

PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA VI KHUẨN *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* TRÊN GÀ NUÔI TẠI MỘT SỐ TỈNH Ở VIỆT NAM

Nguyễn Thị Thắm^{1*}, Trần Văn Trung¹, Trần Thị Thu Hà¹, Đỗ Diệu Hương¹,
Trương Thị Trang Như¹, Nguyễn Đức Thái Hà², Nguyễn Thị Phương Thảo³

*Tác giả liên hệ email: thamb87@gmail.com

TÓM TẮT

Bệnh viêm ruột hoại tử là một trong những bệnh đường ruột nguy hiểm trên gia cầm, gây thiệt hại lớn cho ngành chăn nuôi. Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng độc tố NetB của vi khuẩn *C. perfringens* là tác nhân chính gây ra các bệnh tích điển hình của bệnh viêm ruột hoại tử ở gà. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thu thập 300 mẫu phân gà và 300 mẫu ruột gà nghi mắc bệnh viêm ruột hoại tử tại các tỉnh: Thái Bình, Nam Định, Bình Định, Khánh Hòa, Cần Thơ, Tiền Giang để phân lập vi khuẩn *C. perfringens*. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ mẫu phân gà nhiễm *C. perfringens* là 101/300 (33,67%) và tỷ lệ mẫu ruột gà nhiễm *C. perfringens* là 171/300 (57%). Kết quả xác định type độc tố bằng phản ứng multiplex-PCR cho thấy 272/272 (100%) chủng *C. perfringens* phân lập được đều thuộc type A. Kết quả xác định gen độc lực *netB* bằng phản ứng PCR từ các chủng phân lập được cho thấy có 69/272 (25,37%) chủng mang gen *netB*.

Từ khóa: *Clostridium perfringens*, type độc tố, gen *netB*, viêm ruột hoại tử.

Isolation and determination on biological characteristics of *Clostridium perfringens* in chickens raised in some provinces of Viet Nam

Nguyen Thi Tham, Tran Van Trung, Tran Thi Thu Ha, Do Dieu Huong,
Truong Thi Trang Nhu, Nguyen Duc Thai Ha, Nguyen Thi Phuong Thao

SUMMARY

Necrotic enteritis is one of the most important enteric diseases in poultry and causes high economic loss to the livestock industry. The recent studies have shown that NetB toxin of *C. perfringens* is a critical virulence factor in the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. In this study, we collected 300 fecal and 300 intestinal samples from the necrotic enteritis suspected chickens in the provinces: Thai Binh, Nam Dinh, Binh Dinh, Khanh Hoa, Can Tho, and Tien Giang to isolate *C. perfringens*. The studied result showed that 101/300 (33,67%) of fecal samples and 171/300 (57%) of intestinal samples contaminated with *C. perfringens*, respectively. The results of determining the toxin type by multiplex-PCR indicated that 272/272 (100%) of *C. perfringens* isolates belonged to type A. The PCR for detection of *netB* gene showed that 69/272 (25.37%) of *C. perfringens* isolates harbored *netB* gene.

Keywords: *Clostridium perfringens* toxin type, *netB* gene, necrotic enteritis.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh viêm ruột hoại tử ở gà do trực khuẩn yếm khí *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) gây

ra (Shane và cs., 1984). Bệnh viêm ruột hoại tử được phát hiện ở hầu hết các vùng lãnh thổ có chăn nuôi gia cầm trên thế giới, ước tính thiệt hại

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

². Sinh viên Trường Đại học Nha Trang

³. Sinh viên Trường Đại học Nông Lâm Huế

mỗi năm do bệnh này gây ra ở gia cầm khoảng 6 tỷ USD (Moore, 2016). Bệnh viêm ruột hoại tử thường xảy ra ở gà từ 2 – 6 tuần tuổi (Cooper và cs., 2010). Tỷ lệ tử vong khoảng 10-40% tổng số gia cầm bị mắc bệnh (McDevit và cs., 2002). Gia cầm mắc bệnh viêm ruột hoại tử thường xuất hiện các triệu chứng như ủ rũ, biếng ăn, xù lông và sã cánh. Ruột non của gia cầm là phần chủ yếu mà vi khuẩn *C. perfringens* gây ra bệnh tích, trong đó đáng chú ý nhất là đoạn không tràng và hồi tràng; ngoài ra, bệnh tích còn tìm thấy ở manh tràng và gan (Kaldhusdal và Hofshagen, 1992). Bệnh viêm ruột hoại tử nếu không được điều trị kịp thời sẽ gây ra ảnh hưởng lớn tới ngành chăn nuôi gia cầm (Kaldhusdal và cs., 2001). Các nhà nghiên cứu trước đây cho rằng độc tố alpha là nguyên nhân chính gây ra bệnh viêm ruột hoại tử trên gà (Fukata và cs., 1988). Tuy nhiên, năm 2008, Keyburn và cs. đã phát hiện một loại độc tố NetB và chứng minh NetB là độc tố chính gây ra các bệnh tích điển hình của bệnh viêm ruột hoại tử ở gà.

Tại Việt Nam, đã có một số nghiên cứu về vi khuẩn *C. perfringens* trên gà; tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào thực hiện trên diện rộng để đánh giá, so sánh và xác định rõ hơn đặc tính sinh học của vi khuẩn *C. perfringens* trên gà nuôi tại các vùng địa lý khác nhau. Do đó trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập, xác định đặc tính sinh học của vi khuẩn *C. perfringens* trên gà nuôi tại một số tỉnh ở Việt Nam gồm 6 tỉnh Thái Bình, Nam Định, Bình Định, Khánh Hòa, Cần Thơ, Tiền Giang.

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* từ mẫu phân và mẫu ruột gà tại 6 tỉnh Thái Bình, Nam Định, Bình Định, Khánh Hòa, Cần Thơ, Tiền Giang

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

Xác định type độc tố của các chủng vi khuẩn *C. perfringens*

Xác định gen độc lực *netB* của các chủng vi khuẩn *C. perfringens*.

2.2. Nguyên liệu nghiên cứu

2.2.1. Mẫu

Tổng số 600 mẫu bao gồm 300 mẫu phân và 300 mẫu ruột từ gà nghi mắc bệnh viêm ruột hoại tử với các triệu chứng điển hình như: tiêu chảy, phân lẫn máu, ủ rũ, biếng ăn, xù lông và sã cánh thu thập tại 6 tỉnh Thái Bình, Nam Định, Bình Định, Khánh Hòa, Cần Thơ, Tiền Giang trong năm 2023

2.2.2. Các loại môi trường, hóa chất, trang thiết bị phòng thí nghiệm

Các loại môi trường, hóa chất: Môi trường Fluid Thioglycolate (Merck); thạch Tryptose Sulphite Cycloserine Agar (Merck); thạch lòng đỏ trứng (Merck); Litmus milk (Merck), urea – indol (Merck), các loại môi trường đường đơn: Glucose (Merk), lactose (Merck), sucrose (Merck), maltose (Merck), thuốc nhuộm gram, PCR Master Mix (2X), primer (Invitrogen)...

Các thiết bị trong phòng thí nghiệm: Tủ âm CO₂, tủ an toàn sinh học, kính hiển vi, túi dùng để tạo môi trường nuôi yếm khí (Anaerocult P - Merck)...

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phân lập và nuôi cấy vi khuẩn *C. perfringens*

Tiến hành phân lập vi khuẩn theo TCVN 8400-28:2014.

2.3.2. Xác định một số đặc tính sinh hóa của vi khuẩn *C. perfringens*

Phân lập và giám định các đặc tính sinh vật hoá học của vi khuẩn theo phương pháp của Quinn và cs. (2004), và TCVN 8400-28:2014.

2.3.3. PCR để định type và gen độc lực *netB* của các chủng *C. perfringens*

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

Xác định gen độc lực *netB* bằng phản ứng PCR theo phương pháp của Tolooe và cs. (2011).

Trình tự các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở 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 (bp)	Trích dẫn
1	<i>Cpa</i>	Cpa-F Cpa-R	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CCTCTGATACATCGTGTAAG	324	
2	<i>Cpb</i>	Cpb-F Cpb-R	GCGAATATGCTGAATCATCTA GCAGGAACATTAGTATATCTTC	196	Songer và Dawn (1999)
3	<i>Etx</i>	Etx-F Etx-R	GCGGTGATATCCATCTATTC CCACTTACTTGTCCTACTAAC	655	
4	<i>iA</i>	iA-F iA-R	ACTACTCTCAGACAAGACAG CTTTCCTTCTATTACTATACG	446	
5	<i>NetB</i>	netB-F netB-R	GCTGGTGCTGGAATAAATGC TCGCCATTGAGTAGTTGGG	384	Tolooe và cs. (2011)

2.3.4. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel.

ruột gà tại 6 tỉnh Thái Bình, Nam Định, Bình Định, Khánh Hòa, Cần Thơ, Tiền Giang

Kết quả phân lập vi khuẩn *C. perfringens* từ mẫu phân và mẫu ruột gà tại 6 tỉnh Thái Bình, Nam Định, Bình Định, Khánh Hòa, Cần Thơ, Tiền Giang được thể hiện ở bảng 2.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập, xác định tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *C. perfringens* từ mẫu phân và mẫu

Bảng 2. Kết quả phân lập vi khuẩn *C. perfringens* từ gà nuôi tại 6 tỉnh

Địa điểm thu mẫu	Mẫu phân			Mẫu ruột		
	Số mẫu phân lập	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)	Số mẫu phân lập	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Thái Bình	50	19	38	50	27	54
Nam Định	50	18	36	50	24	48
Bình Định	50	18	36	50	31	62
Khánh Hòa	50	14	28	50	28	56
Cần Thơ	50	17	34	50	25	50
Tiền Giang	50	15	30	50	36	72
Tổng số	300	101	33,67	300	171	57,0

Từ 300 mẫu phân gà đã phân lập được 101 chủng vi khuẩn *C. perfringens*; chiếm tỷ lệ 33,67%. Tỷ lệ vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ mẫu phân gà nuôi tại Thái Bình là 38%, các tỉnh còn lại có tỷ lệ phân lập từ 28% đến 36%. Đối với 300 mẫu ruột gà nuôi tại 6 tỉnh, kết quả đã phân lập được 171 chủng

vi khuẩn *C. perfringens*, chiếm tỷ lệ 57%. Tỷ lệ vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ mẫu ruột gà ở tỉnh Tiền Giang là 72%, tỉnh Nam Định là 48%; các tỉnh khác có tỷ lệ phân lập dao động từ 50% đến 62%. Kết quả phân lập của chúng tôi tương đương với kết quả nghiên cứu của Eid và cs. (2023) đã thực hiện phân

lập vi khuẩn *C. perfringens* từ 100 mẫu ruột gà nuôi tại các trang trại tại Ai Cập, kết quả đã phân lập được 50 (50%) chủng vi khuẩn *C. perfringens*. Năm 2021 tại Trung Quốc, Xu và cs. đã phân lập được 312 (50,16%) chủng vi khuẩn *C. perfringens* từ 622 mẫu phân và mẫu chất thải tại các trang trại nuôi gà tại Quảng Đông, Bình Âm, Thái An và Duy Phường. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng vi khuẩn *C. perfringens* thường trực ở đường tiêu hoá gia cầm, khi gặp điều kiện thuận lợi như sự thay đổi đột ngột về môi trường, khẩu phần thức ăn, thức ăn chứa quá nhiều protein

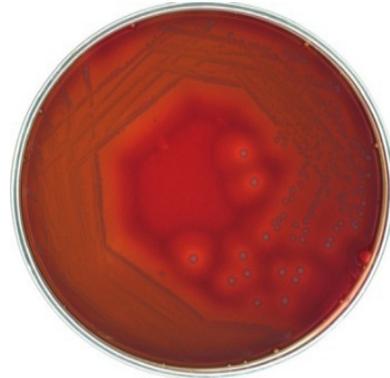
hay ăn phải thức ăn nhiễm khuẩn thì vi khuẩn tăng sinh, sản sinh ra các độc tố gây bệnh cho vật chủ (Patel và cs., 2001).

3.2. Kết quả xác định một số đặc tính sinh vật hoá học của các chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ gà

Chúng tôi kiểm tra các đặc tính sinh hóa các chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập được theo phương pháp của Quinn và cs. (2004) và TCVN 8400-28:2014. Kết quả kiểm tra một số đặc tính sinh hóa ở bảng 3 cho thấy các chủng *C. perfringens* phân lập được mang đầy đủ các đặc tính như các tài liệu đã mô tả (hình 1 - 4).



Hình 1. Khuẩn lạc *C. perfringens* tròn, đen trên môi trường TSC

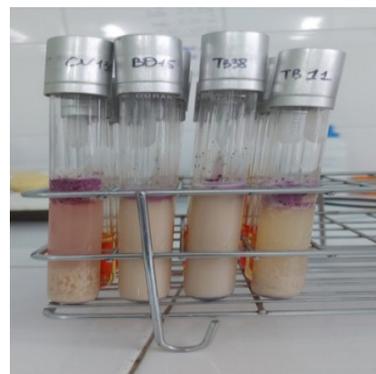


Hình 2. Khuẩn lạc *C. perfringens* gây dung huyết kép trên môi trường thạch máu



Hình 3. Khuẩn lạc *C. perfringens* trên môi trường lòng đỏ trứng

Khuẩn lạc có quang mờ đục - sinh lethicinase, không có lớp như ngọc trai hay vẩy cá bao phủ khuẩn lạc – không sinh lipase



Hình 4. Vi khuẩn *C. perfringens* trên môi trường Litmus

Sữa đông vón, có vẩn như mây - sự phân giải casein

Bảng 3. Kết quả kiểm tra các đặc tính sinh hóa của các chủng vi khuẩn *C. perfringens*

STT	Tính chất	Số chủng kiểm tra	Số chủng dương tính	Tỷ lệ (%)
1	Lecithinase	272	272	100
2	Lipase	272	0	0
3	Phân giải casein	272	272	100
4	Indole	272	0	0
5	Di động	272	0	0
6	Glucose	272	272	100
7	Lactose	272	272	100
8	Sucrose	272	272	100
9	Maltose	272	272	100
10	Salicin	272	0	0
11	Phản ứng CAMP ⁺ ngược	272	272	100
12	Thạch TSC (khuẩn lạc tròn đen)	272	272	100
13	Dung huyết trên thạch máu	272	272	100

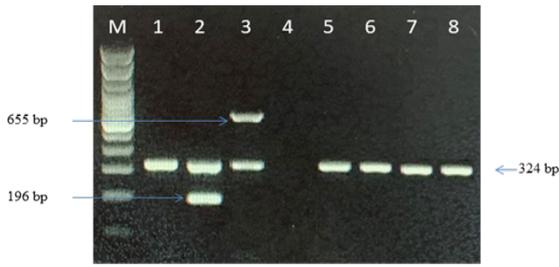
3.3. Xác định type độc tố của các chủng vi khuẩn *C. perfringens***Bảng 4. Kết quả xác định type độc tố của các chủng vi khuẩn *C. perfringens***

Địa điểm thu mẫu	Số chủng kiểm tra	Type A		Type B		Type C		Type D		Type E	
		n+	%	n+	%	n+	%	n+	%	n+	%
Thái Bình	46	46	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Nam Định	42	42	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Bình Định	49	49	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Khánh Hòa	42	42	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Cần Thơ	42	42	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Tiền Giang	51	51	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Tổng số	272	272	100	0							

Ghi chú: n+: số chủng dương tính, %: tỷ lệ %

Vi khuẩn *C. perfringens* được phân thành 5 type là A, B, C, D và E, căn cứ vào sự sản sinh ra các loại độc tố: Type A sản sinh độc tố alpha; type B 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 (Petit và cs., 1999). Kết quả xác định type độc tố của các chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập được từ 6 tỉnh Thái Bình, Nam Định, Bình Định, Khánh Hòa, Cần Thơ, Tiền Giang bằng phương pháp multiplex PCR (hình 5) cho thấy 272/272 (100%) chủng phân lập được thuộc type A (bảng 4). Nguyên nhân gây bệnh viêm

ruột hoại tử ở gia cầm đã được xác định là *C. perfringens* type A, và rất ít khi gây ra bởi vi khuẩn *C. perfringens* type C (Engstrom và cs., 2003). Năm 2023, kết quả nghiên cứu của Rana và cs. tại Bangladesh đã xác định 38/38 (100%) chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ ruột gà đều thuộc type A. Tại Hàn Quốc năm 2020, Wei và cs. đã xác định 162/162 (100%) chủng *C. perfringens* phân lập từ gà đều thuộc type A. Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cùng với các kết quả nghiên cứu khác được công bố đã chứng tỏ vi khuẩn *C. perfringens* type A là type lưu hành chính trên gà.



Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm multiplex PCR

M: Marker, 100 bp; giếng 1: Type A; giếng 2: Type B; giếng 3: Type D; giếng 4: Đối chứng âm; giếng 5 - 8: Các chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ gà.

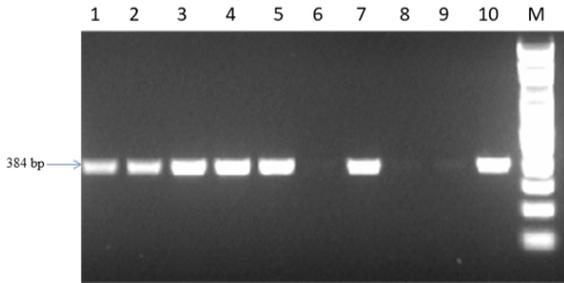
3.4. Xác định gen độc lực netB của các chủng vi khuẩn C. perfringens

Kết quả xác định gen độc lực *netB* (hình 6) của các chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập được tại các tỉnh Thái Bình, Nam Định, Bình Định, Khánh Hòa, Cần Thơ, Tiền Giang bằng phương pháp PCR được thể hiện ở bảng 5. Trong tổng số 272 chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập được từ gà nuôi tại 6 tỉnh, số chủng mang gen *netB* là 69/272 chủng; chiếm tỷ lệ 25,37%. Tỷ lệ chủng mang gen *netB* phân lập từ mẫu phân gà là 18,81% (19/101 chủng); mẫu ruột gà có 50/171 chủng mang gen *netB*; chiếm tỷ lệ 29,24%. Tỷ lệ các chủng vi khuẩn *C. perfringens* mang gen *netB* phân lập từ 6 tỉnh lần lượt là: Khánh Hòa 30,95% (13/42 chủng); Cần Thơ 28,57% (12/42 chủng); Thái Bình 26,09% (12/46 chủng); Nam Định 23,81% (10/42 chủng);

Bình Định 22,45% (11/49 chủng); Tiền Giang 21,57% (11/51 chủng). Tại Canada, Chalmers và cs. (2008) đã xác định 39/41 (95%) chủng phân lập từ gà mắc bệnh viêm ruột hoại tử mang gen *netB*. Tại Hoa Kỳ, tỷ lệ mang gen *netB* là 58% ở gia cầm bị viêm ruột hoại tử (Martin và Smyth, 2009). Năm 2019, tại Ấn Độ, Mwangi và cs. đã xác định gen *netB* của vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ những con gà chết vì viêm ruột hoại tử là 119/145 (81%). Kết quả xác định gen *netB* của các chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ gà năm 2020 của Profeta và cs. tại nước Ý là 31/151; chiếm tỷ lệ 20,5%. Năm 2021, tại Ai Cập kết quả nghiên cứu của Farouk và cs. đã xác định 10/10 (100%) chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ gà bệnh viêm ruột hoại tử tại tỉnh Assiut, Ai Cập mang gen *netB*. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng vi khuẩn *C. perfringens* thường trực ở đường tiêu hoá gia cầm, tuy nhiên, sự hiện diện một số lượng lớn vi khuẩn *C. perfringens* trong đường ruột của gia cầm cũng có thể không gây bệnh viêm ruột hoại tử mà chỉ có những vi khuẩn *C. perfringens* mang các yếu tố độc lực mới gây bệnh cho gia cầm (Cowen và cs., 1987). Nghiên cứu của Keyburn và cs. (2008) đã chỉ ra rằng độc tố NetB là tác nhân chính gây ra các bệnh tích điển hình của bệnh viêm ruột hoại tử ở gà. Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi về xác định gen độc tố *netB* cùng với các kết quả nghiên cứu khác được công bố trên thế giới đã góp phần khẳng định vai trò của các chủng vi khuẩn *C. perfringens* mang gen độc tố *netB* trong bệnh viêm ruột hoại tử ở gà.

Bảng 5. Kết quả xác định gen độc lực netB của các chủng vi khuẩn C. perfringens

Địa điểm thu mẫu	Mẫu phân			Mẫu ruột			Tổng cộng		
	Số chủng kiểm tra	Số chủng mang gen netB	Tỷ lệ (%)	Số chủng kiểm tra	Số chủng mang gen netB	Tỷ lệ (%)	Số chủng kiểm tra	Số chủng mang gen netB	Tỷ lệ (%)
Thái Bình	19	4	21,05	27	8	29,63	46	12	26,09
Nam Định	18	2	11,11	24	8	33,33	42	10	23,81
Bình Định	18	3	16,67	31	8	25,80	49	11	22,45
Khánh Hòa	14	4	28,57	28	9	32,14	42	13	30,95
Cần Thơ	17	3	17,65	25	9	36,00	42	12	28,57
Tiền Giang	15	3	0,2	36	8	22,22	51	11	21,57
Tổng cộng	101	19	18,81	171	50	29,24	272	69	25,37



Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định gen độc tố netB

Giếng M: Marker, 100 bp; giếng 10: Đối chứng dương; giếng 9: Đối chứng âm; giếng 1-5 và 7: Các chủng *C. perfringens* mang gen netB, giếng 6 và 8: Các chủng *C. perfringens* không mang gen netB

IV. KẾT LUẬN

- Đã phân lập được 272 chủng vi khuẩn *C. perfringens* từ gà tại 6 tỉnh Thái Bình, Nam Định, Bình Định, Khánh Hòa, Cần Thơ, Tiền Giang. Trong đó 101/300 chủng phân lập từ mẫu phân; chiếm tỷ lệ 33,67% và 171/300 chủng phân lập từ mẫu ruột; chiếm tỷ lệ 57%.

- Các chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ gà nuôi tại 6 tỉnh có đặc tính sinh học giống các tài liệu đã công bố trong và ngoài nước.

- 272/272 (100%) chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ gà tại 6 tỉnh thuộc type A.

- 69/272 (25,37%) chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ gà nuôi tại 6 tỉnh mang gen độc tố netB.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 8400-28:2014 – Bệnh động vật - Quy trình chẩn đoán – Phần 28: Bệnh Viêm ruột hoại tử do vi khuẩn *Clostridium perfringens*.
2. Eid, N.M., Ahmed, E.F., Shany, S.A., Dahshan, A.H.M. and Ali, A., 2023. *Clostridium perfringens* in Broiler Chickens: Isolation, Identification, Typing, and Antimicrobial Susceptibility. *Journal of World's Poultry Research*, 13(1), pp.112-119.
3. Farouk, R., Amen, O., hassan, A. and Ibrahim, R.S., 2021. Netb, A new toxin related to *clostridium perfringens*-induced avian necrotic enteritis in broiler chickens. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 67(171), pp.133-142.

4. 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.
5. Keyburn A.L., Sheedy S.A., Ford M.E., Williamson M.M., Awad M.M., Rood J.I. and Moore R.J., 2006. Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infection and Immunity* 74, 6496-6500.
6. Profeta F, Di Francesco CE, Di Provvido A, Scacchia M, Alessiani A, Di Giannatale E, Marruchella G, Orsini M, Toscani T, Marsilio F. Prevalence of netB-positive *Clostridium perfringens* in Italian poultry flocks by environmental sampling. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2020 Mar;32(2):252-8.
7. Quinn J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R., 2004. Chapter 17: *Clostridium species*. *Veterinary Clinical Microbiology*. 6th Edition. Printed in Spain.
8. Songer J.G. and Dawn B., 1999. *Multiplex PCR Procedure for Genotyping Clostridium perfringens*. Department of Veterinary Science, University of Arizona.
9. 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.
10. Rana, E.A., Nizami, T.A., Islam, M.S., Barua, H. and Islam, M.Z., 2023. Phenotypical identification and toxinotyping of *Clostridium perfringens* isolates from healthy and enteric disease-affected chickens. *Veterinary Medicine International*, 2023.
11. Xu, W., Wang, H., Liu, L., Miao, Z., Huo, Y. and Zhong, Z., 2021. Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* isolated from different chicken farms in China. *Anaerobe*, 72, p.102467.
12. Wei, B., Cha, S.Y., Zhang, J.F., Shang, K., Park, H.C., Kang, J., Lee, K.J., Kang, M. and Jang, H.K., 2020. Antimicrobial susceptibility and association with toxin determinants in *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Microorganisms*, 8(11), p.1825.

Ngày nhận: 20-11-2023

Ngày phản biện: 24-11-2023

Ngày đăng: 1-3-2024