

XÁC ĐỊNH TỶ LỆ NHIỄM VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG KHÁNG SINH CỦA VI KHUẨN *E. COLI* O157:H7 TRÊN TRÂU, BÒ KHỎE MẠNH Ở MỘT SỐ TỈNH NAM TRUNG BỘ

Nguyễn Trọng Hải¹, Đào Hoài Thu¹, Phan Thị Hằng², Hồ Văn Hiệp¹,
Nguyễn Thị Kim Phụng¹, Đỗ Văn Tấn¹, Lê Đình Hải¹, Vũ Khắc Hùng¹

TÓM TẮT

Chúng tôi áp dụng phương pháp phân tách hút bám miễn dịch để kiểm tra tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *E. coli* O157:H7 trên 800 mẫu phân trâu, bò khỏe mạnh thu thập tại 3 tỉnh Phú Yên, Khánh Hòa và Ninh Thuận. Kết quả cho thấy, tỷ lệ nhiễm *E. coli* O157:H7 của trâu, bò ở 3 tỉnh này lần lượt là 2,2%; 3,5% và 4,5%. Tất cả các chủng *E. coli* O157:H7 phân lập đều mang các đặc tính sinh vật, hóa học như các tài liệu đã mô tả. Khi kiểm tra khả năng mẫn cảm của các chủng vi khuẩn *E. coli* O157:H7 phân lập được với 22 loại kháng sinh khác nhau chúng tôi nhận thấy, vi khuẩn *E. coli* O157:H7 mẫn cảm nhất với Amikacin, Cefotacime, Cefepime, Cefoperazone, Gentamicin và Polymycin B (với 100% số chủng *E. coli* mẫn cảm); mẫn cảm thấp nhất với Clindamycin, Erythromycin và Oxacillin (với tỷ lệ kháng thuốc 100%). Tại Việt Nam, đây là nghiên cứu đầu tiên áp dụng kỹ thuật phân lập vi khuẩn *E. coli* O157:H7 đặc hiệu (phương pháp phân tách hút bám miễn dịch – IMS).

Từ khóa: Trâu, bò, *E. coli* O157:H7, Tỷ lệ nhiễm, Kháng kháng sinh

Determination of *E. coli* infection prevalence in apparently healthy cattle in the Center of Vietnam and of antibiotic resistance of this bacterium

Nguyễn Trọng Hải, Đào Hoài Thu, Phan Thị Hằng, Hồ Văn Hiệp,
Nguyễn Thị Kim Phụng, Đỗ Văn Tấn, Lê Đình Hải, Vũ Khắc Hùng

Summary

We have used the technique immune magnetic separation (IMS) to examine the prevalence of *E. coli* O157:H7 infection in 800 samples from apparently healthy cattle kept in 3 provinces of Phu Yen, Khanh Hoa and Ninh Thuan. The results indicated that the *E. coli* O157:H7 infection in the three provinces were 2,2%; 3,5% and 4,5%, respectively. All the *E. coli* O157:H7 isolates owned properties as having been described elsewhere. Examination the antibiotic resistance to 22 different drugs, the *E. coli* O157:H7 were found susceptible to Amikacin, Cefotacime, Cefepime, Cefoperazone, Gentamicin and Polymycin B (100% of the isolates) and resistant to Clindamycin, Erythromycin and Oxacillin (100% of the isolates). In Vietnam, this is the first study using the IMS to isolate the bacterium O157:H7.

Key words: Cattle, *E.coli* O157:H7, Prevalence, Antibiotic resistance,.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *E. coli* O157:H7 là một trong những tác nhân chính gây ra các vụ ngộ độc thực phẩm ở người. Theo thống kê của Bộ Nông nghiệp Mỹ (USDA - U.S. Department of Agriculture), số vụ ngộ độc thực phẩm do vi khuẩn này gây ra đứng thứ 3 sau các nguyên nhân do *Campylobacter* và *Salmonella* (Griffin, 1995). Vi khuẩn *E. coli* O157:H7 thường gây một số hội chứng nguy hiểm ở người như viêm kết tràng xuất huyết (hemorrhagic colitis), urê huyết (hemolytic uremic syndrome). Bệnh do *E. coli* O157:H7 xảy ra ở mọi lứa tuổi, đối với trẻ sơ sinh thường có biểu hiện viêm thận cấp và thiếu máu do xuất huyết và có tỷ lệ chết từ 5 – 10%. Đối

1. Phân viện thú y miền Trung

2. Đại học Nông lâm Huế

với người già có biểu hiện triệu chứng huyết khối (thrombotic thrombocytopenic purpura), tỷ lệ chết có thể lên đến 50% (Su và Brandt, 1995).

Bò được xem là vật mang vi khuẩn *E. coli* O157:H7 gây bệnh cho người với tỷ lệ mang *E. coli* O157:H7 trong đàn khoảng 1,3 – 9,5%. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, một số loại vật nuôi khác như trâu, dê và cừu cũng là vật mang khuẩn và thường thải *E. coli* O157:H7 ra ngoài môi trường (Seker và cộng sự, 2010). Người có thể bị nhiễm vi khuẩn *E. coli* O157:H7 thông qua nhiều con đường khác nhau như sử dụng thực phẩm, rau xanh, nước uống bị nhiễm vi khuẩn; tiếp xúc trực tiếp với động vật mang vi khuẩn, làm việc trong môi trường có vi khuẩn,... Tại Việt Nam, do đặc điểm chăn nuôi chủ yếu theo hình thức chăn nuôi hộ gia đình và người dân hàng ngày tiếp xúc trực tiếp với vật nuôi nên nguy cơ bị lây nhiễm *E. coli* O157:H7 từ vật nuôi là rất cao.

Vi khuẩn *E. coli* O157:H7 đã được nghiên cứu rất kỹ ở các nước tiên tiến, tuy nhiên ở Việt Nam chưa có những nghiên cứu toàn diện về vi khuẩn này. Vì vậy, chúng tôi đã áp dụng phương pháp phân tách hút bám miễn dịch đặc hiệu và phản ứng Multiplex PCR để phân lập và giám định *E. coli* O157:H7, từ đó xác định tỷ lệ nhiễm và đánh giá được nguy cơ lây nhiễm từ vật nuôi mang khuẩn sang người.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập vi khuẩn *E. coli* O157:H7 từ mẫu phân trâu, bò khỏe mạnh tại một số tỉnh Nam Trung Bộ. Xác định tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *E. coli* O157:H7 trên trâu, bò khỏe mạnh.
- Xác định một số đặc điểm sinh vật, hoá học của các chủng *E. coli* O157:H7 đã phân lập.
- Xác định khả năng kháng kháng sinh của một số chủng vi khuẩn *E. coli* O157:H7 đã phân lập.

2.2. Nguyên liệu

- Các mẫu phân trâu, bò khỏe mạnh thu thập từ 3 tỉnh Phú Yên, Khánh Hòa và Ninh Thuận.
- Các loại môi trường, hóa chất dùng để phân lập vi khuẩn *E. coli* O157:H7.
- Các loại hóa chất, sinh phẩm dùng cho phản ứng PCR; chủng đối chứng dương E29 (O157:H7⁺) do Bộ môn nghiên cứu vi trùng, Phân viện thú y miền Trung cung cấp.
- Các đĩa giấy tấm kháng sinh do công ty Nam Khoa – Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Vi khuẩn *E. coli* O157:H7 được phân lập theo phương pháp phân tách hút bám miễn dịch đặc hiệu (Immunomagnetic cell Separation – IMS).

Quy trình phân lập vi khuẩn *E. coli* O157:H7 như sau:

1. *Chuẩn bị mẫu phân*: Cho 2,5 gam phân vào 25 ml môi trường Trypton soy broth, trộn đều bằng vortex rồi ủ ấm ở 42°C trong tủ ấm lắc với vận tốc 120 vòng/phút trong 6 giờ.
2. *Chuẩn bị dung dịch hút bám miễn dịch và thực hiện phản ứng hút bám miễn dịch*
 - Trộn đều hỗn dịch hạt từ bọc kháng thể O157 bằng vortex, sau đó cho 20µl hỗn dịch hạt từ bọc kháng thể vào các ống eppendorf 1,5 ml (chuẩn bị mỗi mẫu phân một ống eppendorf chứa hỗn dịch hạt từ bọc kháng thể O157).
 - Cho 1ml hỗn dịch mẫu phân (đã chuẩn bị ở trên) vào ống eppendorf chứa 20µl hỗn dịch hạt từ bọc kháng thể O157 và đậy nắp ống eppendorf, thay đầu tip cho mỗi mẫu.
 - Trộn đều hỗn dịch (hạt từ bọc kháng thể O157 + hỗn dịch mẫu phân) nhiều lần sau đó đặt vào giá có tính chất từ. Để giá có tính chất từ (chứa mẫu) ở nhiệt độ phòng trong vòng 10 phút (thỉnh thoảng lắc đều tránh tình trạng các hạt từ tòn độn tại một chỗ).
 - Chèn các giá có tính chất từ vào các khay từ để tập trung các hạt từ bọc kháng thể O157 dồn xuống đáy ống eppendorf. Để cố định ở nhiệt độ phòng trong vòng 5 phút.
 - Dùng pipet hút bỏ phần nước nổi và vật chất khô phía trên.
 - Lấy các giá từ ra khỏi khay từ.

- Cho 1ml dung dịch rửa (PBS tween 20) vào các ống eppendorf trên (chứa các hỗn dịch hạt từ bọc kháng thể O157 + vi khuẩn).
 - Lặp lại các bước 2.4 đến 2.7.
 - Lặp lại các bước 2.4 đến 2.6.
 - 10. Hoàn nguyên phần cặn bằng 100µl dung dịch rửa, làm tan cặn bằng vortex.
 - Ria cấy toàn bộ hỗn dịch trên môi trường CT – SMAC Agar, ủ ở 37°C trong 18 – 24 giờ.
- Chọn 2 – 3 khuẩn lạc nghi *E. coli* và không lên men đường sorbitol.
- *Giám định lại vi khuẩn E. coli* O157:H7 bằng phản ứng Multiplex PCR kiểm tra gen sinh tổng hợp kháng nguyên O (*rfbE*) và kháng nguyên flagellar H (*fliC*) theo Osek (2003).

Bảng 1. Các cặp mồi sử dụng trong phản ứng Multiplex PCR

Mồi	Trình tự mồi (5' - 3')	Gen kiểm tra	Kích thước sản phẩm (bp)	Tác giả nghiên cứu
PE8-F PE8-R	CGTGATGATGTTGAGTTG AGATTGGTTGGCATTACTG	<i>rfbE</i>	420	Osek, (2003)
1806-F 1806-R	GCTGCAACGGTATGTGAT GGCAGCAAGCGGGTTGGT	<i>fliC</i>	948	Osek, (2003)

- Giám định một số đặc tính sinh vật hóa học của các chủng vi khuẩn phân lập được theo Quinn và cộng sự (1994).
- Xác định khả năng kháng kháng sinh theo phương pháp thử nghiệm kháng sinh đồ của Kirby – Bauer (1966).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *E. coli* O157:H7 ở trâu, bò khỏe mạnh tại một số tỉnh Nam Trung Bộ

Chúng tôi đã thu thập 800 mẫu phân trâu, bò khỏe mạnh tại 3 tỉnh Phú Yên, Khánh Hoà và Ninh Thuận. Mẫu được bảo quản lạnh và vận chuyển nhanh về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập vi khuẩn *E. coli* O157:H7 theo phương pháp phân tách hút bắm miễn dịch đặc hiệu. Sau khi chọn được 455 chủng vi khuẩn nghi *E. coli* và không lên men đường sorbitol, chúng tôi tiến hành xác định gen sinh tổng hợp kháng nguyên O157 (*rfbE*) và kháng nguyên flagellar H7 (*fliC*) của các chủng vi khuẩn này bằng phản ứng Multiplex PCR theo phương pháp của Osek (2003) đã mô tả. Kết quả phân lập và giám định vi khuẩn *E. coli* O157:H7 thể hiện qua tỷ lệ nhiễm *E. coli* O157:H7 trên trâu, bò khỏe mạnh ở 3 tỉnh được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *E. coli* O157:H7 ở trâu, bò khỏe mạnh

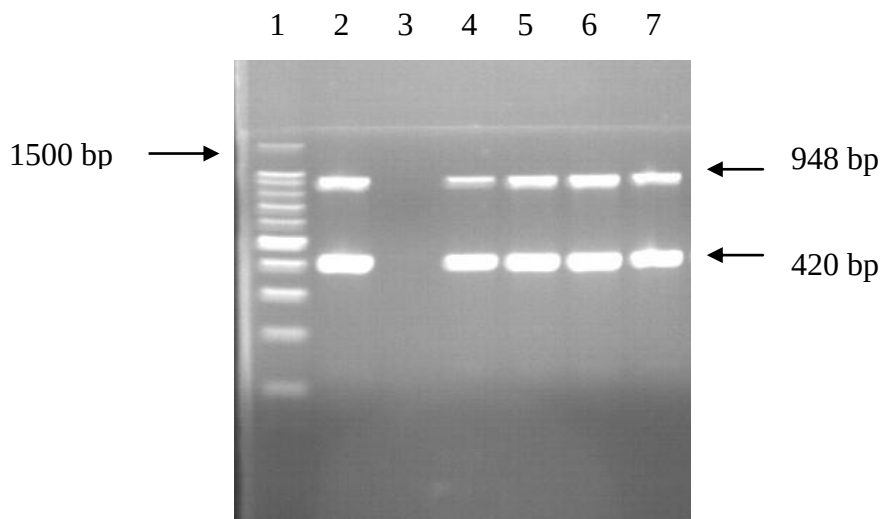
Địa điểm	Số mẫu phân lập	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ %
Phú Yên	274	6	2,2
Khánh Hoà	260	9	3,5
Ninh Thuận	266	12	4,5
Tổng	800	27	3,4

Qua bảng 2 cho thấy, trong 800 mẫu phân trâu, bò khỏe mạnh được thu thập từ Phú Yên, Khánh Hòa và Ninh Thuận có 27 mẫu dương tính với vi khuẩn *E. coli* O157:H7 (chiếm tỷ lệ 3,4%). Kết quả của chúng tôi phù hợp với một số nghiên cứu trước đây ở Đan Mạch, Acentina và ở Mỹ với tỷ lệ nhiễm *E. coli* O157:H7 lần lượt là 3,7%; 4,1% và 4,9% (Nielsen và cs, 2002; Masana và cộng sự, 2010; Byrne và cs, 2003). Tuy nhiên, kết quả này cao hơn kết quả trước đây

của chúng tôi khi nghiên cứu 568 chủng *E. coli* phân lập từ trâu, bò, dê khỏe mạnh thì chỉ có 3 chủng phân lập từ dê mang kháng nguyên O157 (Vu-Khac và Nancy, 2008). Sự khác nhau này theo chúng tôi là do trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng phương pháp phân tách hút bám miễn dịch đặc hiệu. Do đó, xác suất phân lập được vi khuẩn *E. coli* O157:H7 cao hơn so với phương pháp phân lập thường quy.

Khi so sánh kết quả nghiên cứu của chúng tôi với những kết quả đã công bố trước đây của một số tác giả khác, chúng tôi nhận thấy kết quả này thấp hơn nghiên cứu của Eriksson và cộng sự (2005) tại Thụy Điển. Tác giả này đã xác định được 8,9% số bò kiểm tra bị nhiễm vi khuẩn *E. coli* O157:H7. Khi kiểm tra 100 bò sữa tại khu vực ven Hà Nội, Nakasone và cs (2005) đã phân lập *E. coli* O157:H7 với tỷ lệ 8/100 bò sữa. Sở dĩ có sự sai khác này, theo chúng tôi có thể là do sự khác nhau về số lượng mẫu nghiên cứu, phương thức chăn nuôi của từng vùng cũng như điều kiện vệ sinh,... Tại Việt Nam, chăn nuôi trâu bò chủ yếu theo hình thức chăn nuôi hộ gia đình. Vì vậy, số lượng trâu, bò trong một hộ chăn nuôi rất hạn chế cho nên chúng tôi không so sánh tỷ lệ nhiễm giữa các hộ gia đình với tỷ lệ nhiễm ở các trang trại lớn ở nước ngoài.

Khi xét tỷ lệ nhiễm ở từng địa phương khác nhau chúng tôi nhận thấy, tỷ lệ nhiễm *E. coli* O157:H7 trên trâu bò khỏe mạnh ở Phú Yên, Khánh Hòa và Ninh Thuận lần lượt là 2,2%; 3,5%; và 4,5%. Tuy nhiên, sự sai khác về tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *E. coli* O157:H7 ở 3 tỉnh này là không có ý nghĩa về mặt thống kê (ở độ tin cậy $p = 0,95$). Theo chúng tôi, sở dĩ có kết quả này có thể là do ở 3 tỉnh này nằm gần nhau về vị trí địa lý và đều thuộc khu vực Nam Trung Bộ nên có đặc điểm khí hậu cũng như phương thức chăn nuôi khá giống nhau.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm Multiplex - PCR xác định gen *rfbE* và *fliC*

Ghi chú: giếng 1: marker, giếng 2: đối chứng dương,
giếng 3: đối chứng âm, giếng 4, 5, 6, 7: mẫu

3.2. Kết quả kiểm tra một số đặc tính sinh vật, hóa học của vi khuẩn *E. coli* O157:H7

Giám định vi khuẩn bằng cách kiểm tra các đặc tính sinh vật, hóa học là phương pháp nghiên cứu quan trọng trong suốt quá trình chúng tôi thực hiện đề tài. Dựa vào nguyên lý, mỗi loại vi khuẩn có một số đặc tính sinh hóa khác nhau như đặc tính chuyển hóa các loại đường, khả năng sinh các hợp chất trung gian,... Với 27 chủng vi khuẩn *E. coli* O157:H7 đã phân lập được, chúng tôi tiến hành giám định các đặc tính sinh hóa của vi khuẩn *E. coli* theo phương pháp của Quinn và cs (1994) với bộ môi trường 3 ống nghiệm (Kligler Iron Agar - KIA, Mannitol Motility, Urease Indol) và môi trường đường Sorbitol. Đồng thời các chủng vi khuẩn này được kiểm tra hình thái và tính chất bắt màu bằng phương pháp nhuộm Gram, soi dưới kính hiển vi với độ

phóng đại 1000 lần. Kết quả kiểm tra một số đặc tính sinh vật, hoá học của vi khuẩn *E. coli* O157:H7 được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả kiểm tra một số đặc tính sinh vật, hoá học của vi khuẩn *E. coli* O157:H7

STT	Tính chất	Số chủng kiểm tra	Số chủng dương tính (+)	Tỷ lệ %
1	Gram (-)	27	27	100
2	Lactose	27	27	100
3	Glucose	27	27	100
4	H ₂ S	27	0	0
5	Gas	27	27	100
6	Motility	27	27	100
7	Mannitol	27	27	100
8	Urease	27	0	0
9	Indol	27	27	100
10	Sorbitol	27	0	0

Kết quả nghiên cứu cho thấy:

- Các chủng vi khuẩn phân lập đều có dạng hình que nhỏ, hai đầu tròn, đứng riêng rẽ, đôi khi xếp thành chuỗi ngắn và bắt màu Gram âm (màu hồng). Kết quả này phù hợp với các tài liệu của một số tác giả đã mô tả về hình thái và tính chất bắt màu vi khuẩn *E. coli* (Nguyễn Như Thanh, 1997; Phạm Hồng Sơn, 2002).

- Tất cả 27 chủng vi khuẩn phân lập đều có khả năng lên men các loại đường glucose và mannitol với tỷ lệ 100%, không có chủng nào lên men đường sorbitol.

- Trên môi trường KIA không có chủng nào có khả năng sinh H₂S. Tất cả các chủng vi khuẩn trên đều có khả năng di động và lên men sinh hơi với tỷ lệ 100%.

- Các phản ứng indol đều cho kết quả dương tính 100%, các phản ứng urease đều cho kết quả âm tính.

Kết quả giám định đặc tính sinh hóa của chúng tôi phù hợp với kết quả giám định đặc tính sinh hóa của vi khuẩn *E. coli* mà các tác giả khác đã công bố (Quinn và cs, 1994; Nguyễn Như Thanh, 1997). Như vậy, 27 chủng vi khuẩn chúng tôi phân lập từ mẫu phân trâu, bò khỏe mạnh được xác định là vi khuẩn *E. coli* O157:H7.

3.3. Kết quả kiểm tra khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* O157:H7

Để đánh giá khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn *E. coli* O157:H7 đã phân lập được, chúng tôi chọn ra 10 chủng đại diện để tiến hành thử nghiệm kháng sinh đồ theo phương pháp của Kirby – Bauer (1966) với các đĩa giấy tâm kháng sinh do công ty Nam Khoa cung cấp. Khả năng đề kháng với kháng sinh của các chủng vi khuẩn kiểm tra được đánh giá bằng đường kính vòng vô khuẩn theo bảng tiêu chuẩn của nhà sản xuất. Kết quả kiểm tra khả năng kháng kháng sinh của 10 chủng vi khuẩn *E. coli* O157:H7 được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Khả năng kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* O157:H7

TT	Loại kháng sinh	Ký hiệu	Số chủng kiểm tra	Mẫn cảm cao		Mẫn cảm trung bình		Kháng	
				(+)	%	(+)	%	(+)	%
1	Ampicilin	Am	10	6	60	1	10	3	30
2	Amikacin	Ak	10	10	100	0	0	0	0
3	Amoxillin/clavulanic acid	Ac	10	8	80	0	0	2	20
4	Cefotacime	Ct	10	10	100	0	0	0	0
5	Cephalexin	Cp	10	8	80	0	0	2	20
6	Clindamycin	cL	10	0	0	0	0	10	100
7	Colistin	Co	10	6	60	3	30	1	10
8	Cefepime	Cm	10	10	100	0	0	0	0
9	Cefoperazone	Cf	10	10	100	0	0	0	0
10	Cloramphenicol	Cl	10	5	50	1	10	4	40
11	Erythromycin	Er	10	0	0	0	0	10	100
12	Gentamicin	Ge	10	10	100	0	0	0	0
13	Kanamycin	Kn	10	7	70	0	0	3	30
14	Neomycin	Ne	10	3	30	6	60	1	10
15	Nalidixic acid	Ng	10	8	80	0	0	2	20
16	Ofloxacin	Of	10	9	90	0	0	1	10
17	Oxacillin	Ox	10	0	0	0	0	10	100
18	Polymycin B	Pb	10	10	100	0	0	0	0
19	Streptomycin	Sm	10	5	50	3	30	2	20
20	Tetracyclin	Te	10	7	70	0	0	3	30
21	Tobramycin	Tb	10	9	90	0	0	1	10
22	Bactrim	Bt	10	7	70	0	0	3	30

Trong đó: (+): số chủng dương tính, %: tỷ lệ phần trăm

Việc phát hiện ra kháng sinh đã mở ra một kỷ nguyên mới trong việc điều trị các bệnh nhiễm trùng. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh lan tràn trong những thập kỷ vừa qua đã dẫn đến sự xuất hiện rất nhiều chủng vi khuẩn có khả năng đề kháng với kháng sinh và gây ra nhiều khó khăn cho công tác điều trị bệnh.

Trong nghiên cứu này chúng tôi thấy rằng, hầu hết các loại thuốc kháng sinh được kiểm tra ở trên đều có khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *E. coli* O157:H7 trên môi trường Mueller Hinton ở mức độ khác nhau. Trong đó, mẫn cảm nhất là Amikacin, Cefotacime, Cefepime, Cefoperazone, Gentamicin và Polymycin B với 100% số chủng *E. coli* mẫn cảm cao; mẫn cảm thấp nhất là Clindamycin, Erythromycin và Oxacillin với tỷ lệ kháng thuốc 100%.

IV. KẾT LUẬN

- Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *E. coli* O157:H7 của trâu, bò khỏe mạnh ở 3 tỉnh Nam Trung Bộ là 3,4%. Trong đó, tỷ lệ nhiễm ở Phú Yên là 2,2%, Khánh Hoà là 3,5% và ở Ninh Thuận là 4,5%. Đây là nguồn lây nhiễm nguy hiểm cho người tiếp xúc trực tiếp và gián tiếp với vật nuôi mang vi khuẩn *E. coli* O157:H7.

- Các chủng vi khuẩn *E. coli* O157:H7 phân lập từ mẫu phân trâu, bò khỏe mạnh mang đầy đủ các đặc tính sinh vật hóa học như các tài liệu trước đây đã mô tả.

- Vi khuẩn *E. coli* O157:H7 mẫn cảm nhất với Amikacin, Cefotacime, Cefepime, Cefoperazone, Gentamicin và Polymycin B (100% số chủng *E. coli* mẫn cảm cao); mẫn cảm thấp nhất với Clindamycin, Erythromycin và Oxacillin (tỷ lệ kháng thuốc 100%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45(4): 493-6.
2. Byrne CM, Erol I, Call JE, Kaspar CW, Buege DR, Hiemke CJ, Fedorka-Cray PJ, Benson AK, Wallace FM and Luchansky JB (2003) Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from Downer and Healthy Dairy Cattle in the Upper Midwest Region of the United States. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 4683-4688, Vol. 69, No. 8
3. Eriksson E, Aspan S, Gunnarsson A, Vagsholm I. (2005). Prevalence of vero-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157 in Swedish dairy herds. *Epidemiol Infect*, 133: 349-358.
4. Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: Blaser MJ, Smith PD, Favdin JJ, Greenberg HB, Guerrant RL, Eds. *Infections of the Gastrointestinal Tract*. New York: Raven Press, Ltd.; 1995:739-761.
5. Masana MO, Leotta GA, Del Castillo LL, D'Astek BA, Palladino PM, Galli L, Vilacoba E, Carbonari C, Rodríguez HR, Rivas M. (2010). Prevalence, characterization, and genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. *J Food Prot*. 73:649-656.
6. Nakasone N, Tran HH, Nguyen BM, Higa N, Toma C, Song T, Ichinose Y, Iwanaga (2005) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from fecal samples of cows in Vietnam. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 73:586-587.
7. Nielsen EM, Tegtmeier C, Andersen HJ, Grønbaek C, Andersen JS. (2002). Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Danish dairy farms. *Vet Microbiol*. 88:245-257.
8. Osek, J. (2003). Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *Journal of applied Microbiology* 95: 1217 – 1225.
9. Seker E, Kuyucuoglu Y, Sareyyupoglu B, Yardimci H (2010) PCR detection of Shiga toxins, enterohaemolysin and Intimin virulence genes of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from faeces of Anatolian water buffaloes in Turkey. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01285.x
10. Su C, Brandt LJ. *Escherichia coli* O157:H7 infection in humans (1995) *Annal of Internal Medicine* 123:698-714.
11. Vu-Khac H and Nancy NA. (2008). Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes cattle and goats in Central Vietnam. *Veterinary Microbiology*. 126: 356-363.