



DOI:10.22144/ctu.jsi.2018.076

PHÂN LẬP VI KHUẨN *Clostridium botulinum* VÀ XÁC ĐỊNH SỰ HIỆN DIỆN CỦA ĐỘC TỐ BOTULIN TRÊN VỊT BỊ LIỆT MỀM CỔ THU THẬP TẠI MỘT SỐ TỈNH ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Nguyễn Thu Tâm^{1*} và Nguyễn Đức Hiền²

¹Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

²Chi cục Thú y Thành phố Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thu Tâm (email: nttamty@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 24/07/2018

Ngày duyệt đăng: 03/08/2018

Title:

Isolation of *Clostridium botulinum* and determination of botulin toxin from limberneck-ducks in the Mekong Delta

Từ khóa:

Clostridium botulinum, botulin, đồng bằng sông Cửu Long, vịt liệt mềm cổ

Keywords:

Botulin, *Clostridium botulinum*, limberneck, Mekong Delta

ABSTRACT

Specimen samples from 100 limberneck ducks (including: 80 serum samples, 100 gut content samples and 100 liver samples) were collected in some districts of Can Tho city and Kien Giang province, from May 2016 to April 2017. Gut content samples and liver samples were used for isolation of *Clostridium botulinum* by culturing on Cooked–Meat medium and blood agar, then PCR tests were used to identify *Clostridium botulinum* type (Miia Lindstrom and Hannu Korkeala, 2001; Amit-Romach et al., 2004). Serum samples were used for detecting botulin (toxin of *Clostridium botulinum*) by mouse lethality assay as the description of CDC (1998). The result of isolation showed that 21% (42/200) samples were positive to *Clostridium* spp. Results of typing by PCR method showed that *Clostridium botulinum* type C, type D and type E made up 2.38% (1/42), 9.52% (4/42), 9.52% (4/42), respectively. The results of botulin toxin determination revealed that 49/80 sera (61.25%) without the heat treatment caused the death of mice, while the heat treatment sera did not cause mice death. The result of the determination of toxin type, the rate of toxin type C was 61.23%, followed by type D (32.65%), and type E (6.12%). The result showed that *Clostridium botulinum* type C, D, E was the main causes of limberneck duck disease in Can Tho city and Kien Giang province.

TÓM TẮT

100 mẫu từ 100 con vịt bị liệt mềm cổ (gồm 80 mẫu huyết thanh, 100 mẫu dịch ruột và 100 mẫu gan) được thu thập tại một số huyện thuộc thành phố Cần Thơ và tỉnh Kiên Giang từ tháng 05 năm 2016 đến tháng 04 năm 2017. Mẫu dịch ruột và gan được ủ trong môi trường Cooked Meat, môi trường thạch máu và kiểm tra đặc tính sinh hóa bằng phương pháp nhuộm Gram kết hợp với kỹ thuật PCR của Lindstrom and Hannu Korkeala, (2001) và Amit-Romach et al. (2004) để phân lập vi khuẩn *Clostridium botulinum*. Các mẫu huyết thanh được tiến hành thử độc tố botulin của vi khuẩn *Clostridium botulinum* bằng phương pháp thử nghiệm gây chết chuột bạch theo mô tả của CDC (1998). Kết quả phân lập cho thấy vi khuẩn *Clostridium* spp. trên mẫu ruột và gan vịt có triệu chứng liệt mềm cổ là 21% (42/200), trong đó vi khuẩn *Clostridium botulinum* trên các mẫu gồm 1 mẫu type C (2,38%); 4 mẫu type D (9,52%) và 4 mẫu type E (9,52%). Kết quả xác định type độc tố botulin bằng thử nghiệm trên chuột cho thấy có 49/80 mẫu bệnh phẩm huyết thanh không xử lý nhiệt đã gây chết chuột, chiếm tỷ lệ 61,25%, trong khi tất cả mẫu huyết thanh đã xử lý nhiệt đều không gây chết chuột thí nghiệm. Kết quả định type độc tố cho thấy, tỷ lệ xuất hiện độc tố type C là 61,23% (30/49), type D là 32,65% (16/49), và type E là 6,12% (3/49). Độc tố type C, D của vi khuẩn *Clostridium botulinum* là một trong những nguyên nhân gây bệnh liệt mềm cổ trên vịt ở một số địa phương thuộc thành phố Cần Thơ và tỉnh Kiên Giang.

Trích dẫn: Nguyễn Thu Tâm và Nguyễn Đức Hiền, 2018. Phân lập vi khuẩn *Clostridium botulinum* và xác định sự hiện diện của độc tố botulin trên vịt bị liệt mềm cổ thu thập tại một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(Số chuyên đề: Nông nghiệp): 143-147.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Clostridium botulinum là vi khuẩn kỵ khí bắt buộc, sinh bào tử và có khả năng di động. Có 8 loại độc tố thần kinh được sản sinh từ loài vi khuẩn này và được kí hiệu từ A đến H, trong đó các độc tố loại A, B, E, F gây bệnh ở người còn những độc tố loại C, D chỉ gây bệnh trên động vật.

Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) nói chung, tỉnh Kiên Giang và thành phố Cần Thơ nói riêng có các điều kiện tự nhiên thuận lợi cho phát triển nông nghiệp, đặc biệt là nghề trồng lúa nước và chăn nuôi vịt chạy đồng. Nuôi vịt chạy đồng là hình thức chăn nuôi có vốn đầu tư ban đầu vừa tận dụng được nguồn lúa rơi vãi hay còn sót lại sau thu hoạch lúa, kết hợp sử dụng thêm nguồn thức ăn tự nhiên sẵn có. Hiện nay, người chăn nuôi vịt chạy đồng thường gặp phải vịt bệnh với các triệu chứng: liệt mềm cổ, liệt mí mắt, liệt chân, tỷ lệ chết rất cao. Hiện tượng liệt mềm cổ, liệt chân thường xảy ra sau khi vịt tìm mồi ở những vùng bùn tại các ao, hồ, kênh rạch lúc thủy triều xuống hoặc từ ruộng vừa có nước ngập rồi rút xuống. Cách xảy ra bệnh và các triệu chứng bệnh như mô tả ở trên rất giống với mô tả của Tonie and Friend (1999) về bệnh “limberneck” trên thủy cầm do nhiễm độc tố botulin của vi khuẩn *Clostridium botulinum*. Nghiên cứu này nhằm tìm hiểu sự hiện diện của *Clostridium botulinum* và sự hiện diện của độc tố botulin trong huyết thanh trên những vịt bị liệt mềm cổ tại một số huyện thuộc tỉnh Kiên Giang và thành phố Cần Thơ.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Máu cừu (Công ty Nam Khoa, Việt Nam), TPGY broth (5% trypticase, 0,5% peptone, 0,4% glucose, 2% yeast extract, 0,1% sodium thioglycolate, pH=7.0), CMM (Cooked Meat Medium) (Difco, USA). Bộ kit li trích vi khuẩn gram dương (Gene JET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Fisher Scientific). Dụng cụ và máy móc phục vụ cho kỹ thuật PCR, kháng độc tố của vi khuẩn *C. botulinum* (Anti botulinum toxin) type C, D và E (Statens Serum Institut, Đan Mạch). Chuột bạch thí nghiệm có trọng lượng từ 20 – 25g do viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp.

2.2 Mẫu và phương pháp lấy mẫu

Một trăm vịt (80 vịt còn sống, 20 vịt vừa mới chết) có triệu chứng liệt cổ, liệt chân, liệt cánh thu thập từ vịt chạy đồng tại một số huyện thuộc thành phố Cần Thơ và tỉnh Kiên Giang được thu thập dùng trong nghiên cứu này. Tổng số bệnh phẩm sử dụng

trong nghiên cứu này bao gồm 80 mẫu huyết thanh, 100 mẫu dịch ruột (chất chứa trong ruột già), và 100 mẫu gan.

– Phương pháp lấy mẫu

Tiến hành thu thập các mẫu vịt có triệu chứng của bệnh tại 4 huyện: Vĩnh Thanh, Thốt Nốt thuộc thành phố Cần Thơ và huyện Giồng Riềng, Tân Hiệp thuộc tỉnh Kiên Giang Chọn lấy những vịt thịt hơn 2 tháng tuổi và vịt đẻ có triệu chứng đặc trưng như cổ bị mềm, liệt mí mắt, đôi khi liệt cánh hoặc chân, lấy máu (đối với vịt có triệu chứng mà vẫn còn sống) để lấy huyết thanh, sau đó hủy tủy, mổ lấy toàn bộ đường tiêu hóa của vịt từ hầu đến hậu môn (cột dây tại hai vị trí cắt để giữ môi trường yếm khí bên trong đường tiêu hóa). Mẫu gan được nhẹ nhàng lấy ra và cho vào túi vô trùng. Máu được lấy khoảng 5-10 ml cho vào ống nghiệm, để nghiêng góc 45°, chờ máu đông để chất lấy huyết thanh. Các mẫu ruột và gan cho vào túi nilon vô trùng, ép hết không khí, cột chặt, mỗi mẫu được đặt vào túi riêng và ghi chú ký hiệu mẫu, cho vào thùng trữ lạnh mang về phòng thí nghiệm. Mỗi đàn chọn từ 1-10 con vịt có triệu chứng như mô tả ở trên.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Phương pháp phân lập vi khuẩn *Clostridium spp.* từ mẫu dịch ruột và gan:

Đối với mẫu ruột: Buộc hai đầu một đoạn ruột già – đoạn tiếp giáp manh tràng, dùng kéo cắt mở ruột khoảng 1 cm, lấy tám bông vô trùng nhúng vào chất chứa trong mẫu ruột.

Đối với mẫu gan: Dùng dao hơ nóng ép lên bề mặt gan để diệt vi khuẩn trên bề mặt gan, tránh ảnh hưởng đến sự phân lập vi khuẩn. Dùng kéo cắt lên phần gan đó một đoạn khoảng 1 cm, dùng tampon vô trùng khuấy sâu vào bên trong gan.

Phết trực tiếp tampon vừa lấy mẫu lên thạch máu, ria cấy sau đó đem ủ trong điều kiện yếm khí ở 37°C trong 24 giờ. Chọn những khuẩn lạc màu trắng đục, to, nhầy, bề mặt khô, gồ gề, có khả năng dung huyết, đường kính khoảng từ 0,5-1 cm, nhuộm Gram, quan sát tiêu bản dưới kính hiển vi với vật kính 100X để xem hình dạng, tính chất bắt màu, hình dạng nha bào, độ thuần nhất của vi khuẩn. *Clostridium spp.* là trực khuẩn hình que thẳng hoặc hơi cong, bắt màu Gram dương, thẳng hai đầu tròn, kích thước chiều rộng 0,9 – 1 µm, chiều dài 4 – 8 µm. Nha bào có hình trứng dài với nhiều hình dạng: dạng dùi trống và dạng không dùi (tạo bào tử ovale ở tâm hoặc nằm ở một đầu vi khuẩn). Sau khi nhuộm, các góc vi khuẩn sẽ được kiểm tra đặc tính sinh hóa theo Bảng 1.

Bảng 1: Đặc tính sinh hóa của một số chủng *Clostridium*

Chủng vi khuẩn <i>Clostridium</i>	Glucose	Lactose	Maltose	Saccarose	Indole
<i>C. perfringens</i>	+	+	+	+	-
<i>C. tetani</i>	-	-	-	-	-
<i>C. septicum</i>	+	+	+	-	-
<i>C. difficile</i>	+	-	-	-	-
<i>C. conium</i>	+	-	+	+	-
<i>C. botulinum</i>	+	-	+	-	-

(Nguyễn Như Thanh, 1997)

2.3.2 Phương pháp xác định *Clostridium botulinum* bằng kỹ thuật PCR

Vi khuẩn *Clostridium* spp. sau khi được thử sinh hóa sẽ được tăng sinh trên môi trường thạch máu để tiến hành ly trích DNA. DNA của vi khuẩn được ly

trích bằng bộ kit ly trích GeneJET Genomic DNA Purification K0721, K0722 (Thermo Scientific). Chu trình nhiệt và điện di trong kỹ thuật PCR được thực hiện theo Lindstrom (2001). Trình tự các cặp môi được trình bày ở Bảng 2 và 3.

Bảng 2: Trình tự nucleotide của các cặp đoạn môi xác định gene của vi khuẩn *Clostridium* spp.

Primer PCR	Trình tự (5'-3')	Kích thước SP
Clos58-f	AAAGGAAGATTAATACCGCATA	722bp
Clos780-r	ATCTTGCGACCGTACTCCCC	

(Amit-Romach et al., 2004)

Bảng 3: Trình tự nucleotide của cặp đoạn môi xác định vi khuẩn *C. botulinum* type C, D, E

Primer	Trình tự	Gene	Kích thước SP	Tham khảo
BoNT/C Fw	TAGTAGAATCTTCAGGTGAAG	<i>BoNT</i>	1118bp (type C)	Nakamura et al., 2013
BoNT/D Fw	TTAATATAGAAAATTCGGGTCA		887 bp (type D)	
BoNT Rv	ATATGAATCTTTCCATCTCTTAA	<i>BoNT</i>	389 bp (type E)	Lindstrom and Hannu Korkeala, 2001
BoNT/Ef	CCAAGATTTTCATCCGCCTA			
BoNT/Er	GCTATTGATCCAAAACGGTGA			

2.3.3 Phương pháp phát hiện độc tố từ huyết thanh của vịt có triệu chứng liệt mềm cổ

Quy trình xử lý huyết thanh và bố trí thí nghiệm: Mẫu huyết thanh trước khi tiêm truyền cho chuột được ly tâm ở vận tốc 12.000 vòng/phút trong vòng 20 phút. Lấy phần nước trong bên trên lọc bằng màng lọc 0,45 µm (syringe filter). Chia dịch bệnh phẩm sau khi lọc làm 3 phần: một phần (1 ml) không xử lý nhiệt (lô I), một phần (1 ml) xử lý nhiệt bằng cách đun cách thủy dịch bệnh phẩm ở 100°C/10 phút (lô II) và một phần (tổng cộng 3 ml cho 3 loại kháng độc tố) trộn với kháng độc tố chuẩn lần lượt với các type C, D, E theo tỷ lệ 1:1 (lô III). Theo dõi diễn biến đối với chuột thí nghiệm trong 7 ngày sau khi tiêm.

Tất cả mẫu huyết thanh ở 3 lô trước khi đem tiêm cho chuột đều được cấy lên đĩa thạch máu và ủ ở 2 điều kiện kỵ khí và hiếu khí để kiểm tra và đảm bảo rằng không có sự hiện diện của vi khuẩn trong mẫu.

Cách đọc kết quả: Nếu kết quả tiêm cho chuột ở lô I làm chuột có biểu hiện liệt chi, không vận động

được hoặc chuột chết và chuột ở lô II, lô IV vẫn sống và hoạt động bình thường, có thể kết luận mẫu nghi ngờ có mang độc tố botulin. Nếu kết quả tiêm cho chuột lô III không làm chuột chết hoặc không có biểu hiện bất thường ở type kháng độc tố nào thì huyết thanh chứa độc tố loại đó.

2.4 Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và Minitab 16,0, phép thử Chi-square được sử dụng để so sánh tỷ lệ nhiễm vi khuẩn ở các địa phương khác nhau và các loại mẫu khác nhau

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả sự hiện diện của vi khuẩn *Clostridium* spp. trên các mẫu bệnh phẩm của vịt theo địa phương

Những vịt có biểu hiện triệu chứng liệt mềm cổ được thu thập và tiến hành phân lập và định danh vi khuẩn *Clostridium* spp. Kết quả được trình bày qua Bảng 4.

Bảng 4: Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Clostridium* spp. theo địa phương

Địa điểm	Số mẫu phân lập	<i>Clostridium</i> spp. (+)	Tỷ lệ %
Cần Thơ	84	17	20,24 ^a
Kiên Giang	106	25	24,04 ^a
Tổng	200	42	21,00

Ghi chú: (+): dương tính

Những số trong cùng 1 cột mang mũ chữ giống nhau thì khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).

Qua Bảng 4, vi khuẩn *Clostridium* spp. chiếm 21,0% trong các mẫu kiểm tra (42/200 mẫu). Tỷ lệ này cho thấy sự hiện diện của vi khuẩn *Clostridium* spp. trên vịt có triệu chứng liệt mềm cổ tương đối thấp. Điều này phù hợp với nhận định của Tonic and Friend (1999) về bệnh liệt mềm cổ trên gia cầm là do chúng trúng phải độc tố botulin của vi khuẩn *Clostridium botulinum*. Tuy nhiên, sự hiện diện của vi khuẩn *Clostridium* spp. trong các vịt chạy đồng sẽ là nguồn phát tán vi khuẩn vào môi trường, từ đó có thể lây lan sang vịt khác hoặc đối tượng khác.

Tỷ lệ hiện diện của vi khuẩn *Clostridium* spp. trên các mẫu thu thập tại Cần Thơ và Kiên Giang khác nhau không có ý nghĩa. Điều này có thể lý giải do hai địa phương này đều thuộc vùng Đồng bằng sông Cửu Long, chịu ảnh hưởng của khí hậu không khác biệt nhiều. Ngoài ra, việc nuôi vịt chạy đồng cũng luôn thay đổi liên tục các cánh đồng để có thể tận dụng nguồn thức ăn rơi vãi, điều này làm cho tỷ lệ nhiễm hiện diện của vi khuẩn sẽ không khác nhau giữa các địa bàn khác nhau.

3.2 Kết quả sự hiện diện của vi khuẩn *Clostridium* spp. trên các mẫu bệnh phẩm của vịt

Kết quả phân lập vi khuẩn *Clostridium* spp. trên các mẫu bệnh phẩm được thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5 cho thấy sự hiện diện của vi khuẩn *Clostridium* spp. trong ruột vịt chiếm tỷ lệ 29%

(29/100) và trong mẫu gan với tỷ lệ 13% (13/100). Tỷ lệ phân lập vi khuẩn từ mẫu ruột cao hơn mẫu gan và sự sai khác này có ý nghĩa về mặt thống kê ($P=0,05$). Điều này cho thấy vi khuẩn khu trú ở một số cơ quan trong cơ thể khi vịt bị bệnh là có khác nhau. Sự khác biệt này phản ánh sự tồn tại của vi khuẩn trong đường tiêu hóa dưới, đặc biệt là ruột già. Đường tiêu hóa dưới là môi trường yếm khí, chứa nhiều dinh dưỡng thuận lợi cho sự phát triển của vi khuẩn *Clostridium* spp. Vi khuẩn *Clostridium* vốn có sẵn trong ruột và chờ cơ hội gây bệnh. (Smith, 1987).

Bảng 5: Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Clostridium* spp. từ chất chứa trong ruột và gan của vịt

Loại mẫu	Số mẫu phân lập	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Gan	100	13	13,0 ^a
Ruột	100	29	29,0 ^b
Tổng	200	42	21

$P(H_0) < 0,05$

Ghi chú: Những số trong cùng 1 cột mang mũ chữ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

3.3 Kết quả định type C, D, E của vi khuẩn *Clostridium botulinum* bằng phản ứng PCR trên các mẫu vi khuẩn *Clostridium* spp.

Sự hiện diện của vi khuẩn *Clostridium botulinum* type C, D, E trên vịt liệt mềm cổ được ghi nhận ở Bảng 6.

Bảng 6: Tỷ lệ nhiễm *C. botulinum* type C, D, E trên mẫu gan/ruột được xác định bằng kỹ thuật PCR

Loại Mẫu	Số mẫu XN	Type C		Type D		Type E	
		Dương tính	Tỷ lệ %	Dương tính	Tỷ lệ %	Dương tính	Tỷ lệ %
Gan	13	0	0	0	0	2	15,38
Ruột	29	1	3,45	4	13,79	2	6,90
Tổng	42	1	2,38	4	9,52	4	9,52

Bảng 6 cho thấy sự hiện diện của vi khuẩn *C. botulinum* type C, D, E trong mẫu vịt có biểu hiện liệt cổ, liệt chân, liệt cánh. Sự bài thải các chủng vi khuẩn này ra ngoài môi trường có thể là nguồn lây nhiễm vi khuẩn cho nhiều đối tượng khác như cua, ốc, cá... từ đó làm thành vòng lây nhiễm vi khuẩn cho nhiều loài động vật khác. Anza et al. (2014) khảo sát tình hình *C. botulinum* gây bệnh ngộ độc gia cầm ở miền Nam và miền Bắc châu Âu, ngộ độc

gia cầm là một bệnh bại liệt gây ra bởi vi khuẩn *C. botulinum* sản xuất độc tố thần kinh botulin (BoNTs), phổ biến nhất của loại C/D. Type E có sự xuất hiện phổ biến trong môi trường, các vùng đất ngập nước (Huss, 1980).

Tỷ lệ *C. botulinum* type C (2,38%) thấp hơn *C. botulinum* type D và E (9,52%) và qua phân tích, sự sai khác này không có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê ($P > 0,05$). Theo các nghiên cứu trên thế

giới, type C có tính phổ biến hơn trên các trường hợp ngộ độc ở gia cầm. Tuy nhiên, tỷ lệ nhiễm type C trong nghiên cứu này ít phổ biến hơn so với type D và E, nhưng điều này có thể lý giải bởi đặc điểm điều

kiện tự nhiên, thổ nhưỡng, khí hậu,... của nước ta và các nước là khác nhau.

3.4 Kết quả tiêm truyền huyết thanh có và không có xử lý nhiệt trên chuột

Bảng 7: Kết quả tiêm truyền huyết thanh vịt bị liệt mềm cổ trên chuột (N = 80)

Tình trạng chuột	Lô I		Lô II		Lô đối chứng	
	Số mẫu	Tỷ lệ (%)	Số mẫu	Tỷ lệ (%)	Số mẫu	Tỷ lệ (%)
Gây chết chuột	49	61,25	0	0	0	0
Gây bất thường	31	38,75	0	0	0	0
Bình thường	0	0	80	100	8	100
Tổng	80	100	80	100	8	100

Trong tổng số 80 mẫu huyết thanh đem thí nghiệm, lô I có 49 mẫu gây chết chuột chiếm tỷ lệ 61,25%, số mẫu gây ra các triệu chứng bất thường cho chuột thí nghiệm như: ủ rũ, vận động kém, xù lông, ăn ít, thờ bưng, tiêu chảy, sưng mí mắt,... chiếm tỷ lệ 38,75% với 31 mẫu (Bảng 7). Có thể nói, 100% các mẫu huyết thanh đều có ảnh hưởng đến chuột thí nghiệm. Ở Lô II, tất cả những chuột được tiêm huyết thanh, qua xử lý nhiệt, có tỷ lệ chuột khỏe mạnh bình thường đạt 100%, không nhận thấy bất kì biểu hiện khác thường nào. Kết quả này cũng góp phần chứng minh độc tố botulin bị phá hủy bởi nhiệt ở 100°C trong 10 phút. Ở lô IV (đối chứng), 100% chuột đều bình thường khi được tiêm nước muối 0,9%.

liệt mềm cổ không có ý nghĩa cao trong việc chẩn đoán nguyên nhân gây bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Amit-Romach, E., Sklan, D. and Uni, Z., 2004. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poultry Science*, 83(7): 1093-1098.

Anza, I., Vidal, D. and Mateo, 2014. New insight in the epidemiology of avian botulism outbreaks: necrophagous flies as vectors of *Clostridium botulinum* type C/D. *Environmental Microbiology*, 6(6): 738-43.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 1998. Handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers. *Botulism in the United States, 1899-1996*.

Han H. Huss., 1980. Distribution of *Clostridium botulinum*, *Appl Environmental Microbiology*, 39(4): 764-769.

Leighton F.A. (2000), "Type C Botulism in Birds". [http://burn.medicclub.info](http://burn.medicclub.info/Lindström, M., Keto, R., Markkula, A., Nevas, M., Hielm, S. and Korkeala, H., 2001. Multiplex PCR assay for detection and identification of Clostridium botulinum types A, B, E, and F in food and fecal material. Applied and Environmental Microbiology, 67(12): 5694-5699)

Nakamura, K., Kohda, T., Seto, Y., Mukamoto, M., and Kozaki, S., 2013. Improved detection methods by genetic and immunological techniques for botulinum C/D and D/C mosaic neurotoxins. *Veterinary Microbiologyp*, 162(2-4): 881-890.

Nguyễn Như Thanh, 1997. Vi sinh vật thú y. NXB Nông nghiệp Hà Nội, 192 trang.

Smith G.R. (1987), "Botulism in water birds and its relation to comparative medicine". In Eklund M.E, Dowell V.R. (eds.). *Avian Botulism: An International Perspective*. Charles C. Thomas: Springfield, IL, pp. 73-86

Toni,e E. R. and Friend, M., 1999. Chapter 38: Avian botulism in Field Manual of Wildlife Diseases, United States Geological Survey, USA, 38: 271-382.

3.5 Kết quả xác định type độc tố bằng kháng độc tố chuẩn

Bảng 8: Kết quả sự hiện type độc tố botulin trong huyết thanh (Lô III)

Type độc tố botulin	Số mẫu xuất hiện	Tỷ lệ (%)
Type C	30	61,23
Type D	16	32,65
Type E	3	6,12
Tổng	49	100

Dựa vào kết quả bảng trên, tỷ lệ xuất hiện *C. botulinum* type C là khá cao, chiếm 61,22%, tiếp theo là độc tố type D chiếm 32,65% và thấp nhất là độc tố type E chiếm 6,12%. Kết quả này cho thấy độc tố type C là nguyên nhân chủ yếu gây ra ngộ độc trên vịt. Điều này cũng phù hợp với nhận với nhận định của Leighton (2000), độc tố type C là nguyên nhân gây ngộ độc ở vịt tại các vùng đất ngập nước.

4 KẾT LUẬN

Độc tố botulin là một trong những nguyên nhân chính gây chứng liệt mềm cổ trên vịt tại một số địa phương thuộc Đồng bằng sông Cửu Long. Các type độc tố chính được tìm thấy là type C và D. Type E hiện diện với tỷ lệ không đáng kể. Việc phân lập *Clostridium botulinum* từ dịch ruột và gan của vịt