

Praca oryginalna

Original paper

Zastosowanie specyficznych dla toksyn Shiga sond DNA znakowanych digoksygeniną do oznaczania w kale bydła shigatoksycznych szczepów *Escherichia coli* (STEC)*)

JACEK OSEK, PETER GALLIEN*

Zakład Mikrobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

*Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine (BgVV), Jahnstr. 8, D-06846 Dessau, Niemcy

Osek J., Gallien P.

Application of Shiga toxin-specific digoxigenin-labeled DNA probes for identification of Shigatoxigenic *Escherichia coli* strains (STEC) in bovine feces

Summary

The aim of the present study was to develop and validate a method for specific identification of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in bovine feces by the use of DIG-labeled DNA probes. The *stx1*- and *stx2*-specific probes were prepared by means of PCR with *stx1*- and *stx2*-positive reference *E. coli* strains, respectively. The nylon membranes were utilized for making replicas from the LB or MacConkey's master plates that had been inoculated with bovine feces artificially infected with *stx*-positive or *stx*-negative *E. coli* bacteria. The membranes were then incubated with *stx*-specific probes, anti-DIG conjugates, and developed with enzyme substrates (BCIP and NBT). Dark spots visible on the replicas were observed which corresponded to the *stx*-positive *E. coli* colonies on the master agar plates. Those bacteria were then isolated and characterized using multiplex PCR for the amplification of the *rfbO157* (LPS O157), *eaeA* (intimin), and *stx1/stx2* (Shiga toxins) genes. The analysis of the 69 bovine fecal samples derived from animals naturally infected with STEC demonstrated that 41 of them were either *stx1*-, *stx2*- or *stx1/stx2*-positive. The present method may be used for the identification and characterization of bacteria belonging to the STEC group in feces of bovine origin, which is the natural reservoir of these microorganisms.

Keywords: *E. coli*, bovine feces, genetic probes, Shiga toxins, multiplex PCR

Szczepy *Escherichia coli* wytwarzające toksyny Shiga Stx1 i/lub Stx2 (Shigatoxin-producing *E. coli*; STEC) są groźnym dla ludzi czynnikiem chorobotwórczym, wywołującym krwotoczne zapalenie jelita grubego (hemorrhagic colitis; HC) oraz hemolityczny zespół mocznicowy (hemolytic uremic syndrome; HUS) (2, 7, 12). Źródłem STEC jest głównie bydło, które będąc bezobjawowym nosicielem, wydała te bakterie z kałem (1, 17). Stwierdzono również, że shigatoksyczne szczepy *E. coli* występują w przewodzie pokarmowym innych gatunków zwierząt domowych (świnie, kozy, owce), wolno żyjących (jelenie) oraz ptaków (mewy) (1, 7, 12). Badania epidemiologiczne wykazały, że źródłem zakażenia ludzi tymi bakteriami są najczęściej środki żywności pochodzenia zwierzęcego (zwłaszcza wołowina), wtórnie zanieczyszczone kałem zawierającym STEC (1). Obserwowano też infekcje wywołane spożyciem nieodpowiednio pasteryzowanego mleka, warzyw, owoców, soków owocowych, jak również na skutek bezpośrednich kontaktów zwierzę-człowiek i człowiek-człowiek (1, 7). Wykazano, że patogenne dla ludzi szczepy STEC należą do szeregu serotypów, wśród których najczęściej stwierdzane są O157, O26 i O111, jednakże *E. coli* innych grup serologicznych także mogą być odpowiedzialne za rozwój HC i HUS (1, 2, 18).

Shigatoksyczne *E. coli*, obok uwalniania toksyn Stx1 i/lub Stx2 posiadają często inne markery chorobotwórczości, z których za najbardziej istotny uważa się intyminę, białko kodowane przez gen *eaeA*, warunkujące przyczepność komórek STEC do receptorów nabłonkowych (17). Obecność tych jak również szeregu innych wskaźników patogenności (np. enterohemolizyny, receptora intyminowego TIR) warunkuje wysoki potencjał chorobotwórczy szczepów STEC (16).

Identyfikacja bakterii shigatoksycznych grupy O157 oraz należących do innych serotypów w materiale biologicznym (kale) pochodzącym od zwierząt nosicieli opiera się zwykle na wykonaniu hodowli namnażających, izolacji poszczególnych kolonii i ich analizie biochemicznej oraz na oznaczaniu podstawowych markerów patogenności, a zwłaszcza toksyn Shiga (10). Z uwagi na to, że szczepy STEC występują w kale zwykle w małej liczbie i są zdominowane przez mikroflorę saprofityczną, w tym niechorobotwórcze *E. coli*, diagnostyka izolatów *stx*-dodatnich jest bardzo trudna i wiąże się z ryzykiem uzyskania wyników fałszywie ujemnych. W ostatnim okresie opracowano szereg testów, wykorzystujących analizę materiału genetycznego bakterii STEC, które umożliwiają czułą i swoistą identyfikację próbek kału zawierających *E. coli stx*⁺ (3, 4, 8, 13, 15, 16). Odczyny te (PCR, multiplex PCR) nie pozwalają jednak na oznaczenie i izo-

*Praca wykonana w ramach projektu badawczego KBN 6 P06K 027 20.

lację poszczególnych komórek posiadających geny *stx* oraz inne, typowe dla STEC wyznaczniki genotypowe. Możliwość taką stwarza natomiast metoda oparta na zastosowaniu znakowanych (np. digoksygeniną; DIG) sond molekularnych, swoistych dla genów *stx* lub *rfbO157*, kodujących wytwarzanie LPS O157 *E. coli* (5, 6). W niniejszym opracowaniu przedstawiono procedurę wykorzystującą system membran nylonowych i specyficznych sond DNA, umożliwiającą identyfikację w kale oraz izolację i dalszą charakterystykę bakterii STEC. Test ten może być wykorzystany do oznaczania nosicielstwa u bydła shigatoksycznych *E. coli* oraz jako istotny element w badaniach epidemiologicznych szczepów STEC pochodzących z różnych źródeł.

Material i metody

Sondy molekularne Stx. Sondy DNA, specyficzne dla genów toksyn Shiga 1 (*stx1*) i 2 (*stx2*), przygotowano metodą PCR, używając do znakowania produktów reakcji deoksyuracyle połączonego digoksygeniną (DIG) (Roche; Niemcy). Matrycowy DNA szczepów referencyjnych *E. coli* C600J1 (K-12, *stx1*) i C600W34 (K-12, *stx2*) uzyskano przez zawieszenie 1 kolonii bakteryjnej w 25 μ l jałowej wody redystylowanej, wolnej od Dnaz (ICN; USA), inkubację zawiesiny w 100°C przez 5 min., a następnie odwirowanie (13.000 g, 1 min.). Otrzymany supernatant stanowił źródło DNA użytego do reakcji PCR.

Amplifikację genu *stx* metodą PCR wykonano w mieszaninie składającej się z 5 μ l 10X buforu enzymatycznego, MgCl₂ (5 mM), deoksyrybonukleotydów dATP, dCTP i dGTP (po 200 μ M) oraz dTTP (130 μ M), starterów specyficznych dla konserwatywnego regionu podjednostki A toksyn Stx1 i Stx2: MK1 (5' TTTACGATAGACTTCTC-GAC3') i MK2 (5' CACATATAAATTATTTTCGCTC3') (po 0,5 μ M) (9), DIG-11-dUTP (70 μ M), polimerazy Taq DNA (1 U) (Fermentas; Litwa), matrycowego DNA (5 μ l) oraz wody redystylowanej do końcowej objętości 50 μ l. Amplifikację wykonano w termocyklerze PTC-100 (MJF research; USA), używając następującego programu: denaturacja wstępna w 94°C przez 2 min., a następnie 30 cykli o parametrach: 44°C 1 min., 72°C 1,5 min., 94°C 1 min. Wydłużanie końcowe uzyskanego amplikonu PCR przeprowadzono w 72°C przez 10 min. Produkty amplifikacji наносzono (po 10 μ l/dołek) na 1,5% żel agarozowy (Low Melting Point; Sigma; USA) i wykonano elektroforezę przy stałym napięciu 100 V przez 45 min. Żel barwiono bromkiem etydyny (1 μ g/ml) przez 1 min., odbarwiano w wodzie redystylowanej i analizowano w świetle UV. Uzyskane produkty wycinano z żelu skalpelem i przenoszono do probówek Eppendorfa zawierających wodę redystylowaną (200 μ l/prążek). Probówki inkubowano w łaźni wodnej (100°C) przez 10 min., a następnie schładzano w lodzie. Tak uzyskane sondy genetyczne, specyficzne odpowiednio dla genów toksyn Stx1 lub Stx2, przechowywano w -20°C do chwili wykonania testu hybrydyzacji.

Próbki kału bydłowego

Zakażenie referencyjnymi szczepami *E. coli*. Kał pochodzący od krów mlecznych badano na obecność bakterii STEC używając testu ELISA (Primer EHEC, Meridian

Diagnostics, USA) oraz multiplex PCR (15) i w przypadku uzyskania wyników ujemnych zakażano bakteriami *E. coli* odpowiednich szczepów referencyjnych Stx1/Stx2 (B2; O157 : H7), C600J1 (Stx1), C600W34 (Stx2), C600 (K-12, Stx1/Stx2-ujemny). Szczepy inkubowano w bulionie tryptozowo-sojowym (TSB; bioMerieux; Francja) w 37°C przez 18 h, z wytrząsaniem (150 rpm). Po odwirowaniu hodowli, ustalano gęstość zawiesiny bakteryjnej na 10² komórek/ml, używając spektrofotometru przy długości fali światła 600 nm. Do 1 g kału dodawano 1 ml zawiesiny bakteryjnej oraz 18 ml podłoża TSB i po worteksowaniu (2 min.) odwirowano w 2000 g przez 2 min. Zebrany supernatant przenoszono do kolb o pojemności 250 ml i inkubowano w 37°C przez 18 h, 150 rpm. Po tym czasie, pobierano 1 ml hodowli, którą odwirowano (2300 g, 2 min.) i wykonywano seryjne rozcieńczenia supernatantu w PBS: 10⁻⁶, 10⁻⁷ oraz 10⁻⁸. Następnie, po 100 μ l każdej zawiesiny posiewano na płytkę z agarem LB lub MacConkey'a, które inkubowano w 37°C przez 18 h. Do dalszych badań testem hybrydyzacji wybierano płytki, na których uzyskano wzrost w granicach 25-100 kolonii bakteryjnych.

Kał terenowy. Próbki kału pobrano od 69 krów mlecznych i dostarczono schłodzone do laboratorium w ciągu 1-4 godzin. Kał ten badano równocześnie testem multiplex PCR w kierunku obecności genów *stx1*, *stx2*, *eaeA* (intymina) oraz *rfbO157* (*E. coli* O157) wg metodyki przedstawionej w poprzedniej publikacji (15). W obecnej pracy, do testu hybrydyzacji używano 1 g kału z każdej próbki, który dodawano do 19 ml podłoża TSB, worteksowano przez 2 min. i odwirowano w 2000 g przez 2 min. Uzyskany supernatant przenoszono do kolb 250 ml i postępowano dalej jak w przypadku kału zakażanego referencyjnymi szczepami *E. coli*.

Test hybrydyzacji. Bakterie obecne na płytkach z podłożem LB lub MacConkey'a pokrywano krążkami membran nylonowych (Roche), a następnie po delikatnym ich zdjęciu, wykonywano dalsze etapy testu hybrydyzacji, polegające na inkubacji w następujących roztworach:

- denaturującym (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) przez 15 min.;
- neutralizującym (1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl; pH 7,4) przez 15 min.;
- kalibrującym (2X SSC [0,3 M NaCl, 30 mM cytrynian sodu; pH 7,0]) przez 10 min.

Bakteryjny DNA utrwalano na membranach przez inkubację krążków w temperaturze 80°C przez 40 min., a następnie działano roztworem proteiny K (2 mg/ml) w buforze 2X SSC w 37°C 1 h, celem usunięcia balastowych składników ściany komórkowej. Po tym etapie, dodawano sondy DNA znakowane DIG anty-*stx1* i anty-*stx2* w roztworze DIG-Easy Hyb (Roche) i inkubowano w piecu hybrydyzacyjnym w temp. 42°C przez 18 h. Po płukaniu membran nylonowych roztworem płuczającym 1 (2X SSC, 0,1% SDS), 2 razy po 5 min. w temperaturze pokojowej oraz roztworem płuczającym 2 (0,5X SSC, 0,1% SDS) w 68°C przez 15 min., membrany przenoszono do roztworu płuczającego 3 (0,1 M kwas maleinowy, 0,15 M NaCl; pH 7,5, 0,3% Tween 20) na 5 min. w temperaturze pokojowej. Po inkubacji krążków w roztworze blokującym (Roche) (30 min., temp. pokojowa) dodawano koniugat (fragment Fab

owczych immunoglobulin IgG anty-DIG; 60 min. temp. pokojowa) znakowany alkalyczną fosfatazą (AP) (Roche). Reakcję barwną wywoływano przez inkubację krążków w mieszaninie substratów enzymatycznych BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) oraz NBT (nitroblue tertazolium chloride) w buforze TBS (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl; pH 9,5). Membrany inkubowano przez 15-30 min. w temperaturze pokojowej, a reakcję hamowano przez płukanie krążków w wodzie destylowanej.

Macierzyste płytki agarowe z hodowlami bakteryjnymi przechowywano w 4°C do czasu wykonania identyfikacji kolonii wytwarzających toksyny Shiga.

Identyfikacja bakterii stx-dodatnich. Krążki nylonowe z ciemnymi punktami wskazującymi na obecność genów stx toksyn Shiga, stanowiły podstawę do identyfikacji odpowiadających im kolonii bakteryjnych na macierzystych płytkach agarowych. Po izolacji, bakterie te posiewano na podłoże LB, a następnie dokonano ich dalszej charakterystyki, oznaczając testem multiplex PCR (15) obecność genów stx toksyn Shiga Stx1 i Stx2, intyminy (*caeA*) oraz LPS O157 *E. coli* (gen *rfb* O157).

Wyniki i omówienie

W pierwszym etapie badań opracowano i wystandaryzowano test hybrydyzacji znakowanych digoksygeniną sond DNA anty-stx1 i anty-stx2 z materiałem genetycznym bakterii immobilizowanym na krążkach nylonowych. W tym celu wykonano szereg prób, w których do stałej ilości kału bydłowego (1 g), nie zawierającego bakterii z grupy STEC, dodawano różne liczby komórek referencyjnych szczepów *E. coli*, wytwarzających toksyny Shiga 1 i 2 (szczep B2), Stx1 (szczep C600J1) lub Stx2 (szczep C600W34) oraz jako szczep kontrolny ujemny C600 (K-12), tzn. bakterie nie posiadające genów stx. Wykazano wcześniej (15), że optymalna liczba komórek *E. coli*, dodana do 1 g kału, która pozwalała na uzyskanie wiarygodnych wyników metodą multiplex PCR, była w granicach $10^2 - 5 \times 10^2$ jtk i z tego względu w obecnej pracy do standaryzacji opracowanego testu hybrydyzacji użyto 10^2 bakterii.

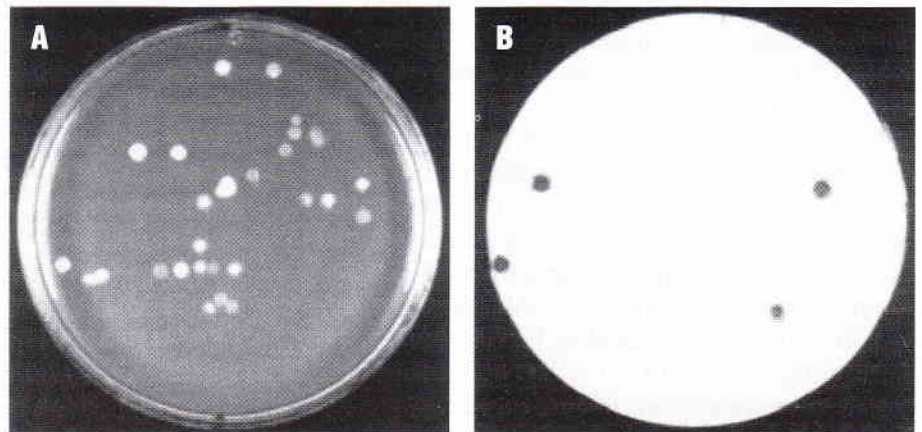
W kolejnym etapie wykonywano szereg rozcieńczeń uzyskanej hodowli kału, sztucznie zakażonego podanymi referencyjnymi szczepami *E. coli*. Zawiesiny te, posiane następnie na płytki agarowe (LB lub MacConkey'a, pozwoliły uzyskać po kolejnych 18 h inkubacji wzrost w granicach 25-100 kolonii, obejmujących zarówno dodane badane szczepy, jak też bakterie obecne naturalnie w kale, w tym też saprofityczne *E. coli*. Taką liczbę komórek bakteryjnych, wśród których była nieznaną liczbą drobnoustrojów stx-dodatnich, uznano za optymalną do wykonania etapu blotingu na krążek membranowy, a następnie do identyfikacji kolonii stx⁺,

obecnych na płytce macierzystej. Stwierdzono, że najlepszy wzrost bakteryjny uzyskiwano po rozcieńczeniu hodowli bulionowej w granicach 10^{-6} , 10^{-7} oraz 10^{-8} i posianiu po 100 µl zawiesiny na płytkę Petriego o średnicy 9 cm. Typowy obraz płytki Petriego z agarem LB, na którą dodano hodowlę kałową referencyjnego szczepu *E. coli* B2 w rozcieńczeniu 10^{-7} , przedstawiono na ryc. 1A. Z płytki tej wykonano replikę z użyciem krążka nylonowego, a następnie przeprowadzono kolejne etapy testu hybrydyzacji, opisane w części „Materiał i metody”. W efekcie końcowym uzyskano wynik w postaci kilku ciemnych punktów (ryc. 1B), odpowiadających koloniom bakteryjnym obecnym na płytce macierzystej, posiadających geny kodujące wytwarzanie toksyn Shiga 1 i/lub 2.

W dalszym etapie testu, zestawiając odpowiednio membranę nylonową z macierzystą płytką agarową, identyfikowano i izolowano kolonie bakteryjne odpowiadające ciemnym punktom na powierzchni krążka hybrydyzacyjnego. Wyosobnione drobnoustroje charakteryzowano następnie testem multiplex PCR, pozwalającym na równoczesną identyfikację markerów *stx1*, *stx2*, *caeA* i *rfbO157*.

W przypadku, gdy do eksperymentalnego zakażenia kału użyto szczepu referencyjnego *E. coli* C600 (K-12), na krążkach membranowych nie stwierdzono obecności żadnych ciemnych punktów, odpowiadających komórkom stx-dodatnim.

W kolejnym etapie badań, wystandaryzowanym testem hybrydyzacyjnym wykonano analizę 69 próbek kału bydłowego, pochodzącego od krów mlecznych z terenu wschodniej i południowej Polski, z gospodarstw, w których wykazano wcześniej występowanie zwierząt zakażonych naturalnie *E. coli* grupy STEC (11). Próbkę te były badane w poprzedniej pracy (15) testem multiplex PCR na obecność bakterii stx-dodatnich oraz w kierunku genów *rfbO157* i *caeA* (intymina). Jak stwierdzono obecnie, 41 spośród 69 badanych próbek kału wykazywało dodatni wynik w teście hybry-



Ryc. 1. Hodowla macierzysta na płytce z agarem LB zawiesiny kału bydłowego zakażonego referencyjnym szczepem *E. coli* B2 (*stx1/stx2*), po 18 h inkubacji w 37°C (A) oraz obraz odpowiadającej jej membrany nylonowej po hybrydyzacji z sondami DNA *stx1* i *stx2* znakowanymi DIG (B). Ciemne punkty obecne na krążku membranowym wskazują na kolonie bakteryjne posiadające zdolność wytwarzania toksyn Shiga.

Tab. 1. Porównanie wyników testów multiplex PCR (mPCR) i hybrydyzacji z sondami DNA *stx* znakowanymi DIG (DIG-*stx*), uzyskanych w badaniu 69 próbek kału pochodzących od bydła

Wynik testu (liczba próbek)		Profil genotypowy szczepów <i>E. coli</i> *
DIG- <i>stx</i>	mPCR	
2	2	<i>rfbO157 + eaeA + stx1 + stx2</i>
6	6	<i>rfbO157 + eaeA + stx1</i>
1	1	<i>rfbO157 + eaeA + stx2</i>
0	2	<i>rfbO157 + eaeA</i>
9	9	<i>eaeA + stx1 + stx2</i>
4	4	<i>eaeA + stx1</i>
19	19	<i>stx1</i>
ujemny (26)	ujemny (26)	nie oznaczano

Objaśnienia: *obecność genów *rfbO157* (LPS O157), *eaeA* (intymina), *stx1* i *stx2* (toksyny Shiga 1 i 2) oznaczano testem multiplex PCR (15)

dyzacji za znakowanymi DIG sondami DNA anty-*stx1* i anty-*stx2*. Brak widocznych ciemnych punktów na membranach nylonowych obserwowano natomiast w przypadku pozostałych 28 próbek kału, które z tego względu uznano za wolne od *E. coli* grupy STEC.

Kolejny etap badań polegał na izolacji z każdej próbki dodatkowo 3 kolonii bakteryjnych, których położenie na macierzystej płytce agarowej odpowiadało umiejscowieniu analogicznych ciemnych punktów na powierzchni membrany hybrydyzacyjnej. Bakterie te badano następnie testem mPCR w kierunku obecności genów *stx1*, *stx2*, *eaeA* i *rfbO157*. Uzyskane wyniki wraz z rezultatami otrzymanymi z bezpośredniej analizy tych samych próbek kału metodą PCR, przedstawiono w tab.1. Testem mPCR stwierdzono 43 próbki dodatnie, tzn. powodujące powstanie przynajmniej jednego amplikonu o masie 348 pz (*stx1*), 584 pz (*stx2*), 840 pz (*eaeA*) lub 420 pz (*rfbO157*). W przypadku testu hybrydyzacji z sondami DIG-*stx*, uzyskano odpowiednio 41 wyników dodatnich, tzn. obecności ciemnych punktów na powierzchni membrany nylonowej, będących wynikiem reakcji immobilizowanego DNA bakteryjnego ze specyficznymi sondami *stx1* i/lub *stx2*.

Dalsza analiza izolowanych kolonii *stx*-dodatnich wykazała pełną zgodność uzyskanego w teście mPCR profilu genotypowego badanych izolatów w porównaniu z wynikami bezpośredniej analizy tych samych próbek kałowych metodą amplifikacji PCR. Stwierdzono również, że dwie próbki dodatnie w teście mPCR, a ujemne w metodzie hybrydyzacyjnej, zawierały bakterie grupy O157 (*rfbO157*-dodatnie), mające zdolność wytwarzania intyminy (*eaeA*-dodatnie), ale nie posiadające genów kodujących wytwarzanie toksyn Shiga 1 i/lub 2. Z tego też względu wynik analizy hybrydyzacyjnej tych próbek był ujemny, gdyż nie reagowały one z użytymi sondami DID-*stx*, wykazując jednak dodatni wynik w teście mPCR ze starterami specyficznymi dla genów intyminy i LPS O157.

Opracowany test hybrydyzacji bakteryjnego DNA ze znakowanymi digoksygeniną sondami molekularnymi *stx1* i *stx2* pozwala na swoistą identyfikację w kale bydła bakterii posiadających zdolność wytwarzania toksyn Shiga. W przeciwieństwie do wcześniejszych wyników, otrzymanych metodą bezpośredniej analizy kału testem multiplex PCR (15), odczyn z użyciem krążków nylonowych umożliwia, obok wykrycia próbek zawierających drobnoustroje z grupy STEC, również izolację poszczególnych kolonii *stx*⁺ i dalszą ich charakterystykę (np. metodą PCR) w kierunku różnych markerów chorobotwórczości. Pozwala też na ilościowe oznaczenie liczby komórek bakteryjnych *stx*-dodatnich, znajdujących się w badanym materiale biologicznym. Izolacja z kału oznaczonych sondami DIG-*stx* szczepów STEC umożliwia wykonanie dodatkowych specjalistycznych badań epidemiologicznych, polegających na porównaniu izolatów zwierzęcych oraz bakterii wyisobnionych od ludzi (14). Procedura ta ma istotne znaczenie w prawidłowym prowadzeniu dochodzenia epidemiologicznego i określeniu pokrewieństwa klonalnego shigatoksynicznych szczepów *E. coli* wyisobnionych z różnych źródeł oraz oznaczenie kierunków transmisji chorobotwórczych dla ludzi izolatów STEC.

Piśmiennictwo

1. Armstrong G. L., Hollingsworth J., Morris J. G.: 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. 1996, 18, 29-51.
2. Coia J. E.: Clinical, microbiological and epidemiological aspects of Escherichia coli O157 infection. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1998, 20, 1-9.
3. Fagan P. K., Hornitzky M. A., Bettelheim K. A., Djordjevic S. P.: Detection of Shiga-like toxin (*stx1* and *stx2*), intimin (*eaeA*) and enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal faeces by multiplex PCR. Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65, 868-872.
4. Franck S. M., Bosworth B. T., Moon H. W.: Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing Escherichia coli strains from calves. J. Clin. Microbiol. 1998, 36, 1795-1797.
5. Gallien P., Klic H., Perlberg K. W., Protz D.: Einsatz von Nylonmembranen zur gezielten Isolierung und Charakterisierung Verotoxin-bildender Escherichia coli mittels DNA-Sonden. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 1996, 109, 431-433.
6. Gallien P., Much C., Perlberg K. W., Protz D.: Einsatz von Nylonmembranen zur spezifischen Isolierung von Escherichia coli O157 mittels DNA-Sonden und Prüfung auf STEC-Gruppenzugehörigkeit. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 1999, 112, 1136-1139.
7. Griffin P. M., Tauxe R. V.: The epidemiology of infections caused by Escherichia coli O157 : H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol. Rev. 1991, 13, 60-98.
8. Hu Y., Zhang Q., Meitzler J. C.: Rapid and sensitive detection of Escherichia coli O157 : H7 in bovine faeces by a multiplex PCR. J. Appl. Microbiol. 1999, 87, 867-876.
9. Karch H., Meyer T.: Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1989, 27, 2751-2757.
10. Osek J.: Aktualne metody diagnostyki szczepów Escherichia coli O157. Medycyna Wet. 2001, 57, 783-787.
11. Osek J., Gallien P., Protz D.: Characterization of shiga toxin-producing Escherichia coli strains isolated from calves in Poland. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2000, 23, 267-276.
12. Osek J.: Escherichia coli O157 – groźny patogen o szerokiej chorobotwórczości. Medycyna Wet. 1999, 55, 215-221.
13. Osek J.: Genotypowa identyfikacja i różnicowanie shigatoksynicznych szczepów Escherichia coli przy użyciu multiplex PCR. Medycyna Wet. 2001, 57, 323-326.
14. Osek J.: Molecular characterisation of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157 strains isolated in Poland. Res. Vet. Sci. 2001, 70, 175-177.
15. Osek J.: Rapid and specific identification of Shiga toxin-producing Escherichia coli in bovine faeces by multiplex PCR. Lett. Appl. Microbiol. 2002, 34, 304-310.
16. Paton A. W., Paton J. C.: Detection and characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, *rfbO111* and *rfbO157*. J. Clin. Microbiol. 1998, 36, 598-602.
17. Paton J. C., Paton A. W.: Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing Escherichia coli infection. Clin. Microbiol. Rev. 1998, 11, 450-479.
18. Tarr P. I., Neill M. A.: Perspective: the problem of non-O157 : H7 Shiga toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli. J. Infect. Dis. 1996, 174, 1136-1139.

Adres autora: doc. dr hab. Jacek Osek, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: josek@piwet.pulawy.pl