

Risultati del 6° test inter-laboratorio per l'identificazione e la tipizzazione di ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC) e la tipizzazione delle varianti dei geni *vtx* - 2011

Negli anni 2007, 2008 e 2009, il Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità ha organizzato test inter-laboratorio per l'identificazione e la caratterizzazione di ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC). Poiché l'LNR per *E. coli* è anche Laboratorio Comunitario di Riferimento (EU-RL) per questo patogeno, questi test sono stati condotti contestualmente ai ring test organizzati per i Laboratori Nazionali di Riferimento degli Stati Membri UE. I test finora effettuati prevedevano la ricerca dei principali geni di virulenza dei VTEC: *vtx1* (gruppo), *vtx2* (gruppo) e il gene *eae* codificante l'intimina, fattore dell'adesione *attaching/effacing*. I geni *vtx1* e *vtx2* possono presentare numerose varianti, alcune particolarmente associate ai ceppi VTEC isolati da casi di sindrome emolitico uremica (SEU). La loro identificazione potrebbe quindi costituire un'indicazione supplementare della virulenza del ceppo in esame. Per questo motivo, l'EU-RL ha organizzato uno studio che prevedeva anche la determinazione delle principali varianti dei geni *vtx* finora classificate.

Lo studio è stato organizzato insieme al *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Escherichia and Klebsiella*, operante presso lo *Statens Serum Institute*, a Copenhagen (SSI), che coordina la rete dei Laboratori Nazionali di Riferimento degli Stati Membri UE per le infezioni umane, che afferisce al *Food- and Waterborne Diseases and Zoonoses Surveillance Programme* dello *European Center for Disease Prevention and Control* (ECDC).

Il 6° test inter-laboratorio nazionale per l'identificazione e la caratterizzazione di ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC), organizzato tra il 2010 e il 2011, prevedeva quindi l'identificazione di un set di ceppi di *E.coli* come VTEC e, successivamente, la tipizzazione delle varianti dei loro geni *vtx* utilizzando un protocollo sperimentale di PCR sviluppato in una collaborazione tra EU-RL e SSI.

Lo studio aveva quindi due obiettivi:

1. Valutare la capacità dei laboratori partecipanti di identificare e tipizzare i ceppi VTEC utilizzando i metodi standard.
2. Valutare il metodo sperimentale per la tipizzazione delle varianti dei geni *vtx*.

Visto l'obiettivo di valutare un metodo ancora in fase sperimentale, la partecipazione al test è stata lasciata **facoltativa** per i laboratori.

1. PARTECIPANTI

Al ring test nazionale hanno partecipato 4 laboratori di 4 Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), di seguito elencati:

- IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, sede di Torino
- IZS dell'Umbria e delle Marche, sede di Perugia
- IZS delle Regioni Lazio e Toscana, Dir. Op. Controllo degli Alimenti, Centro di Rif. Reg. Enterobatteri Patogeni, Roma
- IZS dell'Abruzzo e del Molise, Teramo

2. OBIETTIVI E STRUTTURA DEL TEST INTERLABORATORIO

Al momento, sono state descritte 10 varianti dei geni *vtx*. Tuttavia, lo studio è stato ristretto all'identificazione delle 6 varianti considerate più rilevanti per i laboratori operanti nel settore veterinario-alimentare: le tre varianti del gene *vtx1* (*vtx1a*, *vtx1c* and *vtx1d*) e le tre varianti del gene *vtx2* maggiormente associate alla SEU (*vtx2a*, *vtx2c*, *vtx2d*). L'identificazione delle varianti era basata su un protocollo di PCR convenzionale sviluppato nell'ambito di una collaborazione tra EU-RL e SSI.

Lo studio era quindi strutturato in 3 fasi:

1. Identificazione e caratterizzazione dei ceppi VTEC mediante amplificazione PCR dei loro principali geni di virulenza (*vtx1* group, *vtx2* group, *eae*).
2. Determinazione del sierogruppo (antigene O), limitatamente agli 11 sierogruppi più frequentemente coinvolti nelle infezioni umane.
3. Identificazione delle 3 varianti di *vtx1* (*vtx1a*, *vtx1c* and *vtx1d*) e di *vtx2* (*vtx2a*, *vtx2c*, *vtx2d*).

Insieme ai ceppi da saggiare, i partecipanti hanno ricevuto un set di ceppi di riferimento contenenti tutte le 10 varianti dei geni *vtx1* e *vtx2*.

3. MATERIALI E METODI

Il metodo di PCR per la tipizzazione delle varianti dei geni *vtx*, sviluppato dall' EU-RL in collaborazione con l'SSI, è descritto nell'**Allegato 1**.

Il campione oggetto di analisi era costituito da 5 ceppi di *E.coli*, le cui caratteristiche sono riportate nella Tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche dei ceppi di *E. coli* utilizzati nello studio

Ceppo	Sierogruppo	Gene <i>vtx1</i> group (variante)	Gene <i>vtx2</i> group (variante)	Gene <i>eae</i> (intimina)
1	O103	+ (<i>vtx1a</i>)	-	+
2	O146	+ (<i>vtx1c</i>)	+ (<i>vtx2a</i>)	-
3	O154	+ (<i>vtx1d</i>)	-	-
4	O157	-	+ (<i>vtx2a</i> + <i>vtx2c</i>)	+
5	O91	-	+ (<i>vtx2d</i>)-	-

I campioni (colture batteriche seminate per infissione in agar molle) sono stati preparati all'SSI nel periodo 22 - 26 Novembre, con la collaborazione di un ricercatore dell'EU-RL VTEC. I campioni, identificati con codici numerici a tre cifre assegnati casualmente e diversi per ogni laboratorio, sono stati inviati tra il 26 Novembre e il 3 Dicembre. La stabilità e l'omogeneità dei campioni sono state verificate secondo quanto prescritto dalla ISO 17043:2010.

I laboratori hanno inviato i loro risultati direttamente via WEB, usando pagine dedicate accessibili attraverso la *restricted area* del sito web dell'EU-RL VTEC (www.iss.it/vtec), previa presentazione di *user ID* e *password*, inviate ad ogni laboratorio insieme al codice identificativo e alle istruzioni necessarie per il *log in*.

Prima di inserire i risultati della sierotipizzazione, ai laboratori è stato richiesto di indicare i sierogruppi che erano in grado di identificare.

Al termine del test, i partecipanti hanno avuto la possibilità di stampare direttamente il proprio *test-report* con i risultati inviati e quelli attesi.

4. RISULTATI

Tre dei 4 Laboratori partecipanti hanno inviato i propri risultati. Un Laboratorio (L13) ha comunicato di non essere in grado di effettuare le analisi dopo aver ricevuto i campioni.

4.1. Identificazione e tipizzazione dei ceppi VTEC

Tutti i laboratori hanno identificato correttamente la presenza/assenza dei geni di virulenza (*vtx1* group, *vtx2* group, *eae*). La Tabella 2 riporta i risultati dei saggi PCR effettuati.

Tabella 2. Identificazione dei geni di virulenza (*vtx1* group, *vtx2* group, *eae*) mediante PCR. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti, le caselle rosse i risultati sbagliati.

NRL	Identificazione dei geni in:														
	Campione 1			Campione 2			Campione 3			Campione 4			Campione 5		
	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>	<i>vtx1</i>	<i>vtx2</i>	<i>eae</i>
Valore atteso	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-
L07	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-
L11	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-
L52	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-

La Tabella 3 riporta i risultati relativi all'Identificazione del sierogruppo. I laboratori hanno identificato correttamente i sierogruppi per cui avevano dichiarato la disponibilità di reagenti e hanno riportato un risultato di "non tipizzabile" per gli altri.

Tabella 3. Identificazione del sierogruppo. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti; le caselle rosse i risultati sbagliati.

Lab	Identificazione del sierogruppo:				
	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5
Valore Atteso	O103	O146	O154	O157	O91
L07	O103	ONT	ONT	O157	ONT
L11	O103	ONT	ONT	O157	ONT
L52	ONT	ONT	ONT	ONT	ONT

4.2. Identificazione delle varianti dei geni *vtx*

I risultati dei test PCR per l'identificazione delle varianti dei geni *vtx1* e *vtx2* sono riportati nella Tabella 4 e nella Tabella 5, rispettivamente.

Tabella 4. Identificazione delle varianti del gene *vtx1* mediante PCR. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti; le caselle rosse i risultati sbagliati.

Lab	Identificazione della variante genica nel:								
	Campione 1			Campione 2			Campione 3		
	<i>vtx1a</i>	<i>vtx1c</i>	<i>vtx1d</i>	<i>vtx1a</i>	<i>vtx1c</i>	<i>vtx1d</i>	<i>vtx1a</i>	<i>vtx1c</i>	<i>vtx1d</i>
Valore atteso	+	-	-	-	+	-	-	-	+
L07	+	-	-	-	+	-	-	-	+
L11	+	-	-	-	+	-	-	-	+
L52	+	-	-	-	+	-	+	-	+

Tabella 5. Identificazione delle varianti del gene *vtx2* mediante PCR. Le caselle verdi evidenziano i risultati corretti; le caselle rosse i risultati sbagliati.

Lab	Identificazione della variante genica nel:								
	Campione 1			Campione 1			Campione 1		
	<i>vtx2a</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2d</i>	<i>vtx2a</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2d</i>	<i>vtx2a</i>	<i>vtx2c</i>	<i>vtx2d</i>
Valore atteso	+	-	-	+	+	-	-	-	+
L07	+	-	-	+	+	-	-	-	+
L11	+	-	-	-	+	-	-	-	+
L52	+	-	-	+	+	-	-	+	+

5. CONSIDERAZIONI

Lo studio sull'identificazione delle varianti dei geni *vtx* è stato organizzato congiuntamente dalle reti mediche e veterinarie degli NRL per *E.coli* degli Stati Membri UE, allo scopo di

favorire l'armonizzazione dei metodi di tipizzazione usati per i ceppi VTEC di origine umana e animale.

Poiché il test prevedeva l'uso di un metodo di tipizzazione molecolare ancora in fase di sperimentazione, la partecipazione al test è stata proposta ai laboratori italiani come facoltativa, e questo spiega il numero ridotto di laboratori che hanno partecipato.

I tre laboratori che hanno inviato i risultati hanno effettuato correttamente l'identificazione dei geni di virulenza dei ceppi ricevuti, confermando come i laboratori italiani coinvolti nel controllo ufficiale degli alimenti siano ormai in grado di identificare i VTEC.

Per quanto riguarda l'identificazione delle varianti dei geni *vtx*, i risultati prodotti dai tre laboratori italiani sono in linea con quelli prodotti dagli NRL europei (report a http://www.iss.it/binary/vtec/cont/PT6_Report.pdf). Nell'insieme, questi risultati hanno indicato che il metodo PCR proposto ha ancora problemi di specificità, soprattutto per le varianti del gene *vtx2*, e necessita ulteriori aggiustamenti.



**Identification of the subtypes of
Verocytotoxin encoding genes of *Escherichia coli*:
conventional PCR amplification of the three *vtx1* subtypes and
the three *vtx2* subtypes mainly involved in severe human
disease**

INDEX

- 1. Aim and field of application**
- 2. Procedure**
 - 2.1 Principle of the method***
 - 2.2 Template preparation***
 - 2.3 Setting up the PCR reaction***
 - 2.4 Agarose gel electrophoresis***
 - 2.5 Safety and protection devices***
 - 2.6 Reference Strains***
 - 2.7 References***

Annex 1

- Primers**

Annex 2

- Reference strains**

1. Aim and field of application

Verocytotoxins (VT), synonymous Shiga toxins, are a toxin family characterized by an elevated degree of diversity. The VT family is divided into two branches, VT1 and VT2, based on their antigenic differences. The terms “VT1” and “VT2” were also used to describe the prototypic toxins first described in each branch. Many toxin variants have been described in either branch and it has been recommended that VT family members be classified based on phenotypic differences, biologic activity and hybridization properties (O'Brien et al. 1994).

Classification of VT variants does not represent only a taxonomic exercise: some of the variants are clinically relevant in that they are produced by strains isolated from cases of hemolytic uremic syndrome (HUS), while some others are primarily associated with milder course of disease or are probably not produced by *E.coli* strains causing human disease (Friedrich et al. 2002; Bielaszewska et al. 2006; Persson et al. 2005).

Different systems of nomenclature have been proposed and used for VT variants and their coding genes (*vtx*) (O'Brien et al. 1994). A consensus on a comprehensive proposal of nomenclature has been reached during the 7th International Symposium on VTEC held in 2009. This proposal is going to be published and introduces three levels of designations:

1. Types

The two major branches VT1 and VT2 that share structure and function but that are not cross neutralized with heterologous antibodies. The terms VT1 and VT2 should only be used when the subtype is unknown.

2. Subtypes

The antigenically related members of the two main types, which are suffixed with small Arabic letters (e.g. VT1a).

3. Variants

Variants include the subtype specific prototypic toxins or related toxins within a subtype (that differ by one or more AAs from the prototype). The variants are designated by toxin subtype, O group of the host *E. coli* strain, followed by the strain name or number from which that toxin was described. (e.g. VT1a-O157-EDL933 or VT2c-O157-E32511).

Nucleotide variants within a given VT subtype are italicised e.g. *vtx2c*-O157-E32511 is a nucleotide variant that encodes VT2c-O157-E32511.

The present method concerns the identification of the three *vtx1* subtypes of VT-coding (*vtx*) genes of *E. coli* and the three *vtx2* subtypes mainly involved in severe human disease by conventional PCR amplification. It is intended for application on isolated VTEC strains.

The *vtx* gene subtypes that represents the target of this method are:

For *vtx1*:

vtx1a, vtx1c, vtx1d

For *vtx2*:

vtx2a, vtx2c, vtx2d

2. Procedure

2.1 Principle of the method

The method is based on PCR amplification of specific DNA regions from a template DNA, with oligonucleotides triggering the start of the PCR reaction.

The procedure includes a first phase of identification of the *vtx* gene types (*vtx1* and/or *vtx2*) possessed by the strain under examination. The primers for this preliminary typing step are included in the table in **Annex 1**. The second phase concerns the detection of the *vtx* gene subtypes and is performed by specific PCR reactions, using primers designed on the basis of analyses of existing *vtx* sequences (reported in the table in **Annex 1**).

The method is composed of the following steps:

- Template preparation
- Setting up the PCR reaction
- Determination of the PCR results by agarose gel electrophoresis.

2.2 Template preparation

Isolated strains are streaked onto solid media (e.g. TSA) and incubated over night.

A single bacterial colony is inoculated in TSB and incubated over night.

25 µl of the overnight culture are added to 975 µl Milli Q water in Eppendorf tube and boiled for 15 minutes. Centrifuge at 18.000 g 5 minutes. Upon transfer to a clean tube, the supernatant is used directly for PCR and stored at -18°C for further analyses.

2.3 Setting up the PCR reaction

PCR assays are set up in a total volume of 20 µl for standard PCR and 25 µl for triplex PCR as described in **Annex 1** (stock solution of primers is 5 µM) and 5 µl supernatant of boiled lysate (stock template prepared as described above) and Milli Q water up to 20 or 25 µl.

Standard PCR in total volume of 20 µl:

2.5 µl H₂O §

10 µl Mastermix (HotStart Qiagen); similar high-performance Taqs reducing non specific amplifications can be used according to the manufacturer's instructions

1.25 µl of each of two primers (STOCK solution of primers is 5 µM) §

5 µl supernatant of boiled lysate (STOCK)

§ If three primers are used (*vtx2a*), H₂O volume is reduced to 1.25 µl; If four primers are used (all *vtx2d* or detection of all *vtx2* variants), H₂O is NOT added!

Triplex-PCR for subtyping of *vtx1*

PCR in total volume of 25 µl:

12 µl Mastermix (HotStart, Qiagen),

1 µl of each of the four primers for *vtx1c* and *vtx1d* (STOCK solution of primers is 5 µM)

2 µl of each of two primers for *vtx1a* (STOCK solution of primers is 5 µM)

5 µl supernatant of boiled lysate (STOCK)

The thermocycler conditions are:

vtx1 and *vtx2* detection with primers *vtx1-det-F1/ vtx1-det-R1*; *F4/R1/F4-f/R1-e/f*:

95°C for 15 min (HotStart Taq activation)

35 cycles of 94°C for 50 sec, 56° for 40 sec and 72°C for 60 sec, ending with 72°C for 3 min

vtx1 and *vtx2* subtyping:

95°C for 15 min (HotStart Taq activation)

35 cycles of 94°C for 50 sec, 62°C for 40 sec and 72°C for 60 sec, ending with 72°C for 3 min. PCR amplicons can be stored at 4°C until loading on agarose gel.

In each PCR assay, a positive and a negative control must be included. The positive controls are DNA templates obtained from *E. coli* strains harboring the different *vtx*

subtypes that are the object of the present method (*vtx1a*, *vtx1c*, *vtx1d*, *vtx2a*, *vtx2c* and *vtx2d*), and the negative control is constituted by a sample without template added.

2.4 Agarose gel electrophoresis

Prepare agarose gel in 1X Tris/Borate/EDTA (TBE) or Tris/Acetate/EDTA (TAE). Each well of the gel is loaded with 10 µl of each reaction added with loading dye at 1X final concentration. Run the samples in 1X running buffer (TBE or TAE) in constant voltage (100 V). Use a molecular weight marker suitable for assignment of the correct molecular weights to the amplicons produced (refer to the table in **Annex 1**). Consider that a correct band assignment is a crucial point in the assessment of the presence of the target genes. Make sure that the bands produced by the reference strains match exactly the expected molecular weight.

Agarose gels should be added of ethidium bromide to allow the visualisation of DNA. This reagent is a DNA intercalating agent commonly used as a nucleic acid stain in molecular biology laboratories. When exposed to ultraviolet light, it will fluoresce with a red-orange color. Ethidium bromide should be added to a final concentration of 0.5 µg/ml before pouring the agarose gel in the electrophoresis gel cast. Alternatively the agarose gel can be stained after electrophoresis in a 0.5 µg/ml ethidium bromide aqueous solution.

2.5 Safety and protection devices

Some VTEC strains can infect human beings at a very low infectious dose and can cause severe disease. Laboratory acquired infections have been reported. Therefore, working with VTEC requires good laboratory practices and the use of protection devices. Ethidium bromide is a mutagen and toxic agent; therefore it should be used in compliance with the safety sheet provided and with protection devices (lab-coats and latex gloves). The U.V. light may cause damage to eyes so it is mandatory the use of plexiglass shields and protective glasses.

2.6 Reference strains

VTEC strains harboring the different *vtx* subtypes object of the present method are listed in **Annex 2** and should be used as positive control. A complete set of strains harboring the genes encoding all *vtx* subtypes (for a total of ten isolates) are provided in the framework of the collaborative inter-laboratory study. Nonetheless, for the application of the present method, only the strains harboring the *vtx* subtypes object of the method shall be used as positive controls.

The control templates can be prepared in advance as described for the test strains and stored at -20°C for eight months.

2.7 References

- Bielaszewska, M., A. W. Friedrich, T. Aldick, R. Schurk-Bulgrin, and H. Karch. 2006. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: Predictor for a severe clinical outcome. *Clin.Infect.Dis.* 43:1160-1167
- Friedrich, A. W., M. Bielaszewska, W. L. Zhang, M. Pulz, T. Kuczius, A. Ammon, and H. Karch. 2002. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J.Infect.Dis.* 185:74-84
- O'Brien, A. D., M. A. Karmali, and S. M. Scotland. 1994. A proposal for rationalization of the *Escherichia coli* cytotoxins, p. 147-149. *In* M. A. Karmali and A. G. Goglio (eds.), *Recent Advances in Verocytotoxin-producing Escherichia coli Infections*. Elsevier Science, B.V., Amsterdam.
- Persson, S., K. E. P. Olsen, S. Ethelberg, and F. Scheutz. 2007. Subtyping typing method for *Escherichia coli* Shiga toxin (Verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *J Clin Microbiol* 45:2020-2024.

Annex 1.

List of primers to be used for *vtx* genes detection and subtyping

Primer	Sequence (5' – 3')	Position	Amplicon size (bp)	
<i>vtx/vtx1</i>				
Detection				
vtx1-det-F1 vtx1-det-R1	GTACGGGGATGCAGATAAATCGC AGCAGTCATTACATAAGAACGYCCACT	440-462 622-648	209	
Subtyping				
vtx1a-F1 vtx1a-R2	CCTTTCCAGGTACAACAGCGGTT GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG	362-384 815-839	478	All 6 primers can be used in a triplex PCR for subtyping of <i>vtx1</i> *.
vtx1c-F1 vtx1c-R1	CCTTTCCTGGTACAACACTGCGGTT CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA	362-384 588-613	252	
vtx1d-F1 vtx1d-R2	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC CTCTTCCTCTGGTTCTAACCCCATGATA	50-78 225-252	203	
<i>vtx2</i>				
Detection				
F4 R1 F4-f R1-e/f	GGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGT ATTAAACTGCACTTCAGCAAATCC CGCTGTCTGAGGCATCTCCGCT TAAACTTCACCTGGGCAAAGCC	606-629 1209-1232 606-629 1209-1230	627 625	For detection all 4 primers can be used in one reaction.
Subtyping				
vtx2a-F2 vtx2a-R3 vtx2a-R2	GCGATACTG RGB ACTGTGGCC CCG K CAACCTTCACTGTAAATGTG GGCCACCTTCACTGTGAATGTG	754-774 1079-1102 1079-1100	349 347	
vtx2c-F1 vtx2c-R2	GAAAGTCACAGTTTTTATATACAACGGGTA CCGGCCAC Y TTTACTGTGAATGTA	926-955 1079-1102	177	
vtx2d-F1 vtx2d-R1 vtx2d-R2	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG TTYCCGGCCACTTTTACTGTG GCCTGATGCACAGGTA CTGGAC	927-955 1085-1105 1184-1206	179 280	Some <i>vtx2d</i> strains are positive for the small fragment and and some for the larger fragment. The control strain C165-02 should be positive for both bands

* Triplex PCR for *vtx1* subtyping: 1 µl of each of the four primers for *vtx1c* and *vtx1d* (stock solution of primers is 5 µM) 2 µl of each of two primers for *stx1a* (stock solution of primers is 5 µM).

Annex . 2

List of reference strains harboring the *vtx* gene subtypes

<i>SSI collection D number</i>	<i>Strain</i>	<i>Toxin subtype</i>	<i>Toxin variant designation</i>	<i>GenBank accession No.</i>	<i>Results obtained using the present method</i>
D2653	EDL933	VT1a	VT1a-O157-EDL933	M19473	VT1a + VT2a
D3602	DG131/3	VT1c	VT1c-O174-DG131-3	Z36901	VT1c *
D3522	MHI813	VT1d	Stx1d-O8-MHI813	AY170851	VT1d
D2435	94C	VT2a	VT2a-O48-94C	Z37725	VT1a + VT2a
D3428	EH250	VT2b	VT2b-O118-EH250	AF043627	VT2b
D2587	031	VT2c	VT2c-O174-031	L11079	VT2c *
D3435	C165-02	VT2d	VT2d-O73-C165-02	DQ059012	VT2d **
D3648	S1191	VT2e	VT2e-O139-S1191	M21534	VT2e
D3546	T4/97	VT2f	VT2f-O128-T4-97	AJ010730	VT2f
D3509	7v	VT2g	2g-O2-7v	AY286000	VT2g

* These two strains also encode VT2b

** May result in both fragments at 179 bp and 280 bp