

XÁC ĐỊNH CÁC YẾU TỐ ĐỘC LỰC CỦA VI KHUẨN *Clostridium perfringens* PHÂN LẬP TỪ ĐÀ ĐIỀU

Nguyễn Thị Thắm¹, Vũ Khắc Hùng², Nguyễn Đức Tân¹,
Phạm Khánh Nam¹, Vũ Thái Thân¹, Đào Duy Hưng¹, Lê Hồng Quý¹

TÓM TẮT

Đã thu thập 318 mẫu phân đà điều (160 từ đà điều nghi mắc bệnh viêm ruột hoại tử và 158 từ đà điều khỏe mạnh) và 105 mẫu bệnh phẩm (ruột non, ruột già và manh tràng) để phân lập vi khuẩn *Clostridium perfringens*. Kết quả cho thấy tỷ lệ phân lập được vi khuẩn *C. perfringens* ở đà điều nghi mắc bệnh là 29,37% (từ mẫu phân); 34,28% (từ mẫu bệnh phẩm) và ở đà điều khỏe mạnh là 20,88%. Từ 423 mẫu đã phân lập được 116 chủng *C. perfringens*, kết quả kiểm tra đặc tính sinh vật hóa học cho thấy các chủng *C. perfringens* đều mang các đặc tính như đã mô tả ở các tài liệu trước đây. Kết quả xác định type độc tố bằng phản ứng Multiplex-PCR cho thấy, 116 chủng *C. perfringens* phân lập từ đà điều bị bệnh và khỏe mạnh đều thuộc type A. Trong số 83 chủng phân lập từ đà điều bị bệnh, 15 (18,07%) chủng mang gen *NetB*, 5 (6,02%) chủng mang gen *Cpb2* và 01 (1,2%) chủng mang gen *Cpe*. Chỉ có 01 (3,03%) chủng trong 33 chủng phân lập từ đà điều khỏe mạnh mang gen *NetB*. Khi gây nhiễm cho đà điều 1 tháng tuổi bằng chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ thực địa, đà điều biểu hiện các triệu chứng bệnh tích rõ rệt.

Từ khóa: *C. perfringens*, đà điều, gây nhiễm, gen độc lực, type độc tố.

1. BẬT VẤN ĐỀ

Trong những năm qua, đà điều là loài vật nuôi được đẩy mạnh phát triển ở nhiều quốc gia trên thế giới nhờ lợi thế vượt trội về khả năng thích nghi, sức sản xuất so với các vật nuôi truyền thống khác cũng như ưu thế cạnh tranh về sản phẩm thịt an toàn chất lượng cao, đặc biệt là hàm lượng cholesterol rất thấp. Hiện nay các nước như: Nam Phi, Zimbabwe đang dẫn đầu về số lượng chăn nuôi đà điều. Ở Việt Nam, chăn nuôi đà điều được khởi xướng từ năm 1995, đã điều giống được nhập từ Zimbabwe và Australia (Phùng Đức Tiến, 2004) [10], cho đến nay đà điều được nuôi ở nhiều địa phương trong cả nước.

Cũng như các ngành chăn nuôi khác, dịch bệnh luôn là vấn đề lớn cho ngành chăn nuôi đà điều, đặc biệt là các bệnh đường tiêu hóa. Verwoerd (2000) [13] cho rằng những bệnh đường ruột là những bệnh thường xuyên xảy ra nhất và gây thiệt hại về kinh tế lớn nhất cho các trại chăn nuôi đà điều. Nhưng yếu tố như chăm sóc quản lý kém, stress, hoặc nhiễm các bệnh khác là nguyên nhân nguyên phát có thể tạo điều kiện cho các loại vi khuẩn như: *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Salmonella spp. và *Clostridium* spp. gây các bệnh đường tiêu hóa. Ở Việt Nam những nghiên cứu về bệnh đường tiêu hóa trên đà điều, đặc biệt bệnh do *C. perfringens* chưa nhiều. Xuất phát từ thực tế đó, đã tiến hành đề tài "*Phân lập, xác định các yếu tố độc lực của vi khuẩn Clostridium perfringens* trên đà điều".

2. 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 của đà điều khỏe mạnh và phân, mẫu bệnh phẩm (ruột non, ruột già và manh tràng) của đà điều nghi mắc bệnh viêm ruột hoại tử.

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, các 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 đà điều khỏe và đà điều nghi mắc bệnh viêm ruột hoại tử.

Mẫu bệnh phẩm: Ruột non, ruột già và manh tràng của đà điều nghi mắc bệnh viêm ruột hoại tử.

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
Email: thambt87@gmail.com

2.2.2. Các loại môi trường nuôi cấy phân lập

Đã sử dụng các loại môi trường như: 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 khác trong phòng thí nghiệm.

2.2.3. Các sinh phẩm dùng cho phản ứng PCR

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	Trích dẫn
1	<i>Cpa</i>	Cpa-F Cpa - R	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CCTCTGATACATCGTGAAG	324 bp	Songer và Dawn (1999) [6]
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	
6	<i>Cpb2</i>	Cpb - F Cpb - R	AGATTTTAAATATGATCCTAACCC CAATACCCTTACCAAATACTC	567 bp	
7	<i>NetB</i>	<i>netB-F</i> <i>netB-R</i>	GCTGGTGCTGGAATAAATGC TCGCCATTGAGTAGTTGGG	384 bp	Tolooe và cs (2011) [12]

*Taq DNA polymerase, dNTPs, Agarose, DNA ladder, TBE buffer....

2.2.4. Động vật thí nghiệm

Đã điều con 1 tháng tuổi.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập và giám định các đặc tính sinh vật học của vi khuẩn theo phương pháp của Quinn và cs (1994) [9] và sử dụng hệ thống định danh vi khuẩn Vitek2, tại Phòng thí nghiệm, Phân viện Thú y miền Trung.

Xác định type độc tố bằng phản ứng Multiplex PCR theo phương pháp của Songer và Dawn (1999) [6].

Kiểm tra độc lực các chủng *C. perfringens* phân lập được trên đã điều theo mô tả của Olkowski và cs (2006) [8].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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

Từ năm 2016 đến năm 2019 đã thu thập được 318 mẫu phân đã điều và 105 mẫu bệnh phẩm (ruột non, ruột già và manh tràng) từ đã điều nghi mắc bệnh để phân lập vi khuẩn *C. perfringens* (Bảng 2). Trong số 318 mẫu phân có 158 mẫu phân từ đã điều khỏe

manh và 160 mẫu phân từ đã điều nghi mắc bệnh viêm ruột hoại tử. Kết quả cho thấy tỷ lệ phân lập được vi khuẩn *C. perfringens* ở mẫu phân đã điều nghi mắc bệnh là 29,37% trong khi đó ở đã điều khỏe mạnh là 20,88%. Tỷ lệ vi khuẩn *C. perfringens* phân lập được từ mẫu bệnh phẩm nghi mắc bệnh viêm ruột hoại tử là 34,28%. Kết quả này tương đương với kết quả của Razmyar và cs (2014) [11] tại Iran, nhóm tác giả phân lập được 30 chủng *C. perfringens* từ 90 mẫu đường ruột của đã điều khỏe mạnh và đã điều nghi bị bệnh viêm ruột hoại tử. Tuy nhiên, trong một nghiên cứu khác tại Iran bằng phản ứng Multiplex-PCR, Alimolaei và cs (2014) [1] đã phát hiện được 46/118 (38,98%) mẫu phân dương tính với vi khuẩn *C. perfringens*. Sự sai khác này do phương pháp khác nhau vì phản ứng Multiplex-PCR tương đối nhạy, chỉ cần một số lượng rất nhỏ vi khuẩn *C. perfringens* là có thể dương tính, trong khi đó nhóm nghiên cứu của chúng tôi và Razmyar và cs (2014) [11] phân lập trực tiếp nên tỷ lệ thấp hơn. Ngược lại, trong một nghiên cứu khác tại Nam Phi, Keokilwe và cs (2015) [3] khi phân lập vi khuẩn từ 122 đã điều con từ 1-3 tháng tuổi bị bệnh tiêu chảy thì vi khuẩn *C. perfringens* chỉ chiếm tỷ lệ 20% trong khi đó tỷ lệ vi

khuẩn *E. coli* phân lập được là 40%, có thể trong chính gây bệnh tiêu chảy trên đà điều con. nghiên cứu của nhóm này thì *E. coli* là nguyên nhân

Bảng 2. Kết quả phân lập vi khuẩn *C. perfringens* trên đà điều

Mẫu	Số mẫu phân lập	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)	Số lượng cfu /1 gam phân
Mẫu phân đà điều khỏe mạnh	158	33	20,88	<10 ⁴
Mẫu phân đà điều nghi mắc bệnh	160	47	29,37	>10 ⁶
<i>Tổng mẫu phân</i>	<i>318</i>	<i>80</i>	<i>25,15</i>	
Mẫu bệnh phẩm (ruột non, ruột già, manh tràng) của đà điều nghi mắc bệnh	105	36	34,28	
Tổng mẫu	423	116	27,42	

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

Sau khi phân lập, đã tiến hành kiểm tra các đặc tính sinh hóa, kết quả cho thấy (Bảng 3) các chủng phân lập được mang đầy đủ các đặc tính sinh hóa điển hình của vi khuẩn *C. perfringens* như Quinn và cs (1994) [9] đã mô tả.

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

STT	Tính chất	Số chủng kiểm tra	Số chủng dương tính	Tỷ lệ (%)
1	Gram dương	116	116	100
2	Di động	116	0	0
3	Indole	116	0	0
4	Urease	116	0	0
5	Glucose	116	116	100
6	Lactose	116	116	100
7	Maltose	116	116	100
8	Sucrose	116	116	100
10	Sinh hơi	116	116	100
11	Mannitol	116	0	0
12	Egg yolk (vòng trắng sữa do sản sinh Lecithinase)	116	116	100
13	Litmus milk (vón cục)	116	116	100
14	Thạch TSC (khuẩn lạc tròn đen)	116	116	100
15	Dung huyết trên thạch máu	116	116	100
16	OF - Test (lên men và oxi hóa)	116	116	100
17	Camp - Test (tăng khả năng dung huyết)	116	116	100
18	Khả năng làm dung giải gelatin	116	116	100

3.3. Kết quả xác định type độc tố các chủng vi khuẩn phân lập được từ đà điều

Type độc tố của các chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập được, được xác định bằng phản ứng Multiplex-PCR, với kết quả được trình bày ở bảng 4. Kết quả cho thấy tất cả các chủng phân lập được từ đà điều nghi bị bệnh và đã khỏe đều thuộc

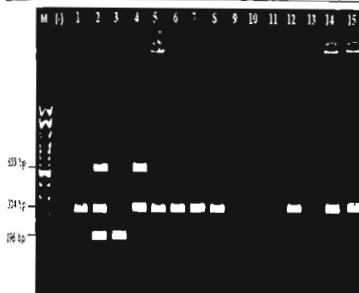
type A. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước đây của Zandi và cs (2014) [14], nhóm tác giả này xác định type độc tố của 36 chủng *C. perfringens* từ đà điều ở miền Nam Iran bằng Multiplex-PCR và tất cả các chủng đều thuộc type A. Cùng tại Iran, trong một nghiên cứu khác của Alimolaei và cs (2014) [1], khi phân tích 46 chủng *C. perfringens* phân lập từ 118 mẫu phân đà điều thì tất cả 46 chủng đều thuộc

type A. Trong nghiên cứu của Keokilwe và cs (2015) [3] type A cũng chiếm đa số 93,2% trong số 44 chủng

C. perfringens phân lập từ đà điểu ở Nam Mỹ, điều này chứng tỏ rằng là type A lưu hành khắp nơi.

Bảng 4. Kết quả xác định type độc tố các chủng vi khuẩn phân lập được từ đà điểu

Nguồn gốc chủng	Số chủng kiểm tra	Type A		Type B		Type C		Type D		Type E	
		n+	%	n+	%	n+	%	n+	%	n+	%
Phân đà điểu khỏe	33	33	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Phân đà điểu nghi mắc bệnh	47	47	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Bệnh phẩm (ruột non, ruột già, manh tràng) của đà điểu nghi mắc bệnh	36	36	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Tổng số	116	116	100	0	0	0	0	0	0	0	0



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm Multiplex PCR

M- Marker (100 bp), dải chứng âm, giếng 1- type A, giếng 2 - type B, giếng 3 - type C, giếng 4 - type D, giếng 5 - 15 các chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ đà điểu.

3.4. Kết quả PCR xác định độc tố

Kết quả xác định các gen độc tố của các chủng *C. perfringens* được trình bày ở bảng 5. Gần đây, độc tố *NetB* (Necrotic enteritis B-like toxin) được nhiều nhóm nghiên cứu cho là độc tố chính gây bệnh viêm ruột hoại tử trên gà. Nghiên cứu của Keyburn và cs (2013) [4] 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 viêm ruột hoại tử. Trong nghiên cứu này đã nhận thấy gen độc tố *NetB* được tìm thấy ở các chủng *C. perfringens* phân lập từ phân và bệnh phẩm (ruột non, ruột già, manh tràng) của đà điểu nghi mắc bệnh viêm ruột hoại tử lần lượt là 17,05% và

19,44% cao hơn hẳn so với đà điểu khỏe mạnh 3,03%. Kết quả này tương đương với Mirzazadeh và cs (2014) [7] khi kiểm tra 36 chủng *C. perfringens* phân lập từ đà điểu bị bệnh viêm ruột hoại tử và đà điểu khỏe mạnh, kết quả cho thấy 8/16 chủng *C. perfringens* phân lập từ đà điểu bị bệnh dương tính với gen *NetB*, trong khi đó tất cả các chủng *C. perfringens* phân lập từ đà điểu khỏe mạnh đều âm tính với gen này. Trong một nghiên cứu khác, Keokilwe và cs (2015) [3] nhận thấy gen độc tố *NetB* được tìm thấy 7/43 chủng *C. perfringens* phân lập từ đà điểu 1-3 tháng tuổi mắc bệnh tiêu chảy. Kết quả trên một lần nữa khẳng định những kết quả nghiên cứu trước đây cho rằng độc tố *NetB* đóng vai trò quan trọng trong bệnh đường tiêu hóa của đà điểu.

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 đó. Labbe (2000) [5], Engstrom và cs (2003) [2] 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 1/47 chủng phân lập từ phân đà điểu bị bệnh mang gen *Cpe*. Độc tố *beta2* có hoạt tính sinh học giống như độc tố *beta*, trong nghiên cứu này chỉ tìm thấy 15/83 chủng phân lập từ phân và bệnh phẩm (ruột non, ruột già, manh tràng) của đà điểu nghi mắc bệnh viêm ruột hoại tử và chỉ có 1/33 chủng phân lập từ đà điểu khỏe mạnh mang gen này. Kết quả của chúng tôi thấp hơn so với nghiên cứu của Razmyar và cs (2014) [11] nhóm tác giả này nhận thấy gen *cpb2* chiếm tỷ lệ rất lớn trong các chủng *C. perfringens* phân lập từ đà điểu khỏe mạnh (93,3%) cũng như đà điểu bị bệnh (80%).

Bảng 5. Kết quả xác định gen mã hóa độc tố *enterotoxin*, *beta 2 toxin* và *NetB toxin*

Nguồn gốc chủng	Số chủng kiểm tra	<i>Cpa</i>		<i>Cpe</i>		<i>Cpb2</i>		<i>NetB</i>	
		n+	%	n+	%	n+	%	n+	%
Phân đã điều khỏe	33	33	100	0	0	0	0	1	0
Phân đã điều nghi mắc bệnh	47	47	100	1	2,12	3	6,38	8	17,05
Bệnh phẩm (ruột non, ruột già, manh tràng) của đã điều nghi mắc bệnh	36	36	100	0	0	2	5,55	7	19,44
Tổng số	116	116	100	1	0,77	5	4,31	16	13,79



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định gen mã hóa *NetB toxin*

Giếng M: Marker, 100 bp; giếng +: Đối chứng dương; giếng -: Đối chứng âm; giếng 2-11 các chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ đã điều

3.5. Kết quả kiểm tra khả năng gây bệnh

Sau khi kiểm tra các gen độc lực, đã chọn 1 chủng *C. perfringens* mang gen độc tố *cpa/NetB* (chủng CD 115) phân lập từ ruột non của đã điều bị bệnh gây nhiễm cho đã điều 1 tháng tuổi khỏe mạnh.

không bị nhiễm vi khuẩn *C. perfringens* như mô tả của Olkowsku và cs (2006) [8], kết quả được trình bày ở bảng 6. Qua bảng 6 cho thấy, khi gây nhiễm bằng chủng CD 115 mang gen *cpa/NetB* ở lô thí nghiệm 4/5 con biểu hiện triệu chứng bệnh và 01 con không phát bệnh. Trong khi đó ở lô đối chứng không có con nào phát bệnh. Sau 3 ngày, tiến hành mổ khám nhưng đã điều có triệu chứng tiêu chảy để kiểm tra bệnh tích, kết quả (Hình 3) cho thấy niêm mạc ruột xuất huyết, có những vết loét điển hình tại ruột non, gan sưng ở tất cả 4 con được mổ khám. Từ tất cả những đã điều phát bệnh đều phân lập lại được vi khuẩn *C. perfringens* gây nhiễm ban đầu bằng cách kiểm tra các gen độc tố bằng phản ứng PCR. Cho đến thời điểm hiện tại chưa thấy có tài liệu nào công bố về gây nhiễm thực nghiệm vi khuẩn *C. perfringens* cho đã điều nên không thể so sánh. Tuy nhiên, từ kết quả gây nhiễm, mổ khám bệnh tích đã khẳng định vai trò gây bệnh của vi khuẩn *C. perfringens* trên đã điều.

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

Động vật thí nghiệm	Yếu tố độc lực	Số gây nhiễm (con)	Liều gây nhiễm (cfu/con)	Đường gây nhiễm	Số đã điều bị bệnh	Số đã điều chết	Biểu hiện sau khi đã điều bệnh
Lô thí nghiệm	<i>Cpa</i> , <i>NetB</i>	5	5x10 ⁸	Đường uống	4	0	Sau khi gây nhiễm, đã điều ăn ít, lỏng xù tiêu chảy lười vận động
Lô đối chứng	0	2	10 ml môi trường	Đường uống	0	0	Bình thường





Hình 3. Bệnh tích bệnh *C. perfringens* ở đà điểu sau khi gây nhiễm và mổ khám

1: Ruột non viêm, xung huyết (mũi tên xanh); 2: Ruột non loét và xuất huyết (mũi tên đỏ); 3: Gan viêm, sưng, xung huyết và hoại tử (mũi tên vàng).

4. KẾT LUẬN

Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *C. perfringens* ở đà điểu nghi mắc bệnh viêm ruột hoại tử là 29,37% (phân lập từ phân), 34,28% (phân lập từ ruột non, ruột già và manh tràng) và ở phân đà điểu khỏe mạnh là 20,88%.

Đã phân lập được 116 chủng *C. perfringens* từ 423 mẫu phân đà điểu khỏe mạnh và đà điểu bị bệnh, các chủng đều mang các đặc tính sinh hóa đặc trưng. Tất cả 116 chủng *C. perfringens* phân lập từ đà điểu bệnh và đà điểu khỏe mạnh đều thuộc type A.

Trong số 47 chủng phân lập từ phân đà điểu bị bệnh, 8 (17,05%) chủng mang gen *NetB*, 3 (6,3%) chủng mang gen *Cpb2* và 01 (2,12%) chủng mang gen *Cpe*. Trong 36 chủng phân lập từ bệnh phẩm (ruột non, ruột già và manh tràng); 7 (19,44%) chủng mang gen *NetB*, 2 (5,5%) chủng mang gen *Cpe*. Chỉ có 1/33 (3,03%) chủng phân lập từ đà điểu khỏe mạnh mang gen *NetB*.

Khi gây nhiễm cho đà điểu 1 tháng tuổi bằng chủng *C. perfringens* phân lập được, đà điểu được gây nhiễm biểu hiện các triệu chứng bệnh tích điển hình.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alimolaei M., Ezatkah M. and Bafti M. S., 2014. Genetic and antigenic typing of *Clostridium perfringens* isolates from ostriches. *Infection, Genetics and Evolution*. 28:210-213.

2. 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.

3. Keokilwe L., Olivier A., Bunge W. P., Joubert H., Venter E. H. and Morar-Leather D., 2015. Bacterial enteritis in ostrich (*Struthio Camelus*) chicks in Western Cape province, South Africa. *Poultry Science*. 94:1177-1183.

4. 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.

5. Labbe R. G., 2000. *Clostridium perfringens*. In *the Microbiological Safety and Quality of Food* ed. Lund B. Bair-Parker T, and Gould G. G. G. Gainthersburg, MD. Aspen Publishers, 1110-1135.

6. Songer J. G. and Dawn B., 1999. Multiplex PCR Procedure for Genotyping *Clostridium perfringens*. Department of Veterinary Science, University of Arizona.

7. Mirzazadeh A., Razmyar J. and Kalidari G. A., 2014. Prevalence of *NetB* and *Tpel* genes among *Clostridium perfringens* isolates obtained from healthy and diseased ostriches (*Struthio camelus*). The 12th Biental Congress of the Anaerobe Society of Americas, 2014-06-28.

8. Olkowski A. A., Wojnarowicz C., Chinnon-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.

9. Quinn P. J., M.E. Carter, B. Markey, G. R. Carter. 1994. *Clostridium* species. *Clinical Veterinary Microbiology*. *Wolfe Publishing*. 191-208.

10. Phùng Đức Tiến, 2004. Tuyển tập các công trình nghiên cứu khoa học chăn nuôi đà điểu, chim và cá sấu. Viện Chăn nuôi Quốc gia. Trung tâm Nghiên cứu Gia cầm Thụy Phương. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, tr. 46-131.

11. Razmyar J., Kalidarli G. A., Toloee A., Rad M. and Movassaghi A. R., 2014. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from healthy and diseased ostriches (*Struthio camelus*). *Iranian Journal of Microbiology*, 6:31-36.

12. Toloee 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.

13. Verwoerd D. J., 2000. Ostrich diseases. *Revue Scientifique et Technique*. 19:638-661.

14. Zandi E., Mohammadabadi M. R., Ezzatkah M. and Esmailzadeh A. K., 2014. Typing of toxigenic isolates of *Clostridium perfringens* by Multiplex PCR in Ostrich. *Iranian Journal of Microbiology*. 4: 795-801.

DETERMINATION OF VIRULENCE FACTORS OF *Clostridium perfringens* ISOLATED FROM OSTRICHES

Nguyen Thi Tham¹, Vu Khac Hung², Nguyen Duc Tan¹,

Pham Khanh Nam¹, Vu Thai Than¹, Dao Duy Hung¹, Le Hong Qui¹

¹Department of Technology and Product Development, Institute of Veterinary

Research and Development of Central Vietnam-

²Department of Biotechnology-Development-Institute of Veterinary Research and Development of

Central Vietnam

Summary

We collected 318 fecal samples from ostriches (160 from suspected Necrotic Enteritis and 158 from healthy) and 105 intestinal samples (small intestine, colon, and caecum) for isolation of *C. perfringens*. The results showed that the prevalence of *C. perfringens* in diseased and healthy ostriches was 29.37% (from fecal samples), 34.28% (from small intestinal samples) and 20.88%, respectively. From 423 samples we isolated 116 isolates, the results of biochemical tests showed that all 116 isolates have characteristics as have been documented before. The results of determining toxin types by using Multiplex-PCR proved that all of 116 strains belong to type A. Among 83 *C. perfringens* strains isolated from diseased ostriches 15 (18.07%) strains harbored *NetB* gene, 5 (6.02%) strains carried *Cpb2* gene and 1 (1.2%) strain have *Cpe* gene. The percentage of strain carried genes *NetB* among 64 strains, which isolated from healthy ostriches, was only 3.03% (1/33). When 1-month-old ostriches experimentally infected with *C. perfringens* strain, which was isolated from diseased ostriches, the infected ostriches showed clear symptoms and lesions of the disease.

Keywords: *Clostridium perfringens*, experimental infection, ostrich, toxin genes, Type toxin.

Người phản biện: PGS.TS. Tô Long Thành

Ngày nhận bài: 29/11/2019

Ngày thông qua phản biện: 30/12/2019

Ngày duyệt đăng: 6/01/2020