

XÁC ĐỊNH SỰ HIỆN DIỆN CỦA GEN CPB Ở VI KHUẨN CLOSTRIDIUM PERFRINGENS TỪ PHÂN LẬP TỪ GÀ MẮC VIÊM RUỘT HOẠI TỬ TẠI THÀNH PHỐ HUẾ

Nguyễn Đình Thuỳ Khương¹, Nguyễn Xuân Hoà¹, Huỳnh Văn Chương^{2*}, Tạ Đặng Ý Vi²,
Hoàng Nhật Hạ², Nguyễn Bảo Hưng²

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

² Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Nguyễn Đình Tú, Huế, Việt Nam

Tác giả liên hệ: Huỳnh Văn Chương <hvanchuong@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 01-4-2026; Ngày chấp nhận đăng: 09-5-2026)

Tóm tắt. Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và xác định sự hiện diện của gen *cpb* ở vi khuẩn *Clostridium perfringens* từ các mẫu bệnh phẩm thu thập tại Thành phố Huế. Tổng cộng 200 mẫu phân từ gà nghi mắc bệnh viêm ruột hoại tử đã được thu thập tại 4 khu vực: Hương Thủy, Quảng Điền, Phú Vang và Hương Trà (cũ). Bằng các phương pháp nuôi cấy kỵ khí và giám định đặc tính sinh vật hóa học truyền thống, 116 chủng phân lập *C. perfringens* đã được xác định, chiếm tỷ lệ 58,00%. Tỷ lệ nhiễm có xu hướng tăng theo quy mô chăn nuôi, đạt cao nhất ở các trang trại quy mô lớn (66,67%, $p < 0,05$), trong khi yếu tố độ tuổi không gây ra sự sai khác đáng kể ($p > 0,05$). Tất cả các chủng phân lập đều mang đặc tính sinh học điển hình của loài. Thông qua kỹ thuật PCR, nghiên cứu đã phát hiện 28/116 chủng phân lập mang gen độc tố *cpb*, chiếm tỷ lệ 24,14%. Kết quả này cho thấy sự hiện diện của các chủng *C. perfringens* mang gen *cpb* đang lưu hành tại địa phương. Nghiên cứu cung cấp cơ sở dữ liệu quan trọng cho việc dự báo dịch tễ và xây dựng chiến lược kiểm soát bệnh viêm ruột hoại tử tại khu vực.

Từ khoá: *Clostridium perfringens*, gà, gen *cpb*, thành phố Huế, viêm ruột hoại tử.

Detection of the *cpb* gene in *Clostridium perfringens* isolated from chickens with necrotic enteritis in Hue City

Nguyễn Đình Thuỳ Khương¹, Nguyễn Xuân Hoà¹, Huỳnh Văn Chương^{2*}, Tạ Đặng Ý Vi²,
Hoàng Nhật Hạ², Nguyễn Bảo Hưng²

¹ University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St, Hue, Vietnam

² Institute of Biotechnology, Hue University, Nguyen Dinh Tu St., Hue City

* Correspondence to Huynh Van Chuong <hvanchuong@hueuni.edu.vn>

(Received: 01 April 2026; Accepted: 09 May 2026)

Abstract. The study was conducted to isolate and identify the presence of the *cpb* gene in *Clostridium perfringens* from clinical samples collected in Hue City. A total of 200 fecal samples were collected from chickens suspected of having necrotic enteritis across four areas: Huong Thuy, Quang Dien, Phu Vang, and Huong Tra (former). Using anaerobic cultivation and traditional biochemical characterization, 116 *C. perfringens* strains were isolated, accounting for a rate of 58.00%. The infection rate tended to increase with farm scale, reaching the highest in large-scale farms (66.67%, $p < 0.05$), while no significant differences were observed between age groups ($p > 0.05$). All isolates exhibited typical phenotypic and biochemical characteristics of the species. Notably, through PCR technique, the study identified that 28 out of 116 isolates carried the *cpb* toxin gene, accounting for 24.14%. These results indicate the presence

of strains harboring the *cpb* gene circulating locally. The study provides important baseline data for epidemiological forecasting and the development of necrotic enteritis control strategies in the region.

Keywords: *Clostridium perfringens*, chicken, *cpb* gene, Hue City, necrotic enteritis.

1 Đặt vấn đề

Trong bối cảnh ngành chăn nuôi gia cầm tại Việt Nam đang chuyển dịch mạnh mẽ sang mô hình trang trại tập trung, áp lực về dịch bệnh ngày càng trở nên cấp thiết. Trong đó, bệnh viêm ruột hoại tử (Necrotic Enteritis - NE) do vi khuẩn *Clostridium perfringens* gây ra được đánh giá là một trong những thách thức kinh tế nghiêm trọng nhất đối với ngành gia cầm toàn cầu, với thiệt hại ước tính lên đến hàng tỷ USD mỗi năm [1]. *C. perfringens* là vi sinh vật thường trú trong đường ruột, nhưng dưới tác động của các yếu tố tiên phát như cầu trùng, thức ăn có hàm lượng protein quá cao, chúng có thể bùng phát thành tác nhân gây bệnh cơ hội, gây tổn thương niêm mạc ruột, làm tăng hệ số chuyển hóa thức ăn (FCR) và dẫn đến tỷ lệ tử vong cao [2].

Độc lực của *C. perfringens* được quyết định bởi hệ thống độc tố đa dạng, trong đó gen độc tố Beta (*cpb*) đóng vai trò then chốt trong việc hình thành các bệnh tích hoại tử và xuất huyết đường ruột nghiêm trọng. Các chủng mang gen *cpb* (thường thuộc Type B và Type C) có khả năng gây ra thể bệnh cấp tính với độc lực vượt trội so với các chủng chỉ mang gen độc tố Alpha (*cpa*) thông thường [3]. Vì vậy, việc xác định sự hiện diện của gen *cpb* không chỉ có ý nghĩa trong chẩn đoán mà còn là chỉ số quan trọng để đánh giá mức độ nguy hiểm của các ổ dịch. Ở nước ta, sự phân bố các gen độc lực của *C. perfringens* có sự biến động lớn theo vùng địa lý và phương thức chăn nuôi [4]. Thành phố Huế là khu vực có sự đan xen phức tạp giữa chăn nuôi trang trại và nông hộ, tạo điều kiện cho các bệnh đường tiêu hóa trên gà diễn biến khó lường. Tuy nhiên, các dữ liệu về đặc điểm sinh học phân tử, đặc biệt là sự lưu hành của các chủng mang gen độc tố mạnh như *cpb* tại khu vực

này vẫn còn rất hạn chế. Xuất phát từ thực tiễn trên, nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và khảo sát sự mang gen độc tố *cpb* của vi khuẩn *C. perfringens* trên gà nghi mắc viêm ruột hoại tử tại thành phố Huế, từ đó cung cấp cơ sở khoa học cho việc xây dựng chiến lược kiểm soát dịch bệnh hiệu quả và bền vững tại địa phương.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

Nguyên liệu mẫu vật: Tổng cộng 200 mẫu phân từ gà nghi mắc bệnh viêm ruột hoại tử được thu thập trực tiếp tại các cơ sở chăn nuôi. Mỗi địa phương (Hương Thủy, Quảng Điền, Phú Vang, Hương Trà) thu thập 50 mẫu, đại diện cho các quy mô chăn nuôi khác nhau từ nông hộ đến trang trại lớn. Tiêu chí chọn gà lấy mẫu dựa trên các triệu chứng lâm sàng điển hình của bệnh viêm ruột hoại tử: phân lỏng, có màu nâu sẫm đến đen, chứa bọt khí hoặc chất nhầy niêm mạc. Mẫu phân được lấy trực tiếp từ trực tràng hoặc phân mới thải ra, cho vào ống vô trùng và bảo quản lạnh chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 12 giờ.

Hoá chất nghiên cứu:

Môi trường phân lập và nuôi cấy: Môi trường TSC (Oxoid, CM0587) và môi trường Blood Agar Base (Oxoid, CM0055) bổ sung 5% máu cừu khừ fibrin.

Hóa chất giám định sinh hóa: Bộ thuốc nhuộm Gram; môi trường Litmus milk; môi trường canh thang cơ sở có bổ sung các loại đường (Glucose, Lactose, Maltose, Saccharose, Mannitol) và chỉ thị màu phenol red; môi trường thử nghiệm

tính di động và sinh Indole được sử dụng để xác định các đặc tính sinh học của *C. perfringens*.

Hóa chất tách chiết DNA: Bộ kit tách chiết DNA QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Đức) được sử dụng để tách chiết DNA tổng số từ các chủng vi khuẩn.

Hóa chất PCR: Hỗn hợp phản ứng pha sẵn 2X PCR Master Mix (Thermo Scientific) đã bao gồm Taq polymerase, dNTPs, đệm PCR và MgCl₂ được sử dụng trong phản ứng PCR. Cặp mồi đặc hiệu khuếch đại gen *cpb* (196 bp) được thiết kế dựa trên trình tự gene *cpb* đã được công bố trước đó [5] gồm F: 5'-GCGAATATGCTGAATCATCTA-3' và R: 5'-GCAGGAACATTAGTATATCTTC-3'. Nước không chứa nuclease (Nuclease-free water).

Hóa chất điện di: Agarose (Sigma-Aldrich, A9539), thuốc nhuộm an toàn 6X GelGreen Loading Buffer (ABT, Việt Nam), và thang chuẩn DNA 50–2000 bp (DNA ladder, Bionline, BIO-33052) được sử dụng để phân tích sản phẩm PCR.

Dụng cụ:

Thiết bị nuôi cấy: Bình ủ kỵ khí (Anaerobic jar) và các gói tạo môi trường kỵ khí chuyên dụng (AnaeroGen) để nuôi cấy vi khuẩn.

Thiết bị tách chiết và PCR: Máy ly tâm bàn (Eppendorf, 5424R), máy PCR nhiệt chu kỳ (Bio-Rad T100 Thermal Cycler), và hệ thống điện di gel agarose (Bio-Rad Mini-Sub Cell GT).

Thiết bị quan sát và phân tích: Kính hiển vi quang học (Olympus CX31) để quan sát đặc tính Gram.

2.2 Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Địa điểm thu mẫu: Mẫu được thu thập trực tiếp tại các hộ chăn nuôi và trang trại gia cầm tập trung trên địa bàn thành phố Huế: Hương Thủy, Quảng Điền, Phú Vang và Hương Trà.

Địa điểm phân tích: Công tác phân lập, nuôi cấy kỵ khí và giám định đặc tính sinh vật hóa học,

cùng với kỹ thuật sinh học phân tử PCR xác định gen độc tố được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Vi sinh, Khoa Chăn nuôi Thú y, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế và Phòng thí nghiệm Miễn dịch và vắc xin, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân lập và định danh vi khuẩn

Việc phân lập vi khuẩn *C. perfringens* được thực hiện dựa trên quy trình của Quinn và cs (1994) [6]. Mẫu được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường dịch thể kỵ khí (Thioglycollate), sau đó cấy phân vùng trên môi trường thạch chuyên biệt TSC (Tryptose Sulfite Cycloserine) bổ sung D-cycloserine và thạch máu (Blood Agar) chứa 5% máu cừu. Các đĩa thạch được ủ kỵ khí hoàn toàn trong bình (Anaerobic jar) sử dụng gói tạo môi trường kỵ khí chuyên dụng ở nhiệt độ 37 °C trong 24–48 giờ [11, 12].

Các khuẩn lạc nghi ngờ (màu đen trên TSC, tạo vòng dung huyết kép trên thạch máu) được kiểm tra đặc tính sinh hóa bao gồm: nhuộm Gram xác định hình thái, thử nghiệm tính di động, khả năng lên men các loại đường (Glucose, Lactose, Maltose, Saccharose), phản ứng trên môi trường Litmus milk và thử nghiệm không lên men Mannitol cũng như không sinh Indole [12].

Phương pháp xác định gen độc tố *cpb* bằng kỹ thuật PCR

Tách chiết DNA: DNA tổng số của vi khuẩn được tách chiết bằng phương pháp đun sôi (boiling method) [6]. Cụ thể, một khuẩn lạc vi khuẩn thuần khiết được hòa vào 100 µl nước cất vô trùng, đun sôi ở 100 °C trong 10 phút, sau đó ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút. Phần dịch trong nổi phía trên chứa DNA được thu lại để làm khuôn (template) cho phản ứng PCR

Khuếch đại PCR: Phản ứng PCR được thực hiện nhằm phát hiện gen *cpb* sử dụng các cặp mồi đặc hiệu đã chuẩn bị [6]. Hỗn hợp phản ứng PCR

(tổng thể tích 25 μ l) bao gồm Master Mix, cặp mồi đặc hiệu (mồi xuôi F và mồi ngược R), DNA khuôn và được bổ sung nước không chứa nuclease (nuclease-free water) cho vừa đủ thể tích.

Chu trình nhiệt: Phản ứng được thực hiện trên máy luân nhiệt với quy trình: biến tính đầu (95 °C/5 phút); 35 chu kỳ tiếp theo (biến tính 94 °C/45 giây, bắt mồi 55 °C/45 giây, kéo dài 72 °C/1 phút); và giai đoạn kéo dài cuối cùng (72 °C/10 phút).

Điện di kiểm tra: Sản phẩm khuếch đại được điện di trên gel agarose 2% (Meridian Bioscience, USA) trong đệm TAE 1X (ABT, Việt Nam), với điện thế cung cấp 60 V trong 30 phút. Gel được nhuộm bằng thuốc nhuộm 6X GelGreen Loading Buffer With Tricolor (ABT, Việt Nam). Kết quả được quan sát dưới đèn UV, các mẫu dương tính được xác định khi xuất hiện băng DNA đặc hiệu có kích thước khoảng 196 bp so với thang chuẩn DNA (DNA ladder, Bioline).

2.4 Phương pháp xử lý số liệu

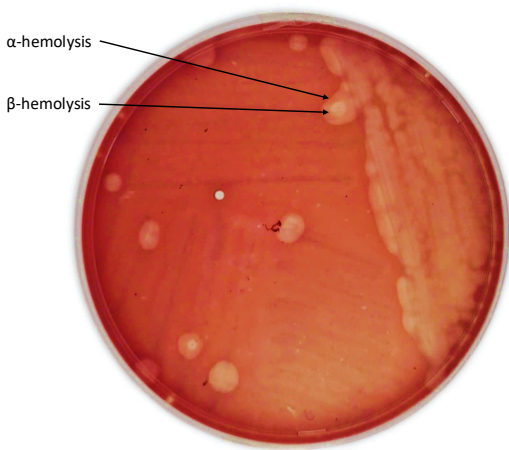
Toàn bộ số liệu được quản lý bằng phần mềm

Microsoft Excel 2021. Các thuật toán thống kê mô tả được sử dụng để xác định tỷ lệ nhiễm. Sự sai khác về tỷ lệ nhiễm giữa các nhóm quy mô đàn và độ tuổi được kiểm chứng bằng phép kiểm Chi-square (χ^2) trên phần mềm SPSS 26.0. Phân tích hậu kiểm (post-hoc) so sánh từng cặp tỷ lệ giữa các nhóm được thực hiện bằng phép kiểm Z (Z-test) có hiệu chỉnh Bonferroni. Mức ý nghĩa thống kê được xác lập khi giá trị $p < 0,05$.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Thực trạng nhiễm vi khuẩn *Clostridium perfringens* trên đàn gà tại Thành phố Huế

Để xác định tỷ lệ phân lập của vi khuẩn *C. perfringens*, nghiên cứu đã tiến hành thu thập và phân tích 200 mẫu phân từ gà có biểu hiện lâm sàng nghi mắc bệnh. Kết quả phân lập thể hiện trên môi trường thạch máu, thạch TSC (Hình 1a-b) và Bảng 1.



Hình 1a



Hình 1b

Hình 1. Khuẩn lạc *Clostridium perfringens* phân lập trên môi trường thạch máu (1a) và thạch TSC (1b)

Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn *C. perfringens* từ mẫu phân thu được

Địa điểm thu mẫu	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Hương Thủy	50	25	50 ^b
Quảng Điền	50	38	76 ^a
Phú Vang	50	31	62 ^{ab}
Hương Trà	50	22	44 ^b
Tổng cộng	200	116	58

Ghi chú: Các giá trị có chữ cái mũ (ab) khác nhau trong cùng một cột biểu thị sai khác ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả tại Bảng 1 cho thấy, trong tổng số 200 mẫu bệnh phẩm phân tích, đã xác định được 116 mẫu dương tính với vi khuẩn *C. perfringens*, đạt tỷ lệ trung bình là 58%. Tỷ lệ nhiễm có sự biến động rõ rệt giữa các địa phương, dao động từ 44% (Hương Trà) đến cao nhất là 76% (Quảng Điền).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với kết quả của một số nghiên cứu như của Nguyễn Thị Thắm và cs (2020) [4] khi cho thấy tỷ lệ phân lập được ở gà nghi nhiễm bệnh là 134/231 (39,83%). Sự khác biệt về tỷ lệ phân lập giữa các nghiên cứu có thể được giải thích thông qua phương pháp chọn mẫu định hướng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung thu thập những mẫu phân có biểu hiện bệnh lý điển hình của viêm ruột hoại tử như: phân lỏng hoặc nhão, màu nâu sẫm đến đen, xuất hiện bọt khí và chất nhầy niêm mạc, đôi khi kèm theo máu

tươi hoặc máu đã tiêu hóa. Đây là những chỉ dấu lâm sàng quan trọng phản ánh sự tăng sinh mạnh mẽ của *C. perfringens* trong đường ruột. Ngoài ra, sự khác biệt về điều kiện khí hậu đặc trưng tại thành phố Huế cùng với phương thức quản lý chăn nuôi tại địa phương có thể là những yếu tố cộng hưởng thúc đẩy sự lưu hành cao của mầm bệnh trong quần thể gà nghiên cứu.

3.2 Ảnh hưởng của độ tuổi đến tỷ lệ lưu hành vi khuẩn *C. perfringens*

Mối liên quan giữa độ tuổi và tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *C. perfringens* trên các đàn gà nghi mắc bệnh được trình bày tại Bảng 2. Phân tích sự phân bố mầm bệnh giữa nhóm gà con (2-6 tuần tuổi) và nhóm gà trưởng thành (>6 tuần tuổi) nhằm đánh giá tính đặc trưng theo giai đoạn trong động thái dịch tễ học của bệnh viêm ruột hoại tử.

Bảng 2. Tỷ lệ phân lập *C. perfringens* theo nhóm tuổi của gà

Độ tuổi	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ phân lập (%)
2-6 tuần tuổi	56	32	57,14
>6 tuần tuổi	144	84	58,33

Kết quả tại Bảng 2 cho thấy tỷ lệ dương tính với *C. perfringens* ở nhóm gà 2-6 tuần tuổi là 57,14% trong khi nhóm gà trên 6 tuần tuổi là 58,33%. Phép

kiểm Chi-square khẳng định không có sự sai khác ý nghĩa thống kê về tỷ lệ nhiễm giữa hai nhóm tuổi này ($p > 0,05$).

Tỷ lệ phân lập dao động trong khoảng 57–58% là mức độ nhiễm tương đối cao, phản ánh sự lưu hành phổ biến của *C. perfringens* trong các cơ sở chăn nuôi tại địa phương. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây, khẳng định vi khuẩn này là một thành phần thường trú của hệ vi sinh vật đường ruột gia cầm và có khả năng khu trú từ giai đoạn rất sớm [2]. Việc không ghi nhận sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ nhiễm giữa hai nhóm tuổi cho thấy nguy cơ mang trùng không giảm khi gà trưởng thành. Mặc dù dạng lâm sàng của viêm ruột hoại tử thường bùng phát mạnh nhất ở gà từ 2–5 tuần tuổi – do sự thay đổi hệ vi sinh vật đường ruột và chế độ dinh dưỡng – nhưng trạng thái mang trùng và nhiễm dưới lâm sàng vẫn có thể duy trì suốt chu kỳ chăn nuôi [7].

Sự hiện diện ổn định của vi khuẩn ở cả hai nhóm tuổi trong nghiên cứu này có thể được giải thích bởi áp lực mầm bệnh từ môi trường cao và liên tục. Nha bào của *C. perfringens* có sức đề kháng

cực cao, tồn tại dai dẳng trong chất độn chuồng, bụi bẩn và phân, tạo nguồn tái nhiễm thường xuyên cho đàn gà bất kể lứa tuổi.

Từ các kết quả trên, có thể kết luận rằng sự lưu hành của *C. perfringens* tại Thành phố Huế không phụ thuộc vào độ tuổi của gà. Điều này nhấn mạnh tính cấp thiết của việc áp dụng các biện pháp an toàn sinh học toàn diện cho toàn đàn (bao gồm vệ sinh chuồng trại, quản lý chất độn và kiểm soát yếu tố nguy cơ như cầu trùng), thay vì chỉ tập trung vào giai đoạn gà con, nhằm giảm thiểu thiệt hại kinh tế do nhiễm dưới lâm sàng gây ra ở giai đoạn gà lớn [8].

3.3 Tỷ lệ nhiễm *C. perfringens* theo quy mô đàn

Tỷ lệ nhiễm *C. perfringens* theo quy mô đàn gia cầm được trình bày trong Bảng 3. Kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm tăng dần theo quy mô đàn, với các trang trại quy mô lớn ghi nhận tỷ lệ cao nhất.

Bảng 3. Ảnh hưởng của quy mô đến tỷ lệ nhiễm *C. perfringens*

Quy mô đàn	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Nông hộ	51	26	50,98 ^b
Trang trại quy mô nhỏ	43	23	53,49 ^b
Trang trại quy mô vừa	34	19	55,88 ^{ab}
Trang trại quy mô lớn	72	48	66,67 ^a

Ghi chú: Các giá trị có chữ cái mũ (a,b) khác nhau trong cùng một cột biểu thị sai khác ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Phân tích kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm *C. perfringens* có xu hướng tăng theo quy mô đàn, với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa trang trại quy mô lớn so với nông hộ và trang trại quy mô nhỏ. Tỷ lệ nhiễm cao hơn ở trang trại quy mô lớn (66,67%) có thể liên quan đến các yếu tố đặc trưng của hệ thống chăn nuôi tập trung, bao gồm mật độ nuôi cao, khối lượng chất thải lớn và áp lực sản

xuất cao. Những điều kiện này có thể tạo môi trường thuận lợi cho sự tồn tại, sinh sôi và lan truyền của *C. perfringens*, một tác nhân gây bệnh hoại tử ruột (necrotic enteritis) phổ biến ở gia cầm.

Các nghiên cứu trước đây đã ghi nhận rằng quy mô đàn và cường độ chăn nuôi có thể ảnh hưởng đến mức độ kháng kháng sinh của *C. perfringens*, với tỷ lệ kháng cao hơn đáng kể ở trang

trại quy mô lớn so với quy mô nhỏ hơn, phản ánh áp lực chọn lọc mạnh hơn trong môi trường chăn nuôi tập trung [9]. Ngoài ra, các yếu tố liên quan đến chăn nuôi thâm canh, như mật độ cao và quản lý chất thải, được xem là yếu tố nguy cơ góp phần làm tăng sự lan rộng của *C. perfringens* và nguy cơ bùng phát bệnh hoại tử ruột ở gà thịt [7]. Mặc dù một số nghiên cứu khác cho thấy sự biến thiên về tỷ lệ lưu hành theo khu vực và phương pháp quản lý, nhưng các hệ thống chăn nuôi quy mô lớn thường đối mặt với thách thức lớn hơn trong việc kiểm soát các tác nhân gây bệnh đường ruột do điều kiện môi trường và sinh học thuận lợi cho vi

khuẩn kỵ khí như *C. perfringens* [10]. Những phát hiện này nhấn mạnh nhu cầu tăng cường các biện pháp an toàn sinh học và quản lý môi trường phù hợp hơn ở các trang trại quy mô lớn nhằm giảm thiểu nguy cơ nhiễm *C. perfringens*.

3.4 Kết quả giám định các đặc tính sinh vật hóa học của vi khuẩn *C. perfringens* phân lập được

Dựa trên các đặc điểm hình thái và sinh hóa [6], 116 chủng vi khuẩn (100%) đều tăng trưởng điển hình trên môi trường thạch máu và thạch TSC; số liệu chi tiết được tổng hợp tại Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả kiểm tra đặc tính sinh hoá của các chủng vi khuẩn *C. perfringens* phân lập được

Tính chất sinh hoá	Số mẫu xét nghiệm	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Thạch máu	116	116	100
TSC	116	116	100
Tính di động	116	0	0
Phản ứng lên men đường	116	116	100
Litmus milk	116	116	100
Mannitol	116	0	0
Indole	116	0	0
Nhuộm Gram	116	116	100

Khi thực hiện nhuộm Gram, tất cả các chủng phân lập đều bắt màu Gram dương, trực khuẩn có đầu tù, xuất hiện riêng lẻ, đôi hoặc thành chuỗi ngắn. Đặc điểm hình thái này phù hợp với mô tả điển hình của *C. perfringens* là vi khuẩn Gram dương, không di động, hình thành nha bào yếm khí [11; 12].

Trên môi trường TSC agar, sau 24 giờ nuôi cấy yếm khí ở 37 °C với 10% CO₂, tất cả các chủng đều hình thành khuẩn lạc đen, tròn, lồi, bờ đều, nhẵn, phân bố rải rác trên bề mặt. Đặc tính này dựa trên khả năng khử sulfite của vi khuẩn, tạo thành hợp chất sulfide đen với ion sắt [13].

Trên môi trường thạch máu, 100% (116/116) các chủng phân lập thể hiện hoạt tính dung huyết kép đặc trưng: vòng trong là dung huyết beta (β -hemolysis) hoàn toàn (do độc tố theta/perfringolysin O), vòng ngoài là dung huyết alpha (α -hemolysis) một phần (do độc tố alpha), tạo nên hình ảnh "mục tiêu" (target hemolysis) điển hình xung quanh khuẩn lạc nhẵn, tròn, bề mặt bóng [12].

Trên môi trường Litmus milk, sau 24–28 giờ nuôi cấy ở 37 °C với 10% CO₂, tất cả các chủng gây phản ứng lên men mạnh mẽ (stormy fermentation): lên men lactose tạo acid làm đông tụ

casein (hình thành cục đông), thay đổi màu từ tím sang nâu/trắng nhờ chỉ thị litmus, sau đó khí sinh ra làm vỡ cấu trúc cục đông. Đây là phản ứng đặc trưng cao của *C. perfringens* [11; 12].

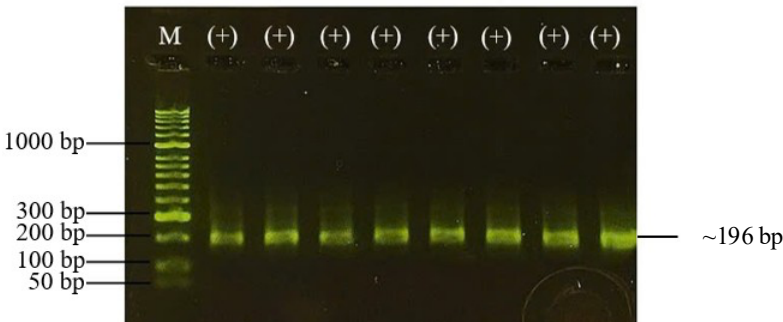
Các thử nghiệm lên men carbohydrate cho thấy 100% chủng lên men glucose, lactose, maltose và saccharose (tạo acid và khí, làm môi trường phenol red chuyển từ đỏ sang vàng), nhưng không lên men mannitol. Tất cả các chủng đều âm tính với indole và không di động (chỉ phát triển dọc theo đường cấy) [11].

Các đặc tính sinh vật và hóa học của các chủng *C. perfringens* phân lập được hoàn toàn phù hợp với các đặc điểm điển hình của loài này theo các tài liệu trong và ngoài nước, đặc biệt trong bối cảnh phân lập từ gà mắc viêm ruột hoại tử [14; 15].

Kết quả này xác nhận việc phân lập và giám định thành công các chủng *C. perfringens* từ các trường hợp viêm ruột hoại tử ở gà tại Thành phố Huế.

3.5 Kết quả điện di của sản phẩm PCR gene *cpb*

Kết quả phản ứng PCR gene *cpb* của 116 chủng *C. perfringens* phân lập được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 2% (Meridian Bioscience, USA) trong đệm TAE 1X (ABT, Việt Nam), với điện thế cung cấp 60 V trong 30 phút. Kích thước các băng DNA được so sánh với thang chuẩn DNA HyperLadder 50-2000 bp (Bioline). Băng đặc hiệu cho gene *cpb* xuất hiện ở vị trí khoảng 196 bp (Hình 3) và tỷ lệ *C. perfringens* mang gene độc tố *cpb* được thể hiện qua Bảng 5.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR có chứa gen *cpb*

Ghi chú: *M: Thang DNA 50–2000 bp (Bioline); (+): Mẫu dương tính có mang gene *cpb* có kích thước khoảng 196 bp

Bảng 5. Tỷ lệ *C. perfringens* mang gene độc tố *cpb*

Địa điểm	Số chủng kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Hương Thủy	25	4	16,0 ^b
Quảng Điền	38	12	31,58 ^a
Phú Vang	31	7	22,58 ^{ab}
Hương Trà	22	5	22,73 ^{ab}
Tổng	116	28	24,14

Ghi chú: Các giá trị có chữ cái mũ (ab) khác nhau trong cùng một cột biểu thị sai khác ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả phân tích PCR trên 116 chủng *C. perfringens* phân lập được cho thấy có 28 chủng phân lập mang gen độc tố *cpb*, chiếm tỷ lệ trung bình 24,14%. Tỷ lệ này biến động từ 16,0% (Hương Thủy) đến 31,58% (Quảng Điền), trong đó khu vực Hương Thủy ghi nhận mức nhiễm thấp hơn đáng kể ($P < 0,05$) so với các địa phương còn lại.

Theo hệ thống phân loại truyền thống và cả hệ thống mở rộng của Rood và cs (2018) [3], độc tố Beta (*cpb*) là đặc trưng của các chủng *C. perfringens* Type B và Type C. Mặc dù Type A (chỉ mang gen *cpa*) thường được coi là tác nhân phổ biến nhất gây viêm ruột hoại tử trên gia cầm, nhưng sự xuất hiện với tần suất cao của gen *cpb* trong nghiên cứu này cho thấy sự lưu hành mạnh mẽ của các chủng có độc lực cao tại địa phương.

Tỷ lệ các chủng *Clostridium perfringens* mang gene *cpb* trong nghiên cứu này đạt 24,14%, cao hơn so với nhiều nghiên cứu trước đây trên gia cầm, nơi gene này thường được ghi nhận với tỷ lệ rất thấp hoặc không phát hiện. Sự khác biệt này có thể liên quan đến đối tượng và phương pháp chọn mẫu trong nghiên cứu. Cụ thể, các mẫu trong nghiên cứu này được thu thập từ những đàn gà có biểu hiện nghi nhiễm bệnh viêm ruột hoại tử, do đó quần thể vi khuẩn phân lập có thể đã được sàng lọc bước đầu theo hướng tập trung vào các chủng có độc lực cao. Việc lựa chọn mẫu từ các cá thể nghi mắc bệnh có thể làm tăng khả năng phát hiện các gene độc lực như *cpb*, dẫn đến tỷ lệ ghi nhận cao hơn so với các nghiên cứu khảo sát trên quần thể gà khỏe mạnh hoặc lấy mẫu ngẫu nhiên trong đàn.

Kết quả này nhấn mạnh sự cần thiết của việc giám sát liên tục sự lưu hành của *C. perfringens* và các gene độc tố liên quan (đặc biệt *cpb*) trong đàn gia cầm tại các khu vực có tỷ lệ cao như thành phố Huế. Việc giám sát định kỳ sẽ hỗ trợ phát hiện sớm các ổ dịch tiềm ẩn, từ đó triển khai các biện pháp phòng ngừa và kiểm soát hiệu quả, góp phần giảm thiểu tác động kinh tế và sức khỏe đàn gia cầm.

4 Kết luận

Nghiên cứu xác định tỷ lệ nhiễm *C. perfringens* trên đàn gà nghi mắc viêm ruột hoại tử tại Thành phố Huế ở mức cao, đạt 58,00%. Tỷ lệ nhiễm *C. perfringens* có xu hướng tăng theo quy mô đàn, nhưng không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê về lứa tuổi. Đặc biệt, phân tích sinh học phân tử ghi nhận 24,14% số chủng phân lập mang gen độc tố *cpb*. Kết quả này cho thấy sự hiện diện của các chủng vi khuẩn mang gen *cpb* tại địa phương. Việc triển khai đồng bộ các biện pháp an toàn sinh học và giám sát dịch tễ định kỳ là rất cần thiết nhằm giảm thiểu rủi ro bệnh.

Lời cảm ơn

Bài báo là một phần kết quả thuộc đề tài nghiên cứu ứng dụng và phát triển công nghệ cấp quốc gia do Bộ Nông nghiệp và Môi trường giao Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế chủ trì thực hiện theo Hợp đồng số 01/HD-KHCN

Tài liệu tham khảo

1. Skinner JT, Bauer S, Young V, Pauling G, Wilson J. An economic analysis of the impact of subclinical (mild) necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis.* 2010;54:1237-1240.
2. Moore RJ. Necrotic enteritis predisposing factors in broiler chickens. *Avian Pathol.* 2016;45(3):275-281.
3. Rood JI, Adams V, Lacey J, Lyras D, McClane BA, Melville SB, et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe.* 2018;53:5-10.
4. Nguyễn TT, Vũ TN, Nguyễn XH, Nguyễn VG. Tỷ lệ nhiễm và đặc điểm sinh học của vi khuẩn *Clostridium perfringens* phân lập từ gà mắc bệnh

viêm ruột hoại tử tại một số tỉnh phía Bắc. Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y. 2020;27:45-52.

5. Nguyen TT, Vu-Khac H, Nguyen TD. Isolation and characterization of *Clostridium perfringens* strains isolated from ostriches (*Struthio camelus*) in Vietnam. Vet World. 2020;13(8):1679-1684.

6. Yoo HS, Lee SU, Park KY, Park YH. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 1997;35(1):228-232.

7. Fathima S, Hakeem WGA, Shanmugasundaram R, Selvaraj RK. Necrotic enteritis in broiler chickens: a review on the pathogen, pathogenesis and prevention. Microorganisms. 2022;10(10):1958.

8. Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Elbestawy AR, El-Shall NA, Saad AM, Salem HM, et al. Necrotic enteritis in broiler chickens: disease characteristics and prevention using organic antibiotic alternatives - a comprehensive review. Poult Sci. 2022;101:101590.

9. Kerek Á, Szabó Á, Barnácz F, Csirmaz B, Kovács L, Jerzsele Á. Antimicrobial susceptibility profiles of commensal *Clostridium perfringens* isolates from chickens in Hungarian poultry farms between 2022 and 2023. Front Vet Sci. 2025;12:1589747.

10. Mohiuddin M, Song Z, Liao S, Qi N, Li J, Lv M, et al. Animal model studies, antibiotic resistance and toxin gene profile of necrotic enteritis reproducing *Clostridium perfringens* type A and type G strains isolated from commercial poultry farms in China. Microorganisms. 2023;11(3):622.

11. Mehdizadeh Gohari I, Navarro MA, Li J, Shrestha A, Uzal FA, McClane BA. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. Virulence. 2021;12(1):723-753.

12. Grenda T, Jarosz A, Sapala M, Grenda A, Patyra E, Kwiatek K. *Clostridium perfringens*—opportunistic foodborne pathogen, its diversity and epidemiological significance. Pathogens. 2023;12(6):768.

13. Miyamoto K, Li J, McClane BA. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens*: detection and identification. Microbes Environ. 2012;27(4):343-349.

14. Nguyen TT, Vu-Khac H, Nguyen TD. Characterisation of *Clostridium perfringens* isolated from chickens in Vietnam. Vet Med (Praha). 2021;66:431-439.

15. Gökce HI, Genç O, Gökce G. Sero-prevalence of *Clostridium perfringens* alpha, beta and epsilon toxins in sheep in Kars province. Turk J Vet Anim Sci. 2005;29:637-642.