Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences
(*Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi*)
https://doi.org/10.35229/jaes.1897088

JAES
Year: 11, 2026 (1-9)
AÇEH
Yıl: 11, 2026 (1-9)

DERLEME MAKALESİ **REVIEW PAPER**

Shiga Toksijenik *Escherichia coli*'lerin Teşhis Yöntemleri

Murat KARAHAN[1]* | Canan KEBABÇIOĞLU[2]
[1]*Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye*

Geliş Tarihi: *25.02.2026* ***Kabul Tarihi:*** *05.05.2026*

Atıf yapmak için: **Karahan, M., & Kebabçıoğlu, C. (2026).** Shiga Toksijenik *Escherichia coli*'lerin Teşhis Yöntemleri. *Anadolu Çev. Hay. Bil. Derg.*, ***11***, 1-9. https://doi.org/10.35229/jaes.1897088

How to cite: **Karahan, M., & Kebabçıoğlu, C. (2026).** Diagnostic Methods of Shiga Toxigenic *Escherichia coli*. *J. Anatolian Envion. Anim. Sci.*, ***11***, 1-9. https://doi.org/10.35229/jaes.1897088

***Sorumlu yazarın:**
Murat KARAHAN
Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye
✉: karahan@mku.edu.tr

Öz: Shiga toksijenik *Escherichia coli* (STEC), hemorajik kolitis ve hemolitik üremik sendrom (HÜS) gibi halk sağlığı açısından oldukça önemli klinik tablolarla ilişkili önemli bir zoonotik patojendir. Shiga toksinine (*Stx1* ve *Stx2*) sahip STEC'ler gıda kaynaklı patojenler arasında oldukça önemli bir yere sahiptir. Doğru, hızlı ve etkin teşhis, STEC'lerin neden olduğu hastalıkların tedavi ve kontrolü açısından kritik öneme sahiptir. Bu derlemede STEC'in laboratuvar tanısında kullanılan başlıca teşhis yöntemlerine odaklanılmıştır. STEC'in teşhisinde geleneksel teşhis yöntemlerinden, özellikle sorbitol-MacConkey agarda sorbitol reaksiyonun değerlendirilmesi ve selektif kromojenik besiyerleri geleneksel teşhisin temelini oluşturur. Ancak non-O157 serotiplerin yaygınlığı sadece fenotipik özelliklere dayalı yöntemlerin yetersiz kalmasına yol açmıştır. Bu nedenle Shiga toksin genleri (*stx1, stx2*) ile diğer virülans genlerinin (*eae, ehxA*) saptanmasında kullanılan moleküler yöntemler ön plana çıkmıştır. Gerçek zamanlı PCR (qPCR) ve multipleks PCR teknikleri, yüksek sensitivite ile daha hızlı sonuç vermektedir. Kültür ve moleküler yöntemlerinin birlikte kullanımı, STEC enfeksiyonlarının güvenilir ve hızlı teşhisini mümkün kılmaktadır. Son dönemde kullanılan teşhis yöntemlerinden moleküler yöntemler STEC tespitinde hız ve doğruluk oranının artmasını sağlamıştır. Özellikle nükleik asit amplifikasyon teknikleri *stx1*, *stx2* ve eae gibi virülans genlerinin teşhisinde daha güvenilir sonuçlar vermektedir. Moleküler yöntemler; bakteri yükü, çevresel kontaminasyon gibi etkenlerden de etkilenmelerine rağmen, yüksek güvenirlik oranlarına sahiptirler.
Halk sağlığı, Kültür, Moleküler yöntemler, STEC, Teşhis.

Anahtar kelimeler: Halk sağlığı, kültür, moleküler yöntemler, STEC, teşhis.

Diagnostic Methods of Shiga Toxigenic *Escherichia coli*

***Corresponding author's:**
Murat KARAHAN
Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Microbiology, Hatay, Türkiye
✉: karahan@mku.edu.tr

Abstract: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is a significant zoonotic pathogen associated with clinically significant conditions such as hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome (HUS). STEC strains producing Shiga toxin (*Stx1* and *Stx2*) hold a prominent position among foodborne pathogens. Accurate, rapid, and effective diagnosis is critical for the treatment and control of diseases caused by STEC. This review focuses on the primary diagnostic methods used in the laboratory diagnosis of STEC. In the diagnosis of STEC, traditional diagnostic methods—particularly the evaluation of the sorbitol reaction on sorbitol-MacConkey agar and the use of selective chromogenic media—form the foundation of conventional diagnosis. However, the prevalence of non-O157 serotypes has led to the inadequacy of methods based solely on phenotypic characteristics. Consequently, molecular methods used to detect Shiga toxin genes (*stx1, stx2*) and other virulence genes (eae, ehxA) have come to the forefront. Real-time PCR (qPCR) and multiplex PCR techniques provide faster results with high sensitivity. The combined use of culture and molecular methods enables the reliable and rapid diagnosis of STEC infections. Among the diagnostic methods used in recent years, molecular methods have improved both the speed and accuracy of STEC detection. In particular, nucleic acid amplification techniques provide more reliable results in the detection of virulence genes such as *stx1, stx2*, and eae. Although molecular methods are influenced by factors such as bacterial load and environmental contamination, they maintain high levels of reliability.

Keywords: Culture, diagnosis, molecular methods, public health, STEC.

GİRİŞ

Shiga Toksijenik *Escherichia coli* (STEC)'lerin tipik izolasyonu gıda örneklerinin selektif besiyerlerine ekilmesi ve bunu takiben spesifik bir antikor ile kaplanmış bir immünomanyetik yakalama sistemi kullanılarak yapılmaktadır (Bell, 2002). Elde edilen suşlar daha sonra selektif agar plaklarının yüzeyine aktarılarak inkübe edilmektedir. Agar plakları üzerinde üreyen koloniler daha sonra organizmanın fenotipik özellikleri yönünden analiz edilen izolatların identifikasyonu amacıyla daha ileri biyokimyasal testler yapılır. Non-O157 STEC izolatlarının analizi için bu tip bir yöntemde kullanılacak faydalı bir izolasyon ortamı mevcut değildir. Çünkü çoğu STEC

izolatı *E. coli* gibi karakter göstermektedir. O157'nin saptanması ve tanımlanması için geliştirilen yöntemler karşılaştırıldığında, non-O157 STEC'i tespit etmek için nispeten daha az sayıda araştırma rutin veya hızlı yöntemleri ele almıştır. Bu nedenle, non-O157 STEC'i spesifik olarak izole etmek ve tanımlamak için uygun yöntemlere sahip olmak son derece önemlidir. Non-O157 STEC'lerin rutin analizlerinin olmayışının bir nedeni de dünyadaki çoğu laboratuvarın, diğer STEC serotipleri mevcut olmasına rağmen, sadece O157:H7 suşları için testleri gerçekleştirmeleridir (Vimont vd., 2006). Genel olarak, STEC'i izole etmek için tasarlanmış olan selektif zenginleştirme ortamlarının çok sayıda olmaması tarama süreçlerinde birçok laboratuvarın sınırlı kalmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte, bu serotiplerin yeni ortaya çıkıp çıkmadığı ya da yıllar boyunca tespit edilmeden var olup olmadıkları gibi soruların cevapları aranmaya devam edecektir. Bu çalışmada halk sağlığı açısından önemli olan STEC 'lerin teşhis yöntemleri üzerine yoğunlaşılmaktadır.

Zenginleştirme ve Kültür: Zenginleştirme ve kültür metotları ekim-kültür işlemlerini ve biyokimyasal testlerin kullanılmasını kapsar. Laboratuvara gelen örneklerin türüne göre kültür işleminin yönü belirlenir. Elde edilen her örnekten aynı oranda izolasyon yapılamamaktadır. Klasik yöntemlerle *E. coli* O157:H7 izolasyonunda diğer yarışmacı bakteri varlığına bağlı olarak sıklıkla yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir (Deisingh & Thompson, 2004). Benzer şekilde analiz edilen diğer mikroorganizmalarda da olduğu gibi, selektif zenginleştirme ortamı olarak kullanılan besiyerinde *E. coli* O157:H7 serotipi ile aynı düzeyde üreyebilen diğer türler selektif katı besiyerinde de rahatlıkla gelişebilmektedir (Fernández vd., 2010). Eğer başlangıçta *E. coli* O157:H7 sayısı bu bakteriler içinde yeterli bir oranda değil ise bu bakterilerin baskılaması nedeni ile analiz sonucu hatalı olarak negatif alınmaktadır. Bu yüzden vancomycin, cefixime, cefsulodin, novobiocin ve potassium tellurite içeren Modifiye Trypticase Soy Broth (mTSB), Modifiye *E. coli* Broth (mEC) ve Buffered Peptone Water (BPW) gibi ön zenginleştirme besi yerleri teşhis oranını artırmak için kullanılmaktadır (Meyer-Broseta vd., 2001). Ön zenginleştirmeye bırakılan ya da çok sayıda farklı bakteri türü barındırmayan örneklerden selektif diferensiyel katı besi yerlerine ekim yapılır.

STEC serotiplerinin hayvanlardan ve çok sayıda başka bakteri içeren gıdalardan izolasyonu, bu STEC'lerin genetik ve biyokimyasal çeşitliliği ve bazı patojenik olmayan bakterilere olan benzerlikleri nedeniyle zordur. 2006 yılında yayınlanan bir derlemede, 1997'den beri yayımlanan 132 makalede açıklanan zenginleştirme/kültür protokolleri tartışılmıştır (Vimont vd., 2006). Pek çok araştırmacı safra tuzları içeren ortamları, *Enterobacteriaceae* olmayan bakterileri ve novobiyosin gibi antibiyotikleri Gram-pozitif bakterileri inhibe etmek için kullanmıştır. Bu çalışmalarda inkübasyon süreleri ve sıcaklıklar değişkendir. Bununla birlikte, deneysel prosedürlerdeki farklılıklar nedeniyle, farklı çevresel örneklerden zenginleştirme için protokollerin nispi etkinliği hakkında kesin bir sonuç alınamamıştır (Vimont vd., 2007).

STEC'ler dışındaki bakterileri inhibe etmek için diğer antibiyotikler (sefiksim, vankomisin) ve seçici ajanlar (tellurit) kullanılmıştır, fakat O157:H7 olmayan bazı STEC'lerin bu ajanlara duyarlı olduğu bildirilmiştir (Orth vd., 2007). Bazı araştırmalar, O157:H7 olmayan bazı STEC'lerin çoğalmasının kültürde novobiyosin tarafından inhibe edildiğini ve bu antibiyotiğin kullanılmasının önerilmediğini göstermiştir (Vimont vd., 2007). Genellikle 42ºC'de inkübe edilen universal ön zenginleştirme brothu (antibiyotik içermeyen) ve modifiye novobiyosinli *Escherichia coli* broth kullanımı karşılaştırıldığında sığır eti, kanatlı eti ve turp filizlerinde universal brothun daha etkili olduğu bildirilmiştir (Vimont vd., 2007).

Bir çalışmada rapor edilen asit zenginleştirme prosedüründe fekal örneklerde diğer bakterilerden oluşan floranın önemli ölçüde azaltıldığı ve STEC suşlarının geri kazanımını arttırıldığı bildirilmiştir (Hu vd., 2009). Amerika Birleşik Devletleri Tarım Departmanı (United States Department of Agriculture, USDA) prosedürü, Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA prosedürü ve asit zenginleştirmesi olmak üzere üç farklı zenginleştirme protokolünün karşılaştırılması yapılan domuz örneklerinde, stx2 geni, asit zenginleştirmesinde diğer yöntemlere göre daha fazla oranda bulunmuştur. Bu çalışmada tüm suşlar O157:H7 olmayan STEC olarak saptanmıştır. Asit zenginleştirme ortamının test edilen tüm 31 STEC suşunun üremesini desteklediği gözlenirken, FDA ortamının 23 suşun USDA ortamının sadece 5 suşun üremesini desteklediği saptanmıştır (Grant vd., 2009).

STEC Serotiplerinin İdentifikasyonu

Kültür Yöntemleri: O157 ve non-O157 STEC suşlarını tanımlamak için tamamen güvenilir kültür yöntemleri yoktur, ancak araştırmalar bazı spesifik besin gereksinimlerinin belirli STEC serotipleriyle ilişkili olduğunu göstermektedir. *E. coli* O157:H7 sorbitol negatif olup Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) besi yerinde renksiz koloni oluştururken, sorbitol pozitif olan diğer *E. coli*'ler kırmızı renkte koloniler meydana getirir (Dejene vd., 2022). Bununla birlikte etken β-glukuronidaz özelliğine de sahip değildir ve kromojenik bir madde olan 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (BCIG) eklenerek hazırlanan (SMAC-BCIG) besi yerlerinde şeffaf renksiz koloni oluştururken O157 dışındaki diğer *E. coli* suşları mavi mor renkli koloniler oluşturur (Deshmukh vd., 2021). Cefixime Tellürite katkılı sorbitol Mac Conkey agar (CT-SMAC), Cefixime rhamnose katkılı sorbitol

MacConkey agar (CR-SMAC) gibi daha selektif hale getirilmiş katı besi yerleri mevcuttur. Cefixime sefalosporin grubunda yer alan bir antibiyotik olup *Proteus* türlerine olan baskılayıcı etkisinden dolayı kullanılmaktadır. CT-SMAC ise diğer Stx taşımayan *E. coli*'lerin üremesini belirli oranda baskılamasının yanında *Proteus, Aeromonas Morgenalla* türlerinin üremesini büyük ölçüde engellemektedir (Kim vd., 2001).

Shiga toksinleri üreten O26 suşları çoğunlukla ramnozları fermente edememektedir ve rhamnose MacConkey agar'da toksijenik olmayan suşlardan genellikle (ama her zaman değil) ayırt edilebilmektedir. 4 STEC serotipini (O26, O103, O111, O145) ayırt etmek için art arda kullanılan diferansiyel ve doğrulama ortamları geliştirilmiştir (Beutin vd., 2009). Yapay olarak kontamine edilmiş gıda örnekleri ve fekal örnekler önce novobiyosin, vankomisin, rifampisin, safra tuzları ve tellurit içeren ortamlarda zenginleştirilmiştir. Sorbose ve sukroz içeren birinci diferansiyel ortamda, non-O157 STEC suşları farklı renkli koloniler üretmişlerdir. Bunlar daha sonra konfirmasyon için D-arabinoz, D-rafinoz, L-ramnoz veya dulcitol içeren ortamlara ekilmiştir. Farklı kaynaklardan elde edilen tüm serotiplerin izolasyon verimliliği çiğ süt, pastörize sütle yapılan peynir, çiğ sütle yapılan peynir, kıyma, fermente et ve sığır dışkısında STEC için sırasıyla %100, %82,3, %88,5, %65,9, %64,3 ve%13,6 olarak bulunmuştur (Possé vd., 2008).

İmmunomanyetik Separasyon (IMS): Gıda ve dışkı örneklerinden STEC izolasyonunda yoğun refakatçı flora varlığına bağlı olarak klasik yöntemlerle sıklıkla yanlış negatif sonuçlar alınmış, selektif zenginleştirme ortamı olarak kullanılan besiyerlerinde STEC ile birlikte diğer mikroorganizmaların ürediği gözlenmiştir (Fu ve ark., 2005). Buna çözüm olarak direkt örneğe ya da ön zenginleştirme besiyerine, etkene spesifik antikorlar ile kaplı manyetik boncukları içeren solüsyon eklenerek etkenin saf olarak izolasyonu amaçlanmaktadır. Bu yöntem immunomanyetik separasyon (IMS) olarak adlandırılmakta ve USDA, FDA ve CDC tarafından STEC izolasyonu için ön zenginleştirmeyi müteakip kullanılması önerilmektedir (FDA, 2026; USDA, 2026) .*E. coli* O157 izolasyonunda ön zenginleştirme sonrası İMS ve selektif besiyerine ekim yapılır. Selektif besiyerinde üreyen şüpheli kolonilere PCR uygulanarak virulens genleri tespit edilir. Benzer şekilde O26, O111, O103, O104, O121, O45 ve O145 için de ticari olarak manyetik boncuklar bulunmaktadır ve IMS ile izolasyon gerçekleştirilebilmektedir. Bu teknikte etkene spesifik beads ile işaretli antiserumla etken kontamine materyallerden saf olarak izole edilebilir (Safarik vd., 1995).

İmmunoanalizler: *E. coli* serotipleri, hücre yüzeyleri üzerinde O ve H antijenlerini hedefleyen immünoanalizler tanımlanabilir. Bu yöntemlerden en sık ve kolay uygulananları Lateks aglutinasyon testi ve H7 antiserumu ile İmmobilizasyon testidir. Lateks aglutinasyon testinde O157 antijenine spesifik antikorlar bulunmaktadır. SMAC besi yerinden alınan sorbitol ve β glukoronidaz negatif olan kolonilerde uygulanır. İmmobilizasyon testi ise yarı katı besi yerinde H7 anti serumu katılan örneklerde hareketin olup olmamasına göre değerlendirilir (Deisingh & Thompson, 2004).

En yaygın O157 olmayan serotipler için antiserumlar (O26, O45, O103, O111, O121, O145) ticari olarak temin edilebilir ve birçok STEC izolatını tanımlamak için kullanılabilir (Gould vd., 2009). Antikorlar, immünomanyetik-ayırma boncukları üzerine kaplanabilir ve çok sayıda STEC serotipini saçan sığırları tespit etmek için potansiyel olarak yararlı olabilir. Ancak bu yöntemler STEC sayıları düşük olduğunda güvenilir değildir.

Bu yöntemlerin yanı sıra diğer serolojik metotlardan, özellikle, immunoassay, radioimmunoassay (RIA), fluorescent immunoassay (FIA), enzim immunoassay (EIA), immun peroksidaz immunoblot ve ELISA testleriyle bakterilerin belirlenmesinde daha güvenli ve erken sonuçlar alınmaktadır.

Serotip Spesifik Genler için PCR: Son yıllarda genetik materyali hedef alan moleküler yöntemler mikroorganizmaların teşhisi için sıklıkla kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan tekniklerden birisi olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bakterilerin teşhisinde çok önemli bir metot haline gelmiştir (Jajarmi vd., 2017). PCR, serotipi doğrulamada ve virulens faktörlerini ortaya koymada oldukça güvenilir bir moleküler yöntemdir. PCR ile O ve H antijenlerini kodlayan genler teşhis edilerek serotip teyit edilmektedir. Etkene ait virulens genlerinin teşhisinde stx_1, stx_2, *eae* ve *ehxA* gen bölgelerine spesifik PCR metotları geliştirilmiştir (Fernández vd., 2010).

Farklı serotiplere özgü DNA varyantlarını hedefleyen PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlar genellikle Shiga toksinlerini veya diğer virülens faktörlerini kodlayan genleri tespit eden PCR analizleriyle bir arada kullanılmaktadırlar. Bazı analizler, O26 ve O103 serotipindeki *wzx* geni gibi O antijeni ile ilişkili bir geni hedeflerken, diğerleri O111:H8 ve O26:H11 için tarif edilen metotlarda olduğu gibi hem O hem de H antijenleri ile ilişkili olan genleri hedeflemektedir. Multipleks yöntemler, dört veya beş farklı O grubunun O-antijen gen kümelerinde bulunan spesifik genlerini tespit edebilmektedir. Bu prosedürler gıdalardan ve fekal örneklerden izole edilen serotipleri tanımlayabilir (Beutin vd., 2009).

EFSA yapılan bilimsel çalışmalardaki izolasyon prosedürlerindeki farklılıklardan dolayı non-O157 STEC prevalansının %0-30 arasında değiştiğini, PCR ile daha

yüksek oranda pozitif örnek saptanabildiğini rapor etmiştir (EFSA, 2010). PCR ile yapılan çalışmalarda farklı serotiplerde STEC teşhisi mümkün olabilmektedir. Ayrıca multipleks PCR (mPCR) da teşhiste sıklıkla kullanılmaktadır. Multipleks PCR, birden çok gen bölgesini çok sayıda primer çifti kullanarak bir defada amplifiye edebilmektedir. Non-O157 STEC serotiplerini identifiye etmek için mPCR protokolleri geliştirilmiştir (Sánchez vd., 2015). Ancak bu yöntemlerle bir veya birkaç serotip ve birkaç virulens geni saptanabilmektedir. O157 ve en yaygın 6 non-O157 serotipinin birlikte teşhis edilebildiği mPCR yöntemi ile virulens genlerini de içeren birden fazla gen araştırılabilmektedir (Ludwig vd., 2020).

Günümüzde konvansiyonel PCR yerini Real-time PCR yöntemine bırakmaktadır. Real-time PCR (quantitative PCR) yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle, kantitatif sonuç alınabilen bir PCR yöntemidir. Sıcaklık döngüleri ve floresan okunması aynı cihaz içinde ve aynı tüp içinde gerçekleşmektedir. Böylece hedef bölge, elektroforeze gerek kalmadan kısa bir süre içinde saptanabilmektedir. Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işleminin hem de çoğaltılan ürünleri saptama işleminin yapılabilmesi, bu yöntemi çok pratik bir yöntem haline getirmiştir. Ayrıca tüpler açılmadan test tamamlandığı için kontaminasyon riski de azalmaktadır (Ruijter vd., 2021). Başta *E. coli* O157:H7 olmak üzere farklı örneklerden birçok STEC ve bunlara ait virülens genlerinin saptanmasına yönelik qPCR yöntemleri geliştirilmiştir (Bell, 2002; Delannoy vd., 2012; Liu vd., 2009; Margot vd., 2013). Ruminantlar özellikle sığırlar etkenlerin rezervuarı kabul edilmesi nedeniyle hayvanlarda, gıda amaçlı tüketilen hayvansal ürünlerde ve sebzelerde STEC identifikasyonunda qPCR çok sık kullanılmaktadır. Multipleks Real-time PCR yöntemleri ise eş zamanlı olarak farklı etken ve virülens genlerinin teşhisinde büyük öneme sahiptir (Branley vd., 2021)

Shiga Toksin Tespiti

Toksinlerin İmmunoanalizleri: STEC enfeksiyonlarının teşhisi için çok sayıda ticari immunoassay kiti FDA tarafından onaylanmıştır. Bunlardan bazıları;

Biostar OIA SHIGATOX: *stx1* ve *stx2* arasında ayrım yapmayan bir optik immunoanaliz olup brothlar ve dışkı örneklerinde toksin tespit edebilmektedir. Duopath Verotoxin Testi: İzole edilen bakteri kültürlerinde Shiga toksin 1 ve 2'yi bir saatten daha kısa sürede tespit ve ayırt edebilir, İmmünokard STATEHEC: İzole edilen bakteri kültürlerinde Shiga toksinl 1 ve 2'yi bir saatten daha kısa sürede ayırt edebilmektedir (Gould vd., 2009), Premier EHEC: Stx1 ve Stx2 arasında ayrım yapmaz ve gerçekleştirilmesi için birkaç saat süre gereklidir. Bu yöntem dışkı örneklerinde ve zenginleştirme brothlarında toksinleri tespit edebilir. Dışkı örneklerinde stx konsantrasyonları tipik olarak çok düşüktür, ancak zenginleştirme brothlarında tespiti daha iyidir, ProSpecT Shiga Toksin *E. coli* Microplate Assay: Stx1 ve Stx2'yi ayırt etmez ve gerçekleştirilmesi için birkaç saat süre gereklidir. Dışkı örneklerinde ve zenginleştirme brothlarında toksinleri tespit edebilir. Sonuçlar genellikle broth kültür testlerinden daha iyidir (Gavin vd., 2004), VTEC Screen "Seiken": *stx1* ve *stx2*'yi ayırt eder ve gerçekleştirilmesi için birkaç saat süre gereklidir. İzole edilen bakteri kültürlerindeki toksinleri tespit eder.

2007 yılında yayınlanan Ridascreen Verotoxin Immunoassay'in bir değerlendirmesinde, bakteriyel izolatların rutin taramalarında Stx1 ve Stx2'nin bilinen tüm varyantlarını tespit edebildiği belirtilmiştir (Beutin & Strauch, 2007). Daha sonra yapılan bir çalışmada ise bu test ile birlikte Premier EHEC ve ProSpecT testlerinin, bazı Stx2 varyantlarını tespit edemediği bulunmuştur. ProSpecT testi diğer iki testten yaklaşık on kat daha az duyarlı bulunmuş ve Premier EHEC testinden sığır taramalarında yararlanılabileceği bildirilmiştir (Willford vd., 2009).

Toksin Proteinleri İçin Nanopartikül Yöntemi: *Stx*, terminal Gal-α1,4-Gal disakkaridleri ihtiva eden hücre yüzey reseptörlerine bağlanır. Glycopolydiacetylene nanopartiküllerinin, yüzeylerindeki Gal-α1,4-Gal disakkaritleri ile, *stx*'e bağlandıklarında mordan kahverengiye renk değiştirdikleri bulunmuştur. Bu nanopartiküller, 10 dakika içinde *stx* üreten ve üretmeyen *E. coli* suşları arasında ayrım yapabilmektedir (Nagy vd., 2008).

Toksin Genleri için PCR: *Stx* genleri için PCR analizleri genellikle, doğrudan gıdalardan veya fekal örneklerden ekstrakte edilen bakteriyel DNA'dan ziyade, zenginleştirici brothlarda büyüyen ortam veya bakteriden izole edilen DNA'ları test etmek için tasarlanmıştır. Ancak son yıllarda insan dışkı örneklerinden, sığır dışkılarından ve gıdalardan STEC tanımlanması için PCR prosedürleri geliştirilmiş ve değerlendirilmiştir (Grys vd., 2009; Sepehriseresht vd., 2008). Multiplex PCR (mPCR) ve real-time PCR *E. coli* O157:H7'nin teşhisinde en çok kullanılanlardır. mPCR birden çok hedefi çok sayıda primer çifti kullanılarak bir defada amplifiye eder. mPCR ile 5 primer setini kulanarak *eaeA, stx1, stx2, fliC* ve *rfbE* gen bölgeleri amplifiye edilmiştir (Hu vd., 2009). Bazı multipleks PCR testleri, enterohemorajik, enteroinvaziv, enteropatojenik, enterotoksijenik ve enteroaggregatif suşlarda bulunan virulens genleri hedef alan diyarejenik *E. coli*'lerin farklı tiplerini ortaya koymak için tasarlanmıştır (Guion vd. 2008). O26, O103, O111 ve O157'nin karakteristik DNA sekansları ve stx ile intimini hedefleyen genlerin multipleks bir yöntemi olarak GeneDisc yönteminin değerlendirmesinde, metodun çok sensitif ve

sadece 2-3 STEC kolonisini tespit edilebildiği bildirilmiştir (Beutin & Strauch, 2007). Antikor yakalama ve DNA amplifikasyonu kombinasyonu olan son derece yüksek duyarlı immüno-PCR yönteminde, 10 pg *stx2*/ml (1 ng saptayabilen ticari bir immunoaasay ile karşılaştırıldığında) tespit edebildiği bildirilmiştir (Zhang vd., 2008)

Toksin Genleri İçin LAMP (Spiral Aracılı İzotermal Amplifikasyon) Testi: Nükleik asit amplifikasyon temelli olan bu metot, tek bir sıcaklık adımında hedef geni amplifiye etmek için 4 veya 6 primerin kullanıldığı PCR'den farklı bir yöntemdir. Bu yöntemde amplifikasyon ürünleri reaksiyonların yan ürünü olan magnezyum pirofosfatın çözünmemesinden dolayı bulanıklık tarzında tespit edilmektedir. Bu çökeltinin neden olduğu bulanıklık, sentezlenen DNA miktarı ile ilişkilidir. Kıymaların zenginleştirme brothlarından ekstrakte edilen DNA'lar *stx* hedeflenerek LAMP yöntemiyle analiz edildiğinde bir takım STEC serotipleri tespit edilmiştir (Hara-Kudo vd., 2008).

Alt Tiplendirme Yöntemleri: Özellikle şüpheli salgın durumlarında, bulaşma yollarının izlenmesi ve salgınların derecesini belirlemek için nedensel patojeni spesifik olarak belirlemek önemlidir. EHEC O157:H7 suş tiplendirme ya da alt tiplendirme çalışmalarında fenotipik veriler, DNA ya dayalı genotipik veriler ve genotipik analiz teknikleri kullanır. Suş tiplendirmede ve epidemiyolojik çalışmalarda salgınları tanımlamaya yardımcı olması sebebiyle, insanlarda görülen EHEC O157:H7 izolatları arasındaki ilişkiyi belirlemede büyük öneme sahiptir**.** O 157 grubunda alt tiplendirme suşların homojen özellikte olmaları yüzünden zordur (Kim vd., 2001)**.** EHEC O157:H7 suşları çok az genetik farklılığa sahip olup yüksek oranda korunmuş gibi gözükmektedir. Alt tiplendirmede başvurulan fenotipik metotları faj tiplendirme, toksin tipinin belirlenmesi oluşturmaktadır. DNA kullanarak yapılan genotipik tiplendirme metotları plazmid tiplendirme, restriction fragment length polymorphisms (RFLP), ribotiplendirme, pulsed field gel electrophoresis **(**PFGE), Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) tekniklerini içerir.

Faj tiplendirme litik fajları izolatlara uygulayarak değişik fajların lizis modellerinin değerlendirilmesiyle yapılır**.** Faj tiplendirme şeması Khakhria tarafından yapılmıştır ve 82 alt tipin ayrımını yapabilmektedir. Teknik olarak basit ve referans laboratuvarlarda standardize edilmiş olmasına rağmen faj tiplendirmeyle ilgili problemler yaygın kullanımını engellemektedir. Bu problemler çok uzun zaman gerektiren bekletme, üretme, koruma, izleme ve fajların test edilmesi işlemlerinden meydana gelmektedir. Toksin tipinin ortaya konması da düşük ayrım gücüne sahiptir çünkü sadece 3 fenotip bulunmaktadır. İzolatlar yalnız Stx_1'i, yalnız Stx_2'yi ya da her ikisine birden barındırabilirler. Dolayısıyla taşıdıkları toksin tipine göre suşlar karşılaştırıldığında iki suş arasındaki ilişkiyi açıklamada bu yöntem yetersiz kalacaktır. İzolatlardaki Stx_1 ve Stx_2'yi tespit etmek için çoğunlukla PCR kullanılmaktadır.

Plazmid profilinin belirlenmesi insanlarda görülen ilk EHEC O157:H7 salgınlarında geniş ölçüde kullanılmıştır. Bu yöntemde plazmidler jelde elektroforetik olarak ayrılır, plazmid büyüklüğüne ve sayısına göre ayrımı yapılır. Suşların özel plazmidlerine restriksiyon enzimleri uygulanarak daha ileri ayrım yapılabilir. Son yapılan çalışmalar plazmid profilinin belirlenmesinin suş tiplendirmede yetersiz kaldığını göstermektedir (Sammarco vd., 2014).

RAPD, rastgele geliştirilmiş primerler DNA ürünlerini PCR ile amplifiye etmek için kullanılır. Suşları ve DNA kalıplarını ayırmada başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Alt tiplendirme için sonuçların tekrar edilebilirliği sınırlıdır. Bu yöntemde rastgele bir sekans için 8-10 bazlık primerler kullanılır ve uyan sekanslar amplifiye edilir**.** Sonuçların tekrar edilebilirliği sağlanırsa RAPD kullanışlı bir alt tiplendirme metodu olabilir (Avzun vd., 2025).

RFLP; DNA'nın 4-6 bp'lik spesifik tanıma bölgesini içeren sabit bir pozisyonda kesim yapan bir restriksiyon endonukleaz enzimi ile muamele edilmesi sonucu oluşturulan parçaların uzunluk ve sayı yönünden karşılaştırılması yöntemidir. Kolay gerçekleştirilen bir işlem olmasından dolayı yaygın bir uygulama alanına sahiptir.

PFGE tekniğinde saf kültürlerden elde edilen bakteriler eritilmiş agaroz jel içerisinde plug adı verilen kaplarda bloklanır ve bu agaroz blok, önce deterjan ve enzimle muamele edilerek bakterilerin genomik DNA'sı elde edilir ve sonra da spesifik bir restriksiyon enzimi ile kesilir. Makro boyutta kesilen DNA fragmentleri dalgalı, değişken, dik elektriksel sahada CHEF (countour-clamped homogeneous field electrophoresis) tekniğini kullanarak agaroz jelde separe edilir. Bu teknikte 30'dan az DNA fragmenti üretilir. 20 ile 700 kb uzunluğundaki 10-20 fragment standart protokollerde kullanılan restriksiyon enzimi olan *Xba*I kullanılır. Elektroforez aygıtında yürütüldükten sonra oluşan görünümü gözlemlemek için jel ethidium bromide ile boyanarak yorumlanır (Kovac vd., 2022).

PFGE analizinde sonuçların, türler arasındaki genetik ve epidemiyolojik ilişkilere göre kategorileri ve bunlara neden olan durumlar 4 şekilde ortaya çıkar. 1) Karşılaştırılan suşların restriksiyon görünümleri aynı sayıda banda sahip ve bant uzunlukları birbirine aynen uyuyorsa, izolatların genetik olarak farksız olduğu kabul edilir. 2) İncelenen izolatlar arasında DNA da tek bir bazın yer değiştirmesi veya mutasyonu sonucunda değişiklik

saptanıyorsa ve fark 2-3 bant ile sınırlıysa iki suşun yakın ilişkili olduğu kabul edilir. 3) Karşılaştırılan iki suş arasında iki bağımsız bazın yer değiştirmesi veya mutasyonuna bağlı olarak 4-6 bant farklı olarak gözlemlenirse aralarında muhtemel ilişki olduğu kabul edilir ve suşlar aynı soya ait fakat yakın ilişkili değil diye nitelendirilir. 4) Üç veya daha fazla bazı içeren ve 7 veya daha fazla bant farklılığı gösteren suşlar ilgisiz kabul edilir (da Cunha, 2019).

PFGE metodu, ABD'de CDC pulsnet üyeleri tarafından kullanılan bir alt tiplendirme metodudur. Vaka izleme, araştırma ve sığırların STEC O157:H7 saha izolatlarının epidemiyolojisini belirlemede en yaygın kullanılan alt tiplendirme yöntemidir. Karşılaştırmalı çalışmalar göstermiştir ki PFGE, faj tiplendirme, plazmid profilinin belirlenmesi ve toksin tiplendirmeyle kıyaslandığında ayrım gücü en yüksek alt tiplendirme metodudur (Wang & Liu, 2013). PFGE sonuçları tekrarlanabilir bir teknik olup laboratuvarlar arası sonuçlar mukayese edilebilir niteliktedir. Dezavantajı ise zaman alan ve pahalı bir teknik olmasıdır. PFGE'yi iki restriksiyon enzimiyle paralel yapmak ayrım gücünü artırmaktadır, fakat çok zaman ve iş gücü gerektirmektedir. Epidemiyolojik saha çalışmalarında mümkünse karma alt tiplendirme metotları kullanılması önerilmektedir (Chui & Li, 2015).

STEC'te kromozomun belirli kısımlarında insersiyon ve delesyonlar ve bakteriyofajlar tarafından taşınan genetik bilgiden dolayı büyük genetik çeşitlilik vardır. PFGE yöntemi, belirli DNA sekanslarının restriksiyon enzimleri tarafından kesilmesi suretiyle ortaya çıkan kromozom fragmanlarının paternlerini analiz eden ve yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu analizler, 2006 yılında Norveç'te STEC O103:H25'in neden olduğu bir salgında fermente bir sucuğun, Belçika salgınına bağlı olarak ise dondurma kontaminasyonunun ortaya çıkarılmasında yani hastalığın bulaşma kaynağının tespit edilip izlenmesinde yardımcı olmuştur (Sekse vd., 2009).

SONUÇ VE TARTIŞMA

Sonuç olarak Shiga Toksijenik *Escherichia coli*'lerin teşhisi, geleneksel kültür yöntemlerinden daha ileri moleküler tekniklere varan laboratuvar yaklaşımı gerektirmektedir. Halk sağlığı açısından oldukça önemli olan non-O157 serotiplerin prevalansı gün geçtikçe artığından yalnızca fenotipik yöntemlere dayalı teşhis yöntemleri yetersiz kalmakta; moleküler teşhis yöntemleri doğruluk açısından daha güvenilir kabul edilmektedir. Moleküler yöntemlerden PCR yüksek sensitivite ve hızlı teşhis avantajına sahipken, geleneksel yöntemler epidemiyolojik tiplendirme ve antimikrobiyal duyarlılık testleri için hâlâ altın standarttır. Dolayısıyla ideal tanı stratejisi, toksin genlerinin tespiti ile kültür işlemlerinin kombinasyonuna dayanmalıdır. Klinik laboratuvarlarda standardize edilmiş, teşhis protokollerinin uygulanması; erken müdahale, komplikasyonların azaltılması ve halk sağlığı açısından kritik öneme sahiptir.

Yazar Katkı Oranı Beyanı/Author Contribution Rate: *Murat KARAHAN*: Literatür araştırması, makale yazımı, elde edilen verilerin yorumlanması ve düzenleme; *Canan KEBABÇIOĞLU:* Literatür araştırması, makale yazımına destek.

KAYNAKLAR

Avzun, T., Nitayanon, P., Yungyuen, T., Kamolvit, W., Wongsurawat, T., Chewapreecha, C., & Thaipisuttikul, I. (2025). Clonal dissemination of drug-resistant Acinetobacter baumannii in Thailand: insights from nationwide molecular typing. *J Infect Dev Ctries,* ***19***(10), 1487-1494. https://doi.org/10.3855/jidc.21062

Bell, C. (2002). Approach to the control of entero-haemorrhagic Escherichia coli (EHEC). *Int J Food Microbiol,* ***78***(3), 197-216. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00188-5

Beutin, L., Jahn, S., & Fach, P. (2009). Evaluation of the 'GeneDisc' real-time PCR system for detection of enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC) O26, O103, O111, O145 and O157 strains according to their virulence markers and their O- and H-antigen-associated genes. *J. Appl. Microbiol.,* ***106***(4), 1122-1132. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04076.x

Beutin, L., & Strauch, E. (2007). Identification of sequence diversity in the Escherichia coli fliC genes encoding flagellar types H8 and H40 and its use in typing of Shiga toxin-producing E. coli O8, O22, O111, O174, and O179 strains. *J Clin Microbiol,* ***45***(2), 333-339. https://doi.org/10.1128/jcm.01627-06

Branley, J., Trewin, A., Gray, T. J., & Polkinghorne, A. (2021). Rapid detection of enteric pathogens in a medical assistance team by real-time multiplex PCR. *Pathology,* ***53***(2), 290-292. https://doi.org/10.1016/j.pathol.2020.06.024

Chui, L., & Li, V. (2015). Chapter 8 - Technical and Software Advances in Bacterial Pathogen Typing. In A. Sails & Y.-W. Tang (Eds.), *Methods in Microbiology* (Vol. 42, pp. 289-327): Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.mim.2015.06.003

da Cunha, M. d. L. R. d. S. (2019). Molecular Biology in Microbiological Analysis. In *Reference Module in Food Science*: Elsevier.

https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22935-1

Deisingh, A. K., & Thompson, M. (2004). Strategies for the detection of Escherichia coli O157:H7 in foods. *J Appl Microbiol,* ***96***(3), 419-429. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2003.02170.x

Dejene, H., Abunna, F., Tuffa, A. C., & Gebresenbet, G. (2022). Epidemiology and Antimicrobial Susceptibility Pattern of E. coli O157:H7 Along Dairy Milk Supply Chain in Central Ethiopia. *Vet Med (Auckl),* ***13***, 131-142. https://doi.org/10.2147/vmrr.S366888

Delannoy, S., Beutin, L., Burgos, Y., & Fach, P. (2012). Specific detection of enteroaggregative hemorrhagic Escherichia coli O104:H4 strains by use of the CRISPR locus as a target for a diagnostic real-time PCR. *J Clin Microbiol,* ***50***(11), 3485-3492. https://doi.org/10.1128/jcm.01656-12

Deshmukh, R., Bhand, S., & Roy, U. (2021). BCIG-SMAC medium and PMA-qPCR for differential detection of viable Escherichia coli in potable water. *Iran J Microbiol,* ***13***(5), 624-631. https://doi.org/10.18502/ijm.v13i5.7427

EFSA. (2010). The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal,* ***8***(1), 1496. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1496

FDA. (2026). Testing methodologies for E. coli O157: H7 and Salmonella species in spent sprout irrigation water (or sprouts). *October, Version, 1*. https://www.fda.gov/media/94349/download

Fernández, D., Irino, K., Sanz, M. E., Padola, N. L., & Parma, A. E. (2010). Characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from dairy cows in Argentina. *Lett Appl Microbiol,* ***51***(4), 377-382. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02904.x

Gavin, P.J., Peterson, L.R., Pasquariello, A.C., Blackburn, J., Hamming, M.G., Kuo, K. J., & Thomson, R.B., Jr. (2004). Evaluation of performance and potential clinical impact of ProSpecT Shiga toxin Escherichia coli microplate assay for detection of Shiga Toxin-producing E. coli in stool samples. *J Clin Microbiol,* ***42***(4), 1652-1656. https://doi.org/10.1128/jcm.42.4.1652-1656.2004

Gould, L.H., Bopp, C., Strockbine, N., Atkinson, R., Baselski, V., Body, B., &Gerner-Smidt, P. (2009). Recommendations for diagnosis of shiga toxin--producing Escherichia coli infections by clinical laboratories. *MMWR Recomm Rep,* ***58***(Rr-12), 1-14. https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5812a1.htm

Grant, M.A., Mogler, M.A., & Harris, D.L. (2009). Comparison of enrichment procedures for shiga toxin-producing Escherichia coli in wastes from commercial swine farms. *J Food Prot,* ***72***(9), 1982-1986. https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.9.1982

Grys, T. E., Sloan, L. M., Rosenblatt, J. E., & Patel, R. (2009). Rapid and sensitive detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli from nonenriched stool specimens by real-time PCR in comparison to enzyme immunoassay and culture. *J Clin Microbiol,* ***47***(7), 2008-2012. https://doi.org/10.1128/jcm.02013-08

Hara-Kudo, Y., Konishi, N., Ohtsuka, K., Hiramatsu, R., Tanaka, H., Konuma, H., & Takatori, K. (2008). Detection of Verotoxigenic Escherichia coli O157 and O26 in food by plating methods and LAMP method: a collaborative study. *Int J Food Microbiol,* ***122***(1-2), 156-161. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.078

Hu, J., Green, D., Swoveland, J., Grant, M., & Boyle, D. S. (2009). Preliminary evaluation of a procedure for improved detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli in fecal specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis,* ***65***(1), 21-26. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.05.012

Jajarmi, M., Imani Fooladi, A. A., Badouei, M. A., & Ahmadi, A. (2017). Virulence genes, Shiga toxin subtypes, major O-serogroups, and phylogenetic background of Shiga toxin-producing Escherichia coli strains isolated from cattle in Iran. *Microb Pathog,* ***109***, 274-279. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.05.041

Kim, J., Nietfeldt, J., Ju, J., Wise, J., Fegan, N., Desmarchelier, P., & Benson, A. K. (2001). Ancestral divergence, genome diversification, and phylogeographic variation in subpopulations of sorbitol-negative, beta-glucuronidase-negative enterohemorrhagic Escherichia coli O157. *J Bacteriol,* ***183***(23), 6885-6897. https://doi.org/10.1128/jb.183.23.6885-6897.2001

Kovac, J., Rolon, M. L., Naum, M., & Lampel, K. A. (2022). DNA-Based Assays☆. In P. L. H. McSweeney & J. P. McNamara (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition)* (pp. 356-362). Oxford: Academic Press.

https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00157-4

Liu, J., Sun, Y., Feng, S., Zhu, L., Guo, X., & Qi, C. (2009). Towards an attenuated enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 vaccine characterized by a deleted ler gene and containing apathogenic Shiga toxins. *Vaccine, **27***(43), 5929-5935. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.097

Ludwig, J. B., Shi, X., Shridhar, P. B., Roberts, E. L., DebRoy, C., Phebus, R. K.,Nagaraja, T. G. (2020). Multiplex PCR Assays for the Detection of One Hundred and Thirty Seven Serogroups of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Associated With Cattle. *Front Cell Infect Microbiol, **10***, 378. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00378

Margot, H., Cernela, N., Iversen, C., Zweifel, C., & Stephan, R. (2013). Evaluation of seven different commercially available real-time PCR assays for detection of shiga toxin 1 and 2 gene subtypes. *J Food Prot, **76***(5), 871-873. https://doi.org/10.4315/0362-028x.Jfp-12-365

Meyer-Broseta, S., Bastian, S. N., Arné, P. D., Cerf, O., & Sanaa, M. (2001). Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with Escherichia coli serogroup O157:H7. *Int J Hyg Environ Health, **203***(4), 347-361. https://doi.org/10.1078/1438-4639-4410041

Nagy, J. O., Zhang, Y., Yi, W., Liu, X., Motari, E., Song, J. C.,Wang, P. G. (2008). Glycopolydiacetylene nanoparticles as a chromatic biosensor to detect Shiga-like toxin producing Escherichia coli O157:H7. *Bioorg Med Chem Lett, 18*(2), 700-703. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.11.055

Orth, D., Grif, K., Dierich, M. P., & Würzner, R. (2007). Variability in tellurite resistance and the ter gene cluster among Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from humans, animals and food. *Res Microbiol, **158***(2), 105-111. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.10.007

Possé, B., De Zutter, L., Heyndrickx, M., & Herman, L. (2008). Quantitative isolation efficiency of O26, O103, O111, O145 and O157 STEC serotypes from artificially contaminated food and cattle faeces samples using a new isolation protocol. *J Appl Microbiol, **105***(1), 227-235. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03739.x

Ruijter, J.M., Barnewall, R.J., Marsh, I.B., Szentirmay, A.N., Quinn, J.C., van Houdt, R., & van den Hoff, M.J.B. (2021). Efficiency Correction Is Required for Accurate Quantitative PCR Analysis and Reporting. *Clinical Chemistry, **67***(6), 829-842. https://doi.org/10.1093/clinchem/hvab052

Safarik, I., Safaríková, M., & Forsythe, S.J. (1995). The application of magnetic separations in applied microbiology. *Journal of Applied Bacteriology, **78***(6), 575-585. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03102.x

Sammarco, M. L., Ripabelli, G., & Tamburro, M. (2014). Molecular epidemiology of infectious diseases: analytical methods and results interpretation. *Ann Ig, **26***(1), 10-45. https://doi.org/10.7416/ai.2014.1956

Sánchez, S., Llorente, M. T., Echeita, M. A., & Herrera-León, S. (2015). Development of three multiplex PCR assays targeting the 21 most clinically relevant serogroups associated with Shiga toxin-producing E. coli infection in humans. *PLoS One, **10***(1), e0117660. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117660

Sekse, C., O'Sullivan, K., Granum, P.E., Rørvik, L.M., Wasteson, Y., & Jørgensen, H.J. (2009). An outbreak of Escherichia coli O103:H25 - bacteriological investigations and genotyping of isolates from food. *Int J Food Microbiol, **133***(3), 259-264. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.026

Sepehriseresht, S., Salehi, T., Sattari, M., Tadjbakhsh, H., & Aslani, M. (2008). Detection of shigatoxigenic Escherichia coli from fecal samples of calves and cattle by molecular and serological methods. *Comparative Clinical Pathology, **18***, 53-57. https://doi.org/10.1007/s00580-008-0755-x

USDA. (2026). Detection, Isolation, and Identification of Top Seven Shiga Toxin-Producing Escherichia coli (STEC) from Meat Products, Carcass, and EnvironmentalSponges. Retrieved from https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/documents/MLG-5C.04.pdf

Vimont, A., Delignette-Muller, M. L., & Vernozy-Rozand, C. (2007). Supplementation of enrichment broths by novobiocin for detecting Shiga toxin-producing Escherichia coli from food: a controversial use. *Lett Appl Microbiol, **44***(3), 326-331. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02059.x

Vimont, A., Vernozy-Rozand, C., & Delignette-Muller, M. L. (2006). Isolation of E. coli O157:H7 and non-O157 STEC in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols. *Lett Appl Microbiol, **42***(2), 102-108.

https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01818.x

Wang, C. X., & Liu, S. L. (2013). Pulsed-field Gel Electrophoresis. In S. Maloy & K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* (pp. 529-531). San Diego: Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01241-9

Willford, J., Mills, K., & Goodridge, L. D. (2009). Evaluation of Three Commercially Available Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for Detection of Shiga Toxin. *Journal of food protection,* ***72***, 741-747. https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.4.741

Zhang, W., Bielaszewska, M., Pulz, M., Becker, K., Friedrich, A. W., Karch, H., & Kuczius, T. (2008). New immuno-PCR assay for detection of low concentrations of shiga toxin 2 and its variants. *J Clin Microbiol,* ***46***(4), 1292-1297. https://doi.org/10.1128/jcm.02271-07