

# Metoda real-time PCR (r-PCR) w diagnostyce molekularnej shigatoksycznych *Escherichia coli*

JACEK OSEK, MARCIN WEINER

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynaryjnego,  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Osek J., Weiner M.

## Real-time PCR assay (r-PCR) for molecular diagnosis of Shigatoxigenic *Escherichia coli*

### Summary

There is considerable progress of the molecular diagnosis of bacteria belonging to the Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) group. Apart from the application of PCR tests, methods based on real-time PCR (r-PCR) with fluorogenic labeled molecular probes play an important role. The aim of this review was to present the theoretical and practical aspects of r-PCR test and its practicality for laboratory identification of STEC. The differences between classical PCR and r-PCR tests, taking into account the possibility of automatization, speed, specificity and mathematical analysis of the obtained results have also been shown. The paper likewise describes different variants of the r-PCR used for the identification of STEC-specific virulence markers: Shiga toxin (stx1 and stx2 genes), O157 lipopolysaccharide (rfbO157 gene), intimin (eae gene), enterohemolysin (ehx gene) and the *E. coli*-specific 16S rRNA marker. It has been demonstrated that the r-PCR test has many advantages in comparison with the classical PCR assay, for instance a shorter time needed to obtain the final results as well as a higher specificity. It has also been demonstrated that the r-PCR method is a powerful tool for molecular diagnostics of microorganisms, including Shigatoxigenic *E. coli*, and should be included in routine identification of these bacteria.

**Keywords:** STEC, real-time, PCR, *E. coli*, identification

Shigatoksyczne szczepy *Escherichia coli* (STEC) są groźnym czynnikiem schorzeń narządowych i systemowych u ludzi – krwotocznego zapalenia jelita grubego (HC), hemolitycznego zespołu mocznicowego (HUS) i małopłytkowej plamicy zakrzepowej (TTP) (1, 2, 10, 26). Źródłem shigatoksycznych *E. coli* jest przede wszystkim bydło, które będąc bezobjawowym nosicielem, wydała te drobnoustroje z kałem do środowiska (22, 23). Stwierdzono, że shigatoksyczne *E. coli* występują również w przewodzie pokarmowym innych zwierząt domowych (świnie, owce, kozy), towarzyszących (psy, koty), wolno żyjących (jelenie) oraz drobiu. Większość infekcji u ludzi na tle STEC związana jest ze spożyciem zanieczyszczonej kałem żywności pochodzenia zwierzęcego (mięso w trakcie uboju i obróbki poubojowej, mleko, przetwory mleczne), roślinnego (warzywa, owoce, soki owocowe) oraz wody przeznaczonej do konsumpcji lub celów gospodarczych (mycie i nawadnianie). Ponadto możliwa jest transmisja szczepów STEC, będąca wynikiem bezpośrednich kontaktów człowiek–zwierzę i człowiek–człowiek.

Głównym czynnikiem patogenności, a jednocześnie markerem świadczącym o przynależności bakterii *E. coli* do grupy STEC, jest toksyna shiga, występująca w dwóch podstawowych odmianach: Stx1 i Stx2. Szczepy bakteryjne mogą wytwarzać Stx1, Stx2 lub

obie toksyny równocześnie (24). Innymi istotnymi czynnikami chorobotwórczości STEC są: białko adhezyjne intymina oraz enterohemolizyna (1, 3, 6). Intymina warunkuje przyczepność komórek bakteryjnych do nabłonka jelitowego oraz powoduje w nim zmiany histopatologiczne, określane jako „attaching-effacing” (5, 8, 13). Wspomniana enterohemolizyna (Ehly) wywołuje natomiast *in vivo* lizę krwinek czerwonych i uwolnienie jonów żelaza do środowiska, które wpływają na wzrost i namnażanie się bakterii *E. coli*, zwłaszcza grupy O157:H7 (28, 29).

### Identyfikacja STEC

Identyfikacja bakterii STEC opiera się na izolacji kolonii z pożywek selektywnych, które poprzedzone jest etapem przednamnażania (enrichment) z użyciem podłoży płynnych. Wyosobnione bakterie są następnie oznaczane gatunkowo za pomocą szeregu testów biochemicznych oraz, po stwierdzeniu przynależności do rodzaju *E. coli*, badane w kierunku typowych dla STEC czynników patogenności. Procedury te są zazwyczaj czaso- i pracochłonne, a uzyskane rezultaty nie zawsze jednoznaczne. Wprowadzenie metod opartych na biologii molekularnej, przede wszystkim na amplifikacji określonych genów za pomocą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR), znacznie usprawniło proces specyficznej i szybkiej diagnostyki drob-

Tab. 1. Charakterystyka metod opartych na r-PCR używanych do identyfikacji wybranych markerów chorobotwórczości *E. coli* należących do grupy STEC

Marker genotypowy	Odmiana r-PCR	Barwnik fluorescencyjny	Urządzenie analizujące	Piśmiennictwo
stx1 stx2	TaqMan	FAM TET TAMRA BHQ	ABI Prism 7700	11, 17, 30
	FRET	Fluorescein Red 640 Red 705	Light Cycler	2, 25
	SYBR Green	SYBR Green I	Light Cycler	14
eae	TaqMan	FAM TAMRA	ABI Prism 7700	9, 17, 18, 30
		Texas Red 575 BHQ	iCycle iQ	12
	FRET	Fluorescein Red 640	Light Cycler	25
ehx	TaqMan	FAM TET TAMRA	ABI Prism 7700	17
	FRET	Fluorescein Red 705	Light Cycler	25
rfbO157	Molecular Beacons	FAM DABCYL	ABI Prism 7700	7
16S rRNA	TaqMan	TET TAMRA	ABI Prism 7700	9

noustrojów, w tym należących do STEC (16, 20, 21, 24). Większość klasycznych testów PCR stosowanych do wykrywania shigatoksynicznych szczepów *E. coli* opiera się na identyfikacji genów kodujących wytwarzanie toksyn shiga (geny stx1 i stx2), intyminy (gen eae) lub enterohemolizyny (gen ehx) (19). W celu określenia wywołującej u ludzi najwięcej przypadków chorobowych grupy serologicznej *E. coli* O157, opracowano również testy umożliwiające identyfikację genu kodującego syntezę lipopolisacharydu O157 (rfbO157) oraz antygeny rzęskowego H7 (fliC) (3, 6, 24). Możliwe jest także oznaczenie kilku wybranych markerów genotypowych jednocześnie, przy użyciu reakcji multiplex PCR (m-PCR) (8, 10, 20-23, 31, 33).

W ostatnim okresie wprowadzono do diagnostyki molekularnej drobnoustrojów metodę real-time PCR z użyciem barwników (SYBR Green) oraz znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi sond molekularnych: TaqMan, Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) oraz Molecular Beacons (MB). Metoda ta skróciła czas prowadzonych badań do kilkudziesięciu minut oraz umożliwiła wysoce swoistą i dającą się określić ilościowo możliwość identyfikacji materiału genetycznego w badanych próbkach biologicznych (9, 14, 16-18, 30).

### Odmiany real-time PCR

Testy diagnostyczne oparte na real-time PCR można podzielić na dwie grupy: nieswoiste i swoiste. Do

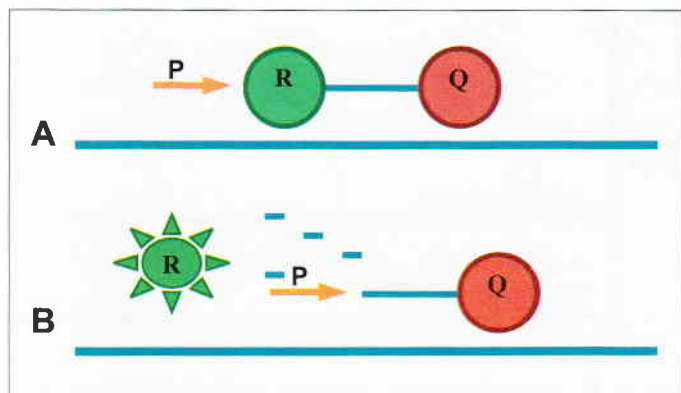
metod nieswoistych, umożliwiających jedynie ilościowe określenie powstałego produktu reakcji amplifikacji, którym jest dwuniciowy DNA, zalicza się odmianę SYBR Green (4, 14, 16). Do metod swoistych, pozwalających na ilościowe i jakościowe określenie otrzymanego produktu, zalicza się: TaqMan, FRET oraz Molecular Beacons (2, 7, 9, 12, 17, 18, 25, 30). Ogólna charakterystyka reakcji opartych na r-PCR, służących do identyfikacji wybranych markerów chorobotwórczości *E. coli* należących do STEC (rfbO157, stx1, stx2, eae, ehx) oraz obecności charakterystycznego dla *E. coli* genu 16S rRNA, przedstawiona została w tab. 1.

### SYBR Green

SYBR Green stanowi najprostszą, niespecyficzną odmianę testu r-PCR. Nazwa pochodzi od barwnika SYBR Green I, który łączy się, podobnie jak bromek etydyny w klasycznym PCR, z powstającym produktem amplifikacji, jakim jest dwuniciowy DNA. Efektem tego jest emisja fluorescencji, możliwa do analizy przez odpowiedni detektor. Gdy kwas nukleinowy zostanie zdenaturowany w przebiegu kolejnego cyklu PCR, a tym samym podwójna nić DNA ulegnie rozłączeniu, barwnik odłącza się od rozdzielonych nici i fluorescencja zanika (4, 14, 16). Wadą tej metody jest uzyskiwanie wyników dla każdego dwuniciowego produktu reakcji, niezależnie od faktu, czy otrzymany DNA jest poszukiwanym produktem, czy też produktem powstałym na skutek zanieczyszczenia próbki obcym DNA. Typowym urządzeniem wykorzystywanym do identyfikacji szczepów STEC metodą real-time PCR w odmianie SYBR Green jest Light Cycler firmy Roche Applied Science. Pozwala on na uzyskanie i odczyt specyficznych wyników amplifikacji w czasie ok. 40 min. (14).

### TaqMan

Metoda „TaqMan 5' nuclease” umożliwia szybką, swoistą i w pełni zautomatyzowaną amplifikację DNA. Test opiera się na hydrolizie, przez polimerazę Taq, sondy oligonukleotydowej znakowanej barwnikami fluorescencyjnymi. Możliwe jest to dzięki unikalnym właściwościom enzymu Taq, który obok cech polimerazy wykazuje równocześnie właściwości 5'-3'-egzonukleazy. Sonda nukleotydowa stosowana do testu TaqMan znakowana jest dwoma barwnikami, określanymi jako reporter (barwnik wzbudzający) i quencher (barwnik tłumiący). Barwnikami wzbudzającymi są najczęściej FAM (6-karboksyfluoresceina) i TET (6-karboksy-tetrachlorofluoresceina), natomiast rolę quenchera pełni zwykle związek określany skrótem TAMRA (6-karboksy-tetrametylo-rodamina) (9, 17, 30, 32). Reporter dołączony jest w sondzie TaqMan do jej końca 5', a quencher do końca 3'. Przed reakcją barwnik tłumiący wpływa na barwnik wzbudzający, hamując jego fluorescencję. Po związaniu się sondy z matrycowym DNA i hybrydacji specyficznych star-



Ryc. 1. Sonda TaqMan. A: Na końcach sondy oligonukleotydowej znajdują się barwniki fluorescencyjne: reporter (R) i quencher (Q). B: Polimeraza Taq (P) powoduje degradację sondy i uwolnienie reportera do środowiska. Następuje zniesienie hamującego działania quenchera i wzbudzenie promieniowania przez reportera

terów PCR następuje aktywacja polimerazy, która dociera do miejsca przyłączenia sondy z kwasem DNA i degradując zawarte w niej nukleotydy, uwalnia reportera do mieszaniny reakcyjnej. Następuje zniesienie hamującego oddziaływania quenchera i wywołanie fluorescencji przez reportera (ryc. 1). Powtarzające się cykle amplifikacyjne powodują wzrost ilości uwolnionego barwnika do otoczenia, a tym samym ogólny wzrost fluorescencji wykrywany odpowiednim detektorem, np. ABI Prism 7700 firmy Applied Biosystems (9, 15, 17, 18, 30).

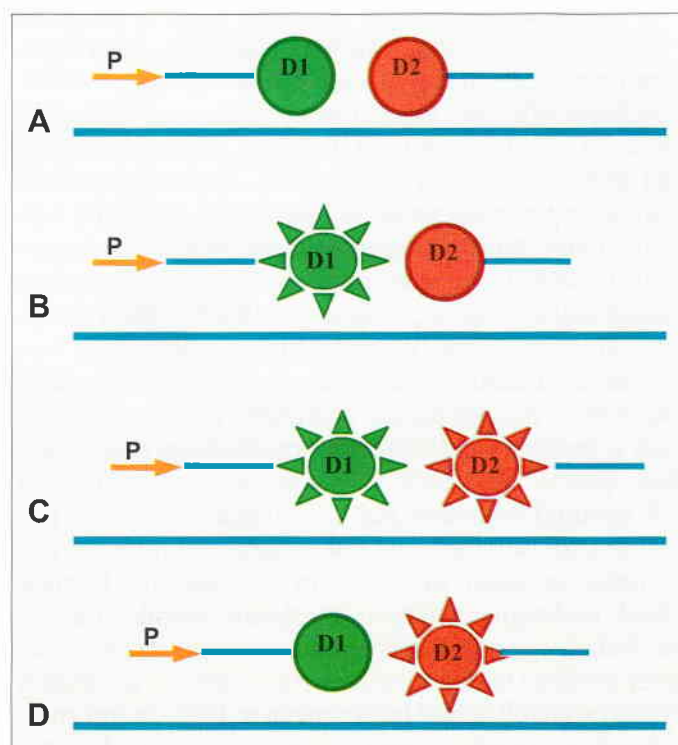
Konstruując sondę molekularną używaną w systemie TaqMan należy zwrócić uwagę, aby jej temperatura topnienia była około 10°C wyższa niż temperatura topnienia starterów. W takim układzie reakcja amplifikacji i aktywność sondy przebiegnie prawidłowo, tzn. w pierwszej kolejności nastąpi jej hybrydyzacja z matrycowym DNA, a dopiero później przyłączą się specyficzne dla danego genu STEC startery PCR.

W skład mieszaniny reakcyjnej „TaqMan 5' nucleasę” wchodzi, oprócz wspomnianej sondy molekularnej: polimeraza DNA AmpliTaq Gold (np. Applied Biosystem), enzym UNG (AmpErase uracylo-N-glikozylaza), barwnik ROX (6-karboksy-s-rodamina), umożliwiający standaryzację reakcji oraz pozostałe składniki, analogicznie jak w klasycznym teście PCR, tzn.: bufor enzymatyczny, jony magnezu, nukleotydy oraz specyficzne dla danego amplifikowanego fragmentu genomu startery oligonukleotydowe. Istotną rolę w przebiegu reakcji real-time PCR odgrywa enzym UNG, który odpowiada za degradację niepożądanego DNA, jaki może być obecny w mieszaninie reakcyjnej na skutek jej zanieczyszczenia. Aktywacja UNG następuje w temperaturze 50°C, w pierwszym cyklu procesu amplifikacji. Enzym ten ulega unieczynnieniu w temperaturze 95°C, po aktywacji polimerazy Taq. Uzyskane w metodzie r-PCR produkty amplifikacji charakteryzują się znacznie mniejszą długością, wynoszącą od 40 do 150 par zasad (pz), niż w przypadku klasycznego testu PCR, w którym otrzymuje się zwyk-

le amplikony o wielkości od 100 do 3000 pz (9, 17, 18). Związane jest to z użyciem starterów oligonukleotydowych flankujących niewielki tylko fragment powielanego genu, który jednak zawiera w sobie sekwencje komplementarne do użytej sondy TaqMan.

### FRET

Metoda FRET cechuje się równoczesnym użyciem dwóch znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi sond oligonukleotydowych (2, 25). Każda z nich markowana jest innym fluorochromem, znajdującym się na różnych końcach łańcucha oligonukleotydowego, tzn. jeden z barwników znajduje się na końcu 5' pierwszego łańcucha, drugi barwnik znajduje się na końcu 3' drugiego oligonukleotydu. Sekwencje sond są dobierane w taki sposób, aby po hybrydyzacji z matrycowym DNA znajdowały się one w odległości od 1 do 5 nukleotydów. Takie położenie określa się mianem głowa-ogon (head-to-tail) (16). Wyemitowane przez detektor promieniowanie o określonej długości powoduje wzbudzenie pierwszego barwnika sondy, który przekazując energię drugiemu barwnikowi, powoduje jego aktywację i emisję promieniowania (ryc. 2). Pomiar fluorescencji barwników odbywa się wyłącznie w czasie hybrydyzacji sondy z badanym matrycowym DNA, za pomocą odpowiednich detektorów (np. Light Cycler). Na etapie wydłużania i denaturacji barwniki



Ryc. 2. Sonda FRET. A: Na końcach sond znajdują się dwa różne barwniki fluorescencyjne. W trakcie hybrydyzacji z matrycowym DNA oraz aktywacji polimerazy Taq (P) sondy zbliżają się do siebie. B: Promieniowanie wysłane przez urządzenie analizujące powoduje wzbudzenie barwnika 1 (D1). C: Wzbudzony barwnik wywołuje transfer energii i aktywację barwnika 2 (D2). D: Indukowany barwnik 2 wywołuje fluorescencję, analizowaną przez urządzenie rejestrujące

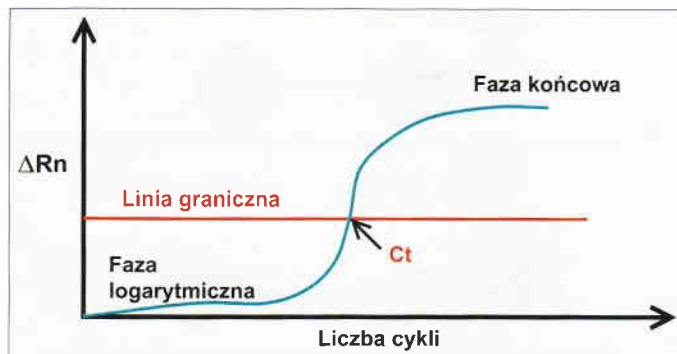
oddalone są od siebie i fluorescencja nie następuje. Do najczęściej używanych w tej odmianie r-PCR barwników fluorescencyjnych należą: LC Red 640 (ester N-hydroksybursztynimidowy) i LC Red 705 (705-amidofosforyn) (25, 32).

### Molecular Beacons (MB)

Używane w tym wariantcie testu r-PCR sondy molekularne mają kształt kolistej pętli, której końce biegną równolegle do siebie na kształt spinki do włosów. Na końcach takiej sondy znajdują się barwniki, połączone są ze sobą za pomocą odpowiednich wiązań chemicznych. W takiej postaci sonda molekularna jest nieaktywna, gdyż fluorescencja jednego barwnika (reporter) tłumiona jest przez drugi barwnik (quencher), którym jest DABCYL (kwas 4-dimetylamino-fenylzobenzoesowy) (7). Hybrydyzacja sondy z matrycowym DNA powoduje przerwanie połączenia mostkowego pomiędzy reporterem a quencherem. W tej metodzie, w przeciwieństwie do TaqMan, temperatura topnienia sondy powinna być zbliżona do temperatury topnienia startera, ponieważ największą wartość fluorescencji stwierdza się na etapie przyłączania MB do matrycowego DNA. W momencie zmiany temperatury sonda wraca do pierwotnego kształtu i fluorescencja zanika (7, 30).

### Odczyt wyników

W przebiegu każdego procesu PCR występują 3 fazy: logarytmiczna, liniowa i końcowa. Faza logarytmiczna obejmuje pierwsze cykle reakcji, przebiegające specyficznym i bardzo precyzyjnym, ze 100% efektywnością. W fazie drugiej, liniowej, substraty zaczynają stopniowo się wyczerpywać, dynamika reakcji zwalnia, a powstałe produkty na skutek działania wysokiej temperatury zaczynają ulegać procesowi degradacji. Ostatnim etapem jest faza końcowa, w której reakcja zatrzymuje się na skutek całkowitego wyczerpania się substratów. W tradycyjnym teście PCR wykrywanie produktów amplifikacji odbywa się w fazie końcowej i polega na ich rozdzieleniu w żelu agarozowym w procesie elektroforezy, co wymaga czasu i nakładu pracy. Uzyskany w trakcie klasycznej reakcji PCR produkt widoczny jest w żelu agarozowym w postaci prążka, którego masa określana jest poprzez porównanie ze znanym wzorcem (markerem). Istnieje jednak niebezpieczeństwo uzyskania wyniku fałszywie dodatniego, np. w przypadku zanieczyszczenia badanej próbki DNA pochodzącym z innych, wcześniej wykonywanych analiz lub kwasem nukleinowym znajdującym się w otoczeniu (w pomieszczeniu laboratoryjnym). Ponadto, klasyczny test PCR umożliwia wyłącznie identyfikację produktu amplifikacji, a nie pozwala określić, jaka ilość DNA była wcześniej dodana do mieszaniny reakcyjnej. Innym ograniczeniem klasycznego PCR jest możliwość uzyskania podczas elektroforezy prążków widocznych słabo w świetle UV. Nie ma wtedy pewności, czy otrzymany wynik jest re-



Ryc. 3. Wykres obrazujący kinetykę reakcji real-time PCR (szczegóły w tekście)

zultatem dodatnim, czy tylko fałszywie dodatnim, na skutek przeniknięcia produktu do sąsiedniego rowka w żelu lub zanieczyszczenia go w trakcie wykonywania czynności laboratoryjnych. Z tego względu konieczne jest nieraz powtórzenie reakcji lub modyfikacja jej parametrów, co wydłuża czas niezbędny do diagnozy czynnika zakaźnego. Dodatkowo, bromek etydy, używany do barwienia amplikonów, wykazuje działanie teratogenne i może stanowić niebezpieczeństwo dla osób wykonujących elektroforezę agarozową produktów reakcji PCR.

W metodzie real-time PCR wynik podawany jest w postaci wartości liczbowych lub odpowiadających im wykresów (ryc. 3). Rejestracja i matematyczna analiza uzyskanych w tej metodzie rezultatów rozpoczyna się już od pierwszego cyklu amplifikacji i obejmuje kilka istotnych elementów. Należą do nich: linia graniczna (treshold), fluorescencja reportera (normalized reporter,  $Rn$ ), przyrost fluorescencji ( $\Delta Rn$ ), cykl graniczny (cycle treshold,  $Ct$ ), krzywa topnienia (melting curve) oraz krzywa standaryzacyjna (standard curve), umożliwiającą określenie czułości testu r-PCR (2, 7, 9, 12, 25, 30).

**Linia graniczna** obliczana jest jako 10-krotność odchylenia standardowego (SD) dla średniej zmierzonych fluorescencji z pierwszych kilku cykli reakcji amplifikacji. Wartość tę umieszcza się na wykresie w postaci poziomo biegnącej linii, a wszystkie wartości fluorescencji poniżej niej uważa się za nieistotne w przebiegu reakcji (emisja tła).

**Fluorescencję reportera** oblicza się przez podział fluorescencji barwnika właściwego (reportera) przez fluorescencję barwnika referencyjnego (np. ROX).

**Przyrost fluorescencji** stanowi wynik odejmowania  $Rn$  od uśrednionych wartości fluorescencji w pierwszych cyklach.

**Cykl graniczny** stanowi taki numer cyklu w przebiegu r-PCR, w którym następuje przecięcie się  $\Delta Rn$  z linią graniczną.

**Krzywa topnienia.** Otrzymane w r-PCR produkty reakcji, mimo bardzo wysokiej jej specyficzności, nie zawsze są jednakowe, gdyż mogą różnić się jedną lub dwiema parami zasad. Ze względu na zmiany w zawartości zasad G-C, uzyskane amplikony cechują się odmienną temperaturą topnienia, a tym samym emisją

fluorescencji, dzięki czemu możliwe jest ich bardzo dokładne zróżnicowanie. W tym celu uzyskany produkt testu r-PCR poddaje się działaniu temperatury w przedziale od 40°C do 80°C. W ściśle określonym dla każdego ampliconu przedziale temperaturowym dochodzi do gwałtownego wzrostu fluorescencji, która następnie, po obniżeniu temperatury gwałtownie maleje.

**Krzywa standaryzacyjna.** Czulość testu r-PCR wyznacza się za pomocą krzywej standaryzacyjnej (standard curve), która pokazuje liniową zależność pomiędzy ilością użytego do analizy DNA (podawaną np. w jednostkach tworzących kolonie CFU) a wartością Ct (cykl graniczny) (9, 12, 17, 30).

### Podsumowanie

Real-time PCR stanowi bardzo czułą, szybką i nowoczesną molekularną metodę diagnostyczną, która staje się coraz bardziej popularna i znajduje szerokie zastosowanie w diagnostyce laboratoryjnej. Zastosowanie barwników fluorescencyjnych (metoda SYBR Green) oraz znakowanych fluorochromami sond molekularnych: TaqMan, FRET oraz Molecular Beacons (MB) skróciło czas prowadzonych badań do kilkunastu minut oraz umożliwiło wysoce swoistą i dającą się określić ilościowo możliwość identyfikacji charakterystycznych dla shigatoksycznych *E. coli* markerów genotypowych (stx1, stx2, rfbO157, eae, ehx, 16S rRNA). Te istotne zalety r-PCR w porównaniu z klasyczną metodą amplifikacji genotypowej sprawiły, że real-time PCR stanowi istotny postęp w diagnostyce mikrobiologicznej drobnoustrojów i należy sądzić, że zostanie w najbliższym czasie wprowadzony do rutynowej identyfikacji bakterii należących do grupy 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. Bellin T., Pulz M., Matussek A., Hepmen H.-G., Gunzer F.: Rapid detection of enterohemorrhagic Escherichia coli by real-time PCR with fluorescent hybridization probes. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 370-374.
3. Beutin L., Montenegro M. A., Orskov I., 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.
4. Bhagwat A. A.: Simultaneous detection of Escherichia coli O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 84, 217-224.
5. Brunder W., Schmidt H., Karch H.: KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Microbiology* 1996, 142, 3305-3315.
6. 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 feces by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 868-872.
7. Fortin N. Y., Mulchandani A., Chen W.: Use a real-time polymerase chain reaction and molecular beacons for the detection of Escherichia coli O157:H7. *Analyt. Biochem.* 2001, 289, 281-288.
8. 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.
9. Frydendahl K., Imberechts H., Lehmann S.: Automated 5' nuclease assay for detection of virulence factors in porcine Escherichia coli. *Moll. Cell. Probes* 2001, 15, 151-160.
10. 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.
11. Heller L. C., Davis C. R., Keally Peak K., Wingfield D., Cannons A. C., Amuso P. T., Cattani J.: Comparison of methods for DNA isolation from food samples for detection of shiga toxin-producing Escherichia coli by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 1844-1846.
12. Ibekwe A. M., Watt P. M., Grieve C. M., Shrama V. K., Lyons S. R.: Multiplex fluorogenic real-time PCR for detection and quantification of Escherichia coli O157:H7 in dairy wastewater wetlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 4853-4862.
13. Jerse A. E., Yu J., Tall B. D., Kaper J. B.: A genetic locus of enteropathogenic Escherichia coli necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 7839-7843.
14. Jothikumar N., Griffiths M. W.: Rapid detection of Escherichia coli O157:H7 with multiplex real-time PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 3169-3171.
15. Lee L. G., Connell C. R., Bloch W.: Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 1993, 21, 3761-3766.
16. Leutenegger C. M.: The real-time Taqman PCR and applications in veterinary medicine. *Vet. Sci. Tomorrow* 2001, 1, 1-15.
17. Nielsen E. M., Andersen M. T.: Detection and characterization of verocytotoxin-producing Escherichia coli by automated 5' nuclease PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 2884-2893.
18. Oberst R. D., Hays M. P., Bohra L. K., Phebus R. K., Yamashiro C. T., Paszlo-Kolva C., Flood S. J. A., Sergeant J. M., Gillespie J. R.: PCR-based DNA amplification and presumptive detection of Escherichia coli O157:H7 with an internal fluorogenic probe and 5' Nuclease (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64, 3389-3396.
19. Osek J.: Genotypowa charakterystyka szczepów Escherichia coli O157 izolowanych w Polsce. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 255-257.
20. Osek J.: Genotypowa identyfikacja i różnicowanie shigatoksycznych szczepów Escherichia coli przy użyciu multiplex PCR. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 323-326.
21. Osek J.: Oznaczanie markerów genotypowych fimbrii F18 i toksyny shiga Stx2e szczepów Escherichia coli testem multiplex PCR. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 510-512.
22. 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.
23. Paton A. W., Paton J. C.: Detection and characterization of Shiga toxigenic 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.
24. Paton J. C., Paton A. W.: Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11, 450-479.
25. Reischl U., Youseff M. T., Kilwinski J., Lehn N., Zhang W. L., Karch H., Stockbine N. A.: Real-time fluorescence PCR assay for detection and characterization of Shiga toxin, intimin and enterohemolysin genes from Shiga toxin-producing Escherichia coli. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 2555-2565.
26. Riley L. W., Remis R. S., Helgerson S. D., McGee H. B., Wells J. G., Davis B. R., Hebert R. J., Olcott E. S., Johnson L. M., Hargrett N. T., Blake P. A., Cohen M. L.: Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype. *New Engl. J. Med.* 1983, 308, 681-685.
27. Saiki R., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N.: Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230, 1350-1354.
28. Schmidt H., Beutin L., Karch H.: Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of Escherichia coli O157:H7 strain EDL 993. *Infect. Immun.* 1995, 63, 1055-1061.
29. Schmidt H., Karch H., Beutin L.: The large-sized plasmids of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 strains encode hemolysins which are presumably members of E. coli  $\alpha$ -hemolysin family. *FEMS Microbiol. Lett.* 1994, 117, 189-196.
30. Sharma V. K., Dean-Nystrom E. A., Casey T. A.: Semi-automated fluorogenic PCR assay (TaqMan) for rapid detection of Escherichia coli O157:H7 and other shiga toxigenic Escherichia coli. *Moll. Cell. Probes* 1999, 13, 291-302.
31. Sharma V. K., Dean-Nystrom E. A.: Detection of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 by using a multiplex real-time PCR assay for genes encoding intimin and Shiga toxins. *Vet. Microbiol.* 93, 247-260.
32. Uhl J. R., Bell C. A., Sloan L. M., Espy M. J., Smith T. F., Rosenblatt J. E., Cockerill III F. R.: Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for the detection of microbial pathogens: the Mayo-Roche rapid anthrax test. *Mayo Clin. Proc.* 2002, 77, 673-680.
33. Wang G., Clark C. G., 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.