



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0027096

(51)⁷ C12Q 1/68; A61K 35/76; A61P 31/04

(13) B

(21) 1-2014-01095

(22) 20/09/2012

(86) PCT/KR2012/007555 20/09/2012

(87) WO2013/042964 28/03/2013

(30) 10-2011-0094648 20/09/2011 KR

(45) 25/01/2021 394

(43) 25/08/2014 317A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

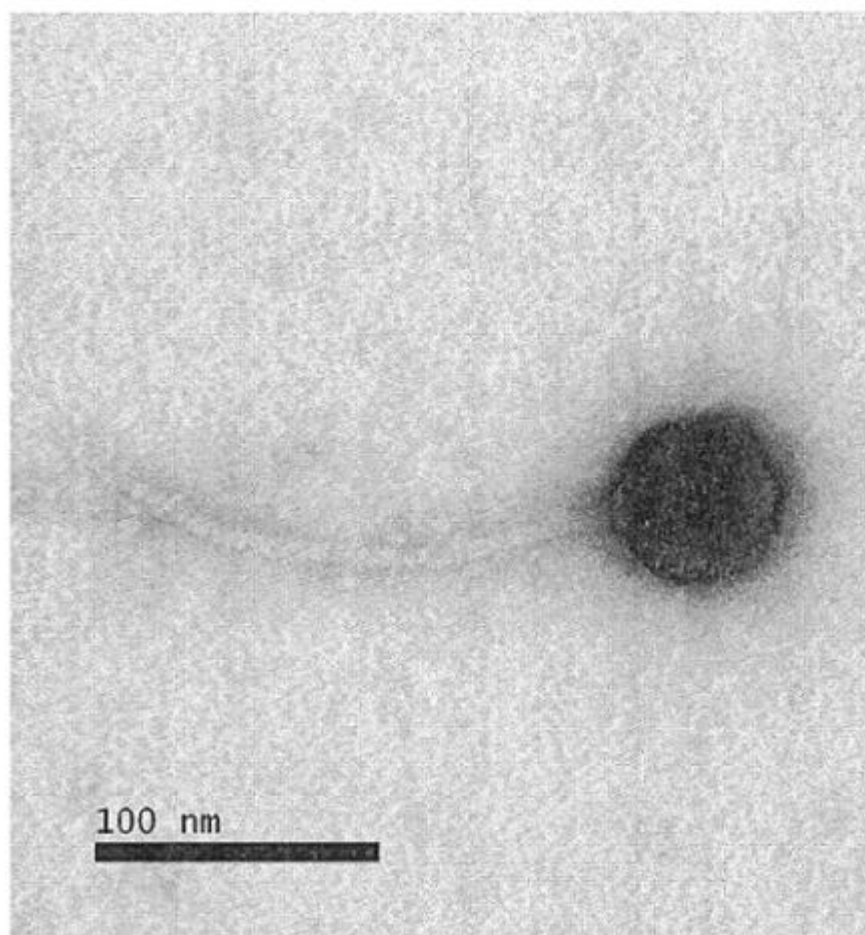
330, Dongho-ro, Jung-gu, Seoul 100-400, Republic of Korea

(72) YANG, Si Yong (KR); KIM, Jae Won (KR); CHO, Young Wook (KR); KIM, Young Sa (KR); SHIN, Eun Mi (KR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) THẺ THỰC KHUẨN VÀ CHẾ PHẨM ĐỂ PHÒNG NGỪA HOẶC ĐIỀU TRỊ
BỆNH TRUYỀN NHIỄM DO VI KHUẨN SALMONELLA

(57) Sáng chế đề xuất thẻ thực khuẩn có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Salmonella*, chế phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm, kháng sinh, nước uống, thức ăn chăn nuôi, chế phẩm làm sạch thịt hoặc chế phẩm vệ sinh chuồng trại, chứa thẻ thực khuẩn này. Thẻ thực khuẩn này có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* hoặc *Salmonella newport*, không ảnh hưởng đến vi khuẩn có lợi, có tính kháng axit, kháng nhiệt, khả năng chống chịu khô hạn cao và có thể dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn salmonella hoặc ngộ độc thực phẩm do *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* hoặc *Salmonella newport*, và đưa vào nước uống, thức ăn chăn nuôi, chế phẩm làm sạch thịt và chế phẩm vệ sinh chuồng trại.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể thực khuẩn, chế phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm, kháng sinh, nước uống, thức ăn chăn nuôi, chế phẩm làm sạch thịt và chế phẩm vệ sinh chuồng trại chứa thể thực khuẩn này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Salmonella có hàm lượng GC trung bình trong bộ gen nằm trong khoảng từ 50% đến 52%, tương tự như *Escherichia coli* và *Shigella*. Chi *Salmonella* là các vi sinh vật gây bệnh nhiễm trùng ở vật nuôi cũng như ở người. Phân loại theo huyết thanh cho thấy *Salmonella enterica*, một loài của *Salmonella bacterium*, có nhiều kiểu huyết thanh bao gồm *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella derby*. Trong số các loài này, loài *choleraesuis* và *derby* là tác nhân gây bệnh trên lợn, loài *gallinarum* và *pullorum* là tác nhân gây bệnh trên gà, loài *typhimurium* và *enteritis* là tác nhân gây bệnh cho người và động vật, và loài *typhi* là tác nhân gây bệnh cho người, tất cả loài này đều gây bệnh ở các động vật tương ứng, gây thiệt hại to lớn cho người chăn nuôi và người tiêu dùng (Zoobises Report; United Kingdom 2003).

Gần đây, việc áp dụng hệ thống phân tích mối nguy và điểm kiểm soát tới hạn đã trở thành yêu cầu bắt buộc đối với tất cả các cơ sở giết mổ tại Hàn Quốc kể từ ngày 01/07/2003, do trong quá trình sản xuất sản phẩm chăn nuôi có nguy cơ cao đối với lây nhiễm *Salmonella*, một vi khuẩn gây bệnh trực tiếp cho lợn, ảnh hưởng đến chất lượng thịt và được tìm thấy trong đường tiêu hóa của lợn (Jae-gil Yeh. Characterization and Counterplan of Salmonellosis in Pigs. Monthly Magazine of Pig Husbandry. 2004).

Bệnh phó thương hàn - bệnh truyền nhiễm cấp tính hoặc mạn tính ở đường tiêu hóa của lợn do nhiễm *Salmonella*, được đặc trưng bởi tình trạng viêm dạ dày ruột và nhiễm trùng huyết, chủ yếu xảy ra trong thời gian vỗ béo. Đặc biệt, một số vi khuẩn *Salmonella* có thể gây ngộ độc thực phẩm cho người khi sử dụng thịt, do đó đây là bệnh rất nguy hiểm đối với sức khỏe cộng đồng. Một loạt các vi khuẩn *Salmonella* có thể gây

bệnh. Trong số đó, *Salmonella choleraesuis* và *Salmonella typhisuis* gây bệnh dịch tả ở lợn là nguyên nhân chính gây nhiễm trùng huyết cấp tính. Viêm ruột cấp tính xảy ra trong thời gian vỗ béo, và kèm theo sự thèm ăn bất thường, tiêu chảy nặng, sốt cao, mất sức sống, viêm phổi, và các dấu hiệu thần kinh. Trong một số trường hợp nặng, các vết đốm có thể xuất hiện trên da lợn. *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, và *Salmonella derby* là nguyên nhân chính gây viêm ruột mãn tính.

Bệnh nhiễm khuẩn *Salmonella* là bệnh lây qua đường miệng do thức ăn hoặc nước uống bị nhiễm *Salmonella*, do đó các đường lây nhiễm này cần được phòng ngừa. Thức ăn chăn nuôi, nguyên liệu dùng cho chăn nuôi hoặc nước uống bị ô nhiễm, hoặc lợn trưởng thành mang tác nhân gây bệnh có thể các nguồn lây nhiễm chính. Trong giai đoạn nhiễm trùng cấp tính, lợn thải ra lên đến 10^6 *Salmonella choleraesuis* hoặc 10^7 *Salmonella typhimurium*/g phân. Tuy nhiên, ghi nhận trên thực nghiệm cho thấy nhiều trường hợp nhiễm trùng, lợn thải ra từ 10^8 đến 10^{11} *Salmonella*. Trong thử nghiệm tiêm 10^3 *Salmonella* vào lợn, thấy rằng lợn đã tiêm không biểu hiện triệu chứng bệnh, nhưng các con lợn khác được nuôi cùng chuồng lại có biểu hiện các triệu chứng lâm sàng điển hình. Kết quả này cho thấy một lượng lớn vi khuẩn *Salmonella* đã phát triển ở lợn bị lây nhiễm tự nhiên, và gây lây nhiễm cho các con lợn khác (Jung-Bok Lee. Control of the Recent Outbreaks of Porcine Salmonella và Proliferative Enteropathy. Korea Swine Association. 2009).

Hiện nay, các bệnh lây nhiễm virus nguy hiểm như là virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn và *Circovirus* ở lợn (Porcine Circovirus-PCV2) đã gây ra thiệt hại kinh tế to lớn cho ngành chăn nuôi lợn ở Hàn Quốc, do đó chương trình quản lý bệnh tật được tập trung vào các bệnh này. Do các bệnh nhiễm khuẩn có thể gây ra thiệt hại to lớn tương đương với thiệt hại do các bệnh do virus, nên lệnh cấm sử dụng kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi đã được ban hành và chương trình điều tra tần suất xuất hiện của bệnh hoặc quản lý bệnh cần được thực hiện trước hết (Jung-Bok Lee. Control of the Recent Outbreaks of Porcine Salmonella và Proliferative Enteropathy, Infectious Disease Laboratory, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Livestock Product Safety, 2010) (Robert W. Wills, Veterinary Microbiology, 1999). Trong khi đó, thể thực khuẩn, cũng được gọi là khuẩn thể, là một loại virus đặc biệt chỉ nhiễm vào vi khuẩn cụ thể và kiểm soát sự phát triển của vi khuẩn này, và chỉ có thể tự tái tạo bên trong cơ thể vi

khuẩn chủ. Sau khi tìm ra thể thực khuẩn, việc sử dụng chúng để điều trị các bệnh nhiễm trùng đã được đề xuất. Tuy nhiên, khi các kháng sinh phổ rộng được sử dụng phổ biến, thể thực khuẩn được cho là không cần thiết vì chúng chỉ có phổ tác dụng hẹp. Các kháng sinh hoặc chất kháng khuẩn đã được sử dụng rộng rãi để điều trị các bệnh nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, việc lạm dụng và sử dụng quá nhiều kháng sinh đã gây ra lo ngại về tình trạng kháng kháng sinh và tác hại tồn dư của kháng sinh trong thực phẩm. Tuy nhiên, hiện tại việc ngừng sử dụng kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi có thể làm tăng tần xuất các bệnh nhiễm khuẩn bao gồm bệnh nhiễm khuẩn *Salmonella* đã được kiểm soát bằng kháng sinh, như được thể hiện trong các dữ liệu thử nghiệm hoặc từ các quốc gia khác. Do đó, có nhu cầu cấp thiết về việc thiết lập chương trình hướng dẫn chi tiết trong thực tế quản lý các bệnh truyền nhiễm do *Salmonella* (Jung-Bok Lee. Control of the Recent Outbreaks of Porcine Salmonella và Proliferative Enteropathy, Infectious Disease Laboratory, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Livestock Product Safety. 2010).

Các thể thực khuẩn ngày càng thu hút được nhiều sự quan tâm trở lại. Bầy thể thực khuẩn để kiểm soát *E.coli* O157:H7 được bộc lộ trong Patent Mỹ số 6,485,902 (2002) và hai thể thực khuẩn để kiểm soát các vi sinh vật khác nhau được bộc lộ trong Patent Mỹ số 6,942,858 (cấp cho Nymox, năm 2005). Nhiều công ty đã và đang tích cực phát triển các chế phẩm khác nhau chứa thể thực khuẩn. Tập đoàn thực phẩm EBI (châu Âu) đã nghiên cứu phát triển phụ gia thực phẩm để ngăn ngừa ngộ độc thực phẩm do *Listeria monocytogenes*, tức là Listerix-P100, là chế phẩm chứa thể thực khuẩn đầu tiên được chấp thuận bởi USFDA. Chế phẩm chứa thể thực khuẩn LMP-102 cũng được nghiên cứu phát triển làm phụ gia thực phẩm kháng *Listeria monocytogenes*, được chứng nhận đạt tiêu chuẩn GRAS (Generally Regarded As Safe). Vào năm 2007, chế phẩm tẩy rửa chứa thể thực khuẩn do OmniLytics sản xuất đã được nghiên cứu phát triển để ngăn ngừa lây nhiễm *E. coli* O157 ở bò trong quá trình giết mổ, được chấp thuận bởi Cục kiểm dịch và An toàn thực phẩm Mỹ (Food Safety and Inspection Service-FSIS). Tại châu Âu, thể thực khuẩn *Clostridium sporogenes* NCIMB 30008 và thể thực khuẩn *Clostridium tyrobutiricum* NCIMB 30008 đã được đăng ký làm chất bảo quản thức ăn chăn nuôi kháng lại *Clostridium* vào năm 2003 và 2005. Các nghiên cứu này cho thấy việc phát triển các thể thực khuẩn để kiểm soát vi khuẩn kháng kháng sinh và nhiễm bẩn sản phẩm chăn nuôi bởi các tác nhân gây bệnh động vật là cần thiết.

Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu về thể thực khuẩn nêu trên đều tập trung vào việc kiểm soát *E. coli*, *Listeria*, và *Clostridium*. Trong khi đó, *Salmonella* cũng là tác nhân gây bệnh động vật, và thiệt hại do tác nhân gây bệnh này không hề suy giảm. Như nêu trên, do *Salmonella* có khả năng kháng nhiều thuốc, nên chương trình giám sát tính kháng thuốc đã được thực hiện trên toàn lãnh thổ Hàn Quốc theo Nghị định thi hành luật về ngăn ngừa bệnh truyền nhiễm (Sắc lệnh 16961), Pháp lệnh thi hành luật về phòng chống bệnh truyền nhiễm (Sắc lệnh 179 của Bộ Y tế và Phúc lợi Hàn Quốc), và Tổ chức Y tế Hàn Quốc (Sắc lệnh 17164). Do đó, nhu cầu về việc phát triển thể thực khuẩn thế hệ mới để kiểm soát *Salmonella* là cần thiết.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để khắc phục các vấn đề phát sinh khi dùng sai hoặc lạm dụng kháng sinh phổ rộng, như vi khuẩn kháng thuốc và tồn dư kháng sinh trong thực phẩm, các tác giả sáng chế đã phân lập được thể thực khuẩn từ nguồn tự nhiên, trong đó thể thực khuẩn này có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Salmonella* - vi khuẩn gây ra nhiều bệnh trong chăn nuôi. Theo kết quả phân tích đặc tính hình thái, sinh hóa và di truyền, các tác giả sáng chế phát hiện thấy rằng thể thực khuẩn phân lập được có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* và *Salmonella newport*, nhưng không ảnh hưởng đến các vi khuẩn có lợi, đồng thời có tính kháng axit và kháng nhiệt rất cao. Ngoài ra, các tác giả sáng chế còn phát hiện thấy rằng thể thực khuẩn phân lập được này có thể được đưa vào chế phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh do *Salmonella typhimurium*, như là bệnh nhiễm khuẩn *Salmonella* và ngộ độc thực phẩm chứa *Salmonella* ở gia súc, và đưa vào nhiều sản phẩm khác nhau để điều trị và kiểm soát hiệu quả sự tăng sinh của *Salmonella*, bao gồm nước uống, thức ăn chăn nuôi, chế phẩm vệ sinh chuồng trại, và chế phẩm làm sạch thịt.

Theo khía cạnh chính, sáng chế đề xuất thể thực khuẩn ΦCJ11 có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Salmonella choleraesuis*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa hoạt chất là thể thực khuẩn ΦCJ11, để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm do *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* hoặc *Salmonella newport*.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất kháng sinh, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn ΦCJ11.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất nước uống hoặc thức ăn chăn nuôi, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn ΦCJ11.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm vệ sinh chuồng trại hoặc chế phẩm làm sạch thịt, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn ΦCJ11.

Ngoài ra, sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh truyền nhiễm do *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* hoặc *Salmonella newport*, bằng cách sử dụng thể thực khuẩn hoặc chế phẩm theo sáng chế.

Thể thực khuẩn theo sáng chế có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* hoặc *Salmonella Newport*, nhưng không ảnh hưởng đến các vi khuẩn có lợi, đồng thời có tính kháng nhiệt, kháng axit và khả năng chống chịu điều kiện khô hạn rất cao. Do đó, thể thực khuẩn theo sáng chế có thể được dùng để phòng ngừa hoặc điều trị Bệnh nhiễm khuẩn *Salmonella* hoặc ngộ độc thực phẩm chứa *Salmonella*, là bệnh truyền nhiễm do *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* hoặc *Salmonella newport*, và cũng được đưa vào nước uống chăn nuôi, thức ăn chăn nuôi chế phẩm vệ sinh chuồng trại và chế phẩm làm sạch thịt.

Mô tả văn tắt hình vẽ

Fig.1 là ảnh chụp thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế qua kính hiển vi, thể thực khuẩn này thuộc họ *Siphoviridae*, có kiểu hình B1, khác biệt ở chỗ thể nó có vỏ capsid đồng đều và phần đuôi dài không thể co rút;

Fig.2 là ảnh chụp thể hiện sự hình thành vết tan thể thực khuẩn ΦCJ11 ở đĩa chứa vi khuẩn *Salmonella*, trong đó (đĩa A, B: *Salmonella choleraesuis*, đĩa C: *Salmonella gallinarum*, đĩa D: *Salmonella typhimurium*, đĩa E: *Salmonella infantis*, đĩa F, G: *Salmonella derby*, đĩa H: *Salmonella newport*), quan sát thấy vết tan hình thành ở đĩa chứa các chủng *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis*, *Salmonella derby* và *Salmonella newport*, nhưng không quan sát được ở đĩa chứa chủng

Salmonella gallinarum;

Fig.3 là hình ảnh thể hiện kết quả điện di trên gel SDS-PAGE của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế, trong đó các protein cấu trúc được phát hiện ở 33 kDa, 55 kDa và 69,5 kDa, và protein chuẩn có độ chính xác cao (BIO-RAD) được dùng làm gen chỉ thị;

Fig.4 là hình ảnh thể hiện kết quả điện di trên gel PFGE của thể thực khuẩn ΦCJ11 phân lập được theo sáng chế, trong đó kích cỡ ADN bộ gen của thể thực khuẩn ΦCJ11 xấp xỉ bằng 140kbp, và ADN CHEF Size Standard Lambda Ladder (Bio-Rad) được dùng làm gen chỉ thị kích cỡ ADN;

Fig.5 là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích PCR, được thực hiện bằng cách sử dụng từng cặp mồi đặc hiệu với ADN bộ gen của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế, trong đó bảng A: cặp mồi có trình tự tương ứng là SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6, bảng B: cặp mồi có trình tự tương ứng là SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.8, bảng C: cặp mồi có trình tự tương ứng là SEQ ID NO.9 và SEQ ID NO.10, và bảng D: cặp mồi có trình tự tương ứng là SEQ ID NO.11 và SEQ ID NO.12, và toàn bộ các bảng A, B, C và D chứa sản phẩm PCR có kích cỡ nằm trong khoảng từ 1kbp đến 2kbp;

Fig.6 là đồ thị thể hiện kết quả đánh giá tính kháng axit của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế, thể hiện số lượng thể thực khuẩn sống sót ở điều kiện pH = 2,1, pH = 2,5, pH = 3,0, pH = 3,5, pH = 4,0, pH = 5,5, pH = 6,4, pH = 6,9, pH = 7,4, pH = 8,0, pH = 9,0, pH = 9,8 và pH = 11,0, trong đó so với đối chứng, thể thực khuẩn ΦCJ11 không bị mất hoạt tính ở pH lên đến 5,5, nhưng nó bị giảm hoạt tính ở pH = 4 và pH = 3,5, và bị mất hoàn toàn hoạt tính ở pH = 3,0 hoặc thấp hơn;

Fig.7 là đồ thị thể hiện kết quả đánh giá tính kháng nhiệt của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế, thể hiện số lượng thể thực khuẩn sống sót ở nhiệt độ 37°C, 45°C, 53°C, 60°C, và 70°C trong 0 phút, 10 phút, 30 phút, 60 phút và 120 phút, trong đó thể thực khuẩn ΦCJ11 vẫn duy trì được hoạt tính ngay cả khi được cho tiếp xúc với nhiệt độ 60°C trong thời gian lên đến 2 giờ;

Fig.8 là đồ thị thể hiện kết quả đánh giá khả năng chống chịu khô hạn của thể thực khuẩn ΦCJ11 được làm khô bằng thiết bị cô đặc SpeedVac, trong đó khi hàm lượng thay đổi đo được trong điều kiện khô hạn so với trước khi làm khô, thì thể thực khuẩn ΦCJ11

vẫn duy trì được hoạt tính ngay cả khi được cho tiếp xúc với nhiệt độ 60°C trong thời gian lên đến 1 giờ; và

Fig.9 là đồ thị thể hiện sự thay đổi thể trọng do độc tính sau khi cho chuột Sprague-Dawley sử dụng liều duy nhất qua đường miệng của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế, trong đó khi quan sát sự thay đổi thể trọng trước và 1 ngày, 3 ngày, 7 ngày, 10 ngày và 14 ngày sau khi sử dụng ΦCJ11, thấy rằng so với nhóm đối chứng, thể trọng của chuột thử nghiệm hầu như không thay đổi (■: chuột đực đối chứng, □: chuột đực sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ11, ●: chuột cái đối chứng, ○: chuột cái sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ11).

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thể thực khuẩn có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* hoặc *Salmonella newport*.

Các tác giả sáng chế đã thu thập mẫu phân và nước thải từ chuồng lợn, và phân lập được thể thực khuẩn có khả năng phân giải tế bào vật chủ *Salmonella choleraesuis*. Ngoài ra, các tác giả sáng chế phát hiện thấy thể thực khuẩn phân lập được cũng có khả năng phân giải *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* và *Salmonella newport* (Fig.2 và Bảng 1). Kết quả phân tích hình thái bằng kính hiển vi điện tử truyền qua đã chứng tỏ được rằng thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế thuộc họ *Siphoviridae* có kiểu hình B1 (Fig.1). Ngoài ra, các tác giả sáng chế cũng phát hiện thấy các protein cấu trúc của thể thực khuẩn ΦCJ11 có trọng lượng phân tử xấp xỉ tương ứng bằng 69,5kDa, 55kDa và 33kDa, khi thực hiện phân tích dạng protein của nó (Fig.3), và phân tích bộ gen cho thấy kích cỡ ADN bộ gen của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế nằm trong khoảng từ 97kbp đến 145,5kbp (Fig.4). Hơn nữa, kết quả phân tích đặc tính di truyền cho thấy bộ gen của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế chứa các phân tử axit nucleic có trình tự như được thể hiện trong SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.4 (Ví dụ 6). Dựa trên các trình tự từ SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.4, độ tương đồng về mặt di truyền của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế với các loài khác được so sánh. Đã phát hiện thấy thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế có độ tương đồng về mặt di truyền rất thấp so với các thể thực khuẩn đã biết, điều này chứng tỏ rằng thể thực khuẩn theo sáng chế là

loài mới (Bảng 2). Để thực hiện các phân tích di truyền chuyên sâu, các cặp môi đặc hiệu với thể thực khuẩn ΦCJ11, tức là SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9 và SEQ ID NO.10, và SEQ ID NO.11 và SEQ ID NO.12 được sử dụng để thực hiện phân tích PCR. Mỗi sản phẩm PCR được phát hiện có kích cỡ tương ứng bằng 1,4 kbp, 1,2 kbp, 1,25 kbp và 1,5 kbp (Fig.5).

Trong khi đó, khi *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* và *Salmonella newport* được lây nhiễm bằng thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế, đã quan sát thấy được các vết tan do thể thực khuẩn (vùng trong suốt trên môi trường thạch mềm được tạo ra bởi quá trình phân giải tế bào vật chủ bởi một thể thực khuẩn) (Fig.2). Độ ổn định của thể thực khuẩn ΦCJ11 được đánh giá ở các điều kiện nhiệt độ và độ pH khác nhau, kết quả đánh giá cho thấy thể thực khuẩn ΦCJ11 vẫn duy trì độ ổn định trong khoảng pH rộng từ pH = 3,5 đến pH 11,0 (Fig.6) và trong khoảng nhiệt độ cao từ 37°C đến 70°C (Fig.7), và thậm chí ở điều kiện khô hạn (Fig.8). Ngoài ra, phát hiện thấy thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế cũng có khả năng phân giải các chủng *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* và *Salmonella newport* thể tự nhiên (Bảng 3).

Cuối cùng, kết quả thử nghiệm kích ứng mắt và da của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế trên thỏ trắng New Zealand âm tính với các tác nhân gây bệnh cho thấy chỉ số kích thích nguyên phát (PII) bằng 0,33, chứng tỏ thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế không gây kích ứng da, và chỉ số kích ứng mắt cấp tính (IAOI) bằng 0 ở các nhóm thỏ được nhỏ và không được nhỏ thể thực khuẩn theo sáng chế, chứng tỏ thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế không gây kích ứng mắt. Kết quả thử nghiệm khi sử dụng qua đường miệng thể thực khuẩn ΦCJ11 cho thấy thể trọng của chuột thử nghiệm thay đổi không đáng kể (Fig.9) cũng như không quan sát thấy số lượng chuột chết, các triệu chứng toàn thân (Bảng 4) và dấu hiệu bất thường ở cơ quan nội tạng (Bảng 5), điều này chứng tỏ thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế không có độc tính.

Theo đó, các tác giả sáng chế đã phân lập được thể thực khuẩn ΦCJ11 thể hệ mới từ các mẫu phân và nước thải ở chuồng lợn, có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* và *Salmonella newport* và các đặc tính nêu trên, được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật Hàn Quốc (361-221, Honje 1, Seodaemun, Seoul) vào ngày 09/09/2011 với số đăng

ký là KCCM11208P.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm do một hoặc nhiều vi khuẩn *Salmonella* được chọn từ nhóm bao gồm *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* và *Salmonella newport*, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn ΦCJ11.

Do có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* và *Salmonella newport*, nên thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế có thể được dùng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm do các vi khuẩn này. Ví dụ về các bệnh truyền nhiễm có thể phòng ngừa hoặc điều trị được bằng thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế bao gồm bệnh nhiễm khuẩn *Salmonella* và ngộ độc thực phẩm chứa *Salmonella* ở lợn do *Salmonella choleraesuis* hoặc *Salmonella typhimurium*, bệnh viêm ruột cấp tính hoặc mạn tính ở lợn do *Salmonella derby*, *Salmonella infantis*, *Salmonella newport*, nhưng không chỉ giới hạn ở các bệnh này.

Thuật ngữ “bệnh nhiễm khuẩn *Salmonella*” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ bệnh có các triệu chứng sau khi nhiễm *Salmonella*, như là sốt, đau đầu, tiêu chảy, và nôn. Bệnh nhiễm khuẩn *Salmonella* là bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn thuộc chi *Salmonella*, được biểu hiện bằng hai triệu chứng lâm sàng: nhiễm trùng huyết cấp tính tương tự như bệnh thương hàn, và viêm dạ dày ruột cấp tính, bao gồm cả viêm ruột, ngộ độc thực phẩm, nhiễm trùng huyết cấp tính.

Thuật ngữ “phòng ngừa” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ các biện pháp để hạn chế hoặc làm chậm quá trình tiến triển của bệnh bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế.

Thuật ngữ “điều trị” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ toàn bộ các biện pháp để cải thiện hoặc hạn chế tình trạng bệnh bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế.

Chế phẩm theo sáng chế chứa thể thực khuẩn ΦCJ11 với hàm lượng nằm trong khoảng từ 1×10^2 đến 1×10^{12} PFU/mL, và tốt hơn nếu chế phẩm theo sáng chế chứa thể thực khuẩn ΦCJ11 với hàm lượng nằm trong khoảng từ 1×10^6 đến 1×10^{10} PFU/mL.

Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế có thể còn chứa chất mang được dùng.

Thuật ngữ “chất mang được dụng” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ chất dẫn thuốc hoặc tá dược hầu như không gây kích ứng với sinh vật và không ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học và các đặc tính của hoạt chất được sử dụng. Để bào chế các chế phẩm dạng lỏng theo sáng chế, chất mang được dụng vô trùng và có độ tương thích sinh học có thể được sử dụng như là nước muối, nước cất vô trùng, dung dịch Ringer, nước muối sinh lý, dung dịch tiêm truyền albumin, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol, etanol, và hỗn hợp của một hoặc nhiều chất mang này. Nếu cần, các chất mang thông thường khác như là chất chống oxy hóa, chất đệm, và chất diệt khuẩn có thể được sử dụng. Ngoài ra, tá dược pha loãng, tá dược phân tán, chất hoạt động bề mặt, tá dược dính và tá dược trơn có thể được bổ sung vào chế phẩm theo sáng chế để bào chế chế phẩm thuốc tiêm như là thuốc tiêm dung dịch, thuốc tiêm hỗn dịch, và thuốc tiêm nhũ tương, hoặc chế phẩm dùng qua đường miệng như là viên tròn, viên nang, thuốc cốm, hoặc viên nén.

Chế phẩm phòng ngừa hoặc điều trị theo sáng chế có thể được bôi hoặc xịt lên vùng bị nhiễm khuẩn, hoặc sử dụng qua đường miệng hoặc đường ngoài tiêu hóa. Sử dụng qua đường ngoài tiêu hóa có thể bao gồm sử dụng qua đường tiêm tĩnh mạch, tiêm màng bụng, tiêm bắp, tiêm dưới da hoặc sử dụng khu trú.

Liều lượng thích hợp để bôi, xịt hoặc sử dụng chế phẩm theo sáng chế sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm phương pháp bào chế, cách dùng, độ tuổi, cân nặng, giới tính, tình trạng bệnh lý, và chế độ dinh dưỡng của đối tượng bị bệnh hoặc động vật cần điều trị, thời gian sử dụng, đường dùng, tốc độ thải trừ, và phản ứng miễn dịch. Các nhân viên thú y hoặc bác sĩ thú y trong lĩnh vực này có thể dễ dàng xác định được và kê đơn lượng hữu hiệu của chế phẩm theo yêu cầu.

Ví dụ về dạng bào chế dùng qua đường miệng, chứa chế phẩm theo sáng chế làm hoạt chất bao gồm viên nén, viên ngậm, viên thuốc hình thoi, hỗn dịch nước hoặc hỗn dịch dầu, thuốc bột hoặc thuốc cốm, nhũ tương thuốc, viên nang cứng hoặc viên nang mềm, xirô, hoặc cồn thuốc ngọt. Đối với các dạng bào chế viên nén và viên nang, các tá dược hữu ích bao gồm: tá dược dính như là lactoza, sacaroza, sorbitol, manitol, tinh bột, amylopectin, xenluloza hoặc gelatin; tá dược độn như là đicanxi phosphat; tá dược trơn như là tinh bột ngô hoặc tinh bột khoai lang; và tá dược trơn như là magie stearat, canxi stearat, natri stearyl fumarat, hoặc sáp polyetylen glycol. Đối với dạng bào chế viên nang,

chất mang dạng lỏng như là lipit có thể còn được sử dụng với các tá dược nêu trên.

Các dạng bào chế dùng qua đường ngoài tiêu hóa chứa chế phẩm theo sáng chế làm hoạt chất bao gồm thuốc tiêm dưới da, thuốc tiêm tĩnh mạch, hoặc thuốc tiêm bắp, thuốc đặt, hoặc thuốc xông hít qua đường hô hấp, như là thuốc khí dung. Dạng bào chế thuốc tiêm có thể được bào chế bằng cách hòa tan hoặc phân tán chế phẩm theo sáng chế cùng với chất bảo quản hoặc chất đệm vào nước và nạp dung dịch hoặc hỗn dịch thu được vào ống tiêm hoặc lọ tiêm. Đối với dạng bào chế thuốc xịt, như là thuốc khí dung, chất đẩy để phun chế phẩm đậm đặc được phân tán trong nước hoặc bột ẩm, có thể được sử dụng kết hợp với tá dược.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất kháng sinh, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn ΦCJ11.

Thuật ngữ “kháng sinh” được sử dụng trong bản mô tả để chỉ thuốc bất kỳ được sử dụng để tiêu diệt các tác nhân gây bệnh trên động vật, và theo sáng chế thuật ngữ này được dùng để chỉ chất khử trùng, chất diệt khuẩn và chất kháng khuẩn. Không giống như các kháng sinh thông thường, thể thực khuẩn theo sáng chế có độ đặc hiệu cao với *Salmonella* để tiêu diệt các tác nhân gây bệnh này và không ảnh hưởng đến các vi khuẩn có lợi, không gây kháng thuốc, do đó tạo ra kháng sinh thế hệ mới có vòng đời tương đối dài.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất nước uống hoặc thức ăn chăn nuôi chứa hoạt chất là thể thực khuẩn ΦCJ11.

Kháng sinh được sử dụng trong các ngành công nghiệp chăn nuôi và thủy sản để phòng ngừa các bệnh truyền nhiễm. Tuy nhiên, hầu hết các kháng sinh dùng trong thức ăn chăn nuôi hiện nay có xu hướng bị kháng thuốc và có thể thâm nhập vào cơ thể người, do chúng tồn dư trong các sản phẩm chăn nuôi. Sự hấp thu kháng sinh tồn dư có thể làm cho các tác nhân gây bệnh trên người kháng lại các kháng sinh, dẫn đến lây lan nhiều bệnh truyền nhiễm. Ngoài ra, do việc lạm dụng kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi, đã làm xuất hiện ngày nhiều các chủng đa kháng thuốc và đang là vấn đề rất nghiêm trọng trên toàn thế giới. Do đó, thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế có thể được sử dụng làm kháng sinh trong thức ăn chăn nuôi do nó thân thiện hơn với môi trường và giải quyết được các vấn đề nêu trên.

Thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể được bào chế bằng cách bổ sung gián tiếp hoặc trực tiếp thể thực khuẩn ΦCJ11 vào chất phụ gia để bào chế thành thức ăn chăn nuôi. Thức ăn chăn nuôi có thể chứa thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế ở dạng lỏng hoặc dạng rắn, tốt hơn nếu thức ăn chăn nuôi chứa thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế ở dạng bột khan. Quy trình làm khô có thể được thực hiện theo các phương pháp hong khô, phơi khô tự nhiên, sấy phun và đông khô, nhưng không chỉ giới hạn ở các phương pháp này. Thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng bột với hàm lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 10% khối lượng, tốt hơn nếu nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2% khối lượng, tính theo khối lượng của thức ăn chăn nuôi. Ngoài thể thực khuẩn ΦCJ11, thức ăn chăn nuôi theo sáng chế cũng có thể còn chứa các chất phụ gia thông thường khác để bảo quản lâu dài.

Thức ăn chăn nuôi theo sáng chế có thể còn chứa các vi sinh vật không gây bệnh khác. Các vi sinh vật này có thể được chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus subtilis*, có thể sản sinh proteaza, lipaza và invertaza, chủng *Lactobacillus* sp. có thể tạo ra hoạt tính sinh lý và chức năng phân hủy trong điều kiện kỵ khí, như là trong dạ dày của gia súc, nấm sợi bao gồm *Aspergillus oryzae* (J Animal Sci 43:910-926, 1976) làm tăng trọng lượng của vật nuôi, tăng cường sản sinh sữa và giúp tiêu hóa và hấp thu tốt thức ăn, và nấm men bao gồm *Saccharomyce scerevisiae* (J Anim Sci 56:735-739, 1983).

Thức ăn chăn nuôi chứa thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế có thể bao gồm thức ăn có nguồn gốc thực vật, như là ngũ cốc, các loại hạt, sản phẩm phụ trong chế biến thực phẩm, rong biển, chất xơ, sản phẩm phụ trong chế biến dược phẩm, dầu, tinh bột, bột thức ăn chăn nuôi, và sản phẩm phụ trong chế biến bột hạt, và thức ăn có nguồn gốc động vật như là protein, chất vô cơ, chất béo, chất khoáng, chất dầu, protein đơn bào, động vật nổi, và chất thải thực phẩm, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này.

Thức ăn chăn nuôi chứa thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế có thể chứa tá dược dính, chất nhũ hóa, và chất bảo quản để phòng ngừa sự suy giảm chất lượng, axit amin, vitamin, enzym, probiotic, chất thơm, nitơ phi protein, silicat, chất đệm, chất màu, chiết xuất, và oligosacarit để cải thiện hiệu lực, và hoặc các hỗn hợp thức ăn chăn nuôi sơ bộ khác, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này.

Ngoài ra, việc cung cấp nước uống chứa thể thực khuẩn theo sáng chế có thể làm

giảm được số lượng vi khuẩn *Salmonella* trong đường ruột của vật nuôi, nhờ đó thu được vật nuôi không chứa *Salmonella*.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm làm sạch thịt hoặc chế phẩm vệ sinh chuồng trại, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn ΦCJ11.

Ngoài ra, sáng chế mô tả phương pháp điều trị bệnh truyền nhiễm do *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* hoặc *Salmonella newport*, bằng cách sử dụng thể thực khuẩn hoặc chế phẩm nêu trên.

Cụ thể, phương pháp điều trị theo sáng chế bao gồm bước cho đối tượng mắc bệnh truyền nhiễm do *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis* hoặc *Salmonella newport*, sử dụng lượng hữu hiệu của thể thực khuẩn hoặc chế phẩm theo sáng chế.

Thể thực khuẩn hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng dược phẩm cho động vật hoặc có thể được sử dụng dưới dạng hỗn hợp với nước uống hoặc thức ăn chăn nuôi cho động vật và tốt hơn nếu dưới dạng hỗn hợp với thức ăn chăn nuôi.

Đường dùng bất kỳ, kể cả đường miệng hoặc đường ngoài tiêu hóa, đều có thể được sử dụng đối với thể thực khuẩn hoặc chế phẩm theo sáng chế, miễn là chúng được phân bố đến mô đích. Cụ thể, chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng qua đường miệng, đường trực tràng, khu trú, tiêm tĩnh mạch, tiêm màng bụng, tiêm bắp, tiêm động mạch, qua da, qua đường mũi, và xông hít.

Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu rằng tổng liều hàng ngày của thể thực khuẩn hoặc chế phẩm theo sáng chế để sử dụng theo phương pháp điều trị của sáng chế cần được xác định thông qua chế độ liều thích hợp bởi nhân viên thú y. Tốt hơn nếu, lượng hữu hiệu dùng cho đối tượng bị bệnh có thể thay đổi phụ thuộc vào nhiều yếu tố đã biết, bao gồm loại và mức độ đáp ứng cần đạt được, tình trạng của đối tượng bị bệnh như là độ tuổi, cân nặng, tình trạng bệnh lý, giới tính, và chế độ dinh dưỡng, thời gian và đường dùng, tốc độ thải trừ của chế phẩm, thời gian điều trị, chế phẩm cụ thể chứa hoặc không chứa các tác nhân khác được sử dụng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn thông qua các ví dụ sau. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa, và phạm vi của sáng chế không chỉ được giới hạn bởi các ví dụ này.

Ví dụ 1

Quy trình phân lập thể thực khuẩn có khả năng phân giải *Salmonella* theo sáng chế

Ví dụ 1-1

Quy trình phân lập và sàng lọc thể thực khuẩn theo sáng chế

50mL mẫu phân và nước thải từ chuồng lợn được chuyển vào ống ly tâm, và ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút. Sau đó, phần dịch nổi được lọc bằng cách sử dụng màng lọc có kích cỡ 0,45µm. 18mL mẫu dịch lọc được trộn với 150µL môi trường nuôi cấy được lắc chứa *Salmonella choleraesuis* (OD₆₀₀=2) và 2mL môi trường Luria-Bertani 10 x (trypton 10g/L, chiết xuất nấm men 5g/L và NaCl 10g/L: môi trường LB). Hỗn hợp này được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ, và môi trường nuôi cấy thu được được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi được lọc bằng cách sử dụng màng lọc có kích cỡ 0,2µm. 3mL dung dịch aga 0,7% (kl/tt) và 150µL môi trường nuôi cấy được lắc chứa *Salmonella choleraesuis* (OD₆₀₀=2) được trộn với nhau, và cấy chuyển lên đĩa LB chứa môi trường thạch, và để hóa rắn. 10µL dịch lọc nuôi cấy nêu trên được cấy trải lên đĩa LB này, và nuôi cấy trong 18 giờ ở nhiệt độ 37°C, và quá trình định lượng chất phân giải thể thực khuẩn được thực hiện trên môi trường thạch, còn được gọi là phương pháp phủ thạch aga mềm.

Mẫu môi trường nuôi cấy chứa chất phân giải thể thực khuẩn được pha loãng chính xác, và trộn với 150µL môi trường nuôi cấy được lắc chứa *Salmonella choleraesuis* (OD₆₀₀=2), sau đó định lượng bằng phương pháp phủ thạch agar mềm, sao cho thu được các vết tan đơn lẻ. Vết tan đơn lẻ chính là một thể thực khuẩn và do đó, để phân lập được các thể thực khuẩn đơn lẻ, một vết tan chứa thể thực khuẩn được bổ sung vào 400µL dung dịch SM (NaCl, 5,8g/L, MgSO₄.7H₂O, 2g/L, Tris-Cl 1M (pH = 7,5) 50mL/L), và để trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng để phân lập được các thể thực khuẩn đơn lẻ. Để tinh chế thể thực khuẩn với số lượng lớn, 100µL phần dịch nổi được lấy ra từ dung dịch thể thực khuẩn đơn lẻ, và trộn với 12mL dung dịch aga 0,7% và 500µL môi trường nuôi cấy được

lắc chứa *Salmonella choleraesuis*, sau đó định lượng bằng phương pháp phủ thạch agar mềm trên đĩa LB có đường kính bằng 150mm. Khi quá trình phân giải kết thúc, 15mL dung dịch SM được bổ sung vào đĩa. Đĩa này được lắc nhẹ trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng để rửa giải thể thực khuẩn ra khỏi môi trường thạch. Dung dịch SM chứa thể thực khuẩn đã được rửa giải được thu hồi, clorofom được bổ sung vào đến nồng độ cuối cùng bằng 1%, và trộn kỹ trong 10 phút. Dung dịch này được ly tâm ở nhiệt độ 4000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi thu được được lọc bằng cách sử dụng màng lọc có kích cỡ 0,45µm, và bảo quản trong tủ lạnh.

Ví dụ 1-2

Quy trình nuôi cấy thể thực khuẩn theo sáng chế trên quy mô lớn

Thể thực khuẩn thu được nêu trên được nuôi cấy trên quy mô lớn bằng cách sử dụng *Salmonella choleraesuis* làm cơ chất. *Salmonella choleraesuis* được nuôi cấy có lắc đến mật độ bằng $1,5 \times 10^{10}$ cfu (đơn vị hình thành khuẩn lạc) được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút, và các hạt thể thực khuẩn thu được được hỗn dịch hóa lại trong 4mL dung dịch SM. Thể thực khuẩn có mật độ bằng $9,0 \times 10^8$ Đơn vị hình thành vết tan (PFU-plaque forming unit) được cấy bổ sung vào với tỷ lệ lây nhiễm bằng 0,001 (MOI: multiplicity of infection = 0,001), và để ở nhiệt độ 37°C trong 20 phút. Dung dịch này được cấy chuyển vào 150mL dung dịch LB, và nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 5 giờ. Clorofom được bổ sung vào đến nồng độ cuối cùng bằng 1%, và dung dịch nuôi cấy được lắc trong 20 phút. ADNza I và RNaza A được bổ sung vào đến nồng độ cuối cùng tương ứng bằng 1µg/ml. Dung dịch này được để ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút. NaCl và polyetylen glycol được bổ sung vào đến nồng độ cuối cùng tương ứng bằng 1M và 10% (kl/tt) và để ở nhiệt độ 4°C trong 3 giờ nữa. Dung dịch này được ly tâm ở nhiệt độ 4°C và tốc độ 12.000 vòng/phút trong 20 phút để loại phần dịch nổi. Các hạt thể thực khuẩn thu được được hỗn dịch hóa lại trong 5mL dung dịch SM, và để ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. 4mL cloroform được bổ sung vào và trộn kỹ, sau đó ly tâm ở nhiệt độ 4°C và tốc độ 4000 vòng/phút trong 20 phút. Phần dịch nổi được lọc bằng cách sử dụng màng lọc có kích cỡ 0,2µm, và thể thực khuẩn được tinh chế bằng phương pháp siêu ly tâm theo gradient tỷ trọng glyxerol (tỷ trọng: 40%, glyxerol 5% ở tốc độ 35000 vòng/phút và nhiệt độ 4°C trong 1 giờ). Thể thực khuẩn tinh chế được đặt tên là “Thể thực khuẩn ΦCJ11”, và hỗn dịch hóa lại trong 300µL dung dịch SM, sau đó định lượng. Thể thực

khủng ΦCJ11 được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật Hàn Quốc (361-221, Honje 1, Seodaemun, Seoul) vào ngày 09/09/2011 với số đăng ký là KCCM11208P.

Ví dụ 2

Đánh giá khả năng lây nhiễm *Salmonella* của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế

Để đánh giá hoạt tính phân giải các loài *Salmonella* khác với loài *Salmonella choleraesuis* của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế, thử nghiệm để lây nhiễm chéo với các loài *Salmonella* khác được thực hiện. Theo kết quả đánh giá, thể thực khuẩn ΦCJ11 có hoạt tính phân giải *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella newport*, *Salmonella infantis*, *Salmonella arizonae* và *Salmonella bongori*, nhưng không có hoạt tính phân giải *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, và *Salmonella pullorum* (Bảng 1 và Fig.2).

Bảng 1

Hoạt tính phân giải *Salmonella* của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế

Kiểu huyết thanh	Tên chủng	Sự hình thành vết tan	Kiểu huyết thanh	Tên chủng	Sự hình thành vết tan
SC	ATCC 10708	O	SA	ATCC 12398	O
SN	SL 317	O	SB	ATCC 12397	O
SD	ATCC 2468	O	ST	13	O
SE	SGSC 2282	X	SI	SARB 26	O
SG	SGSC 2293	X	SP	SGSC 2295	X

* ATCC: American Type Culture Collection

* SGSC: Salmonella Genetic Stock Center

Fig.2 là ảnh chụp thể hiện sự hình thành vết tan thể thực khuẩn ΦCJ11 ở đĩa chứa vi khuẩn *Salmonella*. Như được thể hiện trên Fig.2 (đĩa A, B: *Salmonella choleraesuis*, đĩa C: *Salmonella gallinarum*, đĩa D: *Salmonella typhimurium*, đĩa E: *Salmonella infantis*, đĩa F, G: *Salmonella derby*, đĩa H: *Salmonella newport*), quan sát thấy vết tan hình thành ở đĩa chứa các chủng *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis*, *Salmonella derby* và *Salmonella newport*, nhưng không quan sát được ở đĩa chứa chủng *Salmonella gallinarum*.

Ví dụ 3

Phân tích hình thái của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế

Thể thực khuẩn ΦCJ11 tinh khiết được pha loãng trong dung dịch đệm SM, sau đó cấy trải lên lưới đồng, được nhuộm bằng uranyl axetat 2% trong 3 đến 5 giây, và làm khô. Hình thái của thể thực khuẩn ΦCJ11 được quan sát bằng kính hiển vi điện tử truyền qua Carl Zeiss (LIBRA 120, 80 kV, độ phóng đại bằng 120.000 lần ~ 200.000 lần). Fig.1 là ảnh chụp thể thực khuẩn ΦCJ11 qua kính hiển vi. Như được thể hiện trên Fig.1, cho thấy thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế thuộc họ *Siphoviridae* có kiểu hình B1, khác biệt ở chỗ thể nó có vỏ capsid đồng đều và phần đuôi dài không thể co rút.

Ví dụ 4

Phân tích dạng protein của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế

15μL dung dịch chứa thể thực khuẩn ΦCJ11 tinh khiết ở nồng độ bằng 10^{11} PFU/mL được trộn với 3μL dung dịch mẫu SDS 5 x, và gia nhiệt trong 5 phút. Gel SDS-PAGE 12% được điều chế, sau đó nhuộm bằng xanh Coomassie trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Fig.3 là hình ảnh thể hiện kết quả điện di trên gel SDS-PAGE của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế, trong đó protein chuẩn có độ chính xác cao (BIO-RAD) được dùng làm gen chỉ thị. Như được thể hiện trên Fig.3, cho thấy thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế có các protein cấu trúc, có trọng lượng phân tử tương ứng bằng 33kDa, 55kDa và 69,5kDa.

Ví dụ 5

Phân tích kích cỡ ADN bộ gen của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế

ADN bộ gen của thể thực khuẩn ΦCJ11 được phân lập bằng cách sử dụng hệ thống siêu ly tâm. Cụ thể, axit etylenđiamintetraaxetic (pH = 8,0), proteiNaza K, và natri đodexyl sulfat được bổ sung vào môi trường nuôi cấy chứa thể thực khuẩn ΦCJ11 tinh khiết ở nồng độ cuối cùng tương ứng bằng 20mM, 50ug/mL, và 0,5% (kl/tt), sau đó ủ ở nhiệt độ 50°C trong 1 giờ. Phenol có thể tích tương đương (pH = 8,0) được bổ sung vào và trộn kỹ. Sau đó ly tâm ở nhiệt độ phòng và tốc độ 12,000 vòng/phút trong 10 phút, phần dịch nổi được trộn kỹ với thể tích tương đương hỗn hợp chứa phenol và cloroform theo tỷ lệ 1:1. Quá trình ly tâm được thực hiện thêm một lần nữa ở nhiệt độ phòng và tốc độ 12,000 vòng/phút trong 10 phút. Sau đó, phần dịch nổi thu được được trộn với thể tích

trương đương cloroform, tiếp theo ly tâm ở nhiệt độ phòng và tốc độ 12,000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi thu được được trộn với 1/10 thể tích natri axetat 3M và hai thể tích etanol lạnh 95%, và để ở nhiệt độ -20°C trong 1 giờ. Sau đó ly tâm ở nhiệt độ 0°C và tốc độ 12,000 vòng/phút trong 10 phút, phần dịch nổi được loại bỏ hoàn toàn, và hạt ADN thu được được hòa tan vào 50µL Tris-EDTA (pH = 8,0). ADN chiết được được pha loãng 10 lần, và độ hấp thụ được đo ở bước sóng 260nm để xác định nồng độ ADN. 1µg ADN bộ gen được chuyển lên gel agarosa PFGE 1% (phương pháp điện di xung điện trường), và điện di ở nhiệt độ 14°C trong 22 giờ trên hệ thống BIORAD CHEF DR II PFGE ở khoảng thời gian ngắt nằm trong khoảng từ 50 đến 90 giây, hiệu điện thế 6 V/cm(200V). ADN CHEF Size Standard Lambda Ladder (Bio-Rad) được dùng làm gen chỉ thị kích cỡ and. Fig.4 là hình ảnh thể hiện kết quả điện di trên gel PFGE của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế. Như được thể hiện trên Fig.4, kích cỡ ADN bộ gen của thể thực khuẩn ΦCJ11 xấp xỉ bằng 140 kbp..

Ví dụ 6

Phân tích đặc tính di truyền của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế

Để phân tích đặc tính di truyền của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế, 5µg ADN bộ gen của thể thực khuẩn ΦCJ11 được phân cắt bằng các cặp enzym giới hạn *PstI*, *XbaI* và *BamHI*, *EcoRI* và *Sall*. Vector pCL1920 (Promega) được phân cắt bằng các enzym giới hạn *PstI*, *XbaI* và *BamHI*, *EcoRI* và *Sall*, sau đó xử lý bằng phosphatase kiềm đường ruột của bê. ADN bộ gen đã phân cắt của thể thực khuẩn ΦCJ11 được trộn với vector này ở tỷ lệ 3:1, và nối ở nhiệt độ 16°C trong 2 giờ. Vector tái tổ hợp thu được được biến nạp vào *E. coli* DH5α, sau đó cấy chuyển lên đĩa LB chứa spectinomycin và X-gal (5-brom-4-clo-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid) để chọn lọc các khuẩn lạc màu xanh/trắng. Các khuẩn lạc được chọn được nuôi cấy trong 16 giờ trên môi trường chứa kháng sinh kết hợp lacc. Sau đó, các plasmit được chiết xuất bằng cách sử dụng kit tinh chế Plasmid (Promega).

Quá trình tách dòng của các plasmit này được kiểm chứng bằng phương pháp PCR bằng cách sử dụng cặp mồi FTR135 và FTR136 (SEQ ID NO.13 và SEQ ID NO.14) và quá trình chọn lọc chỉ được thực hiện trên các đoạn chèn có kích cỡ bằng 1kb hoặc dài hơn. Trình tự nucleotit của các đoạn chèn này được phân tích bằng cách sử dụng cặp mồi

nêu trên. Theo đó, các trình tự nucleotit thu được là tương ứng như trong SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.4, có kích cỡ nằm trong khoảng từ 1kbp đến 2kbp hoặc nhỏ hơn, và độ tương đồng trình tự được phân tích bằng cách sử dụng chương trình NCBI blastx và blastn, và kết quả phân tích được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2

So sánh độ tương đồng trình tự giữa thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế và các thể thực khuẩn khác

	Vi sinh vật	Protein	Chương trình Blastx			
			Truy vấn	Đối tượng	Độ tương đồng	Trị số -e
1	Thể thực khuẩn đường ruột T5	protein giả định	436-627	1-64	63/64 (98%)	7e-32
	Thể thực khuẩn đường ruột SPC35	protein giả định	10-423	1-139	127/139 (91%)	3e-31
	Thể thực khuẩn đường ruột SPC35	protein giả định	3-863	30-315	264/291 (91%)	2e-116
	Thể thực khuẩn đường ruột T5	protein giả định	3-863	30-315	255/291 (88%)	1e-113
	Thể thực khuẩn đường ruột EPS7	protein giả định	3-761	29-281	235/253 (93%)	7e-107
	Klebsiella phage KP15	protein giả định	9-761	22-276	217/255 (85%)	4e-100
	Thể thực khuẩn đường ruột RB43	proteing chứa vùng SPFH giả định	9-839	18-257	223/281 (79%)	7e-99
	Thể thực khuẩn đường ruột RB16	protein giả định	9-761	18-272	219/255 (86%)	2e-98
2	Thể thực khuẩn đường ruột EPS7	protein giả định	412-771	1-120	109/120 (91%)	7e-57
	Thể thực khuẩn đường ruột T5	protein giả định	490-771	1-94	94/94 (100%)	3e-46
	Thể thực khuẩn đường ruột T5	Protein D11	532-2	1-177	175/177 (99%)	5e-96
	Thể thực khuẩn đường ruột SPC35	Protein D11	532-2	1-177	174/177 (98%)	2e-95
	Thể thực khuẩn đường ruột EPS7	Protein D11	532-8	1-175	163/175 (93%)	4e-90
	Thể thực khuẩn đường ruột EPS7	protein giả định	872-528	5-120	96/116 (83%)	2e-46
3	Thể thực khuẩn đường ruột SPC35	protein đuôi Pb4	777-4	1-258	221/258 (86%)	4e-128
	Thể thực khuẩn đường ruột T5	protein đuôi Pb4	777-4	1-258	197/258 (76%)	6e-115
	Thể thực khuẩn đường ruột SPC35	protein đuôi Pb3	1322-780	769-949	178/181 (98%)	2e-96

	Thể thực khuẩn đường ruột EPS7	protein đuôi Pb3	1322-780	769-949	160/181 (88%)	9e-88
	Thể thực khuẩn đường ruột T5	protein đuôi cấu trúc Pb3	1322-780	769-949	156/181 (86%)	8e-84
	Thể thực khuẩn đường ruột EPS7	protein đuôi Pb4	423-4	1-140	112/140 (80%)	2e-62
4	Thể thực khuẩn đường ruột SPC35	flap endonucleaza	980-564	153-291	138/139 (99%)	1e-73
	Thể thực khuẩn đường ruột T5	flap endonucleaza	980-564	153-291	138/139 (99%)	1e-73
	Thể thực khuẩn đường ruột EPS7	flap endonucleaza	980-564	153-291	135/139 (97%)	4e-72
	Thể thực khuẩn đường ruột SPC35	đeoxyUTP pyrophosphataza giả định	564-157	1-136	130/136 (96%)	3e-70
	Thể thực khuẩn đường ruột T5	đeoxyUTP pyrophosphataza giả định	564-160	1-135	130/135 (96%)	2e-69
	Thể thực khuẩn đường ruột EPS7	đeoxyUTP pyrophosphataza giả định	564-157	1-136	128/136 (94%)	2e-67

Ví dụ 7

Thiết kế trình tự đoạn mồi đặc hiệu cho thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế

Để phân tích các đặc tính của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế, các đoạn mồi đặc hiệu cho thể thực khuẩn ΦCJ11 được thiết kế dựa trên các trình tự từ SEQ ID NO.1 đến SEQ ID NO.4. Phân tích PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các cặp mồi có trình tự tương ứng là SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9 và SEQ ID NO.10, và SEQ ID NO.11 và SEQ ID NO.12. 0,1μg ADN bộ gen của thể thực khuẩn và 0,5pmol mỗi đoạn mồi được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng sơ bộ (Bioneer), và thể tích cuối cùng được điều chỉnh đến 20μL. Phân tích PCR được thực hiện với 30 chu kỳ biến tính; 94°C 30 giây, gắn mồi; 55°C 30 giây, và khuếch đại; 72°C, 1,5 phút. Fig.5 là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích PCR, được thực hiện bằng cách sử dụng từng cặp mồi đặc hiệu với ADN bộ gen của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế. Bảng A: cặp mồi có trình tự tương ứng là SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6, Bảng B: cặp mồi có trình tự tương ứng là SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.8, Bảng C: cặp mồi có trình tự tương ứng là SEQ ID NO.9 và SEQ ID NO.10, và Bảng D: cặp mồi có trình tự tương ứng là SEQ ID NO.11 và SEQ ID NO.12. Toàn bộ các bảng A, B, C và D chứa sản phẩm PCR có kích cỡ nằm trong khoảng từ 1kbp đến 2kbp. Như được thể hiện trên Fig.5, sản phẩm PCR thu được có kích cỡ nằm trong khoảng từ 1kbp đến 2kbp, với cặp mồi có trình tự

trương ứng là SEQ ID NO.5 và SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7 và SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9 và SEQ ID NO.10, và SEQ ID NO.11 và SEQ ID NO.12.

Ví dụ 8

Phân tích độ ổn định pH của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế

Để đánh giá xem liệu thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế có khả năng sống ổn định trong điều kiện môi trường pH thấp của dạ dày lợn hay không, thể thực khuẩn ΦCJ11 được phân tích độ ổn định trong khoảng pH rộng (pH = 2,1, pH = 2,5, pH = 3,0, pH = 3,5, pH = 4,0, pH = 5,5, pH = 6,4, pH = 6,9, pH = 7,4, pH = 8,0, pH = 9,0, pH = 9,8 và pH = 11,0). Các dung dịch có độ pH khác nhau (dung dịch đệm natri axetat (pH = 2,1, pH = 4,0, pH = 5,5, và pH = 6,4), dung dịch đệm natri xitrat (pH = 2,5, pH = 3,0, và pH = 3,5), dung dịch đệm natri phosphat (pH 6,9 và pH = 7,4) và Tris-HCl (pH = 8,2, pH = 9,0, pH = 9,8 và pH = 11,0)) được điều chế ở nồng độ bằng 0,2M. 180μL mỗi dung dịch đệm pH này được trộn với 20μL dung dịch thể thực khuẩn ($1,0 \times 10^{11}$ PFU/mL) để thu được dung dịch đệm pH có nồng độ bằng 1M, sau đó ủ ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng được pha loãng liên tiếp, và 10μL mỗi dung dịch pha loãng được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ thạch agar mềm để xác định nồng độ của chất phân giải thể thực khuẩn. Fig.6 là đồ thị thể hiện kết quả đánh giá tính kháng axit của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế, thể hiện số lượng thể thực khuẩn sống sót ở điều kiện pH = 2,1, pH = 2,5, pH = 3,0, pH = 3,5, pH = 4,0, pH = 5,5, pH = 6,4, pH = 6,9, pH = 7,4, pH = 8,0, pH = 9,0, pH = 9,8 và pH = 11,0. Thể thực khuẩn ΦCJ11 không bị mất hoạt tính ở pH lên đến 5,5. Tuy nhiên, so với đối chứng, thể thực khuẩn ΦCJ11 bị giảm hoạt tính ở pH = 4 và pH = 3,5, và bị mất hoàn toàn hoạt tính ở pH = 3,0 hoặc thấp hơn. Như được thể hiện trên Fig.6, thể thực khuẩn ΦCJ11 không bị mất hoạt tính và vẫn ổn định ở pH lên đến 5,5, nhưng ngược lại thể thực khuẩn ΦCJ11 bị mất hoạt tính ở pH = 3,0 hoặc thấp hơn.

Ví dụ 9

Phân tích độ ổn định nhiệt của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế

Để sử dụng làm phụ gia chăn nuôi, thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế được đánh giá độ ổn định với nhiệt sinh ra trong quá trình bào chế. Về vấn đề này, 200μL dung

dịch thể thực khuẩn ΦCJ11 với nồng độ bằng $1,0 \times 10^{11}$ PFU/mL được ủ ở nhiệt độ 37°C, 45°C, 53°C, 60°C, và 70°C trong 0 phút, 10 phút, 30 phút, 60 phút và 120 phút. Dung dịch này được pha loãng liên tiếp, và 10μL mỗi dung dịch pha loãng được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ thạch agar mềm để xác định nồng độ của chất phân giải thể thực khuẩn. Fig.7 là đồ thị thể hiện kết quả đánh giá tính kháng nhiệt của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế, thể hiện số lượng thể thực khuẩn sống sót ở nhiệt độ 37°C, 45°C, 53°C, 60°C, và 70°C trong 0 phút, 10 phút, 30 phút, 60 phút và 120 phút. Như được thể hiện trên Fig.7, thể thực khuẩn ΦCJ11 vẫn duy trì được hoạt tính ngay cả khi được cho tiếp xúc với nhiệt độ 60°C trong thời gian lên đến 2 giờ.

Ví dụ 10

Phân tích đánh giá khả năng chống chịu khô hạn của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế

Để sử dụng làm phụ gia chăn nuôi, thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế được đánh giá khả năng chống chịu điều kiện khô hạn trong quy trình bào chế. Dựa trên kết quả thu được từ thử nghiệm đánh giá độ ổn định nhiệt, thử nghiệm đánh giá khả năng chống chịu khô hạn được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị cô đặc SpeedVac. 200μL dung dịch thể thực khuẩn ΦCJ11 với nồng độ bằng $1,0 \times 10^{11}$ PFU/mL được làm khô trong điều kiện chân không ở nhiệt độ 60°C trong 2 giờ, và các hạt thể thực khuẩn thu được được hỗn dịch hóa lại hoàn toàn trong 200μL dung dịch SM ở nhiệt độ 4°C trong 1 ngày, và đo nồng độ. Fig.8 là đồ thị thể hiện kết quả đánh giá khả năng chống chịu khô hạn của thể thực khuẩn ΦCJ11 được làm khô bằng thiết bị cô đặc SpeedVac. Như được thể hiện trên Fig.8, khi hàm lượng thay đổi đo được trong điều kiện khô hạn so với trước khi làm khô, thì thể thực khuẩn ΦCJ11 vẫn duy trì được hoạt tính ngay cả khi được cho tiếp xúc với nhiệt độ 60°C trong thời gian lên đến 1 giờ.

Ví dụ 11

Phân tích phổ lây nhiễm của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế

Thể thực khuẩn ΦCJ11 được đánh giá hoạt tính phân giải kháng lại các chủng tự nhiên *Salmonella* (2 chủng), *Salmonella choleraesuis* (5 chủng), *Salmonella typhimurium* (17 chủng), *Salmonella infantis* (4 chủng), *Salmonella newport* (6 chủng), *Salmonella*

derby (2 chủng) và *Salmonella dublin* (3 chủng), thu được từ Laboratory of Avian Diseases, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, và *Salmonella choleraesuis* (ATCC SC10708) được sử dụng trong thử nghiệm này. 150µL môi trường nuôi cấy được lắc chứa mỗi chủng nêu trên ($OD_{600}=2$) được trộn với 10µL dung dịch thể thực khuẩn ΦCJ11 có nồng độ bằng 10^{10} PFU/mL, được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ bằng cách sử dụng phương pháp phủ thạch aga mềm để kiểm soát sự hình thành vết tan (Bảng 3). Sự hình thành vết tan thể thực khuẩn được quan sát ở 8 chủng *Salmonella choleraesuis*.

Bảng 3

Các chủng *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis*, *Salmonella newport* và các chủng *Salmonella* tự nhiên bị lây nhiễm bởi thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế.

Kiểu huyết thanh	Tên chủng		Sự hình thành vết tan	Kiểu huyết thanh	Tên chủng		Sự hình thành vết tan
SC	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 2929	○	SI	<i>S. infantis</i>	SARB 26	○
	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 2930	○		<i>S. infantis</i>	SARB 27	○
	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 2932	○		<i>S. infantis</i>	S1326/28	○
	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 2933	○		<i>S. infantis</i>	B09-106	○
	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 2425	○	SN	<i>S. newport</i>	SARB 36	○
	<i>S. choleraesuis</i>	ATCC 10708	○		<i>S. newport</i>	SARB 37	○
	<i>S. choleraesuis</i>	SNU#1	○		<i>S. newport</i>	SARB 38	○
	<i>S. choleraesuis</i>	SNU#2	○		<i>S. newport</i>	7257	○
ST	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST1	○	SD	<i>S. newport</i>	SL 317	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST2	○		<i>S. newport</i>	SL 254	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST4	○		<i>S. derby</i>	ATCC 2466	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST7	○		<i>S. derby</i>	ATCC 2468	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST8	○	SD	<i>S. dublin</i>	SA 4405	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST11	○		<i>S. dublin</i>	RKS 4699	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST12	○		<i>S. dublin</i>	88/6	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST13	○	SA	<i>S. arizonae</i>	ATCC 12398	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST14	○	SB	<i>S. bongori</i>	ATCC 12397	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST17	○	SH	<i>S. heidelberg</i>	SARA 33	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST18	○		<i>S. heidelberg</i>	SARA 23	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST19	○	SM	<i>S. maimi</i>	SARB 28	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST20	○		<i>S. maimi</i>	SARB 29	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST26	○	SP	<i>S. panama</i>	SARB 39	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST38	○		<i>S. panama</i>	SARB 40	○

	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST41	○		<i>S. panama</i>	SARB 41	○
	<i>S. typhimurium</i>	SNU ST42	○		<i>S. panama</i>	7261	○
* SGSC: Salmonella genetic stock center * ATCC: American Type Culture Collection * SNU: Laboratory of Avian Diseases, College of Veterinary Medicine, Seoul National University							

Ví dụ 12

Phân tích đánh giá độc tính của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế

Thử nghiệm kích ứng mắt và da được thực hiện trên thỏ trắng New Zealand âm tính với tác nhân gây bệnh để đánh giá độc tính của thể thực khuẩn ΦCJ11 trong phòng ngừa bệnh nhiễm khuẩn *Salmonella* và ngộ độc thực phẩm chứa *Salmonella*, trong đó dữ liệu thực nghiệm đã được tích lũy cho phép dễ dàng phân tích các kết quả thí nghiệm. Vùng da bụng không bị tổn thương và vùng da bụng bị tổn thương của thỏ được quấn bằng gạc có kích thước 2,5 cm x 2,5 cm, có tẩm các thể thực khuẩn ΦCJ11, và mỗi vị trí quấn được tẩm 0,5mL. Kết quả thử nghiệm cho thấy không có thay đổi về các triệu chứng toàn thân, và thể trọng của thỏ giảm nhẹ, 1 ngày sau khi quấn gạc tẩm thể thực khuẩn ΦCJ11. Trong thử nghiệm này, chỉ số kích thích nguyên phát (PII) bằng 0,33, chứng tỏ thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế không gây kích ứng da. Trong thử nghiệm kích ứng mắt, mắt trái của thỏ đã được nhỏ bằng các thể thực khuẩn ΦCJ11, sau đó đổi chiều với mắt phải, không được nhỏ bằng các thể thực khuẩn ΦCJ11. Kết quả thử nghiệm cho thấy không có thay đổi về các triệu chứng toàn thân và thay đổi bất thường về thể trọng do sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ11. Sau khi sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ11, quá trình kiểm tra mắt cho thấy chỉ số kích ứng mắt cấp tính bằng “0”, chứng tỏ thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế không gây kích ứng mắt. Do đó, các kết quả thử nghiệm này cho thấy thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế không gây kích ứng.

Ngoài ra, thử nghiệm đánh giá độc tính được thực hiện bằng cách cho chuột Sprague-Dawley sử dụng theo đường miệng liều duy nhất của thể thực khuẩn ΦCJ11. Nhóm chuột thử nghiệm được cho sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ11 với liều bằng 1×10^{11} PFU/kg và nhóm chuột đối chứng được cho sử dụng giả dược [Tris-HCl 20mM (pH = 7,0) + MgCl₂ 2mM], và 10 chuột mỗi nhóm (gồm 5 chuột đực và 5 chuột cái) được cho sử dụng qua đường miệng với liều duy nhất. Tỷ lệ chết, các triệu chứng toàn thân, sự thay đổi thể trọng, và kết quả phân tích giải phẫu được theo dõi trong 2 tuần và so sánh với nhau. Quá trình theo dõi được thực hiện 6 giờ một lần, bắt đầu từ 30 phút đến 1 giờ,

trong ngày đầu tiên. Sau đó, các triệu chứng toàn thân được theo dõi và ghi lại, một lần một ngày trong 14 ngày (Bảng 4 và Bảng 5).

Bảng 4

Tỷ lệ chết và các triệu chứng toàn thân sau khi sử dụng qua đường miệng thể thực khuẩn ΦCJ11

Giống	Mẫu thử (pfu)	Ngày sau điều trị														Tỷ lệ chết
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Chuột đực	Mẫu đối chứng	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ¹¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chuột cái	Mẫu đối chứng	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ¹¹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Bảng 5

Kết quả phân tích giải phẫu sau khi sử dụng qua đường miệng thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế

Giống	Mẫu thử (PFU)	Dấu hiệu quan sát	Tần số ^A
Chuột đực	Mẫu đối chứng	Không có dấu hiệu bất thường ở cơ quan nội tạng	5/5
	10 ¹¹	Không có dấu hiệu bất thường ở cơ quan nội tạng	5/5
Chuột cái	Mẫu đối chứng	Không có dấu hiệu bất thường ở cơ quan nội tạng	5/5
	10 ¹¹	Không có dấu hiệu bất thường ở cơ quan nội tạng	5/5

^A Số lượng chuột có triệu chứng/số lượng chuột được thử nghiệm.

Như được thể hiện trong các Bảng 4 và Bảng 5, không có chuột chết, chuột không biểu hiện triệu chứng ngộ độc cũng như không biểu hiện triệu chứng lâm sàng đáng kể sau khi sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ11. Kết quả phân tích được thể hiện trong Bảng 4 và Bảng 5. Thể trọng được ghi lại trước khi sử dụng và 1 ngày, 3 ngày, 7 ngày, 10 ngày và 14 ngày sau khi sử dụng. Không có sự thay đổi đáng kể về thể trọng so với nhóm đối

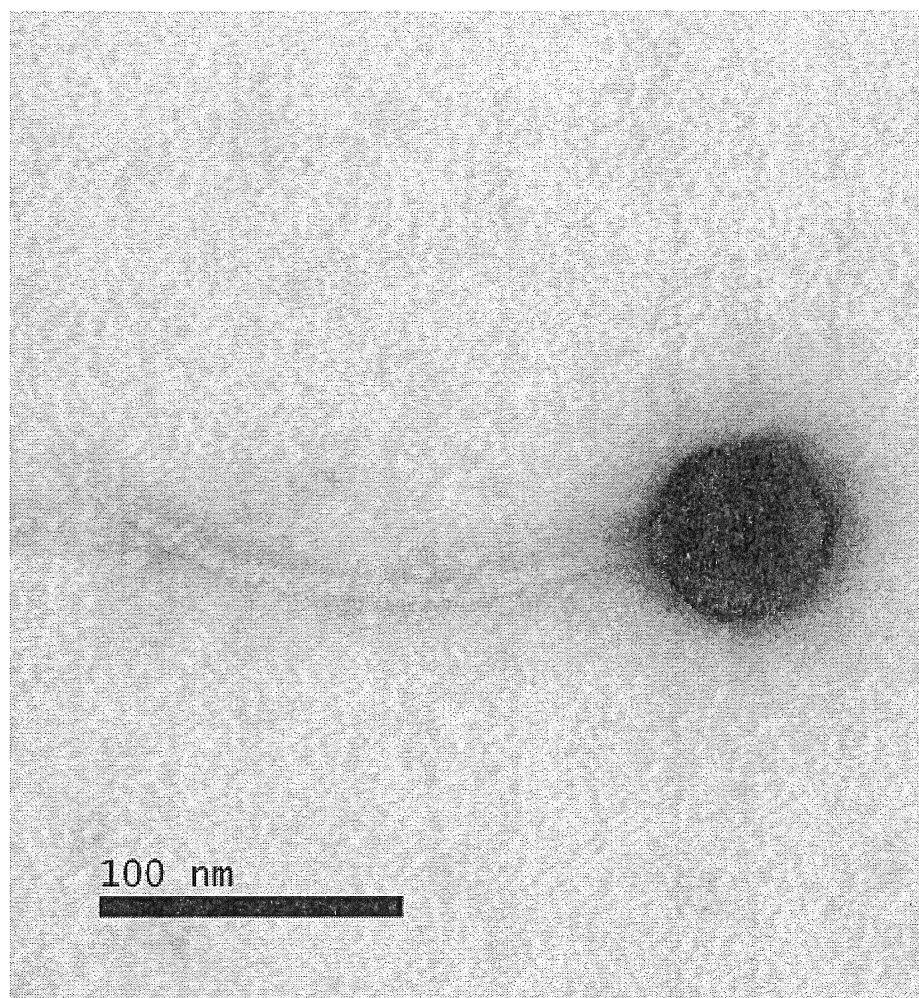
chứng.

Trong khi đó, kết quả phân tích sự thay đổi thể trọng cho thấy thể thực khuẩn ΦCJ11 không gây ra phản ứng độc tính đủ để làm giảm cảm giác thèm ăn hoặc thay đổi thể trọng. Kết quả được thể hiện trên Fig.9. Fig.9 là đồ thị thể hiện sự thay đổi thể trọng do độc tính sau khi cho chuột Sprague-Dawley sử dụng liều duy nhất qua đường miệng của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế. Như được thể hiện trên Fig.9, quan sát thấy sự thay đổi thể trọng trước khi sử dụng và 1 ngày, 3 ngày, 7 ngày, 10 ngày và 14 ngày sau khi sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ11 cho thấy không có sự thay đổi đáng kể về thể trọng so với nhóm đối chứng (■: chuột đực đối chứng, □: chuột đực sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ11, ●: chuột cái đối chứng, ○: chuột cái sử dụng thể thực khuẩn ΦCJ11).

Đã nhận thấy rằng các phản ứng bất lợi của thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế không xuất hiện khi thể thực khuẩn này được sử dụng ở liều trên 1×10^{11} PFU/kg ở cả chuột đực lẫn chuột cái, vì vậy thể thực khuẩn ΦCJ11 theo sáng chế không có độc tính.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thử thực khuẩn phân lập, có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu đối với *Salmonella choleraesuis*, được lưu trữ tại Ngân hàng giống vi sinh vật Hàn Quốc với số đăng ký là KCCM11208P.
2. Chế phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn *Salmonella* được chọn từ nhóm bao gồm *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis*, *Salmonella newport* và tổ hợp của chúng, chứa hoạt chất là thử thực khuẩn theo điểm 1.
3. Kháng sinh chứa hoạt chất là thử thực khuẩn theo điểm 1.
4. Thức ăn chăn nuôi chứa hoạt chất là thử thực khuẩn theo điểm 1.
5. Nước uống chứa hoạt chất là thử thực khuẩn theo điểm 1.
6. Chế phẩm làm sạch thịt chứa hoạt chất là thử thực khuẩn theo điểm 1.
7. Chế phẩm vệ sinh chuồng trại chứa hoạt chất là thử thực khuẩn theo điểm 1.

**Fig.1**

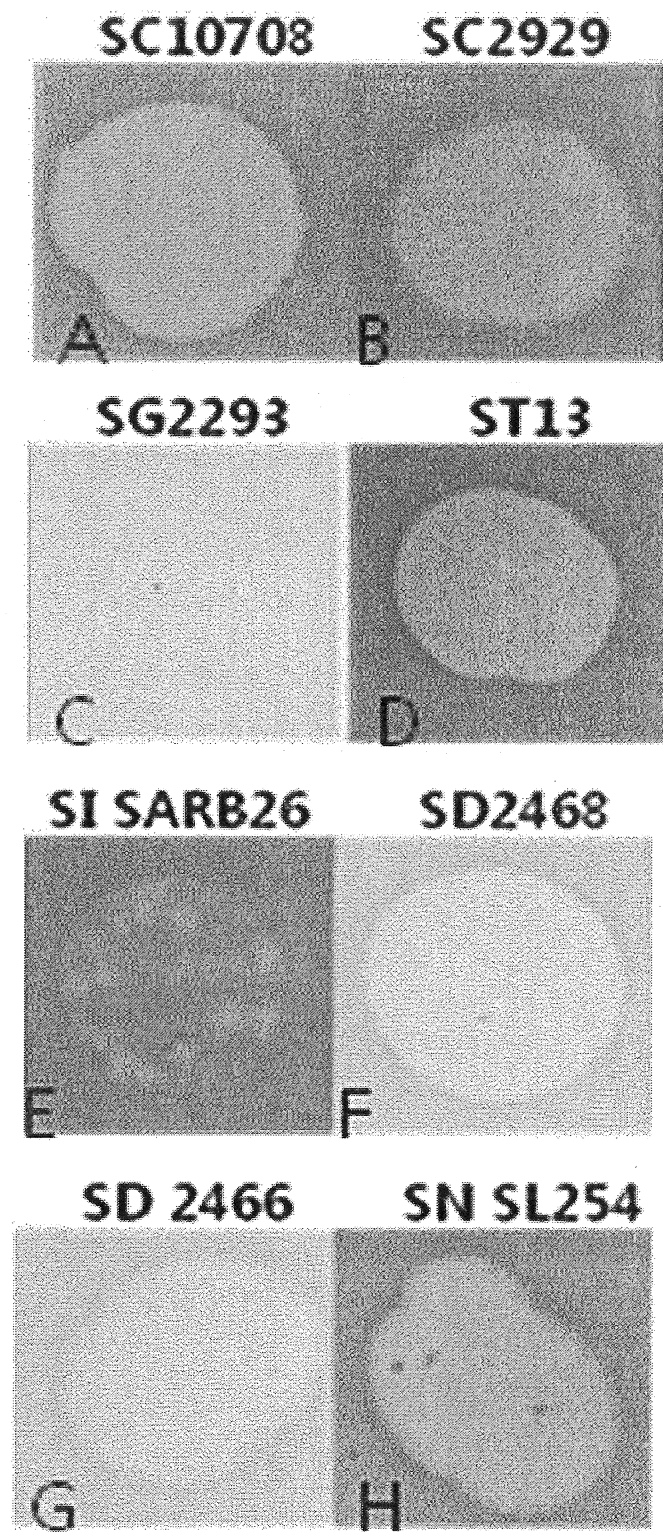


Fig.2

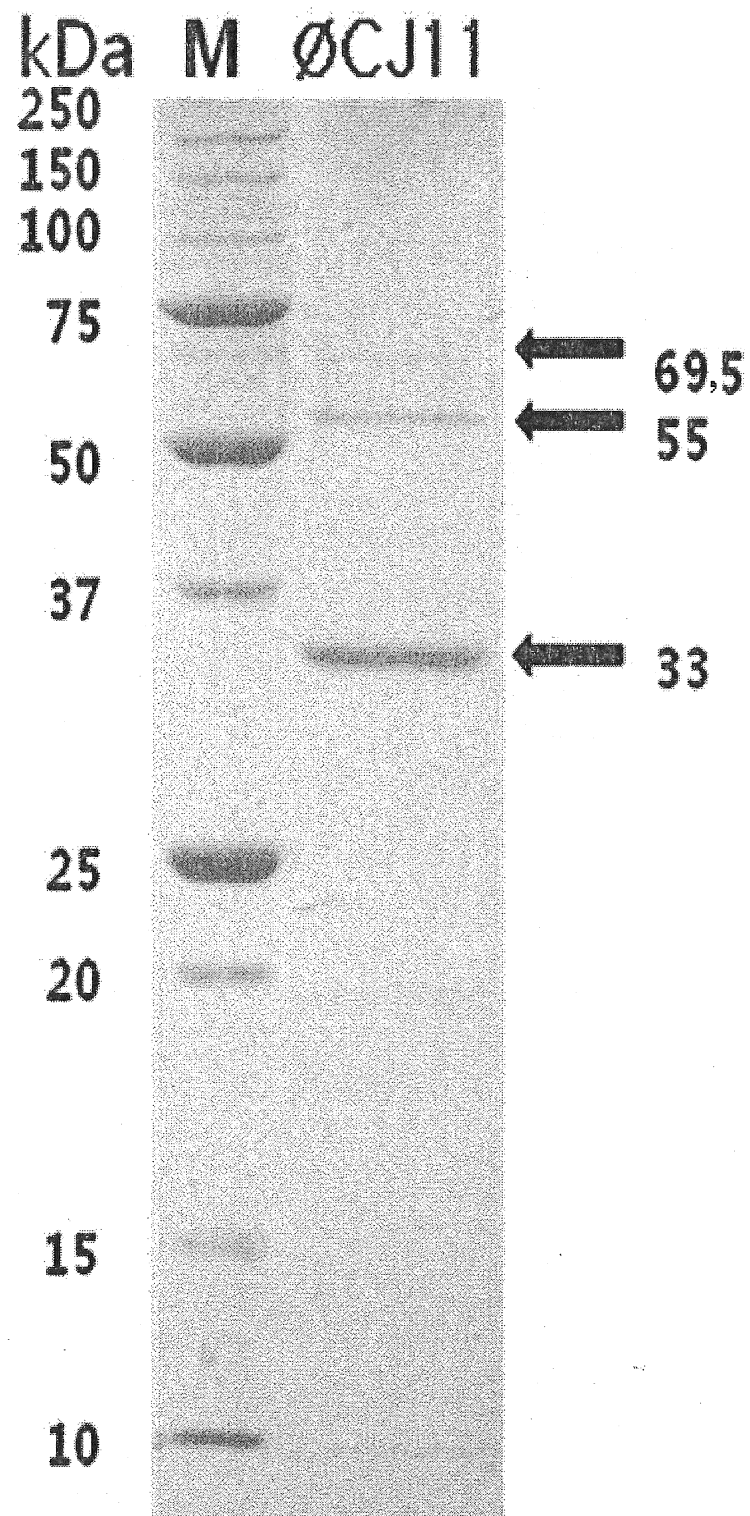


Fig.3

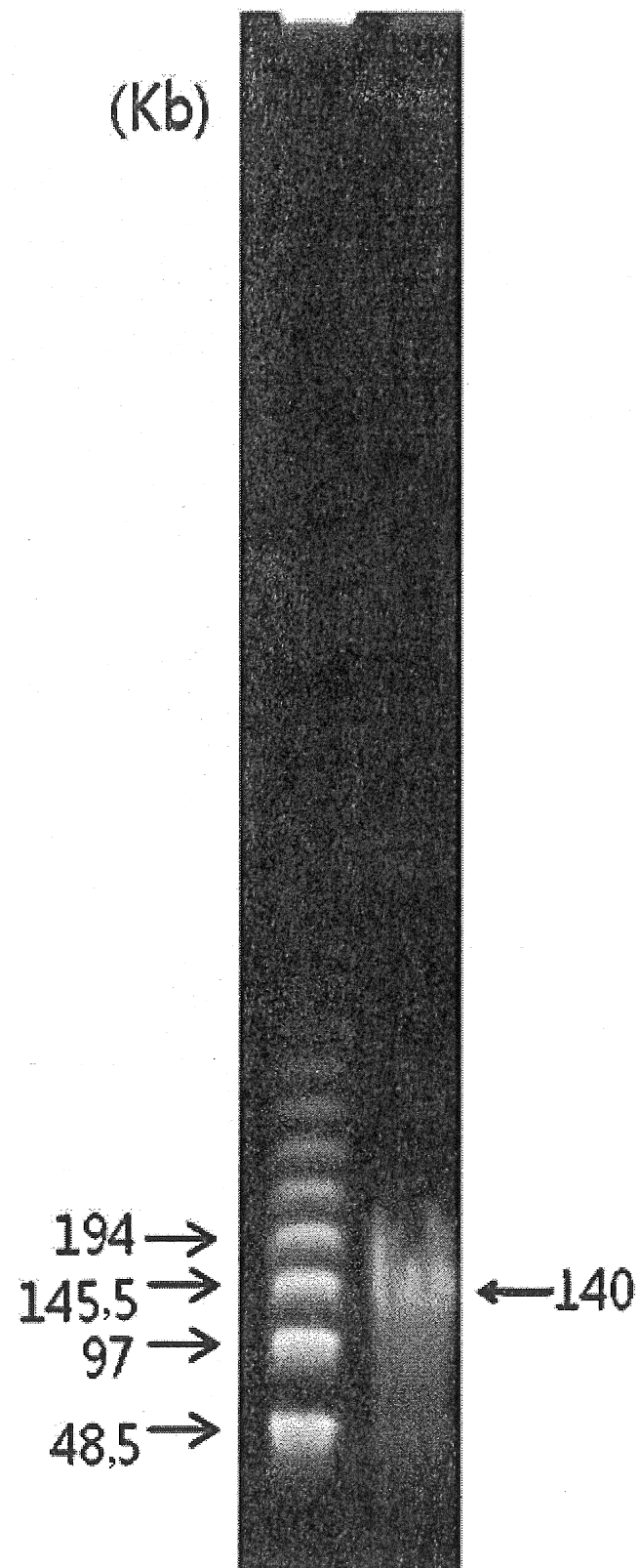


Fig.4

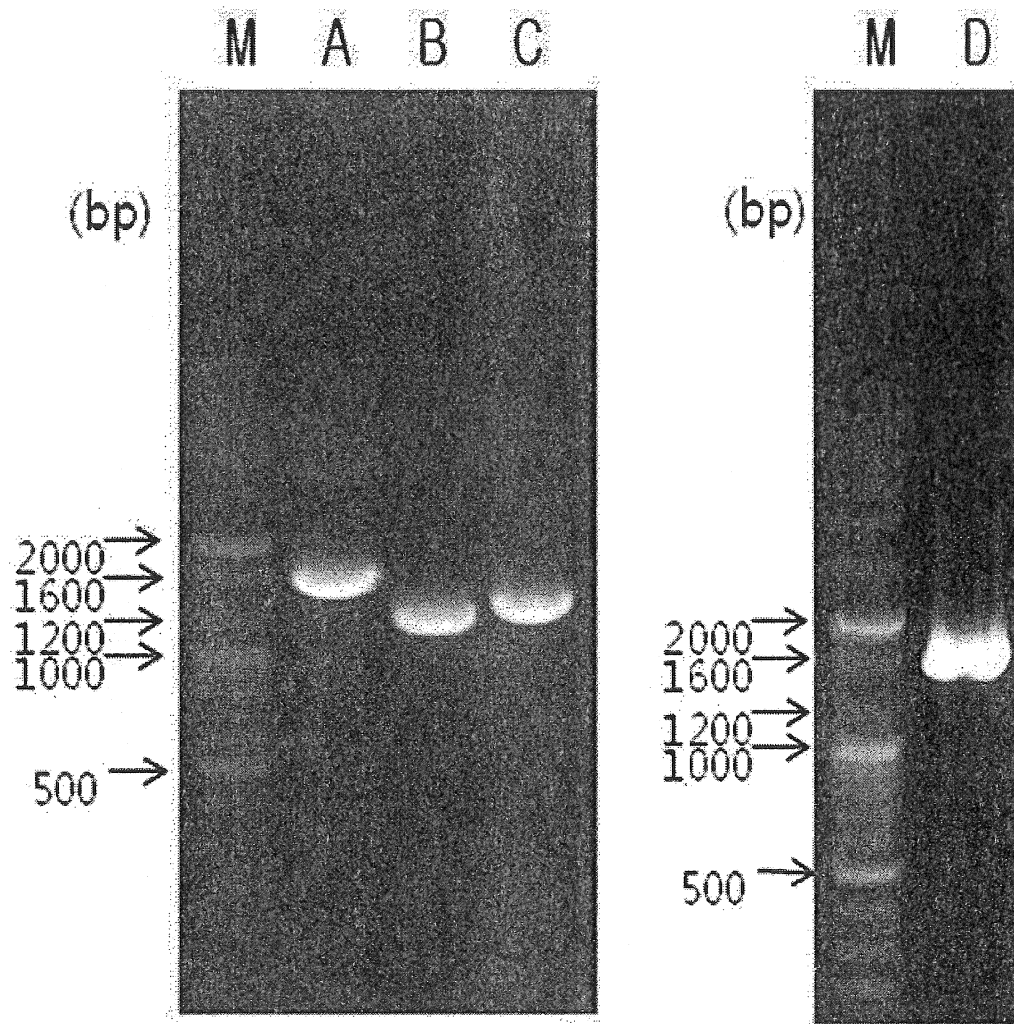


Fig.5

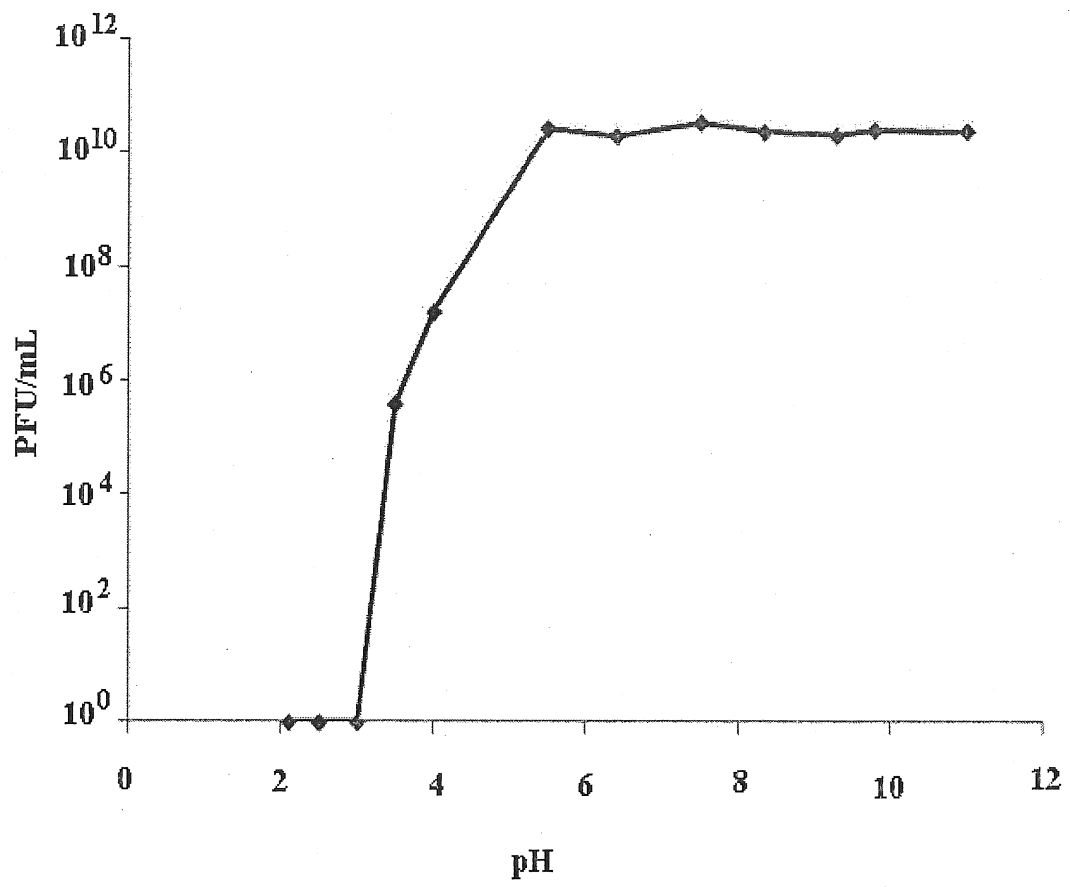


Fig.6

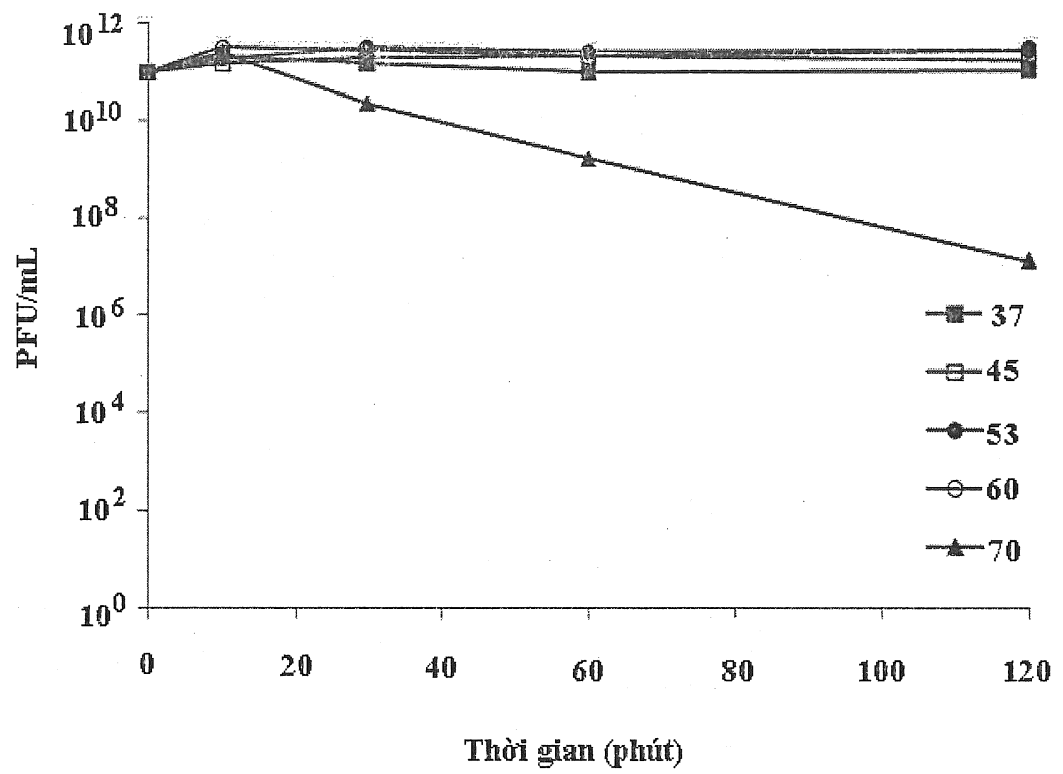


Fig.7

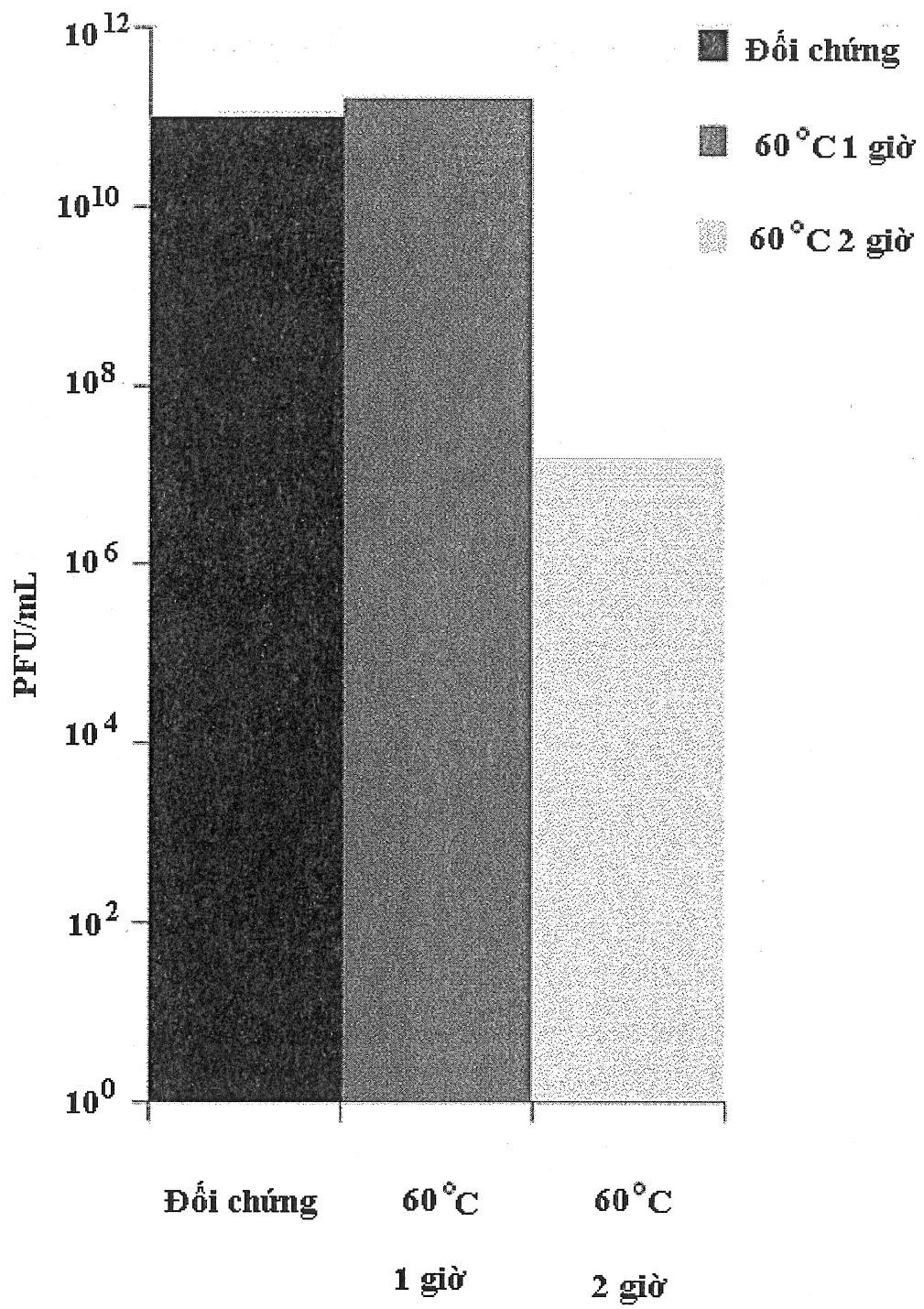


Fig.8

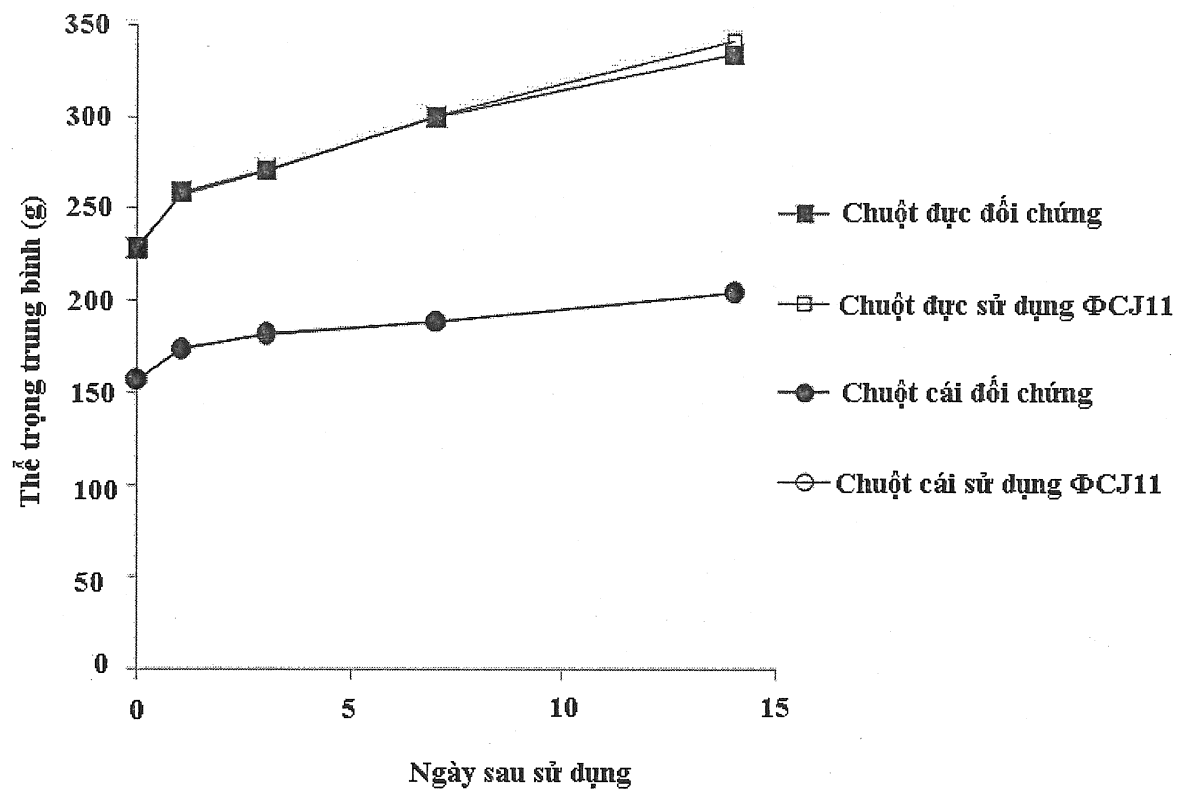


Fig.9

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	CJ CHEILJEDANG CORPORATION		
<120>	THỂ THỰC KHUẨN VÀ CHẾ PHẨM ĐỀ PHÒNG NGỪA HOẶC ĐIỀU TRỊ BỆNH TRUYỀN NHIỄM DO VI KHUẨN		
	SALMONELLA		
<130>	OPA12111		
<150>	10-2011-0094648		
<151>	20-09-2011		
<160>	14		
<170>	KopatentIn 2.0		
<210>	1		
<211>	1643		
<212>	ADN		
<213>	Thế thực khuẩn ΦCJ11		
<400>	1		
taaactgccg	gcttaatat	aaggggagga	gccattatg agtaaataatg gttttgtaaa 60
taacggactt	aatcaaatg	tgggtctcca	gcagcccatg ccgggtctgg ataacccta 120
cttacaacag	ttgcaacagc	gtttagcaga	agcgcaacag atgcagcaac aactccagca 180
aaatcctgga	agtgttagtc	ctatgcacaa	gatgcagcaa atgaatgggc agtcgcaaat 240
gccccacaac	atgcagcaac	agatgccgca	gcagcaagtt cagcaacaaa cccaacaacc 300
gcaggtttct	gcggaaggac	aggcagtact	agcccttttc gaagacttcg caaagacaga 360
ggatgggaag	cagcttgat	cacttatggg	taagtttaat agcttctgcc aaagccaagt 420
tgcaaaagct	caaaatggtg	gtaataactc	ctaaggagga attatgtgtt gcagaaaatc 480
tgtttctgtc	tgcccaatgc	ctgtagcacg	ttgttgctct tcagcaatgt ttacacaaat 540
accggcggtc	aatcggtttg	cctttaagcc	tactcttatc ctgcccccta gagtagattt 600
tcagtcaagg	ttggcctccc	gtatgggtgg	ttgctgtaat aagagtatat ggttctaaag 660
aaccaaaca	taaagccctt	agtcgaaaag	cttaggggct tttcttttat cttaaatata 720
gaaaagccct	gcgctctcca	gggaacgcag	ggcttacttc agatgttacg tgcggatatt 780
atttattacg	catatccatg	atcattttgc	catcatagcc agtgccaacc acagtctgcg 840
gtacaccacc	tttggtat	ctgagcacga	atcatttcaa ctttccagtt gcttccagcg 900
aatcatctca	ggagtaatgg	tacgttgcaa	tgccgggtta gcttcagctt ctttcttagc 960
tgcgtagagt	ttggcatctg	cgtcacgttc	gttagcaata gcttgggtat tacgagcttc 1020
gcgatctgct	tctgcttggt	taacctttct	ctgtgcttct tgttcaaac gagccagttc 1080
agctttcgca	gcattaaact	gttcttcacg	aactttggta ttctgtacct gttccatgat 1140
taccgggtgc	aaagtaatat	cctgaagaaa	tacctgctta actgtgtaac catatgggcg 1200
tgcatactct	tcaacttctt	gttgaattgc	agtttgcaat tgagcctgaa ttttagcatc 1260
aaacaaatct	tgtgctttag	gtacagacct	accaaactca cgaatagtag acagtaattt 1320
ttcagttaca	tatttgtcta	acgcttgatc	ctgagtaact gcattaatat gggttaactcg 1380
tgcccttaga	ccatcaaaact	gcaacataac	agtcagggtc acagtggatt taaacttatc 1440
ctgactagga	acctgaagtt	tatctaattt	tagagcaata tctttagtac taaaagtatc 1500
gaaagaagca	aaaggattta	caatatgaaa	gccgggtaat actgggctag gggtcaacttt 1560
acccaggaaa	gtctgggttt	taacagttac	gtcttgaaca acagtatagg agttaagggc 1620
cagaactaaa	cctaccaaac	caa	
<210>	2		1643
<211>	1464		
<212>	ADN		
<213>	Thế thực khuẩn ΦCJ11		
<400>	2		
taggtatata	ctgggatact	aactcttcta	aatggaaggt agaaataact aactgtatag 60
gtgttataat	atatgggtgg	ttattccctt	atgaagaatt agagttagct ataaataaag 120
ctaacgaact	tagagcacag	catctaggta	tggattccag gcaagaacta ttcaaaagat 180
atatttgccg	acgtgaggac	ttagataagt	aaaattgcat ttggcaatag ctcataaatg 240
atgtataata	tatacataaa	tttgagagag	aaagtttcgg attgataaga aagtcggaag 300
cagaaaaata	aaaattttag	ttgctaaatt	ctctcgaaat ctagtataat atatacataa 360
attcgaggag	aaaacaaaa	ttaaattctt	cgattatgaa aagctatact tactagctag 420
aggaaatttc	gacctaatta	ttaaagttat	caaaagaatg cttacagagc ctgatgtcta 480
ccaatttatg	tgctggttct	cattcat	gaatgaatca acaatagttg ataataccaa 540
taaattgtct	aatagacaac	tggcagaata	tctagggaatt ttaagtctac gaaattatgc 600
cgaatacaag	tttacaacg	atcctagttt	ggacatacaa tatgttccag tatggatacc 660
acgttttagt	atcgacacta	acccactaat	cgcaattaac aaatcgaaat taatctttaa 720
agaggaaata	aaatatggct	aagtcttggt	gcgaaactac tggcgggtct aacgataaaa 780
tcgaattcct	gaagtccaac	aacggtatca	ctcgtgttcg tatcgtttct ggtgttcttc 840
cacgttatgt	ctattggctg	actaataaag	agggtagcgt agctccttct gaatgtctcc 900
gttttaaccg	tgacaaagag	agcctttgtc	gtggtaaagc tgatccggtt catgagatgg 960
gcttcttcga	gaaagaactg	gataaagatg	gtaatcgtgt tccgctgaaa ccgaagaaaa 1020
actatatcgc	ttttgttata	gaccgttctg	ataacaaact gaaagtaatg gaagtcaagg 1080
ctactattct	gaaaggcatc	cagtctatca	tgaagcagtt gagtctggca actccgtttg 1140
atattgatat	ttctatcgag	aaaaaaggta	aagggtttcga tactgagtat gatgtacagc 1200
agattgctgc	tatgcagttc	cagatttaagc	tgcaagatcc taacagtgca gagtctaagc 1260
aatatgctgc	aggcagca	gcttggcgta	atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa 1320
ttgttatccg	ctcacaattc	cacacaacat	acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg 1380
gggtgcctaa	tgagttagct	aactcacatt	aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca 1440
gtcgggaaac	ctgtcgtgcc	agct	
<210>	3		1464
<211>	1324		
<212>	ADN		
<213>	Thế thực khuẩn ΦCJ11		
<400>	3		
tactgaatct	atataagaaa	caacaaatcc	gcgaacgtta gcgccagctc ctctatccca 60

```

ttccattgtg acacggagat catatctttc tttaccatca gcaatccttg cagctttgaa 120
agtaattgtt ttaggagcag taggaggtac aaagtattac tctacagtaa gaactttgga 180
aaattcaaag tatccagaag agtctacagt tacaccatct ggcatggtaa cttgcccaga 240
tatgcgtact ttgtaattcc caacaggaac accaccaaat ctaatagtgg gagatagtgg 300
acctatataa tactttaccc acgggctatt tgaaggttga gtacttttta actcaatagt 360
acaataacta gcttctcctg tagtctctat aactactata ggggcaccta caccacatc 420
tactggatca gcctctgatc tagcggcagt aatagttagt tttctcttag tactaaaggt 480
agtttttatt gataagttta tgccaatttt agcctctaag agctcagagt ctataataga 540
gtcatagaaa gccctttgaa cctcataaga agttgaaggg gttagattat taatcattac 600
aaagaaagta tctatacccg tatagtcacg tctatcaata ctttctccta actttaacca 660
aaaggatcta ccaataacgt cataatcagt atatatagag tgctggacat atgccattgt 720
atatctcagt attatactat ttaagaccat ttggctgggt gcattattcg aaatcattaa 780
atggatgccc actccacaga ctgttcccca tcatctcctt ctgctctaag acgaaaatat 840
agttttctat tgatccctag agcatcactg ttatggagag caaaatctgc cttattatac 900
attaataaat agtcataagt atactgattt tcaatacgtc cacttcttag cattctattc 960
tggaatcact agatctccag agtatagaat atactttcta ttatatcttc ttctgggtatc 1020
ctatcccaag ctagtttttac gtctgggccc acaaaactcag ttacatctcc agaagccgta 1080
ttagttaccc taaaattaga tactacgctt aggttttttag cagagttaag ttctatagat 1140
aatgttactg gagaactttct tctaccgttt atatccacag cccttatttc aaatattgct 1200
aaacctgcag gttctccaac tatctcttgg atcatcgttt cattgggatt tgtttctagt 1260
tgctgcacaa tatacggctc agcatggcct gaatgtacga tagaatagta aactacgtta 1320
ttag 1324
<210> 4
<211> 1666
<212> ADN
<213> Thể thực khuẩn ΦCJ11
<400> 4
cagaaaaataa cattaccttc tttatctggt tttagtacaa ccgtttcttg ttttagtagtt 60
ttaatctgat aagttagatg actagtatca atacctacca tattaggatc ggtaaaaatta 120
tttgcttccct gaactttcaa atccgccttc cccacgatct gtctccccta gttcgtcaac 180
gattttcaaaa ttatgagttg agtagtgtgg tactactact agctgacaaa gtctttcaaa 240
attttccaga gtttgaattt cagaaccata gttataaagg ttcatcttaa tagttccacg 300
atagtctgag tcaatcactc ctgcggtggt tgcaatcact agatgacgct tacctaagga 360
gctacgagga actaccaaac cgaaccaacc tcgcggaatt tctaccgca caccgggtgc 420
aatcatttag gatttgctcg gtgcaatagc acgtaaatct gcagcagggt tagtaccaaa 480
gaacgctcgc agatccatc ctgcgcatc ttcggaacca atcttaggcg tacaatctgg 540
atgagttaat ttaattttta tcattgttct gcaatctcca aaatatcttt tgtaaaattta 600
tctaatacat ctgacacctc agcagcaata gcatccacac agtaggtagg taaatcaacc 660
agaattaggt ttgcataaag caattcttcc gaagcattta aattctgtat atatttctgt 720
tttccaggca ttggaagctg atcaataata tccagaacgt taccaaattc acgaataata 780
ttatacccac gctttgcccc aataccctca acacctcgga tattatcccc taaatcacc 840
ataattgctt tcaggagat aaactgctct acatcgtcaa cattatgatg ctcatacata 900
tcacgaagat gatattcacg acgtgtgttg aaagagaagc gagatacttt atcagttaat 960
aaagtatccc agtcaccatc ggtagaaatt agccaacat gatcatatag atgccaatc 1020
agcttaacaa tataagctgc catatcatct gcttctaccc cagcaatagt gaaagttggg 1080
aatgtagttt cacataattc gaaagcatct ttcaagtact cgaagaattg ttcatctaat 1140
gctttctcct ctcccgtagc ctgcgagtat ttctcatctc gattcccttt atactcaggg 1200
agatgctcta ggccgaagtc agacttccct ttatctccta aaactattgt agttctagca 1260
gagtaagatt ttgcaagaga ctgaatagtg gaaacataac ttgaggcaaa tggtttttta 1320
ctattgttat gttgaagcg aaagcctaag ttagtccat cgacaatcat taggttacga 1380
cggaagcca ttccggcttc ctcttctccta ataaattttc cccaggattt actcattatt 1440
taattaagtc ctcaacagat gcatgatgta gccacggctc aaataaacca attacgattt 1500
ccatgtcttt cttattttaac accatatggg tacgactcat taagttgtca accatcgggt 1560
ctgagctatc caaagctatt aaccactgtc ctctgtcttt tttgaatatt aatgcaggtt 1620
tggaattcat ctgctcacct tcacgtgagc actgctgcca ccactt 1666
<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mở
<400> 5
cccattatga tgaaataggg 20
<210> 6
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mở
<400> 6
ctatactggt gttcaagac 19
<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mở
<400> 7
gatactaact cttctaaatg 20
<210> 8

```



```

<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 8
cttagactct gaactgtag
<210> 9
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 9
ctgaatctat ataagaaaca ac
<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 10
cgaagtttac tattctatcg
<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 11
gttttttagta caaccgtttc
<210> 12
<211> 19
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 12
cagatgaact ccaaacctg
<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 13
cgggcctctt cgctattacg
<210> 14
<211> 22
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Đoạn mỗi
<400> 14
aggcttaccg gtcttactgt cg

```

20

22

20

20

19

20

22