

Opracowanie testów multiplex PCR do identyfikacji i charakterystyki shigatoksycznych *Escherichia coli**)

MARCIN WEINER

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

Weiner M.

Development of multiplex PCR assays for identifying and defining the characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

Summary

The aim of the study was to develop multiplex PCR (mPCR) assays which allow identification of shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) strains and a characterization of their virulence properties. As an internal control, a fragment of 16S rRNA gene - two amplicons of 230 bp (stx gene) and 401 bp (16S rRNA) were obtained in the test, designated as mPCR-1 for the amplification of the stx gene, characteristic for all known Shiga toxin variants. The mPCR-2 assay was developed to characterize the stx-positive bacterial colonies, which allowed the detection of Shiga toxin 1 and/or 2, the affiliation of STEC O157:H7 serotype (rfbO157 and fliC_{H7} genes), and internal control, resulting in amplicons of 348 bp (stx1), 584 bp (stx2), 420 bp (rfbO157), 247 bp (fliC_{H7}) and 798 bp (16S rRNA). The detection of markers O26wzx, rfbO111 and rfbO113, typical for *E. coli* O26, O111 and O113, respectively, was performed with mPCR-3. The products of molecular masses 153, 406 and 593 bp were observed. All STEC's were also tested using mPCR-4, for the presence of enterohemolysin (ehlyA) and intimin (eaeA) markers generating specific bands of 837 bp (eaeA gene), 534 bp (ehlyA) and 401 bp (16S rRNA). The mPCR assays developed allow STEC to be identified and characterized and may be used in routine diagnosis of these bacteria.

Keywords: *Escherichia coli*, STEC, multiplex PCR

Shigatoksyczne szczepy *Escherichia coli* (STEC) stanowią groźny czynnik chorobotwórczy. U ludzi odpowiedzialne są one za rozwój krwotocznego zapalenia jelita grubego (HC), hemolitycznego zespołu mocznicowego (HUS) oraz małopłytkowej plamicy zakrzepowej (TTP). Rezerwuarem STEC jest przede wszystkim bydło, które będąc bezobjawowym nosicielem, wydała drobnoustroje z kałem. Dotychczas stwierdzono ponad 400 serotypów *E. coli* zaliczonych do STEC, przy czym około 100 z nich izolowano z przypadków chorobowych u ludzi. Szczepy te różnią się właściwościami biochemicznymi, fenotypowymi oraz genotypowymi. Źródłem zakażenia jest przede wszystkim żywność pochodzenia zwierzęcego (zwłaszcza wołowina), ale notowano również przypadki zachorowania po spożyciu warzyw, owoców, jak też na skutek kontaktów bezpośrednich zwierzę-człowiek i człowiek-człowiek (10, 12, 17).

Najważniejszym czynnikiem patogenności STEC jest kodowana przez gen stx toksyna Shiga (Stx), występująca w dwóch podstawowych odmianach: Stx1 oraz Stx2. Różnią się one między sobą składem aminokwasowym, strukturą antygenową i aktywnością biologiczną. Shigatoksyczne szczepy *E. coli* mogą wytwarzać tylko Stx1 lub tylko Stx2 albo obie toksyny równocześnie (11). Do gru-

py chromosomalnych czynników patogenności zalicza się również intyminę, determinowaną przez gen eaeA. Występuje ona w szeregu wariantach (do chwili obecnej znanych jest 18), określanych literami alfabetu greckiego (α - ξ). Intymina warunkuje przyczepność *E. coli* do nabłonka jelitowego oraz odpowiada za wystąpienie szeregu zmian histopatologicznych określanych jako attaching-effacing (A-E). Zalicza się do nich zanik rąbka szczoteczki enterocytów, zaburzenia w transporcie wapnia oraz nagromadzenie białka aktyny, co w efekcie prowadzi do destrukcji komórek (10, 12, 17). Istotnym markerem patogenności STEC jest również enterohemolizyna (Ehx) kodowana przez gen ehlyA o wielkości 3,4 kb. Marker ten występuje u blisko 100% szczepów *E. coli* O157 oraz u szeregu (22-88%) szczepów STEC innych niż O157 grup serologicznych, izolowanych od ludzi chorujących na HC i HUS (17, 19).

Identyfikacja STEC, opierająca się na izolacji kolonii z użyciem podłoży selektywnych, a następnie na oznaczeniu czynników patogenności, jest przede wszystkim czasochłonna, a uzyskane rezultaty badań nie zawsze są jednoznaczne. W ostatnich kilku latach wprowadzono szereg testów opartych na biologii molekularnej, umożliwiających wykrycie genów kodujących wspomniane markery patogenności STEC (13). Obok klasycznych reakcji PCR, coraz częściej znajdują zastosowanie testy, określone jako multiplex PCR (mPCR), umożliwiające

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

Tab. 1. Referencyjne szczepy *E. coli* użyte do badań

Numer szczepu <i>E. coli</i>	Oznaczenie międzynarodowe	Genotypowy marker patogenności
344	B2	stx1, stx2, eaeA, ehlyA, rfbO157, fliC _{H7}
408	b.d.*	stx1, eaeA, rfbO157, fliC _{H7}
414	BgVV 137/98	stx2, eaeA, rfbO157, fliC _{H7}
427	b.d.	stx1, eaeA, ehlyA, O26wzx
440	214/061	stx1, stx2, eaeA, ehlyA, rfbO157
478	D238/03	stx2, ehlyA, rfbO113
480	EH014	stx1, eaeA, ehlyA, rfbO111
390	C600, K-12	–

Objaśnienie: * – brak danych

równoczesną amplifikację DNA kilku markerów chorobotwórczości (10, 14). Z drugiej strony, brakuje testów pozwalających na szybką i swoistą identyfikację bakterii zarówno O157:H7, jak i STEC należących do grup O:26, O:111 oraz O:113.

Celem badań było opracowanie reakcji mPCR umożliwiających identyfikację STEC na podstawie obecności genu stx (mPCR-1) oraz szczegółową charakterystykę posiadanych przez nie markerów patogenności: stx1, stx2, rfbO157, fliC_{H7} (mPCR-2) oraz ehlyA, eaeA (mPCR-4). Do wykrycia genów O26wzx, rfbO111 i rfbO113, charakterystycznych odpowiednio dla *E. coli* O26, O111 oraz O113, opracowano test mPCR-3. W każdym z zastosowanych odczynów identyfikowano gen 16S rRNA, kodujący wytwarzanie 16S rRNA *E. coli*, świadczący o prawidłowym przeprowadzeniu reakcji amplifikacji.

Material i metody

Szczepy bakteryjne. Do opracowania i oceny testów mPCR użyto referencyjnych szczepów *E. coli*, których charakterystykę przedstawiono w tab. 1 oraz szczepów bakteryjnych zebranych w tab. 2.

Matrycowy DNA. W celu uzyskania DNA użytego do testów mPCR, oczko ezy bakteriologicznej, zawierające kolonie bakteryjne zawieszono w 50 µl jałowej wody redestylowanej. Zawiesinę ogrzewano w temp. 99°C przez 10 min., schładzano w lodzie przez 20 min. i odwirowano (13 000 × g, 1 min.). Otrzymany supernatant stanowił źródło matrycowego DNA.

Testy PCR. Do identyfikacji genu stx, świadczącego o przynależności do shigatoksycznych *E. coli* opracowano test mPCR-1. Kolejnym testem (mPCR-2) wykrywano geny poszczególnych odmian toksyn Stx1 i/lub Stx2 oraz oceniano przynależność do serotypu STEC O157:H7 (markery rfbO157 oraz fliC_{H7}). Przy użyciu odczynu mPCR-3 identyfikowano geny O26wzx, rfbO111 i rfbO113, charakterystyczne dla *E. coli* O26, O111 oraz O113. Opracowano też test mPCR-4, w celu identyfikacji u STEC genów kodujących enterohemolizynę (ehlyA) oraz intyminę (eaeA). Amplifikację badanych markerów wykonywano w mieszaninie PCR składającej się z matrycowego DNA uzyskanego z referencyjnych szczepów bakteryjnych (tab. 1, tab. 2), 5 µl buforu enzymatycznego, 5 mM MgCl₂ (mPCR-1, mPCR-3 i mPCR-4), 4 mM MgCl₂ (mPCR-2), 5 µl nukleotydów dNTP (dATP, dCTP, dGTP i dTTP w koncentracji 200 µM), 1 U (mPCR-1) lub 2 U (mPCR-2, mPCR-3 oraz mPCR-4) termostabilnej polimerazy Taq (Fermentas, Litwa), starterów oligonukleotydowych (IBB PAN, Polska) oraz wody,

do dodanej do końcowej objętości 50 µl. Charakterystykę oraz sekwencje nukleotydowe starterów przedstawiono w tab. 3. Reakcję amplifikacji wykonywano w termocyklerze PTM-100 (MJ Research, USA) używając parametrów przedstawionych w tab. 4.

Analiza elektroforetyczna. Analizę elektroforetyczną produktów amplifikacji genowej wykonywano w 1,5% (testy mPCR-1 i mPCR-4) lub 1,7% żelu agarozowym (testy mPCR-2 i mPCR-3) (Agarose type I: low EEO, Sigma) w buforze TAE (Tris–kwas octowy–EDTA) przy stałym napięciu 100 V (HE33, Hoeffler Scientific Instruments, USA). Żele barwiono bromkiem etydyny (Sigma) (5 µg/ml) przez 2 min., odbarwiano w wodzie redestylowanej (2 min.) i fotografowano w świetle UV przy użyciu zestawu Gel-Doc 2000 (Bio-Rad). Jako standardu masy molekularnej użyto markera GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas).

Określenie czułości testów mPCR. Do określenia czułości testów mPCR-1, mPCR-2, mPCR-3 i mPCR-4 wykorzystano izolowany i częściowo oczyszczony DNA referencyjnych szczepów STEC (tab. 1), uzyskany za pomocą zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology, Polska).

Tab. 2. Szczepy bakteryjne użyte do oceny specyficzności testów mPCR

Szczep bakteryjny	Oznaczenie ATCC*
<i>Campylobacter coli</i>	ATCC 43478
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33291
<i>Campylobacter lari</i>	ACTC 35221
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644
<i>Salmonella bongori</i>	ATCC 43975
<i>Salmonella Enteritidis</i>	ATCC 13076
<i>Salmonella Salamae</i>	ATCC 15786
<i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538

Objaśnienie: * – American Type Culture Collection, USA

Wyniki i omówienie

Do identyfikacji STEC opracowano odczyn mPCR-1, przy pomocy którego amplifikowano fragment genu stx, kodującego wszystkie odmiany toksyny Shiga oraz, jako kontrolę reakcji amplifikacji, fragment genu 16S rRNA *E. coli*. Wyboru starterów dokonano opierając się na danych piśmiennictwa (tab. 3) uwzględniając różnice wielkości poszczególnych produktów amplifikacji. W trakcie opracowywania testu mPCR-1 ustalono, że optymalne stężenia starterów, pozwalające na uzyskanie specyficznych amplikonów, wynosiły, odpowiednio, 0,5 µM dla MK1 i MK2 (stx) oraz 0,05 µM w przypadku e16S-a i e16S-b (16S rRNA). W odczynie tym uzyskano dwa produkty reakcji: amplikon o wielkości 230 pz, charakterystyczny dla genu stx, oraz produkt o wielkości 401 pz (16S rRNA), gdy badaniu poddano STEC 344 (stx₁/stx₂-dodatni), 427 (stx₁-dodatni), 478 (stx₂-dodatni) oraz 480 (stx₁-dodatni), a więc niezależnie od tego, czy badane szczepy posiadały geny kodujące obie odmiany toksyny Stx, czy też jedną z nich. Gdy do badań wykorzystano szczep *E. coli* 390, nie posiadający genu stx, uzyskano jedynie prążek o wielkości 401 pz, typowy dla genu 16S rRNA. Kiedy bakteryjny DNA zastąpiono wodą redestylowaną, nie stwierdzono amplikonów o charakterystycznych wielkościach 230 i 401 pz.

Do szczegółowej charakterystyki kolonii bakteryjnych stx-dodatnich (tab. 1) opracowano kolejny test (mPCR-2), którym wykrywano geny poszczególnych odmian toksyn Stx1 i/lub Stx2, oceniano przynależność do serotypu STEC

Tab. 3. Charakterystyka oraz koncentracje starterów oligonukleotydowych użytych w testach mPCR

Test	Nazwa startera	Sekwencja (5'→3')	Amplifikowany gen	Amplikon PCR (pz)	Koncentracja w teście (mM)	Dostęp do banku genowego	Lokalizacja w genomie	Piśmiennictwo
mPCR-1	MK1 MK2	TTTACGATAGACTTCTCGAC CACATATAAATTATTTTCGCTC	stx	230	0,5	M19473	235-254 442-462	7
	e16S-a e16S-b	CCCCCTGGACGAAGACTGAC ACCGCTGGCAACAAAGGATA	16S rRNA	401	0,05	AB035924	1682-1701 2082-2063	20
mPCR-2	LP30 LP31	CAGTTAATGTCGTGGCGAAGG CACCAGACAATGTAACCGCTG	stx1	348	0,25	JM19473	213-222 559-538	4
	LP43 LP44	ATCCTATTCGCGGGAGTTTACG GCGTCATCGTATACACAGGAGC	stx2	584	0,05	X07865	295-316 881-859	4
	PF8 PR8	CGTGATGATGTTGAGTTG AGATTGGTTGGCATTACTG	rfb O157	420	0,25	AF049343	918-935 1339-1321	9
	FLIC-a FLIC-b	TACCATCGCAAAAGCAACTCC GTGCGCAACGTTAGTGATACC	fliC _{H7}	247	0,05	AF228488	1068-1088 1314-1296	20
	16S-F 16S-R	AGAGTTTGATCATGGCTCAG GGACTACCAGGGTATCTAAT	16S rRNA	798	0,05	J01859	8-27 805-798	6
mPCR-3	O111-F O111-R	TAGAGAAATTATCAAGTTAGTTCC ATAGTTATGAACATCTTGTATTAGC	rfb O111	406	0,1	AF078736	3197-3221 3603-3579	15
	O113F O113R	AGCGTTTCTGACATATGGAGTG GTGTTAGTATCAAAAGAGGCTCC	rfb O113	593	0,1	AF172324	3690-3712 4282-4259	17
	O26wzx-F O26wzx-R	GCGCTGCAATTGCTTATGTA TTTCCCGCAATTTATTTCAG	O26 wzx	153	0,1	AF529080	6076-6095 6198-6208	5
	16S-F 16S-R	AGAGTTTGATCATGGCTCAG GGACTACCAGGGTATCTAAT	16S rRNA	798	0,05	J01859	8-27 805-798	6
mPCR-4	Int-FC Int-RC	GGGATCGATTACCGTCAT TTTATCAGCCTTAATCTC	eaeA	837	0,05	AF022236	26010-26027 26847-26832	1
	Hly-AF Hly-AR	GCATCATCAAGCGTACGTTCC AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	ehlyA	534	0,1	X79839	70-90 602-578	18
	e16S-a e16S-b	CCCCCTGGACGAAGACTGAC ACCGCTGGCAACAAAGGATA	16S rRNA	401	0,05	AB035924	1682-1701 2082-2063	20

O157:H7 na podstawie amplifikacji markerów rfbO157 oraz fliC_{H7}, oraz amplifikowano gen 16S rRNA, stanowiący wewnętrzną kontrolę reakcji. W trakcie opracowywania odczynu ustalono, że optymalne stężenia starterów, pozwalające na uzyskanie specyficznych produktów amplifikacji, wynosiły, odpowiednio, 0,25 µM (startery LP30 i LP31 oraz PF8 i PR8) oraz 0,05 µM (startery LP43 i LP44, FLIC-a i FLIC-b oraz 16S-F i 16S-R) (tab. 3). Stwierdzono też, że najbardziej wyraźne amplikony obserwowano, gdy w mieszaninie PCR użyto 4 mM MgCl₂, a reakcję wykonywano używając parametrów podanych w tab. 4. Wykazano, że test mPCR-2 umożliwił równoczesne powielenie fragmentów genów ko-

dujących toksynę Shiga Stx1 (gen stx₁, 348 pz), Stx2 (gen stx₂, 584 pz), LPS O157 (gen rfbO157, 420 pz), antygeny

Tab. 4. Parametry amplifikacji DNA użyte w testach mPCR

Test	Produkt amplifikacji	Koncentracja MgCl ₂ (mM)	Denaturacja wstępna	Przyłączanie	Temp. (°C)/Czas (min.)			Liczba cykli
					Wydłużanie	Denaturacja	Wydłużanie końcowe	
mPCR-1	stx	5	94/5	52/1	72/1	94/1	72/5	30
	16S rRNA							
mPCR-2	rfb O157	4	94/5	57/1	72/1	94/1	72/5	30
	fliC _{H7}							
	stx1							
	stx2							
mPCR-3	rfb O111	5	94/5	53/1	72/1	94/1	72/5	30
	rfb O113							
	16S rRNA							
mPCR-4	eaeA	5	94/5	53/1	72/1	94/1	72/5	30
	ehlyA							
	16S rRNA							

H7 (gen *fliC*_{H7}, 247 pz), jak również konserwatywnego odcinka genu 16S rRNA (798 pz). Gdy do mieszaniny reakcyjnej dodawano DNA szczepów STEC posiadających różne układy badanych genów, obserwowano od dwóch do pięciu amplikonów o wielkościach odpowiednich dla danych markerów patogenności. W przypadku DNA szczepu 390 (*E. coli* K12) nie stwierdzono innych prążków, poza charakterystycznym dla 16S rRNA.

Przynależność STEC do grup *E. coli* O26, O111 oraz O113 określono w obecnej pracy testem mPCR-3, pozwalającym na wykrycie odpowiednio genów O26wzx, rfbO111 i rfbO113. Drobnoustroje należące do tych grup opisywane były w wielu publikacjach dotyczących przypadków klinicznych HC, HUS i TTP, izolowano je również od zwierząt (zwłaszcza bydła) oraz z żywności (2, 3, 8, 10, 17). W trakcie opracowywania odczynu stwierdzono, że optymalne stężenie starterów oligonukleotydowych wyniosło 0,1 µM dla O111-F i O111-R, O113F i O113R oraz O26wzxF i O26wzxR oraz 0,05 µM dla 16S-F i 16S-R. Wykazano, że test mPCR-3 umożliwił amplifikację fragmentów genów trzech grup serologicznych: O26, O111 oraz O113 (gen O26wzx, 153 pz; gen rfbO111, 406 pz; gen rfbO113, 593 pz) jak również konserwatywnego odcinka genu 16S rRNA (798 pz). W przypadku użycia DNA szczepów 390 oraz 344 (brak genów charakterystycznych dla badanych grup serologicznych) nie stwierdzono, poza amplikonem 16S rRNA, innych prążków odpowiadających identyfikowanemu genom STEC.

W celu identyfikacji u STEC genów kodujących enterohemolizynę (*ehlyA*) oraz intyminę (*eaeA*), opracowano test mPCR-4. Wykazano, że odczyn ten umożliwił równoczesną amplifikację fragmentów genów kodujących intyminę (gen *eaeA*, 837 pz) i enterohemolizynę (gen *ehlyA*, 534 pz), jak również konserwatywnego odcinka genu 16S rRNA (401 pz). W trakcie jego opracowywania ustalono, że optymalne stężenia starterów wynosiły 0,05 µM dla starterów Int-FC i Int-RC oraz e16S-a i e16S-b, natomiast 0,1 µM dla Hly-AF i Hly-AR (tab. 3). Do oceny mPCR-4 wykorzystano referencyjne szczepy STEC, posiadające różne genotypowe markery wirulencji (tab. 1). W przypadku, gdy do mieszaniny reakcyjnej PCR dodawano DNA szczepów STEC posiadających różne układy badanych markerów patogenności, obserwowano dwa lub trzy amplikony o przewidywanych dla danych genów wielkościach. W przypadku użycia DNA szczepu 390 (brak genów chorobotwórczości STEC), nie stwierdzono, poza amplikonem 16S rRNA o wielkości 401 pz, innych prążków.

Ocenę specyficzności opracowanych testów mPCR (mPCR-1, mPCR-2, mPCR-3 oraz mPCR-4) wykonano również używając do badań, poza materiałem genetycznym STEC, DNA pochodzące z bakterii innych gatunków niż *E. coli* (tab. 2) i we wszystkich przypadkach stwierdzono brak produktów amplifikacji.

W trakcie prowadzonych badań określono czułość testów mPCR, używając izolowanego i oczyszczonego DNA referencyjnego szczepu *E. coli* 344 (mPCR-1, mPCR-3 oraz mPCR-4), jak również DNA szczepów *E. coli* 427, 478 oraz 480 (tab. 1). W przypadku testu mPCR-1 stwierdzono, że wyraźne prążki o wielkościach 230 pz oraz 401 pz, odpowiadające amplikonom *stx* oraz 16S rRNA uzyskano, gdy DNA był obecny w mieszaninie PCR w ilości co najmniej 200 pg/µl. Gdy ocenie poddano test mPCR-2,

wyraźne prążki odpowiadające markerom *fliC*_{H7}, *stx*₁, *stx*₂, rfbO157 oraz 16S rRNA były obecne, gdy do mieszaniny reakcyjnej PCR dodawano DNA w ilości co najmniej 1 ng/µl. Poddając analizie test mPCR-3, wyraźne prążki w żelu agarozowym, odpowiadające produktom amplifikacji genowej markerów O26wzx, rfbO113, rfbO111 oraz 16S rRNA *E. coli*, zaobserwowano w obecności bakteriynego DNA w ilości co najmniej 1 ng/µl (szczep STEC 427) oraz 5 ng/µl (szczep STEC 478 oraz szczep STEC 480). Z kolei, czułość testu mPCR-4 określono na 20 ng bakteriynego DNA/µl.

Opracowane testy mPCR pozwalają na identyfikację oraz szczegółową charakterystykę STEC, a zastosowana w nich wewnętrzna kontrola amplifikacji w postaci genu 16S rRNA *E. coli* eliminuje ryzyko uzyskania wyników fałszywie ujemnych. Odczyny te mogą znaleźć zastosowanie w rutynowej diagnostyce tych drobnoustrojów.

Piśmiennictwo

1. 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.
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. Caprioli A., Morabito S., Brugere H., Oswald E.: Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 2005, 36, 289-311.
4. 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.
5. DebRoy C., Roberts E., Kundrat J., Davis M. A., Briggs C. E., Fratamico P. M.: Detection of *Escherichia coli* serogroups O26 and O113 by PCR amplification of *wzx* and *wzy* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 3379-3383.
6. 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.
7. 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.
8. Karch H., Tarr P. I., Bielaszewska M.: Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 2005, 295, 405-418.
9. 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.
10. Nataro J. P., Kaper J. B.: Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11, 142-201.
11. O'Brien A. D., Tesh V. L., Donohue-Rolfe A., Jackson M. P., Olsnes S., Sandvig K., Lindberg A. A., Keusch G. T.: Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1992, 180, 65-94.
12. Osek J.: Molekularne podstawy chorobotwórczości *Escherichia coli* O157. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 750-755.
13. Osek J., Weiner M.: Metoda real-time PCR (r-PCR) w diagnostyce molekularnej shigatoksycznych *Escherichia coli*. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 687-691.
14. Osek J., Weiner M.: Opracowanie testów multiplex PCR do identyfikacji odmian toksyn Shiga wytwarzanych przez *Escherichia coli*. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 207-210.
15. Paton A. W., Paton J. C.: Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohaemorrhagic *E. coli* *hlyA*, rfb_{O111} and rfb_{O157}. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 598-602.
16. Paton A. W., Paton J. C.: Molecular characterization of the locus encoding biosynthesis of the lipopolysaccharide O antigen of *Escherichia coli* serotype O113. *Infect Immun.* 1999, 67, 5930-5937.
17. Paton J. C., Paton A. W.: Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11, 450-479.
18. 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.
19. Schmidt H., Karch H.: Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 2364-2367.
20. Wang G., Clark C., Rodgers 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.

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