

[原 著]

下痢症患者から分離された下痢原性大腸菌の各種病原因子の保有状況について

磯崎将博¹⁾・小林 治²⁾・星子文香¹⁾・津嶋かおり¹⁾

金子 優¹⁾・松下久美子¹⁾・北川真喜³⁾・江成 博⁴⁾

¹⁾ 天草郡市医師会立天草地域医療センター検査部

²⁾ 七尾市公立能登総合病院臨床検査部

³⁾ 極東製薬工業株式会社製品開発部

⁴⁾ 岐阜大学生命科学総合研究支援センター嫌気性菌研究分野

(平成 25 年 12 月 9 日受付, 平成 27 年 8 月 29 日受理)

1996 年から 2012 年の間に, 下痢症患者より分離・同定した大腸菌の保存株 161 株を対象に各種病原因子の保有状況を調査した。PCR 法により EHEC 81 株, EPEC 12 株, EAaggEC 5 株, ETEC 3 株, その他大腸菌 60 株に分類された。EHEC 81 株では *eae* が 74 株 (91%), *hlyA* が 80 株 (99%), *astA* が 7 株 (9%) から検出された。EPEC 12 株では *hlyA* と *astA* が 1 株ずつ, ETEC 3 株では *astA* が 1 株から検出された。その他大腸菌 60 株で病原因子を保有していたものは, *astA* 保有のわずか 2 株 (3%) のみであった。血清型は, EHEC では O157 や O26 などの主要血清型以外にも稀な血清型や血清型別不能株も含まれていた。またその他大腸菌の中にはこれまで EPEC として報告されてきた血清型が数多く含まれていた。したがって, 従来法はある程度の精度を有する確立された検査法ではあるものの, 稀な血清型や血清型別不能株の見逃しや, 非病原性株を病原性株として報告してしまう可能性など, 限界のある検査法といえる。よって, 今後は血清型別を前提とした分類法に代わり, PCR 法を用いた下痢原性大腸菌検査法を採用する必要があると考える。

Key words: 下痢原性大腸菌, 病原因子, PCR, 血清型別試験

序 文

大腸菌はヒトの腸管の常在菌のひとつであるが, 大腸菌の中にはヒトや動物に対して下痢を引き起こすものが存在する。現在, 下痢原性大腸菌はその病原機序の違いにより, 腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC), 毒素原生大腸菌 (enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), 腸管侵入性大腸菌 (enteroinvasive *E. coli*, EIEC), 腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC), 腸管凝集附着性大腸菌 (entero-

aggregative *E. coli*, EAaggEC) の 5 つに分類¹⁾されている。これまでの病原性大腸菌のカテゴリー分類には, 1944 年に Kaufmann によって提唱された血清型による分類²⁾が使用されてきた。しかし, 下痢原性大腸菌の中でも特に O157 や O26 など, EHEC の中でも分離頻度が高い特定の O 群のみが対象となってきたため, 病原性があるにも拘らず検査対象外の O 群であるため報告されなかったものや, 逆に特定の O 群として報告されたものの中には, 実際には病原因子をもたないものも含まれていたなど, 血清型別を前提とした検査法の問題が指摘されてきた。このような状況を踏まえ, 2012 年 1 月に国立感染症研究所および地研で組織される衛生微生物技術協議会等により下痢原性大腸菌分類の見直し³⁾が行なわれた。ETEC, EIEC および EHEC の判定方法については従来と変更はなかったが, EPEC の判定についてはこれまで血清型で判定していたものを *eae* を指標とすることとなり,

著者連絡先: (〒863-0046) 熊本県天草市亀場町食場 854-1
一般社団法人天草郡市医師会立天草地域医療センター検査部
磯崎将博
TEL: 0969-24-4111 (内線 164)
FAX: 0969-23-4496
E-mail: misozaki@outlook.com

表1. プライマーの塩基配列と増幅サイズ

Target gene	Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>invE</i>	I-1	ATA TCT CTA TTT CCA ATC GCG T	379
	I-51	GGC GAG AAA TTA TAT CCC G	
<i>stx1</i>	mMK1_1	GAA TTT ACC TTA GAC TTC TCG AC	234
	mMK1_2	TGT CAC ATA TAA ATT ATT TCG TTC	
<i>stx2</i>	mMK2_1	GAG TTT ACG ATA GAC TTT TCG AC	234
	mMK2_2	GGC CAC ATA TAA ATT ATT TTG CTC	
STp	ST1a_as	GGA TTA CAA CAA AGT TCA CAG	179
	ST1a_s	GCA ATT TTT ATT TCT GTA TTA TCT TT	
STh	ST1b_S2	TTT TTC ACC TTT CGC TCA G	179
	ST1b_A1	TTA ATA GCA CCC GGT ACA AG	
LT	LT-11	CCC ACC GGA TCA CCA	123
	LT-2	GTG CTC AGA TTC TGG GTC TC	
<i>eae</i>	mSK1	CCG GCA CAA GCA TAA GC	310
	eaekas_a	TGG CAA AAT GAT CTG CTG	
<i>aggR</i>	aggR_multi_S4	GCG ATA CAT TAA GAC GCC TA	254
	aggR_multi_A4	AAA GAA GCT TAC AGC CGA TA	
<i>astA</i>	EAST0S1	GCC ATC AAC ACA GTA TAT CCG	109
	EAST0AS2	CGC GAG TGA CGG CTT TGT AG	
<i>hlyA</i>	hlyAF	GCA TCA TCA AGC GTA CGT TCC	534
	hlyAR	AAT GAG CCA AGC TGG TTA AGC T	
<i>bfpA</i>	bfpAk_multi_S2	CTA AAA TCA TGA ATA AGA AAT ACG A	394
	bfpAk_multi_A2	GTT GCA AGA CTA ACA CAT GC	

新たなカテゴリーとして *aggR* 陽性の大腸菌を EAggEC とすることが追加された。そこで今回、筆者らが過去に下痢原性大腸菌として分離・報告した大腸菌の保存株を用いて、各種病原因子の保有状況を調査した。すなわち、下痢原性大腸菌のカテゴリー分類に必要な毒素産生遺伝子 (STp, STh, LT, *stx1*, *stx2*) と腸管侵入性遺伝子 (*invE*)、下痢発現の重要な病原因子となる腸管粘膜への付着様式が異なる3種類の付着遺伝子 (*eae*, *aggR*, *bfpA*)、EAggEC が産生する毒素 (EAST1) 産生遺伝子 (*astA*) を標的遺伝子とした。さらに EHEC における腸管溶血素 (エンテロヘモリジン) 産生遺伝子 (*hlyA*) の保有率もあわせて調査した。

材料と方法

1. 材料

対象菌株は 1996 年から 2012 年までに天草地域医療センターおよび公立能登総合病院にて下痢症患者より分離・同定され、血清型別試験にて下痢原性大腸菌と判定されたものと、血清型別不能で毒素産生試験、PCR のいずれかの方法により下痢原性大腸菌と判定された大腸菌と、医療関係施設の保存株を合わせた計 161 株

を対象とした。

2. 下痢原性大腸菌分類の定義

下痢原性大腸菌のカテゴリー分類は、Manual of Clinical Microbiology (10th Ed)⁴⁾と、国立感染症研究所および地研で組織される衛生微生物技術協議会等による見直し³⁾に則って行なった。即ち、*stx1* と *stx2* 両方あるいはどちらかを保有したものを他の病原関連遺伝子の有無に拘らず EHEC とし、*eae* を保有し、かつ、STh, STp, LT, *stx1*, *stx2* をもたないものを EPEC とし、STh, STp および LT を単独あるいは複数保有したものを ETEC とし、*aggR* を保有し、かつ、STh, STp, LT, *stx1*, *stx2* をもたないものを EAggEC とし、*invE* を保有したものを EIEC とした。なお、EHEC, EPEC, ETEC, EAggEC および EIEC のいずれにも該当しないものはその他の大腸菌と定義した。

3. 方法

STp, STh, LT, *stx1*, *stx2*, *invE*, *eae*, *aggR*, *bfpA*, *astA*, *hlyA* の計 11 種類を増幅するプライマー (表1) を用いて PCR を実施した。PCR 装置は Thermal Cycler Dice mini (TaKaRa) を使用した。*eae*, STp, STh, LT, *stx1*, *stx2*, *invE* は平成 22 年度

表2. EHEC の病原因子の保有状況

カテゴリー	血清型	菌株数	病原因子保有数											
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1</i> and <i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>hlyA</i>	STh	STp	LT	<i>invE</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>	<i>bfpA</i>
EHEC	O157	28		8	20	28	28							5
	O111	15	15			15	15							
	O26	14	14			14	14						2	
	O121	4		4		4	4							
	O91	4	4			1	4							
	O103	3	3			3	3							
	O145	2	1	1		2	2							
	O165	2		2		2	2							
	O1	1	1				1							
	O113	1		1			1							
	O128	1			1	1	1							
	O169	1	1			1	1							
	O177	1		1		1	1							
	OUT	4	3		1	2	3							
合計		81	42	17	22	74	80	0	0	0	0	0	7	0

新興再興感染症技術研修遺伝子検査法⁵⁾を参考に Multiplex PCR で検出した。すなわち、5×Go Taq Green Buffer (プロメガ) を 6.5 µl, dNTP Mix を 1 µl, Taq polymerase を 0.1 µl, プライマー (10 µM) を各 0.25 µl, DNA テンプレート (菌液を 100°C で 10 分ボイリングし, 15,000 rpm で 1 分間遠心した上清を用いる) を 3 µl, 滅菌蒸留水を 10.9 µl の計 25 µl の系で実施した。反応条件は, 94°C 5 分の前熱変性後, 94°C 30 秒, 50°C 1 分, 72°C 90 秒を 30 サイクル後, 72°C 10 分の最終伸長反応で行なった。また, *aggR*, *hlyA*, *astA*, *bfpA* の検出には SapphireAmp Fast PCR Master Mix (TaKaRa) を使用し, single PCR で行った。すなわち, Master Mix を 25 µl, プライマー (10 µM) を 1 µl, DNA テンプレートを 5 µl, 滅菌蒸留水を 18 µl の計 50 µl の系で実施した。反応条件は, 98°C 5 秒, 55°C 5 秒, 72°C 10 秒を計 30 サイクルで増幅した。その産物を 2% アガロースで電気泳動後, エチジウムブロマイドで染色し, バンドの有無を確認した。なお, 各遺伝子の陽性コントロールには, 当院所有の保存株 AMC01 (STp, STh 保有), AMC02 (LT 保有), AMC03 (*stx1*, *stx2* 保有), AMC11 (*invE* 保有), AMC21 (*eae* 保有), AMC22 (*aggR* 保有), AMC23 (*bfpA* 保有), AMC31 (*astA* 保有), AMC41 (*hlyA* 保有) を用いた。

4. 血清型別試験

O 抗原型別には病原大腸菌免疫血清 (デンカ生研) を用い, 添付文書に従い実施した。なお, 50 種の O

型血清に凝集の認められなかったものは型別不能 (O antigen untypable; OUT) とした。

結 果

PCR による標的遺伝子の確認により EHEC 81 株, EPEC 12 株, EAggEC 5 株, ETEC 3 株, その他 60 株に分類された。

EHEC 81 株では, 血清型は O157 が最も多く 28 株, 次いで O111 が 15 株, O26 が 14 株, 以下は表 2 に示す通りであった。病原因子の保有状況は, *stx1* 単独保有が 42 株 (52%), *stx2* 単独保有が 17 株 (21%), *stx1* 及び *stx2* を同時に保有していたものは 22 株 (27%) であった。*hlyA* 保有株は 80 株 (99%), *eae* 保有株は 74 株 (91%), *astA* 保有株は 7 株 (9%) であった。

EPEC (*eae* 陽性株) 12 株では, 血清型は O1, O8, O25, O26, O55, O103, O125, O167 がそれぞれ 1 株ずつで, OUT 株が 4 株であった。また, *hlyA* と *astA* 保有株がそれぞれ 1 株ずつであった (表 3)。

EAggEC (*aggR* 陽性株) 5 株では, 血清型は O126 が 3 株, O111 が 2 株で, 5 株全てが *astA* も保有していた (表 4)。

ETEC 3 株では, 血清型は O25, O159, OUT がそれぞれ 1 株ずつで, 保有毒素は LT が 2 株, STh が 1 株であった。STh 保有株は *astA* も保有していた (表 5)。

その他大腸菌 60 株のうち 2 株 (3%) に *astA* 単独

表3. EPEC の病原因子の保有状況

カテゴリー	血清型	菌株数	病原因子保有数											
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1</i> and <i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>hlyA</i>	STh	STp	LT	<i>invE</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>	<i>bfpA</i>
EPEC	O1	1				1								
	O8	1				1								
	O25	1				1								
	O26	1				1	1							
	O55	1				1								
	O103	1				1								
	O125	1				1							1	
	O167	1				1								
	OUT	4				4								
合計		12	0	0	0	12	1	0	0	0	0	0	1	0

表4. EAaggEC の病原因子の保有状況

カテゴリー	血清型	菌株数	病原因子保有数											
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1</i> and <i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>hlyA</i>	STh	STp	LT	<i>invE</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>	<i>bfpA</i>
EAaggEC	O126	3										3	3	
	O111	2										2	2	
合計		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0

表5. ETEC の病原因子の保有状況

カテゴリー	血清型	菌株数	病原因子保有数											
			<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>stx1</i> and <i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>hlyA</i>	STh	STp	LT	<i>invE</i>	<i>aggR</i>	<i>astA</i>	<i>bfpA</i>
ETEC	O25	1											1	
	O159	1											1	
	OUT	1							1					1
合計		3	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	1	0

保有が確認されたが、残りの58株(97%)はいずれの病原因子も保有していなかった。なお今回対象とした161株からは、EIECおよび*bfpA*保有株は1例も確認されなかった。

考 察

腸管出血性大腸菌感染症に関する世界で最初の報告は、1982年の米国ミシガン州とオレゴン州で発生したハンバーガーを原因とするO157:H7集団感染である⁶⁾。日本においては1990年に埼玉県の子供園で井戸水汚染による集団感染が発生し、1996年には全国的な発生が確認され社会問題となった⁷⁾。以降、腸管出血性大腸菌の中でもとりわけO157については多くの医療機関でも積極的に検査が実施されるようになった。一方、O157以外のEHECとEHEC以外の下痢

原性大腸菌については、検査で見落とされることが多く、さらには非病原性大腸菌が病原性大腸菌として誤って報告されてきた実態があることから、筆者らは今回の調査を実施するに至った。

調査したEHEC 81株のうち、74株(91%)に*eae*の保有が確認され、EHECの感染初期における下痢症発現にはA/E lesionの形成が関与しているとのNataroらの報告⁸⁾と一致する結果となった。また、*hlyA*の保有株も80株(99%)と高率であったことはBeutinらの報告⁹⁾とも一致していることから、エンテロヘモリジン(E-hly)産生性を指標とした腸管出血性大腸菌検索法の有効性を示している。さらに血清型は13種類と多岐にわたり、OUT株も4株(5%)分離されたことから、O157、O26、O111などのような分離頻度が高い特定の血清型のみを指標とする血清型

別を前提とした従来法では、稀な血清型や OUT 株を見逃す可能性があること示唆される。一方で、2011年にドイツを中心にヨーロッパで大流行した EHEC と EAggEC の両方の性状を併せ持った O104:H4 は、*eae* および *hlyA* のどちらも保有していなかったことがわかっており¹⁰、E-hly 産生性を指標としても検出しない株もわずかながら存在するという事は認識しておくべきである。

EPEC の病原性にはインチミン (*eae* 遺伝子産物) と bundle-forming pilus (BFP) と呼ばれる付着線毛が関与することが知られている。付着線毛を有する EPEC は腸管上皮細胞において微絨毛の脱落と細胞骨格因子の再編成によって特徴付けられる A/E lesion を形成することで下痢症を発現すると考えられている¹¹が、本検討で分離された EPEC12 株のうち *bfpA* を保有しているものは全く検出されなかった。*bfpA* については今後も継続して検討し、病原性との関連を調査する必要がある。

Infectious Agents Surveillance Report (IASR) の報告¹²では、EHEC 以外の下痢原性大腸菌の中で ETEC が事例数・患者数ともに最も多いとしているが、本検討ではわずか3株の分離に止まった。また、IASR が2012年に改訂した下痢原性大腸菌のカテゴリー分類に新たに追加された EAggEC について、本検討では O111 の2株、O126 の3株の計5株のみであったが、過去には海外渡航後の集団下痢症事例¹³も報告されており、下痢原性大腸菌のカテゴリーに追加されたことで今後、さらに報告数が増加してくることが考えられる。

その他大腸菌として分類された60株では、12種類の血清型が確認された。これらの血清型の中には、IASR において2011年までに採用されていた分類基準で EPEC として報告されていた O1 や O18 も数多く含まれており、O1 や O18 は病原因子を持たないものが多いとの IASR の報告¹⁴に合致する結果であり、血清型と病原性との関連性は薄いものと考えられた。また今回、*astA* 単独保有大腸菌が2株分離された。*astA* の病原学的意義については現在も確定されていないが、近年では *astA* 単独保有大腸菌が原因と考えられた集団下痢症が報告¹⁵されており、既知の病原遺伝子の中で *astA* のみを保有する大腸菌でもヒトに対して下痢症を起こす可能性を示唆している。筆者らは、これまで *astA* 単独保有株については臨床へ報告することはなかったが、同一事例で複数名から分離された場合には、原因菌の可能性の一つとして報告すべきではないかと考えている。

筆者らは、2012年5月から2012年12月までの8ヶ月間に下痢症患者から分離・同定された大腸菌について、本検討と同じ手法を用いて病原因子の保有状況を調査した。その結果、市販の病原大腸菌免疫血清に凝集し、かつ、何らかの病原因子を保有していたものは70株中12株(17%)であった。同様に Nishikawa らは229株中40株(17%)、Tamaki らは1130株中263株(23%)、Yang らは137株中15株(11%)と報告^{16)~18)}している。つまり、たとえ何らかの血清型に凝集したとしても、真の下痢原性大腸菌はそのなかの11~23%程度にすぎないということである。血清型別を前提とした従来法を用いる場合には、このことを十分理解した上で、検査・報告すべきである。

今回、過去に病原性大腸菌として報告した保存株を用いて病原因子の保有状況を調査し、血清型別分類と病原因子の関連性について検討を行った。その結果、血清型別を前提とした従来法もある程度の精度を有する確立された検査法ではあるものの、稀な血清型や OUT 株の見逃しや、非病原性株を病原性株と報告してしまう可能性があるなど、限界がある検査法であることも示された。よって、今後は血清型別を前提とした分類法から、PCR 法などによる直接、病原因子を検出する方法へと切り替えていく必要があると考える。

なお、本論文の要旨は第24回日本臨床微生物学会総会(2013年 横浜)において発表し、座長および編集委員推薦を受けたものである。

謝辞：下痢原性大腸菌の PCR 検査を始めるにあたり、ご指導賜りました宮崎市郡医師会検査センター細菌検査室の皆様ならびに宮崎県衛生環境研究所微生物部の皆様に深謝致します。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) 渡邊治雄. 1996. 腸管出血性大腸菌 O157:H7 による食中毒とその予防. 食品衛生研究 46 (8): 7-16.
- 2) Kaufmann, F. 1947. The serology of the coli group. J. Immunol 57: 71-100.
- 3) 伊藤健一郎, 伊豫田淳, 八柳 潤, 他. 2012. 下痢原性大腸菌の分類の見直しについて. IASR 33 (1): 5-7.
- 4) Manual of Clinical Microbiology (10th Ed) Vol 1. p. 603-613
- 5) 平成22年度新興再興感染症技術研修遺伝子検査法(国立保健医療科学院)
- 6) Riley, LW, RS Remis, SD Helgeson, et al. 1983. Hem-

- orrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 308: 681-685.
- 7) 城 宏輔. 1991. 埼玉県某幼稚園で流行した *E. coli* O157:H7 による出血性大腸炎. *臨床と微生物* 18: 457-465.
 - 8) Nataro, J.P., J.B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol. Rev.* 11: 142-201.
 - 9) Beutin., L, M.A. Montenegro, I. Ørskov, et al. 1989. Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2559-2564.
 - 10) Robert Koch Institute. 2011. Report: Final presentation and evaluation of epidemiological findings in the EHEC O104: H4 outbreak, Germany.
 - 11) 坂崎利一, 他. 2000. 新訂食水系感染症と細菌性食中毒. p.237-244, 中央法規出版, 東京.
 - 12) 伊藤健一郎, 伊豫田淳, 八柳 潤, 他. 2012. 下痢原性大腸菌 2011 年現在. *IASR* 33 (1): 1-3.
 - 13) 中島 洋, 山崎 貢, 狩屋英明, 他. 2005. 腸管凝集性大腸菌 (enteroaggregative *Escherichia coli* : EA_gEC) の海外旅行者集団下痢症からの分離. *感染症誌* 79: 314-321.
 - 14) 伊藤健一郎, 伊豫田淳, 八柳 潤, 他. 2012. 病原大腸菌血清型と「他の下痢原性大腸菌」の検出状況. 2001 年~2011 年 8 月. *IASR* 33 (1): 3-4.
 - 15) 石村勝之, 毛利好江, 橋渡佳子, 他. 2002. 腸管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子 (*astA*) 保有大腸菌が原因と考えられた集団下痢症—広島市. *IASR* 23: 229-230.
 - 16) Nishikawa, Y, Z Zhou, A Hase, et al. 2002. Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000. prevalence of enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E. coli*. *Jpn J Infect Dis* 55: 183-190.
 - 17) Tamaki, Y, H Narimatsu, T Miyazato, et al. 2005. The relationship between O-antigens and pathogenic genes of diarrhea-associated *Escherichia coli*. *Jpn J Infect Dis* 58: 65-69.
 - 18) Yang, JR, FT Wu, JL Tsai, et al. 2007. Comparison between O serotyping method and multiplex real-time PCR to identify diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan. *J Clin Microbiol* 45: 3620-3625.

Analytical study of virulence genes of *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea

Masahiro Isozaki¹⁾, Osamu Kobayashi²⁾, Fumika Hoshiko¹⁾, Kaori Tsushima¹⁾, Yu Kaneko¹⁾,
Kumiko Matsushita¹⁾, Maki Kitagawa³⁾, Hiroshi Enari⁴⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Amakusa Medical Center

²⁾Department of Clinical Laboratory, Noto General Hospital

³⁾Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.

⁴⁾Division of Anaerobe Research, Life Science Research Center, Gifu University

Analytical study of virulence genes have been carried out on 161 strains of *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea in 1996-2011.

Possessing virulence gene on *E. coli* isolated from patients with diarrhea were detected as follows, *stx1*; 26% (42/161), *stx2*; 11% (17/161), *stx1* and *stx2*; 14% (22/161), *hlyA*; 50% (81/161), *eae*; 53% (86/161), *astA*; 10% (16/161), *aggR*; 3% (5/161), *LT*; 1% (2/161), *STh*; 0.6 % (1/161), *STp*; 0% (0/161), *bfpA*; 0% (0/161), *invE*; 0% (0/161), *hlyA* in *stx* (*stx1* and/or *stx2*) possessing strains; 99% (80/81), *eae* in *stx* (*stx1* and/or *stx2*) possessing strains; 91% (74/81), *astA* in possessing *stx* (*stx1* and/or *stx2*) strains; 9% (7/81).