

# Identyfikacja podstawowych markerów chorobotwórczości shigatoksycznych *Escherichia coli* metodą PCR z wewnętrzną kontrolą amplifikacji\*

JACEK OSEK

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

Osek J.

## Identifying the main pathogenic markers of shigatoxigenic *Escherichia coli* using the PCR method with an internal amplification control

Summary

Shigatoxigenic *E. coli* strains (STEC) possess the ability to produce Shiga toxins (Stx) and other pathogenic markers, e.g. intimin or enterohemolysin. These isolates often belong to O157:H7 or O157:NM serotypes. The pathogenic factors of STEC are usually expressed in different variants, i.e. Stx1, Stx2 and their identification may be difficult. The aim of the present study was to develop PCR tests which would allow STEC major genotypic virulence markers to be determined, e.g. Shiga toxin with their Stx1 and Stx2 variants, intimin (*eaeA* gene), enterohemolysin (*ehfA* gene) as well as the operons determining O157:H7 and O157:NM serotypes (*rfbO157* and *fliC*). DNA primers encoding the conserved fragments of the identified genes were selected for the PCR tests as they allow the amplification of different genotypic variants, especially of stx and *eaeA*. Each test included an internal control i.e. the primers flanking the 16S rRNA *E. coli* gene allowing the validation of the performed PCR as well as the bacterial DNA used. The results indicated that the tests developed were specific and the PCR amplicons obtained were easy to distinguish in an agarose gel. This method may be used for routinely diagnosing the main virulence factors of shigatoxigenic *E. coli* strains.

**Keywords:** *Escherichia coli*, virulence marker genes, PCR identification

Szczepy *Escherichia coli* wytwarzające toksyny Shiga (Stx) określane są mianem shigatoksycznych *E. coli* (Shiga toxin-producing *E. coli*, STEC) (1, 18, 21). Bakterie te są czynnikiem groźnych schorzeń u ludzi, wywołując m.in. krwotoczne zapalenie okrężnicy (HC) i hemolityczny zespół mocznicowy (HUS) (1, 18, 21). Większość infekcji, zarówno o charakterze sporadycznym, jak i epidemiologicznym, związana jest z konsumpcją skażonej żywności pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego (1, 21). Źródłem szczepów STEC jest głównie bydło, które, będąc bezobjawowym nosicielem tych bakterii, wydała je z kałem. Wykazano, że szczepy STEC mogą należeć do różnych grup serologicznych, ale stosunkowo często izoluje się bakterie serotypów O157 : H7 lub O157 : NM (bez antygeny H7) (24).

Najważniejszym czynnikiem patogenności szczepów STEC jest uwalniania pozakomórkowo cytotoksyna Shiga, występująca w dwóch podstawowych odmianach: Stx1 i Stx2 (10, 18, 20). Toksyna Stx1 jest prawie jednorodna (spotyka się tylko odmianę Stx1c),

natomiast Stx2 tworzy szereg wariantów, z których najważniejsze to: Stx2c, Stx2d, Stx2e i Stx2f (7, 20, 22, 25). Obok uwalniania toksyn Shiga, bakterie STEC mogą posiadać szereg innych czynników chorobotwórczości, do których należą m.in.: białko adhezyjne intymina, kodowane przez chromosomalny gen *eaeA* oraz enterohemolizyna, determinowana przez materiał genetyczny plazmidu (gen *ehfA*) (4, 13, 19). Oprócz nich za istotne markery patogenności szczepów STEC uznaje się: katalazę P, receptor intyminowy TIR, białka sekrecyjne Esp oraz inne, o nieokreślonej bliżej funkcji (18).

Identyfikacja *E. coli* grupy STEC, w tym bakterii grupy serologicznej O157, w ostatnim czasie opiera się na szybkich, czułych i swoistych testach, wykorzystujących metody biologii molekularnej, a zwłaszcza technikę PCR (2, 5, 10, 11, 14, 17). W piśmiennictwie dostępny jest szereg sekwencji starterów oligonukleotydowych, umożliwiających amplifikację markerów genotypowych, kodujących toksyny Shiga, intyminę i inne czynniki patogenności STEC. Możliwa jest też genotypowa identyfikacja operonów *rfbO157* i *fliC*, odpowiedzialnych za biosyntezę antygeny somatycznego O157 i rzęskowego H7 (12, 24).

\*1 Praca wykonana w ramach projektu celowego zamawianego KBN Nr PCZ 014-26.

Część z tych starterów, zwłaszcza flankujących geny *stx* i *eaeA*, umożliwia amplifikację tylko niektórych wariantów genotypowych (np. *stx1* lub *stx2*), nie pozwalając na pełną diagnozę istniejących wariantów molekularnych tych czynników chorobotwórczości.

W niniejszym opracowaniu przedstawiono szereg testów PCR z użyciem starterów, umożliwiających jednoznacznie amplifikację najważniejszych markerów genotypowych szczepów STEC, w tym serotypu O157:H7. W każdym z tych odczynów, oprócz genu patogenności, identyfikowano równocześnie specyficzny dla *E. coli* fragment DNA, kodujący wytwarzanie 16S rRNA. Marker ten stanowił wewnętrzną kontrolę poprawności wykonanej reakcji PCR, jak też umożliwiał ocenę użytego do testu bakteryjnego DNA. W badaniach zastosowano uniwersalne startery, pozwalające na amplifikację różnych wariantów genotypowych występujących u STEC czynników chorobotwórczości, a zwłaszcza genów *stx* i *eaeA*. Startery te zostały również tak dobrane, aby uzyskane amplikony były łatwe do odróżnienia w trakcie rutynowej analizy w żelu agarozowym.

Celem badań było opracowanie testów PCR umożliwiających identyfikację podstawowych genotypowych markerów chorobotwórczości shigatoksynicznych szczepów *E. coli*, z uwzględnieniem wewnętrznej kontroli amplifikacji bakteryjnego DNA w postaci genu 16S rRNA.

### Material i metody

**Szczepy bakteryjne.** Do opracowania i oceny testów PCR użyto referencyjnych szczepów *E. coli*, których charakterystyka została przedstawiona w tab. 1. W badaniach wykorzystano też 87 izolatów *E. coli*, pochodzących od ludzi i zwierząt, które dokładnie opisano w poprzednich pracach (14-18).

Tab. 2. Charakterystyka starterów DNA użytych do opracowania testów PCR

Nazwa startera	Sekwencja (5'→3')	Amplifikowany gen	Produkt PCR (pz)	Koncentracja w teście PCR (µM)	Nr w banku genowym	Piśmiennictwo
LIN-F LIN-R	TTTGATTGTTACAGTCAT GAACGAAATAATTTATATGT	<i>stx</i>	900	0,5	M24352	11
LP30 LP31	CAGTTAATGTCGTGGCGAAGG CACCAGACAATGTAACCGCTG	<i>stx1</i>	348	0,1	JM19473	5
LP43 LP44	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG GCGTCATCGTATACACAGGAGC	<i>stx2</i>	584	0,1	X07865	5
Int-Fc Int-Rc	GGGATCGATTACCGTCAT TTTATCAGCCTTAATCTC	<i>eaeA</i>	840	0,1	AF022236	3
Hly-AF Hly-AR	GCATCATCAAGCGTACGTTCC AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	<i>ehlyA</i>	534	0,1	X79839	19
PF8 PR8	CGTGATGATGTTGAGTTG AGATTGGTTGGCATTACTG	<i>rfbO157</i>	420	0,1	AF049343	12
1806 1809	GCTGCAACGGTAAGTGAT GGCAGCAAGCGGGTTGGT	<i>fliCH7</i>	948	0,2	U47614	24
16S-F 16S-R	AGAGTTTGATCATGGCTCAG GGACTACCAGGGTATCTAAT	<i>E. coli</i> 16S rRNA	798	0,05	J01859	6
E16S-a E16S-b	CCCCTGGACGAAGACTGAC ACCGCTGGCAACAAGGATA	<i>E. coli</i> 16S rRNA	401	0,05	AB035924	23

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

Szczep	Serotyp	Genotyp	Piśmiennictwo
B2	O157:H7	<i>eaeA</i> , <i>ehlyA</i> , <i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>rfbO157</i> , <i>fliC</i>	8
C600J1	K-12	<i>stx1</i>	8
C600W34	K-12	<i>stx2</i>	8
12/96	O157:NM	<i>ehlyA</i>	17
CB572	O157:NM	<i>eaeA</i>	8
387/99	O55:H7	<i>fliC</i>	8
137/98	O157:NM	<i>rfbO157</i>	8
C600	K-12	Szczepy bez genów patogenności STEC	8, 15
H10407	O78:K80		
215	O26:K-		

**Matrycowy DNA.** Do amplifikacji fragmentów genów szczepów STEC użyto DNA otrzymanego przez zawieszenie 1 kolonii bakteryjnej w 25 µl jałowej, wolnej od DNaz wody redestylowanej (ICN Biomedicals, USA). Zawiesinę podgrzewano do 99°C przez 10 min. (Thermomixer, Eppendorf, Niemcy), a następnie odwirowano (13 000 g, 1 min.). Uzyskany supernatant stanowił źródło matrycowego DNA użytego do testów PCR (5 µl).

**Startery reakcji PCR.** Do opracowania testów PCR użyto starterów flankujących konserwatywne fragmenty genów kodujących najważniejsze czynniki patogenności szczepów STEC, tzn. toksynę Shiga Stx (gen *stx*) wraz z jej podstawowymi odmianami Stx1 (*stx1*) i Stx2 (*stx2*), intyminę (*eaeA*), enterohemolizynę (*ehlyA*) oraz geny odpowiedzialne za biosyntezę lipopolisacharydu (LPS) O157 *E. coli* (*rfbO157*) i czynnika rzęskowego H7 (*fliC*). Dodatkowo, do każdego testu włączono parę starterów, flankujących gen kodujący wytwarzanie 16S rRNA *E. coli*. Stanowiły one kontrolę wewnętrzną prawidłowości wykonania reakcji PCR, jak też obecności w mieszaninie reakcyjnej

właściwego DNA bakteryjnego. Charakterystykę użytych w pracy starterów oligonukleotydowych przedstawiono w tab. 2.

**Reakcje PCR.** Amplifikację wszystkich badanych w pracy fragmentów genowych wykonano w mieszaninie o objętości 50 µl, zawierającej 5 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP (200 µM), 2 U termostabilnej polimerazy Taq DNA (Fermentas, Litwa) oraz startery w koncentracjach podanych w tab. 2. Reakcje PCR wykonywano w termocyklerze PTM-100 (MJ Research, USA).



używając uniwersalnego dla wszystkich genów programu amplifikacji o następujących parametrach: 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 przeprowadzano 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 jednego z badanych w pracy czynników patogenności, obserwowano obecność dwóch produktów amplifikacji – charakterystycznego dla danej markera STEC oraz drugiego, typowego dla genu 16S rRNA *E. coli* (w zależności od użytych starterów – prążek o masie 401 pz lub 798 pz).

### Wyniki i omówienie

Do opracowania testów PCR, umożliwiających identyfikację podstawowych markerów genotypowych szczepów STEC, tzn. toksyn Shiga, intyminy i enterohemolizyny oraz serotypu O157 : H7, wybrano startery DNA o szerokim spektrum, pozwalające na amplifikację różnych odmian genotypowych toksyn Shiga oraz intyminy, jak też umożliwiające uzyskanie produktów o zróżnicowanych masach molekularnych. Sekwencje tych starterów zostały opisane wcześniej przez innych autorów, którzy wykazali również ich specyficzność w stosunku do amplifikowanych fragmentów genowych (3, 5, 10, 12, 13, 19, 24). Brano też pod uwagę możliwość wystąpienia wzajemnych interakcji między starterami flankującymi geny patogenności STEC a użytymi oligonukleotydami specyficz-

ny dla genów 16S rRNA *E. coli* (tab. 2). Istotnym kryterium wyboru była też zbliżona temperatura topnienia danego startera, niezbędna do równoczesnej amplifikacji dwóch fragmentów genowych w jednej reakcji PCR.

Według danych piśmiennictwa, stosunkowo największą informację dotyczy starterów DNA, pozwalających zidentyfikować markery genotypowe toksyny Shiga (2, 7, 9-11, 23). Jak wynika z badań Bastian i wsp. (2), gen *stx*, występujący w odmianach *stx1* i *stx2* z szeregiem wariantów, może być wykazany przy użyciu tylko niewielkiej liczby starterów, do których należą użyte w obecnych badaniach LIN3 i LIN5. Flankują one konserwatywny fragment genu podjednostki A, o identycznej dla większości toksyn Shiga *Stx1* i *Stx2* sekwencji nukleotydowej (11). Dodatkową zaletą tych starterów jest uzyskiwana w procesie amplifikacji *stx* masa molekularna (900 par zasad), pozwalająca na łatwe wizualne różnicowanie amplifikowanego równocześnie fragmentu genu 16S rRNA *E. coli* (401 pz), stanowiącego kontrolę wewnętrzną prawidłowego przebiegu reakcji PCR i użytego DNA bakteryjnego (ryc. 1, ścieżka 1).

W przypadku genów *stx1* i *stx2*, odpowiedzialnych za syntezę dwóch podstawowych odmian toksyny Shiga, użyto starterów LP30 i LP31 (*Stx1*) oraz LP43 i LP44 (*Stx2*), które umożliwiają amplifikację jednorodnej odmiany *Stx1* (włączając w to wariant *Stx1c*) (ryc. 1, ścieżka 2) oraz szeregu wariantów genotypowych *Stx2*, a zwłaszcza *Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e* i *Stx2f* (2, 5, 7) (ryc. 1, ścieżka 3). Taki układ pozwalał na specyficzną identyfikację wszystkich odmian toksyn Shiga, z różnicowaniem na *Stx1* i *Stx2* i nie stwarzał niebezpieczeństwa otrzymania wyników fałszywie ujemnych, szczególnie w przypadku wariantu *Stx2*.

Podobne kryterium wyboru zastosowano w odniesieniu do starterów oligonukleotydowych Int-Fc i Int-Rc, użytych do identyfikacji genu *eaeA*, kodującego wytwarzanie białka adhezyjnego intyminy. Startery te pozwalają amplifikować konserwatywny fragment genu, występujący we wszystkich znanych wariantach genotypowych (3). Również i w tym przypadku dodatkową zaletą użycia tych starterów jest masa molekularna amplikonu (884 pz), umożliwiającą łatwe odróżnienie od produktu amplifikacji genu 16S rRNA *E. coli* (401 pz) (ryc. 1, ścieżka 4).

Kolejne startery (Hly-AF i Hly-AR) charakteryzują się dużą swoistością i pozwalają na jednoznaczne oznaczenie konserwatywnego fragmentu genu *ehlyA*, odpowiedzialnego za syntezę podjednostki A enterohemolizyny, wytwarzanej przez



**Ryc. 1.** Obraz elektroforetyczny produktów amplifikacji PCR uzyskanych ze starterami flankującymi podstawowe markery patogenności shigatoksynicznych szczepów *E. coli*. Poszczególne ścieżki: M, 100 bp standard masy molekularnej (pozycja 500 pz zaznaczona strzałką); 1 – szczep B2 (*stx*-dodatni); 2 – szczep C600J1 (*stx1*-dodatni); 3 – szczep C600W34 (*stx2*-dodatni); 4 – szczep CB572 (*eaeA*-dodatni); 5 – szczep 12/96 (*ehlyA*-dodatni); 6 – szczep 137/98 (*rffO157*-dodatni); 7 – szczep 387/99 (*fliC*-dodatni); 8 – szczep C600 (16S rRNA-dodatni; 798 pz); 9 – szczep C600 (16S rRNA-dodatni; 401 pz); 10 – kontrola reakcji PCR (H<sub>2</sub>O)

szczepy STEC grupy O157 : H7, ale też przez izolaty STEC należące do innych serotypów (3, 19). W tym przypadku zastosowano inną parę starterów flankujących gen 16S rRNA *E. coli*, których produktem amplifikacji PCR był fragment o masie 798 pz (tab. 2). Umożliwiało to łatwe odróżnienie tego amplikonu od prążka genu enterohemolizyny (534 pz) w 1,5% żelu agarozowego (ryc. 1, ścieżka 5).

Pozostałe użyte startery oligonukleotydowe, tzn. PF8 i PR8 oraz 1806 i 1809, pozwalają na genotypową identyfikację serotypu O157 : H7 *E. coli*, uznawanego za najczęściej występujący wśród szczepów STEC izolowanych od bydła i wywołujących schorzenia HC i HUS u ludzi (12, 24). Podobnie jak w przypadku omówionych wcześniej testów, przy wyborze tych sekwencji kierowano się głównie kryterium specyficzności, jak też możliwością wizualnego różnicowania uzyskiwanych produktów amplifikacji genów rfbO157 (420 pz; ryc. 1, ścieżka 6) i fliC H7 (948 pz, ryc. 1, ścieżka 7) od odpowiednich amplikonów 16S rRNA *E. coli* (tab. 2).

Stwierdzono, używając referencyjnych szczepów *E. coli* (tab. 1), że wszystkie opracowane testy PCR umożliwiały amplifikację odpowiednich fragmentów genowych, czego rezultatem były produkty o oczekiwanych masach molekularnych (tab. 2; ryc. 1). W przypadku użycia szczepów nie posiadających żadnego z identyfikowanych genów (szczepy C600, H10407, 215), otrzymano tylko amplikony odpowiadające genom kodującym 16S rRNA *E. coli* (798 pz; ryc. 1, ścieżka 8 lub 401 pz; ryc. 1, ścieżka 9).

Opracowane testy PCR zastosowano następnie do identyfikacji genotypowych markerów chorobotwórczości szczepów STEC, używając 87 izolatów *E. coli* pochodzących od ludzi i zwierząt. Wykazano pełną zgodność wyników amplifikacji, uzyskanych we wcześniejszych badaniach, z rezultatami testów PCR użytych w obecnej pracy. Dodatkowo, we wszystkich wykonanych reakcjach PCR otrzymano prążek, odpowiadający fragmentowi genu 16S rRNA *E. coli* (w zależności od testu posiadał on masę 401 pz lub 798 pz), co umożliwiło kontrolę prawidłowości wykonanego procesu amplifikacji PCR, jak też rodzaju użytego matrycowego DNA bakteryjnego.

## Wnioski

1. Opracowane testy PCR cechują się specyficznością i umożliwiają identyfikację podstawowych markerów chorobotwórczości szczepów STEC.

2. Wprowadzenie kontroli wewnętrznej reakcji PCR umożliwia ocenę użytego DNA bakteryjnego i prawidłowości procesu amplifikacji.

## Piśmiennictwo

- Altekruse S. F., Cohen M. L., Swerdlow D. L.: Emerging foodborne diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 1997, 3, 285-293.
- Bastian S. N., Carle I., Grimont F.: Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of *stx* genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 1998, 149, 457-472.
- Batchelor M., Knutton S., Caprioli A., Huter V., Zanial M., Dougan G., Frankel G.: Development of a universal intimin antiserum and PCR primers. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 3822-3827.
- Beutin L., Montenegro M. A., Orskov L., Orskov F., Prada J., Zimmermann S., Stephan R.: Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin 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., Fellner 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.
- 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, 58-63.
- 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.
- 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.
- Lin Z., Kurazono H., Yamazaki S., Takeda Y.: Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* 1993, 37, 543-548.
- Maurer J. J., Schmidt D., Petrosco P., Sanchez S., Bolton L., Lee M. D.: Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for specific detection of *Escherichia coli* O157 by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 2954-2960.
- McDaniel T. K., Jarvis K. G., Donnenberg M. S., Kaper J. B.: A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 1664-1668.
- 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., 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.
- Osek J.: Molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in Poland. *Res. Vet. Sci.* 2001, 70, 175-177.
- Osek J.: Rapid and specific identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in faeces by multiplex PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 2002, 34, 304-310.
- Paton J. C., Paton A. W.: Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11, 450-479.
- Schmidt H., Beutin L., Karch H.: Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157 : H7 strain EDL 933. *Infect. Immun.* 1995, 63, 1055-1061.
- Schmidt H.: Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Res. Microbiol.* 2001, 152, 687-695.
- Tarr P. I.: *Escherichia coli* O157 : H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin. Infect. Dis.* 1995, 20, 1-8.
- Unkmeir A., Schmidt H.: Structural analysis of phage-borne *stx* genes and their flanking sequences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains. *Infect. Immun.* 2000, 68, 4856-4864.
- Wang G., Clark C. G., Rodgers F. G.: Detection in *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.
- Wang L., Rothemund D., Curd H., Reeves P. R.: Sequence diversity of the *Escherichia coli* fliC genes: implication for a DNA-based typing scheme for *E. coli* O157 : H7. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 1786-1790.
- Zhang W., Bielaszewska M., Kuczus 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.