

Opracowanie testów multiplex PCR do identyfikacji odmian toksyny Shiga wytwarzanych przez *Escherichia coli*^{*})

JACEK OSEK, MARCIN WEINER

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

Osek J., Weiner M.

Development of multiplex PCR tests for identifying Shiga toxin subclasses in *Escherichia coli*

Summary

The aim of the present study was to develop a method based on multiplex PCR (mPCR) to identify Shiga toxin and its genotypic subclasses. The procedure involved the amplification of the *stx* gene and its variants with the primers described earlier by other authors. In the first test, designated as mPCR-1, four primer pairs were used that were specific for the following Shiga toxin variants: Stx1, Stx2, Stx2d, and Stx2f. The amplification reaction generated PCR products of molecular masses 348, 584, 175 and 428 bp, respectively. The second test (mPCR-2) which used primers specific for Stx2c and Stx2e, generated the amplicons of 124 and 267 bp, respectively. In addition, in each test, primers specific to the *E. coli* 16S rRNA were used as an internal control. Both mPCR-1 and mPCR-2 were then validated by analyzing the 197 previously characterized *E. coli* isolates originating from calves, pigs and children. The results obtained with the mPCR tests were compared with previous results performed with conventional PCR assays and demonstrated a 100% correlation. In this case, similarly to previous studies, 29 of 197 examined strains were positive for the *stx* genes, indicating that they were of the STEC group. The mPCR test developed test may be used as a sensitive and specific diagnostic method for identifying Shiga toxin with its several subclasses.

Keywords: *Escherichia coli*, Shiga toxins, multiplex PCR

Szczepy *Escherichia coli* wytwarzające toksyny Shiga, określane jako STEC (Shiga toxin-producing *E. coli*), stanowią groźny dla ludzi czynnik chorobotwórczy, odpowiedzialny za rozwój krwotocznego zapalenia jelita grubego (hemorrhagic colitis; HC), hemolitycznego zespołu mocznicowego (hemolytic uremic syndrome; HUS) oraz małopłytkowej plamicy zakrzepowej (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP) (18, 21). Rezerwuarem i źródłem STEC jest przede wszystkim bydło, które będąc bezobjawowym nosicielem, wydała drobnoustroje z kałem (15, 16, 21). Shigatoksyniczne szczepy *E. coli* stwierdza się też u innych zwierząt domowych, takich jak: świnie, kozy i owce oraz u zwierząt wolno żyjących (jeleni) i ptaków (18). Źródłem zakażenia ludzi jest przede wszystkim żywność pochodzenia zwierzęcego (zwłaszcza wołowina), ale notowano również przypadki zachorowania po spożyciu zakażonego mleka, warzyw, owoców, jak też na skutek kontaktów bezpośrednich zwierzę-człowiek i człowiek-człowiek (17, 21).

Najważniejszym czynnikiem patogenności szczepów STEC jest toksyna Shiga (Stx) występująca w dwóch podstawowych odmianach: Stx1 oraz Stx2, różniących się między sobą składem aminokwasowym, strukturą antygenową i aktywnością biologiczną (5, 8, 10, 11, 17, 18, 21). Shigatoksyniczne szczepy *E. coli* mogą wytwarzać tylko Stx1, tylko Stx2 lub też obie toksyny równo-

ześnie. Toksyna Stx1 jest prawie jednorodna, gdyż obserwowane różnice dotyczą zaledwie jednego aminokwasu (22), natomiast odmiana Stx2 występuje w kilku podstawowych wariantach, oznaczonych jako Stx2c, Stx2d i Stx2f, zbliżonych jednak do siebie pod względem aktywności biologicznej (17-19, 21). Dostatecznie odmiennie wykazuje natomiast odmiana toksyny określona jako Stx2e, cechująca się szczególnym powinowactwem do glikolipidowych receptorów Gb3, występujących w jelicie cienkim oraz w śródbłonku naczyń krwionośnych. Obecność tego wariantu Stx związana jest z rozwojem charakterystycznych zmian histopatologicznych u świń w przebiegu choroby obrzękowej oraz biegunki u prosiąt, przede wszystkim w okresie odsadzenia od macior (1, 14).

Identyfikacja *E. coli* grupy STEC opiera się zazwyczaj na izolacji bakterii z użyciem podłoży selektywnych, określaniu przynależności gatunkowej przy zastosowaniu testów biochemicznych, a następnie na oznaczaniu czynników patogenności, zwłaszcza toksyn Shiga (2, 18). Procedury te są czasochłonne, a uzyskane rezultaty badań nie zawsze jednoznaczne.

W ostatnich kilku latach wprowadzono szereg nowoczesnych testów opartych na biologii molekularnej, umożliwiających wykrycie genów kodujących wytwarzanie toksyny Stx. W testach tych wykorzystuje się technikę hybrydyzacji DNA ze znakowanymi sondami molekularnymi lub amplifikację techniką PCR fragmentów

^{*}) Praca wykonana w ramach projektu badawczego KBN PCZ 014-26.

genów stx odpowiedzialnych za ekspresję toksyny Shiga (6, 12-14, 16). Obok klasycznych reakcji PCR, w których używa się tylko jednej pary starterów, zwykle komplementarnych do konserwatywnego fragmentu genu stx, coraz częściej znajdują zastosowanie testy określone jako multiplex PCR (mPCR), w których wykorzystuje się dwie i więcej par starterów umożliwiających równoczesną amplifikację kilku markerów genotypowych szczepów STEC (6, 12-14, 17). W niniejszym opracowaniu przedstawiono dwustopniową procedurę opartą na reakcji mPCR, pozwalającą na identyfikację toksyny Shiga oraz różnicowanie jej odmian genotypowych (Stx1, Stx2), jak też czterech wariantów toksyny Stx2 (Stx2c, Stx2d, Stx2f, Stx2e).

Material i metody

Szczepy bakteryjne. Do opracowania testów użyto referencyjnych szczepów *E. coli*, których charakterystyka podana została w tab. 1. Ponadto, do oceny skuteczności opracowanego testu mPCR wykorzystano 197 szczepów izolowanych od cieląt, świń i ludzi. Szczepy te zostały wcześniej zbadane w kierunku obecności genów stx1 i stx2 toksyny Shiga (13, 14, 16).

Tab. 1. Charakterystyka referencyjnych szczepów *E. coli* użytych do opracowania testów multiplex PCR

Szczep	Serotyp	Genotyp toksyny Shiga	Piśmiennictwo
B2	O157:H7	stx1, stx2	7
C600J1	K-12	stx1	7
C600W34	K-12	stx2	7
137/98	O157:NM	stx2c	7
551/98	O62:H-	stx2d	7
107/86	O139:K12	stx2e	1
214/125	O-H18	stx2f	20
C600	K-12	brak	7

Matrycowy DNA. Do testów PCR użyto DNA uzyskanego przez zawieszenie 1 kolonii bakteryjnej w 25 µl jałowej, wolnej od DNaz i RNaz wody redestylowanej (ICN Biomedicals, USA). Zawiesinę następnie odwirowano (13 000 × g, 2 min.), a otrzymany supernatant stanowił źródło matrycowego DNA. Bakterie do badań inkubowano na podłożu LB lub agarze z krwią w 37°C przez 18 h.

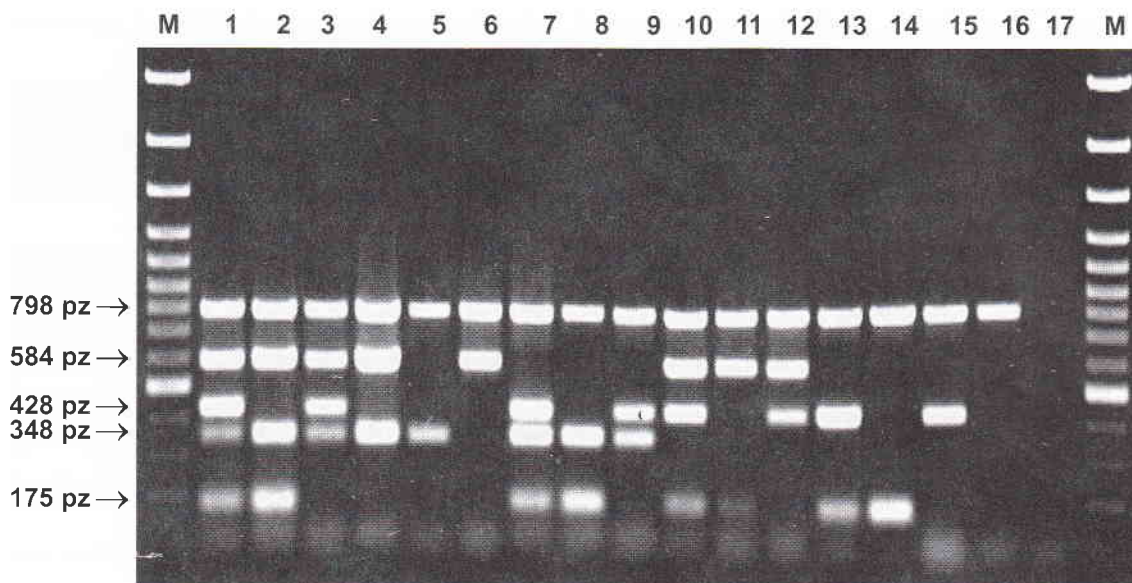
Testy PCR. W pierwszym etapie pracy opracowano multiplex PCR (mPCR-1) pozwalający na wykrycie genów toksyn Stx1 i/lub Stx2 oraz dwóch odmian Stx2: Stx2d i Stx2f. Następnie wprowadzono drugi test mPCR oznaczony jako mPCR-2, umożliwiający identyfikację kolejnych wariantów Stx2: Stx2c oraz Stx2e. Ponadto, w obu etapach pracy zastosowano specyficzne startery, pozwalające na amplifikację fragmentu DNA, kodującego wytwarzanie 16S rRNA *E. coli*, co stanowiło kontrolę wewnętrzną wykonanej reakcji.

Amplifikację genów toksyny Stx i jej odmian wykonywano w mieszaninie PCR składającej się z matrycowego DNA odpowiednich referencyjnych szczepów bakteryjnych, 5 µl buforu enzymatycznego, 10 µl MgCl₂ (w końcowej koncentracji 5 mM), 5 µl nukleotydów dNTP (dATP, dCTP, dGTP i dTTP w koncentracji 200 µM), 2 U termostabilnej polimerazy Taq (Fermentas, Litwa), starterów oligonukleotydowych oraz wody, dodanej do końcowej objętości 50 µl. Charakterystyka oraz sekwencje nukleotydowe starterów zostały przedstawione w tab. 2. Reakcje amplifikacji wykonywano w termocyklerze PTM-100 (MJ Research, USA) używając następujących parametrów: 94°C 5 min. (denaturacja wstępna), a następnie 30 cykli składających się z 94°C (1 min.), 53°C (1 min.) i 72°C (2 min.). Końcowy etap wydłużania przeprowadzono w temperaturze 72°C przez 5 min.

Interpretacja wyników. Analizę elektroforetyczną produktów amplifikacji genowej wykonano w 1,5% żelu agarozowym w buforze TAE przy stałym napięciu 100 V. Żele barwiono w bromku etydyny (5 µg/ml) przez 2 min., odbarwiano w wodzie redestylowanej i fotografowano w świetle UV przy użyciu zestawu Gel-Doc 2000 (Bio-Rad, USA). W przypadku, gdy badany izolat bakteryjny posiadał zdolność ekspresji przynajmniej jednej z badanych toksyn, obserwowano

Tab. 2. Charakterystyka starterów użytych w testach mPCR do identyfikacji genów badanych toksyn Shiga

Multiplex PCR	Nazwa startera	Sekwencja (5'→3')	Amplifikowany gen	Lokalizacja w genomie	Amplikon PCR (pz)	Koncentracja w teście mPCR (µM)	Dostęp do Banku Genowego	Piśmiennictwo
mPCR-1	LP30 LP31	CAGTTAATGTCGGTGGCAAGG CACCAGACAATGTAACCGCTG	stx1	213-232 559-538	348	0,1	JM19473	3
	LP43 LP44	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG GCGTCATCGTATACACAGGAGC	stx2	295-316 881-859	584	0,1	X07865	3
	Stx2d-a Stx2d-b	GGTAAAATTGAGTTCTCTAAGTAT CAGCAAATCCTGAACCTGACC	stx2d	1221-1244 1395-1375	175	0,1	AF043627	22
	128-1 128-2	AGATTGGGGCGTCATTCACCTGGTTG TACTTTAATGGCCGCCCTGTCTCC	stx2f	519-543 946-923	428	0,05	AJ010730	20
	16S-F 16S-R	AGAGTTTGATCATGGCTCAG GGACTACCAGGGTATCTAAT	16S rRNA	8-27 805-798	798	0,05	J01859	4
mPCR-2	Stx2c-a Stx2c-b	GCGGTTTTATTGTCATTAGT AGTACTCTTTCCGGCCACT	stx2c	1186-1205 1309-1290	124	0,1	M59432	22
	SLT2vB1 SLT2vB2	ATGAAGAAGATGTTTATAGCG TCAGTAAACTTCACCTGGGC	stx2e	1176-1196 1439-1419	267	0,2	M36727	8
	16S-F 16S-R	AGAGTTTGATCATGGCTCAG GGACTACCAGGGTATCTAAT	16S rRNA	8-27 805-798	798	0,05	J01859	4



Ryc. 1. Obraz elektroforetyczny produktów testu multiplex PCR (mPCR-1) uzyskany ze szczepami *E. coli* badanymi w kierunku genów toksyn Stx1 oraz Stx2 z jej odmianami Stx2f i Stx2d. Poszczególne ścieżki: M – marker masy molekularnej 100 pz; 1 – szczepy B2, 214/125 i 551/98 (Stx1, Stx2, Stx2f, Stx2d, 16S rRNA); 2 – szczepy B2 i 551/98 (Stx1, Stx2, Stx2d, 16S rRNA); 3 – szczepy B2 i 214/125 (Stx1, Stx2, Stx2f, 16S rRNA); 4 – szczep B2 (Stx1, Stx2, 16S rRNA); 5 – szczep C600J1 (Stx1, 16S rRNA); 6 – szczep C600W34 (Stx2, 16S rRNA); 7 – szczepy C600J1, 214/125 i 551/98 (Stx1, Stx2f, Stx2d, 16S rRNA); 8 – szczepy C600J1 i 551/98 (Stx1, Stx2d, 16S rRNA); 9 – szczepy C600J1 i 214/125 (Stx1, Stx2f, 16S rRNA); 10 – szczepy C600W34, 214/125 i 551/98 (Stx2, Stx2f, Stx2d, 16S rRNA); 11 – szczepy C600W34 i 551/98 (Stx2, Stx2d, 16S rRNA); 12 – szczepy C600W34 i 214/125 (Stx2, Stx2f, 16S rRNA); 13 – szczepy 214/125 i 551/98 (Stx2f, Stx2d, 16S rRNA); 14 – szczep 551/98 (Stx2d, 16S rRNA); 15 – szczep 214/125 (Stx2f, 16S rRNA); 16 – szczep C600 (16S rRNA); 17 – H₂O (próba ślepa). Strzałkami oznaczono pozycje amplikonów: 16S rRNA (798 pz), Stx2 (584 pz), Stx2f (428 pz), Stx1 (348 pz), Stx2d (175 pz)

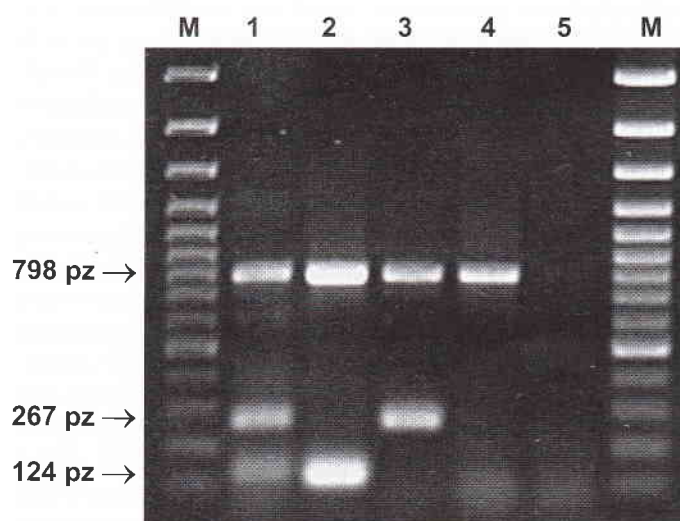
obecność co najmniej dwóch produktów amplifikacji – charakterystycznego dla danej toksyny Stx (i/lub odmiany Stx2) oraz drugiego, typowego dla genu 16S rRNA *E. coli* (prążek o masie 798 pz).

Wyniki i omówienie

Identyfikacja shigatoksycznych szczepów *E. coli*, opierająca się na izolacji badanych drobnoustrojów i wykonaniu testów biochemicznych, jest procesem pracochłonnym i czasochłonnym, co nie jest bez znaczenia w przypadku rozpoznawania drobnoustrojów pochodzących z przypadków klinicznych. Znacznym ułatwieniem procesu diagnostycznego jest zastosowanie metody PCR pozwalającej znacznie skrócić (do kilku godzin) i usprawnić proces oznaczania genów odpowiedzialnych za ekspresję toksyny Shiga i jej wariantów, a tym samym zaliczyć badane bakterie do grupy STEC. W tym celu, w obecnych badaniach opracowane zostały dwa testy multiplex PCR, wykorzystujące odpowiednio 5 par starterów w przypadku testu mPCR-1 oraz 3 pary starterów w metodzie mPCR-2. W trakcie wykonywania szeregu prac wstępnych zastosowano różne koncentracje starterów, stężenia poszczególnych reagentów, np. MgCl₂, a także odmienne parametry dotyczące czasu i temperatury poszczególnych etapów amplifikacji. Stwierdzono, że optymalne wyniki testów mPCR, widoczne w żelu agarozowym w postaci wyraźnych prążków uzyskano przy zastosowaniu koncentracji starterów, które zostały podane w tab. 2 oraz w obecności 5 mM jonów magnezu.

Specyficzność opracowanych testów oznaczono, poddając analizie szereg referencyjnych szczepów *E. coli* (tab. 2). W rezultacie, w teście mPCR-1 uzyskano specyficzne produkty amplifikacji o następujących masach molekularnych: 175 pz (Stx2d), 348 pz (Stx1), 428 pz (Stx2f), 584 pz (Stx2) oraz produkt o masie 798 pz, odpowiadający 16S rRNA *E. coli*, stanowiący wewnętrzną kontrolę reakcji PCR (ryc. 1). W teście mPCR-2 uzyskano natomiast amplikony odpowiadające wielkości 124 pz (Stx2c), 267 pz (Stx2e)

oraz, podobnie jak w poprzednim odczynie, 798 pz (16S rRNA) (ryc. 2). Nie stwierdzono obecności tych lub innych produktów amplifikacji genowej, gdy do badań użyto szczepów nie należących do rodzaju *E. coli* (*Campylobacter jejuni*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella* sp.).



Ryc. 2. Obraz elektroforetyczny produktów testu multiplex PCR (mPCR-2) uzyskany ze szczepami *E. coli* badanymi w kierunku genów toksyn Stx2c i Stx2e. Poszczególne ścieżki: M – marker masy molekularnej 100 pz; 1 – szczepy 107/86 i 137/98 (Stx2e, Stx2c, 16S rRNA); 2 – szczep 137/98 (Stx2c, 16S rRNA); 3 – szczep 107/86 (Stx2e, 16S rRNA); 4 – szczep C600 (16S rRNA); 5 – H₂O (próba ślepa). Strzałkami oznaczono pozycje amplikonów: 16S rRNA (798 pz), Stx2e (267 pz), Stx2c (124 pz)

Opracowane testy mPCR-1 i mPCR-2 zastosowano następnie do analizy genotypowych markerów toksyn Shiga u 197 szczepów *E. coli* pochodzących od cieląt, świń i ludzi. Izolaty te były badane poprzednio w kierunku genów stx przy użyciu konwencjonalnych testów PCR. Stwierdzono pełną zgodność pomiędzy wynikami uzyskanymi w poprzednich badaniach a obecnymi rezultatami, otrzymanymi przy zastosowaniu testów mPCR. Wśród zbadanych 197 szczepów 29 (14,7%) było Stx-dodatnich, pozwalających zaliczyć je do grupy STEC. Stwierdzono również obecność wariantów toksyny Shiga 2: Stx2d (1 szczep) i Stx2c (2 izolaty), które nie były wykazane w trakcie poprzednich badań metodą PCR. Nie wykazano natomiast genu stx2f, kodującego stosunkowo rzadko występującą odmianę tej toksyny Stx (tab. 3).

W ostatnich kilku latach opracowano szereg testów PCR, wykorzystujących więcej niż jedną parę starterów oligonukleotydowych, umożliwiających identyfikację różnych markerów genotypowych szczepów STEC (6, 12-14, 17, 22). Większość tych odczynów opiera się na amplifikacji fragmentu genu toksyny Shiga (stx), genu *eaeA* odpowiedzialnego za ekspresję intyminy oraz genu *ehlyA* kodującego wytwarzanie enterohemolizyny. Opracowana obecnie metoda, z wykorzystaniem dwóch testów multiplex PCR, umożliwia szybkie oznaczenie genów odpowiedzialnych za ekspresję toksyny Shiga (Stx1, Stx2 oraz jej szeregu wariantów), a tym samym stwierdzenie przynależności badanych drobnoustrojów do grupy STEC. Odpowiednio dobrane startery oligonukleotydowe umożliwiły uzyskanie amplikonów różniących się znacznie masą molekularną, przez co były łatwe do identyfikacji w 1,5% żelu agarozowym. Przedstawiona metoda, oparta na dwóch testach multiplex PCR, umożliwia zaliczenie analizowanych bakterii *E. coli* do grupy STEC, jak również pozwala na oznaczenie wariantów genotypowych toksyny Stx2 w czasie kilku godzin, co może mieć szczególne znaczenie w przypadku szybkiej diagnostyki patogennych dla ludzi i zwierząt izolatów shigatoksycznych. Opracowane testy cechowały się wysoką specyficznością (zgodność wyników testów PCR i mPCR, brak produktów amplifikacji w przypadku zastosowania innych bakterii niż *E. coli*), a kontrolę prawidłowości ich wykonania gwarantowała równoczesna amplifikacja genu 16S rRNA *E. coli*. Metoda ta może więc być użyta do szybkiej, a jednocześnie szczegółowej charakterystyki genotypowej szczepów STEC.

Piśmiennictwo

- Bertschinger H. U., Bachmann M., Mettler C., Pospischil A., Schraner A., Stamm M., Sydler T., Wild P.: Adhesive fimbriae produced in vivo by *Escherichia coli* O139:K12(B):H1 associated with enterotoxaemia in pigs. *Vet. Microbiol.* 1990, 25, 267-281.
- Beutin L., Montenegro M. A., Orskov I., Orskov F., Prada J., Zimmermann S., Stephan R.: Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with en-

Tab. 3. Profil toksyczny szczepów *E. coli* pochodzących od cieląt, świń i ludzi, oznaczony opracowanymi testami mPCR

Profil toksyczny	Liczba szczepów	Geny wykrywane w teście mPCR					
		mPCR-1			mPCR-2		
		stx1	stx2	stx2d	stx2f	stx2c	stx2e
Stx1	7	+	-	-	-	-	-
Stx2	11	-	+	-	-	-	-
Stx1 + Stx2	3	+	+	-	-	-	-
Stx2 + Stx2d	1	-	+	+	-	-	-
Stx1 + Stx2c	2	+	-	-	-	+	-
Stx2e	5	-	-	-	-	-	+
Ujemny	168	-	-	-	-	-	-

- terohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 1989, 27, 2559-2564.
- Cebula T. A., Payne W. I., Feng P.: Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 248-250.
- Ehresmann C., Stiegler P., Felner P., Ebel P.: The determination of the primary structure of the 16S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. 2. Nucleotide sequence of products from partial enzymatic hydrolysis. *Biochemie* 1972, 54, 901-967.
- Eklund M., Leino K., Siitonen A.: Clinical *Escherichia coli* strains carrying stx genes: stx variants and stx-positive virulence profiles. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 4585-4593.
- Fratamico P. M., Bagi L. K., Pepe T.: A multiplex polymerase chain reaction assay for rapid detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 in foods and bovine feces. *J. Food Prot.* 2000, 63, 1032-1037.
- Gallien P., Much C., Periberg 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, 58-63.
- Imberechts H., De Greve H., Lintermans P.: The pathogenesis of edema disease in swine. *Vet. Microbiol.* 1992, 31, 221-233.
- Ito H., Terai A., Kurazono H., Takeda Y., Nishibuchi M.: Cloning and nucleotide sequencing of Verotoxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. *Microb. Pathogen.* 1990, 8, 867-876.
- Jackson M. P., Neill R. J., O'Brien A. D., Holmes R. K., Newland J. W.: Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1987, 44, 109-114.
- Marques L. R. M., Peiris J. S. M., Crisp S. J., O'Brien A. D.: *Escherichia coli* strains isolated from pigs produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol. Lett.* 1987, 44, 33-38.
- Meng J., Zhao S., Doyle M. P., Mitchell S. E., Kresovich S.: A multiplex PCR for identifying Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Let. App. Microbiol.* 1997, 24, 172-176.
- Osek J., Dacko J.: Development of a PCR-based method for specific identification of genotypic markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *J. Vet. Med. B* 2002, 48, 771-778.
- Osek J.: Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. *Vet. Microbiol.* 1999, 68, 209-217.
- Osek J., Gallien P., Protz D.: Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from calves in Poland. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 2002, 23, 267-276.
- 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, rfb_{O111}, and rfb_{O157}. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 598-602.
- Paton J. C., Paton A. W.: Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11, 450-479.
- Paton A. W., Paton J. C., Goldwater P. N., Heuzenroeder M. W., Manning P. A.: Sequence of a variant Shiga-like type I operon of *Escherichia coli* O111:H-. *Gene* 1993, 129, 87-92.
- Schmidt H., Scheff J., Morabito S., Caprioli A., Wieler L. H., Karch H.: A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl. Env. Microbiol.* 2000, 66, 1205-1208.
- Tarr P. I.: *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin. Infect. Dis.* 1995, 20, 1-8.
- Wang G., Clark C. G., and Rodgers F. G.: Detection of *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 3613-3619.
- Zhang W., Bielaszewska M., Kuczynski T., Karch H.: Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx1c) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 1441-1446.