



## Investigation of Virulence Genes in *Escherichia coli* O157:H7 Strains Isolated from Dairy Cattle

Hakan KALENDER

Firat University, Faculty of Engineering, Department of Bioengineering, Elazığ, Turkey

Received: 19.08.2016

Accepted: 10.11.2016

### SUMMARY

*Escherichia coli* O157:H7 is one of the most important zoonotic agents worldwide. Humans can be infected by consumption of food and water contaminated with agent. Cattle are especially considered to be the main reservoir of *E. coli* O157:H7. The aims of this study were to investigate the presence of *E. coli* O157:H7 in dairy cattle in Elazığ, and to determine virulence genes in *E. coli* O157:H7 isolates. A total of 300 rectal swab samples were collected from dairy cattle. *E. coli* O157:H7 was isolated from 11 (3.6 %) of rectal swab samples. The presence of shiga toxin (*stx1* and *stx2*), intimin (*eae*) and haemolysin (*hlyA*) genes was detected by polymerase chain reaction (PCR). Of the 11 *E. coli* O157:H7 strains, 9 had *stx2*, *hlyA* and *eae* genes. Two strains were positive for *stx1*, *stx2*, *hlyA* and *eae* genes. The results of this study show that dairy cattle are asymptomatic carriers of *E. coli* O157:H7 that is pathogenic for humans.

**Key Words:** *E. coli* O157:H7, Isolation, Virulence genes, Dairy cattle

### ÖZET

## Sütçü Sığırlardan İzole Edilen *Escherichia coli* O157:H7 Suşlarında Virulans Genlerinin Varlığının Araştırılması

*Escherichia coli* O157:H7 tüm dünyada önemli zoonotik etkenlerden biridir. Bu etken ile kontamine olmuş hayvansal gıdalar ve sular insanlar için enfeksiyon kaynağını oluşturmaktadır. Hayvan türleri içerisinde özellikle sığırlar *E. coli* O157:H7'nin esas taşıyıcısıdır. Bu çalışma, Elazığ'da sütçü sığırlardan *E. coli* O157:H7'nin izolasyonu ve izolatlarda önemli virulans genlerinin varlığının araştırılması amacıyla yapılmıştır. Çalışmada, toplam 300 sütçü sığırdan rektal sıvı örnekleri alınmıştır. Bu örneklerin 11 (% 3.6)'inden *E. coli* O157:H7 izole edilmiştir. İzole edilen suşlarda Şiga toksin (*stx1* ve *stx2*), intimin (*eae*) ve enterohemolizin (*hlyA*) genlerinin varlığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile araştırılmıştır. Suşların 9'unda *stx2*, *hlyA* ve *eae* genleri, 2'sinde ise *stx1*, *stx2*, *hlyA* ve *eae* genleri saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları sütçü sığırların, insanlar için patojenik karakter taşıyan *E. coli* O157:H7'nin taşıyıcısı olduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** *E. coli* O157:H7, İzolasyon, Virulans genleri, Sütçü sığır

### GİRİŞ

*E. coli* O157:H7 gıda kaynaklı enfeksiyonlara neden olan önemli bir patojendir (Mora ve ark. 2010; Kawano ve ark. 2012). Hayvanlar bağırsaklarında bu etkeni herhangi bir klinik belirti göstermeden taşıyabilirler (Hussein ve Bollinger 2005). Hayvan dışkı ile kontamine et, süt, su ve çiğ sebzeler insanlar için enfeksiyon kaynağıdır. İnsanlarda görülen *E. coli* O157:H7 enfeksiyonlarının, yeterince pişmemiş ve çiğ olarak tüketilen gıdalardan kaynaklandığı bildirilmiştir (Bidet ve ark. 2005; Ferreira ve ark. 2014). Evcil hayvan türleri içerisinde özellikle sığırlar *E. coli* O157:H7'nin ana taşıyıcısı olarak kabul edilmektedir (Hussein ve Sakuma 2005). Şiga toksin üreten (STEC) O157:H7 insanlarda ishal, hemorajik kolitis, hemolitik üremik sendrom ve trombotik trombositopenik purpura'ya neden olur (D'Astek ve ark. 2012; Chui ve ark.

2015). Yaşlı kişilerde ve çocuklarda ölümlere yol açabilir (Money et al. 2010; Hiroi ve ark. 2012). Etkenin patojenitesinde, Şiga toksinler (Şiga toksin 1 ve 2) yanında, intimin ve enterohemolizin gibi virulans faktörlerinin de rolü vardır. *Stx1* ve *stx2* genleri tarafından kodlanan Şiga toksinler en önemli virulans faktörleridir. Şiga toksinlerin, hemorajik kolitis ve hemolitik üremik sendromlu hastalarda vasküler endotelial hasara neden olduğu düşünülmektedir. İntimin, *eae* geni tarafından kodlanır ve bakterinin bağırsak hücrelerine tutunmasından sorumludur. *HlyA* geni tarafından kodlanan enterohemolizin ise kırmızı kan hücrelerinden hemoglobinin uzaklaştırılmasına ve enterositlerin lizisine neden olur (Paton ve Paton 1998; Sanchez ve ark. 2010; Kawano ve ark. 2012; Amezcute-Lopez ve ark. 2012). Türkiye'de sütçü sığırlarda *E. coli* O157:H7'nin prevalansı ile ilgi oldukça az çalışma bulunmaktadır. Türkiye'de

yapılan çalışmalarda, sığır fekal örneklerinden (Yılmaz ve ark. 2002; Aslantas ve ark. 2006; Öngör ve ark. 2007; Kuyucuoglu ve ark. 2011), kıymalardan (Sarimehmetoglu ve ark. 2009), çiğ süt ve peynirlerden (Akkaya ve ark. 2007) ve insanlardan (Erdogan ve ark. 2008; Erdogan ve ark. 2011) *E. coli* O157:H7'nin izole edildiği bildirilmiştir. Bu çalışma, Elazığ ilinde sütçü sığırlarda *E. coli* O157:H7'nin varlığını araştırmak ve izolatlardaki virulans genleri tespit etmek amacıyla yapılmıştır.

## MATERYAL ve METOT

### Rektal Sıvap Örnekleri

Ocak 2012 ve Haziran 2012 arasında Elazığ ilinde, sürü büyüklükleri 10 ile 100 hayvan arasında değişen 30 sütçü sığır işletmesinde bulunan 3 yaş ve üzerindeki toplam 300 sığırdan rektal sıvap örnekleri toplandı. Örnek alınan hayvanlar rastgele seçildi. Sıvaplar novobiosin içeren modified tryptone soya broth (mTSB) (LAB165; Lab M) besiyerine konuldu ve soğuk ortamda kısa sürede laboratuvara getirildi.

### *E. coli* O157:H7 İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Laboratuvara getirilen rektal sıvap örneklerini içeren mTSB besiyeri 41.5°C'de 24 saat inkube edildi. Bu besiyerinde gelişen mikroorganizmalar için immunomanyetik seperasyon kiti (Captivate O157; LAB M, UK) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre immunomanyetik seperasyon (IMS) işlemi uygulandı. Kısaca *E. coli* O157 antikoru ile kaplı Captivate O157 partiküllerini içeren karışımdan 20 µl alındı ve 1.5 ml'lik tüpe kondu. Üzerine mTSB besiyerinde üreyen kültürden 1

ml eklendi ve karıştırıldı. Karışım oda ısısında 30 dakika bekletildi. Separasyon işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve partiküller yıkama solüsyonu ile birkaç kez yıkandı. Partiküllerden, 100 µl yıkama solüsyonu içerisinde süspansiyon hazırlandı. Daha sonra IMS örneklerinden, sefiksim ve tellürit suplementi içeren Sorbitol MacConkey Agar'a (CT-SMAC Agar) (LAB161; LAB M) ekim yapıldı ve petriyer 37°C'de 24 saat inkubasyona bırakıldı. CT-SMAC Agar'da renksiz koloni oluşturan *E. coli* O157 şüpheli bakteriler, somatik O157 antijen geni (*rfbE*) ve H7 flagella (*fliCh7*) geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile çoğaltılmasıyla identifiye edildi (Oporto ve ark. 2008).

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, identifikasyon genleri olan O157 somatik antijen geni (*rfbE*) ve H7 flagella (*fliCh7*) geni ile virulans genlerin (*stx1*, *stx2*, *hlyA* ve *eae*) saptanması amacıyla uygulandı. Nutrient agarda 37°C'de bir gece inkube edilen kültürlerden öze ile alınarak 200 µl distile su ile eppendorf tüp içerisinde süspansiyon hazırlandı ve kuru blok ısıtıcıda 99°C'de 15 dakika tutuldu. Daha sonra eppendorf tüp 12.000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, PZR testi için template DNA olarak kullanıldı. *RfbE*, *fliCh7*, *stx1* ve *stx2* *hlyA* ve *eae* genlerinin belirlenmesi için diğer araştırmacılar tarafından bildirilen primer setleri kullanılarak PZR işlemi uygulandı (Tablo 1). *stx1* ve *stx2* genleri multipleks PZR yöntemiyle, *rfbE*, *fliCh7*, *hlyA* ve *eae* genleri ise tekli PZR yöntemiyle saptandı. Amplifikasyon ürünleri % 1'lik agaroz jel içerisinde 200 voltta 30 dakika elektroforez işlemine tabi tutuldu. Jel, etidium bromid ile boyandı ve ultraviyole ışığı altında görüntüldü.

**Tablo 1.** PZR'da kullanılan primerler

**Table 1.** Primers used in PCR

Hedef gen	Primer dizisi (5'-3')	Amplikon Uzunluğu (bp)	Kaynak
<i>rfbE</i> <sub>O157</sub>	F: AAC GGT TGC TCT TCA TTT AG R: GAG ACC ATC CAA TAA GTG TG	678	Nagano ve ark. 1998
<i>fliCh7</i>	F: TAC CAC CAA ATC TAC TGC TG R: TAC CAC CTT TAT CAT CCA CA	560	Nagano ve ark. 1998
<i>stx1</i>	F: ACA CTG GAT GAT CTC AGT GG R: CTG AAT CCC CCT CCA TTA TG	582	Paton ve Paton 1998
<i>stx2</i>	F: GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC R: TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	255	Paton ve Paton 1998
<i>eae</i>	F: GTG GCG AAT ACT GGC GAG ACT R: CCC CAT TCT TTT TCA CCG TCG	890	Gannon ve ark. 1993
<i>hlyA</i>	F: AGC CGG AAC AGT TCT CTC AG R: CCA GCA TAA CAG CCG ATG T	525	Fratamicove ark. 2009

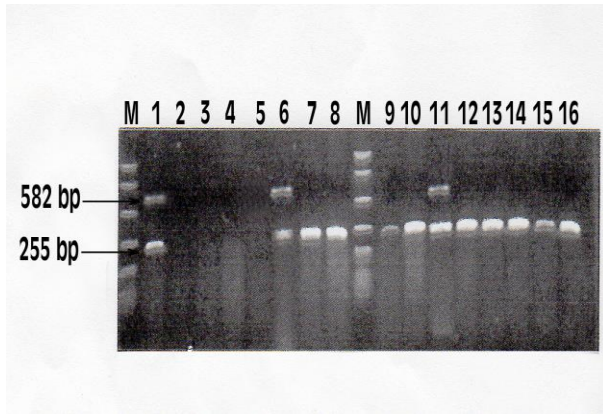
## BULGULAR

Toplam 300 rektal sıvap örneğinin 11'inden (% 3.6) *E. coli* O157:H7 izole edildi. Tüm izolatlarda şiga toksin 2 (*stx2*) geni tespit edildi. İzolatların herbiri farklı bir işletmeden elde edildi. İzole edilen 11 suşun 9'unda *stx2*, *hlyA* ve *eae* genleri birlikte, 2'sinde ise *stx1*, *stx2*, *hlyA* ve *eae* genleri birlikte tespit edildi (Tablo 2). Şiga toksin genleri için yapılan multipleks PZR ürünlerinin elektroforez sonuçları Şekil 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** 11 *E. coli* O157:H7 İzolatının Virulans Genleri

**Table 2.** Virulence genes of 11 *E. coli* O157:H7 isolates

İşletme No.	İzolot No.	Virulans Genler			
		<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>hlyA</i>	<i>eaeA</i>
3	1	-	+	+	+
6	2	-	+	+	+
8	3	-	+	+	+
11	4	-	+	+	+
11	5	-	+	+	+
15	6	-	+	+	+
16	7	+	+	+	+
16	8	-	+	+	+
16	9	+	+	+	+
20	10	-	+	+	+
27	11	-	+	+	+



**Şekil 1.** Multiplex PZR sonrası *Stx1* ve *stx2* genlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü M: Marker (50, 150, 300, 500, 750, 1000 bp) 1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3, 4, 5: Negatif örnekler, 6, 11: *Stx1* ve *stx2* pozitif örnekler, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16: *Stx2* pozitif örnekler

**Figure 1.** Agarose gel electrophoresis of *stx1* and *stx2* genes amplified by multiplex PCR M: Marker (50, 150, 300, 500, 750, 1000 bp) Lane 1: Positive control, Lane 2: Negative control, Lane 3, 4, 5: Negative samples, Lane 6, 11: Positive samples for *stx1* and *stx2*, Lane 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16: Positive samples for *stx2*

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya'da O157:H7 prevalansının etçi sığırlarda %0.3 ile %27.3 ve sütçü sığırlarda %0.2 ile %48 arasında değiştiği rapor edilmiştir (Hussein ve Bollinger 2005; Hussein ve Sakuma 2005). Sütçü sığırlar hem sütleri hem de etleriyle insan STEC O157:H7 enfeksiyonlarının oluşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda birçok ülkede sığırlarda farklı prevalans oranları bildirilmiştir. Sasaki ve ark. (2011), Japonya'da sığır rektal sıvap örneklerinin %8.9'undan, Zhou ve ark. (2002), Çin'de sığır dışkı örneklerinin %1.7'sinden, İslam ve ark. (2008), Bangladeş'de mezbahada kesilen sığırların %7.2'sinden, Amezcua-Lopez ve ark.(2012), Meksika'da sığır dışkı örneklerinin %3.3'ünden STEC *E. coli* O157 izole etmişlerdir. Aspan ve Eriksson (2010), İsveç'te mezbahada kesilen sığırların %1.2'sinde, Keen ve ark. (2006), Amerika'da sığır dışkı örneklerinin %13'ünde STEC *E. coli* O157:H7 tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Türkiye'de son yıllarda farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda hem etçi hem de sütçü sığırlardan *E. coli* O157:H7 izole edildiği bildirilmiştir. Yılmaz ve ark. (2002) İstanbul'da yaptıkları bir çalışmada, mezbahalarda kesilen 330 sığır rektal sıvap örneklerinin 13(%3.93)'ünden *E. coli* O157:H7 izole etmişlerdir. Aslantaş ve ark. (2006) Hatay'da yaptıkları bir çalışmada, 565 sığır dışkı örneğinin 77 (%13.6)'sinden *E. coli* O157 izole ettiklerini, izolatların 66'sının O157:H7 ve 11'inin O157:NM serotipine ait olduğunu bildirmişlerdir. Kuyucuoğlu ve ark. (2011), Afyonkarahisar'da inek ve buzağılardan alınan 457 dışkı örneğinin 14 (%3.1)'ünde *E. coli* O157:H7 saptamışlardır. Öngör ve ark. (2007), Elazığ'da bir mezbaha'da kesilen klinik olarak sağlıklı 251 sığırdan alınan rektal sıvap örneğinin 3 (%1.2)'ünden *E. coli* O157:H7 izole etmişlerdir. Çabalar ve ark. (2001), Van yöresinde 312 sütçü sığır dışkı örneğinin 4(%1.2)'ünde *E. coli* O157:H7 tespit etmişlerdir. Aydın ve ark. (2010), Kayseri'de 500 sütçü sığır dışkı örneğinin 6 (%4.6)'sından *E. coli* O157 izole ettiklerini ancak örneklerin hiçbirinde *E. coli* O157:H7 serotipi tespit edilemediğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada tespit edilen *E. coli* O157:H7

izolasyon oranı (%3.6), Türkiye'de yapılan bazı çalışmalarda bildirilen oranlara yakın bulunmuştur (Yılmaz ve ark. 2002; Kuyucuoğlu ve ark. 2011). Bununla birlikte yukarıda belirtilen çalışmaların bazılarında daha yüksek bazılarında ise daha düşük oranlar tespit edilmiştir. İzolasyon oranlarındaki bu farklılıklar, örnekleme metodu, mikroorganizma izolasyon yöntemi, coğrafik farklılıklar, mevsimler, hayvanların yaşı ve yetiştirme yöntemlerinin farklılığından kaynaklanabilir. Ruminantlarda STEC O157:H7 prevalansının yazın daha yüksek kışın ise daha düşük olduğu bildirilmiştir (Hussein ve Bollinger 2005). Yetişkin sığırlarla karşılaştırıldığında, buzağular *E. coli* O157:H7'ye daha duyarlıdır (Kuyucuoğlu ve ark. 2011). Dışkı örneklerinde birçok bakteri türü bulunmaktadır. Bu nedenle dışkı örneklerinden mikroorganizmaları saf olarak izole etmek için duyarlılığı yüksek testlerin kullanılması önem taşımaktadır. Bu çalışmada dışkı örneklerinden *E. coli* O157:H7 izolasyonu için duyarlı bir yöntem olduğu bildirilen (Öngör ve ark. 2007; Inat ve Siriken 2010) immunomanyetik seperasyon metodu (IMS) kullanılmıştır.

STEC O157:H7 izolatlarında şiga toksin (*stx1* ve *stx2*), intimin (*eae*) ve enterohemolizin (*hlyA*) gibi virulans genlerin varlığı insan enfeksiyonlarının oluşmasında etkin bir rol oynamaktadır. Japonya'da insanlardan izole edilen STEC O157 izolatlarının %82'sinde *stx2* geni saptanmıştır (Sasaki ve ark. 2011). Güney Kore'de yapılan bir çalışmada sığırlardan izole edilen *E. coli* O157 izolatlarının %15.9'unda *stx2*, %11'inde *hlyA*, %8.3'ünde *stx1* ve %5.2'sinde *eae* genleri tespit edilmiştir (Shin ve ark. 2014). Kanada'da insan *E. coli* O157:H7 izolatlarının %75'inde hem *stx1* hem de *stx2* genleri, %19'unda ise sadece *stx2* geni saptanmıştır (Chui ve ark. 2015). Amerika'da sığır dışkı örneklerinden izole edilen *E. coli* O157:H7 izolatlarının %94'ünün *stx2* geni taşıdığı bildirilmiştir (Keen et al. 2006). Türkiye'de yapılan çalışmalarda; Yılmaz ve ark. (2002), sığırlardan izole ettikleri *E. coli* O157 izolatlarının %80'inde *stx2* ve *eae* genleri saptanmışlardır (Yılmaz ve ark. 2002). Aslantaş ve ark. (2006), sığır orijinli 77 *E. coli* O157 izolatının 74 (%96)'ünde *hlyA*, 72 (%93)'sinde *eae*, 62 (%80)'sinde *stx2* ve 3 (%3.9)'ünde *stx1* genlerini tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Kuyucuoğlu ve ark. (2011), sığır dışkı örneklerinden izole edilen 14 *E. coli* O157:H7 izolatının 6 (%42.8)'sında *stx1* ve *stx2* genleri tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada izolatların 11 *E. coli* O157:H7 izolatının 9'unda *stx2*, *eae* ve *hlyA* genleri, 2'sinde ise *stx1*, *stx2*, *eae* ve *hlyA* genleri saptanmıştır. Şigatoksin genleri içerisinde en fazla *stx2* geninin saptanması diğer araştırmacıların bulgularıyla da benzerlik göstermektedir (Scott ve ark. 2006; Aslantaş ve ark. 2006; Aspan ve Eriksson 2010). Yapılan bu çalışmada elde edilen bulguların aksine, Ferreira ve ark (2014), sütçü sığırlardan izole edilen STEC O157 izolatlarının %90'ında *stx1* geni saptamışlardır. İnsanlarda hemorajik üremik sendrom enfeksiyonunun oluşmasında *stx2*'nin *stx1*'den daha etkili olduğu bildirilmiştir (Bidet ve ark. 2005; Chui ve ark. 2015). İntimin, enterohemolizin ve şigatoksin 2 genlerinin tümüne sahip olan suşların, insanlar için yüksek patojen suşlar olduğu rapor edilmiştir (Posse ve ark. 2007).

Sonuç olarak, bu çalışma klinik olarak sağlıklı süt sığırlarının STEC O157:H7'nin önemli bir taşıyıcısı olduğunu göstermektedir. Hayvanların sağımı esnasında sütler ve sütçü sığırların kesimi esnasında karkaslar kontamine olabilir. Bu durum halk sağlığı için potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır. Bu nedenle çiftliklerde, mezbahalarda ve gıda endüstrisinde hijyenik önlemler alınmalı ve tüketiciler eğitilmelidir. Ayrıca insan, gıda ve

hayvan *E. coli* O157:H7 izolatlarını karşılaştırmak için geniş kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Akkaya L, Alişarlı M, Kara R, Telli R (2007). Afyonkarahisar'da tüketime sunulan çiğ süt ve peynirlerde *E. coli* O157:H7 varlığının belirlenmesi. *YYÜ Vet Fak Derg*, 18, 1-5.
- Amezquita-Lopez BA, Quinones B, Cooley MB, Leon-Felix J, Campo NC, Mandrel RE, Jimenez M, Chaidez C (2012). Genotypic analyses of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and non-O157 recovered from feces of domestic animals on rural farms in Mexico. *PLoS One*, 7, 1-12.
- AslantasÖ, Erdogan S, Cantekin Z, Gulactli, Evrendilek GA (2006). Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from Turkish cattle. *Int J Food Microbiol*, 106, 338-342.
- Aspan A, Eriksson E (2010). Verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 from Swedish cattle; isolates from prevalence studies versus strains linked to human infections—a retrospective study. *BMC Vet Res*, 6, 1-10.
- Aydın F, İça T, Yontar A (2010). Kayseri yöresinde süt sığırlarında *Escherichia coli* O157:H7'nin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle araştırılması. *Erciyes Univ Sağlık Bil Derg*, 19, 159-166.
- Bidet P, Mariani-Kurkdjian P, Grimont F, Brahimi N, Courroux C, Grimont P, Bingen E (2005). Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France. *J Med Microbiol*, 54, 71-75.
- Chui L, Li V, Fach P, Delannoy S, Malejczyk K, Patterson-Fortin L, Poon A, King R, Simmonds K, Scott AN, Lee MC (2015). Molecular profiling of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans and cattle in Alberta, Canada. *J Clin Microbiol*, 53, 986-990.
- Çabalar M, Boynukara B, Gülhan T, Ekin IH (2001). Van yöresinde sağlıklı görülen süt sığırlığı işletmelerinde Rotavirus, *E. coli* K99 and O157:H7'nin varlığı üzerine araştırmalar. *Turk J Vet Anim Sci*, 25, 191-196.
- D'Astek BA, del Castillo LL, Miliwebsky E, Carbonari C, Palladino PM, Deza N, Chinen I, Manfredi E, Leotta GA, Masana MO, Rivas M (2012). Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from human infections and healthy cattle in Argentina. *Foodborne Pathog Dis*, 9, 457-464.
- Erdoğan, H., Erdoğan, A., Levent, B., Kayalı, R., Arslan, H., 2008. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: case report. *Turk J Pediatr*, 50, 488-491.
- Erdoğan H, Levent B, Erdoğan A, Güleşen R, Arslan H (2011). Investigation of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 incidence in gastroenteritis patients. *Bull Microbiol*, 45, 519-525
- Ferreira MRA, Filho EGF, Pinto JFN, Dias M, Moreira CN (2014). Isolation, prevalence, and risk factors for infection by shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in dairy cattle. *Trop Anim Health Prod*, 46, 635-639.
- Fratamico PM, Debroy C, Liu Y (2009). The DNA sequence of the *Escherichia coli* O22 O-antigen gene cluster and detection of pathogenic strains belonging to *E. coli* serogroups O22 and O91 by multiplex PCR assays targeting virulence genes and genes in the respective O-antigen gene clusters. *Food Anal Method*, 2, 169-179.
- Gannon VPJ, Rashed M, King RK, ThomasEG (1993). Detection and characterization of the *eae* gene of shiga-like toxin producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 31, 1268-1274.
- HiroiM, Takahashi N, Harada T, Kawamori F, IadAN, Kanda T, Sugiyama K, Ohashi N, Hara-Kudo Y, Masuda, T (2012). Serotype, shiga toxin (stx) type, and antimicrobial resistance of stx-producing *Escherichia coli* isolated from humans in Shizuoka Prefecture, Japan (2003-2007). *Jpn J Infect Dis*, 65, 198-202.
- Hussein HS, Bollinger LM (2005). Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *J Food Protect*, 68, 2224-2241.
- Hussein HS, Sakuma T (2005). Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichiacoli* in dairy cattle and their products. *J Dairy Sci*, 88, 450-465,2005.
- Inat, G, Siriken B (2010). Detection of *Escherichia coli* O157 and *Escherichia coli* O157:H7 by the immunomagnetic separation technique and *stx1* and *stx2* genes by multiplex PCR in slaughtered cattle in Samsun Province, Turkey. *J Vet Sci*, 11, 321-326.
- Islam MA, Mondol AS, de Boer E, Beumer RR, Zwietering MH, Talukder KA, Heuvelink AE (2008). Prevalence and genetic characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from slaughtered animals in Bangladesh. *Appl Environ Microbiol*, 74, 5414-5421.
- Kawano K, Ono H, Iwashita O, Kurogi M, Haga T, Maeda K, Goto Y (2012). Stx genotype and molecular epidemiological analyses of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7/H-in human and cattle isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31, 119-127.
- Keen JE, Wittum TE, Dunn JR, Bono JL, Durso LM (2006). Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157 in agricultural fair livestock, United States. *Emerg Infect Dis*, 12, 780-786.
- KuyucuogluY, Seker E, Sareyyupoglu B, Gurler Z (2011). Virulence genes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from calves and cattle. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 58, 255-260.
- Money P, Kelly AF, Gould SWJ, Denholm-Price J, Threfall EJ, Fielder MD (2010). Cattle, weather and water: mapping *Escherichia coli* O157:H7 infections in humans in England and Scotland. *Environ Microbiol*, 12, 2633-2644.
- Mora A, Blanco M, Blanco JE, Alanso MP, Dhahi G, Thomson-Carter F, Usera MA, Bartolome R, Prats G, Blanco J (2004). Phage types and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolates from humans and animals in Spain: identification and characterization of two predominating phage types (PT2 and PT8). *J Clin Microbiol*, 42, 4007-4015.
- Nagano I, Kunishima M, Itoh Y (1998). Detection of verotoxin producing *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol*, 42, 371-376.
- Oporto B, Esteban I, Aduriz G, Juste RA, Hurtado A (2008). *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 shiga toxin-producing *E. coli* in healthy cattle, sheep, and swine herds in Northern Spain. *Zoonose Public Health*, 55, 73-81.
- Öngor H, Kalin R, Çetinkaya B (2007). Investigations of *Escherichia coli* O157 and some virulence genes in samples of meat and faeces clinically healthy cattle in Turkey. *Vet Rec*, 161, 392-394.
- Paton AW, Paton JC (1998). Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eae*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfb* O111 and *rfb* O157. *J Clin Microbiol*, 36, 598-602.
- Possé B, De Zutter L, Heyndrickx M, Herman, L (2007). Metabolic and genetic profiling of clinical O157 and non-O157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, 158, 591-599.
- Sanchez S, Martinez R, Rey J, Garcia A, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Herrera-Leon S, Echeita A, Alonso JM (2010). Phenogenotypic characterisation of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from domestic and wild ruminants. *Vet Microbiol*, 142, 445-449.
- Sarmehmetoğlu B, Aksoy M, Ayaz ND, Ayaz Y, Kuplulu O, Kaplan YZ (2009). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using immunomagnetic separation and multiplex PCR. *Food Control*, 20, 357-361.
- Sasaki Y, Tsujiyama Y, Kusukawa M, Murakami M, Katayama S, Yamada Y (2011). Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and O26 in beef farms. *Vet Microbiol*, 150, 140-145.
- Scott L, McGee P, Minihan D, Sheridan JJ, Earley B, Leonard N (2006). The cahracterisation of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from cattle faeces and feedlot environment using PFGE. *Vet Microbiol*, 114, 331-336.
- Shin SW, Byun JW, Jung M, Shin MK, Yoo HS (2014). Antimicrobial resistance, virulence genes and PFGE-profiling of *Escherichia coli* isolates from South Korean cattle farms. *J Microbiol*, 52, 285-293.
- Yılmaz A, Gün H, Yılmaz H (2002). Frequency of *Escherichia coli* O157:H7 in Turkish cattle. *J Food Protect*, 65, 1637-1640.
- Zhou Z, Nishikawa Y, Zhu P, Hong S, Hase A, Cheasty T, Smith HR, Zheng M, Haruki K (2002). Isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from beef, pork and cattle fecal samples in Changchun, China. *J Vet Med Sci*, 64, 1041-1044.