

# Caracterización molecular de cepas de *E. coli* 0157: H7 aisladas de humanos en Bogotá, D.C.

Joao Cuesta<sup>1</sup>, Salim Mattar<sup>1</sup>, Miguel Parra<sup>2</sup>

En muchos países tropicales, tales como Colombia, la gastroenteritis aguda (GEA) constituye una causa importante de morbilidad y mortalidad. En varias regiones de Colombia la GEA es endémica y su incidencia ha aumentado con epidemias y casos esporádicos de diarrea<sup>1,4</sup>. El objetivo de este estudio fue el de caracterizar el ADN cromosomal de cepas de *E. coli* 0157:H7 a través del análisis de restricción enzimático. Se utilizó la técnica de electroforesis de campo pulsado (PFGE), para determinar la clonalidad de los aislamientos. La característica molecular de los 18 aislamientos humanos de *E. coli* 0157:H7 estuvo basada en el análisis de los fragmentos de ADN cromosomal obtenidos mediante la restricción enzimática con la endonucleasa XbaI. Se obtuvieron 6 patrones de bandas diferentes entre sí, constituidos por 16 a 27 fragmentos de restricción, con tamaños moleculares entre 40 y 580 Kbp. Los resultados mostraron que los distintos aislamientos humanos de *E. coli* 0157:H7 implicados en los casos esporádicos de GEA en Bogotá, presentan un alto grado de polimorfismo genético entre sus diferentes patrones de banda, lo que significa, que las cepas posiblemente no están relacionadas entre sí. *Salud UIS* 2003;35:116-121

**Palabras Clave:** *E. coli* 0157:H7; PFGE, diarrea, clones, Bogotá.

In many tropical countries, such as Colombia, the acute diarrhoeal disease (ADD) constitutes an important cause of morbidity and mortality. In several regions from Colombia the ADD is endemic and its incidence has come enlarging through epidemics and sporadic cases of diarrhoea. The objective of this study was to characterize the DNA chromosomal of strains of *E. coli* 0157:H7 through the analysis of enzymatic restriction and establishing the epidemiological relations among the strains of *E. coli* 0157:H7. The technique utilized was pulse-field gel electrophoresis (PFGE), to determine the clonality of the isolates. The molecular characteristic of the 18 human isolations of *E. coli* 0157:H7 was based on the analysis of the fragments of chromosomal DNA obtained by means of the restriction enzymatic with the endonuclease XbaI. Six different profiles of bands were obtained between them, constituted by 16 to 27 restriction fragments, with molecular sizes of 40 and 580 Kbp. The results showed that the distinct human isolations of *E. coli* 0157:H7 implied in the sporadic cases of ADD in Bogotá, show a high degree of genetic polymorphism among its different profiles of band, it is likely that there is no epidemiological relationships between the sporadic human cases of diarrhoea strains from Bogotá. *Salud UIS* 2003;35:116-121

**Key Words:** *E. coli* 0157: H7, PFGE, clones, diarrhoea, Bogotá.

## INTRODUCCIÓN

La Gastroenteritis aguda (GEA) continúa siendo una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad especialmente en niños. Se estima que la probabilidad de que un niño muera por GEA antes de los 7 años puede llegar al 50%.<sup>1-3</sup> En los países desarrollados la mortalidad

es mucho más baja, pero todavía importante.<sup>2</sup> La GEA es la segunda causa de morbi-mortalidad infantil en Colombia.<sup>1-5</sup>

*E. coli* es el agente productor de diarrea más importante en menores de edad y representa uno de los problemas de salud pública más influyentes en los países en vías de desarrollo.<sup>6</sup> *E. coli* Enterotoxigénica es el agente etiológico más importante de diarrea en países en vías de desarrollo, cerca del 30% al 40% de los casos reportados son causados por este patógeno, además es el más común de la diarrea del viajero.<sup>7-9</sup> Para hacer un diagnóstico adecuado, se deben reconocer las cepas patógenas de las cepas constituyentes de la flora normal del tracto gastrointestinal.<sup>6</sup> *E. coli* 0157:H7 fue primeramente reconocido como causa de GEA humana en 2 brotes separados de colitis hemorrágica en Michigan y Oregon en 1982.<sup>10,11</sup> Los brotes y casos esporádicos por *E. coli* 0157: H7 se han ido presentando en diferentes

<sup>1</sup>Universidad de Córdoba. Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico. Montería (Cordoba) Colombia, Sur América.

<sup>2</sup>Corporación Universitaria del Sinú (CUS), Facultad de Ciencias de la Salud, Montería (Cordoba) Colombia, Sur America.

**Correspondencia:** Salim Mattar V. Ph.D. Universidad de Córdoba, Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Apartado Aéreo # 343 Montería, Córdoba. Colombia.

Email: mattarsalim@hotmail.com. FAX: 094-7560710.

Recibido Junio 11 de 2003 / Aceptado Agosto 13 de 2003

partes del mundo y por diferentes fuentes de transmisión.<sup>10</sup> Recientemente, en Jakarta un estudio realizado desde marzo de 1997 a agosto de 1999, detectó a *E. coli* como el agente etiológico de diarrea en 218 (18%) muestras de 1244 hisopados rectales obtenidos.<sup>9</sup> En Colombia no se poseían evidencias de la existencia de *E. coli* 0157:H7 hasta 1997,<sup>12</sup> cuando un estudio en pacientes pediátricos con GEA demostró por primera vez la presencia en Colombia del patógeno con una prevalencia del 5.3%, constituyendo así un llamado de alerta en ese momento ya que la tasa de ataque fue lo suficientemente alta comparada con la de otros países.<sup>12</sup>

En estudios posteriores también logramos aislar *E. coli* 0157:H7 del ganado bovino y de carne de hamburguesa la cual se ha asociado con casos de intoxicaciones, brotes de colitis hemorrágica y algunos casos de síndrome urémico hemolítico en otros países.<sup>5</sup> Con estos estudios se estableció la cadena de transmisión de *E. coli* 0157:H7 en Bogotá. A partir de ese momento se obtuvo un banco celular de cepas de *E. coli* 0157:H7 de tres orígenes diferentes a las cuales se les realizó análisis bioquímicos, serológicos, determinación de toxinas y extracción de plásmidos. La ausencia de estudios moleculares que muestren la importancia de la etiología bacteriana por *E. coli* 0157:H7 impide tener datos actualizados sobre el comportamiento de este microorganismo como agente causante de una de las patologías que más afectan a la población infantil; de ahí la importancia de realizar estudios para caracterizar molecularmente dicho agente, utilizando la técnica de electroforesis de campo pulsado (PFGE). Esta última técnica hace parte de una serie de herramientas moleculares empleadas actualmente en el estudio de las enfermedades infecciosas, como RAPD, AFLP, ribotipificación, RFLP y más recientemente PCR en tiempo real y microarreglos.

El objetivo en el presente estudio fue el de caracterizar el ADN cromosomal de cepas de *E. coli* 0157:H7 aisladas de pacientes pediátricos, en Bogotá, D.C., Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 18 cepas de *E. coli* 0157:H7 aisladas de muestras fecales obtenidas de pacientes pediátricos que presentaron casos esporádicos de GEA. Las cepas se recolectaron a partir de las muestras de niños menores de 5 años, entre marzo de 1996 y noviembre de 2000 en diferentes hospitales de Bogotá, D.C.<sup>5,12</sup> Las muestras fueron colocadas en medio de transporte Stuart y enviadas al laboratorio, posteriormente fueron identificadas por los métodos de cultivo convencionales, finalmente las cepas se

mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$  en skim milk antes de la realización de la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

PFGE: El ADN cromosomal de cada aislado fue preparado siguiendo el método descrito por Díaz et al;<sup>13</sup> se inoculó una colonia en caldo tripticasa de soya y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas. Posteriormente se centrifugaron  $1.500\ \mu\text{l}$  y se determinó la densidad óptica, se elaboraron los discos de agarosa de bajo punto de fusión y se colocaron en una solución tampón que contenía  $2\ \text{mg/ml}$  de lizosima y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas. Una vez incubados se lavaron los discos con una solución tampón de lavado y se colocaron en otra solución que contenía  $1\ \text{mg/ml}$  de proteinasa K. Se incubó nuevamente a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 17 horas. Posteriormente, se transfirió a un tubo eppendorf  $1.5\ \text{ml}$  del cultivo, centrifugando por 8 minutos a  $10000\ \text{r.p.m.}$ , y descartando posteriormente el sobrenadante y dejando el pellet en el fondo del tubo. Se agregaron al tubo tipo eppendorf  $500\ \text{ml}$  de buffer de suspensión (EDTA  $100\ \text{mM}$ , NaCl  $20\ \text{mM}$ , Tris HCl  $10\ \text{mM}$ , pH 7.2) Se repitió el proceso de centrifugación y se descartó del sobrenadante. Se vertieron en el tubo  $200\ \text{ml}$  de buffer de suspensión, homogenizándolo una vez más.

Una vez realizado esto, se tomó un tubo en el cual se depositó un mililitro de agua destilada, añadiendo posteriormente  $5\ \mu\text{l}$  de la muestra de  $200\ \mu\text{l}$ , con el fin de calcular la densidad óptica de la misma. Tras la realización de la medición, se estimó la cantidad de buffer de suspensión necesario para ser adicionado y tener una densidad óptica de 1,5. La densidad óptica se determinó mediante la utilización de un equipo Multiskan MCC/340P versión 2.33, con un filtro de  $620\ \text{nm}$  y con blanco conocido. El volumen a añadir obedeció a la fórmula:  $\text{Do} \times 40 \times 210 - 315$ . A la muestra con  $195\ \mu\text{l}$  se le agregó el buffer de suspensión calculado, esta se utilizó para realizar los bloques de agarosa.

Los bloques se obtuvieron de una preparación de  $100\ \mu\text{l}$  de la muestra, más  $100\ \mu\text{l}$  de agarosa al  $1,3 - 1,5\%$  p/v. Se homogeneizó bien la solución y se tomaron  $24\ \mu\text{l}$  para realizar los bloques, sobre una superficie de acrílico limpia forrada en parafilm.

Una vez realizados los bloques, se llevaron al refrigerador de  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 5 a 10 minutos, con la finalidad de que adquirieran una mayor consistencia. Una vez adquirieron consistencia fueron recolectados en tubos tipo eppendorf para proceder a la extracción del ADN. Terminada esta fase los discos se sometieron a fenilmetil-sulfonil-fluoride a  $4^{\circ}\text{C}$  por 2 horas, se lavaron 3

veces con la solución tampón de lavado por 24 horas y se les agregó 30µl de XbaI (Promega, Madison, Wisconsin, USA), durante 24 horas a 37°C. Finalmente se corrió la electroforesis utilizando un gel de agarosa para campo pulsado al 1% con TBE 0.5X; el equipo de PFGE empleado fue un Gen Navigator (Pharmacia, Biotech, Upsala, Sweden). Las fases realizadas fueron de 5, 15 y 25 segundos a 8°C y 160 V. El gel fue coloreado con bromuro de etidio durante 45 minutos y se visualizaron las bandas en un transiluminador de U.V. El marcador utilizado fue el fago Lambda (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Ver figura 1

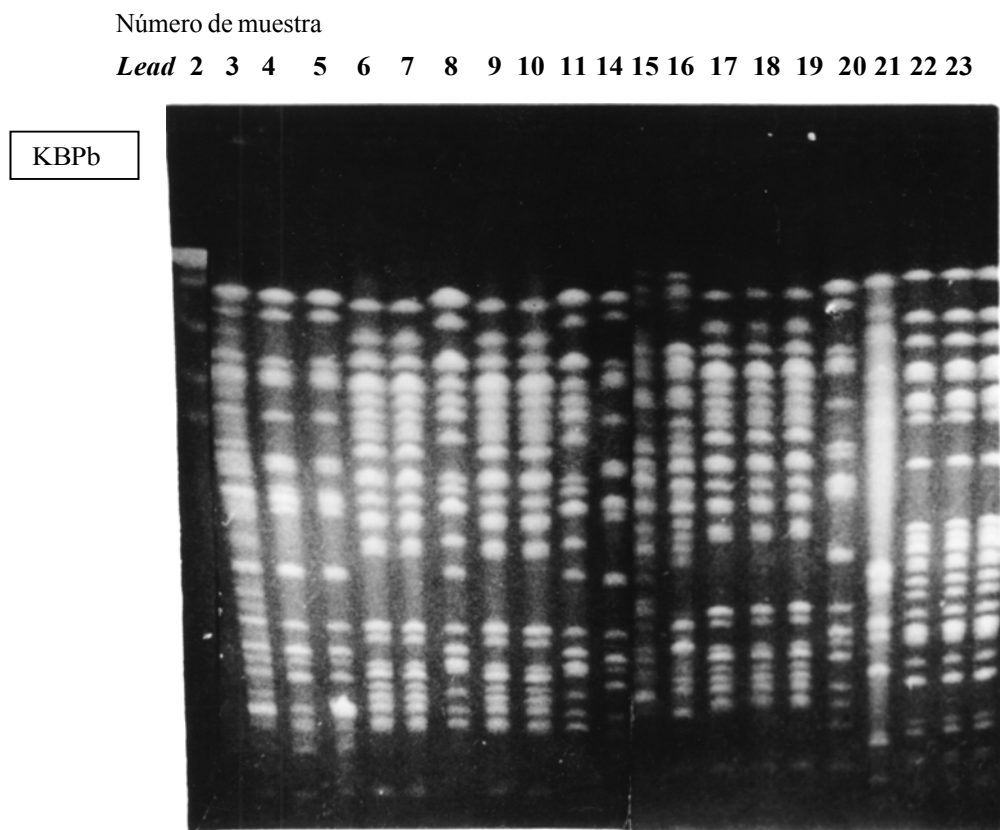
La interpretación de los electroferotipos o patrones obtenidos en la PFGE fue analizada siguiendo las guías de Tenover et al<sup>14</sup> quienes afirman que un aislamiento puede considerarse no relacionado con la cepa del brote cuando presenta patrones electroforéticos que difieren de los patrones registrados por esta en 7 o más bandas, lo cual puede interpretarse como 3 o más eventos genéticos ocasionados por cambios o rearrreglos en el cromosoma bacteriano.

## RESULTADOS

Los 18 aislados de *E. coli* 0157:H7 obtenidos a partir de pacientes pediátricos en Bogotá, D.C., exhibieron patrones de restricción con tamaños moleculares aproximadamente de 40 a 580 Kbp. Los fragmentos obtenidos a partir de XbaI correspondieron a 6 patrones distinguibles (arbitrariamente designados como patrones A, B, C, D, E y F) los cuales registraron entre 16 y 27 fragmentos. El patrón A fue observado en 7 de los 18 aislados. B fue observado en 3 aislados; los patrones C, D, E y F fueron cada uno observados en 2 de los 18 aislados. Ver Tabla 1 y Figura 1

El análisis de restricción con XbaI en el presente estudio permitió obtener fragmentos de 40 - 580 Kbp a partir de los aislados de origen humano en Bogotá, D.C. Se obtuvieron 6 tipos de patrones uniformemente distribuidos en la ciudad: A, B, C, D, E, y F.

Figura 1. Perfiles de PFGE de *E. coli* 0157:H7.



Resultados de la PFGE, que muestran los patrones electroforéticos obtenidos de las cepas de *E. coli* 0157:H7, aisladas de pacientes pediátricos en Bogotá. Los cortes enzimáticos se realizaron con la endonucleasa XbaI. Los números en la parte superior de la fotografía corresponden al código de las diferentes cepas de *E. coli* 0157:H7.

**Tabla 1.** Perfiles obtenidos de PFGE en *E. coli* 0157:H7 aisladas de pacientes de Bogotá, D.C.

Líneas	Cepa	No Fragmentos	Patrones
1	Marcadores de peso Molecular de 1Kb		
2	No relacionado		
3	<i>E. coli</i> 0157:H7	19	C
4	<i>E. coli</i> 0157:H7	19	C
5	<i>E. coli</i> 0157:H7	22	A
6	<i>E. coli</i> 0157:H7	22	A
7	<i>E. coli</i> 0157:H7	18	D
8	<i>E. coli</i> 0157:H7	22	A
9	<i>E. coli</i> 0157:H7	22	A
10	<i>E. coli</i> 0157:H7	18	D
11	<i>E. coli</i> 0157:H7	16	E
14	<i>E. coli</i> 0157:H7	27	F
15	<i>E. coli</i> 0157:H7	27	F
16	<i>E. coli</i> 0157:H7	22	A
17	<i>E. coli</i> 0157:H7	22	A
18	<i>E. coli</i> 0157:H7	22	A
19	<i>E. coli</i> 0157:H7	16	E
20	<i>E. coli</i> 0157:H7	Indistinguible	-
21	<i>E. coli</i> 0157:H7	20	B
22	<i>E. coli</i> 0157:H7	20	B
23	<i>E. coli</i> 0157:H7	20	B

El patrón A con 25 bandas se registró en 7 de los 18 aislados, 27 fragmentos con distintos pesos moleculares fueron observados en el patrón B el cual se presentó en 3 pacientes y los patrones C, D, E y F fueron observados en 2 pacientes cada uno.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente investigación a partir del análisis de los fragmentos de restricción, generados por PFGE mediante el uso de la endonucleasa XbaI, permiten concluir (observar) que existe un alto grado de polimorfismo entre las cepas de *E. coli* 0157:H7 responsables de los distintos brotes esporádicos de GEA registrados en Bogotá D.C. En este mismo sentido Gouveia et al,<sup>15</sup> reportaron resultados similares a partir de casos esporádicos de pacientes infectados por *E. coli* 0157:H7 atendidos en centros de salud ambulatoria en Wisconsin EEUU. El estudio de Gouveia et al<sup>15</sup> al igual que el nuestro permitió determinar un alto grado de polimorfismo genómico entre los fragmentos de restricción generados por las cepas responsables de dichos brotes esporádicos, realizado también con la enzima de XbaI.

A pesar de la casuística que incluyo solo 18 aislamientos, la diversidad clonal encontrada en nuestro estudio coincide con el estudio hecho en Chile por Rios et al<sup>16</sup> quienes analizaron 39 cepas de *E. coli* 0157:H7 y encontraron 37 patrones electroforéticos diferentes. Adicionalmente, determinaron la relación clonal existente entre los aislamientos de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que se obtuvieron de diferentes fuentes (animales, humanas y alimentos). También compararon los resultados obtenidos a partir de PFGE e hibridización In vitro y observaron que la electroforesis tiene una mayor discriminación que la técnica de hibridización; lograron por PFGE identificar 37 perfiles diferentes mientras que por hibridización solamente diferenciaron 12 perfiles.<sup>16</sup>

Los resultados obtenidos en la investigación realizada por Rios et al<sup>16</sup> indican que uno de los reservorios animales más importantes para el hombre son los cerdos. En contraste a estos resultados, Davis et al,<sup>17</sup> demostró que la técnica de PFGE no es tan buena para la diferenciación molecular de la cepas de *E. coli* 0157:H7 y recomienda el uso de técnicas mas modernas como el AFLP y los microarreglos.

En Escocia un estudio realizado por Allison et al,<sup>18</sup> mediante PFGE tipificó 600 cepas de *E. coli* 0157: H:7, aisladas de animales, humanos y alimentos, el estudio demostró que existía un clon particular que de manera recurrente actuaba en las diferentes regiones escocesas y no presentó variaciones genéticas notables en la cepa de ataque. En ese trabajo<sup>18</sup> se analizaron varias regiones, a diferencia del nuestro que se realizó en una sola ciudad, sin embargo, Allison et al<sup>18</sup> no pudo demostrar diversidad clonal, como la observada en nuestro estudio.

De igual manera, Izumiya et al,<sup>19</sup> reportaron en Japón las mismas observaciones que Gouveia et al,<sup>14</sup> aplicando la técnica de PFGE para la tipificación de 825 cepas de *E. coli* 0157:H7 aisladas a partir de 19 brotes y 608 casos esporádicos, registrados en escuelas de diferentes localidades. Los resultados reportados por Gouveia et al<sup>15</sup> e Izumiya et al,<sup>19</sup> coinciden con los nuestros en el número de fragmentos y el tamaño molecular reportado por autores como Krause et al,<sup>20</sup> quienes utilizaron la misma técnica molecular y la enzima XbaI, para analizar los perfiles electroforéticos generados por cepas de *E. coli* 0157:H7 aisladas a partir de humanos, implicadas en brotes que se presentaron en Escocia durante 1996. El presente estudio permite demostrar que la enzima XbaI es útil en la diferenciación de fragmentos cromosómicos en cepas de *E. coli* 0175:H7 aisladas de humanos.

No obstante, otros autores como Meng et al,<sup>21</sup> utilizaron la misma enzima en un estudio de brotes ocasionados por *E. coli* 0157:H7 en varios estados de EEUU y reportaron rangos de peso molecular mayores a los encontrados por nosotros, comprendidos entre 30 y 1000 Kbp, pero curiosamente con un número similar de bandas al observado en esta investigación. Los perfiles obtenidos en las cepas aisladas de bovinos sanos en el estudio de Liebana et al,<sup>22</sup> presentaron un número de bandas características que oscilaron entre 13 y 18 fragmentos de DNA, que tenían pesos entre 50 y 800Kbp. Estas diferencias respecto a los pesos moleculares, podrían deberse a variaciones de tipo geográfico, por el origen de las muestras, por rearrreglos genéticos o por presión selectiva del medio ambiente. Como se sabe, existe una notable diferencia geográfica en la distribución de los microorganismos a nivel mundial.

Algunos estudios demuestran que existen diferentes perfiles en las cepas de *E. coli* 0157:H7 aisladas de humanos, sin embargo, la diversidad es mucho más alta cuando se analizan cepas obtenidas de ganado bovino.<sup>16,22</sup> En ese sentido el estudio reciente de Liebana et al,<sup>22</sup> demostró un alto grado de polimorfismo con 57 tipos diferentes de patrones PFGE en 228 aislamientos realizados a partir de ganado bovino en granjas no relacionadas geográficamente en Inglaterra y Gales. Estos hallazgos son importantes ya que la diversidad genética de las cepas de *E. coli* 0157:H7 en los aislamientos animales, podría en un momento determinado infectar y movilizar estas cepas hacia los humanos, lo que epidemiológicamente puede ocasionar problemas en el seguimiento de estas patologías infecciosas en nuestro medio.

De otro lado, el número reducido de cepas analizadas en nuestro trabajo no permite establecer una relación exacta respecto a la diversidad genética de las cepas de *E. coli* 0157:H7 cocirculantes en Bogotá. Sin embargo, si se aplican los criterios sugeridos por Tenover et al,<sup>14</sup> se podría decir que en Bogotá existen diferentes subtipos dentro del serotipo 0157:H7, los cuales no estarían epidemiológicamente relacionados si se toma en cuenta el alto grado de polimorfismo genético encontrado mediante el análisis de los diferentes patrones electroforéticos.

Los diferentes patrones PFGE ofrecen una información epidemiológica valiosa que hace posible estudiar con detalle cepas involucradas en casos esporádicos como nuestro estudio,<sup>23</sup> al igual que en brotes. La cocirculación permanente de estos subtipos, la variabilidad encontrada en los aislamientos animales que son fuente de

contaminación para humanos, son un aviso importante que indican la necesidad de crear un mapa molecular que pueda permitir ubicar los diferentes subtipos en las distintas zonas del país para un mejor control epidemiológico de los mismos. Desde este punto de vista, el presente trabajo constituye un primer esfuerzo dentro de este importante proceso, entendiendo que se requieren investigaciones futuras que abarquen zonas geográficas más amplias en las cuales se analice un mayor número de aislados, incluyendo análisis de animales domésticos que sean reservorios del patógeno.

Finalmente, el presente estudio demostró la importancia de caracterizar genéticamente las cepas de *E. coli* 0157:H7 en Bogotá y aportó elementos valiosos que permiten establecer parámetros de relación epidemiológica entre dichas cepas.

## REFERENCIAS

1. Gabriel Ruiz JG, Máttar S. Accuracy of fecal lactoferrin and other stool tests in diagnosis of invasive diarrhoea at a Bogotá Pediatric Hospital. *Ped Infect Dis J* 1999;18:342-346
2. Mattar S, Pulido N, Mulleth R., Londoño D., Medina G., Martínez M. et al. Aetiology of acute infectious diarrhoea in a private Hospital in Bogotá. *Med Sci Res* 1999;27:29-32
3. Máttar S, Vasquez E. Enteropathogenic *E. coli* isolated in Bogotá from children with diarrhoea: serotypes and drug resistance. *Med Sci Res* 1997;25:615-617
4. Mattar S, Mora A, Bernal N. Prevalencia de *E. coli* 0157:H7 en una población pediátrica de Bogotá, D.C., con gastroenteritis aguda. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997;15:364-8
5. Máttar S. Investigación epidemiológica sobre la prevalencia de *E. coli* 0157:H7 en humanos, bovinos y productos cárnicos en Bogotá. *Enferm Infecc y Microbiol (México)* 1998;18:45-50
6. Toma C, Lu Y, Higa N, Nakasane N, Chimen I, Baschkier A, Rivas M, Iwanaga M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrhoeagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2003;41:2669-71
7. Streinsland M, Valentiner-Branth P, Perch M, Dias F, Fischer T, Aaby P, Molback K, Somerfelt H. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infections and diarrhoea in a cohort of young children in Guinea-Bissau. *J Infect Dis* 2002;186:17-40-47
8. Oyoto BA, Subekti D, Tjanadi P, Machpud N, Komalarini S, Stiawan B, Simanjutak C, Punjabi N, Corwin AL, Wasfy M, Campbell JR, Lesmana M. Enteropathogens associated with acute diarrhoea in FEMS *Immunol Med Microbiol* 2002;34:139-46

9. Nataro J, Kaper J. Diarrheagenic *E. Coli*. *Clin Microbiol Reviews* 1998;11:142-201
10. Su Ch Brandt L. *Escherichia coli* 0157:H7 infection in human. *Ann Intern Med* 1995;126:698-714
11. Rowe P M Erradicating *Escherichia coli* 0157:H7. *Lancet* 1995;345:1-3
12. Máttar S, E. Vasquez. Emerging infectious caused by *Escherichia coli* 0157 :H7 in Bogotá [letter]. *Emerg Infect Dis* 1998;4:11-12.
13. Diaz ML, Mattar S, Chalá MS. Molecular characterisation of *Salmonella* entérica isolated from children with infectious diarrhoea in Bogotá, D.C., Bogotá. *Med Sci Res* 1998;711-4
14. Tenover FC, Arbeit R, Richard V, Mickelsen P, Murray B, Persing H. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9
15. Gouveia S, Proctor M E, Lee M S, Luchansky J B, Kaspar C W. Genomic Comparisons and Shiga Toxin Production among *Escherichia coli* 0157:H7 isolates from a Day Care Center Outbreak and Sporadic Cases in Southeastern Wisconsin. *J Clin Microbiol* 1998;36:727-733
16. Rios M, Prado V, Trucksis M, Arellano A, Borie C, Alexandre M Fica A, Levine M. Clonal diversity of Chilean isolates of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. *J Clin Microbiol* 1999;37:778-81
17. Davis M, Hancock D, Besser T, Call D. Evaluation of pulse-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* 0157:H7. *J Clin Microbiol* 2003;41:1843-9
18. Allison L, Carter P, Thomson-Carter M. Characterization of a recurrent clonal type of *Escherichia coli* 0157:H7 causing major outbreaks of infection in Scotland. *J Clin Microbiol* 2001;38:1632-5
19. Izumiya H, Terajima J, Wada A, Inagaki Y, Itoh KI, Tamura K, Watanabe H. Molecular typing of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 isolates in Japan by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1997;35:1675-80
20. Krause U, Thomson Carter F M, Pennington T H. DNA Fingerprinting of *Escherichia coli* 0157:H7 Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1996;34:959-61
21. Meng J, Zhao S, Doyle M P. Molecular Characterization of *Escherichia coli* 0157:H7 isolates by Pulsed Field Gel electrophoresis and plasmid DNA analysis. *J Med Microbiol* 1995;42:258-63
22. Liebana E, Smith R, Lindsay E, McLaren I, Cassar C, Clifton-Hadley F, Paiba G. Genetic diversity among *Escherichia coli* 0157 H :7 isolates from bovines living in farms in England and Wales. *J Clin Microbiol*: 2003;41:3857-60
23. Welinder-Olsson C, Badenfors M, Kjellin E, Kaijser B. Genetic profiling of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains in relation to clonality and clinical signs of infection. *J Clin Microbiol* 2002;40:959-64