

# **VỊ TRÍ PHÂN LOẠI CỦA CÁC CHỦNG *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM DỰA VÀO TRÌNH TỰ GEN 16S rRNA**

***Lê Lập<sup>1</sup>, Lê Văn Sơn<sup>2</sup>, Võ Thành Thìn<sup>1</sup>,  
Lê Đình Hải<sup>1</sup> và Nguyễn Viết Không<sup>3</sup>***

## **TÓM TẮT**

Trình tự nucleotid đoạn 645bp trên 16S rRNA của 5 chủng *C.perfringens* phân lập từ dê, cừu mắc bệnh viêm ruột tiêu chảy tại Việt Nam có mức tương đồng cao (99,8-100%); trong đó trình tự gen 16S rRNA của 3 chủng: CD4 (typ D) phân lập từ miền Bắc, DKH (typ D) phân lập tại Khánh Hòa và CV58 (typ A) phân lập từ Ninh Thuận là hoàn toàn giống nhau (100%), chúng tỏ gen này có độ bảo tồn và tương đồng rất cao giữa các chủng *C.perfringens* với typ độc tố khác nhau và ở các vùng địa lý khác nhau; giữa các chủng còn lại (CV58, CV135 và typ C) sự khác biệt chỉ là 1 nucleotid, hay độ tương đồng 99,8%. Khác biệt này có thể được xem là do đột biến điểm ngẫu nhiên, như vậy có thể kết luận đoạn 645 bp mã hóa cho 16S rRNA của các chủng phân lập tại Việt Nam là giống nhau. Phân tích cây phả hệ dựa vào so sánh trình tự gen 16S rRNA của các loài trong giống *Clostridium* (Collins và cs., 1994; Sasaki và cs., 2001, 2002), các chủng phân lập tại Việt Nam có vị trí thuộc giống *Clostridium*, cụm I (Cluster I), nhóm I-a (Clade I-a), loài *C.perfringens*.

*Từ khóa:* Dê, cừu, *Clostridium perfringens*, Giải trình tự gen 16S rRNA, Vị trí phân loại, Việt Nam

## **PHYLOGENTIC POSITIONS OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* STRAINS ISOLATED FROM VIETNAM BASED ON 16S rRNA GEN SEQUENCES**

***Le Lap, Le Van Son, Vo Thanh Thin,  
Le Dinh Hai and Nguyen Viet Khong***

## **SUMMARY**

The nucleotide sequence of 645bp fragments on 16S rRNA of 5 *C.perfringens* strains isolated from diarrhea-enteritis goats and sheep reared in VietNam were completely identical; they were highly similarity (99,8-100%); in which the 16S rRNA gen sequences of three strains: CD4 (type D) isolated from the North, DKH (type D) from Khanh Hoa và CV58 (type A) from Ninh Thuan were totally homologue (100%), demonstrated that these gens were highly conserve and homologue among *C.perfringens* strains of different toxinotypes and different isolated places; among the other strains (CV58, CV135 and type C), they differed by 1 nucleotide, or level of similarity 99,8%. This difference could be a random point mutation, these results suggest that the 645bp fragments on 16S rRNA of 5 *C.perfringens* strains isolated from VietNam are homologue. Phylogentic tree analysis based on the comparison of 16S rRNA gen sequences of genus *Clostridium* (Collins et al., 1994; Sasaki et al., 2001, 2002), the strains isolated from VietNam belong to the position of genus *Clostridium*, Cluster I, Clade I-a, species *C.perfringens*.

*Key words:* Goats, Sheep, *Clostridium perfringens*, 16S rRNA gen sequences, Phylogentic positions, Vietnam

<sup>1</sup> *Phân viện thú y miền Trung*

<sup>2</sup> *Trung tâm kiểm nghiệm thuốc thú y TW 2*

<sup>3</sup> *Viện thú y*

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong ribosom của vi khuẩn có 3 loại phân tử rRNA với hằng số lắng tương ứng là 16S, 23S và 5S. Đối với hầu hết các loại vi khuẩn, phân tích trình tự gen 16s rRNA có thể kết luận về giống hoặc loài, cũng như vị trí của vi khuẩn này trong bảng phân loại và quan hệ họ hàng của chúng, là một phương pháp phổ biến và tin cậy. Để định loài, không nhất thiết giải mã toàn bộ đoạn gen 16s rRNA (~1500 bp) vì vùng dị chủng rõ rệt nhất nằm trong khoảng 500 bp đầu 5'. Đến nay, trình tự gen 16s rRNA của hầu hết các loài vi khuẩn đã được giải mã. GenBank là ngân hàng dữ liệu lớn nhất hiện đang lưu giữ hơn 20 triệu chuỗi gen, trong đó hơn 90.000 là các gen 16s rRNA.

So sánh trình tự gen 16S rRNA của 100 loài *Clostridium*, Collins và cs. (1994) [Error! Reference source not found.]; Sasaki và cs. (2002) [Error! Reference source not found.] đã phân chia những loài này thành 19 cụm (cluster) đánh số La Mã từ I đến XIX. Theo Collins và cs. (1994) [Error! Reference source not found.]; Johnson và cs. (1975) [Error! Reference source not found.], trong giống *Clostridium* có 40 loài có khả năng gây bệnh, hầu hết các loài gây bệnh chính là thành viên của cụm I (cluster I) như *C.barati*, *C.botulinum* typB, *C.perfringens*, *C.carnis*, *C. quinii* *C. quinii* (nhóm (clade) I-a); *C.cellulovorans* (nhóm I-b); *C.intestinalis* (nhóm I-c); *C.novyi* (nhóm I-e); *C.septicum* (nhóm I-g); *C.tetani* (nhóm I-h),... và cụm II như *C.histolyticum*. Giữa các cụm, trình tự nucleotid khác nhau trên 5%; giữa hai loài của cùng cluster có độ tương đồng cao (thí dụ, 99,3% của *C.chauvoei* và *C. septicum*).

*Clostridium perfringens* là một trong những vi khuẩn gây viêm ruột tiêu chảy (VRTC) ở bò, dê, cừu. Trong quá trình sinh trưởng, *C.perfringens* sản sinh hơn 17 loại độc tố khác nhau, dựa vào khả năng sản sinh 4 loại độc tố chính là  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  và  $\iota$ , các chủng vi khuẩn *C.perfringens* được phân thành 5 typ khác nhau, gọi là typ độc tố (toxintype: A, B, C, D, E). Typ A sinh độc tố  $\alpha$ ; typ B sinh độc tố  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ; typ C sinh độc tố  $\alpha$ ,  $\beta$ ; typ D sinh độc tố  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ; typ E sinh độc tố  $\alpha$ ,  $\iota$ . Ở nước ta, *C.perfringens* typ A và D đóng vai trò quan trọng trong bệnh viêm ruột tiêu chảy ở dê, cừu, trâu, bò; một số chủng có độc lực rất mạnh (Lê Lập và cs., 2009) [Error! Reference source not found.]; (Nguyễn Quang Tính, 2008) [Error! Reference source not found.]; (Huỳnh Thị Mỹ Lệ, 2010) [Error! Reference source not found.].

Để kết luận về loài *C.perfringens* đã phân lập, cũng như vị trí phân loại và quan hệ họ hàng của chúng với các chủng trên thế giới, chúng tôi đã tiến hành giải mã đoạn 645 bp gen 16S rRNA của 5 chủng *C.perfringens* phân lập từ dê, cừu mắc bệnh viêm ruột tiêu chảy ở Việt Nam.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu

- Chủng vi khuẩn *C.perfringens*: Các chủng được lựa chọn mang tính đại diện typ theo khu vực gồm: (i) 3 chủng phân lập tại các tỉnh duyên hải Nam Trung bộ đã được xác định typ độc tố (Lê Lập và cộng sự, 2010) [Error! Reference source not found.] gồm: chủng CV58 (typ A) phân lập từ cừu mắc bệnh VRTC tại Ninh Thuận; chủng CV135 (typ D) phân lập từ dê Bình Thuận, chủng DKH (typ D) phân lập từ dê Khánh Hòa. (ii) 2 chủng phân lập từ dê ở các tỉnh phía Bắc gồm: chủng CD4 (typD) và chủng TYPC (typ C) do Viện thú y quốc gia cấp.

### 2.2 Phương pháp

- Mẫu DNA của vi khuẩn *C.perfringens* được chiết tách bằng phương pháp sốc nhiệt: đun vi khuẩn ở 100°C, 10 phút ; sốc nhiệt nhanh trong nước đá 5 phút, bảo quản DNA ở -20°C. Đối với gen mã hóa 16S ribosome RNA, sử dụng cặp mồi nhân đoạn gen 714bp 16S rRNA: 16S-F1 (5'-CGAGCGATGAAGTTTCCTT-3') và 16S-R1 (5'-ACAGTCCAGAGATCGCCTT-3').

- Giải trình tự gen được thực hiện theo quy trình cơ bản hiện hành và được giải mã tại

phòng thí nghiệm NK Biotech, Công ty TNHH Nam Khoa, Tp. Hồ Chí Minh.

- Kết quả giải trình tự gen được xử lý bằng phần mềm BioEdit (version 7.0.0) theo phương pháp Clustal W Multiple Alignment. Xử lý số liệu các chuỗi gen thu nhận được với các chuỗi trong Ngân hàng gen quốc tế (Gen Bank), so sánh mức tương đồng nucleotid bằng Pairwise alignment. Mã nucleotid xác định chuỗi có trình tự nucleotid gần nhất bằng cách sử dụng chương trình Blast; xây dựng cây phả hệ dựa trên multiple alignment, chương trình MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 4.2) theo thông số Neighbor - Joining (NJ). Độ tin cậy của nhánh phả hệ được tính toán theo chương trình Bootstrap với 1.000 lần lặp lại (1000 replicates).

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của các chủng *C.perfringens*:

Để khẳng định đặc điểm phân loại và xác định vị trí phân loại của các chủng *C.perfringens* đã phân lập từ dê, cừu mắc bệnh viêm ruột tiêu chảy, chúng tôi đã giải trình tự gen 16S rRNA của 5 chủng phân lập. Các đặc tính của chủng được thể hiện ở bảng 1.

**Bảng 1. Đặc tính các chủng *C.perfringens* lựa chọn giải mã 16S rRNA**

| TT | Ký hiệu chủng | Ký hiệu giải trình tự | Nguồn gốc        | Typ | Tổ hợp gen            |
|----|---------------|-----------------------|------------------|-----|-----------------------|
| 1  | CV58          | A-CNt-58              | Cừu (Ninh Thuận) | A   | <i>cpa, cpb2</i>      |
| 2  | CV135         | D-DNt-135             | Dê (Bình Thuận)  | D   | <i>cpa, etx, cpb2</i> |
| 3  | DKH           | D-DKh1                | Dê (Khánh Hòa)   | D   | <i>cpa, etx, cpb2</i> |
| 4  | CD4           | D-DHn4                | Dê (Hà Nội)      | D   | NI                    |
| 5  | TYP C         | C-DHn1                | Dê (Hà Nội)      | C   | NI                    |

Ghi chú: NI: chưa xác định

Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của 5 chủng *C.perfringens* phân lập tại Việt Nam được trình bày ở hình 1.

|           |                                                                        |                                                 |                                                 |                                                 |                                                 |                                                 |                                                 |
|-----------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
|           | 10                                                                     | 20                                              | 30                                              | 40                                              | 50                                              | 60                                              | 70                                              |
| A-CNt-58  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| D-DNt-135 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| D-DKh1    | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| D-DHn4    | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| C-DHn1    | CGGCGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTCATAGAGTGGAAATAGCCTTTCGAAAGGAAGATTA | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
|           | 80                                                                     | 90                                              | 100                                             | 110                                             | 120                                             | 130                                             | 140                                             |
| A-CNt-58  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| D-DNt-135 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| D-DKh1    | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| D-DHn4    | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| C-DHn1    | ATACCGCATAATGTTGAAAGATGGCATCATCATCAACCAAGGAGCAATCCGCTATGAGATGGACCCGC   | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
|           | 150                                                                    | 160                                             | 170                                             | 180                                             | 190                                             | 200                                             | 210                                             |
| A-CNt-58  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| D-DNt-135 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| D-DKh1    | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| D-DHn4    | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| C-DHn1    | GGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAT  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
|           | 220                                                                    | 230                                             | 240                                             | 250                                             | 260                                             | 270                                             | 280                                             |
| A-CNt-58  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| D-DNt-135 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| D-DKh1    | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| D-DHn4    | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| C-DHn1    | CGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
|           | 290                                                                    | 300                                             | 310                                             | 320                                             | 330                                             | 340                                             | 350                                             |
| A-CNt-58  | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| D-DNt-135 | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |
| D-DKh1    | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....                        | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... | ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... |

```

D-DHn4 ..... 350
C-DHn1 GGGAAACCCCTGATGCAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTCTTTGGG 350

      360      370      380      390      400      410      420
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A-CNt-58 ..... 420
D-DNt-135 ..... 420
D-DKh1 ..... 420
D-DHn4 ..... 420
C-DHn1 AAGATAATGACGGTACCCAAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGT 420

      430      440      450      460      470      480      490
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A-CNt-58 ..... 490
D-DNt-135 ..... 490
D-DKh1 ..... 490
D-DHn4 ..... 490
C-DHn1 GCGGAGCGTTATCCGGATTACTGGGCGTAAAGGAGCGTAGGCGGATGATTAAGTGGGATGTGAAATAC 490

      500      510      520      530      540      550      560
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A-CNt-58 ..... 560
D-DNt-135 ..... 560
D-DKh1 ..... 560
D-DHn4 ..... 560
C-DHn1 CCGGGCTCAACTTGGGTGCTGCATTCCAACTGGTTATCTAGAGTGAGGAGAGAGTGAATTCCTA 560

      570      580      590      600      610      620      630
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
A-CNt-58 ..... 630
D-DNt-135 ..... 630
D-DKh1 ..... 630
D-DHn4 ..... 630
C-DHn1 GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGACTGTAAGTG 630

      640
.....|.....|.....|
A-CNt-58 ..... 645
D-DNt-135 ..... 645
D-DKh1 ..... 645
D-DHn4 ..... 645
C-DHn1 ACGCTGAGGCTCGAA 645

```

**Hình 1. Trình tự gen mã hóa 16S rRNA của 5 chủng *C.perfringens***

### 3.2. So sánh mức tương đồng nucleotid của 5 chủng *C.perfringens*

So sánh mức tương đồng nucleotid của 5 chủng *C.perfringens* bằng phương pháp Pairwise alignment/Calculate identity/Similarity for two sequences (BioEdit). Kết quả được trình bày ở bảng 2.

**Bảng 2. Mức tương đồng (%) nucleotid 16S rRNA các chủng *C.perfringens***

| Trình tự  | A-CNt-58 | D-DNt-135 | D-DKh1 | D-DHn4 | C-DHn1 |
|-----------|----------|-----------|--------|--------|--------|
| A-CNt-58  |          | 99,8      | 100    | 100    | 99,8   |
| D-DNt-135 |          |           | 99,8   | 99,8   | 99,8   |
| D-DKh1    |          |           |        | 100    | 99,8   |
| D-DHn4    |          |           |        |        | 99,8   |
| C-DHn1    |          |           |        |        |        |

Kết quả so sánh trình tự đoạn 645 bp của 16S rRNA ở hình 3.1 và tỷ lệ tương đồng nucleotid ở bảng 2 cho thấy:

-Trình tự nucleotid 645 bp của 16S rRNA giữa các chủng *C.perfringens* phân lập tại Việt Nam có mức tương đồng cao, dao động trong khoảng 99,8-100%;

-Trình tự gen 16S rRNA của 2 chủng typ D (CD4 có nguồn gốc từ miền Bắc, và DKH phân lập tại Khánh Hòa) là hoàn toàn giống nhau (100%), chứng tỏ gen này có độ bảo tồn và tương đồng rất cao giữa các chủng *C.perfringens* ở các vùng địa lý khác nhau; hoặc cùng một chủng phân bố ở miền Bắc và ở duyên hải Nam Trung bộ;

-Trình tự gen 16S rRNA của chủng DKH phân lập tại Khánh Hòa (typ D) và 1 chủng

typ A (CV58, phân lập từ cừu Ninh Thuận) là hoàn toàn giống nhau (100%), chứng tỏ gen này có độ bảo tồn và tương đồng rất cao giữa các chủng *C.perfringens* với typ độc tố khác nhau,

- Giữa typ A (trình tự A-CNt-58) và typ D (trình tự D-DNt-135) và typ C (trình tự C-DHn1) sự khác biệt chỉ là 1 nucleotid, hay độ tương đồng 99,8%. Mức tương đồng này cũng tương tự nội typ D (giữa trình tự D-DNt-135 và D-DKh1 cũng chỉ khác nhau 1 nucleotid). Khác biệt này có thể được xem như do đột biến điểm ngẫu nhiên, có thể kết luận trình tự đoạn gen 645 bp 16S rRNA của các chủng phân lập tại Việt Nam là giống nhau, không có sự khác biệt đáng kể.

### 3.3. So sánh mức tương đồng nucleotid của chủng phân lập với các chủng trên thế giới

Để xác định quan hệ họ hàng của các chủng phân lập tại Việt Nam với các chủng *C.perfringens* trên thế giới, chúng tôi sử dụng chương trình Blast để tìm trong Ngân hàng gen quốc tế các trình tự có mức tương đồng nucleotid cao nhất với trình tự đã giải mã. Kết quả blast cho hàng chục gen có trình tự tương đồng 100% với mỗi chủng phân lập, chúng tôi chỉ trích dẫn một trong số những chủng có trình tự hoàn toàn giống với đoạn 645 bp 16S rRNA của 3 chủng đại diện cho 3 typ độc tố: CV58 (typA), CV135 (typD), Typ C (typC). Kết quả được trình bày ở bảng 3

**Bảng 3 Chủng *C.perfringens* có trình tự gen 16S rRNA gần nhất**

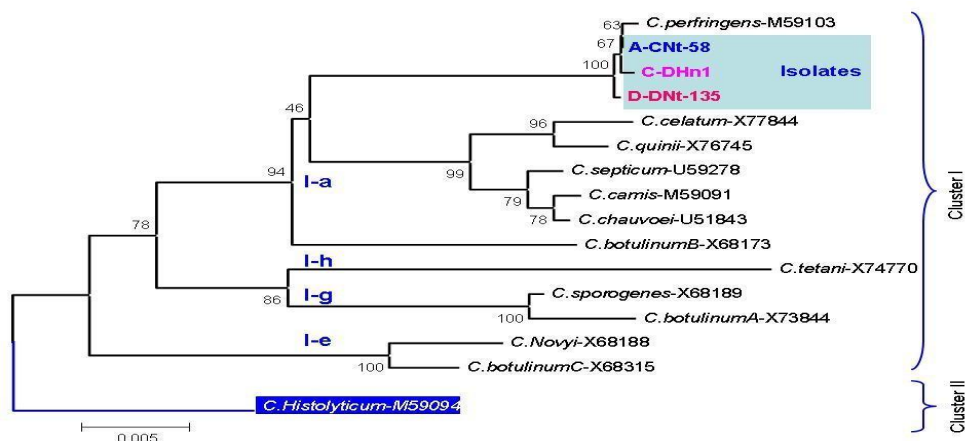
| TT | Tên chủng | Tên chủng gần nhất | Mức tương đồng (%) | Mã số Gen bank | Tài liệu trích dẫn                                             |
|----|-----------|--------------------|--------------------|----------------|----------------------------------------------------------------|
| 1  | CV58      | JPL_18-USA 2009    | 100                | FJ957872       | Probst và cs, (2010) [Error! Reference source not found]       |
| 2  | CV135     | ME5-USA-2008       | 100                | FJ215349       | Mueller-Spitz và cs (2010) [Error! Reference source not found] |
| 3  | Typ C     | SM101-USA-2006     | 100                | CP000312       | Myers và cs, (2006)                                            |

Kết quả so sánh mức tương đồng cho thấy:

Trình tự nucleotid gen 16S rRNA của chủng typ A (CV58) tương đồng 100% với chủng JPL-18- USA phân lập từ môi trường không khí ô nhiễm (2009), chủng typ D (CV135) tương đồng 100% với chủng ME5-USA từ môi trường nước bị ô nhiễm phân (2008) và chủng typ C (typC) tương đồng 100% với chủng SM101-USA-2006 (chủng *C.perfringens* tham chiếu ATCC 13124, gây bệnh hoại thư sinh hơi và ngộ độc thực phẩm ở người). Với kết quả này chứng tỏ *C.perfringens* ở mọi nguồn có quan hệ họ hàng gần gũi căn cứ vào đặc tính di truyền của gen 16S rRNA.

### 3.4. Vị trí phân loại của các chủng *C.perfringens* phân lập tại Việt Nam

Để xác định vị trí phân loại của 3 chủng phân lập đại diện cho 3 typ độc tố (CV58, CV135 và Typ C) trong nội cụm I, chúng tôi sử dụng chủng *C.histolyticum* (M59094) ở cụm II để làm cây phả hệ (rooted tree) và các chủng tham chiếu ở cụm I có mã số trên ngân hàng gen: *C.botulinum* typ A (X73844), *C.botulinum* typ B (X68173), *C.botulinum* typ C (X68315), *C.camis* (M59091), *C.celatum* (X77844), *C.chauvoei* (U51843), *C.novyi* (X68188), *C.quinii* (X76745), *C.septicum* (U59278), *C.sporogens* (X68189), *C.tetani* (X74770), *C.perfringens* (M59103). Kết quả xây dựng cây phả hệ được thể hiện ở hình 2.



**Hình 2. Phả hệ của các chủng *C. perfringens* phân lập tại Việt Nam**

Phân tích cây phả hệ ở hình 2. cho biết các chủng phân lập *C.perfringens* tại Việt Nam thuộc cụm I (cluster I), nằm cùng nhóm I-a (clade I-a) với các chủng *C.perfringens* trên thế giới, tách khỏi nhánh với các nhóm khác như: nhóm I-e (*C.novyi*, *C.botulinum* C, D), nhóm I-g (*C.botulinum* A, *C.sporogenes*), nhóm I-h (*C.tetani*). Trong nội nhóm I-a, các chủng phân lập tại Việt Nam cùng với *C.perfringens* tham chiếu tạo thành một phân nhóm riêng, tách khỏi các phân nhóm khác (*C.septicum*, *C.chauvoei*, *C.canis*, *C.quinii*...).

Theo hệ thống phân loại dựa vào so sánh trình tự gen mã hóa 16S rRNA của các loài *Clostridium* (Collins và cs., 1994) [Error! Reference source not found.]; (Sasaki và cs., 2002) [Error! Reference source not found.], các chủng phân lập tại Việt Nam có vị trí thuộc giống *Clostridium*, cụm I (cluster I), nhóm I-a (clade I-a), loài *C.perfringens*.

#### IV. KẾT LUẬN

1. Trình tự nucleotid đoạn 645 bp trên gen mã hóa 16S rRNA giữa 5 chủng *C.perfringens* phân lập tại Việt Nam có mức tương đồng cao, dao động trong khoảng 99,8-100%, trong đó có 3 chủng (CV58, DKH, CD4) hoàn toàn giống nhau (100%).

2. Trình tự gen 16S rRNA của 3 chủng đại diện cho mỗi typ độc tố (typA: CV58, typD: CV135 và typ C) tương đồng 100% với các chủng tham chiếu trên thế giới, chứng tỏ *C.perfringens* ở mọi nguồn có quan hệ họ hàng gần gũi căn cứ vào đặc tính di truyền của gen 16S rRNA.

3. Phân tích phả hệ cho thấy các chủng vi khuẩn *C.perfringens* phân lập tại Việt Nam thuộc giống *Clostridium*, cụm I, nhóm I-a, loài *C.perfringens*.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Lập và cs., (2009). Khảo sát một số đặc điểm dịch tễ bệnh viêm ruột hoại tử do *C.perfringens* gây ra ở dê cừu tại Khánh Hòa, Ninh Thuận, Bình Thuận. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y* 16, tr.16-25.
2. Lê Lập và cs., (2010). Chế tạo vắc xin giải độc tố phòng các thể bệnh viêm ruột tiêu chảy do *C.perfringens* gây ra ở bò, dê, cừu. Báo cáo kết quả nghiên cứu KH&CN năm 2009. Hội đồng KH Phân viện thú y miền Trung.
3. Huỳnh Thị Mỹ Lệ (2010). Nghiên cứu tình hình nhiễm, vai trò của vi khuẩn *Clostridium perfringens* trong hội chứng tiêu chảy ở bò, lợn nuôi tại Hà Nội và một số vùng phụ cận. Luận án Tiến sỹ nông nghiệp, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội.
4. Nguyễn Quang Tính (2008). Xác định một số đặc tính của *C.perfringens* phân lập từ dê bị tiêu chảy ở tỉnh Thái Nguyên và sử dụng autovaxin phòng bệnh. Luận án Tiến sỹ nông nghiệp, Viện Thú y, Hà Nội
5. Collins M. D. et al., (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of

- five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst. Bacteriol.* 44, pp. 812-826.
6. Johnson J. L. & Francis B. S. (1975). Taxonomy of the *Clostridia*: ribosomal ribonucleic acid homologies among the species, *J Gen Microbiol* 88, pp. 229-244.
  7. Mueller-Spitz S. R. Stewart L. B. & McLellan S. L. (2010). Reliability of mCP method for identification of *C.perfringens* from faecal polluted aquatic environments. *J Appl Microbiol* 108, pp. 1994-2002.
  8. Myers G.S. et al., (2006), Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*, *Genome Res* 16, pp. 1031-1040.
  9. Probst A. et al., (2010). Diversity of anaerobic microbes in spacecraft assembly clean rooms. *Appl Environ. Microbiol* 76, pp. 2837-2845.
  10. Sasaki Y. et al., (2002). Phylogentic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* type A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene. *Vet Microbiol* 86, pp. 257-267.