

Xác định gen độc tố và tổ hợp của chúng với các gen mã hóa những độc tố chính của *Clostridium perfringens* phân lập từ dê và cừu ở duyên hải Nam Trung bộ

Lê Văn Sơn¹, Đặng Thanh Hiền², Lê Đình Hải², Lê Lập²,
Nguyễn Ngọc Nhiên³ và Nguyễn Việt Không³

TÓM TẮT

Chúng tôi đã xác định 2 gen độc tố (toxinothyp) của *C. perfringens* phân lập từ dê, cừu ở duyên hải Nam Trung Bộ bằng phương pháp multiplex PCR với tần số 76,28% typ A và 23,72% typ D. Phân tích tổ hợp của mỗi loại gen độc tố với gen (cpe và cpb2) mã hóa 2 loại độc tố gây viêm ruột hoại tử, đã xác định được có 3 tổ hợp gen độc tố của thuộc typ A với tần số: 7,56% [typ A⁺cpe⁺]; 0,84% [typ A⁺cpb2⁺] và 0,84% [typ A⁺cpe⁺ cpb2⁺]; và chỉ phát hiện tổ hợp gen độc tố (1 genothyp) với typ D: [typ D⁺ cpb2⁺] với tần số 21,82% các chủng phân lập. Tần số xuất hiện typ D và 4 tổ hợp gen trên ở cừu cao hơn ở dê và dao động tùy vùng địa lý (vùng sinh thái) hiếm khi tìm thấy ở gia súc khỏe mạnh nhưng xuất hiện ở tần số cao ở gia súc bệnh.

Từ khóa: Dê, cừu, *Clostridium perfringens*, Multiplex PCR, Gen độc tố, Duyên hải Nam Trung bộ

Determination of toxinotype and their combination to genes encoding the major toxins of *C. perfringens* isolated from goats and sheeps reared in the South-central coach area of Vietnam

Lê Văn Sơn, Đặng Thanh Hiền, Lê Đình Hải, Lê Lập,
Nguyễn Ngọc Nhiên, Nguyễn Việt Không

Summary

We have determined two toxinotypes of *C. perfringens* isolated from goats and sheep reared in the south-central coach area of Vietnam by multiplex PCR with the occurrence of 76,28% type A and 23,72% type D. Analyses the combination of each toxinotype to the genes (cpe and cpb2) encoding the 2 major toxins contribution to the necrotic and hemorrhagic enteritis have revealed 3 combinations of type A with the isolation rates of 7,56% [typ A⁺cpe⁺]; 0,84% [type A⁺cpb2⁺] and 0,84% [type A⁺cpe⁺ cpb2⁺], and only one combination for the type D [typ D⁺ cpb2⁺] at rate of 21,82% isolates. The frequency of type D and the 4 above combinations was higher in the sheeps as compared to the goats, fluctuated by geographic (ecographic) areas, really found from healthy but highly prevalence in the enteritis-diarrheic animals

Key words: Goat, Sheep, *Clostridium perfringens*, Multiplex PCR, Toxinotype, South-central coach area of Vietnam

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Clostridium perfringens là một trong những vi khuẩn gây viêm ruột tiêu chảy ở dê, cừu. *C. perfringens* phân bố rộng rãi trong môi trường, trong đất, chất hữu cơ. Trong khu hệ vi sinh vật bình thường của đường tiêu hóa dê, cừu, *C. perfringens* luôn tồn tại “lành tính”. Khi con vật gặp stress, môi trường đường tiêu hóa thay đổi đột ngột như thay đổi khẩu phần ăn đột ngột, *C. perfringens* tăng sinh và sản sinh độc tố gây bệnh. Tại đường tiêu hóa, độc tố của *C. perfringens* hoặc có tác động trực tiếp hoặc được hấp thu vào máu, và các triệu chứng đầu tiên xuất hiện. Viêm ruột tiêu chảy ở dê, cừu do *C. perfringens* có đặc trưng phân lẫn máu và niêm mạc, đặc biệt có mùi thối khắm; con vật có triệu chứng thần kinh như nghiêng răng, chảy nước rãi, kêu rống, co giật cục bộ, húc đầu vào bờ đất và chết sau vài giờ.

¹ Trung tâm kiểm nghiệm thuốc thú y TW 2;

² Phân viện thú y miền Trung;

³ Viện thú y.

Hiện có 17 loại độc tố của *C. perfringens* được xác định như: độc tố alpha (α), beta (β), epsilon (ϵ), iota (ι), beta2, enterotoxin, theta, vv..., trong đó độc tố epsilon có độc lực cao nhất, thuộc nhóm chất độc bảng B, sau độc tố botulinum và tetanus. Trong quá trình sinh trưởng, mỗi chủng *C. perfringens* chỉ sản sinh một số loại độc tố nhất định. Dựa vào khả năng sản sinh 4 loại độc tố chính là α , β , ϵ và ι , các chủng vi khuẩn *C. perfringens* được phân thành 5 typ khác nhau, gọi là typ độc tố (toxintyp: A, B, C, D, E). Typ A sinh độc tố α ; typ B sinh độc tố α , β , ϵ ; typ C sinh độc tố α , β ; typ D sinh độc tố α , ϵ ; typ E sinh độc tố α , ι .

Các typ vi khuẩn *C. perfringens* gây ra các thể bệnh khác nhau ở người và động vật. Typ A gây bệnh hoại thư sinh hơi ở người, bệnh viêm ruột hoại tử gia cầm. Typ B gây bệnh lý ở cừu non, viêm ruột xuất huyết ở bê và ngựa non; nhiễm độc tố ruột huyết ở cừu. Typ D gây bệnh nhiễm độc tố ruột huyết ở bò, dê, cừu, vv.. Ngoài các độc tố chính, mỗi chủng còn sản sinh nhiều độc tố khác, trong đó quan trọng nhất là enterotoxin và beta2 [8]. Độc tố ruột chủ yếu do *C. perfringens* typ A sản sinh (đôi khi tìm thấy ở một số chủng typ C và D), gây dịch ngộ độc thực phẩm ở người. Các *C. perfringens* có mang độc tố beta2 gây các bệnh đường tiêu hoá ở nhiều loài gia súc như gây tiêu chảy, viêm ruột hoại tử và bệnh nhiễm độc tố ruột huyết [4, 11].

Mỗi loại độc tố có phương thức tác động khác nhau, đặc tính gây bệnh của một chủng *C. perfringens* tùy thuộc vào số và loại độc tố (tổ hợp) nó có thể sản sinh. Trong nghiên cứu này, nhằm xác định đặc tính sản sinh độc tố/ đặc tính gây bệnh chúng tôi tiến hành xác định toxintyp và các tổ hợp của chúng với những gen độc tố chính của các chủng *C. perfringens* phân lập từ dê, cừu tại khu vực Duyên hải Nam trung Bộ, sử dụng kỹ thuật multiplex PCR.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

- *C. perfringens* được phân lập từ các mẫu bệnh phẩm (phân, phủ tạng) của dê, cừu nuôi tại Duyên hải Nam trung Bộ (gồm 3 tỉnh đại diện Khánh Hòa, Ninh Thuận và Bình Thuận). Trong số 156 chủng *C. Perfringens* có 31 chủng phân lập từ dê, cừu khỏe mạnh; 125 chủng từ dê, cừu mắc bệnh viêm ruột tiêu chảy. Các chủng *C. perfringens* đối chứng dương do Viện thú y cấp.

-Phản ứng multiplex PCR được thực hiện theo quy trình đã công bố trước đây [9, 19] sử dụng 5 cặp mồi định typ độc tố và 1 cặp phát hiện gen *cpb2* mã hóa cho protein độc tố beta 2:

Gen	Trình tự các cặp mồi (5'-3')	Sản phẩm
<i>cpa</i>	GCTAATGTTACTGCCGTTGA CCTCTGATACATCGTGTAAG	324bp
<i>cpb</i>	GCGAATATGCTGAATCATCTA GCAGGAACATTAGTATATCTTC	196bp
<i>etx</i>	GCGGTGATATCCATCTATTC CCACTTACTTGTCTACTAAC	655bp
<i>iA</i>	ACTACTCTCAGACAAGACAG CTTTCCTTCTATTACTATACG	446bp
<i>cpe</i>	GGAGATGGTTGGATATTAGG GGACCAGCAGTTGTAGATA	233bp
<i>cpb2</i>	AGATTTTAAATATGATCCTAACC CAATACCCTTCACCAAATACTC	567bp

Khuôn DNA được tách bằng phương pháp đun vi khuẩn ở 100°C, 10phút

Thành phần 25 μ l phản ứng PCR gồm: 7 μ l (10x PCR buffer, 25 mM MgCl₂, 2,5 mM dNTPs, 5x Q-solution); 3 μ l (10 pM các loại mồi); 0,4 μ l Taq DNA polymerase; 10,6 μ l DNase - free water; và 3 μ l DNA. Chu trình PCR gồm 3 bước (i) đun mạch ở 94°C trong 1 phút; (ii) bắt cặp ở 55°C, 1 phút; (iii) sinh tổng hợp ở 72°C trong 1 phút.

Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5%, nhuộm bằng Ethydium bromide, đọc kết quả và chụp ảnh bằng hệ thống Transilluminator của Vilber Lourmat (France).

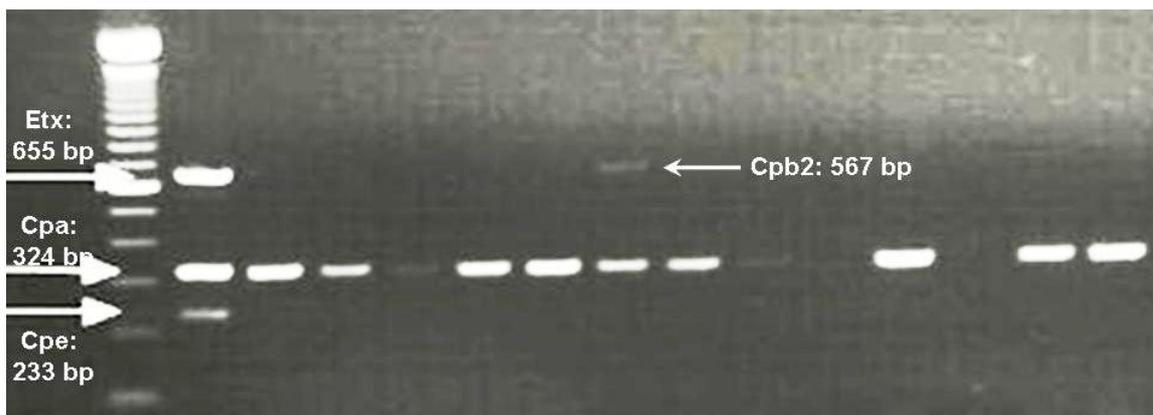
Xác định toxinotyp A, B, C, D và E theo dương tính PCR: typ A dương tính với *cpa*; typ B dương tính với *cpa*, *cpb*, *etx*; typ C dương tính với *cpa*, *cpb*; typ D dương tính với *cpa*, *etx*; và typ E dương tính với *cpa*, *ia*.

Xác định tổ hợp gen: tùy thuộc chủng với typ đã xác định có mang gen *cpe* và *cpb2* hoặc cả hai.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1 Typ độc tố của các chủng phân lập *C. perfringens*

Multiplex PCR được tiến hành với 6 cặp mồi và chu trình trình bày ở phần vật liệu và phương pháp [9], kết quả được minh họa ở hình 1.



Hình 1. Agarose Gel 1,5% sản phẩm multiplex PCR phát hiện độc tố *C. perfringens*

Kết quả ở hình 1 cho thấy multiplex PCR cho phép phát hiện sự có mặt của các gen mã hóa protein độc tố của các chủng *C. perfringens* phân lập.

Giám định gen theo phương pháp trên được tiến hành với tất cả các chủng phân lập *C. perfringens*, kết quả cho thấy, trong số 156 chủng chưa phát hiện typ B, C và E; tần số xuất hiện typ A và D theo địa danh được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả xác định typ độc tố các chủng *C. perfringens*

TT	Địa phương	Số chủng định typ (N)	Typ A n ⁺ (%)*	Typ D n ⁺ (%)
1	Khánh Hòa	28	24 (85,71)	4 (14,29)
2	Ninh Thuận	69	55 (79,71)	14 (20,29)
3	Bình Thuận	59	40 (67,8)	19 (32,2)
Tổng		156	119 (76,28)	37 (23,72)

*Ghi chú**: n⁺: Số chủng dương tính PCR

Kết quả ở bảng 1 cho biết trong số 156 chủng *C. perfringens* phân lập có 119 chủng thuộc typ A (76,28%) dao động trong khoảng từ 67,8% đến 85,71%, và 37 chủng thuộc typ D (23,72%), cao nhất ở Bình Thuận (32,2%), tiếp đến Ninh Thuận (20,29%), và thấp nhất ở Khánh Hòa (14,29%).

Kết quả định typ được thống kê theo nguồn gốc mẫu (gia súc khỏe/bệnh), tỷ lệ phân bố typ A và D theo thể trạng gia súc, được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Phân bố typ độc tố *C. perfringens* theo thể trạng gia súc

TT	Địa phương	Số chủng định typ (N)	Typ A n ⁺ (%)*	Typ D n ⁺ (%)
1	Khỏe	31	27 (87,1)	4 (12,9)
2	Mắc bệnh	125	92 (73,6)	33 (26,4)

*Ghi chú**: n^+ : Số chủng dương tính PCR

Kết quả ở bảng 2 cho thấy ở cừu và dê khỏe mạnh *C. perfringens* typ A là chủ yếu 27/31 (87,1%), tuy nhiên cũng phát hiện typ D ở gia súc khỏe (12,9 % các chủng phân lập). Đối với gia súc ốm, tỷ lệ *C. perfringens* typ D tăng cao hơn so với ở gia súc khỏe 26,4% so với 12,9%).

Hiện tại, các công bố trên thế giới cho biết, typ *C. perfringens* ở dê cừu chủ yếu gồm typ A, C và D [5, 6, 10]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định cho đến thời điểm hiện tại, tại khu vực các tỉnh miền Trung 3 tỉnh thuộc địa bàn thu thập mẫu) toxintyp vi khuẩn *C. perfringens* phân lập từ phân và phủ tạng của dê, cừu bao gồm typ A và D, chưa phát hiện các typ B, C và E, đặc biệt là typ C [5] từ dê, cừu mắc bệnh VRTC. Tần số xuất hiện typ A là 76,28%, chủ yếu ở các gia súc khỏe mạnh và tần số typ D chiếm 23,72% chủ yếu có nguồn gốc từ gia súc bệnh.

Phân bố của các chủng với typ độc tố khác nhau có tính chất phụ thuộc vào vùng sinh thái/địa lý; như ở châu Âu, *C. perfringens* phổ biến ở cừu cũng được xác định là 2 typ A và D: Tại Pháp 95% typ A và 5% typ D, tại Bỉ 91 và 9%; tại Tây Ban Nha 84 và 16% [6]. Tần số xuất hiện các *C. perfringens* với 2 typ độc tố phổ biến cũng mang tính chất phụ thuộc loài; tại Áo, ở cừu tỷ lệ typ A chiếm 80%, typ D 20%; trong khi đó ở dê tỷ lệ typ A là 19,23%, thấp hơn nhiều so với typ D (73,08%) [14].

Typ D được xác định là typ có độc lực cao [16] được phát hiện ở dê, cừu khỏe mạnh trong nghiên cứu này chứng tỏ *C. perfringens* độc lực cao vẫn tồn tại trong tự nhiên, ngay ở gia súc khỏe mạnh. *C. perfringens* typ D cũng đã được công bố ở cừu khỏe (16% chủng phân lập) tại Thụy Sĩ, Thổ Nhĩ Kỳ và các nước khác [5, 10].

Tần số phát hiện các *C. perfringens* với 2 typ độc tố phổ biến đặc biệt phụ thuộc vào thể trạng gia súc; tại Thổ Nhĩ Kỳ, cừu khỏe có tỷ lệ typ A là 95% typ D là 5 %, nhưng ở cừu mắc bệnh typ A chỉ chiếm 64%, và typ D tăng lên 21% [phần còn lại là typ C: 15%] [5]; tương tự ở Thụy Sĩ cừu khỏe tại có tỷ lệ mang typ D: 16% (84,61% còn lại là typ A) [10]. Ngược lại ở dê, cừu mắc bệnh viêm ruột tiêu chảy typ D là 100% [10]; nhìn chung ở gia súc bệnh có sự gia tăng các chủng *C. Perfringens* có độc lực cao (typ D), đôi khi đạt tới 100% các chủng phân lập [10, 17].

3.2 Kiểu gen mã hóa các loại độc tố

Nghiên cứu typ độc tố với phân loại kiểu gen nội typ *C. perfringens* dựa vào sự có mặt của gen mã hóa độc tố enterotoxin và beta2toxin hoặc cả hai, phản ánh độc lực và khả năng gây bệnh của các chủng *C. Perfringens* lưu hành tại một khu vực. Kết quả dương tính PCR đối với gen *cpe* và *cpb2* được thống kê theo địa phương ở bảng 3, theo loài gia súc ở bảng 4 và theo thể trạng con vật ở bảng 5.

Bảng 3. Phân bố *C. perfringens* theo tổ hợp gen *cpe* và *cpb2* ở typ A và D

TT	Địa phương	Typ A				Typ D			
		Số chủng (N^a)	<i>cpe</i> n^+ (%)*	<i>cpb2</i> n^+ (%)*	<i>cpe</i> và <i>cpb2</i> (n^+ (%)*)	Số chủng (N^d)	<i>cpe</i> n^+ (%)*	<i>cpb2</i> n^+ (%)*	<i>cpe</i> và <i>cpb2</i> (n^+ (%)*)
1	Khánh Hòa	24	4 (16,67)	0	0	4	0	2 (50,0)	0
2	Ninh Thuận	55	4 (7,27)	1 (1,82)	1 (1,82)	14	0	2 (14,28)	0
3	Bình Thuận	40	1 (2,5)	0	0	19	0	4 (21,05)	0
Tổng		119	9 (7,56)	1 (0,84)	1 (0,84)	37	0	8 (21,62)	0

*Ghi chú**: n^+ : Số chủng dương tính PCR

Kết quả ở bảng 3 cho biết (i) Gen mã hóa cho độc tố đường ruột chỉ xuất hiện ở 9/119 chủng phân lập thuộc typ A và không có ở 37 chủng phân lập typ D; (ii) Ngược lại gen *cpb2* mã hóa cho độc tố beta2 chủ yếu có ở các *C. perfringens* typ D (8/37, 21,62%) và rất hiếm ở các chủng thuộc typ A, 1 trong 119 trường hợp có cae *cpe* và *cpb2* (0,84%); (iii) có sự khác biệt về tỷ lệ kiểu gen typ A

mang gen *cpe* và typ D mang gen *cpb2* giữa các địa phương nghiên cứu nhưng số mẫu chưa đủ ý nghĩa thống kê.

Bảng 4. Tần số tổ hợp gen *cpe* và *cpb2* ở typ A và D ở dê và cừu

TT	Loài gia súc	Typ A				Typ D			
		Số chủng (N^a)	<i>cpe</i> n^+ (%)*	<i>cpb2</i> n^+ (%)*	<i>cpe</i> và <i>cpb2</i> n^+ (%)*	Số chủng (N^d)	<i>cpe</i> n^+ (%)*	<i>cpb2</i> n^+ (%)*	<i>cpe</i> và <i>cpb2</i> n^+ (%)*
1	Dê	62	3 (4,84)	0	1 (1,61)	21	0	4 (19,05)	0
2	Cừu	57	6 (10,53)	1 (1,75)	0	16	0	4 (25)	0

*Ghi chú**: n^+ : Số chủng dương tính PCR

Số liệu thống kê ở bảng 4 cho biết (i) đối với các chủng *C. perfringens* phân lập typ A tần số xuất hiện gen *cpe* ở cừu (10,53%) lớn hơn ở dê (4,84+1,61%), và tần số xuất hiện gen *cpb2* là tương đương (1,61 và 1,75%) giữa 2 loài vật cảm thụ; (ii) đối với typ D, khác biệt về tần số xuất hiện gen *cpb2* ở cừu (25%) và ở dê là 19,05%. Tuy khác biệt chưa đủ ý nghĩa thống kê (ở độ tin cậy $p=0,01$) nhưng tần số xuất hiện cả hai kiểu gen [typ A cpe^+] và [typ D $cpb2^+$] ở cừu cao hơn ở dê, phản ánh tính phụ thuộc loài cảm thụ.

Bảng 5. Tần số tổ hợp gen *cpe* và *cpb2* ở typ A và D theo thể trạng

TT	Thể trạng	Typ A				Typ D			
		Số chủng (N^a)	<i>cpe</i> n^+ (%)*	<i>cpb2</i> n^+ (%)*	<i>cpe</i> và <i>cpb2</i> n^+ (%)*	Số chủng (N^d)	<i>cpe</i> n^+ (%)*	<i>cpb2</i> n^+ (%)*	<i>cpe</i> và <i>cpb2</i> n^+ (%)*
1	Khỏe	27	1 (3,7)	0	0	4	0	0 (0)	0
2	Bệnh	92	8 (8,69)	1 (1,09)	1 (1,09)	33	0	8 (24,24)	0

*Ghi chú**: n^+ : Số chủng dương tính PCR

Số liệu tổng hợp ở bảng 5 chỉ rõ sự khác biệt về tần số xuất hiện chủng mang gen *cpe* (độc tố đường ruột) và *beta2* ở gia súc bình thường và gia súc bệnh. Hiếm khi (ngoại trừ 1 trường hợp) tìm thấy gen *cpe* và *cpb2* ở gia súc bình thường. Số chủng có gen *cpe* (typ A) và *cpb2* (typ A và D) đều nằm ở nhóm có nguồn gốc từ gia súc bệnh, chứng tỏ sự có mặt của những gen độc tố này có liên quan mật thiết đến sinh bệnh học.

Độc tố ruột chủ yếu do *C. Perfringens* typ A thải tiết và đóng vai trò quan trọng trong các ổ dịch ngộ độc thực phẩm ở người [8]. Trong nghiên cứu này có 7,56% *C. perfringens* phân lập thuộc typ A có gen *cpe*. *C. perfringens* mang gen mã hóa cho độc tố đường ruột tồn tại ở con vật khỏe mạnh (3,7%) và số vi khuẩn độc gia tăng ở gia súc bệnh (8,69%). Đặc điểm tăng số vi khuẩn có độc lực cao này đã được nhận định vào khoảng 5% [12, 13]. Tần số typ A có mang gen *cpe* ở cừu cao hơn ở dê có thể phản ánh vai trò của *C. perfringens* trong viêm ruột tiêu chảy ở cừu trầm trọng hơn ở dê. Hiện chưa phát hiện các chủng typ D mang gen *cpe*.

Độc tố *beta2* mới được phát hiện từ năm 1997 [4], có ần số xuất hiện rất cao ở trong các trường hợp tiêu chảy ở lợn (85%), bê (47,3%) và bò (21,4%). Các *C. perfringens* typ A ở bò cũng mang gen *cpb2* ở tỷ lệ khá cao (50%) [2], cùng với độc tố alpha, độc tố *beta2* được coi là tác nhân gây nên bệnh tích hoại tử và xuất huyết ruột ở những loài vật này [7].

Tác động gây bệnh của độc tố *beta2* ở cừu, dê chủ yếu gây hoại tử xuất huyết đường ruột [3, 15, 18]. Sự có mặt và tỷ lệ *C. perfringens* mang gen *cpb2* là một chỉ thị quan trọng về vai trò của loại vi khuẩn này trong hội chứng viêm ruột tiêu chảy ở cừu, dê. Kết quả ở bảng 3 cho thấy có 21,62% các chủng phân lập *C. perfringens* mang gen này nhưng chủ yếu xuất hiện ở gia súc bệnh (24,24%), chưa phát hiện ở gia súc khỏe. Phân bố của chủng mang gen độc tố *beta2* ít phụ thuộc vào loài vật nhưng thường ở cừu (25%) cao hơn ở dê (19,05%), đặc điểm này cũng phù hợp với nghiên cứu ở Arizona, tần số xuất hiện *cpb2* ở cừu là 19,2% và ở dê là 11,7% [1].

IV KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định toxinotyp của 156 chủng *C. perfringens* phân lập ở dê, cừu (khỏe mạnh và mắc tiêu chảy) thuộc 3 tỉnh duyên hải miền Trung. Tần số xuất hiện typ A là 76,28% và typ D là 23,72%, chưa phát hiện typ C và các typ khác. Tần số xuất hiện các typ phụ thuộc vào địa phương (hay vùng sinh thái) và đặc biệt phụ thuộc vào thể trạng gia súc, trong đó tần số typ A ở gia súc khỏe (87,10%) cao hơn ở gia súc bệnh (73,60%) và typ D, ngược lại, ở gia súc bệnh (26,40%) cao hơn ở gia súc khỏe (12,9%).

Kiểu gen liên quan đến 2 loại độc tố quan trọng là cpe (mã hóa cho độc tố đường ruột) và cpb2 (mã hóa cho độc tố beta2) theo từng tổ hợp với typ A và D cũng đã được xác định. Đã xác định được có 3 tổ hợp gen thuộc typ A với tần số phát hiện: [typ A⁺cpe⁺] (7,56%); [typ A⁺cpb2⁺] (0,84%); [typ A⁺cpe⁺ cpb2⁺] (0,84%); và 1 tổ hợp [typ D⁺ cpb2⁺] (21,82%). Phân bố của các tổ hợp gen này phụ thuộc vào vùng địa lý (vùng sinh thái), loài gia súc cảm thụ và đặc biệt là thể trạng gia súc. Ở gia súc khỏe mạnh chỉ phát hiện 1 trường hợp có tổ hợp gen [typ A⁺cpe⁺] (3,70%), ngược lại ở gia súc bệnh tần số gặp các tổ hợp gen này đều tăng cao: 8,69% [typ A⁺cpe⁺] và 24,24 [typ D⁺ cpb2⁺].

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bueschel, D. M., Jost, B. H., Billington, S. J., Trinh, H. T., & Songer, J. G. Prevalence of cpb2, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotyp with phenotyp. *Vet Microbiol* **94**, 121-129 (2003).
2. Ceci, L. *et al.* Haemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle: possible role of *Clostridium perfringens* typ A in the disease complex. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin.Med* **53**, 518-523 (2006).
3. Dray, T. *Clostridium perfringens* typ A and beta2 toxin associated with enterotoxemia in a 5-week-old goat. *Can Vet J* **45**, 251-253 (2004).
4. Gibert, M., Jolivet-Reynaud, C., & Popoff, M. R. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gen* **203**, 65-73 (1997).
5. Kalender H. *et al.* Typing of isolates of *C. perfringens* from healthy and diseased sheep by multiplex PCR. *Vet.Med-Czech* **50**, 439-442 (2005).
6. Manteca, C. Epidemiological survey of ovine enterotoxaemia in Europe. *CEVA Sante' Animale*, 126 (1994).
7. Manteca, C. *et al.* A role for the *Clostridium perfringens* beta2 toxin in bovine enterotoxaemia? *Vet Microbiol* **86**, 191-202 (2002).
8. McClane, B. A. An overview of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Toxicon* **34**, 1335-1343 (1996).
9. Meer, R. R. & Songer, J. G. Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping *Clostridium perfringens*. *Am.J Vet Res* **58**, 702-705 (1997).
10. Miserez, R. *et al.* Detection of alpha- and epsilon-toxigenic *Clostridium perfringens* typ D in sheep and goats using a DNA amplification technique (PCR). *Lett Appl Microbiol* **26**, 382-386 (1998).
11. Nikolaou, G. N., Kik, M. J., van Asten, A. J., & Grone, A. Beta2-toxin of *Clostridium perfringens* in a hamadryas baboon (*Papio hamadryas*) with enteritis. *J Zoo.Wildl Med* **40**, 806-808 (2009).
12. Sarker, M. R., Shivers, R. P., Sparks, S. G., Juneja, V. K., & McClane, B. A. Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes. *Appl Environ.Microbiol* **66**, 3234-3240 (2000).

13. Sarker, M. R., Singh, U., & McClane, B. A. An update on *Clostridium perfringens* enterotoxin. *J Nat. Toxins* **9**, 251-266 (2000).
14. Sipos, W., Fischer, L., Schindler, M., & Schmoll, F. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from domestic and exotic ruminants and swine. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **50**, 360-362 (2003).
15. Uzal, F. A. *et al.* Ulcerative enterocolitis in two goats associated with enterotoxin- and beta2 toxin-positive *Clostridium perfringens* typ D. *J Vet Diagn Invest* **20**, 668-672 (2008).
16. Uzal, F. A. & Kelly, W. R. Enterotoxaemia in goats. *Vet Res Commun* **20**, 481-492 (1996).
17. Uzal, F. A., Plumb, J. J., Blackall, L. L., & Kelly, W. R. PCR detection of *Clostridium perfringens* producing different toxins in faeces of goats. *Lett Appl Microbiol* **25**, 339-344 (1997).
18. Uzal, F. A., Vidal, J. E., McClane, B. A., & Gurjar, A. A. *Clostridium Perfringens* Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases. *The Open Toxinology Journal* **3**, 24-42 (2010).
19. van Asten, A. J., van der Wiel, C. W., Nikolaou, G., Houwers, D. J., & Grone, A. A multiplex PCR for toxin typing of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet Microbiol* **136**, 411-412 (2009).