

Identyfikacja i charakterystyka shigatoksycznych szczepów *Escherichia coli* występujących w surowej wołowinie przy użyciu sondy molekularnej oraz multiplex PCR*)

MARCIN WEINER

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

Weiner M.

Identification and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from raw beef by the use of a molecular probe and multiplex PCR

Summary

Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) are a serious cause of human diseases. The infections are mainly associated with strains belonging to serogroups O157, O26, O103, O111 and O113, while the main source of infection is contaminated food of animal origin (especially beef). In this study the molecular identification methods for STEC were used which enabled detection of STEC in raw beef using multiplex PCR (mPCR) assays, isolation of individual bacterial colonies with digoxigenin (DIG)-labeled DNA probe and characterization of the virulence markers by the use of mPCR.

The molecular method was used to examine 272 raw beef samples obtained from slaughterhouses. After the mPCR-1 analysis 16 stx-positive samples (5.88%) were detected. The STEC isolates were then tested using the mPCR and PCR assays. Eight of them belonged to O157:H7 serotype by the presence of the *rfbO157* and *fliC_{H7}* genes. The *stx₁* marker was observed in all *E. coli* O157:H7 and in four of the non-O157:H7 isolates tested. Moreover, the *stx₂* gene was detected in all *E. coli* O157:H7 and in seven of the non-O157:H7, three of them also possessed the *stx₁* marker. Eight of the *rfbO157*-negative STEC were examined with the mPCR-3 assay to detect the *rfbO111*, *rfbO113* and O26wzx markers, three of them produced the characteristic amplicon for the O26 group. These isolates also carried the *stx₁* (one strain) or *stx₂* genes (two isolates). Among the STEC tested, none belonged to the O111 or O113 groups. The amplification with the mPCR-4 assay showed that all isolates harbored the enterohemolysin (*ehlyA*) gene whereas the intimin marker (*eaeA*) was observed in all *E. coli* O157:H7 and O26 isolates.

Keywords: molecular probe, STEC, PCR, beef

Źródłem zakażeń ludzi shigatoksycznymi szczepami *E. coli* jest przede wszystkim żywność pochodzenia zwierzęcego (głównie wołowina). Zachorowania wywołane są najczęściej obecnymi w niej szczepami STEC (shigatoksyczne *E. coli*) należącymi do grup serologicznych: O157, O26, O111 oraz O113. W Polsce do zakażeń dochodzi sporadycznie, jednak dotychczas szersze badania w tym zakresie nie były prowadzone. Do identyfikacji STEC w rutynowej diagnostyce stosowane są klasyczne metody mikrobiologiczne, które są czasochłonne i pracochłonne, a ich rezultaty nie zawsze jednoznaczne. Wynika to, między innymi,

z różnic pomiędzy poszczególnymi szczepami należącymi do STEC oraz z małej liczby tych bakterii w badanym materiale biologicznym w porównaniu do mikroflory towarzyszącej (10). Wprowadzenie testów opartych na biologii molekularnej, takich jak hybrydyzacja DNA ze znakowanymi sondami genetycznymi oraz amplifikacja DNA metodą PCR, znacznie usprawniło proces specyficznej i szybkiej diagnostyki tych drobnoustrojów (12). W dostępnych publikacjach brak jednak technik molekularnych, które umożliwiłyby oznaczenie zarówno *E. coli* O157:H7, jak i innych serotypów STEC często występujących w surowej wołowinie.

Celem badań było określenie możliwości zastosowania sondy molekularnej znakowanej digoksygeni-

*) Badania wykonane w ramach projektu nr 2P06K03427 finansowanego przez MNiSW w Zakładzie Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego PIWet-BIP; kierownik projektu: prof. dr hab. Jacek Osek.

ną oraz testów multiplex PCR do identyfikacji shiga-toksycznych szczepów *E. coli* obecnych w surowej wołowinie oraz charakterystyki posiadanych przez nie genotypowych markerów patogenności.

Material i metody

Material do badań. Próbkę wołowiny (25 g) uzyskane od bydła pochodzącego z województwa lubelskiego ($n = 99$), mazowieckiego ($n = 70$), podkarpackiego ($n = 47$) oraz świętokrzyskiego ($n = 56$), pobierano w zakładach mięsnych z tusz wołowych bezpośrednio przed schłodzeniem i dostarczano w czasie kilku godzin (1–4 h) do laboratorium.

Hodowla. Do każdej próbki dodawano 225 ml bulionu TSB, homogenizowano (Stomacher 400, Seward Lab System, Anglia) przez 2 min. z częstotliwością 230 uderzeń/min. i inkubowano w cieplarni w temp. 37°C przez 6 h, z wytrząsaniem (150 rpm). Z tak uzyskanej hodowli wstępnej pobierano 1 ml, przenoszono do 4 ml TSB z mitomycyną C (50 µg/l) i inkubowano przez kolejne 18 h w temp. 37°C z wytrząsaniem (150 rpm).

Matrycowy DNA. Z hodowli pobierano 2 ml, wirowano przez 2 min., 5000 × g. Uzyskany supernatant (1 ml) wirowano ponownie przez 5 min., (13 000 × g). Otrzymany osad przemywano PBS (1 ml) i ponownie wirowano, a osad zawieszano w 200 µl wody redestylowanej. Zawiesinę ogrzewano w temp. 99°C przez 10 min. i schładzano w lodzie przez 20 min. Po kolejnym wirowaniu (13 000 × g, 1 min.) uzyskany supernatant stanowił źródło matrycowego DNA.

Test mPCR-1. Amplifikację genów toksyny Shiga (stx) oraz genu 16S rRNA *E. coli* wykonywano w mieszaninie PCR składającej się z matrycowego DNA, 5 µl buforu enzymatycznego, 5 mM MgCl₂, 5 µl nukleotydów dNTP (200 µM), 1 U polimerazy Taq (Fermentas, Litwa), starterów oligonukleotydowych (IBB PAN, Polska) oraz wody wolnej od DNazy i RNazy (ICN Biomedicals, USA), dodanej do końcowej objętości 50 µl. Reakcję amplifikacji wykonywano w termocyklerze PTM-100 (MJ Research, USA). Charakterystykę oraz sekwencje nukleotydowe starterów, jak również parametry amplifikacji przedstawiono w poprzedniej pracy (24).

Metoda hybrydyzacji. Do identyfikacji pojedynczych kolonii szczepów shigatoksycznych *E. coli* użyto opisanych hodowli bulionowych. Hodowle te badano testem mPCR-1. W przypadku wyniku pozytywnego z hodowli pobierano 2 ml i wirowano wstępnie przez 2 min., 5000 × g. Uzyskany supernatant rozcieńczano buforem PBS i posiewano na 3 płytki z agarem Tergitol-7, które inkubowano w temp. 37°C przez 18 h. Do dalszych badań wybierano te płytki, na których uzyskano wzrost w granicach 50–100 kolonii bakteryjnych. Hybrydyzację DNA kolonii wykonano w ten sposób, że na wyrośnięte kolonie bakteryjne przykładano krążek nitrocelulozowy (NC) (Roche), a po delikatnym zdjęciu umieszczano kolejno w roztworze denaturacyjnym, neutralizacyjnym oraz kalibrującym i inkubowano, odpowiednio, przez 15 min., 15 min. oraz 10 min. Po wysuszeniu NC w temp. pokojowej utrwalano bakteryjny DNA w piecu hybrydyzacyjnym (Biometra OV1, Biometra, Niemcy) w temp. 80°C przez 45 min. Celem usunięcia

składników ściany komórkowej bakterii dodawano proteinazę K (Sigma) i inkubowano NC w temp. 37°C przez 1 h.

Sonda DNA. Do wykonania sondy molekularnej użyto DNA referencyjnego szczepu *E. coli* 344 i wykonano techniką PCR (12). Odpowiednie prążki stx wycinano z żelu, przenoszono do probówek Eppendorfa zawierających 200 µl jałowej wody redestylowanej, ogrzewano w temp. 99°C przez 10 min. i schładzano w lodzie przez 20 min. Tak przygotowaną sondę dodawano do roztworu DIG Easy Hyb (Roche) i wstawiano do lodu. Po tym etapie przenoszono ją do butelek hybrydyzacyjnych (Biometra) zawierających wcześniej przygotowane krążki nitrocelulozowe i wykonywano hybrydyzację w piecu hybrydyzacyjnym w 42°C przez 18 h. Następnie membrany płukano w roztworze płuczającym w temperaturze pokojowej przez 5 min., dodawano koniugat anty-DIG-AP (Roche) (1 µl/NC) i inkubowano przez 60 min. w temperaturze pokojowej. Po dwukrotnym płukaniu membran w buforze płuczającym dodawano substrat NBT i BCIP (Roche) w buforze TBS, w ilości 5 ml/NC i inkubowano bez dostępu światła przez 1 h. Krążki nitrocelulozowe z ciemnymi punktami wskazującymi na obecność genu stx toksyny Shiga stanowiły podstawę do identyfikacji odpowiadających im kolonii bakteryjnych na macierzystych płytkach agarowych. Kolonie te przesiewano następnie na płytki z agarem LB i inkubowano w temp. 37°C przez 18 h.

Test mPCR-2, mPCR-3 oraz mPCR-4. Szczegółową charakterystykę markerów patogenności STEC: stx1, stx2, rfbO157, fliC_{H7}, wykonano przy użyciu mPCR-2, ehlyA, eaeA testem mPCR-3 a genów O26wzx, rfbO111 i rfbO113, typowych dla *E. coli* O26, O111 oraz O113 przy użyciu testu mPCR-4, które szczegółowo opisano w poprzedniej pracy (24).

Wyniki i omówienie

Wprowadzenie metod opartych na biologii molekularnej, przede wszystkim amplifikacji określonych genów za pomocą PCR, znacznie usprawniło proces specyficznej i szybkiej diagnostyki drobnoustrojów należących do STEC oraz istotnych z klinicznego punktu widzenia ich genotypowych markerów patogenności. Z drugiej strony, obecność w badanym materiale mioglobiny, hemoglobiny czy NaCl, jak również mikroflory towarzyszącej często wpływa hamująco na proces amplifikacji genowej i powoduje uzyskanie wyników fałszywie ujemnych. Z tego względu w obecnej pracy do identyfikacji STEC w mięsie wołowym, jak również do późniejszej charakterystyki ich markerów patogenności, zastosowano testy multiplex PCR zawierające oprócz sekwencji starterowych charakterystycznych dla badanych genów STEC, wewnętrzną kontrolę reakcji w postaci powielania fragmentu genu 16S rRNA *E. coli*.

Przy użyciu testu mPCR-1 zbadano 272 próbki wołowiny i stwierdzono 16 stx-dodatnich (5,88%). Najwięcej z nich pochodziło z województwa lubelskiego ($n = 7$) oraz świętokrzyskiego ($n = 6$), natomiast w przypadku próbek otrzymanych z województwa mazowieckiego uzyskano dwa wyniki dodatnie, a z podkarpackiego jeden taki wynik.

Badania wykonywane w Polsce przez innych autorów koncentrowały się dotychczas przede wszystkim na identyfikacji markerów patogenności u STEC wyosobnionych od ludzi lub zwierząt, a w niewielkim stopniu dotyczyły występowania tych bakterii w żywności. Szych i wsp. (19) wyizolowali 5 szczepów *E. coli* O157:H7, charakteryzujących się obecnością wyłącznie genu *stx*₂. Kwiatek i Różańska (7), po przebadaniu 210 próbek, stwierdzili *E. coli* O157:H7 w mięsie wołowym (8,0%), mielonym mięsie wieprzowo-wołowym (16,0%) oraz mleku surowym (5,56%). Sadowskiej i wsp. (17) udało się wyosobnić z 40 próbek żywności 2 szczepy *E. coli* O157:H7, z których tylko jeden, należący do serotypu O157:H7, na podstawie obecności genu *stx* zaliczono do grupy STEC oraz drugi do grupy O26.

Analiza dostępnych publikacji wykazała, że pomimo wysokiej czułości i specyficzności testów PCR, umożliwiających identyfikację genów charakterystycznych dla STEC, obecność mikroflory towarzyszącej uniemożliwia często wyizolowanie pojedynczych komórek bakteryjnych należących do tej grupy. Khan i wsp. testem PCR stwierdzili gen *stx* w 55 ze 111 zbadanych próbek wołowiny, jednak tylko z 4 z nich udało się wyizolować drobnoustroje *stx*-dodatnie (5). Z podobnym problemem zetknęli się również Pierard i wsp., którzy wyosobnili STEC jedynie z połowy próbek mięsa reagujących dodatnio w teście PCR (15).

Z tego względu w badaniach własnych zastosowano metodę hybrydyzacji umożliwiającą identyfikację i izolację pojedynczych komórek STEC z płytki agarowej, dzięki przyłączaniu komplementarnego oligonukleotydu znakowanego digoksygeniną do fragmentu genu *stx* bakterii. Początkowo wykorzystano w tym celu płytki z agarem LB, stosowane w badaniach przez Oskę i Galliena (12) do identyfikacji STEC w próbkach kału bydłęcego. Ze względu na często stwierdzany zalewowy wzrost mikroflory naturalnie obecnej w mięsie, do izolacji STEC zastosowano agar Tergitol-7. Villari i wsp. (23) używali go do wykrywania oraz oznaczania liczby komórek *E. coli* obecnych w żywności i wykazali, że skutecznie hamował wzrost innych drobnoustrojów obecnych w mięsie. Zastosowanie

tej pożywki w obecnych badaniach do metody hybrydyzacji powodowało jednak powstawanie niespecyficznych, jasnoniebieskich punktów na membranach nitrocelulozowych, błędnie sugerujących obecność kolonii bakteryjnych zawierających gen *stx*. Zjawisko to wyeliminowano w trakcie optymalizacji odczynu hybrydyzacji poprzez zmniejszenie koncentracji używanego koniugatu anty-DIG-AP.

Kolonie bakteryjne *stx*-dodatnie, zidentyfikowane przy użyciu sondy molekularnej znakowanej digoksygeniną, poddano dalszym badaniom testami multiplex PCR w kierunku genów *stx*₁, *stx*₂, *rfb*O157, *fliC*_{H7} (mPCR-2), O26wzx, *rfb*O11, *rfb*O113 (mPCR-3) oraz *ehlyA* i *eaeA* (mPCR-4).

Wykazano, że osiem spośród badanych izolatów *stx*-dodatnich posiadało gen *rfb*O157, charakterystyczny dla grupy serologicznej O157. Szczepy te posiadały jednocześnie gen *fliC*_{H7}, warunkujący ekspresję antygeny H7 (tab. 1) i na tej podstawie zakwalifikowano je do serotypu O157:H7. Nie stwierdzono występowania genu *fliC*_{H7} u żadnego z izolatów *E. coli* nie należących do grupy O157. Gen toksyny Stx1 (*stx*₁) zidentyfikowano łącznie u 12 badanych izolatów, w tym wszystkich należących do serotypu O157:H7, jak również czterech innych niż O157:H7. Gen *stx*₂ obecny był wśród 15 STEC, w tym również u wszystkich wyosobnionych *E. coli* O157:H7. Ponadto marker ten stwierdzono u 3 nie-O157:H7, u których jednocześnie wykazano gen *stx*₁, jak również u 4 STEC nie posiadających innych genów patogenności badanych testem mPCR-2 (tab. 1).

Tab. 1. Charakterystyka genotypowa *stx*-dodatnich izolatów STEC uzyskanych z próbek wołowiny pobranych w zakładach mięsnych wykonana testami mPCR-2, mPCR-3 oraz mPCR-4

Nr izolatu	Marker patogenności								
	O157 ¹	fliC _{H7} ¹	stx ₁ ¹	stx ₂ ¹	O26wzx ²	rfbO111 ²	rfbO113 ²	ehlyA ³	eaeA ³
1	+	+	+	+	n.b. ⁴			+	+
2	+	+	+	+	n.b.			+	+
3	-	-	+	+	-	-	-	+	-
4	-	-	-	+	-	-	-	+	-
5	+	+	+	+	n.b.			+	+
6	-	-	+	-	+	-	-	+	+
7	-	-	-	+	-	-	-	+	-
8	+	+	+	+	n.b.			+	+
9	+	+	+	+	n.b.			+	+
10	+	+	+	+	n.b.			+	+
11	+	+	+	+	n.b.			+	+
12	-	-	-	+	+	-	-	+	+
13	-	-	+	+	-	-	-	+	-
14	-	-	+	+	-	-	-	+	-
15	-	-	-	+	+	-	-	+	+
16	+	+	+	+	n.b.			+	+

Objaśnienia: ¹ – mPCR-2, ² – mPCR-3, ³ – mPCR-4, ⁴ – n.b. = nie badane ze względu na obecność genu *rfb*O157 w teście mPCR-2

Tataczak i wsp. (21) wykazali za pomocą PCR, że w obrębie 74 STEC (39 pochodzenia ludzkiego, 11 bydłowego, 18 wyizolowanych od prosiąt i 6 uzyskanych z żywności), 17 posiadało gen stx_1 , 49 stx_2 , a pozostałe 8 izolatów geny obu toksyn. Marker $rfbO157$ występował u 44 STEC, przy czym u 12 izolatów z jednoczesną obecnością genu $fliC_{H7}$. Wszystkie STEC uzyskane z żywności należały do serotypu O157:H7 i posiadały gen toksyny Stx2, a jeden z nich także Stx1. Stosując technikę mPCR, Osek (11) stwierdził, że w grupie 202 izolatów *E. coli* pochodzących od cieląt i ludzi, 25 (12,4%) było stx -dodatnich. Sześć z nich należało do serotypu O157:H7, natomiast cztery do O157:H-. U dwóch *E. coli* O157:H7 obecne były geny kodujące obie odmiany toksyny Stx, a u czterech wyłącznie stx_2 . W grupie piętnastu nie-O157 STEC dwa izolaty posiadały markery stx_1 i stx_2 , osiem gen stx_2 natomiast u pięciu obecny był tylko stx_1 . Wykonane rok później podobne badania wykazały, że w grupie 29 STEC izolowanych od ludzi, świń i cieląt stwierdzono siedemnaście posiadających stx_2 , siedem stx_1 , a u pozostałych geny obu odmian Stx (13). Badania prowadzone za granicą, dotyczące występowania STEC w żywności (głównie mięsie wołowym), koncentrowały się przede wszystkim nad *E. coli* O157:H7, natomiast niewiele prac dotyczyło identyfikacji STEC innych serotypów. Najwięcej przypadków *E. coli* O157:H7 zanotowano w USA (43,6%) (4) oraz w Argentynie (40,9%) (3). Z drugiej strony, Pierard i wsp. (15) oraz Tarr i wsp. (20) nie stwierdzili obecności bakterii tego serotypu w żadnej z badanych próbek wołowiny (15, 20).

Izolaty, które nie należały do grupy O157 ($n = 8$), zbadano następnie przy użyciu mPCR-3, pozwalającego na wykrycie genów O26wzx, $rfbO111$ i $rfbO113$, charakterystycznych odpowiednio dla *E. coli* O26, O111 oraz O113. Stwierdzono, że ampikon o wielkości 153 pz, charakterystyczny dla genu $wzxO26$ kodującego antygen O26, występował u *E. coli* oznaczonych numerami 6, 12, 15. Izolat nr 6 posiadał również gen stx_1 , natomiast pozostałe dwa (nr 12 i 15) zawierały marker stx_2 . Wśród badanych *E. coli* nie wykazano izolatów należących do grup serologicznych O111 lub O113 (tab. 1).

W krajowych badaniach dotyczących występowania STEC w żywności, dotychczas jedynie Sadowska i wsp. (17) wyosobnili jeden izolat stx -dodatni należący do grupy serologicznej O26. Wszystkie STEC izolowane od ludzi z biegunką przez Paciorka (14), należały natomiast do grupy serologicznej O26 (14). Wszyscy wymienieni autorzy dokonali identyfikacji antygeny O *E. coli* wykonano metodą serologiczną. W dostępnym piśmiennictwie niewiele jest danych dotyczących zastosowania biologii molekularnej, np. testów PCR, do oceny przynależności *E. coli* pochodzących z żywności do poszczególnych grup serologicznych O. Do oznaczania STEC O26, O111 oraz O157 w mięsie wołowym opracowano real-time PCR,

przy pomocy którego w 65 zbadanych próbkach pochodzących z Irlandii, *E. coli* grupy O26 obecna była w 3 próbkach mięsa, a *E. coli* grupy O111 w jednej (9). Najwięcej STEC nie należących do serotypu O157:H7 stwierdzono w mięsie wołowym w 62,5%, 49,2% oraz 40,9% próbek (1, 16, 18). Badania wykonane w Hiszpanii (2) w odniesieniu do STEC innych serotypów niż O157:H7 wykazały, że wśród 60 szczepów izolowanych z żywności, 36 posiadało gen stx_2 (60%), 16 stx_1 (27%), a 8 izolatów markery kodujące obie odmiany toksyny Shiga (13%). Szczepy te należały do 29 grup serologicznych, z których najczęściej występującymi i jednocześnie powiązanymi z patogenizacją HUS były O26:H11, O26:H-, O103:H2, O103:H-, O113:H21, O174:H21.

Wyosobnione szczepy STEC zbadano następnie, stosując test mPCR-4, w kierunku obecności genów $ehlyA$ i $eaeA$. W niniejszych badaniach markery $ehlyA$, kodujący wytwarzanie enterohemolizyny oraz $eaeA$, odpowiedzialny za ekspresję intyminy, stwierdzono u wszystkich izolatów należących do serotypu O157:H7. Uzyskane wyniki były zbliżone do rezultatów innych autorów. Toma i wsp. (22) wykazali te geny u szczepów *E. coli* O157:H7 oraz O26:H11 pochodzących z żywności. W badaniach Menga i wsp. (8) oraz Chinena i wsp. (3) 100% wyizolowanych od zwierząt i z żywności STEC serotypu O157:H7 wytwarzało intyminę i enterohemolizynę.

Odmienne obserwacje dotyczyły obecności tych markerów u STEC innych niż O157 grup serologicznych. W badaniach własnych gen enterohemolizyny występował u wszystkich wyizolowanych STEC nie-O157, natomiast marker intyminy wyłącznie u *E. coli* grupy O26. Z dostępnych publikacji wynika, że w Hiszpanii na 60 badanych szczepów STEC pochodzących z żywności i reprezentujących odmienne grupy serologiczne, geny $eaeA$ stwierdzono u 21 (35%), a $ehlyA$ u 8 (13%) izolatów (2). Natomiast Kumar i wsp. (6) wykazali, że wśród 30 STEC, nie należących do O157, 12 szczepów posiadało geny kodujące enterohemolizynę, natomiast tylko 4 intyminę. Pierard i wsp. (15) wykazali również, że u 67 izolatów STEC, nie zaklasyfikowanych jako O157 i pochodzących z wołowiny, marker $eaeA$ obecny był jedynie w dwóch, a gen kodujący enterohemolizynę u 20 szczepów.

Zastosowana w obecnych badaniach metoda diagnostyczna polegająca na użyciu sondy molekularnej znakowanej digoksygeniną oraz testów multiplex PCR, może być wykorzystana w praktyce do identyfikacji oraz charakterystyki STEC w surowej wołowinie, co może mieć istotne znaczenie dla oceny występowania tych drobnoustrojów w żywności, jak również oceny potencjalnego zagrożenia dla ludzi.

Piśmiennictwo

1. Al-Gallas N., Ben Aissa R. R., Attia Annabi T., Bahri O., Boudabous A.: Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and dairy products. Food Microbiol. 2002, 19, 389-398.

2. Blanco J., Blanco M., Blanco J. E., Mora A., Gonzalez E. A., Bernardez M. I.: Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: Prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Exp. Biol. Med.* 2003, 228, 345-351.
3. Chinen I., Miliwebsky E. S., Chillemi G. M., Baschkier A., Rivas M.: Clonal relatedness of Argentinean *Escherichia coli* O157:H7 strains by pulsed-field gel electrophoresis. Ninth International Congress Infectious Diseases. Buenos Aires 2000, s. 97.
4. Elder R. O., Keen J. E., Siragusa G. R., Barkocy-Gallagher G. A., Koohmaraie M., Laegreid W. W.: Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000, 97, 2999-3003.
5. Khan A., Yamasaki S., Sato T., Ramamurthy T., Pal A., Datta S., Chowdhury N. R., Sas S. C., Sikdar A., Tsukamoto T., Bhattacharya S. K., Takeda Y., Nair G. B.: Prevalence and genetic profiling of virulence determinants of non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* isolated from cattle, beef, and humans, Calcutta, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2002, 8, 54-61.
6. Kumar H. S., Otta S. K., Karanasagar I., Karanasagar I.: Detection of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in fresh seafood and meat marketed in Mangalore, India by PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 2001, 33, 334-338.
7. Kwiatek K., Różańska H.: Badania nad występowaniem szczepów enterokrwotocznych *Escherichia coli* O157:H7 w surowcach i produktach zwierzęcego pochodzenia. XII Konf. Nauk. Diagnostyka mikrobiologiczna. Puławy 19-20.06.1996. *Rocz. Wojsk. Inst. Hig. Epidemiol.* 1996, 33, 14.
8. Meng J., Zhao S., Doyle M. P.: Virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from food, animals and humans. *Int. J. Food Microbiol.* 1998, 45, 229-235.
9. O'Hanlon K. A., Catarame T. M. G., Duffy G., Blair I. S., McDowell D. A.: Rapid detection and quantification of *E. coli* O157/O26/O111 in minced beef by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 2004, 96, 1013-1023.
10. Osek J.: Aktualne metody diagnostyki szczepów *Escherichia coli* O157. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 783-787.
11. Osek J.: Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *J. Appl. Microbiol.* 2003, 95, 1217-1225.
12. Osek J., Gallien P.: Zastosowanie specyficznych dla toksyn Shiga sond DNA znakowanych digoksygeniną do oznaczania w kale bydła shigatoksynicznych szczepów *Escherichia coli* (STEC). *Medycyna Wet.* 2002, 58, 863-866.
13. Osek J., Weiner M.: Opracowanie testów multiplex PCR do identyfikacji odmian toksyny Shiga wytwarzanych przez *Escherichia coli*. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 207-210.
14. Paciorek J.: Virulence properties of *Escherichia coli* faecal strains isolated in Poland from healthy children and strains belonging to serogroups O18, O26, O44, O86, O126 and O127 isolated from children with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 2002, 51, 548-556.
15. Pierard D., Van Damme L., Moriau L., Stevens D., Lauwers S.: Virulence factors of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from raw meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63, 4585-4587.
16. Read S. C., Gyles C. L., Clarke R. C., Lior H., McEwen S.: Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork, and chicken in Southwestern Ontario. *Epidemiol. Infect.* 1990, 105, 11-20.
17. Sadowska B., Osek J., Bonar A., Więckowska-Szakiel M., Rudnicka W., Różalska B.: Phenotypic and molecular characteristics of typical and atypical *Escherichia coli* O157, clinical and food isolates. *Acta Microbiol. Pol.* 2003, 52, 149-158.
18. Samadpour M., Kubler M., Buck F. C., Depavia G. A., Mazengia E., Stewart J.: Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef and cattle feces from King Country, Washington. *J. Food Prot.* 2002, 65, 1322-1325.
19. Szych J., Paciorek J., Cieślak A., Kałużewski S.: Charakterystyka szczepów *E. coli* O157 izolowanych w Polsce z próbek materiału klinicznego i z żywności. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1999, 50, 179-196.
20. Tarr P. I., Tran T. N., Wilson R. A.: *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef in Seattle: results of a one-year perspective study. *J. Food Prot.* 1999, 62, 133-139.
21. Tatarczak M., Wieczorek K., Posse B., Osek J.: Identification of putative adhesin genes in shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from different sources. *Vet. Microbiol.* 2005, 110, 77-85.
22. Toma C., Espinosa E. M., Song T., Miliwebsky E., Chinen I., Iyoda S., Iwanaga M., Rivas M.: Distribution of putative adhesions in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 4937-4946.
23. Villari P., Iannuzzo M., Torre I.: An evaluation of the use of 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) in different solid media for the detection and enumeration of *Escherichia coli* in foods. *Lett. Appl. Microbiol.* 1997, 24, 286-290.
24. Weiner M.: Opracowanie testów multiplex PCR do identyfikacji i charakterystyki shigatoksynicznych *Escherichia coli*. *Medycyna Wet.* (w druku).

Adres autora: dr Marcin Weiner, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: mpweiner@piwet.pulawy.pl