

ĐỘC TÍNH VÀ TÍNH GÂY BỆNH TRÊN VỊT CỦA ĐỘC TỐ VI KHUẨN (*CLOSTRIDIUM BOTULINUM*) PHÂN LẬP TẠI THÀNH PHỐ CẦN THƠ

Nguyễn Đức Hiền¹ và Phạm Mạnh Hùng¹

ABSTRACT

The *Clostridium botulinum* bacteria were investigated for their virulence and pathogenicity by first isolating the bacteria from mud and intestines of diseased ducks and culturing them in MCMM culture for 5 days incubation period in anaerobic condition for toxin production and then inoculating supernatant of *C. botulinum* broth to mice and ducks. The results showed that 100% mice were killed when injecting intraperitoneally 1ml of 10% heat-untreated *C. botulinum* culture supernatant while all mice injected by heat-treated *C. botulinum* culture were alive. Seventy per cent of ducks were killed by intravenous injection of *C. botulinum* broth supernatant with a dose of 5ml/ducks, and 100% ducks were death when injected with a dose of 10ml/ducks. The most common clinical signs were wing droop and reluctant to move (100%), followed by leg, neck and eye lid paralysis(80%). No typical lesion was found, except hemorrhage in the hearts and the lungs were observed from 15% and 10% of the experimental death ducks, respectively.

Keywords: Domestic ducks, Virulence and pathogenicity, *Clostridium botulinum*, Cantho

Title: Toxicity and pathogenicity of *Clostridium botulinum* isolated from domestic ducks in Cantho city

TÓM TẮT

Thí nghiệm khảo sát độc tính và tính gây bệnh trên vịt của độc tố vi khuẩn *C. botulinum* được thực hiện qua việc nuôi cấy vi khuẩn *C. botulinum* phân lập từ bùn và ruột vịt có triệu chứng bệnh ở một số trại chăn nuôi vịt tại thành phố Cần Thơ, sau đó sử dụng dịch nổi ly tâm canh khuẩn tiêm cho chuột và vịt thí nghiệm. Kết quả thí nghiệm cho thấy vi khuẩn có khả năng sản sinh độc tố đủ gây bệnh sau khi ủ yếm 5 ngày trong môi trường MCMM. Với liều 1ml dịch nổi ly tâm canh khuẩn pha loãng 1/10 gây chết 100% chuột thí nghiệm sau khi tiêm vào xoang bụng, trong khi tất cả chuột được tiêm bởi dịch này sau xử lý nhiệt vẫn bình thường. Khi tiêm dịch nổi qua đường tĩnh mạch với liều 5ml/vịt gây chết 70% (7/10) và 10ml/vịt gây chết 100% (10/10) vịt thí nghiệm. Triệu chứng lâm sàng chủ yếu được ghi nhận là ủ rũ, kém vận động (100%), liệt chân, cổ và mí mắt (80%). Vịt chết không có bệnh tích đặc trưng, ở một số vịt chết có bệnh tích xuất huyết tim (15%) và phổi (10%).

Từ khóa: Vịt, độc lực và tính gây bệnh, *Clostridium botulinum*, Cần Thơ

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong vài năm gần đây, bệnh nhiễm độc tố vi khuẩn *Clostridium botulinum* hay còn được gọi là chứng cổ mềm (limberneck) xảy ra khá phổ biến trên vịt chạy đồng, đặc biệt là vào mùa khô và những tháng nóng nhất trong năm. Vịt chết với triệu chứng liệt mềm cổ, liệt mí mắt trong, liệt cánh và chân được người chăn nuôi

¹ Chi cục Thú Y Cần Thơ

địa phương gọi là bệnh “cúm cần”. Bệnh này gây tổn thất lớn cho người chăn nuôi do phát triển nhanh, tỷ lệ mắc bệnh và chết khá cao. *Clostridium botulinum* sản sinh ngoại độc tố (botulin) có tác dụng ức chế sản sinh acetylcholine là chất dẫn truyền tín hiệu từ đầu mút thần kinh đến cơ, gây ra liệt cơ. Độc chất này là một trong những nguyên nhân quan trọng trong các bệnh ngộ độc thực phẩm ở người và động vật. Kết quả nghiên cứu mức độ nhiễm vi khuẩn *Clostridium botulinum* ở vịt và môi trường chăn thả tại thành phố Cần Thơ đã phân lập được vi khuẩn này từ 14,77% (52/252) mẫu chất chứa trong ruột vịt và 27,71% (27/105) mẫu bùn (Nguyễn Đức Hiền, 2012). Tiếp nối nghiên cứu nói trên, bài báo này giới thiệu các kết quả xác định độc tính và đặc điểm bệnh lý do độc tố vi khuẩn *Clostridium botulinum* đã được phân lập gây ra nhằm cung cấp những thông tin cần thiết trong việc chẩn đoán bệnh này trên vịt.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu và đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Năm phân lập vi khuẩn *C. botulinum* từ các mẫu ruột vịt và 5 phân lập vi khuẩn này từ bùn nơi chăn thả vịt tại TP.Cần Thơ (Nguyễn Đức Hiền, 2012).

Chuột bạch thí nghiệm 30 ngày tuổi (Viện Pasteur TP. Hồ Chí Minh): 20 con.

Vịt thí nghiệm 60 ngày tuổi (Trại Chăn nuôi thực nghiệm, Công ty Chăn nuôi Vemedim): 100 con.

Vật liệu và phương tiện nghiên cứu

Môi trường TSA (Trypticase Soy Agar), TPGY broth (5% trypticase, 0,5% peptone, 0,4% glucose, 2% yeast extract, 0,1% sodium thioglycolate, pH=7.0), MCMM (modified cooked meat medium) (Difco, USA), dung dịch đệm gelatin (gelatin phosphate buffer). Buồng cấy vô trùng, các thiết bị và dụng cụ cần thiết dùng trong nuôi cấy vi khuẩn *Clostridium botulinum*.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phương pháp kiểm tra sự hiện diện của độc tố botulin của C. botulinum

Năm phân lập *C. botulinum* từ bùn, 5 phân lập *C. botulinum* từ ruột vịt trên môi trường TSA sẽ được lấy tiến hành kiểm tra sự hiện diện của độc tố botulin theo quy trình của Solomon and Lilly (1998).

Lấy khuẩn lạc của *C. botulinum* hòa vào ống nghiệm có chứa môi trường TPGY. Ủ yếm khí canh khuẩn ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó lấy 1ml cấy vào môi trường MCMM và ủ tiếp ở 35°C trong 5 ngày trong điều kiện yếm khí. Lấy 10ml huyền dịch sau khi ủ 5 ngày cho vào các ống nghiệm, đem ly tâm ở 12.000vòng/phút trong 15 phút ở nhiệt độ 5°C, vi khuẩn lắng đọng xuống đáy. Lấy phần nước trong (phần trên của ống ly tâm) được pha loãng với dung dịch đệm gelatin (gelatin phosphate buffer) với tỷ lệ 1:10. Phần nước trong này được sử dụng để khảo sát độc tính của độc tố *C. botulinum* (botulin).

Phần dịch trong bên trên sau khi thu hoạch sẽ được chia ra làm 2 phần, một phần đem đun 100°C trong 30 phút, một phần không đun, sau đó đem tiêm cho chuột. Mỗi ống canh khuẩn sẽ được tiêm cho 2 chuột vào xoang bụng với liều 1ml/con.

Theo dõi diễn biến đối với chuột thí nghiệm trong 48 giờ sau khi tiêm. Nếu trong canh khuẩn có độc tố của *C.botulinum* thì chuột lô I sống và 2 chuột ở lô II sẽ chết trong vòng 48 giờ với triệu chứng của đặc trưng do botulin là bại liệt chân sau, liệt cổ mềm, chảy nước dãi, khó thở trong khi đó chuột lô I sống (do độc tố đã bị phá hủy khi được xử lý bởi nhiệt độ).

2.2.2 Phương pháp khảo sát liều gây độc trên vịt của canh khuẩn *C. botulinum*

Để khảo sát liều gây độc của độc tố botulin do *C. botulinum* gây ra trên vịt chúng tôi chọn ngẫu nhiên 02 phân lập *C.botulinum* (01 phân lập từ mẫu bùn và 01 phân lập từ ruột vịt để khảo sát) từ 10 phân lập đã khảo sát trên chuột.

Quy trình chuẩn bị dung dịch để kiểm tra độc tố botulin được thực hiện giống như mục 2.2.1. Sau đó, chúng tôi thử nghiệm gây bệnh cho vịt thí nghiệm với hai đường tiêm tĩnh mạch và cho uống với các liều 1ml, 2ml, 5ml, 10ml (Shaw and Simson, 1936).

Bảng 1: Bố trí thí nghiệm gây bệnh thực nghiệm trên

Ký hiệu lô thí nghiệm	Liều tiêm (ml/vịt)	Đường tiêm	
		Tiêm tĩnh mạch (con)	Cho uống (con)
Clos.V1	1	5	5
Clos.V2	2	5	5
Clos.V3	5	5	5
Clos.V4	10	5	5
Clos.B1	1	5	5
Clos.B2	2	5	5
Clos.B3	5	5	5
Clos.B4	10	5	5

Clos. B: Mẫu kiểm tra botulin của vi khuẩn *C.botulinum* được phân lập từ bùn đất

Clos.V: Mẫu kiểm tra botulin của vi khuẩn *C.botulinum* được phân lập từ ruột vịt

2.2.3 Phương pháp khảo sát đặc điểm bệnh lý của vịt bệnh gây ra bởi độc tố *C. botulinum*

Việc khảo sát đặc điểm bệnh lý của vịt bệnh gây ra bởi độc tố *C. botulinum* được thực hiện bằng cách sử dụng canh khuẩn chứa độc tố botulin từ 02 phân lập *C. botulinum* (01 phân lập từ mẫu bùn và 01 phân lập từ ruột vịt), tiến hành gây nhiễm cho 20 vịt (mỗi chủng gây nhiễm 10 con vịt) bằng đường tiêm tĩnh mạch hoặc cho uống với liều 10ml/vịt. Sau đó khảo sát cẩn thận triệu chứng và bệnh tích ở vịt thí nghiệm.

Khảo sát triệu chứng

Triệu chứng của vịt thí nghiệm được khảo sát bằng cách quan sát và ghi chép những dấu hiệu lâm sàng vào phiếu theo dõi từng cá thể vịt 3 lần/ngày (6 giờ, 12 giờ, 18 giờ) từ khi được tiêm hoặc cho uống độc tố đến khi vịt chết. Biểu hiện lâm sàng được theo dõi là tình trạng đi đứng, hoạt động, bộ lông, tiếng kêu, phản ứng khi bị dồn đuổi, tình hình ăn uống, quan sát nhịp thở, tình trạng phân, tình trạng bơi lội.

Khảo sát bệnh tích

Vịt thí nghiệm được mổ khám khi sắp chết hoặc vừa chết, quan sát biến đổi ở từng hệ thống như thần kinh (não), hô hấp (khí quản, phổi), tuần hoàn (tim), tiêu hóa (thực quản, dạ dày tuyến, dạ dày cơ, ruột non, ruột già, hậu môn), da, cơ, mô liên kết, mô lympho và các cơ quan nội tạng khác như gan, lách, thận. Những biến đổi bệnh lý của từng cơ quan sẽ được ghi nhận trong biên bản mổ khám.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả xác định sự hiện diện của độc tố trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn *C. botulinum*

3.1.1 Kết quả kiểm tra độc tố *C. botulinum* trên chuột

Kết quả kiểm tra sự hiện diện của độc tố botulin trong 10 canh khuẩn *C. botulinum* phân lập được từ ruột vịt nghi mắc bệnh "cúm cần" và từ mẫu bùn lấy ở ao nước trại vịt được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2: Kết quả kiểm tra độc tố của *C. botulinum* từ mẫu sau khi nuôi cấy

Ký hiệu mẫu	Số chuột chết/số chuột thử nghiệm	
	Lô I (canh khuẩn chưa xử lý nhiệt)	Lô II (canh khuẩn đã xử lý nhiệt)
Clos.B1	2/2	0/2
Clos.B2	2/2	0/2
Clos.B3	2/2	0/2
Clos.B4	2/2	0/2
Clos.B5	2/2	0/2
Clos.V1	2/2	0/2
Clos.V2	2/2	0/2
Clos.V3	2/2	0/2
Clos.V4	2/2	0/2
Clos.V5	2/2	0/2

Clos. B: Mẫu kiểm tra botulin *C. botulinum* phân lập từ bùn.

Clos. V: Mẫu kiểm tra botulin *C. botulinum* phân lập từ ruột vịt.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy sau khi tiêm vào xoang bụng dịch nội chế từ canh khuẩn chưa qua xử lý nhiệt của 5 phân lập *C. botulinum* từ bùn và 5 phân lập từ ruột vịt, tất cả các chuột ở lô I đều chết trong thời gian 48 giờ với những triệu chứng bại liệt chân sau, liệt cổ mềm, chảy nước dãi, khó thở đặc trưng bởi ngộ độc botulin. Ngược lại, tất cả chuột lô II (được tiêm dung dịch canh khuẩn qua xử lý nhiệt) vẫn sống và không có biểu hiện bệnh lý bất thường nào.

Kết quả ở bảng 2 được lý giải bởi sau khi ly tâm các tế bào vi khuẩn đã bị loại khỏi canh khuẩn *C. botulinum*, như vậy yếu tố gây chết chuột là độc tố của vi khuẩn này (botulin). Do botulin dễ bị phá hủy bởi nhiệt độ (Nguyễn Như Thanh *et al.*, 2001), do đó tất cả chuột ở lô 2 (được tiêm dung dịch canh khuẩn qua xử lý nhiệt) vẫn sống. Kết quả trên cho thấy các phân lập *C. botulinum* từ bùn và từ ruột vịt đều có khả năng sản sinh độc tố sau quá trình ủ yếm khí trong 5 ngày trong môi trường MCMM.

3.2 Kết quả khảo sát liều gây bệnh trên vịt của độc tố botulin trên vịt

Kết quả khảo sát liều gây bệnh của canh khuẩn chứa độc tố botulin trên vịt được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3: Kết quả khảo sát liều gây bệnh cho vịt bằng canh khuẩn chứa độc tố botulin

Ký hiệu lô thí nghiệm	Liều gây nhiễm (ml/vịt)	Số vịt chết/số vịt gây nhiễm	
		Tiêm tĩnh mạch (con)	Cho uống (con)
Clos.V1	1	0/5	0/5
Clos.V2	2	0/5	0/5
Clos.V3	5	3/5	0/5
Clos.V4	10	5/5	4/5
Clos.B1	1	0/5	0/5
Clos.B2	2	0/5	0/5
Clos.B3	5	4/5	1/5
Clos.B4	10	5/5	3/5

Clos. V: Mẫu độc tố *C. botulinum* phân lập được từ ruột vịt.

Clos. B: Mẫu độc tố *C. botulinum* phân lập được từ mẫu bùn.

Kết quả ở bảng 3 cho thấy dung dịch nổi sau khi ly tâm canh khuẩn *C. botulinum* không gây chết vịt thí nghiệm với liều 1-2ml/vịt ở cả 2 đường tiêm tĩnh mạch và cho uống. Nhưng với liều 5 – 10ml/vịt có thể chết gây chết vịt thí nghiệm và vịt được tiêm tĩnh mạch có tỷ lệ chết cao hơn so với vịt được cho uống dung dịch canh khuẩn.

Kết quả thí nghiệm cho thấy với liều 5ml/vịt, có 70% (7/10) vịt chết khi được tiêm tĩnh mạch (3/5 con chết do *Clos. V* và 4/5 con chết do *Clos. B*) với triệu chứng điển hình của bệnh này là liệt cổ mềm, liệt cánh, liệt chân và chết trong vòng 6 ngày. Nhưng ở vịt được cho uống với cùng liều thì chỉ có 10% (1/10) vịt chết (chỉ có 1/5 vịt chết do *Clos. B*, 0/5 vịt chết do *Clos. V*), các vịt còn lại yếu ớt, đi đứng khó khăn, sau đó hồi phục dần. Với liều 10ml/vịt, tất cả vịt đều có biểu hiện triệu chứng đặc trưng do botulin trong vòng 3 – 4 giờ sau khi tiêm và 100% (10/10) vịt thí nghiệm bị chết trong vòng 4 ngày. Nhưng khi cho uống chỉ có 70% (7/10) vịt chết trong 6 ngày. Số vịt còn lại yếu ớt, sã cánh nhưng sau đó hồi phục. Kết quả tỷ lệ chết ở vịt thí nghiệm qua đường uống thấp hơn so với đường tiêm tĩnh mạch có thể được lý giải bởi độc tố botulin có thể bị phân hủy bởi men trypsin ở ruột khi đi qua đường tiêu hóa (Solomon and Lilly, 1998; Shone *et al.*, 1985).

Kết quả thí nghiệm này cho thấy liều gây chết 100% vịt sau khi tiêm tĩnh mạch dịch nổi ly tâm canh khuẩn pha loãng 1/10 là 10ml/con. Kết quả khảo sát nói trên phù hợp với nghiên cứu của Boroff (1959), khi nghiên cứu về độc tố của *C. botulinum* cho rằng liều gây bệnh ở vịt phải cao hơn ở chuột gấp 10 lần.

Từ kết quả ghi nhận được cho thấy khả năng gây bệnh của botulin ở vịt phụ thuộc vào liều và đường gây nhiễm. Với những liều thấp không đủ gây chết vịt và sau khi có triệu chứng ngộ độc, vịt có thể hồi phục. Kết quả trên cũng phù hợp với kết quả thí nghiệm một số tác giả khi nghiên cứu gây nhiễm cho vịt (Notermans *et al.*, 1980; Jensen and Duncan, 1980) cho thấy botulin qua đường uống có tính độc tương đối thấp hơn so với các đường khác.

3.3 Kết quả khảo sát đặc điểm bệnh lý ở vịt khi gây nhiễm độc tố botulin

Kết quả theo dõi triệu chứng lâm sàng ở vịt gây nhiễm bằng phương pháp tiêm vào tĩnh mạch với liều 10 ml/con dung dịch nổi sau khi ly tâm canh khuẩn *C. botulinum* pha loãng 1/10 được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4: Kết quả biểu hiện triệu chứng lâm sàng trên vịt thí nghiệm

Triệu chứng (*)	Số vịt có biểu hiện triệu chứng/Số vịt thí nghiệm			Tỷ lệ (%)
	Clos.V	Clos.B	Tổng	
Kém vận động, ủ rũ	10/10	10/10	20/20	100
Liệt cổ	9/10	7/10	16/20	80
Tiêu chảy phân xanh	1/10	2/10	3/20	15
Liệt chân	9/10	4/10	13/20	65
Chảy nước mũi	2/10	2/10	4/20	20
Liệt mí mắt, đồng tử giãn rộng	6/10	4/10	10/20	50

Clos. B: Mẫu độc tố của *C.botulinum* phân lập được từ bùn.

Clos.V: Mẫu độc tố của *C.botulinum* phân lập được từ ruột vịt

(*): Các số liệu được quan sát từ ngày thứ 2 sau khi tiêm dung dịch chế từ canh khuẩn của *C. botulinum* với liều 10ml/vịt.

Kết quả ở bảng 4 cho thấy 100% vịt có biểu hiện ủ rũ, chỉ đi lại khi bị dồn đuổi, tuy đi đứng rất yếu ớt nhưng vẫn còn ăn được. Các biểu hiện liệt cổ chiếm 80%, liệt chân với tỷ lệ 65%, và biểu hiện liệt mí mắt, có đồng tử giãn rộng chiếm 50% số vịt khảo sát. Một số vịt bị tiêu chảy, phân có màu xanh lá cây nhạt và vài con có chất nhầy chảy ra từ miệng (15-20%).

Kết quả khảo sát về các biểu hiện triệu chứng lâm sàng sau khi gây nhiễm thực nghiệm ở trên của chúng tôi phù hợp với một số nghiên cứu về bệnh do nhiễm độc tố botulin trên một số loài gia cầm. Các tác giả Dohms (1987), Rosen (1971), Clark (1987), Jeffery *et al.* (1994) nhận định, triệu chứng lâm sàng ở vịt, gà, gà tây, gà lôi thì tương tự nhau, chủ yếu là liệt chân, cánh, cổ và mí mắt. Chính vì triệu chứng điển hình này mà lúc đầu bệnh được đặt tên “chứng cổ mềm” (Limberneck). Ở gà, các tài liệu mô tả còn có biểu hiện lông xù, rụng lông. Tuy nhiên, trong thí nghiệm này chúng tôi không thấy vịt bị rụng lông, có thể đây là đặc điểm riêng của vịt.

Kết quả mổ khám những vịt thí nghiệm ngay sau khi vừa mới chết để quan sát bệnh tích được trình bày ở bảng 5.

Kết quả ở bảng 5 cho thấy chỉ có 15% (3/20) trường hợp xuất huyết ở tim và 10% (2/20) xuất huyết ở phổi, không có bệnh lý ở các cơ quan nội tạng khác.

Bảng 5: Kết quả bệnh tích đại thể trên vịt thí nghiệm

Bệnh tích (*)	Số vịt có biểu hiện bệnh tích/Số vịt thí nghiệm			Tỷ lệ (%)
	Clos.V	Clos.B	Tổng	
Tim xuất huyết	2/10	1/10	3/20	15
Phổi xuất huyết	1/10	1/10	2/20	10

Clos.V: Mẫu độc tố *C.botulinum* phân lập được từ ruột vịt

Clos.B: Mẫu độc tố *C.botulinum* phân lập được từ bùn.

(*): Các số liệu được quan sát từ ngày thứ 4 sau khi tiêm dung dịch chế từ canh khuẩn của *C. botulinum* với liều 10ml/vịt.

Kết quả này phù hợp với mô tả của nhiều tài liệu cho biết hầu hết các trường hợp ngộ độc tố botulin đều không thể hiện bệnh tích đặc trưng. Khi nghiên cứu về độc tố botulin ở thủy cầm hoang dã, Jensen and Duncan (1980), gây nhiễm cho vịt trời (*Anas platyrhynchos*), bằng độc tố botulin C1 và C2 thấy hầu hết các trường hợp vịt chết bởi độc tố botulin C1 là do liệt hô hấp, còn bởi botulin C2 là do phù và xuất huyết phổi, ngoài ra không phát hiện được bệnh tích đặc trưng nào.

Từ những triệu chứng và bệnh tích quan sát được trong những thí nghiệm ở trên, chúng tôi có thể kết luận là bệnh “cúm cần” thường xảy ra trên vịt chạy đồng ở các huyện thuộc thành phố Cần Thơ trong thời gian qua là do bị nhiễm độc tố của *C. botulinum* gây nên.

4 KẾT LUẬN

Vi khuẩn *C. botulinum* phân lập được từ ruột vịt mắc bệnh “cúm cần” ở các trại chăn nuôi vịt Cần Thơ và từ bùn ao ở trại nuôi vịt có thể gây chết 100% chuột thí nghiệm khi tiêm vào xoang bụng 1ml/con dịch nổi sau ly tâm canh khuẩn nuôi cấy 5 ngày trong điều kiện yếm khí trên môi trường MCMM pha loãng 1/10. Ngược lại, nếu xử lý nhiệt dịch này trước khi tiêm thì tất cả vịt đều sống bình thường.

Tiêm vào tĩnh mạch 10 ml dịch nổi sau ly tâm canh khuẩn pha loãng 1/10 của hai phân lập *C. botulinum* gây chết 100% vịt, trong khi bằng đường uống dịch này chỉ gây chết 70% số vịt thí nghiệm.

Các triệu chứng liệt cổ, mí mắt và chân xuất hiện phổ biến trên vịt thí nghiệm đặc trưng cho bệnh nhiễm độc tố botulin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Boroff D.A., Reilly J.R. (1959), “Studies of the toxin of *Clostridium botulinum*. Prophylactic immunization of pheasants and ducks against avian botulism”, *J Bacteriol* 77, pp. 142-146.
- Clark W.E. (1987), “Avian botulism”, In Eklund M.W., and Dowell V.R., (eds.), *Avian Botulism: An International Perspective*. Charles C. Thomas: Springfield, IL, pp. 89-105
- Dohms J.E. (1987). “Laboratory investigation of botulism in poultry”, In Eklund M.W., and Dowell V.R. (eds.), *Avian Botulism: An International Perspective*. Charles C. Thomas: Springfield, IL, pp. 295-314.
- Jeffery J.S., Galey F.D., Meteyer C.V., Kinde H. and Rezvani M. (1994), “Type C botulism in turkeys: Determination of the median toxic dose”, *J Vet Diagn Invest*, 6, pp. 93-95.
- Jensen W.I., Duncan R.M. (1980), “The susceptibility of the mallard duck (*Anas platyrhynchos*) to *Clostridium botulinum* C2 toxin”, *Jpn J Med Sci Biol* 1980 Apr, 33(2), pp. 81-6.
- Nguyễn Đức Hiền (2012). Phân lập và xác định tính nhạy cảm đối với kháng sinh của vi khuẩn *Clostridium botulinum* từ vịt và môi trường chăn thả tại thành phố Cần thơ (tài liệu chưa công bố).
- Nguyễn Như Thanh, Nguyễn Bá Hiền, Trần Thị Lan Hương (2001), *Vi sinh vật học thú y*. Nhà xuất bản Nông nghiệp Hà Nội.
- Notermans S., Dufrenne J. and Kozaki S. (1980), “Experimental botulism in Pekin ducks”. *Avian Dis.*, 24(3), pp. 658-64.
- Rosen M.N., (1971), “Botulism”, In Davis J. W., Anderson R. C., Karstad L. and Trainer D. O. (eds.), “*Infectious and Parasitic Diseases of Wild Birds*”, Iowa State University Press: Ames, IA, pp. 100-117.
- Shaw R. M., Simpson G. S. (1936), “The anaerobic bacteria: their activities in nature and disease”, A Subject Bibliography-By Elizabeth. McCoy and L. S. McClung.
- Shone CC, Hambleton P, Melling J. Inactivation of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin by trypsin and purification of two tryptic fragments. Proteolytic action near the COOH-terminus of the heavy subunit destroys toxin-binding activity. *Eur J Biochem.* 151(1), pp. 75-82
- Solomon H. M. and Lilly T. (1998), “*Clostridium botulinum*”, *Bacteriological Analytical Manual*, 8th Ed. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070879.htm>