387.
26. **Versalovic J, Koeuth T, Lupski R**, (1991). *Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes*. Nucleic Acids Res. 19(24), 6823-6831.
27. **Vogel L, Van Oorschot E, Maas HME, Minderhoud B, Dijkshoorn L**, (2000). *Epidemiologic typing of Escherichia coli using RAPD analysis, ribotyping and serotyping*. Clin Microbiol Infect. 6, 82-87.