

## Ege Bölgesi'ndeki sığırların süt ve dışkı örneklerinden *Escherichia coli* O157:H7 izolasyonu ve verotoksinlerinin belirlenmesi\*

Erdem ÇİÇEK, Serap SAVAŞAN

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

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

**Özet:** *Escherichia coli* O157:H7 serotipi; insan patojeni olarak ilk kez 1982 yılında ABD'de meydana gelen iki ayrı hemorajik kolitis salgını sonucu tanımlanmaya başlamıştır ve en sık izole edilen enterik patojenlerden biridir. *E. coli* O157:H7 ile infekte olan kişiler asemptomatik olabilir veya kanlı yada kansız diare, hemorajik kolitis (HC), hemolitik üremik sendrom (HUS) ve trombotik trombositopenik purpura (TTP) semptomları gösterebilir. Shiga-benzeri toksin üreten *E. coli* (STEC), Vero toksin-üreten *E. coli* (VTEC) olarak da adlandırılır. Enfeksiyonu gıda kaynaklıdır ve sığırlar STEC enfeksiyonunun birincil rezervuarı olarak kabul edilmektedir. STEC enfeksiyonlarının patogeneğinde rol alan en önemli virülens faktörleri, şigatoksinler, hemolizin, intimin yapışma faktörü, pO157 plazmid ve tip III sekresyon sistemi olarak belirtilmektedir. Bu çalışmada, incelenen 150 süt ve 150 dışkı örneğinden 2'si süt ve diğer 2'si ise dışkı örneklerinden olmak üzere 4 (%1.3) *E. coli* O157:H7 izole edildi. Süt örneklerinden izole edilen suşlardan 1'inin VT1 ürettiği belirlendi.

**Anahtar sözcükler:** *E. coli* O157:H7, izolasyon, sığır, verotoksin.

### Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 in milk and faeces of cattle in Aegean Region and determination of their verotoxin

**Summary:** *Escherichia coli* O157:H7 was first identified as a human pathogen following two geographically separate outbreaks of hemorrhagic colitis in the United States in 1982. *E. coli* O157:H7 was one of the most frequently isolated enteric pathogen. Persons infected with *E. coli* O157:H7 may be asymptomatic or symptoms such as diarrhea, bloody diarrhea, hemorrhagic colitis (HC), hemolytic-uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura may be observed. Infections caused by Shiga-like toxin-producing *E. coli* (STEC), also known as Vero toxin-producing *E. coli* (VTEC), in humans is food-borne and infected cattle act as a primer reservoir for STEC infection. The most important virulence factors which act role in the pathogenesis of STEC infections are reported as shiga toxins, hemolysin, intimin adherence factor and type III secretion system. In this study, 4 (1.3%) *E. coli* O157:H7, two of them were from milk samples and the other two from faeces samples were isolated from 150 milk samples and 150 faeces samples. We determined that one strain isolated from milk samples produced VT1.

**Key words:** Cattle, *E. coli* O157:H7, isolation, verotoxin.

### Giriş

*Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae* familyasına ait *Escherichia* genusunun en önemli türüdür. İnsan ve çoğu sıcakkanlı hayvanın doğal bağırsak florasında bulunmaktadır (1, 3, 4, 32). Toplam fekal floranın küçük bir bölümünü oluşturmasına rağmen insan bağırsağında baskın fakültatif anaerob türdür ve normalde simbiyotik olarak bulunur. Bunun yanı sıra patojenik özellik gösteren bazı *E. coli* suşları insanlarda ishale yol açan enfeksiyonlar, idrar yolları enfeksiyonları, menenjit, septisemi gibi çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir (11, 22).

1982'de ABD'de Michigan ve Oregon eyaletlerinde aynı restoran zincirinden hamburger yiyen 47 kişinin benzer klinik belirtilerle (kramp, karın ağrısı, sulu ve hemorajik ishal şikayetleriyle) başvurusu sonucu *E. coli* O157:H7 serotipi hemorajik kolitis (HC) ve hemolitik üremik sendrom (HUS)'a neden olan bir patojen olarak tanımlanmıştır (4, 9, 18, 26, 29).

*E. coli* O157:H7'yi diğer *E. coli* suşlarından ayıran üç temel özellik vardır. Sorbitolü ferment edememesi (10, 21), 4-methylumbelliferone glucuronide'i (MUG) hidrolize eden  $\beta$ -glukuronidaz enzim aktivitesine sahip olmaması ve 44-45°C ve

**Yazışma adresi / Correspondance:** Erdem Çiçek, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Işıklı, Aydın, Türkiye. E-posta: erdemcicek@mynet.com

\* İlk yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir. Bu çalışma ADÜ bilimsel araştırma projeleri (VTF-07-12 no'lu proje) tarafın-dan desteklenmiştir.

üzerindeki sıcaklıklarda gelişmemesidir (5, 9, 19). *E. coli* O157:H7'yi ayıran diğer bir özellik ise 60 Md (pO157) plazmid taşımasıdır (31, 33).

Elliden fazla serotipi bulunan Entero Hemorajik *E. coli* (EHEC)'in en yaygın tipi olan *E. coli* O157:H7; *Shigella dysenteriae* tip I tarafından oluşturulan toksine benzerliğinden dolayı şigatoksiner olarak adlandırılan (Stx 1 ve Stx 2) toksinler üretmektedir. Bunlara Shiga-benzeri toxin üreten *E. coli* (STEC) denilmektedir. Şigatoksiner Vero hücre kültürlerine sitotoksik etkili olduğundan verotoksiner (Vt 1 ve Vt 2) olarak da adlandırılmaktadır. Bu toksinlerin EHEC suşlarının insanlardaki virulensi açısından önemli roller üstlendiği düşünülmektedir (1, 8, 9, 12, 28, 31).

Stx'lerin patojenik mekanizması tam olarak anlaşılammıştır. Fakat diare, HC, HUS ve trombotik trombositopenik purpura (TTP) gelişimine katkıda buldukları düşünülmektedir. HC'nin Stx'lerin intestinal sisteme bırakıldıktan sonra ortaya çıktığı ve HUS/TTP'nin de yine Stx'lerin kana karışmasından sonra ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (9, 20). HUS'lu hastalarının kanlarında da Stx'lere rastlanmıştır. Stx 2 ve Stx 2c'nin insan klinik izolatlarında en sık rastlanılan toksinler olduğu belirtilmektedir (1). Stx 1 ve Stx 2'nin in vitro ve hayvanlarda değişik patojeniteleri görülmüştür (9, 13, 20).

STEC/EHEC *E. coli* patotipinde zoonotik orijinli tek patojenik gruptur ve birçok hayvan türünün bağırsak florasında bulunabilir. Bununla birlikte ruminantlar STEC'nin ve özellikle *E. coli* O157:H7'nin birincil rezervuarı olarak belirtilmektedir. Yapılan son çalışmalarda, insan için yüksek derecede virulent olan bu türün sadece kontamine gıda veya suyun tüketilmesiyle değil, STEC pozitif hayvanlar veya ortamlarla temas ile de infeksiyona neden olduğu bildirilmektedir (6, 9).

Bu çalışmada, Ege Bölgesi'nde bulunan sığırlardan alınacak süt ve dışkı örneklerdeki *E. coli* O157:H7 bakterisinin varlığı ve verotoksin üretip üretmediğinin belirlenmesi amaçlandı.

## Materyal ve Metot

Bu çalışmada Ege Bölgesi'nde bulunan çeşitli çiftlikler ve köy evleri ziyaret edilerek farklı yaş ve cinsiyetteki sağlıklı sığırlardan 150 dışkı ve süt örneği toplandı. Çalışmada ilk 50 sığırdan hem süt hem dışkı örneği alındı. Diğer 100 süt ve dışkı örneği farklı sığırlardan alınarak toplamda 250 farklı sığırdan örnek toplandı. Dışkı örnekleri her hayvan için farklı rektal muayene eldiveni ve steril plastik dışkı kabı kullanılarak rektumdan, çiğ süt örnekleri ise hayvanların memelerinden enjektör ile 50 ml'lik steril cam şişeler içerisine alındı. Örnekler soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı.

Örneklerden *E. coli* O157:H7 izolasyonu amacıyla ön zenginleştirme besiyeri olarak novobiocin katkılı modifiye Tryptic Soy Broth (mTSB, Oxoid) kullanıldı. Selektif-diferansiyel katı besiyeri olarak Sefiksim-Tellürit (CT) (Oxoid) ilave edilmiş Sorbitol MacConkey Agar (SMAC, Oxoid) kullanıldı. 37°C'de aerobik koşullarda 24 saat inkübe edildi. CT-SMAC agarda üreyen sorbitol fermentasyonu ve β-glukuronidaz negatif renksiz koloniler şüpheli olarak değerlendirildi (15). Gram boyama ve API 20E test kiti ile örneklerin *E. coli* olup olmadığı incelendi. *E. coli* O157 şüpheli olarak belirlenen izolatlar *E. coli* O157 Latex Test (Oxoid) uygulandı. Aglutinasyon gösteren izolatlar, *E. coli* O157 olarak belirlendi (9, 15). *E. coli* O157 olarak saptanan suşların H antijen tipinin belirlenmesi amacıyla *Escherichia coli* Antiserum (Denka Seiken Co. Japonya) kullanıldı. Son olarak yapılan incelemelerle *E. coli* O157:H7 olduğu tespit edilen suşların toksin üretip üretmediğinin belirlenmesi amacıyla VTEC-RPLA toksin belirleme kiti (Oxoid TD960) kullanıldı.

## Bulgular

Toplam 300 dışkı ve süt örneğinden *E. coli* O157:H7 izolasyon oranı ve verotoksin test sonucu Tablo 1'de belirtilmiştir.

**Tablo 1.** *E. coli* O157:H7 izolasyon oranı ve verotoksin üreten suşların yüzdesi.

Örnekler	Örnek sayısı (n)	İzolasyon oranı (%)	VT1 (%)	VT2 (%)
Dışkı Örnekleri	150	2 (%1.3)	-	-
Süt Örnekleri	150	2 (%1.3)	1 (%50)	-

Çalışmada 250 farklı sığırdan elde edilen örneklerden izole edilen *E. coli* O157:H7 suşlarından 3'ünün 2 yaş üzerindeki sığırlara, 1'inin ise 2 yaş altındaki sığırlara ait olduğu belirlendi. İzole edilen *E. coli* O157:H7 suşlarının yaşa göre dağılımı Tablo 2'de belirtilmiştir.

**Tablo 2.** Örneklerden izole edilen *E. coli* O157:H7 suşlarının yaşa göre dağılımı.

Yaş grubu	Örnek sayısı (n)*	İzolasyon oranı (%)
2 yaş altı	82	1 (%1.2)
2 yaş ve üzeri	168	3 (%1.8)
Toplam	250	4 (%1.6)

\* Çalışmada ilk 50 sığırdan hem süt hem dışkı örneği alındı. Diğer 50 süt ve dışkı örneği farklı sığırlardan alınarak toplamda 250 farklı sığırdan örnek toplandı.

Çalışmada kullanılan 150 sığıra ait rektal dışkı örneğinin 3'ünden (%2) *E. coli* O157 izole edilirken, *E. coli* antiserum testi sonucunda 2 örnek (%1.3) *E. coli* O157:H7, 1 örnek ise (%0.7) *E. coli* O157:H- olarak belirlendi. Benzer şekilde 150 çiğ süt örneğinin 3'ünden (%2) *E. coli* O157 izole edilirken bunlardan 2'si (%1.3) *E. coli* O157:H7, 1'i (%0.7) *E. coli* O157:H- olarak tespit edildi.

## Tartışma ve Sonuç

Elliden fazla serotipi bulunan EHEC'in en yaygın tipi olan *E. coli* O157:H7, insanlarda kanlı veya kansız diyare, hemorajik kolit, hemolitik üremik sendrom ve trombotik trombositopenik purpura olarak tanımlanan ciddi ve genellikle letal etkili infeksiyonlara neden olarak son yıllarda adından sıkça söz ettirmektedir (1, 9, 30, 35). *E. coli* O157:H7 her yıl ABD'de yaklaşık 73000 infeksiyona neden olmaktadır ve 1982-2002 yılları arasında toplam 350 salgın ortaya çıkmıştır. Bu salgınlar her yıl ortalama 50 ölüme neden olmuştur (13, 14, 26).

*E. coli* O157:H7'nin kontrolü birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. *E. coli* O157:H7 sağlıklı sığırlarda kolonize olabilir, gıda ve suda yaşayabilir, asitli ortamlara dirençlidir ve en önemlisi infeksiyon dozu çok düşüktür. Bu yüzden her aşamada kontrol yapılması gerektiği belirtilmektedir (6, 13).

Sığırlar *E. coli* O157:H7 infeksiyonunun en önemli kaynağı olarak belirtilmektedir. Sığırların normal bağırsak mikroflorasının bir parçası olan *E. coli* O157:H7 varlığı sığırların yaşıyla da değişim

göstermektedir. Yapılan çalışmalarda genç sığırların dışkılarında özellikle süttten kesildikten sonra erişkinlerdekine göre çok daha yoğun ölçüde bu patojene rastlanmıştır. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda da yaz aylarında *E. coli* O157:H7 sayısının arttığı tespit edilmiştir (6, 9).

*E. coli* O157:H7'ye sığırlar dışında koyun, keçi, domuz, köpek ve at gibi evcil hayvanların yanı sıra geyik, kuş gibi vahşi hayvanlarda da rastlanmıştır. Vahşi hayvanlarla temas eden evcil hayvanlara bulaşmanın olabileceği belirtilmiştir (6, 9).

*E. coli* O157:H7 infeksiyonlarında ilk sırayı, doğrudan veya dolaylı olarak sığır dışkısıyla kontamine olmuş etlerin yeterince pişirilmeden tüketilmesinin aldığı düşünülmektedir. Diğer bir bulaşma kaynağı ise dışkıyla kontamine olmuş meyve, sebzelerin tüketilmesidir. Süt ve ürünleri de önemli bir bulaşma kaynağıdır. Özellikle çiğ sütün veya çiğ süt ile yapılan peynir, tereyağı gibi ürünlerin tüketilmesi infeksiyonlara neden olmaktadır. Son yıllarda insanlar arasında bulaşma ve su kaynaklı salgınların sayısında belirgin artışlar gözlemlenmiştir. Özellikle kontamine olmuş içme suları ve halka açık yüzme havuzları büyük salgınlara neden olmaktadır. Son on yılda hayvanat bahçesi veya çiftlik ziyaretlerinde hayvanlarla temas sonucu ortaya çıkan salgınların sayısında da büyük bir artış görüldüğü belirtilmektedir (6, 26).

*E. coli* O157:H7 serotipinin çeşitli gıda, klinik ve çevre örneklerinde aranmasına yönelik olarak klasik ve gelişmiş olmak üzere 2 ana grupta toplanabilecek çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Klasik yöntemler biyokimyasal testler üzerine kurulmuştur ve büyük çoğunluğu selektif zenginleştirme ve katı besiyerlerine ekim aşamalarını içeren var/yok testleridir. Gelişmiş testler ise genellikle serolojik yöntemler üzerine dayandırılmıştır ve genellikle araştırma laboratuvarlarında uygulanmaktadır (15).

STEC/EHEC *E. coli* grubu içerisinde zoonotik orijinli tek patojenik gruptur. Sığır popülasyonlarında yapılan çalışmalarda *E. coli* O157:H7 prevalansının ABD'de %1-5 (35), çeşitli Avrupa ülkelerinde %1-13 arasında olduğu bildirilmektedir (3). Wells ve ark. (32), 1266 sağlıklı sığırdan aldıkları süt örneklerinin 18'inde (%1.4) *E. coli* O157:H7 izolasyonu gerçekleştirdiklerini bildirmiştir. ABD'nin Washington eyaletinde 3570 dışkı örneği alınarak yapılan bir çalışmada ise 10 adet (%0.28) *E. coli* O157:H7 izolasyonu gerçekleştirildiği bildirilmiştir (16).

Ülkemizde de sığır ve süt ineklerinde *E. coli* O157:H7 izolasyonuna yönelik çalışmalar yapılmıştır. Van yöresinde yapılan bir çalışmada, sağlıklı süt sığırlarından alınan 312 dışkı örneğinden 4'ünde (%1.28) *E. coli* O157:H7 saptandığı belirtilmiştir (7). Yılmaz ve ark. (34), Türkiye'deki sığırlarda *E. coli* O157:H7'ye rastlanma sıklığını araştırdıkları bir çalışmada, İstanbul'dan alınan 330 rektal svap örneğinin 88'inde (%26.7) SMAC agarda sorbitol-negatif koloni gözlemlendiğini, bunlardan 13'ünden (%3.93) de *E. coli* O157:H7 izolasyonu gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmadaki %1.3'lük izolasyon oranı Türkiye'de ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Çiğ sütlerden *E. coli* O157:H7 izolasyonuna yönelik yapılan çeşitli çalışmalarda, çiğ sütlerde prevalansın oldukça düşük olduğu ve %0 ile %10 arasında değiştiği belirtilmektedir (24). Heuvelink ve ark. (17), yaptıkları çalışmada, 1011 çiğ süt örneğinden *E. coli* O157 izole edemediklerini bildirmişlerdir. İtalya'da yapılan sorbitol-negatif *E. coli* suşlarının araştırıldığı bir çalışmada ise, inek ve keçilere ait toplam 144 çiğ süt örneğinin sadece 1'inden *E. coli* O157:H- izole edildiği belirtilmiştir (25). Arjantin'de immunomanyetik separasyon yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada, 150 süt örneğinin hiçbirinden STEC O157 izolasyonu yapılmadığı belirtilmiştir (27). Türkiye'de Öksüz ve ark.'ın (23) çiğ süt ve çiğ süttten yapılmış peynirlerde *E. coli* O157 insidansına yönelik yaptıkları bir çalışmada 100 çiğ süt örneğinden sadece 1'inde (%1) *E. coli* O157 tespit edildiği bildirilmiştir.

Bu çalışmada 150 çiğ süt örneğinin 2'sinden (%1.3) *E. coli* O157:H7 tespit edildi. Bu sonuç Türkiye'de ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Wells ve ark. (32), farklı yaşlardaki sığırlarda *E. coli* O157:H7 prevalansını araştırdıkları bir çalışmada; 210 buzağının 5'inde (%2.3), 394 düvenin 12'sinde, fakat 662 yetişkin sığırın sadece 1'inde (%0.15) *E. coli* O157:H7 izolasyonu gerçekleştirdiğini bildirmiştir. Yılmaz ve ark. (34), sığırlarda yaptıkları çalışmada, izolasyonun genellikle iki yaşındaki hayvanlardan yapıldığını bildirmiştir. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda da yaz aylarında *E. coli* O157:H7 sayısının arttığı tespit edilmiştir (6, 9).

Bu çalışmada izole edilen suşların 3'ünün (%1.8) 2 yaş üzerindeki sığırlara, 1'inin (%1.2) ise iki yaş altındaki sığıra ait olduğu belirlendi. Çalışmada yetişkin sığırlardan gerçekleşen izolasyon oranının genç sığırlardakine göre yüksek çıkması diğer çalışmalarla farklılık göstermektedir. Bu farklılıkta coğrafik açıdan değişkenlerin etkili olabileceği düşünüldü.

Wang ve ark. (31), 81 *E. coli* O157:H7 suşunun virulans faktörlerini araştırdıkları bir çalışmada, 32 (%39) suşun VT1, 68 suşunda VT2 (%83) ürettiklerini bildirmişlerdir.

Çalışmada izole edilen 4 *E. coli* O157:H7 suşundan 1'inin (%25) VT1 ürettiği tespit edildi. İzole edilen suşlardan hiç birinin VT2 üretmediği belirlendi. Bu sonucun diğer çalışmalarla farklılık göstermesi izolatların sayısının yeterli olmaması ile açıklanabilir.

Bu çalışma ile Ege Bölgesi'nde bulunan sığırlardan kültürel ve serolojik yöntemler kullanılarak *E. coli* O157:H7 izolasyonu ve identifikasyonu gerçekleştirildi ve Türkiye'de gerçekleştirilen birçok çalışmadan farklı olarak suşların verotoksin üretip üretmedikleri belirlendi. Sunulan bu çalışmanın, Türkiye'de gerçekleştirilecek *E. coli* O157:H7 izolasyonuna ve verotoksin araştırmalarına yönelik diğer çalışmalar için yarar sağlayabileceği düşünülmüştür.

## Kaynaklar

1. Baets LD, Taelen IVD, Filette MD, Pierard D, Allison L, Greve HD, Hernalsteens JP, Imberechts H, (2004). *Genetic Typing of Shiga Toxin 2 Variants of Escherichia coli by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis*. Appl Environ Microbiol. 70 (10), 6309-6314.
2. Bekar M, (1997). *Enterobacteriaceae Familyası Mikroorganizmaların Genel Karakterleri ve Tanı Yöntemleri*. Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yayın No. 97-1 Ankara.
3. Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Alonso MP, Gonzales EA, Bernardez MI, (2001). *Epidemiology of Verocytotoxigenic Escherichia coli (VTEC) in Ruminants*. In: Verocytotoxigenic Escherichia coli. G. Duffy, P. Garvey, McDowell D.A. eds. Trumbull, Connecticut, USA: Food & Nutrition Press. p.113-148.
4. Boerlin P, Mceven SA, Petzold FB, Wilson JB, Jhonson RP, Gyles CL, (1999). *Associations Between Virulence Factors of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli and Disease in Humans*. J Clin Microbiol. 37 (3), 497-503.
5. Brooks GF, Butel JS, Morse SA, (2004). *Enteric Gram Negative Rods (Enterobacteriaceae)*. Chapter 16 in: Jawetz Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. Twenthy



- Third Edition, Mcgraw Hill Education, Boston. p. 252-255.
6. **Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E**, (2005). *Enterohemorrhagic Escherichia coli: Emerging Issues on Virulence and Modes of Transmission*. Vet Res. 36, 289-311.
  7. **Çabalar M, Boynukara B, Gülhan T, Ekin İH**, (2001). *Prevalence of Rotavirus, Escherichia coli K99 and O157:H7 in Healthy Dairy Cattle Herds in Van, Turkey*. Turk J Vet Anim Sci. 25, 191-196.
  8. **Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Moon HW, O'brien AD**, (1998). *Escherichia coli O157:H7 Requires Intimin for Enteropathogenicity in Calves*. Infect Immun. 66 (9), 4560-4563.
  9. **Dunn JR**, (2003). *The Epidemiology of Shiga – Toxicogenic Escherichia coli O157:H7 in Louisiana Dairy Cattle, Beef Cattle and White – Tailed Deer*. J Wildlife Dis. 40 (2), 361-365
  10. **Durso LM, Smith D, Hutkins RW**, (2004). *Measurements of Fitness and Competition in Commensal Escherichia coli and E. coli O 157:H7 Strains*. Appl Environ Microbiol. 70 (11), 6466-6472.
  11. **Franzolin MR, Alves RCB, Keller R, Gomes TAT, Beutin K, Barreto ML, Milroy C, Strina A, Riberio H, Trabusi LR**, (2005). *Prevalence of Diarrheagenic Escherichia coli in Children with Diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 100 (4), 359-363.
  12. **Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang W, Pulz M, Kuczus T, Ammon A, Karch H**, (2002). *Escherichia coli Harboring Shiga Toxin 2 Gene Variants: Frequency and Association with Clinical Symptoms*. J Infect Dis. 185, 74-84.
  13. **Gorbach , Barleth, Blacklow**, (2004). *Infectious diseases*. Chapter 70, *Escherichia coli and Other Shiga-Toxin Producing E. coli*. Lippincott, Philadelphia. p.643-647.
  14. **Gupro A, Hunter SB, Bidol SA, Dietrich S, Kincaid J, Salehi E, Nicholson L, Genese CA, Weinstein ST, Marengo L, Kimura AC, Brooks JT**, (2004). *Escherichia coli O157 Cluster Evaluation*. Emerg Infect Dis. 10 (10), 1856-1858.
  15. **Halkman AK, Noveir MR, Doğan HB**, (2001). *Escherichia coli O157:H7 serotipi*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Sim Matbaacılık Ltd, Şti, Ankara s:46.
  16. **Hancock DD, Besser TE, Kinsel ML, Tarr PI, Rice DH, Paros MG**, (1994). *The prevalence of Escherichia coli O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State*. Epidemiol Infect. 113 (2), 199-207.
  17. **Heuvelink AE, Bleumink B, Van Den Biggelaar FL, Te Giffel MC, Beumer RR, De Boer E**, (1998). *Occurrence and survival of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 in raw cow's milk in Netherlands*. J Food Protect. 61, 1597-1601.
  18. **Jin HY, Tao KH, Li YX, Li FO, Li SQ**, (2005). *Microarray Analysis of Escherichia coli O 157:H7*. W J Gastroenterolo. 11 (37), 5811-5815.
  19. **Kim JY, Kiro SH, Kwon NH, Bae WK, Lim JY, Koo HC, Kim JM, Noh KM, Jong WK, Park KT, Park YH**, (2005). *Isolation and Identification of Escherichia coli O 157:H7 Using Differend Detection Methots Molecular De-termination by Multiplex PCR and RAPD*. J Clin Microbiol. 6 (1), 7-19.
  20. **Kusumato M, Okitsu T, Nishiya Y, Suzuki R, Yamai S, Kawamura Y**, (2001). *Spontaneous Reactivation of Shiga Toxins in Escherichia coli O157:H7 Cells Caused by Transposon Excision*. J Biosci and Bioengineer. 92 (2), 114-120.
  21. **Maldonado Y, Fiser JC, Nakatsu CH, Bhunia AK**, (2005). *Cytotoxicity Potential and Genotypic Characterization of Escherichia coli Isolated from Environmental and Food Sources*. Appl Environ Microbiol. 71(4), 1890-1898.
  22. **Orlandi PP, Magalhaes GF, Matos NB, Silva T, Penatti M, Nogueira PA, Pereira da Silva LH**, (2006). *Etiyology of Diarrheal Infections in Children of Porto Velho ( Rondonia, Western Amazon Region, Brazil)*. Brazilian J Med Biologic Res. 39 (4), 507-517.
  23. **Öksüz Ö, Arıcı M, Kurultay S, Gümüş T**, (2004). *Incidence of Escherichia coli O157 in raw milk and pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey*. Food Cont. 15, 453-456.
  24. **Padhye NY, Doyle MP**, (1991). *Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic Escherichia coli O157 in food*. Appl Environ Microbiol. 57, 2693-2698.
  25. **Picozzi C, Foschino R, Heuvelink A, Beumer R**, (2005). *Phenotypic and genotypic characterization of sorbitol-negative or slow-fermenting (suspected O157) Escherichia coli isolated milk samples in Lombardy region*. Lett Appl Microbiol. 40, 491-496.
  26. **Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL**, (2005). *Epidemiology of Escherichia coli O 157:H7 Outbreaks, United States 1982-2002*. Emerg Infect Dis. 11 (4), 603-609.
  27. **Roldan ML, Chinen I, Otero JI, Mihwebsky ES, Alfaro N**, (2007). *Isolation, characterization and typing of Escherichia coli O157:H7 strains from beef products and milk*. Revista Argentina de Microbiologia. 39, 113-119.
  28. **Topçu Aİ, Söyletir G, Doğanay M**, (2002). *Bakteriyel İnfeksiyonlar: İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*, cilt 1, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul, s.1564-1575.
  29. **Tsai WL, Miller CE, Richter ER**, (2000). *Determination of the Sensitivity of a Rapid Escherichia coli O157:H7 Assay for Testing 375-Gram Composite Samples*. Appl Environ Microbiol. 66 (9), 4149-4151.
  30. **Ünlütürk A, Turantaş F, eds.**, (1998). *Gıda Mikrobiyolojisi*, 1. Basım, Mengi Tan Basımevi, İzmir. s:605.
  31. **Wang G, Clark CG, Rodgers FG**, (2002). *Detection in Escherichia coli of the Genes Encoding the Major Virulence Factors, the Genes Defining the O 157:H7 Serotype and Components of the Type 2 Shiga Toxin Family by Multiplex PCR*. J Clin Microbiol. 40 (1), 3619-3619.
  32. **Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, Cameron DN, Downes FP, Martin ML, Griffin PM, Ostroff SM, Potter ME, Tauxe RV, Wachsmuth IK**, (1991). *Isolation of Escherichia coli serotype O157:H7 and other shiga-like-toxin-producing E.coli from dairy cattle*. J Clin Microbiol. 29, 985-989.
  33. **Yang ZM, Kovar J, Kim J, Nietfelt J, Smith DR, Moxley RA, Olson ME, Fey PD, Benson AK**, (2004). *Identification of Common Subpopulations of Non-Sorbitol-Ferment-*

ing,  $\beta$ -Glucuronidase- Negative *Escherichia coli* O 157:H7 from Bovina Production Environments and Human Clinical Samples. *Appl Environ Microbiol.* 70 (11), 6846-6854.

**34. Yılmaz A, Gun H, Yılmaz H,** (2002). *Frequency of Escherichia coli O157:H7 in Turkish cattle.* *J Food Protect.* 10, 1637-1640.

**35. Zhao T, Doyle MP, Shere J, Garber L,** (1995). *Prevalence of Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 in a Survey of Dairy Herds.* *Appl Environ Microbiol.* 61(4), 1290-129.