

PHÂN LẬP, XÁC ĐỊNH CÁC YẾU TỐ ĐỘC LỰC CỦA VI KHUẨN *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* TRÊN GÀ

Nguyễn Thị Thắm¹, Vũ Khắc Hùng², Nguyễn Đức Tân¹,
Phạm Khánh Nam¹, Vũ Thái Thân¹, Lê Lập¹

TÓM TẮT

Chúng tôi thu thập 497 mẫu phân gà (231 mẫu từ gà nghi mắc bệnh viêm ruột hoại tử và 266 mẫu từ gà khỏe) để phân lập vi khuẩn *Clostridium perfringens*. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ vi khuẩn *C. perfringens* phân lập được ở gà nghi mắc bệnh là 58% và ở gà khỏe mạnh là 24,06%. Kết quả xác định type độc tố bằng phản ứng Multiplex-PCR cho thấy 198 chủng *C. perfringens* phân lập từ gà bệnh và gà khỏe đều thuộc type A. Trong số 134 chủng phân lập từ gà bệnh, 39 (29,10%) chủng mang gen *netB*, 3 (2,24%) chủng mang gen *cpe* và 1 (0,74%) chủng mang gen *netB* và *cpe*. Tỷ lệ các chủng mang gen *netB*, *cpe* trong 64 chủng phân lập từ gà khỏe lần lượt là 26,57% (17/64) và 1,56% (1/64). Khi gây nhiễm cho gà 28 ngày tuổi bằng các chủng *C. perfringens* phân lập từ thực địa, gà biểu hiện các triệu chứng, bệnh tích như một số tài liệu trước đây đã mô tả.

Từ khóa: *Clostridium perfringens*, type độc tố, gen độc lực, gây nhiễm, gà.

Isolating *Clostridium perfringens* from chickens and determining its virulence factors

Nguyen Thi Tham, Vu Khac Hung, Nguyen Duc Tan,
Pham Khanh Nam, Vu Thai Than, Le Lap

SUMMARY

In this research, 497 fecal samples from the chickens, including 231 samples from the suspected chickens suffering with necrotic enteritis and 266 samples from the healthy chickens were collected for isolating *Clostridium perfringens*. The studied results showed that the prevalence of *C. perfringens* in the suspected and healthy chickens were 58% and 24.06%, respectively. The results of toxin type determination, using Multiplex-PCR, proved that all of the 198 *C. perfringens* strains belonged to type A. Among 134 *C. perfringens* strains isolated from the diseased chickens, 39 (29.10%) strains harbored *netB* gene, 3 (2.24%) strains carried *cpe* gene, and 1 (0.74%) strain had *netB* and *cpe* gene. The percentages of *C. perfringens* strains carried *netB* and *cpe* genes among 64 strains isolated from the healthy chickens were 26.57% (17/64) and 1.56% (1/64), respectively. Experimental infection for the chickens at 28 days old with the field *C. perfringens* strains was carried out. The infected chickens showed the symptoms and lesions as described in the previous documents.

Keywords: *Clostridium perfringens*, type toxin, toxin genes, experimental infection, chicken.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh viêm ruột hoại tử (VRHT) ở gà được Parish mô tả lần đầu tiên vào năm 1961 tại Anh (Parish, 1961), là một trong những tác nhân gây thiệt hại kinh tế lớn đối với chăn nuôi gà (Ficken và

cs., 1997). Nguyên nhân gây bệnh VRHT ở gà được xác định là do vi khuẩn *Clostridium perfringens*. *C. perfringens* là trực khuẩn yếm khí, gram dương, có khả năng hình thành nha bào, được chia thành 5 type (toxintype) là A, B, C, D, E căn cứ vào sự sản sinh ra các loại độc tố: Type A sinh độc tố alpha; type B

¹ Phòng kỹ thuật và phát triển sản phẩm, Phân viện Thú y miền Trung

² Bộ môn Công nghệ sinh học, Phân viện Thú y miền Trung

sinh độc tố alpha, beta, epsilon; type C sinh độc tố alpha, beta; type D sinh độc tố alpha, epsilon; type E sinh độc tố alpha, iota. Vi khuẩn *C. perfringens* sản sinh nhiều loại độc tố gây ra các thể bệnh khác nhau như bệnh nhiễm độc độc tố máu (enterotoxemia), bệnh hoại thư sinh hơi (gas gangrene), bệnh viêm ruột hoại tử (necrotic enteritis)... Bệnh VRHT ở gà chủ yếu do vi khuẩn *C. perfringens* type A gây ra; một số ít bệnh VRHT ở gà do type C gây ra (Kalender, 2005; Cooper và Songer, 2009).

Những nghiên cứu trước đây cho rằng độc tố alpha là nguyên nhân chính gây bệnh VRHT ở gà (Songer, 1996). Những năm gần đây, bằng thực nghiệm gây đột biến gen mã hóa độc tố alpha, một số nghiên cứu đã chứng minh rằng độc tố alpha không phải là độc tố chính gây bệnh VRHT, các tác giả đã phát hiện một loại độc tố mới, độc tố *netB* là tác nhân chính gây ra các bệnh tích điển hình của bệnh VRHT ở gà (Keyburn và cs., 2008, 2010, 2013).

Bệnh VRHT do vi khuẩn *C. perfringens* là bệnh gây nhiều thiệt hại về kinh tế đối với chăn nuôi gà tại nước ta, tuy nhiên có rất ít nghiên cứu về bệnh này được công bố. Xuất phát từ thực tế đó, chúng tôi tiến hành đề tài: “*Phân lập, xác định các yếu tố độc lực của vi khuẩn Clostridium perfringens trên gà*”.

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

2.1. Nội dung nghiên cứu

Phân lập, xác định tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *C. perfringens* trong phân gà khỏe và gà nghi mắc bệnh VRHT.

Xác định một số đặc tính sinh vật hoá học của các chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập được.

Xác định type độc tố, yếu tố độc lực và khả năng gây bệnh của các chủng *C. perfringens* phân lập được.

2.2. Nguyên liệu nghiên cứu

2.2.1. Mẫu phân

Lấy từ trực tràng của gà nghi mắc bệnh VRHT và gà khỏe mạnh

2.2.2. Các loại môi trường nuôi cấy phân lập

Fluid thioglycolate; Egg yolk agar; TSC agar; SPS agar, Litmus milk, các loại đường đơn: glucose, lactose, sucrose, maltose

Các loại hoá chất và môi trường thông thường trong phòng thí nghiệm.

2.2.3. Các sinh phẩm dùng cho phản ứng PCR

Taq DNA polymerase, dNTPs, agarose, DNA ladder, TBE buffer, ethidium bromide.

Các cặp mồi xác định gen độc tố (bảng 1).

Bảng 1. Trình tự nucleotide của các cặp mồi để xác định gen độc tố

STT	Gen	Mồi	Trình tự các cặp mồi (5'-3')	Kích thước sản phẩm PCR	TLTK
1	<i>Cpa</i>	Cpa-F Cpa-R	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CCTCTGATACATCGTGTAAG	324 bp	Songer và Dawn (1999)
2	<i>Cpb</i>	Cpb-F Cpb-R	GCGAATATGCTGAATCATCTA GCAGGAACATTAGTATATCTTC	196 bp	
3	<i>Etx</i>	Etx-F Etx-R	GCGGTGATATCCATCTATTC CCACTTACTTGTCTACTAAC	655 bp	
4	<i>IA</i>	IA-F IA-R	ACTACTCTCAGACAAGACAG CTTTCCTTCTATTACTATACG	446 bp	
5	<i>Cpe</i>	Cpe-F Cpe-R	GGAGATGGTTGGATATTAGG GGACCAGCAGTTGTAGATA	233 bp	Tolooe và cs. (2011)
6	<i>Cpb2</i>	Cpb-F Cpb-R	AGATTTTAAATATGATCCTAACC CAATACCCTTCACCAAATACTC	567 bp	
7	<i>NetB</i>	NetB-F NetB-R	GCTGGTGCTGGAATAAATGC TCGCCATTGAGTAGTTTGGG	384 bp	

2.2.4. Động vật thí nghiệm

Gà con 28 ngày tuổi.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập và giám định các đặc tính sinh vật hoá học của vi khuẩn *C. perfringens* theo phương pháp của Quinn và cs. (2004) và sử dụng hệ thống định danh vi khuẩn Vitek2, tại phòng thí nghiệm Phân viện Thú y miền Trung.

Phương pháp đếm số vi khuẩn *C. perfringens*: Đếm số vi khuẩn *C. perfringens* trong 1 gram phân theo phương pháp pha loãng và cấy lãng trên môi trường thạch TSC.

Xác định type độc tố bằng phản ứng Multiplex-PCR theo phương pháp của Songer và Dawn (1999).

Kiểm tra độc lực các chủng *C. perfringens* phân lập được trên gà theo mô tả của Olkowski và cs. (2006).

Xử lý số liệu sử dụng phần mềm Excel 2007.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *C. perfringens* từ gà

Từ năm 2016 đến năm 2019, chúng tôi đã thu thập 497 mẫu phân gà để phân lập vi khuẩn *C. perfringens*, trong đó có 266 mẫu phân từ gà khỏe mạnh và 231 mẫu phân từ gà nghi mắc bệnh VRHT. Kết quả cho thấy tỷ lệ phân lập được vi khuẩn *C. perfringens* ở mẫu phân gà nghi mắc bệnh là 58%, trong khi đó ở gà khỏe mạnh là 24,06% (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả phân lập vi khuẩn *C. perfringens* trên gà khỏe mạnh và gà nghi mắc bệnh

Mẫu	Số mẫu phân lập	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)	Số lượng CFU/gram phân
Phân gà khỏe mạnh	266	64	24,06	< 10 ⁴
Phân gà nghi mắc bệnh	231	134	58,00	> 10 ⁶
Tổng cộng	497	198	39,83	

Ghi chú: CFU: Colony form units – đơn vị hình thành khuẩn lạc

Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Shahdadnejad và cs. (2016) tại Iran với 50/122 mẫu phân của gà nghi mắc bệnh VRHT phân lập được vi khuẩn *C. perfringens*. Tuy nhiên, kết quả của chúng tôi cao hơn so với kết quả của Kalender (2005) khi tác giả này xét nghiệm 160 mẫu phân gà khỏe mạnh từ Thổ Nhĩ Kỳ chỉ có 5% mẫu dương tính với *C. perfringens*. Nguyên nhân do tác giả này lấy mẫu từ các trang trại gà dùng thức ăn có bổ sung kháng sinh nên tỷ lệ phân lập được vi khuẩn thấp hơn. Song song với phân lập vi khuẩn *C. perfringens*, chúng tôi tiến hành đếm số lượng vi khuẩn. Kết quả cho thấy số lượng vi khuẩn ở gà khỏe mạnh là

<10⁴ CFU/g và ở gà nghi mắc bệnh là >10⁶ CFU/g. Kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả của Shojadoost và cs. (2012), nhóm tác giả này nhận thấy số lượng vi khuẩn *C. perfringens* trong mẫu phân của gà khỏe mạnh khoảng 10²-10⁴ CFU/g trong khi đó ở gà bị bệnh là 10⁷ - 10⁹ CFU/g.

3.2. Kết quả xác định các đặc tính sinh vật, hóa học của vi khuẩn *C. perfringens* phân lập trên gà

Sau khi phân lập chúng tôi chọn 114 chủng đại diện để kiểm tra các đặc tính sinh hóa theo phương pháp của Quinn và cs. (2004) (bảng 3).

Bảng 3. Kết quả kiểm tra các đặc tính sinh hóa của các chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập được trên gà

STT	Tính chất	Số chủng kiểm tra	Số chủng dương tính	Tỷ lệ (%)
1	Gram	114	114	100
2	Di động	114	0	0
3	Indole	114	0	0
4	Urease	114	0	0
5	Glucose	114	114	100
6	Lactose	114	114	100
7	Maltose	114	114	100
8	Sucrose	114	114	100
10	Sinh hơi	114	114	100
11	Mannitol	114	0	0
12	Egg yolk (vòng trắng sữa do sản sinh Lecithinase)	114	114	100
13	Litmus milk (vón cục)	114	114	100
14	Thạch TSC (khuẩn lạc tròn đen)	114	114	100
15	Dung huyết trên thạch máu	114	114	100
16	OF-Test (lên men và oxi hóa)	114	114	100
17	Camp-Test (tăng khả năng dung huyết)	114	114	100
18	Khả năng làm dung giải gelatin	114	114	100

Kết quả cho thấy các chủng phân lập được mang đầy đủ các đặc tính như các tài liệu đã mô tả.

3.3. Kết quả xác định type độc tố của các chủng *C. perfringens* phân lập từ gà

Sau khi kiểm tra các đặc tính sinh hóa, chúng tôi tiến hành xác định type độc tố của các chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập được. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả xác định type độc tố của các chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ gà

Nguồn gốc chủng	Số chủng kiểm tra	Type A		Type B		Type C		Type D		Type E	
		n+	%	n+	%	n+	%	n+	%	n+	%
Phân gà khỏe	64	64	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Phân gà bệnh	134	134	100	0	0	0	0	0	0		
Tổng số	198	198	100	0	0	0	0	0	0	0	0

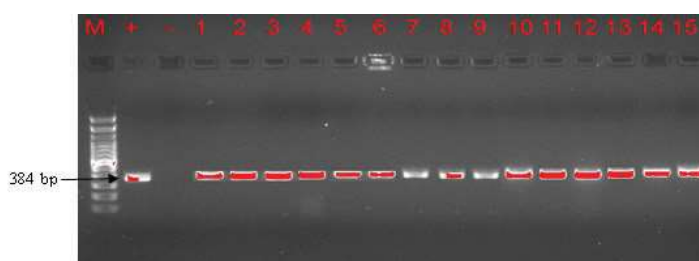
Kết quả cho thấy tất cả các chủng phân lập được từ gà nghi bị bệnh và gà khỏe đều thuộc type A. Kết quả của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu trước đây của Park và cs. (2015), nhóm tác giả này xác định type độc tố của 88 chủng *C. perfringens* từ gà bị VRHT và 50 chủng phân lập từ gà khỏe mạnh bằng Multiplex-PCR và

tất cả các chủng đều thuộc type A. Trong một nghiên cứu khác của Nauerby và cs. (2003), khi phân tích 279 chủng phân lập từ gà bệnh và gà khỏe mạnh thì tất cả 279 chủng đều thuộc type A, điều này chứng tỏ type A là type lưu hành chính trên gà.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm Multiplex-PCR

M: Marker, 100 bp; giếng 1-4: Đối chứng dương (giếng 1: Type A; giếng 2: Type B; giếng 3: Type C; giếng 4: Type D); giếng 5: Đối chứng âm; giếng 6 - 17: Các chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ gà.



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định gen mã hóa độc tố netB

Giếng M: Marker, 100 bp; giếng (+): Đối chứng dương; giếng (-): Đối chứng âm; giếng 1-15: Các chủng *C. perfringens* dương tính với gen netB.

3.4. Kết quả xác định các gen độc tố của các chủng *C. perfringens* phân lập từ gà

Kết quả xác định các gen độc tố của các chủng *C. perfringens* được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả xác định gen mã hóa enterotoxin, beta 2 toxin và netB toxin

Nguồn gốc chủng	Số chủng kiểm tra	Cpa		cpe		Cpb2		netB		netB, cpe, Cpa	
		n+	%	n+	%	n+	%	n+	%	n+	%
Phân gà khỏe	64	64	100	1	1,56	0	0	17	26,56	0	0
Phân gà bệnh	134	134	100	3	2,38	0	0	39	29,01	1	0,74
Tổng số	198	198	100	4	2,29	0	0	65	29,82	1	0,46

Độc tố alpha được xem là một trong những yếu tố độc lực của các chủng *C. perfringens* gây bệnh VRHT trên gia cầm (Timbermont và cs., 2011). Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận thấy tất cả các chủng phân lập được đều mang gen *Cpa*. Tương tự như kết quả của chúng tôi, nhóm nghiên cứu Heikinheimo và Korkeala (2005) từ Phần Lan, Park và cs. (2012) từ Hàn Quốc đều phát hiện 100% các chủng *C. perfringens* phân lập từ gà khỏe mạnh và

gà bị bệnh đều mang gen này. Gần đây, độc tố netB (necrotic enteritis toxin B) được nhiều nhóm nghiên cứu xem là độc tố chính gây bệnh VRHT trên gà. Nghiên cứu của Keyburn và cs. (2013) cho thấy, khi loại bỏ gen netB thì chủng *C. perfringens* không còn khả năng gây bệnh, ngược lại chủng mang gen netB hoặc độc tố của chúng khi gây nhiễm cho gà thì xuất hiện triệu chứng, bệnh tích điển hình của bệnh VRHT. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nhận

thấy gen độc tố *netB* được tìm thấy ở cả các chủng *C. perfringens* phân lập từ gà khỏe mạnh (17/64) và gà bị bệnh (39/134). Kết quả của chúng tôi có sự sai khác so với Park và cs. (2015) tại Hàn Quốc. Nhóm tác giả này nhận thấy gen độc tố *netB* được tìm thấy nhiều hơn ở gà bị chết do VRHT (47,1%) so với gà khỏe mạnh (4%). Tuy nhiên, nhóm tác giả này phân lập từ gà chết do bệnh VRHT nên tỷ lệ chủng *C. perfringens* cao hơn so với chúng tôi. Mặt khác, không phải tất cả các chủng *C. perfringens* phân lập từ gà khỏe mạnh mang gen *netB* đều sản sinh độc tố. Nhóm nghiên cứu của Abildgaard và cs. (2010) khi kiểm tra khả năng sản sinh độc tố của các chủng *C. perfringens* mang gen *netB* phân lập từ gà khỏe mạnh và gà ốm, kết quả cho thấy chỉ có 4/14 chủng mang gen *netB* phân lập từ gà khỏe có khả năng sản sinh độc tố *netB*, trong khi đó 12/13 chủng mang gen *netB* phân lập từ gà ốm có khả năng sản sinh độc tố. Điều đó chứng tỏ rằng cần một cơ chế khác để các chủng *C. perfringens* mang

gen *netB* sản sinh độc tố. Một trong những độc tố quan trọng của vi khuẩn *C. perfringens* là độc tố đường ruột (Enterotoxin), độc tố này chỉ chiếm tỷ lệ rất nhỏ trong các chủng vi khuẩn này. Labbe (2000), Engstrom và cs. (2003) cho rằng, gen độc tố *cpe* chỉ chiếm khoảng < 5% trên tổng số các chủng *C. perfringens* phân lập được trên toàn cầu. Nhận xét này cũng phù hợp với nghiên cứu của chúng tôi, chỉ có 3/134 chủng phân lập từ gà bệnh và 1/64 chủng phân lập từ gà khỏe mang gen *cpe*. Ngoài ra chúng tôi tìm thấy 1 chủng phân lập từ gà bị bệnh mang đồng thời 2 gen độc tố *netB* và *cpe*.

3.5. Kết quả kiểm tra khả năng gây bệnh

Sau khi kiểm tra các gen độc tố, chúng tôi chọn 3 chủng *C. perfringens* mang gen độc tố phân lập từ gà bị bệnh gây nhiễm cho gà như mô tả của Olkowski và cs. (2006). Mỗi chủng gây nhiễm cho 10 gà con 28 ngày tuổi, kết quả được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Kết quả kiểm tra khả năng gây bệnh của vi khuẩn phân lập được trên gà

Chủng vi khuẩn	Yếu tố độc lực	Số gà gây nhiễm (con)	Liều gây nhiễm (CFU/con)	Đường gây nhiễm	Số gà bị bệnh	Số gà chết	Biểu hiện sau khi gây nhiễm
CG36	<i>Cpa</i> , <i>Cpe</i>	10	5 x 10 ⁹	Đường uống	7	0	Gà ăn ít, lông xù, tiêu chảy, phân màu nâu, lười vận động
CG69	<i>Cpa</i> , <i>NetB</i>	10	5 x 10 ⁹	Đường uống	8	1	Gà ăn ít, lông xù, tiêu chảy, phân màu nâu, lười vận động
CG83	<i>Cpa</i> , <i>NetB</i> , <i>cpe</i>	10	5 x 10 ⁹	Đường uống	7	1	Gà ăn ít, lông xù, tiêu chảy, phân màu nâu, lười vận động
Gà đối chứng		5	10 ml môi trường	Đường uống	0	0	Bình thường

Bảng 6 cho thấy 7/10 gà tiêm chủng CG36 mang gen *Cpa* và *cpe* có biểu hiện triệu chứng bệnh và 3 con không phát bệnh. Ở nhóm gà gây nhiễm với chủng CG69 mang gen *Cpa* và *netB*, 9/10 con phát bệnh trong đó có 1 con chết ở ngày thứ 3. Ở nhóm gà gây nhiễm với chủng CG83 mang đồng thời 3 gen độc tố, có 8 gà phát bệnh trong đó 1 con chết ở ngày thứ 3. Sau 3 ngày,

tiến hành mổ khám những gà có triệu chứng tiêu chảy để kiểm tra bệnh tích, thấy niêm mạc ruột xuất huyết, có những vết loét điển hình tại ruột non, gan sưng ở tất cả gà được mổ khám. Tất cả những gà phát bệnh đều phân lập lại được vi khuẩn *C. perfringens* gây nhiễm ban đầu thông qua kiểm tra các gen độc tố bằng phản ứng PCR. Kết quả của chúng tôi phù hợp với kết quả gây

nhiễm của Olkowski và cs. (2006) và Keyburn và cs. (2012). Hai nhóm tác giả trên cũng nhận thấy khi gây nhiễm thực nghiệm cho gà bằng các chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ gà bị bệnh VRHT thì gà cũng có các bệnh tích như xuất huyết niêm mạc ruột, các vết loét điển hình trên ruột non, gan sưng to và rất ít khi thấy

các điểm hoại tử như ngoài thực địa. Nghiên cứu này của chúng tôi có 2 chủng gây chết gà, mỗi chủng gây chết 1 gà, có thể 2 chủng này mang đồng thời 2 và 3 gen độc tố nên độc lực cao hơn so với các chủng mà hai nhóm trên sử dụng để gây bệnh thực nghiệm (Shojadoost và cs., 2012).



Hình 3. Bệnh tích gà sau khi gây nhiễm *C. perfringens*

1: Gà tiêu chảy; 2: Ruột non viêm, xung huyết (mũi tên xanh), loét và xuất huyết (mũi tên đỏ), gan viêm và hoại tử (mũi tên đen)

IV. KẾT LUẬN

Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *C. perfringens* ở gà nghi mắc bệnh viêm ruột hoại tử là 58% và ở gà khỏe mạnh là 24,06%.

Phân lập được 198 chủng *C. perfringens* từ 497 mẫu phân gà khỏe mạnh và gà bị bệnh. Các chủng đều mang các đặc tính sinh hóa như đã mô tả trước đây, đều thuộc type A.

Trong số 134 chủng phân lập từ gà bệnh, 39 (29,10%) chủng mang gen *netB*, 3 chủng mang gen *cpe* và 1 chủng mang gen *netB* và *cpe*. Tỷ lệ các chủng mang gen *netB*, *cpe* trong 64 chủng phân lập từ gà khỏe lần lượt là 26,57% (17/64) và 1,56% (1/64).

Khi gây nhiễm cho gà 28 ngày tuổi bằng các chủng *C. perfringens* phân lập từ thực địa, gà biểu hiện các triệu chứng, bệnh tích như một số tài liệu trước đây đã mô tả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abildgaard L., Sondergaard T.E., Engberg R.M., Schramm A. and Højberg O., 2010.

In vitro production of necrotic enteritis toxin B, *netB*, by *netB*-positive and *netB*-negative *Clostridium perfringens* originating from healthy and diseased broiler chickens. *Veterinary Microbiology*, 144(1-2):231-5.

2. Cooper K.K., Trinh H.T., Songer J.G., 2009. Immunization with recombinant alpha toxin partially protects broiler chicks against experimental challenge with *Clostridium perfringens*. *Vet Microbiol*, 133:pp. 92-97.
3. Engstrom B.E., Fermer C., Lindberg A., Saarinen E., Baverud V. and Gunnarsson A., 2003. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from health and diseased poultry. *Veterinary Microbiology*, 94, 225-235.
4. Ficken M.D. and Wages, D.P., 1997. Diseases of Poultry. *Mosby-Wolfe*. Ames, Iowa, USA. pp. 261-264.
5. Heikinheimo A. and Korkeala H., 2005. Multiplex PCR assay for toxinotyping *Clostridium perfringens* isolates obtained from Finnish broiler chickens. *Letters in Applied*

- Microbiology*, 40(6):407-11.
6. Kalender H., 2005. Isolation of *Clostridium perfringens* from chickens and detection of the alpha toxin gene by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Turk J. Vet. Anim Sci.* 29: 847-851.
 7. Keyburn A.L., Yan X.X., Bannam T.L., Van I.F., Rood J.I. and Moore R.J., 2010. Association between Avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing *netB* toxin. *Veterinary Research* 41, 1-8.
 8. Keyburn A.L., Boyce J.D., Vaz P., Bannam T.L., Ford M.E., Parker D., Rubbo A.D., Rood J.L. and Moore R.J. 2008. *netB*, a new toxin that is associated with Avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathogens*. Feb; 4(2): e26.
 9. Keyburn A.L., Portela R.W., Sproat K., Ford M.E., Bannam T.L., Yan X., Rood J.I. and Moore R.J., 2013. Vaccination with recombinant *netB* toxin partially protects broiler chickens from necrotic enteritis. *Veterinary Research*. 44:1-8.
 10. Labbe R.G., 2000. *Clostridium perfringens*. In *the Microbiological Safety and Quality of Food* ed. Lund B. Bair-Parker T, and Guold G .pp 1110-1135. Gainthersburg, MD. Aspen Publishers.
 11. Nauerby B., Pedersen K. and Madsen M., 2003. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Veterinary Microbiology* ; 94(3):257-66.
 12. Olkowski A.A., Wojnarowicz C., Chirino-Trejo M. and Drew M.D., 2006. Responses of broiler chickens orally challenged with *Clostridium perfringens* isolated from field cases of necrotic enteritis. *Research in Veterinary Science*;81(1):99-108. Epub 2005 Dec 9.
 13. Parish W.E., 1961. II. Examination of the causal *Clostridium welchii*. *Journal of Comparative Pathology* 71, pp. 394-404
 14. Park J.Y., Kim S., Oh J.Y., Kim H.R., Jang I., Lee H.S. and Kwon Y.K., 2015. Characterization of *Clostridium perfringens* isolates obtained from 2010 to 2012 from chickens with necrotic enteritis in Korea. *Poultry Science*; 94(6):1158-64.
 15. Quinn J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R., 2004. Chapter 17: *Clostridium* species. *Veterinary Clinical Microbiology*. 6th Edition. Printed in Spain.
 16. Shahdadnejad N., Mohammadabadi M., and Shamsadini., 2016. Typing of *Clostridium perfringens* isolated from broiler chickens using multiplex PCR. *Genetics in the 3 rd Millenium*. 14. 4368-4374.
 17. Shojadoost B., Vince A.R and Prescott J.F., 2012. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: A critical review. *Veterinary Research*. 43(1): 74.
 18. Songer J.G., 1996. Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews*; 9(2): 216–234.
 19. Songer J.G. and Dawn B., 1999. Multiplex PCR procedure for genotyping *Clostridium perfringens*. Department of Veterinary Science, University of Arizona.
 20. Timbermont L., Haesebrouck R., Ducattelle. and Van I.F., 2011. necrotic enteritis in broilers: an update review on the pathogenesis. *Avian Phathology*. 40(4):341-7.
 21. Tolooe A., Shojadoost B., Peighambari S. and Tamaddon Y., 2011. Prevalence of *netB* gene among *Clostridium perfringens* isolates obtained from healthy and diseased chickens. *J Anim Vet Adv* 10, 106-110.
- Ngày nhận 13-2-2020
 Ngày phản biện 10-5-2020
 Ngày đăng 1-7-2020