

Epidemiological Analysis of Shiga Toxin-producing *E. coli* Isolated in Gwangju, Korea, by Pulse-field Gel Electrophoresis

Jeong-Chi Lee¹ and Min Ji Kim^{2*}

¹Department of Clinical Pathology, Gwangju Health College University, Gwangju, Korea

²Health & Environment Institute of Gwangju, Gwangju, Korea

In Gwangju, Korea, over the last 4 years, human gastrointestinal infection caused by shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) increased. The aim of this study was to ascertain the genetic relatedness of STEC strains by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), as no data on the molecular epidemiology of STEC in Gwangju has yet been published. The PFGE banding patterns were defined for 62 of the 67 STEC strains isolated from cattle and human. There were 11 clonal types in the 11 STEC strains of cattle origin. Among the 11 STEC strains from asymptomatic person, four O91 strains were 100% similarity in band profiles. In the STEC strains isolated from diarrhea patients, same serogroups were grouped to the same cluster; O111 stains were 89.5% similarity, O157 strains 80%, O26 strains 81.5%, and O103 strains 91% similarity, respectively. In conclusion, this is the first report that a large collection of STEC strains from Korea has been analyzed, and a high degree of diversity was observed among the strains analyzed by this technique. PFGE analysis revealed that the strains isolated from human and cattle were closely related within serotypes, and it was useful for epidemiological analysis of STEC. The importance and usefulness of active laboratory surveillance of STEC such as PFGE should be recommended.

Key Words: Shiga toxin-producing *E. coli*, Pulsed-field gel electrophoresis, Cattle, Human

서 론

시가 독소생성 대장균 (shiga toxin-producing *E. coli*, STEC)의 주요 병원소는 반추류이며, 소에서 분리된 STEC에 435종 이상의 혈청형이 존재하고, 사람에서 분리된 STEC에는 470여종 이상의 혈청형이 확인되었으며, 이들은 소 또는 쇠고기로부터 동정된 것이다 (1). 또한 이 병원체는 숙주의 위장관에서 정상적으로 배출되어 분변에 오염된 식품을 섭취하거나 동물 및 그들이 생활

하는 환경의 접촉에 의해 사람에게 전파된다. 소의 연령에 따라 STEC O157의 배출 정도에 차이가 있으며 미국에서 연구한 결과에 따르면 두 달 이하의 송아지에서는 1.5% 미만, 2~4달 송아지에서는 1.5~5% 정도로 이유기 이후에 증가한다고 하였다 (2~5).

소로부터 분리된 STEC의 유병율에 대한 수많은 연구가 있었지만 분변 채취방법, 채취시기 및 분리방법 등에 따라 상당한 차이가 있다. 실제로 STEC의 많은 혈청형 중 O157의 검출률이 높은 이유는 이들 혈청형에 대한 검사법들의 민감도나 정확도가 다른 혈청형 동정방법에 비해 매우 발달해 있기 때문이기도 하다. 따라서 이러한 결과들을 서로 비교하기는 매우 어렵다 (6). 소 이외의 감염원으로는 양, 물소 및 사슴 등과 같은 반추류와 (7~9) 말이나 개와 같이 농장에 사는 반려동물, 야생이나 집토끼 및 조류 등이 있으며, 돼지는 상대적으로 병원소로서의 중요도는 매우 낮은 편이다 (10~14).

STEC의 전파경로는 크게 음식과 물, 그리고 사람으

Received: May 14, 2009/ Revised: June 8, 2009

Accepted: June 11, 2009

*Corresponding author: Min Ji Kim. Health & Environment Institute of Gwangju, 898 Hwajung-dong, Seo-gu, Gwangju 502-837, Korea.

Phone: +82-62-380-1837, Fax: +82-62-380-1836

e-mail: vetmj@korea.kr

**This research was performed as a part of the laboratory surveillance of acute diarrhea, managed by the National Institute of Health, Republic of Korea.

로 나뉜다. 대부분의 경우가 오염된 소의 부산물 섭취에 의한 경우였으며, 1980년대 enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157 집단발생의 대부분이 잘 익히지 않은 햄버거나 살균되지 않은 우유 등을 섭취함에 의한 것이었다 (15). 그러나 최근 10년 동안의 사례들을 살펴보면, 소 부산물 뿐 아니라 훈제연어, 마요네즈, 요거트 및 사과주스 같은 산성식품 섭취로 인한 집단발병이 증가되고 있으며 (16), 소 분변에 오염된 물이나 비료를 사용하여 재배된 과일, 채소에 의한 간접전파의 사례들도 보고되었다 (17). 또 하나의 감염경로가 보균자나 환자에 의한 전파인데, 미국에서 조사한 결과 1982년부터 2002년 동안 집단발병의 80% 정도가 탁아소에서 발생하였으며 주로 6~8월 사이에 많이 발생한 것으로 나타났다 (18). 이렇듯 집단발생인 경우 발생인자가 매우 빠르며 오염원을 찾기가 비교적 쉽지만, 지역 내 산발적인 발생이나 불현성 감염의 경우 감염경로를 파악하기가 매우 어렵다. 또한 이러한 산발적인 발생은 non O157 STEC에 의한 감염이 주를 이룬다.

대부분 개발도상국에서는 장관 독소형 대장균이나 장관 병원성대장균에 의한 인체감염이 많지만, 선진국에서는 상대적으로 STEC에 의한 감염이 많다. 또한 미국산 쇠고기 수입 전면개방과 더불어 쇠고기 섭취가 늘어나고 식습관의 선진화에 따라 STEC 감염증이 늘어날 것으로 생각된다. 우리나라도 최근 10년간 STEC에 의한 감염이 꾸준히 증가하고 있으며, 특히 광주지역에서의 STEC 감염이 전국에서 가장 높은 실정이다. 따라서 이 조사에서는 소 분변 분리주와 광주지역에서 분리된 설사환자, 환자 접촉자 및 불현성 감염주를 대상으로 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)를 시행하여 지역 내에서 분리된 STEC의 유전학적 연관성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

세균

2004년부터 2008년 10월까지 설사환자 대변에서 분리된 33주, 식중독 환자 및 환자 접촉자에서 분리된 9주, 2004년 불현성 집단감염 11주 및 식품에서 분리된 2주, 그리고 소 분변에서 분리된 11주의 STEC를 실험에 이용하였다.

PFGE

PulseNet Korea network에서 사용되는 표준시험법으로 미국 질병관리본부 (Centers for Disease Control and Prevention)의 PulseNet USA와 아시아 지역 13개국이 참여하는 PulseNet Asia Pacific의 표준시험법을 근간으로 다음과 같이 실시하였다.

Agarose plug의 제조

순수 분리된 균을 tryptic soy agar (TSA)에 접종하여, 표준균주 (*Salmonella* Breanderup, BAA-664)와 함께 37°C에서 16~18시간 배양하여 실험에 사용하였다. 1.2% plug 용 agarose solution (Seakem gold agarose, Cambrex, Rockland, ME, USA), plug wash TE buffer를 55°C 항온수조에 보관하고, 균주 1개 당 12 × 75 mm 폴리에틸렌튜브 1개, 1.5 ml과 2 ml 용량의 microcentrifuge 튜브 각 2개, plug mold (Biorad, Hercules, CA, USA) 2 well씩 준비하였다. 폴리에틸렌튜브에 2 ml의 cell suspension TE buffer를 넣고 멸균 면봉을 사용하여 TSA 평판배지로부터 균을 묻혀 15~20%의 투명도로 부유시켰다. 균 현탁액 200 µl를 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮긴 다음, plug agarose 200 µl를 넣고, micropipette으로 천천히 4회 정도 섞어 바로 plug mold에 넣었다. 섞는 횟수를 늘리거나 거칠게 섞을 경우에는 선명한 결과를 얻는데 방해가 되므로 주의하면서 섞어 주었다. Plug mold를 4°C에서 5분 정도 굳히면서 ES buffer 1.5 ml과 proteinase K (20 mg/ml, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 40 µl를 2 ml microcentrifuge tube에 준비하였다.

Plug lysis 및 세척

균은 plug를 plug mold에서 꺼내어 미리 준비해 둔 ES buffer로 옮기고 96 well microcentrifuge rack에 꽂아 뚜껑을 덮었다. 55°C 진탕 항온수조에 rack을 잘 고정시킨 후 tube가 물속에 완전히 잠기도록 하여 150~175 rpm으로 1~1.5시간 방치하였다. Plug 세척을 위하여 lysis가 끝난 plug를 screen cap (Biorad)에 옮기고 이것들을 연결하여 PVC tube에 넣고 20분 동안 5회 반복하여 세척하였다. 이때 PVC tube가 물속에 완전히 잠기도록 하고 150~175 rpm으로 20분을 넘기지 않도록 하였다. 세척이 끝난 plug는 2 ml microcentrifuge tube에 plug wash TE buffer를 1.5 ml 씩 넣고 4°C에 보관하거나 다음 단계로 진행하였다.

제한효소 처리

세척이 끝난 plug를 슬라이드글라스 위에 올려놓고 70% 에탄올로 닦은 razor blades를 이용하여 1 mm 두께

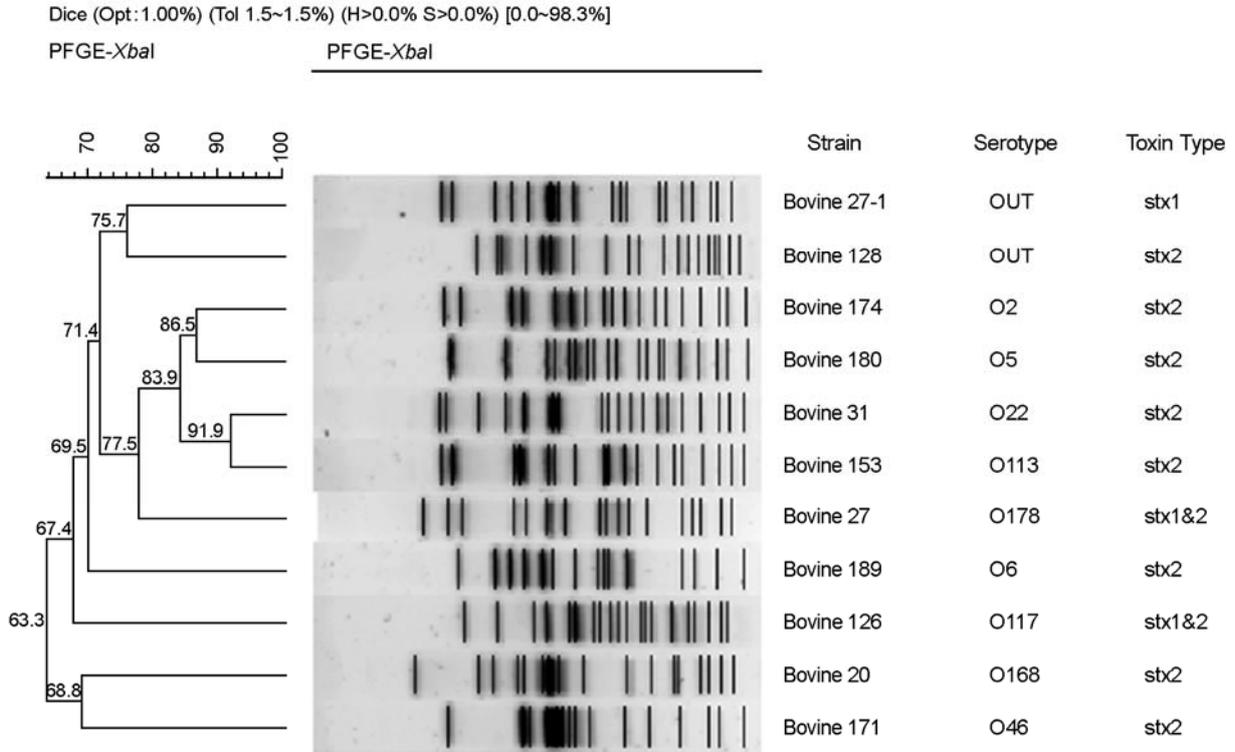


Figure 1. Dendrogram of *XbaI*-digested PFGE profiles of the STEC isolates from cattle.

로 자른 다음, 자른 절편 2개를 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮겨 100 µl의 제한효소 반응액을 넣고 37°C 항온수조에서 4시간 동안 반응시켰다. 제한효소 반응액의 조성은 10 × restriction enzyme buffer 10 µl, 100 × BSA 1 µl, *XbaI* 40 unit (NEB, Beverly, MA, USA)에 멸균증류수로 최종 100 µl를 맞췄다. 반응이 끝나면 제한효소 반응액을 제거하고 TE buffer 200 µl를 채워 넣었다.

전기영동

0.5 × TBE (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 1% agarose solution을 gel 크기에 맞추어 녹여서 55°C 항온수조에 보관하고, 제한효소 처리가 끝난 plug 절편을 꺼내어 agarose gel 성형용 comb (Biorad)의 끝 부위에 맞춰 올려놓은 다음 여과지로 주변의 물기를 제거하였다. Plug가 comb의 lane 끝에 일직선이 되도록 잘 배치하여 상온에서 2분 정도 추가로 건조시키고 항온수조에 보관한 1% agarose solution을 꺼내어 gel 성형틀 안에 부었다. 이때 agarose solution을 약 1~2 ml 정도 남겨서 다시 항온수조에 보관하였다. Gel 성형틀에 plug 절편이 붙어 있는 comb을 제자리에 위치시키고, gel을 상온에서 30분 정도 굳힌 후 comb을 뽑아냈다. Comb에 의해 만들어진 well

에 남아 있는 소량의 agarose solution을 넣어 채웠다. 이렇게 만들어진 gel을 CHEF Mapper system (Biorad)을 이용하여 0.5 × TBE, 6 V/cm, 14°C에서 initial time 2.16 sec, final time 54.17 sec의 조건으로 18시간 전기영동하였다. 전기영동이 완료되면 500 ml의 EtBr (0.5 µg/ml)에 gel을 넣어 15~20분 염색하고, 증류수를 이용하여 매회 30분씩 2회 탈색하였다. 염색 및 탈색 단계는 모두 빛이 차단된 상태에서 이루어졌다.

Dendrogram 작성

PFGE 결과는 Tenover 등 (19)의 방법에 따라 각 균주의 DNA 위치가 다른 절편의 수에 따라서 group을 결정하였고, DNA 절편 유형을 software Bionumerics version 5.0으로 분석하였다. 또한 Dice coefficient similarity (tolerance, 1.5%)로 Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) 법에 의하여 dendrogram을 작성하여 균주간의 상관관계를 비교 분석하였다.

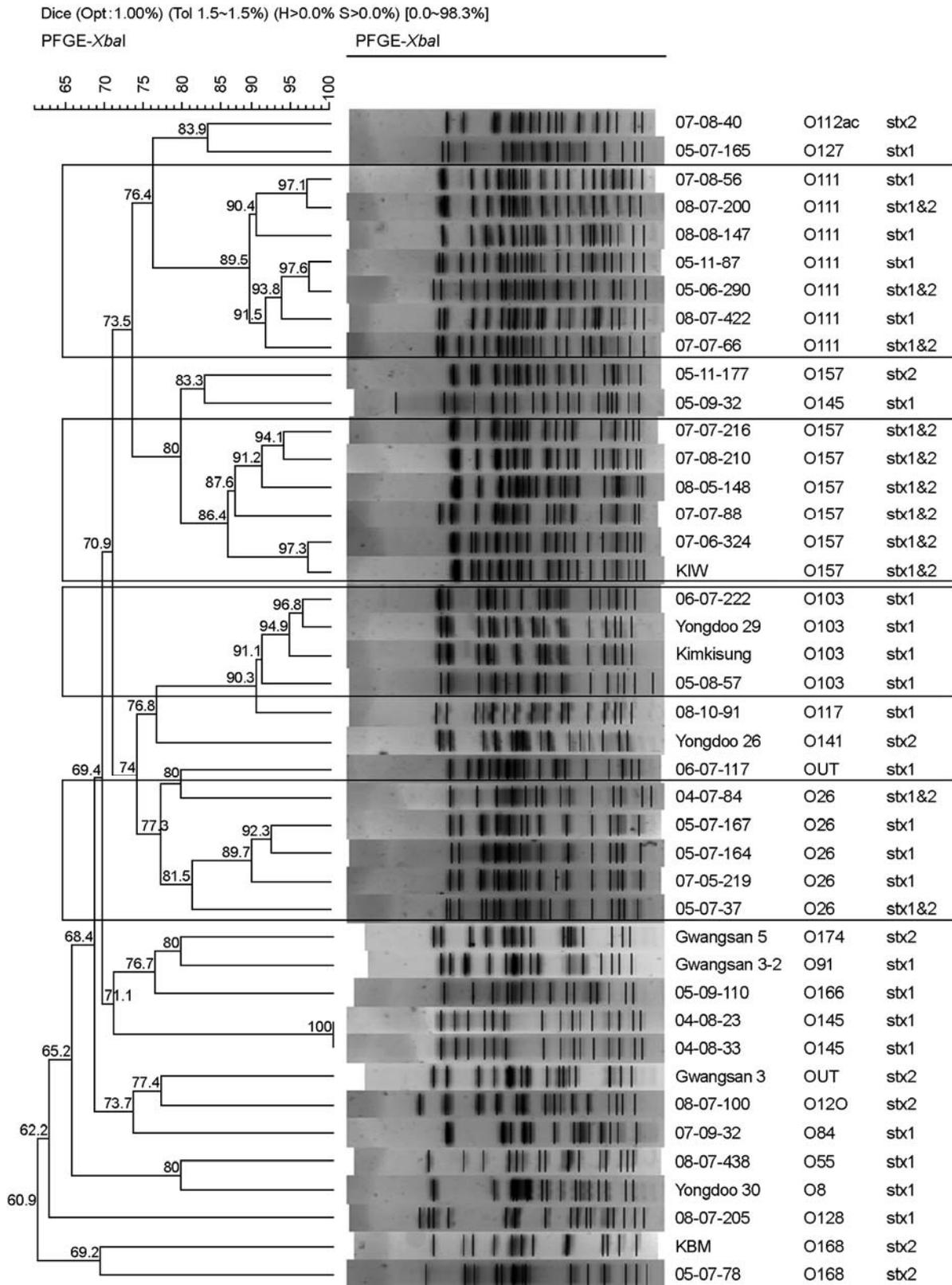


Figure 3. Dendrogram of *XbaI*-digested PFGE profiles of the STEC isolates from diarrhegenic patients.

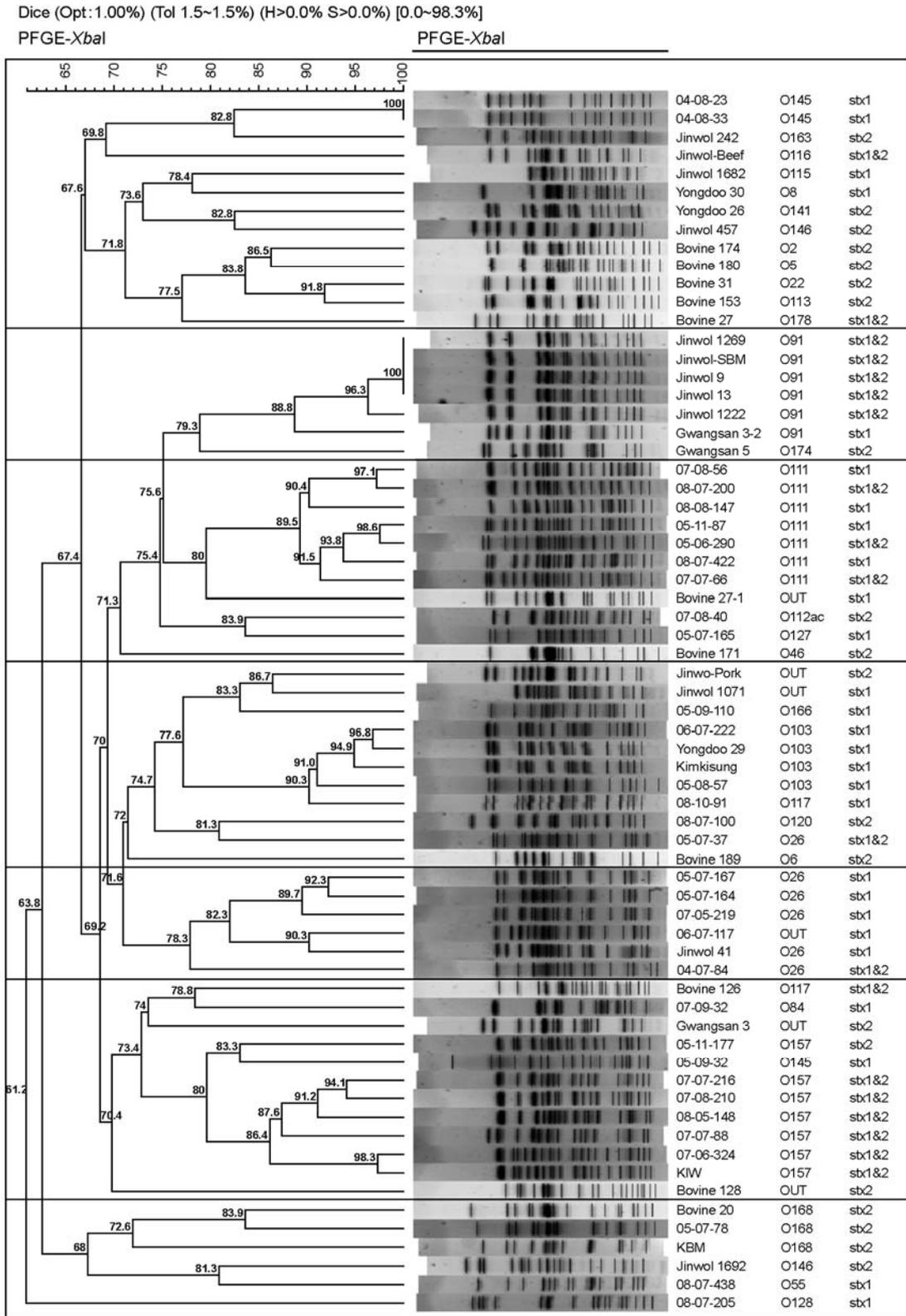


Figure 4. Dendrogram of *Xba*I PFGE banding pattern of each of the 67 STEC strains clustered by MPGMA using the Dice coefficient in Bionumerics version 5.0.

고 찰

분자 역학적 분석방법은 병원체의 유전적 다양성에 기초하여 그들의 특성을 규명하는 방법이다. 기본적으로 분자 역학적 방법은 크게 분류 (classification)와 유형 (typing)으로 구별된다. 분류는 동일그룹 사이에 중을 세분화하고 관계를 규명하는 방법으로 오랜 연구기간이 요구되는 반면, 유형 분석은 임상 분리주나 환경 분리주의 차이점을 분석하는데 더 유용하며 비교적 분석 시간이 짧고 지역적 역학분석방법에 이용된다. Multilocus sequence typing (MLST)이나 multilocus enzyme electrophoresis는 분류를 목적으로 사용되는 실험법이며 (20, 21), PFGE나 RAPD (random amplified polymorphic DNA-PCR), AFLP (amplified fragment length polymorphism) 등의 방법은 유형 분석에 주로 사용된다 (22). 이 연구에서는 광주지역 사육 소 및 사람에서 분리된 STEC의 유전자의 유형 분석을 위하여 PFGE 방법을 사용하였다. 분리된 전체 균주의 유전자 유사성을 비교해 볼 때 총 6개의 cluster로 나눌 수 있었으며, 동일 혈청형 사이의 유전적 거리가 가까운 것으로 나타났다. 그리고 환자 접촉자 검사에서 환자와 동일한 독소형 및 혈청형이 분리되어, 그 당시 동일 오염원에 의한 감염 또는 접촉에 의한 2차 감염이라고 판단하였지만 유전자 분석결과 97.3% 유사성을 확인함으로써, 다른 오염원이거나 균이 증식하는 과정에서 유전자의 소실 또는 변이 등이 일어난 이후에 전파되었을 것이라고 추측할 수 있었다. 현재 STEC의 유형 분석에 PFGE 방법 이외에도 혈청형, 독소형 및 병원성 유전자 분석 등이 사용되고 있지만, 이 연구결과에서는 혈청형과 PFGE 유형이 가장 잘 일치함을 알 수 있었다 (Fig. 4).

광주지역에서 분리된 STEC는 대부분 산발적인 발생이었고, 무증상 집단감염에서도 O91 이외에 여러 가지 혈청형이 분리되었으며, PFGE 유형 분석결과 유전자 유형이 매우 다양하였다. 또한 소 분변 STEC 분리주는 유전적 상관관계가 63.3%였으며, 인체감염주와 동일한 PFGE 유형이 존재하지 않아 이들 집단사이의 어떠한 역학적 상관관계도 찾을 수 없었다. 따라서 STEC에 의한 산발적인 발생은 손씻기 등 개인위생수칙을 잘 지킴으로써 줄일 수 있을 것이라 생각된다. 핀란드에서 1990년부터 1997년 동안 분리한 O157:H7 57주를 대상으로 PFGE 분

석을 한 결과 동일 혈청형에서도 7개의 유전자 유형이 확인되었고 (23), 우간다의 Nyabushozi 지역의 12살 미만의 아이들과 소 분리주의 PFGE 분석결과 23개의 다양한 PFGE 유형이 확인되었으며, PFGE 유형이 혈청형과 가장 일치한 것으로 확인되어 본 연구결과와 유사함을 확인하였다 (24).

현재 STEC 균주 사이의 유전형 분석에 PFGE 방법이 균주사이의 DNA 구성 차이를 검출하는 것으로, 재현성에 있어서 가장 뛰어난 방법으로 알려져 있다 (19). 하지만 Beutin 등은 소와 사람에서 분리된 STEC O103 균주를 가지고 PFGE와 MLST의 방법을 비교했을 때, 유전자 유형에서 상당히 상이한 결과를 얻었다 (25). 장출혈성대장균의 염색체 게놈은 그 구성에 있어서 매우 불안정하고 계대를 거듭함으로 게놈구성에 변화가 생기는데, 그 원인의 하나는 적어도 10개 이상의 많은 bacteriophage DNA 및 다수의 PAI (pathogenicity island)라고 하는 외래 유전자들이 관여하고 있기 때문이다. 또한 PFGE 분석방법이 세균성 병원체의 유형을 결정하는데 20 kb 이상의 염색체 유전자 유형을 비교할 수 있으며 분리균주의 실시간 분석 시 동일 오염원에 의한 산발적인 감염을 빨리 인식할 수 있는 장점이 있지만, 분석자에 따라 밴드의 유형을 설정하는데 많은 변수들이 작용한다. 실제 미네소타에서 분리된 317주의 STECO157:H7이 software 분석에 의해 143개의 유형으로 분석되었으나 (26), 일본에서는 825주 STEC O157:H7이 단지 6개의 PFGE 유형으로 분류되었다 (27). 이것은 컴퓨터와 사람 분석에 의한 해석방법의 차이에 기인한 것이다 (23). 따라서 세균의 유전형을 분석하는데 PFGE 이외에 phage typing이나 MLST 등의 방법을 추가하면 훨씬 더 양질의 결과를 얻을 수 있을 것이라 생각된다.

최근 식습관의 변화와 미국산 쇠고기 전면개방에 따른 식육의 소비가 증가하고 있지만, 식품위생법과 축산물 가공법에서는 O157:H7만 규격 기준에 포함되어 있다. 그러나 STEC에 의한 집단 및 산발적 발생은 O157 이외의 다양한 혈청형에 의하여 발생하고 있으며, 그들이 일으키는 임상증상 또한 O157과 비슷하다 (28). 따라서 전염병 예방법에서 시가독소를 생산하는 모든 대장균을 1종 전염병으로 분류하고 있는 것처럼 식품 및 축산물 가공품의 규격 기준에 non O157 STEC가 반드시 포함되어야 한다.

또한 최근의 집단 식중독 발생경향을 보면 교통이 발

달하고 일일생활권이 가능해지면서 식품 등의 유통이 광역화됨에 따라 어느 한 지역에 국한되지 않고 여러 지역에서 동일 오염원으로 규명되는 경우가 증가하고 있다. 따라서 오염원의 신속한 파악이 요구되며, 그러한 목적에서 광주지역에서 분리된 STEC에 대한 PFGE 자료는 향후 STEC의 감염경로를 파악하는데 유용한 자료가 될 것이다.

Acknowledgements

The authors give their best thanks to the staffs of the hospitals in Gwangju city, Korea, for their kind contribution and help.

참 고 문 헌

- 1) Beutin L, Geier D, Steinruck H, Zimmermann S, Scheutz F. Prevalence and some properties of verotoxin (shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol* 1993;31:2483-8.
- 2) Meyer-Brosseta S, Bastian SN, Arne PD, Cerf O, Sanaa M. Review of epidemiological surveys on the prevalence of contamination of healthy cattle with *Escherichia coli* serogroup O157:H7. *Int J Hyg Environ Health* 2001;203:347-61.
- 3) Faith NG, Shere JA, Brosch R, Arnold KW, Ansary SE, Lee MS, Luchansky JB, Kaspar CW. Prevalence and clonal nature of *Escherichia coli* O157:H7 on dairy farms in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:1519-25.
- 4) Mundy R, Petrovska L, Smollett K, Simpson N, Wilson RK, Yu J, Tu X, Rosenshine I, Clare S, Dougan G, Frankel G. Identification of a novel *Citrobacter rodentium* type III secreted protein, *EspI*, and roles of this and other secreted proteins in infection. *Infect Immun* 2004;72:2288-302.
- 5) Hancock DD, Besser TE, Rice DH, Ebel ED, Herriot DE, Carpenter LV. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the northwestern USA. *Prev Vet Med* 1998;35:11-9.
- 6) Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J Anim Sci* 2007;85:E45-E62.
- 7) Heuvelink AE, Van den Biggelaar FL, De Boer E, Herbes RG, Melchers WJ, Huis in't Veld JH, Monnens LA. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. *J Clin Microbiol* 1998;36:878-82.
- 8) Conedera G, Dalvit P, Martini M, Galiero G, Gramaglia M, Goffredo E, Loffredo G, Morabito S, Ottaviani D, Paterlini F, Pezzotti G, Pisanu M, Semprini P, Caprioli A. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *Int J Food Microbiol* 2004;96:67-73.
- 9) Renter DG, Sargeant JM, Hygnstorm SE, Hoffman JD, Gillespie JR. *Escherichia coli* O157:H7 in free-ranging deer in Nebraska. *J Wildl Dis* 2001;37:755-60.
- 10) Chalmers RM, Salmon RL, Willshaw GA, Cheasty T, Looker N, Davies I, Wray C. Vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in a farmer handling horses. *Lancet* 1997;349:1816.
- 11) Trevena WB, Hooper RS, Wray C, Willshaw GA, Cheasty T, Domingue G. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals. *Vet Rec* 1996;138:400.
- 12) Garcia A, Fox JG. The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1592-7.
- 13) Wallace JS, Cheasty T, Jones K. Isolation of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. *J Appl Microbiol* 1997;82:399-404.
- 14) Makino S, Kobori H, Asakura H, Watarai M, Shirahata T, Ikeda T, Takeshi K, Tsukamoto T. Detection and characterization of Shiga toxin-production *Escherichia coli* from seagulls. *Epidemiol Infect* 2000;125:55-61.
- 15) Griffin PM, Tauxe RV. 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.
- 16) Meng J, Doyle MP. Microbiology of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in foods, in: Kaper JB, O'Brien AD. (Eds.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga-toxin-producing *E. coli*, American Society for Microbiology, Washington, DC. 1998;92-108.
- 17) McDowell DA, Sheridan JJ. Survival and growth of Vero cytotoxin-producing *E. coli* in the environment, in: Duffy G, Garvey P, McDowell D. (Eds.), *Verocytotoxigenic Escherichia coli*, Food & Nutrition Press Inc., Trumbull 2001;279-304.
- 18) Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis* 2005;11:603-9.
- 19) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*

- 1995;33:2233-9.
- 20) Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3140-5.
- 21) Caugant DA, Bøvre K, Gaustad P, Bryn K, Holten E, Høiby EA, Frøholm LO. Multilocus genotypes determined by enzyme electrophoresis of *Neisseria meningitidis* isolated from patients with systemic disease and from healthy carriers. *J Gen Microbiol* 1986;132:641-52.
- 22) Achtman M, van der Ende A, Zhu P, Koroleva IS, Kusecek B, Morelli G, Schuurman IG, Brieske N, Zurth K, Kostyukova NN, Platonov AE. Molecular epidemiology of serogroup a meningitis in Moscow, 1969 to 1997. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:420-7.
- 23) Keskimäki M, Saari M, Heiskanen T, Siitonen A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Finland from 1990 through 1997: prevalence and characteristics of isolates. *J Clin Microbiol* 1998;36:3641-6.
- 24) Majalija S, Segal H, Ejobi F, Elisha BG. Shiga toxin gene-containing *Escherichia coli* from cattle and diarrheic children in the pastoral systems of southwestern Uganda. *J Clin Microbiol* 2008;46:352-354.
- 25) Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kaulfuss S, Gleier K. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J Clin Microbiol* 2004;42:1099-108.
- 26) Bender JB, Hedberg CW, Besser JM, Boxrud DJ, MacDonald KL, Osterholm MT. Surveillance by molecular subtype for *Escherichia coli* O157:H7 infections in Minnesota by molecular subtyping. *N Engl J Med* 1997;337:388-94.
- 27) Izumiya H, Terajima J, Wada A, Inagaki Y, Itoh KI, Tamura K, Watanabe H. Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates in Japan by using pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1997;35:1675-80.
- 28) Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:142-201.
-