Research Paper

Evaluation of the presence of stx1 and stx2 genes in *Escherichia albertii* identified in patients with diarrhea and urinary tract infections in Kermanshah

Azadeh Foroughi[1]*, Saeed Bahari[2], Azizollah Ebrahimi Kahrizsangi[2], Pouya Pournaghi[3]

1. Department of Basic Science & Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran
2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
3. Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

*** Corresponding author e-mail: a.forougih@razi.ac.ir**

Citation: Foroughi A, Bahari S, Ebrahimi Kahrizsangi A, Pournaghi P. Evaluation of the presence of stx1 and stx2 genes in Escherichia albertii identified in patients with diarrhea and urinary tract infections in Kermanshah. Daneshvar Medicine 2022; 30(3):34-41.
doi: 10.22070/DANESHMED.2022.15988.1187

Received: 31 May 2022
Last revised: 13 Aug 2022
Accepted: 21 Aug 2022

Abstract

Background and Objective: Since stx1 and stx2 genes are plasmids and can be transferred between strains and species of Escherichia, therefore Escherichia that has one or both of these genes will be verotoxigenic. This research was conducted for the first time in Iran with the aim of investigating the presence of stx1 and stx2 genes in *Escherichia alberti* identified from patients with diarrhea and urinary infections in Kermanshah city.

Materials and Methods: 60 urine samples and 40 fecal samples that were identified in *Escherichia coli* clinical laboratories were re-investigated in terms of phenotypic and biochemical characteristics. Then, by using the specific primers, detection of lysP, mdh genes for E. albertii, uidA gene for E. coli and subsequently stx1, stx2 genes was performed by PCR method.

Results: Phenotypic and biochemical tests indicated that all specimens matched the characteristics of Escherichia coli, but PCR findings showed that six of them belonged to *Escherichia albertii* (6%). The presence of the stx1 gene in one of the six *Escherichia albertii* samples was also demonstrated (16.66%).

Conclusion: The findings of this study showed that Escherichia albertii which is mistakenly diagnosed as Escherichia coli in clinical laboratories, can harbor stx genes and this matter is important in clinical aspects. Therefore, the use of molecular methods can help identify it more accurately.

Keywords: *Escherichia albertii*, stx1, stx2, Urinary tract infection, Gastrointestinal infection

مقاله پژوهشی

بررسی حضور ژن های stx1 و stx2 در سویه‌های *Escherichia albertii* جدا شده از بیماران مبتلا به اسهال و عفونت های ادراری شهرستان کرمانشاه

نویسندگان: آزاده فروغی[1*]، سعید بهاری[2]، عزیزالله ابراهیمی کهریزسنگی[2]، پویا پورنقی[3]

۱- گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۳- گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: آزاده فروغی **Email: : a.forougih@razi.ac.ir**

چکیده

مقدمه و هدف: از آنجا که ژنهای stx1 و stx2 پلاسمیدی می باشند و قابل انتقال بین سویه ها و گونه های اشرشیا هستند، لذا اشرشیایی که واجد یک یا هر دوی این ژنها باشد، وروتوکسیژنیک خواهد بود. این تحقیق برای اولین بار در ایران و با هدف بررسی حضور ژنهای stx1 و stx2 در اشریشیا آلبرتی های شناسایی شده از بیماران مبتلا به اسهال و عفونتهای ادراری در شهر کرمانشاه انجام گرفت.

مواد و روش ها: تعداد ٦٠ نمونه ادراری و٤٠ نمونه مدفوعی که در آزمایشگاه های بالینی اشریشیاکلی شناسایی شده بودند، مجددا از نظر ویژگی های فنوتیپی و بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی، ردیابی دو ژن lysP و mdh برای اشریشیا آلبرتی و ژن uidA برای اشریشیاکلی و متعاقباً ژنهایstx1 و stx2 به روش PCR انجام شد.

نتایج: تست های فنوتیپی و بیوشیمیایی حاکی از مطابقت تمامی نمونه ها با ویژگی های اشریشیاکلی بود، اما یافته های به دست آمده از PCR نشان داد که ٦ مورد از آنها متعلق به گونه اشریشیا آلبرتی است (٦٪). همچنین وجود ژن stx1را در یک نمونه از ٦ نمونه اشریشیا آلبرتی نشان داده شد (١٦/٦٦٪).

نتیجه‌گیری: یافته های این تحقیق نشان داد که اشریشیا آلبرتی که به اشتباه در آزمایشگاه های بالینی به عنوان اشریشیاکلی تشخیص داده می شود می تواند واجد ژن های **stx** باشد که از نظر بالینی حائز اهمیت است. از این رو کاربرد روش های مولکولی می تواند به شناسایی هرچه بیشتر و دقیق تر آن کمک کند.

واژه های کلیدی: اشریشیا آلبرتی، **stx1**، **stx2**، عفونت ادراری، عفونت گوارشی

دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۰
آخرین اصلاح‌ها: ۱۴۰۱/۰۵/۲۲
پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۳۰

مقدمه

تا چندی پیش در جنس اشریشیا شش گونه بنام های: E. Coli، E. fergusonii، E. adecarboxylata، E. vulneris، E. hermanii و E. blattae شناسایی شده بود که در این میان گونه اشریشیا کلی پاتوژن از اهمیت بیشتری برخوردار است (۱،۲). اخیراً گونه دیگری به نام *Escherichia albertii* توسط Huys و همکارانش در ارتباط با بیماری های اسهال در کودکان بنگلادشی معرفی شده است که این گونه قبلاً و برای اولین بار تحت عنوان هافنیا آلوئی آتیپیکال توسط آلبرت در اوایل سال ۱۹۹۰ از نمونه مدفوع کودکان زیر ۵ سال مبتلا به اسهال جداسازی و تشخیص داده شده بود (۴،۳). در ادامه تست های فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی، متمایز بودن این گونه جدید را به اثبات رساندند و در نهایت در سال ۲۰۰۳ این جدایه های جدید توسط آلبرت به عنوان اشریشیا آلبرتی، گونه جدید و هفتمین گونه از جنس اشریشیا معرفی شد (۵،۶). اهمیت بالینی و شیوع اشریشیا آلبرتی تا حدی ناشناخته است که آن را به عدم قابلیت شناسایی جدایه های این باکتری با استفاده از سیستم های شناسایی بیوشیمیایی معمول نسبت داده اند و ممکن است به اشتباه به عنوان شیگلا، اشریشیاکلی و یا هافنیا آلوئی تشخیص داده شود (۷،۸). از طرف دیگر، ژن های stx1 و stx2 (تولیدکننده توکسین های STX1 و STX2) می باشند. از آنجا که این ژن ها پلاسمیدی می باشند قابل انتقال بین سویه ها و گونه های اشرشیا هستند، لذا اشرشیایی که واجد یک یا هر دوی این ژن ها باشد، وروتوکسیژنیک خواهد بود (۹). بنابراین هدف این مطالعه بررسی حضور ژن‌های stx1 و stx2 در Escherichia albertii های شناسایی شده از نمونه های بالینی بیماران مبتلا به اسهال و عفونت های ادراری در شهرستان کرمانشاه می باشد. تا آنجایی که نویسندگان اطلاع دارند، چنین مطالعه ای در ایران صورت نگرفته است لذا انجام چنین مطالعه ای در جهت روشن شدن وضعیت حضور ژن های تولیدکننده وروتوکسین در اشرشیا آلبرتی های ایجادکننده عفونت ادراری و فراوانی احتمالی آنها ضروری به نظر می رسید.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع توصیفی-مقطعی است. جامعه مورد مطالعه، کشت های مثبت اشریشیاکلی تایید شده به روش های فنوتیپی و بیوشیمیایی مربوط به بیماران با عفونت های گوارشی و ادراری ارجاع شده به آزمایشگاه های تشخیصی شهرستان کرمانشاه بوده است.

جمع آوری نمونه‌ها

تعداد ۱۸۰ نمونه بالینی طی مدت زمان ٦ ماه (از اسفند ماه ۱۳۹٦ الی مرداد ماه ۱۳۹۷) جمع آوری شد که پس از انجام آزمایشات مربوطه، تعداد ۱۰۰ نمونه از نظر اشریشیاکلی مثبت و برای انجام مطالعه حاضر انتخاب شدند. از این تعداد ٦۰ نمونه ادرار و ٤۰ نمونه مدفوع بود. نمونه ها تحت شرایط استریل و در سریعترین زمان ممکن به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی منتقل شد.

کشت نمونه ها

نمونه ها مجدداً در آزمایشگاه در محیط های کشت انتخابی و افتراقی مانند TSI، SIM، MR-VP، سیمون سیترات، اوره آز، لایزین و فنیل آلانین (QUELAB، کانادا) کشت داده شدند.

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

پس از استخراج DNA به روش فنل- کلروفرم- ایزوآمیل (Sigma-Aldrich، آمریکا)، نمونه ها یک شب در دمای ٤ درجه سانتی گراد گذاشته شدند. سپس تا زمان انجام آزمایش PCR در فریزر۲۰- نگهداری شدند (۱۰). جهت انجام PCR ابتدا نمونه‌های DNA که در غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شده بودند با استفاده از ۵ آغازگر انتخاب شده مورد استفاده و تکثیر قرار گرفتند.

آزمون PCR بر روی کلیه کشت های مثبت از نظر اشریشیاکلی، جهت شناسایی ژن uidA به منظور تایید اشریشیاکلی (۱۰) و ژن های mhd و lysp جهت تشخیص اشریشیا آلبرتی (۱۱) انجام شد. همچنین از پرایمرهای مربوطه جهت تشخیص ژن های حدت stx1 و

stx2 نیز در نمونه های احتمالی اشریشیا آلبرتی استفاده شد (۹). کلیه مواد و پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه از شرکت سیناژن (تهران، ایران) تهیه شد. توالی پرایمرها و اندازه محصولات آنها در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

ژن	توالی پرایمر (۳'-۵')	اندازه محصول (bp)	منبع
uidA	GCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGG GTTGCCCGCTTCGAAACCAATGCCT	۵۰۳	۱۰
mdh	CTG GAAGGC GCA GAT GTG GTA CTG ATT CTT GCT GAA CCA GAT TCT TCA CAA TAC CG	۱۱۵	۱۱
lysp	GGG CGC TGC TTT CAT ATA TTC TT TCC AGA TCC AAC CGG GAG TAT CAG GA	۲۵۲	۱۱
stx1	CAGTTAATTTGGTGGCGAAG CTGCTAATAGTTCTGCGAATC	۸۴۹	۹
stx2	CCTCGGTATCCTATTCCCGG GGATGCATCTCTGGTCATTG	۴۷۸	۹

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Bio-Rad، آمریکا) در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد که اجزای هر واکنش در جدول ۲ آمده است. مراحل و دماهای چرخه حرارتی نیز در جدول ۳ بیان شده است (۱۲،۱۱).

جدول ۲. اجزاء واکنش بهینه سازی شده PCR

اجزا یک نمونه	حجم
آب دوبار تقطیر	۱۲/۶ میکرولیتر
بافر **PCR** (۱۰**x**)	۲ میکرولیتر
کلرید منیزیم (۵۰ میلی مولار)	۱/۵ میکرولیتر
مخلوط نوکلئوتیدی (۱۰ میلی مولار)	۰/۴ میکرولیتر
آغازگر	۱/۲ میکرولیتر (از هر کدام)
Taq پلیمراز (۵ واحد در میکرولیتر)	۰/۳ میکرولیتر
DNA (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر)	۲ میکرولیتر
جمع	**۲۰ میکرولیتر**

جدول ۳. مراحل و دماهای چرخه حرارتی PCR

تعداد چرخه	زمان	درجه حرارت	مرحله
۱	۴ دقیقه	۹۵°C	واسرشت سازی (تک رشته‌ای شدن) اولیه
۴۰	۳۰ ثانیه	۹۵°C	واسرشت سازی
	۳۰ ثانیه	۶۷، ۶۵ و ۶۴ برای آغازگرهای مختلف	اتصال آغازگر به DNA تک رشته ای
	۶۰ ثانیه	۷۲°C	بسط (توسعه) آغازگر
۱	۷ دقیقه	۷۲°C	بسط (توسعه) نهایی

الکتروفورز روی ژل

جهت انجام الکتروفورز از ژل آگارز ۲ درصد با بافر واکنش TBE 5/0% و با ولتاژ ۱۲۰–۹۰ و به مدت ۲–۱/۵ ساعت استفاده شد (فناوران سهند آذر، ایران). سپس از دستگاه ژل داک (فرژن، ایران) جهت نمایان شده باندها استفاده شد.

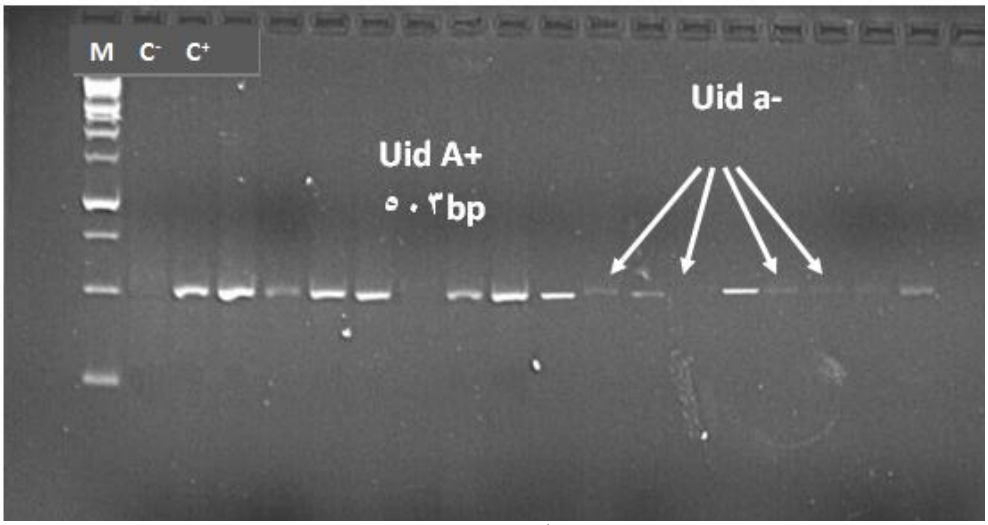
نتایج

نتایج حاصل از تست های بیوشیمیایی

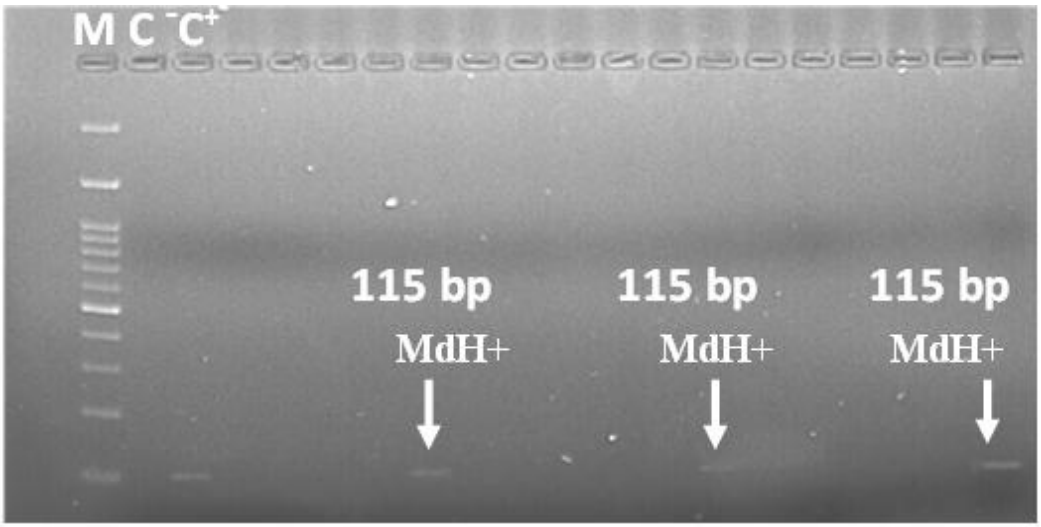
با انجام تست های بیوشیمیایی بر روی ۱۰۰ نمونه ایکلای جداشده از نمونه های ادراری و مدفوعی، مجدداً هر ۱۰۰ نمونه از نظر ایکلای تأیید شدند.

نتایج حاصل از PCR ژن های uidA، mdh، lysP، stx1 و stx2

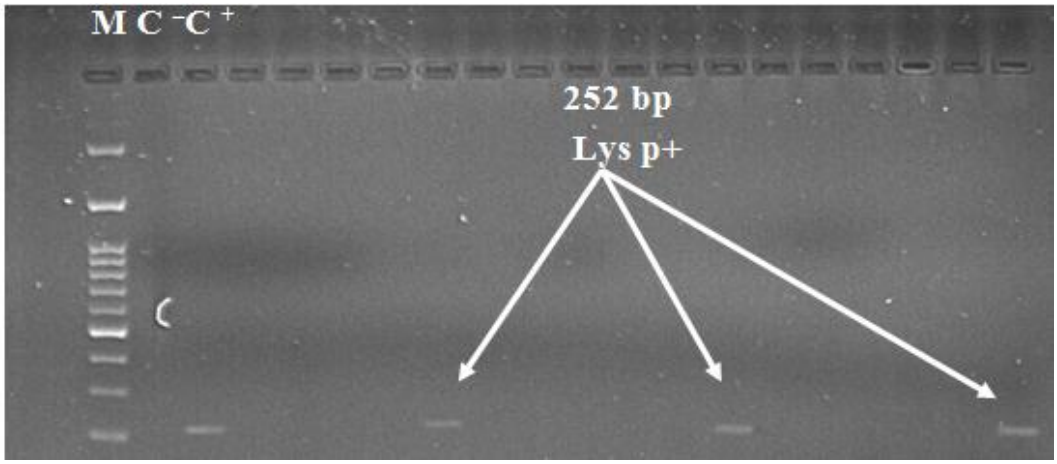
نتایج به دست آمده از واکنش زنجیره ای پلیمراز نشان داد که از مجموع ۱۰۰ نمونه، ۹٤ نمونه (۹٤٪) از نظر ژن uidA که با پرایمر انتخاب شده، اختصاصی اشریشیاکلی است مثبت هستند (تصویر۱) و ٦ نمونه (٦٪) از نظر دو ژن اختصاصی اشریشیا آلبرتی (mdh و lysP) مثبت هستند (تصویر ۲). از طرفی این ٦ جدایه برای ژن uidA منفی بودند (تصویر۳). از این ٦ نمونه یک نمونه مدفوعی و ۵ نمونه ادراری بود. همچنین در یک نمونه ادراری، ژن stx1 مشاهده شد (۱٦/٦٦٪) (تصویر ٤).



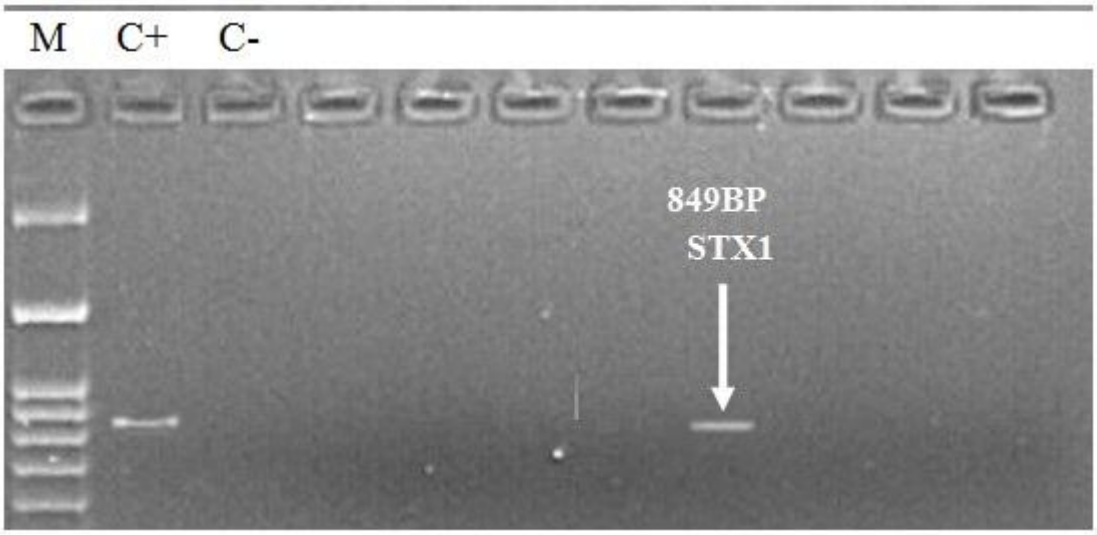
تصویر ۱. الکتروفورز محصولات **PCR** مربوط به ژن ***uidA*** بر روی ژل آگارز ۲٪؛ **M: Ladder 250 bp** ، **C+:** کنترل مثبت و **C-**: کنترل منفی



تصویر ۲. الکتروفورز محصولات **PCR** مربوط به ژن ***mdh*** بر روی ژل آگارز ۲٪؛ **M: Laddre 100 bp**،**C+**: کنترل مثبت و **C-**: کنترل منفی



تصویر ۳. الکتروفورز محصولات **PCR** مربوط به ژن ***lysP*** بر روی ژل آگارز ۲٪؛ **M: Laddre 100 bp**، **C+**: کنترل مثبت و **C-**: کنترل منفی



تصویر ٤. الکتروفورز محصولات **PCR** مربوط به ژن ***stx1*** بر روی ژل آگارز ۲٪؛ **M: Laddre 50-1500 bp**، **C+**: کنترل مثبت و **C-**: کنترل منفی

بحث

تحقیقات و مطالعات اندک در مورد فراوانی ژنهای stx1 وstx2 در اشیرشیا آلبرتی انجام شده است. اولین گزارش از بیان شیگاتوکسین در اشریشیا آلبرتی در سال ۲۰۱۲ منتشر شد. در این گزارش از مجموع ۲٦ سویه اشریشیا آلبرتی، وجود آلل stx2f در دو سویه مثبت گردید (یک مورد از فرد علامت دار و یک مورد از پرنده سالم) (۱۳). در ادامه مطالعات دیگری نیز وجود ژنstx2f را در اشریشیا آلبرتی ابراز داشتند که در مجموع، این موارد پتانسیل سویه های اشریشیا آلبرتی را در جهت ایجاد بیماری های جدی مورد توجه قرار می دهد (۱٦-۱۳). تا به امروز اکثر جدایه های اشریشیا آلبرتی بیان کننده شیگاتوکسین حاوی تحت تیپ stx2f بوده اند (۱۷). حضور و بیان stx2a تنها در یک سویه اشریشیا آلبرتی جدا شده از یک بیمار ٤۸ ساله با علامت اسهال خونی، گزارش شده است که این ویژگی افزایش پتانسیل بیماریزایی اشریشیا آلبرتی را موجب گردیده است (۱۷). باکتری دارنده stx2a بسیار بیماریزا بوده و تهدید کننده حیات است چرا که موجب اسهال خونی شده و القاکننده سندرم اورمیک همولیتیک (HUS) می باشد، این در حالیست که افراد عفونی شده با اشریشیا آلبرتی بیان کننده stx2f دارای علائم خفیف‌تری از جمله اسهال آبکی، درد شکمی، سردرد و تب خفیف بوده‌اند (۱۹،۱۸). هرچند گزارشات اپیدمیولوژیک و مطالعات ژنوتایپینگ اندکی در خصوص تحت تیپ های توکسین در اشریشیا آلبرتی وجود دارد، اما از طرف دیگر در مواردی چون کنترل های تنظیمی

ژن Stx و یا مشخصات عملکردی و بیوشیمیایی توکسین در اشریشیا آلبرتی اطلاعاتی در دست نیست (۱۱، ۵،٦). Hinenoya در سال ۲۰۱۱ در راستای تکمیل تحقیقات خود، ۲۰ سویه اشریشیا کلی آتیپیک جدا شده از اسهال کودکان را مجدداً مورد آزمایش قرار دادند که تکثیر و توالی یابی ژن های cdt و eae، تمامی سویه ها را به عنوان اشریشیا آلبرتی تشخیص داد و ژن stx2 در هیچ یک از سویه ها محرز نشد (۱۷). Hinenoya و همکاران در تحقیقی در سال ۲۰۱۷ در ژاپن سویه ای از اشریشیا آلبرتی تولیدکننده سه توکسین مختلف را از یک کودک مبتلا به اسهال جداسازی و به تعیین مشخصات آن پرداختند و این تحقیق را به عنوان اولین گزارش از فعالیت زیستی توکسین‌های CDT-I،CDT-II و Stx2f در اشریشیا آلبرتی معرفی کردند. نمونه مدفوع و سواب رکتال از یک کودک حدودا یک ساله، مبتلا به اسهال جمع آوری گردید. تست‌های معمول جهت شناسایی عوامل ویروسی و باکتریایی احتمالی انجام گرفت. در تشخیص اولیه با ستفاده از تست های بیوشیمیایی معمول عامل بیماری اشریشیا کلی آتیپیک معرفی گردید. تشخیص گونه و پاتوتیپ باکتری از طریق ردیابی ژنهای اختصاصی به کمک PCR دنبال شد. جمع بندی نتایج حاصله نشان داد که باکتری جدا شده از کودک مبتلا به اسهال، اشریشیا آلبرتی سویه P2660 بوده و ژن های cdt-I، cdt-II و stx2f در آن شناسایی شد. از طرف دیگر مشخص گردید که محصولات تولیدی این سه ژن از نظر زیستی دارای اثرات فعالی بر رده های سلولی پستانداران است، بیانگر اینکه این سویه از اشریشیا آلبرتی احتمالاً بیماریزایی بالایی داشته باشد. با این حال هنوز چگونگی دخیل بودن این سه ژن در بیماریزایی اشریشیا آلبرتی ناشناخته مانده است. هیچ یک از فاکتورهای حدت شناخته شده عامل اسهال در این بیمار جداسازی نگردید، بنابراین می توان گفت که اشریشیا آلبرتی ممکن است بیماریزای منحصر بفرد در این بیمار باشد. این مطالعه برای اولین بار تولید stx2f را از یک جدایه اشریشیا آلبرتی با استفاده از آنتی سرم اختصاصی stx2f از کودک مبتلا به اسهال به اثبات رساند. نویسنده با تکیه بر یافته های خود معتقد است بررسی مداوم مبتلایان به اسهال از نظر وجود اشریشیا آلبرتی بیماریزا دارای اهمیت است و توسعه روش های مولکولی در تشخیص اپیدمیولوژیک این باکتری می تواند در جهت شناسایی سویه های بیماریزا و ژن های حدت آن کمک کننده باشد (۱۸). از محدودیت های مطالعه حاضر، می توان به تعداد کم نمونه های مورد بررسی و نمونه های مثبت اشاره کرد که امکان برآورد فراوانی این باکتری و ژن های مذکور را فراهم نکرد.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر اولین گزارش از فراوانی ژن های stx1 و stx2 در ایران است و نتایج حاصل، اهمیت اشریشیا آلبرتی را به عنوان یکی از عوامل مسبب احتمالی در موارد اسهال و عفونت ادراری بیماران در شهرستان کرمانشاه نشان می دهد و با توجه به شناسایی ژن stx1 در نمونه‌ها، اهمیت آن صد چندان می شود. چنانچه اشریشیا آلبرتی می تواند علاوه بر عفونت ادراری، عامل نوع شدید از گاستروانتریت همراه با اسهال خونی هم باشد. بنابراین بررسی شیوع این باکتری و بیماری های ایجاد شده توسط آن و نیز مطالعه فاکتورهای حدت و مقاومت های آنتی بیوتیکی آن به صورت جامع در ایران ضروری به نظر می رسد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از جناب آقای مهندس شیروانی بابت زحمات بی شائبه شان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد .

منابع

1. Momtaz H, Banisharif G, Banisharif F, Banitalebi S. Genotyping of *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections in Chaharmahal and Bakhtiari province. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences 2018;61:940-9.
2. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Dehkordi FS, Ranjbar R, Sarshar M, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors

and antimicrobial resistance properties. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials 2013;12:1-12.
3. Devi CA, Ranjani A, Dhanasekaran D, Thajuddin N, Ramanidevi T. Surveillance of multidrug resistant bacteria pathogens from female infertility cases. African Journal of Biotechnology 2013;12:4129-34.
4. Prabha V, Aanam TD, Kaur S. Bacteriological study of the cervix of females suffering from unexplained infertility. American Journal of Biomedical Science and Research 2011;3:84-9.
5. Abbott SL, O'Connor J, Robin T, Zimmer BL, Janda JM. Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species, Escherichia albertii. Journal of Clinical Microbiology 2003;41:4852-4.
6. Huys G, Cnockaert M, Janda JM, Swings J. Escherichia albertii sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2003;53:807-10.
7. Lasaro M, Rodrigues J, Mathias-Santos C, Guth B, Balan A, Sbrogio-Almeida M, et al. Genetic diversity of heat-labile toxin expressed by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. Journal of Bacteriology 2008;190:2400-10.
8. Welch RA. The genus *Escherichia*. The prokaryotes: Springer 2006; 60-71.
9. Nazemi A, Mirinargasi M, Khataminezhad MR, Shokouhi Mostafavi SK, Sharifi SH. Detection of stx1, stx2, LT and ST toxin genes and O157 and H7 antigen genes among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from Iran. African Journal of Microbiology Research 2012;6:867-9.
10. Nimri LF. Escherichia albertii, a newly emerging enteric pathogen with poorly defined properties. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2013;77: 91-5.
11. Hyma KE, Lacher DW, Nelson AM, Bumbaugh AC, Janda JM, Strockbine NA, et al. Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related Shigella boydii strains. Journal of Bacteriology 2005;187:619-28.
12. Gómez-Duarte OG, Arzuza O, Urbina D, Bai J, Guerra J, Montes O, et al. Detection of *Escherichia coli* enteropathogens by multiplex polymerase chain reaction from children's diarrheal stools in two Caribbean–Colombian cities. Foodborne Pathogens and Disease 2010;7:199-206.
13. Ori E, Takagi E, Andrade T, Miguel B, Cergole-Novella M, Guth B, et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance. Epidemiology and Infection 2018;147:1-9.
14. Ooka T, Seto K, Kawano K, Kobayashi H, Etoh Y, Ichihara S, et al. Clinical significance of *Escherichia albertii*. Emerging Infectious Diseases 2012;18:488-92.
15. Murakami K, Etoh Y, Tanaka E, Ichihara S, Horikawa K, Kawano K, et al. Shiga toxin 2f-producing *Escherichia albertii* from a symptomatic human. Japanese Journal of Infectious Diseases 2014;67:204-8.
16. Hinenoya A, Yasuda N, Hibino T, Shima A, Nagita A, Tsukamoto T, et al. Isolation and characterization of an *Escherichia albertii* strain producing three different toxins from a child with diarrhea. Japanese Journal of Infectious Diseases 2017;70:252-7.
17. Brandal LT, Tunsj HS, Ranheim TE, Løbersli I, Lange H, Wester AL. Shiga toxin 2a in *Escherichia albertii*. Journal of Clinical Microbiology 2015;53:1454-5.
18. Bhatt S, Egan M, Critelli B, Kouse A, Kalman D, Upreti C. The evasive enemy: insights into the virulence and epidemiology of the emerging attaching and effacing pathogen, *Escherichia albertii*. Infection and Immunity 2019;87:1-15.
19. Siegler RL, Obrig TG, Pysher TJ, Tesh VL, Denkers ND, Taylor FB. Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome. Pediatric Nephrology 2003;18:92-6.