



(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)



1-0027344

(51)⁷ C12N 7/00; A61P 31/00; A23K 1/16; (13) B
A61K 35/76

(21) 1-2013-02227

(22) 21/12/2011

(86) PCT/KR2011/009964 21/12/2011

(87) WO2012/087037 28/06/2012

(30) 61/425,553 21/12/2010 US

(45) 25/02/2021 395

(43) 25/11/2013 308A

(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)

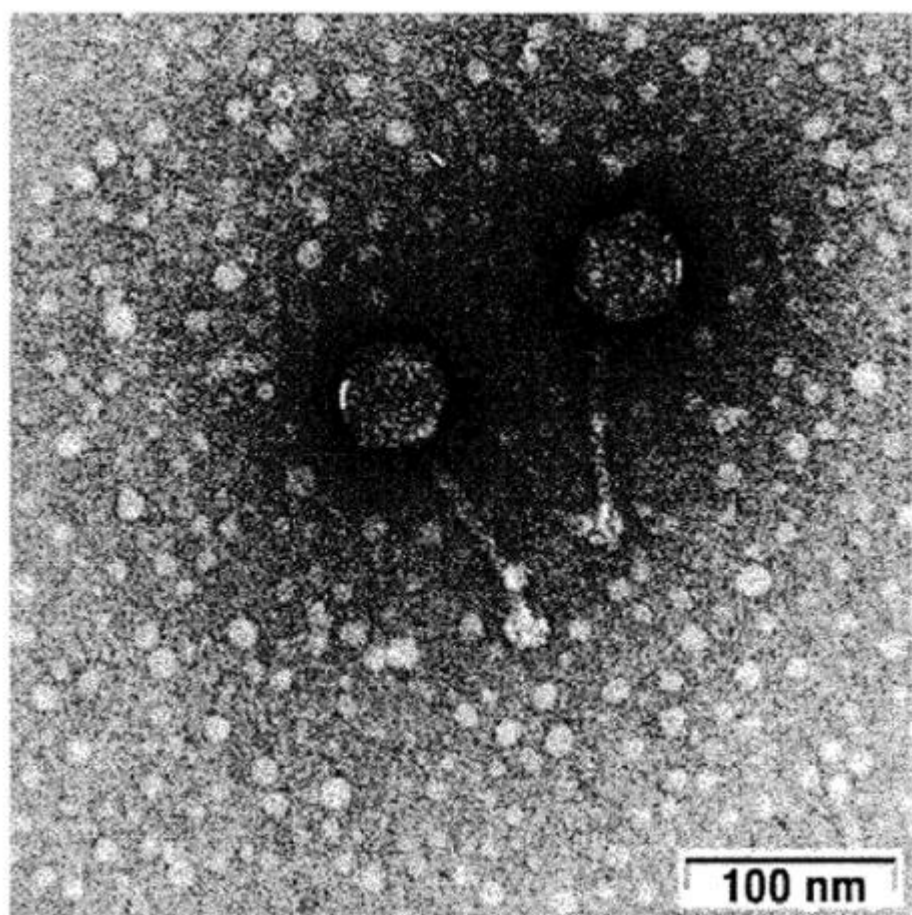
292, Ssangnim-dong, Jung-gu, Seoul 100-400, Republic of Korea

(72) YANG Si Yong (KR); SHIN Soo An (KR); PARK Min Tae (KR); CHO Young Wook (KR); KANG In Hye (KR); SHIN Eun Mi (KR).

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

(54) THỂ THỰC KHUẨN PHÂN LẬP VÀ CHẾ PHẨM DÙNG ĐỂ NGĂN NGỪA
HOẶC ĐIỀU TRỊ CÁC BỆNH NHIỄM KHUẨN CHỨA THỂ THỰC KHUẨN
NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến thể thực khuẩn, cụ thể hơn là thể thực khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn đặc hiệu với *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*, và *Salmonella pullorum*. Sáng chế cũng đề cập tới chế phẩm dùng để ngăn ngừa và điều trị các bệnh nhiễm khuẩn bao gồm bệnh phó thương hàn và ngộ độc thực phẩm do nhiễm *Salmonella* gây ra bởi *Salmonella enteritidis* hoặc *Salmonella typhimurium*, bệnh thương hàn gây ra bởi *Salmonella gallinarum* và bệnh bạch lỵ thương hàn gây ra bởi *Salmonella pullorum*, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này, và thức ăn hoặc nước uống dùng cho vật nuôi, chất làm sạch và chất khử trùng chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể thực khuẩn mới và chế phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn chứa thể thực khuẩn này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Salmonella là giống thuộc họ Enterobacteriaceae, có đặc điểm là vi khuẩn Gram âm, kỵ khí không bắt buộc, không tạo bào tử, có hình que, và hầu hết các chủng có thể di động bằng roi. *Salmonella* có hàm lượng GC trung bình trên bộ gen nằm trong khoảng 50-52%, hàm lượng này tương đương với hàm lượng GC trung bình trên bộ gen của *Escherichia coli* và *Shigella*. Giống *Salmonella* là vi sinh vật gây ra các bệnh nhiễm trùng cho vật nuôi cũng như cho người. Theo phân loại về mặt huyết thanh học thì *Salmonella enterica*, một loài *Salmonella bacterium*, có nhiều kiểu huyết thanh khác nhau bao gồm *gallinarum*, *pullorum*, *typhimurium*, *enteritidis*, *typhi*, *choleraesuis*, và *derby* (Bopp CA, Brenner FW, Wells JG, Strokebine NA. *Escherichia, Shigella, Salmonella*. In Murry PR, Baron EJ, et al., eds. Manual of clinical Microbiology. 7th ed. Washington DC American Society for Microbiology 1999; 467-74; Ryan KJ, Ray CG (editors) (2004). Sherris Medical Microbiology (4th ed). McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9). Trong số này, *Salmonella gallinarum* và *Salmonella typhimurium* là các tác nhân gây bệnh cho gà, *Salmonella typhi* là tác nhân gây bệnh cho người, *Salmonella choleraesuis* và *derby* là các tác nhân gây bệnh cho lợn, và *Salmonella enteritis* và *Salmonella typhimurium* là tác nhân gây bệnh cho cả người lẫn động vật. Mỗi kiểu huyết thanh gây bệnh cho các loài nhất định, điều này dẫn đến thiệt hại nghiêm trọng cho nông dân hoặc người tiêu dùng.

Trong khi đó, *Salmonella enteritidis* (dưới đây được gọi là SE) và *Salmonella typhimurium* (dưới đây được gọi là ST) là các tác nhân gây bệnh ký sinh trên vật nuôi không thể hiện tính đặc hiệu với vật chủ, không như SG hoặc SP (Zoobises Report; United Kingdom 2003).

SE và ST là nguyên nhân gây bệnh phó thương hàn ở gia cầm, lợn, và gia súc. Bệnh phó thương hàn gây ra bởi vi khuẩn *Salmonella* là nhiễm trùng cấp hoặc mạn tính ở đường tiêu hóa của vật nuôi, và có triệu chứng chính là sốt, viêm ruột, và nhiễm trùng máu, thi thoảng có viêm phổi, viêm khớp, sảy thai, và viêm vú. Bệnh phó thương hàn xảy ra trên toàn thế giới, và thường xuyên nhất vào các tháng mùa hè (T.R. Callaway et al. *Gastrointestinal microbial ecology and the safety of the food supply as related to Salmonella*. J Anim Sci 2008,86:E163-E172). Ở gia súc, các triệu chứng điển hình bao gồm chán ăn, sốt, tiêu chảy phân nâu sẫm hoặc nhầy dính máu. Nhiễm trùng cấp tính ở bê gây chết nhanh, và nhiễm trùng trong quá trình mang thai gây chết thai do nhiễm trùng máu, dẫn đến sảy thai sớm (www.livestock.co.kr). Ở lợn, bệnh phó thương hàn được đặc trưng lâm sàng bởi ba hội chứng cấp tính chính: nhiễm trùng máu cấp, viêm ruột cấp, và viêm ruột mạn. Nhiễm trùng máu cấp xảy ra ở lợn 2~4 tháng tuổi, và thường gây chết trong vòng 2~4 ngày sau khi khởi phát triệu chứng. Viêm ruột cấp xảy ra trong giai đoạn vỗ béo, và đi kèm tiêu chảy, sốt cao, viêm phổi, và các biểu hiện thần kinh. Có thể thấy hiện tượng đổi màu da ở một số trường hợp nặng. Viêm ruột mạn đi kèm với tiêu chảy kéo dài (<http://www.livestock.co.kr/>).

Khi đã bùng phát bệnh phó thương hàn do SE và ST gây ra ở gia cầm, lợn, và gia súc, thì rất khó ngăn chặn các tác nhân gây bệnh. Nguyên nhân là vi khuẩn *Salmonella* có tính kháng mạnh với nhiều thuốc và sống trong các tế bào mà thuốc kháng sinh không thâm vào được khi xuất hiện các triệu chứng lâm sàng. Cho đến nay, chưa có phương pháp hữu hiệu để điều trị bệnh phó thương hàn do SE và ST gây ra, kể cả các thuốc kháng sinh (<http://www.lhca.or.kr/>).

Giống như ở vật nuôi, SE và ST gây nhiễm trùng cho người qua các sản phẩm từ vật nuôi, dẫn đến ngộ độc thức ăn do *Salmonella* gây ra. Việc tiêu thụ các sản phẩm từ vật nuôi bị nhiễm, được chế biến không đúng cách (ví dụ, sản phẩm thịt, sản phẩm gia cầm, trứng và các sản phẩm phụ) sẽ gây nhiễm trùng ở người. Ngộ độc thức ăn do *Salmonella* ở người thường kéo theo sự khởi phát nhanh của đau đầu, sốt, đau bụng, tiêu chảy, buồn nôn và nôn. Các triệu chứng này thường xuất hiện trong vòng 6-72 giờ sau khi ăn vào, và có thể kéo dài tới 4-7 ngày hoặc thậm chí lâu hơn (NSW+HEALTH. 2008,01,14.).

Theo báo cáo của CDC (The Centers for Disease Disease Control and Prevention, USA - Trung tâm kiểm soát và ngăn ngừa dịch bệnh Mỹ), 16% trường hợp ngộ độc thức ăn ở người xảy ra trong khoảng từ năm 2005 đến 2008 là do vi khuẩn *Salmonella* gây ra, trong đó tỷ lệ do SE và ST gây ra lần lượt là

20% và 18%. Trong số các vụ ngộ độc thức ăn do *Salmonella* ở người trong thời gian từ năm 1973 đến năm 1984, các vật truyền thực phẩm được đề cập đến trong báo cáo là thịt gà (5%), thịt bò (19%), thịt lợn (7%), các sản phẩm sữa (6%), và thịt gà tây (9%). Vào các năm 1974~1984, kiểm tra nhiễm vi khuẩn ở gà trong quá trình giết mổ cho thấy tỷ lệ nhiễm *Salmonella* là 35% hoặc cao hơn. Vào năm 1983, *Salmonella* được phân lập ở 50,6% gà, 68,8% gà tây, 60% ngỗng, 11,6% thịt lợn, và 1,5% thịt bò. Ngoài ra, nghiên cứu tổng quan được tiến hành vào năm 2007 cho thấy rằng *Salmonella* được tìm thấy ở 5,5% thịt gia cầm sống và 1,1% thịt lợn sống. Đặc biệt, đã phát hiện ra rằng SE thường có nguồn gốc từ trứng, thịt gia cầm bị nhiễm, và ST thường có nguồn gốc từ thịt lợn, thịt gia cầm, và thịt bò bị nhiễm (www.cdc.gov). Ví dụ, ngộ độc thức ăn do SE gây ra đã gia tăng nhanh chóng ở Mỹ, Ca-na-đa và châu Âu từ năm 1988, và các nghiên cứu dịch tễ đã cho thấy rằng nó là do trứng hoặc các thực phẩm từ trứng gây ra (Agre-Food Safety Information Service (AGROS). Domestic and foreign food poisoning occurrence and management trend. 2008,02). Việc đánh giá nguy cơ được FAO và WHO tiến hành vào năm 2002 cho thấy rằng tỷ lệ người mắc bệnh phó thương hàn truyền qua trứng và thịt gia cầm dường như có mối quan hệ tuyến tính với sự lan tràn của *Salmonella* ở gia cầm. Điều này có nghĩa là, khi sự lan tràn của *Salmonella* ở gia cầm giảm xuống, thì tỷ lệ người mắc bệnh phó thương hàn sẽ giảm (*Salmonella* control at the source; World Health Organization. International Food Safety Authorities Network (INFOSAN) Information Note No. 03/2007). Gần đây, những lo ngại về an toàn thực phẩm lại gia tăng do sự bùng nổ của *Salmonella* từ các sản phẩm đa dạng như lạc, rau bina, cà chua, hạt hồ trăn, hạt tiêu và, gần đây nhất là bột nhào để làm bánh quy (Jane Black and Ed O'Keefe. Overhaul of Food Safety Rules in the Works. Washington Post Staff Writers Wednesday, July 8, 2009).

Vì các nguyên nhân này, ở Đức các trường hợp nhiễm *Salmonella* phải được báo cáo (theo mục 6 và 7 trong luật ngăn ngừa bệnh nhiễm khuẩn ở Đức, Infektionsschutzgesetz). Từ năm 1990 đến năm 2005, số trường hợp nhiễm được báo cáo chính thức đã giảm từ khoảng 200.000 trường hợp xuống khoảng 50.000 trường hợp. Ước tính rằng có một phần năm người ở Đức có mang *Salmonella*. Ở Mỹ, có xấp xỉ 40.000 trường hợp nhiễm *Salmonella* được báo cáo mỗi năm (en.wikipedia.org/wiki/Salmonella#cite_note-2).

Do đó, nhu cầu cấp bách đối với việc kiểm soát SE và ST là các vi khuẩn gây bệnh phó thương hàn cho vật nuôi và người. nỗ lực hợp tác giữa USDA và FDA đã phát triển nhiều chiến lược hữu hiệu để ngăn ngừa bệnh phó thương hàn, là bệnh gây ra trên 1 triệu trường hợp nhiễm bệnh lây qua thực phẩm ở Mỹ.

Trong số đó có quy định cuối cùng của FDA, nhằm làm giảm sự nhiễm bệnh ở trứng. Hiện nay, FDA yêu cầu rằng các sản phẩm từ trứng cần phải kiểm nghiệm thường xuyên đối với *Salmonella* gây chết người trong quá trình sản xuất, bảo quản và vận chuyển. Như vậy, ở Đan Mạch, các đánh giá thận trọng từ phân tích chi phí-lợi ích bằng cách so sánh chi phí để phòng trừ *Salmonella* trong khu vực sản xuất với toàn bộ chi phí y tế công cộng để chữa bệnh phổ thương hàn cho thấy rằng việc phòng trừ *Salmonella* đã tiết kiệm cho kinh tế Đan Mạch 14,1 triệu đô la Mỹ trong năm 2001 (*Salmonella Control at the source*. World Health Organization. International Food Safety Authorities Network (INFOSAN) Information Note No. 03/2007).

Bệnh do *Salmonella bacterium* gây ra ở gia cầm là bệnh thương hàn gà (Fowl Typhoid - FT), bệnh này gây ra bởi tác nhân gây bệnh, *Salmonella gallinarum* (dưới đây được gọi là SG). Bệnh thương hàn gà (FT) là bệnh nhiễm trùng máu ở gia cầm như gà và gà tây, và diễn biến có thể là cấp tính hoặc mạn tính với tỷ lệ tử vong cao. Gần đây, đã có báo cáo rằng bệnh thương hàn gà thường xảy ra ở châu Âu, Nam Mỹ, Châu Phi, và Đông Nam Á, và mức thiệt hại đang tăng dần. Sự bùng nổ của FT ở Hàn Quốc đã được báo cáo từ năm 1992 và những thiệt hại kinh tế do FT gây ra ở gà nâu đẻ trứng là rất nghiêm trọng (Kwon Yong-Kook. 2000 annual report on avian diseases. Information publication by National Veterinary Research & Quarantine Service. March, 2001; Kim Ae-Ran et al., The prevalence of pullorum disease-fowl typhoid in grandparent stock and parent stock in Korea, 2003, Korean J Vet Res(2006) 46(4): 347~353, 2006).

Bệnh bạch ly gà cũng do một trong các vi khuẩn *Salmonella*, *Salmonella pullorum* (dưới đây được gọi là SP) gây ra. Bệnh bạch ly gà xảy ra ở tuổi gà hoặc mùa bất kỳ, nhưng gà con rất dễ bị nhiễm bệnh. Trong suốt một thế kỷ đã qua, nó là bệnh nghiêm trọng ảnh hưởng tới gà con ở 1-2 tuần tuổi hoặc nhỏ hơn. Từ thập niên 1980, sự xuất hiện bệnh đã giảm mạnh. Tuy nhiên, nó lại gia tăng vào giữa thập niên 1990 (Kwon Yong-Kook. 2000 annual report on avian diseases. Information publication by National Veterinary Research & Quarantine Service. March, 2001; Kim Ae-Ran et al., The prevalence of pullorum disease-fowl typhoid in grandparent stock and parent stock in Korea, 2003, Korean J Vet Res(2006) 46(4): 347~353, 2006).

Ở Hàn Quốc, sự bùng nổ bệnh thương hàn gà và bệnh bạch ly gà đã tăng dần từ thập niên 1990, gây thiệt hại kinh tế cho người nông dân. Vì nguyên nhân này, vacxin SG sống với độc lực giảm đã được sử dụng cho gà để phòng ngừa bệnh thương hàn gà từ năm 2004 (Kim Ae-Ran et al., The prevalence of

pullorum disease-fowl typhoid in grandparent stock and parent stock in Korea, 2003, Korean J Vet Res(2006) 46(4): 347~353). Hiệu lực của nó không rõ rệt, và vaccin sống không được phép sử dụng cho gà mái do có nguy cơ nhiễm trùng truyền qua trứng. Đáng tiếc là trên thị trường vẫn chưa có phương pháp phòng ngừa chống lại bệnh bạch ly gà, không như bệnh thương hàn gà. Do đó, một nhu cầu cấp bách là phải có các phương pháp mới để phòng ngừa bệnh thương hàn gà và bệnh bạch ly gà.

Trong khi đó, thể thực khuẩn là kiểu virus đặc biệt chỉ gây nhiễm và phá hủy vi khuẩn, và có thể tự nhân lên chỉ khi ở trong vi khuẩn chủ. Thể thực khuẩn gồm vật liệu di truyền là ADN hoặc ARN sợi đơn hoặc sợi kép được bao quanh bởi vỏ protein. Thể thực khuẩn được phân loại dựa trên ba dạng cấu trúc cơ bản: dạng đầu có hình nhị thập diện (hai mươi mặt) có đuôi, dạng đầu có hình nhị thập diện không có đuôi, và dạng sợi. Dựa trên cấu trúc đuôi của chúng, dạng thể thực khuẩn phổ biến nhất là dạng có đầu hình nhị thập diện có đuôi, được phân loại tiếp thành: Myoviridae, Siphoviridae, và Podoviridae, được đặc trưng lần lượt bởi đuôi có thể co rút, đuôi dài không co rút được, và đuôi ngắn không co rút được. Thể thực khuẩn có đầu hình nhị thập diện không đuôi được phân loại dựa trên hình dạng đầu và các thành phần của chúng, và sự có mặt của vỏ. Thể thực khuẩn dạng sợi có vật liệu di truyền là ADN được phân chia dựa trên kích thước, hình dạng, vỏ, và thành phần sợi của chúng (H.W.Ackermann. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000; Arch Virol (2001) 146:843-857; Elizabeth Kutter *et al.* Bacteriophages biology and application; CRC press).

Trong quá trình lây nhiễm, thể thực khuẩn bám vào vi khuẩn và cài vật liệu di truyền vào trong tế bào này. Sau đó, thể thực khuẩn trải qua một trong hai chu trình sống, là chu trình tan hoặc chu trình tiềm tan. Thể thực khuẩn gây tan điều khiển bộ máy tế bào này để sản xuất các thành phần của thể thực khuẩn. Sau đó chúng phá hủy hoặc làm tan bào, giải phóng các hạt thể thực khuẩn mới. Thể thực khuẩn gây tiềm tan kết hợp axit nucleic của chúng vào nhiễm sắc thể của tế bào chủ và sao chép cùng với nó như một đơn vị mà không phá hủy tế bào này. Trong một số điều kiện nhất định, thể thực khuẩn gây tiềm tan có thể được kích thích để đi vào chu trình tan.

Sau khi tìm ra thể thực khuẩn, thoát tiên người ta đã rất tin tưởng vào việc sử dụng chúng để điều trị bệnh nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, khi các kháng sinh phổ rộng được sử dụng phổ biến, thì thể thực khuẩn được xem là không cần thiết do nó có phổ đích riêng biệt. Tuy vậy, việc sử dụng sai và quá nhiều kháng sinh đã làm tăng nỗi lo ngại về việc kháng kháng sinh và tác dụng có hại của dư lượng

kháng sinh trong thực phẩm (Cislo, M *et al.* Bacteriophage treatment of suppurative skin infections. Arch Immunol. Ther. Exp. 1987, 2: 175-183; Kim sung-hun *et al.*, Bacteriophage; New Alternative Antibiotics biological research information center, BRIC). Cụ thể, đã biết rằng chất kích thích tăng trưởng kháng vi sinh vật (antimicrobial growth promoter - AGP) được bổ sung vào thức ăn vật nuôi để thúc đẩy quá trình tăng trưởng cũng sẽ gây ra sự kháng kháng sinh, và do đó, gần đây việc sử dụng chất kích thích tăng trưởng kháng vi sinh vật (AGP) đã bị cấm. Ở châu Âu, việc sử dụng tất cả các chất kích thích tăng trưởng kháng vi sinh vật (AGP) đã bị cấm từ năm 2006. Hàn Quốc đã đưa ra lệnh cấm sử dụng một số AGP từ năm 2009, và đang xem xét việc hạn chế sử dụng tất cả các AGP trong 2013~2015.

Những lo lắng ngày càng gia tăng về việc sử dụng kháng sinh này làm sống lại mối quan tâm về thể thực khuẩn làm chất thay thế kháng sinh. Bả thể thực khuẩn để phòng trừ *E.coli* O157:H đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 6,485,902 (Sử dụng thể thực khuẩn để phòng trừ *Escherichia coli* O157 - được cấp bằng năm 2002). Hai thể thực khuẩn để phòng trừ nhiều loại vi sinh vật khác nhau được bộc lộ trong patent Mỹ số 6,942,858 (được cấp bằng cho Nymox, 2005). Nhiều hãng đã cố gắng tích cực phát triển nhiều sản phẩm khác nhau bằng cách sử dụng thể thực khuẩn. Hãng an toàn thực phẩm EBI (Châu Âu) đã phát triển chất phụ gia thực phẩm để ngăn ngừa ngộ độc thực phẩm gây ra bởi *Listeria monocytogenes*, có tên Listex-P100, là sản phẩm thể thực khuẩn đầu tiên được Cơ quan quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ (US FDA) phê chuẩn. Sản phẩm trên cơ sở thể thực khuẩn, LMP-102 cũng được phát triển dưới dạng chất phụ gia thực phẩm kháng *Listeria monocytogenes*, được phê chuẩn là GRAS (Generally regarded as safe – nói chung là an toàn). Năm 2007, nước rửa trên cơ sở thể thực khuẩn được OmniLytics sản xuất được phát triển để phòng nhiễm *E.coli* O157 ở thịt bò trong quá trình giết mổ, được Cục thanh tra và an toàn thực phẩm của Bộ Nông nghiệp Mỹ (USDA's Food Safety và Inspection Service - FSIS) phê chuẩn. Ở châu Âu, thể thực khuẩn *Clostridium sporogenes* NCIMB 30008 và thể thực khuẩn *Clostridium tyrobutiricum* NCIMB 30008 được đăng ký dưới dạng chất bảo quản thức ăn phòng chống nhiễm *Clostridium* vào thức ăn lần lượt vào năm 2003 và 2005. Điều này cho thấy rằng việc nghiên cứu ứng dụng thể thực khuẩn để sử dụng chúng làm kháng sinh chống lại tác nhân gây bệnh ký sinh trên vật nuôi vẫn đang được tiếp tục.

Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu phòng trừ sinh học bằng thể thực khuẩn đều tập trung vào việc phòng trừ *E.coli*, *Listeria*, và *Clostridium*. *Salmonella* cũng là tác nhân gây bệnh ký sinh trên vật nuôi, và

những thiệt hại do tác nhân gây bệnh này gây ra không thuyên giảm. Như đã nêu trên đây, do SE và ST có tính kháng nhiều thuốc, nên việc giám sát tính kháng vi sinh vật đã được tiến hành trên quy mô toàn quốc ở Hàn Quốc theo Nghị định về việc thi hành Dự luật về phòng chống bệnh lây nhiễm (Executive Order 16961), Sắc lệnh bắt buộc của Dự luật về phòng chống bệnh lây nhiễm (Ministry of Health và Welfare's Order 179), và Tổ chức của Viện y tế Quốc gia (Executive Order 17164). Do đó, cần phải phát triển thể thực khuẩn có thể phòng trừ *Salmonella*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Để giải quyết các vấn đề liên quan đến tính chịu axit do việc dùng sai và lạm dụng chất kháng khuẩn, tác dụng bất lợi của dư lượng chất kháng khuẩn trong thực phẩm, và các vấn đề phát sinh do việc sử dụng các kháng sinh phổ rộng, các tác giả sáng chế đã phân lập từ các nguồn tự nhiên thể thực khuẩn mới có hoạt tính kháng khuẩn đặc hiệu với *Salmonella* gây ra các bệnh chủ yếu ở vật nuôi, đã xác định đặc tính hình thái học, sinh hóa và di truyền của nó. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng thể thực khuẩn này có hoạt tính kháng khuẩn đặc hiệu với *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* và *Salmonella pullorum* mà không ảnh hưởng đến các vi khuẩn có lợi, cũng như có tính chịu axit và bền nhiệt và chịu sấy khô rất tốt, và do đó, các thể thực khuẩn này có thể được sử dụng làm hoạt chất trong chế phẩm dùng để ngăn ngừa và điều trị bệnh phó thương hàn ở vật nuôi gây ra bởi *Salmonella enteritidis* hoặc *Salmonella typhimurium*, và ngộ độc thực phẩm do nhiễm *Salmonella*, bệnh lây nhiễm gây ra bởi *Salmonella gallinarum* và *Salmonella pullorum*, cụ thể là bệnh thương hàn và bệnh bạch ly thương hàn, và trong số các sản phẩm khác nhau để phòng trừ vi khuẩn *Salmonella* như chất phụ gia thức ăn và nước uống dùng cho vật nuôi, chất khử trùng chuồng trại, và chất làm sạch các sản phẩm thịt, nhờ đó thực hiện được sáng chế này.

Giải pháp kỹ thuật

Mục đích của sáng chế là đề xuất thể thực khuẩn mới có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu với một hoặc nhiều vi khuẩn *Salmonella* được chọn từ nhóm bao gồm *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*, và *Salmonella pullorum*.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi một hoặc nhiều vi khuẩn *Salmonella* được

chọn từ nhóm bao gồm *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*, và *Salmonella pullorum*, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất thức ăn hoặc nước uống dùng cho vật nuôi.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chất khử trùng hoặc chất làm sạch, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này.

Sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh phó thương hàn và ngộ độc thực phẩm do nhiễm *Salmonella* gây ra bởi *Salmonella enteritidis* hoặc *Salmonella typhimurium* bằng cách sử dụng chế phẩm chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn, bệnh thương hàn và bệnh bạch lỵ thương hàn gây ra bởi *Salmonella gallinarum* or *Salmonella pullorum*.

Hiệu quả có lợi theo sáng chế

Thể thực khuẩn mới theo sáng chế này có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu với *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* và *Salmonella pullorum*, và tính chịu axit, bền nhiệt và chịu sấy rất tốt. Do đó, thể thực khuẩn mới này có thể được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* hoặc *Salmonella pullorum* gây ra, bao gồm bệnh phó thương hàn, ngộ độc thực phẩm do nhiễm *Salmonella*, bệnh thương hàn gà hoặc bệnh bạch lỵ gà và cũng được sử dụng để phòng trừ *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* hoặc *Salmonella pullorum*

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG. 1 là ảnh chụp ΦCJ8 dưới kính hiển vi điện tử, trong đó ΦCJ8 thuộc kiểu hình thái của họ Siphoviridae, được đặc trưng bởi capsit hình khối và đuôi dài không co rút được;

FIG.2 là ảnh chụp thể hiện quá trình hình thành các đĩa ΦCJ8 trong thăm vi khuẩn *Salmonella*. Các đĩa ΦCJ8 được tạo thành trong các thăm vi khuẩn chứa SE, ST, SG và SP, nhưng không nằm trong thăm vi khuẩn chứa SA, SB, SC và SD.

A: trong thăm vi khuẩn chứa SE;

B: trong thăm vi khuẩn chứa ST;

- C: trong thảm vi khuẩn chứa SG;
- D: trong thảm vi khuẩn chứa SP;
- E: trong thảm vi khuẩn chứa SA;
- F: trong thảm vi khuẩn chứa SB;
- G: trong thảm vi khuẩn chứa SC;
- H: trong thảm vi khuẩn chứa SD.

FIG. 3 thể hiện kết quả SDS-PAGE (natri dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis - điện di trên gel natri đodexyl sulfat polyacrylamit) của thể thực khuẩn ΦCJ8 đã phân lập, trong đó thể hiện các kiểu protein của thể thực khuẩn này, bao gồm protein chính có kích thước 41 kDa, 80 kDa, 15,5 kDa, 60 kDa và 43 kDa (thang BenchMark Protein chưa nhuộm (của Invitrogen) được sử dụng làm chất đánh dấu kích thước);

FIG.4 thể hiện kết quả PFGE (pulse-field gel electrophoresis - điện di trên gel trong trường xung điện) của thể thực khuẩn ΦCJ8 đã phân lập, cho thấy tổng kích thước bộ gen xấp xỉ từ 44,1 kbp đến 49 kbp (với ADN CHEF kích thước chuẩn bằng 5 kbp (Bio-rad) được dùng làm chất đánh dấu kích thước);

FIG. 5 thể hiện kết quả PCR (Polymerase Chain Reaction – Phản ứng chuỗi polymeraza), được tiến hành bằng cách sử dụng mỗi bộ đoạn mồi của ADN bộ gen ΦCJ8.

A: sản phẩm PCR có chiều dài 3,5kbp thu được với bộ đoạn mồi có trình tự nêu trong ID NO: 6 và 7;

B: sản phẩm PCR có chiều dài 2,1kbp thu được với bộ đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8 và 9;

C: sản phẩm PCR có chiều dài 1,6kbp thu được với bộ đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 10 và 11;

D: sản phẩm PCR có chiều dài 1,2kbp thu được với bộ đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12 và 13; và

E: sản phẩm PCR có chiều dài 1,4kbp thu được với bộ đoạn mồi có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 14 và 15

FIG.6 thể hiện kết quả của thử nghiệm về tính chịu axit trên thể thực khuẩn ΦCJ8, cho thấy số thể thực khuẩn sống sót ở độ pH = 2,1, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,5, 6,4, 6,9, 7,4, 8,0, 9,0 và 11,0. Thể thực khuẩn ΦCJ8 này không bị mất hoạt tính ở độ pH lên tới 2,5, nhưng lại mất hoạt tính hoàn toàn ở pH 2,5 hoặc thấp hơn, so với nhóm đối chứng;

FIG.7 thể hiện kết quả của thử nghiệm về tính bền nhiệt trên thể thực khuẩn ΦCJ8, cho thấy số thể thực khuẩn sống sót ở các nhiệt độ 37, 45, 53, 60, 70, 80°C và ở thời điểm 0, 10, 30, 60, 120 phút. Thể thực khuẩn ΦCJ8 này duy

trì được hoạt tính của ở 60°C lên tới 2 giờ, nhưng hoạt tính của nó bị mất hoàn toàn sau khi ủ ở 70°C trong 2 giờ.

FIG. 8 thể hiện kết quả của thử nghiệm về tính bền sấy ở thể thực khuẩn ΦCJ8, được thực hiện ở nhiệt độ 60°C trong 120 phút với sự hỗ trợ của thiết bị cô SpeedVec, trong đó mức thay đổi về chuẩn độ virus trước và sau khi làm khô được so sánh để kiểm tra về độ ổn định tương đối, hoạt tính này giảm khoảng 50 lần.

FIG.9 là sơ đồ trong đó thể trọng của chuột được sau khi dùng đơn liều thể thực khuẩn ΦCJ8 biểu thị bằng đồ thị theo thời gian. Không thấy có sự thay đổi đáng kể nào về thể trọng so với nhóm đối chứng ngay cả 14 ngày sau khi dùng.

■: nhóm chuột đực đối chứng được cho dùng hỗn hợp dung dịch chứa 20 mM Tris-HCl và 2 mM MgCl₂;

□: nhóm chuột đực thử nghiệm được cho dùng ΦCJ8 ở nồng độ 1×10^{12} pfu;

●: nhóm chuột cái đối chứng được cho dùng hỗn hợp dung dịch chứa 20 mM Tris-HCl và 2 mM MgCl₂; và

○: nhóm chuột cái thử nghiệm được cho dùng ΦCJ8 ở nồng độ 1×10^{12} pfu.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất thể thực khuẩn mới có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu với *Salmonella enteritidis* (SE), *Salmonella typhimurium* (ST), *Salmonella gallinarum* (SG), hoặc *Salmonella pullorum* (SP).

Các tác giả sáng chế đã lấy mẫu nước thải ở lò mổ gà, và thể thực khuẩn được phân lập từ đó có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu với SE, ST, SG and SP (xem FIG. 2 và Bảng 1). Từ kết quả kiểm tra hình thái học bằng kính hiển vi điện tử cho thấy thể thực khuẩn theo sáng chế thuộc nhóm hình thái thuộc họ Siphoviridae được đặc trưng bởi cấu trúc hình thái chứa capsit hình khối và đuôi dài, không co rút được (xem FIG. 1).

Thể thực khuẩn theo sáng chế có protein cấu trúc chính có kích thước nằm trong khoảng từ 41, 80, 15,5, 60 đến 43 kDa, đo được bằng phân tích kiểu protein (xem FIG. 3).

Hơn nữa, thể thực khuẩn theo sáng chế thường có tổng kích thước bộ gen xấp xỉ trong khoảng từ 44,1 đến 49 kbp (xem FIG. 4), và có thể chứa một hoặc nhiều phân tử axit nucleic được chọn từ nhóm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: từ 1 đến 5 trong toàn bộ bộ gen. Ngoài ra, từ kết quả so sánh mức tương đồng gen với các loài khác trên cơ sở trình tự nucleotit nêu trên, do mức tương đồng

gen rất thấp giữa thể thực khuẩn theo sáng chế và các thể thực khuẩn đã biết, nên thể thực khuẩn theo sáng chế là mới (xem Bảng 2). Cụ thể hơn, khi thể thực khuẩn theo sáng chế được tiến hành PCR bằng cách sử dụng một hoặc nhiều bộ đoạn mồi được chọn từ nhóm có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 6 và 7, SEQ ID NO: 8 và 9, SEQ ID NO: 10 và 11, SEQ ID NO: 12 và 13, và SEQ ID NO: 14 và 15, sản phẩm PCR thu được lần lượt có kích thước xấp xỉ là 3,5, 2,1, 1,6, 1,2 và 1,4 kbp (xem FIG. 5).

Tương tự như vậy, nhận thấy các mảnh thể thực khuẩn (vùng trong tạo thành trên thảm vi khuẩn chứa các tế bào trên aga mềm do sự tiêu bởi thể thực khuẩn) sẽ làm nhiễm ΦCJ7 vào SE, ST, SG và SP có cùng kích thước và độ đục (FIG.2).

Tương tự như vậy, nhận thấy các mảnh thể thực khuẩn (vùng trong tạo thành trên thảm vi khuẩn chứa các tế bào trên aga mềm do sự tiêu bởi thể thực khuẩn) sẽ làm nhiễm thể thực khuẩn theo sáng chế vào SE, ST, SG và SP có cùng kích thước và độ đục (FIG.2).

Thể thực khuẩn theo sáng chế có đặc tính hóa sinh bền axit và bền nhiệt. Kết quả kiểm tra về độ ổn định trong phổ rộng của pH và nhiệt độ cho thấy thể thực khuẩn theo sáng chế có khả năng sống sót trên khoảng pH từ 3,0 đến 11,0 (xem FIG. 6) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 37 đến 70°C (xem FIG. 7). Ngoài ra, thể thực khuẩn theo sáng chế có tính chịu sấy khô để duy trì ổn định hoạt tính của nó ngay cả sau khi làm khô ở nhiệt độ cao (xem FIG. 8). Các đặc tính chịu axit, bền nhiệt, chịu sấy khô này cho phép ứng dụng thể thực khuẩn theo sáng chế trong các điều kiện nhiệt độ và pH khác nhau trong quá trình điều chế chế phẩm phòng bệnh và chữa bệnh đối với các bệnh của vật nuôi gây ra bởi SE, ST, SG và SP hoặc bệnh của con người gây ra bởi các vật nuôi bị nhiễm bệnh.

Ngoài ra, thể thực khuẩn theo sáng chế có thể gây nhiễm chủng SE, ST, SG và SP kiểu đại (xem Bảng 3).

Khi dùng thể thực khuẩn theo sáng chế cho chuột qua đường miệng, quan sát thấy chuột vẫn giữ được khối lượng, tỷ lệ tử vong, các triệu chứng chung và sự bất thường ở các cơ quan không đổi (FIG.9, Bảng 4, Bảng 5).

Ngoài ra, khi thể thực khuẩn theo sáng chế được dùng làm phụ gia thực phẩm cho gà giò, nó không có tác dụng bất kỳ đến đặc tính sinh trưởng hoặc phát triển của cơ quan và cơ của gà giò (xem các Bảng 6 và 7).

Kết quả của thử nghiệm về hiệu lực, hiệu quả vệ sinh và hiệu quả làm sạch cho thấy rằng khi được dùng ở trang trại vật nuôi, thể thực khuẩn theo sáng chế có thể ngăn ngừa một cách hiệu quả *Salmonella* (SE) bằng cách ức chế mức nhân lên và sự di ngoài của nó (xem các Bảng 8 và 9), và có hoạt tính kháng

khuẩn rất tốt và phù hợp với *Salmonella* trong các điều kiện khác nhau, so với chất làm sạch thông thường được dùng làm chất kiểm chứng âm tính.

Các số liệu này cho rằng thể thực khuẩn theo sáng chế có thể được có thể được đưa dễ dàng vào nhiều sản phẩm khác nhau để phòng trừ vi khuẩn *Salmonella*.

Thể thực khuẩn theo sáng chế có hoạt tính kháng khuẩn đặc hiệu với SE, ST, SG và and SP và các đặc điểm đặc trưng nêu trên được gọi là ΦCJ8 và được lưu giữ tại Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (the Korean Culture Center of Microorganisms (361-221, Honje 1-dong, Seodaemun-gu, Seoul, South Korea) ngày 14 tháng 12 năm 2010 với số truy nhập KCCM11148P.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập tới chế phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi một hoặc nhiều vi khuẩn *Salmonella* được chọn từ nhóm bao gồm *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*, và *Salmonella pullorum*, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này.

Do có hoạt tính kháng khuẩn đặc hiệu với *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*, và *Salmonella pullorum*, nên thể thực khuẩn theo sáng chế có thể được dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh gây ra bởi vi khuẩn. Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế có thể còn chứa chất kháng khuẩn.

Tốt hơn là, ví dụ, các bệnh nhiễm khuẩn bao gồm bệnh phó thương hàn và ngộ độc thực phẩm do nhiễm *Salmonella* gây ra bởi *Salmonella enteritidis* hoặc *Salmonella typhimurium*, bệnh thương hàn gây ra bởi *Salmonella gallinarum* và bệnh bạch lỵ thương hàn gây ra bởi *Salmonella pullorum*, nhưng không chỉ giới hạn bởi các bệnh này.

Khi sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh phó thương hàn” được dùng để chỉ các triệu chứng do nhiễm *Salmonella* gây ra, như sốt, đau đầu, tiêu chảy và nôn. Tức là bệnh phó thương hàn là bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi vi khuẩn thuộc giống *Salmonella*, kèm theo hai triệu chứng điển hình: nhiễm khuẩn máu như sốt thương hàn và viêm dạ dày ruột cấp tính như ngộ độc thức ăn, viêm ruột, và nhiễm trùng máu cấp tính.

Khi được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “ngăn ngừa” có nghĩa là tất cả các tác động trong quá trình tiến triển bệnh được kìm hãm hoặc làm chậm thông qua việc dùng chế phẩm này. Thuật ngữ “điều trị” trong bản mô tả này có nghĩa là tất cả các tác động để cải thiện hoặc biến đổi tình trạng bệnh nhân theo hướng có lợi bằng cách dùng chế phẩm này.

Chế phẩm theo sáng chế chứa thể thực khuẩn theo sáng chế làm hoạt chất với lượng nằm trong khoảng từ 5×10^2 đến 5×10^{12} pfu/ml, và tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 1×10^6 đến 1×10^{10} pfu/ml.

Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa tá dược lỏng được dụng, và có thể được bào chế cùng với chất mang này để tạo thành thực phẩm, thuốc, và các chất phụ gia thực phẩm.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tá dược lỏng được dụng” được dùng để chỉ chất mang hoặc chất pha loãng không gây kích ứng đáng kể cho cơ thể và không làm thoái biến hoạt tính sinh học và các đặc tính của hoạt chất được dụng. Để sử dụng trong quá trình bào chế chế phẩm thành chế phẩm lỏng, tá dược lỏng được dụng phải thích hợp về mặt vô trùng và tương hợp sinh học. Các ví dụ bao gồm nước muối, nước vô trùng, dung dịch Ringer, nước muối sinh lý được đệm, dịch truyền albumin, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol, và etanol. Chúng có thể được sử dụng riêng rẽ hoặc kết hợp với nhau. Nếu cần, có thể bổ sung các chất phụ gia thông thường khác như chất chống oxy hóa, dung dịch đệm, chất kìm khuẩn, v.v. vào chế phẩm. Khi kết hợp thêm chất pha loãng, chất phân tán, chất diện hoạt, tá dược dính và tá dược trơn, chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành chế phẩm dùng để tiêm như dung dịch nước, hỗn dịch, và nhũ tương, hoặc viên tròn, viên nang, thuốc cốm, hoặc viên nén.

Chế phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị theo sáng chế có thể được dụng tại chỗ vào vùng bị bệnh bằng cách bao phủ hoặc phun xịt.

Theo cách khác, chế phẩm theo sáng chế có thể được dụng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hóa. Các dụng ngoài đường tiêu hóa thích hợp là dụng trong tĩnh mạch, trong bụng, bắp, dưới da hoặc dụng tại chỗ.

Tùy thuộc vào nhiều yếu tố khác nhau bao gồm quy trình bào chế, dạng dụng, độ tuổi, cân nặng, giới tính, tình trạng bệnh, và chế độ ăn của bệnh nhân hoặc động vật cần điều trị, thời gian dụng, đường dụng, tốc độ bài tiết, và tính nhạy cảm phản ứng, liều dụng thích hợp của chế phẩm theo sáng chế sẽ thay đổi khi chế phẩm này được cấp, phun xịt hoặc được dụng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết khi nào được phẩm được dụng cho bệnh nhân, tổng liều dụng hằng ngày thích hợp có thể được xác định bởi bác sỹ hoặc bác sỹ thú y được chỉ định thông qua sự đánh giá y học đúng đắn.

Chế phẩm phân liều để dụng qua đường miệng theo sáng chế có thể được bào chế ở các dạng bào chế bao gồm viên nén, viên ngậm det, kẹo ngậm, hỗn dịch nước hoặc hỗn nhũ dịch, thuốc bột hoặc thuốc cốm, nhũ tương, viên nang cứng hoặc mềm, xirô, hoặc cồn thuốc. Dạng phân liều để dụng qua đường miệng

như viên nén và viên nang có thể bao gồm tá dược dính như lactoza, sacaroza, sorbitol, manitol, tinh bột, amylopectin, xenluloza hoặc gelatin, tá dược như đicanxi phosphat, tá dược rã như tinh bột ngô hoặc tinh bột khoai lang, tá dược trơn như magie stearat, canxi stearat, natri stearyl fumarat, hoặc sáp polyetylen glycol. Đối với viên nang, chất mang lỏng như lipit cũng có thể được sử dụng.

Để dùng ngoài đường tiêu hóa, chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành dạng tiêm dưới da, trong tĩnh mạch, hoặc bắp, thuốc đặt, hoặc dạng phun xịt để hít qua đường hô hấp như sol khí. Chế phẩm dùng để tiêm có thể được bào chế bằng cách hòa tan hoặc tạo hỗn dịch chế phẩm theo sáng chế, cùng với chất ổn định hoặc dung dịch đệm, trong nước và đưa dung dịch hoặc hỗn dịch này vào ống tiêm hoặc dạng lọ nhỏ. Đối với dạng phun xịt, như sol khí, chất đẩy để phun dịch đặc hoặc bột nhão để phân tán trong nước có thể được sử dụng kết hợp với chất phụ gia.

Thuật ngữ “thuốc kháng sinh” như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ chất hoặc hợp chất có thể được dùng cho động vật để tiêu diệt vi khuẩn hoặc ức chế sự phát triển của chúng và dự định bao gồm các chất kháng khuẩn, chất diệt khuẩn và chất chống vi khuẩn. Động vật là động vật có vú kể cả người. Do có ưu điểm là tính đặc hiệu cao hơn đối với *Salmonella* so với các kháng sinh thông thường, thể thực khuẩn theo sáng chế có thể tiêu diệt tác nhân gây bệnh cụ thể mà không ảnh hưởng đến các vi khuẩn có lợi. Hơn nữa, thể thực khuẩn theo sáng chế không gây kháng thuốc, vì vậy kháng sinh mới có vòng đời dài.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất thức ăn và nước uống dùng cho động vật, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này.

Thuốc kháng sinh phụ gia thực phẩm sử dụng trong ngành công nghiệp cá và chăn nuôi được dùng nhằm mục đích ngăn ngừa sự nhiễm bệnh. Tuy nhiên, hầu hết các thuốc kháng sinh phụ gia thực phẩm có sẵn hiện nay gặp phải vấn đề là chúng dường như làm xuất hiện các chủng vi khuẩn kháng thuốc, và các thuốc kháng sinh tồn dư trong các sản phẩm từ vật nuôi có thể đi vào người. Sự hấp thu các thuốc kháng sinh tồn dư này có thể làm cho các tác nhân gây bệnh ở người kháng kháng sinh, từ đó gây lây lan bệnh. Ngoài ra, nhiều loại thuốc kháng sinh phụ gia thực phẩm thường được dùng kết hợp với thức ăn chăn nuôi, có thể làm xuất hiện các chủng kháng đa thuốc. Do đó, thể thực khuẩn theo sáng chế có thể được dùng làm thuốc kháng sinh phụ gia thực phẩm đủ thân thiện để giải quyết các vấn đề trên.

Thức ăn dùng cho vật nuôi theo sáng chế có thể được tạo ra riêng rẽ bằng cách bổ sung trực tiếp hoặc dưới dạng chất phụ gia thực phẩm riêng rẽ vào thức

ăn dùng cho vật nuôi. Trong thức ăn cho vật nuôi, thể thực khuẩn theo sáng chế có thể ở dạng lỏng hoặc khô, tốt hơn là ở dạng bột khô. Liên quan tới vấn đề này, thể thực khuẩn theo sáng chế có thể được làm khô sấy khô bằng khí, làm khô tự nhiên, sấy phun, và đông khô, nhưng sáng chế không chỉ giới hạn ở các quy trình làm khô này. Thể thực khuẩn theo sáng chế có thể được bổ sung dưới dạng bột với lượng nằm trong khoảng từ 0,05 đến 10% khối lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2% tổng khối lượng của thức ăn dùng cho vật nuôi. Ngoài thể thực khuẩn theo sáng chế, thức ăn dùng cho vật nuôi có thể còn chứa các chất phụ gia thông thường khác có lợi để bảo quản trong thời gian dài.

Các vi sinh vật khác không phải tác nhân gây bệnh có thể được bổ sung vào chất phụ gia thực phẩm theo sáng chế. Vi sinh vật khác có sẵn có thể được chọn từ nhóm bao gồm *Bacillus subtilis* có thể tạo ra proteaza, lipaza và invertaza, chủng *Lactobacillus* sp. có khả năng sử dụng hoạt tính vật lý và khả năng phân hủy trong điều kiện kỵ khí, như trong dạ dày của gia súc, nấm dạng sợi như *Aspergillus oryzae* (J AnimalSci 43: 910-926, 1976) làm tăng khối lượng gia súc, tăng sản xuất sữa và giúp tiêu hóa và hấp thu thức ăn, và nấm men như *Saccharomyces cerevisiae* (J Anim Sci 56:735-739, 1983).

Thức ăn dùng cho vật nuôi chứa thể thực khuẩn theo sáng chế có thể bao gồm thức ăn trên cơ sở thực vật như thóc, quả hạch, phụ phẩm thực phẩm, tảo biển, sợi, phụ phẩm thuốc, dầu, tinh bột, bột, và phụ phẩm thóc, và thức ăn trên cơ sở động vật như protein, chất khoáng, chất béo, protein đơn bào, động vật nổi, và thức ăn thừa, nhưng không chỉ giới hạn ở các thức ăn này.

Chất phụ gia thực phẩm chứa thể thực khuẩn theo sáng chế này có thể bao gồm các chất phụ gia để ngăn ngừa sự suy giảm chất lượng, như chất kết dính, chất nhũ hóa, và chất bảo quản, và các chất phụ gia để tăng tính hữu dụng, như axit amin, vitamin, enzym, probiotic, chất tạo hương, nitơ không phải protein, silicat, chất đệm, chất màu, dịch chiết, và oligosacarit, nhưng không chỉ giới hạn ở các chất này.

Khi được cung cấp nước uống chứa thể thực khuẩn theo sáng chế, vật nuôi có thể làm giảm liên tục quần thể vi khuẩn *Salmonella* trong ruột vật nuôi. Từ đó thu được vật nuôi không nhiễm *Salmonella*.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chất làm sạch hoặc chất khử trùng, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này.

Chất khử trùng chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo sáng chế rất hữu ích để ngăn ngừa vệ sinh thực phẩm nhiễm độc thực phẩm chẳng hạn. Cụ thể, chất khử trùng có thể được dùng không chỉ là tác nhân hoặc chất phụ gia thực phẩm để ngăn ngừa nhiễm *Salmonella*, mà còn dùng trong chăn nuôi vật nuôi không

nhiễm *Salmonella*. Để tiêu diệt *Salmonella*, chất khử trùng cũng có thể được phun xịt vào nước thải của vật nuôi trong nhà và được dùng trong chuồng gia cầm, lò mổ, khu vực nhiễm bẩn nơi vật nuôi bị chết, khu vực đun nấu và các thiết bị đun nấu, và khu vực bất kỳ có gia cầm hoạt động.

Ngoài ra, chất làm sạch chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo sáng chế có thể được sử dụng trên cơ thể động vật sống như da, lông và các vùng tương tự, đã nhiễm hoặc có khả năng nhiễm vi khuẩn *Salmonella*.

Theo phương án khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi một hoặc nhiều vi khuẩn *Salmonella* được chọn từ nhóm bao gồm *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*, hoặc *Salmonella pullorum*, bằng cách dùng thể thực khuẩn hoặc chế phẩm chứa chúng.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế mô tả phương pháp ngăn ngừa và điều trị các bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi một hoặc nhiều vi khuẩn *Salmonella* được chọn từ nhóm bao gồm *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* and *Salmonella pullorum* bằng cách sử dụng thể thực khuẩn hoặc chế phẩm chứa chúng.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho động vật ở dạng được phẩm hoặc có thể được dùng qua đường miệng dưới dạng hỗn hợp trộn với thức ăn dùng cho vật nuôi hoặc nước uống dùng cho vật nuôi và tốt hơn là dưới dạng hỗn hợp trộn với thức ăn dùng cho vật nuôi. Theo sáng chế, động vật bao gồm gia súc, lợn, gà, gia cầm và người, nhưng không chỉ giới hạn ở các động vật này.

Miễn là đạt tới mô đích, đường dùng bất kỳ, kể cả dùng qua đường miệng hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa, đều có thể áp dụng được đối với chế phẩm theo sáng chế. Cụ thể, chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng qua đường miệng, trực tràng, tại chỗ, trong tĩnh mạch, trong bụng, bắp, trong động mạch, qua da, trong mũi và đường hít.

Phương pháp điều trị bệnh theo sáng chế bao gồm bước dùng lượng hữu hiệu được dụng chế phẩm theo sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần hiểu rằng tổng liều dùng hằng ngày sẽ được xác định bởi bác sĩ điều trị hoặc bác sĩ thú y thông qua sự đánh giá y học đúng đắn. Lượng trị liệu hữu hiệu cho bệnh nhân có thể thay đổi tùy thuộc vào nhiều yếu tố đã biết trong lĩnh vực y học, bao gồm loại và mức độ đáp ứng cần đạt được, độ tuổi của bệnh nhân, thể trọng, tình trạng sức khỏe, giới tính, và chế độ ăn, thời gian dùng và đường dùng, tốc độ bài tiết của chế phẩm, khoảng thời gian điều trị, chế phẩm cụ thể trong đó các chất khác được sử dụng cùng hoặc không, v.v.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế có thể được hiểu rõ hơn thông qua các ví dụ dưới đây, chúng chỉ nhằm mục đích minh họa, và sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ 1: Phân lập thể thực khuẩn *Salmonella*

1-1. Sàng lọc thể thực khuẩn và phân lập thể thực khuẩn đơn

Cho 50ml mỗi mẫu lấy từ lò mổ gà, đặt tại và thực vật loại bỏ nước thải xung quanh gần vào ống ly tâm, và ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó lọc dịch nổi bằng cách sử dụng màng lọc có kích thước lỗ 0,45µm. Trộn 18ml dịch lọc mẫu với 150ul môi trường nuôi cấy lắc *Salmonella enteritidis* (dưới đây được gọi là “SE”) ($OD_{600}=2$) và 2ml môi trường Luria-Bertani 10x (dưới đây gọi là môi trường LB gồm trypton 10g; dịch chiết nấm men 5g; NaCl 10g; trong thể tích cuối cùng 1l). Hỗn hợp này được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ, và sau đó đem ly tâm ở tốc độ 4000vòng/phút trong 10 phút, sau đó dịch nổi được lọc bằng cách sử dụng màng lọc có kích thước lỗ 0,45µm. Trộn riêng rẽ 3ml aga 0,7% (khối lượng/thể tích) và 150ul môi trường nuôi cấy lắc SE ($OD_{600}=2$), và được đổ vào đĩa LB, và để hóa rắn. Trải 10ul dịch nuôi cấy lên đĩa này, và nuôi cấy trong 18 giờ ở nhiệt độ 37°C (aga 0,7% được sử dụng làm “aga đỉnh”, và việc chuẩn độ dịch tan thể thực khuẩn được tiến hành trên aga đỉnh, gọi là kỹ thuật phủ aga mềm).

Dịch pha loãng của môi trường nuôi cấy mẫu chứa dịch tan thể thực khuẩn được trộn với 150ul môi trường nuôi cấy lắc SE ($OD_{600}=2$), tiến hành thử nghiệm phủ aga mềm để tạo ra các mảng đơn. Do mảng đơn chứa cùng một thể thực khuẩn, nên một mảng được lấy ra và hòa tan vào 400ul dung dịch SM (NaCl, 5,8g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2g; Tris-Cl 1M (độ pH=7,5), 50ml; H_2O , trong thể tích cuối cùng 1l), và để trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng để phân lập thể thực khuẩn đơn. Để khuếch đại thể thực khuẩn đã phân lập, 100ul dịch nổi được lấy từ dung dịch thể thực khuẩn đơn, và được trộn với 5 ml aga 0,7% và 100ul môi trường nuôi cấy lắc SE, tiếp theo tiến hành thử nghiệm phủ aga mềm trên đĩa LB (đường kính 90mm). Khi quá trình tiêu hoàn thành, đổ 5ml dung dịch SM vào đĩa, sau đó đĩa này được lắc nhẹ trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng để làm tách thể thực khuẩn khỏi aga đỉnh. Thu hồi dung dịch SM chứa thể thực khuẩn đã tách, và bổ sung cloroform đến 1% thể tích cuối, và trộn kỹ trong 10 phút. Sau khi ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút, dịch nổi thu được được lọc bằng cách sử dụng màng lọc có kích thước lỗ 0,45µm, và bảo quản trong tủ lạnh cho đến khi sử dụng.

1-2. Nuôi cấy thể thực khuẩn ở quy mô lớn

Thể thực khuẩn đã chọn được nuôi cấy với số lượng lớn bằng cách sử dụng SE. SE được nuôi cấy lắc. Sau khi một phần gồm $1,5 \times 10^{10}$ cfu (colony forming unit - đơn vị tạo khuẩn lạc) được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút, các hạt được tái tạo huyền phù trong 4ml dung dịch SM. Thể thực khuẩn gồm $1,5 \times 10^6$ pfu (plaque forming unit – đơn vị tạo mảng) được tiêm vào đó (MOI: multiplicity of infection - hệ số nhiễm=0,0001), sau đó được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 20 phút. Dung dịch này được tiêm vào 150ml môi trường LB trong bình thót cổ, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 5 giờ. Bổ sung chloroform đến lượng tương đương 1% thể tích cuối trước khi lắc dung dịch nuôi cấy trong 20 phút. Bổ sung lần lượt DNaza I và RNaza A đến nồng độ cuối 1ug/ml. Để dung dịch này ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút. Bổ sung lần lượt NaCl và PEG (polyetylen glycol) đến nồng độ cuối 1M và 10% (khối lượng/thể tích), và để ở nhiệt độ 4°C thêm 3 giờ nữa. Ly tâm dung dịch này ở nhiệt độ 4°C và tốc độ 12000 vòng/phút trong 20 phút để loại dịch nổi. Huyền phù chứa các hạt trong 5ml dung dịch SM được để ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút và được trộn kỹ với 4ml chloroform. Sau khi ly tâm ở nhiệt độ 4°C và tốc độ 4000 vòng/phút trong 20 phút, lọc dịch nổi bằng cách sử dụng màng lọc có kích thước lỗ 0,45um, và sử dụng siêu ly tâm gradient nồng độ glyxerol để tinh chế thể thực khuẩn (nồng độ: 40%, 5% glyxerol ở tốc độ 35000 vòng/phút và ở nhiệt độ 4°C trong 1 giờ). Thể thực khuẩn đã tinh chế được gọi là ΦCJ8. Thể thực khuẩn ΦCJ8 được tái tạo huyền phù trong 300μl dung dịch SM, tiếp đó chuẩn độ. Thể thực khuẩn ΦCJ8 được nộp lưu ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (361-221, Honje 1, Seodaemun, Seoul) vào ngày 14 tháng 12 năm 2010 với số truy nhập KCCM11148P.

Ví dụ 2: Thử nghiệm sự nhiễm ΦCJ7 của *Salmonella*

Để phân tích thể thực khuẩn đã chọn về hoạt tính gây tan trên các loài *Salmonella* không phải SE, tiến hành gây nhiễm chéo với các loài *Salmonella* khác. Kết quả là, ΦCJ8 không gây nhiễm SC (*Salmonella choleraesuis*), SD (*Salmonella Derby*), SA (*Salmonella arizonae*), và SB (*Salmonella bongori*), nhưng lại gây nhiễm SE (*Salmonella enteritidis*), ST (*Salmonella typhimurium*), SG (*Salmonella gallinarum*) và SP (*Salmonella pullorum*). Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 1 và được thể hiện trên FIG.2.

Bảng 1

Nhiễm ΦCJ8 vào *Salmonella*

Kiểu huyết thanh	Tên chủng	Sự hình thành mảng	Kiểu huyết thanh	Tên chủng	Sự hình thành mảng
SE	SGSC 038	O	SA	ATCC 12398	X
ST	SGSC 14028	O	SB	ATCC 12397	X
SG	SGSC 2293	O	SC	ATCC 10708	X
SP	SGSC 2295	O	SD	ATCC 2466	O

* ATCC: Trung tâm nguồn sinh học toàn cầu

* SGSC: Trung tâm lưu trữ di truyền *Salmonella*

Ví dụ 3: Hình thái học của thể thực khuẩn ΦCJ8

ΦCJ8 đã tinh chế được pha loãng trong dung dịch gelatin 0,01%, và sau đó được cố định trong dung dịch glutaraldehyt 2,5%. Mẫu được nhỏ lên đĩa mica đã phủ cacbon (khoảng 2,5x2,5 mm), để thích nghi trong 10 phút, và được rửa bằng nước cất vô trùng. Màng cacbon được gắn trên lưới đồng, và nhuộm bằng uranyl axetat 2% trong 3-5 giây, và được sấy. Tiến hành kiểm tra dưới kính hiển vi điện tử truyền qua (LIBRA 120, kính hiển vi điện tử truyền qua Carl Zeiss, 80kV, độ phóng đại nằm trong khoảng từ 120.000 đến 200.000 lần), đã cho thấy ΦCJ8 đã tinh chế có đặc điểm hình thái học có capsit hình khối và đuôi dài không co rút được, chứng tỏ rằng nó thuộc kiểu hình thái của họ Siphoviridae.

Ví dụ 4: Phân tích kiểu protein của ΦCJ8

15ul dung dịch ΦCJ8 đã tinh chế có độ chuẩn 10^{12} pfu/ml được trộn với 3ul dung dịch mẫu 5X SDS, và được làm nóng trong 5 phút. Protein toàn phần của ΦCJ8 được cho chạy trên gel SDS-PAGE 15%. Sau đó, gel này được nhuộm bằng xanh coomassie trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Các dải chính được phát hiện ở các kích thước xấp xỉ 41 kDa, 80 kDa, 15,5 kDa, 60 kDa và 43 kDa, như được thể hiện trên FIG. 3.

Ví dụ 5: Tổng kích thước ADN bộ gen của ΦCJ8

ADN bộ gen của ΦCJ8 được phân lập bằng cách sử dụng phương pháp siêu ly tâm. Liên quan tới vấn đề này, bổ sung EDTA (axit etylenđiamintetraaxetic (độ pH=8,0)) vào môi trường nuôi cấy ΦCJ8 đã tinh chế, proteinaza K, và SDS (natri đodecyl sulfat) đến nồng độ cuối lần lượt bằng 20mM, 50ug/ml, và 0,5% (khối lượng/thể tích) và sau đó ủ ở nhiệt độ 50°C trong

1 giờ. Bổ sung thể tích phenol tương đương (độ pH=8,0) và trộn kỹ. Sau khi ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút và ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút, dịch nổi được trộn kỹ với thể tích PC tương đương (phenol:chloroform=1:1). Ly tâm tiếp ở tốc độ 12000 vòng/phút và ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút để tạo ra dịch nổi, sau đó dịch nổi này được trộn với 1/10 thể tích natri axetat 3M và hai lượng thể tích etanol lạnh 95%, và để ở -20°C trong 1 giờ. Sau khi ly tâm ở 0°C và ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 10 phút, nhờ đó dịch nổi này được loại bỏ hoàn toàn. Hạt ADN được hòa tan trong 50ul TE (Tris-EDTA (độ pH=8,0)). Pha loãng ADN đã chiết 10 lần, và đo hệ số hấp thụ ở OD₂₆₀ để xác định nồng độ của nó. Nạp 1ug ADN bộ gen tổng cộng vào gel agarosa PFGE (pulse-field gel electrophoresis - điện di trên gel trong trường xung điện) 1%, tiến hành điện di ở nhiệt độ trong phòng trong 20 giờ với sự hỗ trợ của chương trình hệ thống BIORAD PFGE 7 (kích thước nằm trong khoảng từ 25 đến 100 kbp; thời gian chuyển 0,4-2,0 giây, dạng quét tuyến tính; điện áp thuận 180V; điện áp nghịch 120V). Như được thể hiện trên FIG.4, ΦCJ8 có kích thước ADN bộ gen xấp xỉ trong khoảng từ 44,1 đến 49 kb.

Ví dụ 6: Phân tích đặc điểm di truyền của ΦCJ8

Việc phân tích đặc điểm di truyền của ΦCJ8 đã tinh chế được bắt đầu bằng cách phân cắt kép 5ug ADN bộ gen của ΦCJ8 bằng ba enzym giới hạn *Sall* and *XhoI*, *EcoRV* and *NruI*, *HincII* and *PvuII*. Một cách riêng biệt, vật truyền pBluscript II SK(+) được phân cắt bằng *EcoRV*, và được xử lý bằng CIP (calf intestinal alkaline phosphatase - phosphatase kiềm ruột bê). ADN bộ gen đã phân cắt được trộn với vật truyền này theo tỷ lệ 3:1, và được gắn ở nhiệt độ 16°C trong 2 giờ. Vật truyền tái tổ hợp thu được được chuyển vào *E.coli* DH5α, sau đó được đặt vào đĩa LB chứa spexinomycin hoặc kanamycin và X-gal (5-bromo-4-clo-3-indolyl-beta-D-galactopyranosit) để chọn lọc xanh/trắng. Các khuẩn lạc đã chọn được nuôi cấy trong 16 giờ trong môi trường nuôi cấy chứa kháng sinh, đồng thời lắc. Sau đó, chiết các plasmit bằng cách sử dụng kit tinh chế plasmit (Promega).

Việc tách dòng plasmit được xác định bằng PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn môi chứa M13 ngược và xuôi (các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 16 và 17), và việc chọn lọc chỉ được tiến hành đối với các mảnh cài xen có kích thước 1 kbp hoặc lớn hơn. Các plasmit đã được chọn được phân tích trình tự bằng cách sử dụng các bộ đoạn môi nêu trên. Trình tự bazơ thu được như vậy được nêu trong các SEQ ID NO. 1 đến 5, mỗi trình tự này có kích thước từ 1 đến 4 kbp, và

được phân tích mức độ tương đồng về trình tự với sự hỗ trợ của chương trình NCBI blastx, và các kết quả được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

Mức độ tương đồng trình tự giữa ΦCJ8 và các thể thực khuẩn khác

Số	Sinh vật	Protein	Blastx			
			Nghi ngờ	Chủ thể	Tỷ lệ tương đồng	Giá trị e
1	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> SETP3	protein giả thuyết	1-672	6-516	183/224 (81%)	1e-97
	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> KS7	protein giả thuyết	1-675	6-230	181/225 (80%)	3e-96
	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> KS7	protein cấu trúc	651-211	345-491	116/147 (78%)	2e-57
	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> SETP3	protein cấu trúc giả định	651-235	345-481	92/139 (66%)	1e-47
	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> SETP3	amidaza	1-171	159-215	55/57 (96%)	6e-24
	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> E1	protein giả thuyết	1-171	160-216	53/57 (92%)	1e-22
2	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> SETP3	ADN polymeraza	524-3	258-431	141/174 (81%)	3e-73
	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> KS7	protein giả thuyết	524-3	258-431	141/174 (81%)	3e-73
	Enterobacteria phage SSL-2009a	ADN polymeraza I	524-48	259-438	104/195 (53%)	2e-48
3	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> SETP3	protein giả thuyết	3-440	36-181	144/146 (98%)	9e-69
	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> KS7	protein giả thuyết	3-440	23-168	144/146 (98%)	1e-68
	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> KS7	protein giả thuyết	555-1	180-364	175/185 (94%)	4e-95
	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> SETP3	protein giả thuyết	558-1	179-364	172/186 (92%)	2e-94
4	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> KS7	protein cấu trúc	3-917	162-466	300/305 (98%)	3e-174
	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> SETP3	protein cấu trúc giả định	3-194	162-465	285/304 (93%)	2e-174

5	Thế thực khuẩn <i>Salmonella</i> KS7	protein cấu trúc	915-253	272-491	189/221 (85%)	3e-94
	Thế thực khuẩn <i>Salmonella</i> SETP3	protein cấu trúc giả định	915-277	272-481	164/213 (76%)	4e-83
	Thế thực khuẩn <i>Salmonella</i> SETP3	helicaza giả định	2-811	384-653	258/270 (95%)	1e-131
	Thế thực khuẩn <i>Salmonella</i> KS7	protein giả thiết	2-811	37-306	259/270 (95%)	2e-130
	Thế thực khuẩn <i>Salmonella</i> SETP3	helicaza giả định	904-197	588-821	216/236 (91%)	6e-109
	Thế thực khuẩn <i>Salmonella</i> KS7	Protein giả thiết	904-197	241-474	213/236 (90%)	8e-108

Ví dụ 7: Phân tích PCR bằng cách sử dụng đoạn môi đặc hiệu với ΦCJ8

Để nhận diện ΦCJ8, tiến hành xác định cấu trúc đoạn môi đặc hiệu với ΦCJ8 dựa trên cơ sở các trình tự nêu trong SEQ ID NO. từ 1 đến 5. Tiến hành PCR bằng cách sử dụng mỗi bộ đoạn môi của các trình tự nêu trong SEQ ID NO. 6 và 7, SEQ ID NO. 8 và 9, SEQ ID NO. 10 và 11 và SEQ ID NO. 12 và 13. Bổ sung 0,1μg ADN bộ gen của thế thực khuẩn và 0,5pmol mỗi đoạn môi vào hỗn hợp đã trộn trước (Bioneer), và điều chỉnh thể tích cuối cùng đến 20ul. Tiến hành PCR với 35 chu kỳ biến tính; 94°C 1 phút, gắn môi; 52°C 1 phút, và polyme hóa; 72°C trong 1 phút sau khi làm biến tính ban đầu ở 94°C trong 10 phút, tiếp đó là phóng đại cuối ở 72°C trong 10 phút. Do đó, các sản phẩm PCR thu được như vậy có chiều dài lần lượt xấp xỉ là 3,5, 2,1, 1,6, 1,2 và 1,4 kbp. Các kết quả được thể hiện trên FIG. 5.

Ví dụ 8: Độ bền pH của ΦCJ8

Để xác định xem ΦCJ8 có tồn tại trong môi trường có độ pH thấp như dạ dày gà hay không, tiến hành thử nghiệm về độ ổn định của ΦCJ8 trong khoảng pH rộng (độ pH=2,1, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,5, 6,4, 6,9, 7,4, 8,2, 9,0, 9,8 và 11,0). Điều chế các dung dịch có độ pH khác nhau (dung dịch đệm natri axetat (độ pH=2,1, pH=4,0, pH=5,5 và pH=6,4)), dung dịch đệm natri xitrat (độ pH=2,5, pH=3,0, pH=3,5), dung dịch đệm natri phosphat (độ pH=6,9 và pH=7,4), Tris-HCl (độ pH=8,2, pH=9,0 và pH=11,0)) ở nồng độ 2M. Trộn 180ul mỗi dung dịch pH với 20ul dung dịch thế thực khuẩn ($1,0 \times 10^{11}$ pfu/ml), sau đó ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng này được pha loãng theo chuỗi, và nuôi cấy 10ul mỗi dịch pha loãng ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ bằng phương

pháp phủ aga mềm, và tiến hành đo độ chuẩn của dịch tan thể thực khuẩn. So sánh sự thay đổi về độ chuẩn theo các giá trị pH khác nhau để đánh giá độ ổn định tương đối. Kết quả cho thấy rằng thể thực khuẩn không bị mất hoạt tính và duy trì được độ ổn định đến pH=3,0. Tuy nhiên, nó bị mất hoạt tính ở pH=2,5 hoặc thấp hơn. Các kết quả được thể hiện trên FIG..6.

Ví dụ 9: Độ bền nhiệt của ΦCJ8

Để đánh giá độ ổn định nhiệt phát sinh trong quá trình chế biến khi được sử dụng làm chất phụ gia thực phẩm, thực hiện thử nghiệm sau. 200ul dung dịch ΦCJ8 với độ chuẩn là $1,0 \times 10^{11}$ pfu/ml được ủ ở các nhiệt độ 37°C, 45°C, 53°C, 60°C, 70°C, và 80°C trong thời gian lần lượt là 0 phút, 10 phút, 30 phút, 60 phút, và 120 phút. Dung dịch này được pha loãng theo chuỗi, và nuôi cấy 10μl mỗi dịch pha loãng ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ aga mềm để xác định độ chuẩn của dịch tan thể thực khuẩn. So sánh sự thay đổi về độ chuẩn theo nhiệt độ và thời gian phơi nhiễm để xác định độ ổn định tương đối. Các kết quả cho thấy rằng thể thực khuẩn không bị mất hoạt tính ở nhiệt độ 60°C trong 2 giờ. Tuy nhiên, thể thực khuẩn bị mất hoạt tính một cách nhanh chóng ở 80°C trong 10 phút hoặc lâu hơn. Các kết quả được thể hiện trên FIG.7.

Ví dụ 10: Khả năng chịu sấy khô của ΦCJ8

Để đánh giá độ ổn định nhiệt của thể thực khuẩn trong điều kiện khô trong quá trình chế biến khi được sử dụng làm chất phụ gia thực phẩm, thực hiện thử nghiệm sau. Trên cơ sở kết quả của thử nghiệm độ bền nhiệt, thử nghiệm được thực hiện trong điều kiện làm khô ở nhiệt độ cao (ở 60°C trong thời gian 120 phút). 200ul dung dịch ΦCJ8 ($6,0 \times 10^{11}$ pfu/ml) được làm khô bằng cách sử dụng thiết bị chân không Speed (thiết bị cô chân không tốc độ cao 5301, Eppendorf). Viên tròn nổi thu được được tái tạo huyền phù hoàn toàn trong 200μl dung dịch SM ở 4°C trong 1 ngày. Dung dịch này được pha loãng theo chuỗi, và nuôi cấy 10μl mỗi dịch pha loãng ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ aga mềm để xác định độ chuẩn của dịch tan thể thực khuẩn. So sánh sự thay đổi về độ chuẩn trước và sau khi làm khô được so sánh để xác định độ ổn định. Các kết quả cho thấy rằng hoạt tính của thể thực khuẩn bị giảm khoảng 50 lần. Các kết quả được thể hiện trên FIG.8.

Ví dụ 11: Kiểm tra phổ của các chủng *Salmonella* kiểu đại nhiễm thể thực khuẩn

Ngoài SE (SCSG SE2282), ST (ATCC ST14028), SG (SGSC SG2293) và SP (SGSC SP2295), hoạt tính gây tan của ΦCJ8 được đánh giá đối với SE (49

chủng), ST (25 chủng), SG (53 chủng), SP (19 chủng), SC (7 chủng) và SD (3 chủng) kiểu đại Hàn Quốc, thu được từ Phòng thí nghiệm bệnh gia cầm, Ban thuốc thú y, Đại học quốc gia Seoul, và Trung tâm Nghiên cứu và Đánh giá quốc gia Thú y và Trung tâm phòng trừ và ngăn ngừa bệnh Hàn Quốc (Laboratory of Avian Diseases, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, and National Veterinary Research and Quarantine Service and the Korea Centers for Disease Control and Prevention).

Trộn 150 μ l môi trường nuôi cấy lacc mỗi chủng ($OD_{600}=2$), và nuôi cấy 10 μ l dung dịch Φ CJ8 (10^{10} pfu/ml) ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ aga mềm để kiểm tra sự hình thành mảng. Đã phát hiện ra rằng thể thực khuẩn Φ CJ8 có hoạt tính gây tan bằng 95% đối với tất cả các chủng SE, ST, SG và SP. Các kết quả được thể hiện ở Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3

Hoạt tính gây tan của Φ CJ8 đối với các chủng kiểu đại Hàn Quốc
SE, ST, SG, và SP

Dạng huyết thanh	Tên chủng	Φ CJ8	Dạng huyết thanh	Tên chủng	Φ CJ8
		Hình thành mảng			Hình thành mảng
		I			
SG	SNU SG1	0		SIGSC SE2282	0
	SNU SW	0		SGSC SE2377	0
	SNU SG3	0		PT4 51400194	0
	SNU SG4	0		PT4 LA52	0
	SNU SG5	0		NVRQS SE004	0
	SNU SG6	0		NVRQS SE005	0
	SNU SG7	0		KCDC SENS	0
	SNU SG8	0		KCDC SE009	0
	SNU SG9	0		KCDC SE010	0
	SNU SG10	0		KCDC SE011	0
	SNU SG11	X		KCDC SE012	0
	SNU SG12	0	SE	KCDC SE013	0
	SNU S13	0		KCDC SE014	0
	SNU SG14	0		KCDC SE015	0
	SNU SG15	0		KCDC SE016	0
	SNU SG16	0		KCDC SE017	0

	SNU SG17	0		KCDC SE018	0
	SNU SG18	0		KCDC SE019	0
	SNU SG19	0		KCDC SE020	0
	SNU SG20	0		KCDC SE021	0
	SNU SG21	0		KCDC SE022	0
	SNU SG22	0		KCDC SE023	0
	SNU SG23	0		KCDC SE024	0

	SNU SG24	0		KCDC SE025	0
	SNU SG25	0		KCDC SE026	0
	SNU SG26	0		KCDC SE027	0
	SNU SG27	0		KCDC SE028	0
	SNU SG28	0		KCDC SE029	0
	SNU SG30	0		KCDC SE030	0
	SNU SG31	0		KCDC SE031	0
	SNU SG32	0		KCDC SE032	0
	SNU SG33	0		KCDC SE033	0
	SNU SG34	0		KCDC SE034	0
	SNU SG36	0		KCDC SE035	0
	SNU SG37	0		KCDC SE036	0
	SNU SG38	0		KCDC SE037	0
	SNU SG39	0		KCDC SE038	0
	SNU SG40	0		KCDC SE039	0
	SNU SG41	0		KCDC SE040	0
	SNU SG42	0		KCDC SE041	0
	SNU SG43	X		KCDC SE042	0
	SNU SG44	0		KCDC SE043	0
	SNU SG45	X		KCDC SE044	0
	SNU SG46	0		KCDC SE045	0
	SNU SG47	X		KCDC SE046	0
	SNU SG48	0		KCDC SE047	0
	SNU SG49	0		KCDC SE048	0
	SNU SG50	0		KCDC SE049	0
	SGSCSG9184	0		KCDC SE050	0
	SGSCSG2292	0	ST	SNU ST1	0
	SGSC SG2293	0		SNU ST2	0
	SGSC SG2744	0		SNU ST3	0

	SGSC SG2296	0		SNU ST4	0
SP	SNU SP1	0		SNU ST7	0
	SNU SP4	0		SNU ST8	0
	SNU SP5	0		SNU ST11	0
	SNU SP8	0		SNU ST12	0
	SNU SP 11	0		SNU ST13	0
	SGSC SP2294	0		SNU ST14	0
	SGSC SP2295	0		SNU ST17	0
	SGSC SP2737	X		SNU ST18	X
	SGSC SP2739	0		SNU ST19	X
	SGSC SP2742	0		SNU ST20	0
	SGSC SP2743	0		SNU ST25	0
	SGSC SP2745	0		SNU ST26	0
	SGSC SP2751	0		SNU ST37	0
	SGSC SP4663	0		SNU ST38	0
	SGSC SP4664	0		SNU ST41	0
	SGSC SP4665	0		SNU ST42	0
	SGSC SP4666	0		ATCC UK1	0
	SGSC SP4667	0		ATCC 14028S	0
	SGSC SA1684	0		SGSC	0
SC	ATCC SC10708	X		SGSC STM260	0
	ATCC SC2929	X		STM SGSC SA2197	0
	ATCC SC2930	0		ATCC SD2466	0
	ATCC SC2931	X	SD	ATCC SD2467	X
	ATCC SC2932	0		ATCC SD2468	0
	ATCC SC2933	0	SA	ATCC 12398	X
	ATCC SC2425	0	SB	ATCC 12397	X

* SNU: Phòng thí nghiệm bệnh gia cầm, Ban thuốc thú y, Đại học quốc gia Seoul

* SGSC: Trung tâm lưu trữ di truyền *Salmonella*

* NVRQS: Cục nghiên cứu & kiểm dịch thú y quốc gia

* KCDC : Trung tâm phòng trừ và ngăn ngừa bệnh Hàn Quốc

Ví dụ 12: Thử nghiệm độc tính của thể thực khuẩn

Để sử dụng an toàn trong ngăn ngừa bệnh phó thương hàn, ngộ độc thực phẩm do nhiễm *Salmonella*, bệnh thương hàn và bệnh bạch ly thương hàn, thể thực khuẩn được thử nghiệm độc tính *in vivo*. Thử nghiệm độc tính được tiến hành với các liều riêng rẽ dùng qua đường miệng. Trong thử nghiệm này, chuột được cho dùng qua đường miệng liều riêng rẽ chứa ΦCJ8 và được kiểm tra về độc tính cấp tính để xác định nồng độ gây chết xấp xỉ của ΦCJ8. Để đạt được mục đích này, trước tiên, chuột đực và chuột cái (SD) không chứa tác nhân gây bệnh đặc hiệu (specific-pathogen free - SPF) 7 tuần tuổi, mỗi nhóm 10 con, được

để cho đói trong 24 giờ trước khi dùng ΦCJ8. Vào ngày dùng thể thực khuẩn, 5 con chuột đực và 5 con chuột cái được cho dùng ΦCJ8 qua đường miệng với liều dùng là 1×10^{13} pfu/ml, đồng thời 5 con thuộc nhóm đối chứng được cho dùng hỗn hợp 20mM Tris-HCl và 2mM MgCl₂ qua đường miệng, sau 4 giờ sau khi bắt đầu cung cấp lại thức ăn cho chuột. 4 giờ kiểm tra một lần, bắt đầu từ 30 phút sau khi dùng vào ngày dùng thể thực khuẩn. Sau 14 ngày, các dấu hiệu lâm sàng được kiểm tra và ghi lại 1 lần/ngày. Kết quả là, không có con nào bị chết, không quan sát được các dấu hiệu lâm sàng do ΦCJ8 gây ra. Kết quả được thể hiện trong các Bảng từ 4 đến 6 dưới đây. Sự thay đổi về thể trọng được đo và ghi lại trước và sau khi dùng 1, 3, 7, 10 và 14 ngày. Như được thể hiện trên FIG.9, không thấy có sự thay đổi về thể trọng so với nhóm kiểm chứng. Kết quả đã cho thấy ΦCJ8 không gây ra phản ứng độc tính đủ để làm giảm sự thèm ăn hoặc để thay đổi thể trọng. Ngoài ra, cũng nhận thấy không có triệu chứng bất thường đáng chú ý ở cơ quan bất kỳ như được kiểm tra bằng cách khám nghiệm và bằng mắt thường. Do đó, thể thực khuẩn ΦCJ8 theo sáng chế là không độc.

Bảng 4

Tỷ lệ chết sau khi dùng ΦCJ8 qua đường miệng

Giới tính	Liều dùng (pfu)	Ngày sau khi xử lý														Số lượng chết/Số lượng đã dùng liều
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Đực	Kiểm chứng	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	10^{13}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Cái	Kiểm chứng	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	10^{13}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

Bảng 5

Các dấu hiệu lâm sàng sau khi dùng ΦCJ8 qua đường miệng

Giới tính	Liều dùng (pfu)	Tỷ lệ chết cuối cùng		Các dấu hiệu lâm sàng	
		Đực	Cái	Đực	Cái
Đực	Kiểm chứng	0/5	0/5	0/5	0/5
	10^{13}	0/5	0/5	0/5	0/5
Cái	Kiểm chứng	0/5	0/5	0/5	0/5
	10^{13}	0/5	0/5	0/5	0/5

Bảng 6

Triệu chứng bất thường ở cơ quan sau khi dùng ΦCJ8 qua đường miệng

Giới tính	Liều dùng (pfu)	Nhận thấy rõ ràng	Tần suất ^A
Đực	Kiểm chứng	không phát hiện thấy triệu chứng bất thường	5/5
	10 ¹³	không phát hiện thấy triệu chứng bất thường	5/5
Cái	Kiểm chứng	không phát hiện thấy triệu chứng bất thường	5/5
	10 ¹³	không phát hiện thấy triệu chứng bất thường	5/5

^A Số con chuột có có dấu hiệu lâm sàng được kiểm tra.

Ví dụ 13: Hiệu lực của ΦCJ8 khi dùng làm chất phụ gia thức ăn

Để kiểm tra độ an toàn và hiệu quả ngăn ngừa của ΦCJ8 trên *Salmonella* khi sử dụng làm chất phụ gia thức ăn, đặc tính sinh trưởng và khối lượng tương đối của cơ được đo. Trong thử nghiệm này, tổng số 320 gà giò đực Ross, 2 ngày tuổi (thể trọng trung bình là 41,4 g) được sử dụng trong 5 tuần thử nghiệm cho ăn. Chúng được chia thành 4 nhóm xử lý (Kiểm chứng: chế độ ăn cơ bản, BP-1: chế độ ăn cơ bản + ΦCJ8 0,05%, BP-2: chế độ ăn cơ bản + ΦCJ8 0,10%, BP-3: chế độ ăn cơ bản + ΦCJ8 0,20%) với 8 nhóm giống nhau và 10 con gà trong mỗi chuồng trong thiết kế khối hoàn chỉnh ngẫu nhiên (RCB). At this time, ΦCJ8 có độ chuẩn là 10⁹ pfu/g. Thử nghiệm sau được thực hiện với chế độ ăn trên cơ sở ngô tương và hai chương trình ăn hai pha được sử dụng. Trong pha I, chế độ ăn chứa 23,0% protein thô và 1,19% lysin được cung cấp trong 2 tuần. Trong pha II, chế độ ăn chứa 21,0% protein thô và 1,05% lysin được cung cấp trong 3 tuần cuối. Tất cả các chất dinh dưỡng khác đều đáp ứng hoặc vượt mức yêu cầu theo chuẩn thức ăn của gia cầm của Hàn Quốc (2007).

Kết quả là, việc bổ sung ΦCJ8 vào thức ăn của gà giò trong suốt 5 tuần thử nghiệm nuôi lớn đã không gây ra tác động bất lợi bất kỳ đến đặc tính sinh trưởng của gà giò (Bảng 7). Không có sự sai khác đáng kể về khối lượng tương đối của cơ quan như gan, lá lách, chất béo ở bụng, cơ vú, và cơ chân, và các cơ giữa các nhóm xử lý (Bảng 8). Các kết quả này đã chỉ ra rằng việc bổ sung ΦCJ8 không gây ra tác động bất lợi bất kỳ đến đặc tính sinh trưởng hoặc phát triển của cơ quan và cơ ở gà giò ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,05 đến 0,2%. Việc bổ

sung ΦCJ8 liên tục trong 5 tuần từ breeding to shipment of broiler chicks không gây ra tác động bất lợi bất kỳ đến đặc tính sinh trưởng hoặc phát triển của cơ quan và cơ ở gà giò, khẳng định độ an toàn của ΦCJ8. Các kết quả này đã cho thấy rằng ngộ độc thực phẩm gây ra bởi *Salmonella enteritidis* có thể được ngăn ngừa cho người sử dụng gà khi ăn thức ăn có bổ sung ΦCJ8 do bởi hoạt tính kháng khuẩn đặc hiệu của nó với nguồn bệnh.

Bảng 7

Hiệu quả của thức ăn được bổ sung ΦCJ8 đến đặc tính sinh trưởng của gà giò

Tiêu chuẩn	Xử lý ^A				SEM ^B
	CON	BP-1	BP-2	BP-3	
Khối lượng gan (g/con gà)					
Ban đầu	41,4	41,4	41,4	41,4	0,03
2 tuần	382,1	369,6	379,6	375,6	2,68
5 tuần	1,988,40	1,959,00	1,999,90	1,991,10	10,64
Khối lượng BW (g/con gà)					
0-2 tuần	340,7	328,2	338,4	334,3	2,69
2-5 tuần	1,606,30	1,589,50	1,620,30	1,615,50	9,28
0-5 tuần	1,947,00	1,917,70	1,958,60	1,949,70	10,64
Mức hấp thụ thức ăn (g/con gà)					
0-2 tuần	483,7	471,7	476,4	481,9	2,73
2-5 tuần	2,727,30	2,740,70	2,789,60	2,728,90	20,35
0-5 tuần	3,210,90	3,212,40	3,266,00	3,210,70	21,69
FCR (tỷ lệ F/G)					
0-2 tuần	1,42	1,44	1,41	1,45	0,01
2-5 tuần	1,7	1,73	1,72	1,69	0,01
0-5 tuần	1,65	1,68	1,67	1,65	0,01

^A Kiểm chứng (chế độ ăn cơ bản), BP-1 (chế độ ăn cơ bản+ ΦCJ8 0,05%), BP-2 (chế độ ăn cơ bản+ ΦCJ8 0,10%), BP-3 (chế độ ăn cơ bản+ ΦCJ8 0,20%).

^B Sai số trung bình chuẩn

Bảng 8

Hiệu quả của thức ăn được bổ sung ΦCJ8 đến khối lượng tương đối của cơ quan và cơ của gà giò

Tiêu chuẩn	Xử lý ^A				SEM ^B
	CON	BP-1	BP-2	BP-3	
Gan, g/100g BW	1,88	1,93	1,77	1,79	0,16
Lá lách, g/100g BW	0,08	0,08	0,08	0,07	0,01
Chất béo ở bụng, g/100g BW	2,23	2,22	2,31	2,15	0,14
Cơ vú, g/100g BW	7,8	7,64	7,57	7	0,23
Cơ chân, g/100g BW	9,31	9,43	9,44	9,47	0,09

^A Kiểm chứng (chế độ ăn cơ bản), BP-1 (chế độ ăn cơ bản+ ΦCJ8 0,05%), BP-2 (chế độ ăn cơ bản+ ΦCJ8 0,10%), BP-3 (chế độ ăn cơ bản+ ΦCJ8 0,20%).

^B Sai số trung bình chuẩn

Ví dụ 14: Hiệu quả ức chế của ΦCJ8 với mức nhân lên của SE và đi ngoài

Để kiểm tra khả năng ngăn ngừa và điều trị *Salmonella* của ΦCJ8, tiến hành đánh giá hiệu quả ức chế của nó. Thử nghiệm hiệu lực được thực hiện với 270 gà bố mẹ trong trang trại gia cầm trong điều kiện kiểm soát nghiêm ngặt *Salmonella*. Các con gà đẻ trứng 270 ngày tuổi được chia thành ba nhóm xử lý và nhóm kiểm chứng dương tính (60 con gà trong mỗi nhóm), và nhóm kiểm chứng âm tính (30 con gà), và mỗi nhóm được nuôi riêng rẽ.

Ba nhóm xử lý ΦCJ8 được dùng thức ăn chứa ΦCJ8 ở lần lượt các nồng độ 10^5 , 10^7 và 10^9 pfu/kg, và các nhóm âm tính và dương tính được cho ăn thức ăn bình thường. Trong số 60 con gà của mỗi nhóm xử lý, 30 con gà được gây nhiễm qua đường miệng SE (*Salmonella enteritidis*: 5×10^7 CFU/con gà) ("nhóm gây nhiễm"), và 30 con gà còn lại được nuôi với nhóm xử lý được gây nhiễm bằng SE ("nhóm được gây nhiễm do tiếp xúc"). Ở các ngày thứ 7, 14, và 21 sau khi gây nhiễm bằng SE, SE được phân lập từ phân ở ruột tịt của 10 con gà của nhóm gây nhiễm và nhóm được gây nhiễm do tiếp xúc và tiến hành phân tích định lượng. Ở các ngày thứ 7, 14, và 21 sau khi gây nhiễm bằng SE, các mẫu được thu gom từ của ra vào, sán, và thiết bị thông hơi trong chuồng gà của nhóm xử lý và nhóm kiểm chứng, và phân lập định lượng *Salmonella* so với nhau.

Ở các ngày thứ 7, 14, và 21 sau khi gây nhiễm bằng SE, quan sát được việc giảm *Salmonella* trong ruột ở nhóm gây nhiễm được dùng ΦCJ8 ở nồng độ 10^7 và 10^9 pfu/kg và nhóm được gây nhiễm do tiếp xúc so với nhóm kiểm chứng dương tính. Nhóm xử lý được dùng ΦCJ8 với nồng độ 10^7 và 10^9 pfu/kg có mức ô nhiễm môi trường bởi SE giảm so với các nhóm không được xử lý, cho thấy thể thực khuẩn ΦCJ8 theo sáng chế có khả năng bài tiết SE ra môi trường. Việc dùng ΦCJ8 cũng ức chế sự tăng sinh của SE trong ruột của nhóm gây nhiễm,

dẫn đến làm giảm khả năng bài tiết của SE ra môi trường, do đó dẫn đến việc ức chế sự nhân lên của SE vào nhóm được gây nhiễm do tiếp xúc được nuôi trong đó. Kết quả được thể hiện trong các Bảng 9 và 10.

Bảng 9

Hiệu quả ức chế của chất phụ gia thức ăn ΦCJ8 đối với sự nhân lên của SE

	Các nhóm tham gia	Số lượng	Phân tích định lượng SE đã phân lập từ phân ở ruột tịt sau khi gây nhiễm qua đường miệng bằng SE (CFU/g) ^A		
			7dpc ^B	14dpc	21dpc
Nồng độ xử lý (10 ⁹ pfu/kg) ^C	Nhóm gây nhiễm ^D	30	3,41E+05	3,06E+05	2,68E+04
	Nhóm được gây nhiễm do tiếp xúc ^E	30	3,00E+04	2,90E+04	1,41E+04
Nồng độ xử lý (10 ⁷ pfu/kg)	Nhóm gây nhiễm	30	5,03E+05	1,58E+06	7,21E+04
	Nhóm được gây nhiễm do tiếp xúc	30	1,68E+04	8,19E+05	4,73E+04
Nồng độ xử lý (10 ⁵ pfu/kg)	Nhóm gây nhiễm	30	3,58E+05	3,18E+06	1,27E+05
	Nhóm được gây nhiễm do tiếp xúc	30	1,41E+05	1,47E+06	5,08E+05
Không xử lý ^F	Nhóm gây nhiễm	30	2,48E+06	3,55E+06	6,23E+05
	Nhóm được gây nhiễm do tiếp xúc	30	1,62E+05	1,75E+06	5,01E+05
Kiểm chứng âm tính ^G		30	0	0	0

^A Phân lập định lượng *Salmonella* từ phân ở ruột tịt trong 3 tuần sau khi gây nhiễm qua đường miệng SE

^B Ngày sau khi gây nhiễm

^C Nhóm được dùng ΦCJ8 làm chất phụ gia thức ăn

^D Nhóm gây nhiễm được gây nhiễm qua đường miệng bằng SE

^E Nhóm được gây nhiễm do tiếp xúc được nuôi bằng nhóm được gây nhiễm bằng SE

^F Nhóm không được xử lý được cho ăn thức ăn bình thường không được bổ sung ΦCJ8

^G Nhóm kiểm chứng âm tính không được gây nhiễm bằng SE sau khi cho ăn thức ăn bình thường không được bổ sung ΦCJ8

Bảng 10

Hiệu quả ức chế của ΦCJ8 đối với việc bài tiết SE

	Phân tích định lượng của SE trong các mẫu ngoài môi trường sau khi gây nhiễm qua đường miệng bằng SE			
	7 dpc ^E			
	Cửa ra vào	Sàn	Thiết bị thông gió	Tổng cộng
Xử lý (10 ⁹ pfu/kg) ^C	2/2	1/2	0/2	3/6 (50)
Xử lý (10 ⁷ pfu/kg)	2/2	0/2	0/2	2/6 (33)
Xử lý (10 ⁷ pfu/kg)	2/2	1/2	½	4/6 (66)
Không xử lý ^D	2/2	2/2	½	5/6 (33)
Kiểm chứng âm tính ^E	0/2	0/2	0/2	0/6 (0)
	14 dpc			
	Cửa ra vào	Sàn	Thiết bị thông gió	Tổng cộng
Xử lý (10 ⁹ pfu/kg) ^C	1/2	2/2	0/2	3/6 (50)
Xử lý (10 ⁷ pfu/kg)	2/2	1/2	0/2	3/6 (50)
Xử lý (10 ⁷ pfu/kg)	2/2	2/2	½	5/6 (33)
Không xử lý ^D	2/2	2/2	½	5/6 (33)
Kiểm chứng âm tính ^E	0/2	0/2	0/2	0/6 (0)
	21 dpc			
	Cửa ra vào	Sàn	Thiết bị thông gió	Tổng cộng
Xử lý (10 ⁹ pfu/kg) ^C	1/2	0/2	0/2	1/6 (16)
Xử lý	2/2	0/2	1/2	3/6 (50)

(10 ⁷ pfu/kg)				
Xử lý (10 ⁷ pfu/kg)	2/2	1/2	1/2	4/6 (66)
Không xử lý ^D	2/2	2/2	2/2	5/6 (33)
Kiểm chứng âm tính ^E	0/2	0/2	0/2	0/6 (0)

^A Phân lập *Salmonella* từ các mẫu ngoài môi trường ở thời điểm 1, 2, và 3 tuần sau khi gây nhiễm bằng SE

^B Ngày sau khi gây nhiễm

^C Nhóm được dùng ΦCJ8 làm chất phụ gia thức ăn

^D Nhóm không được xử lý được cho ăn thức ăn bình thường không được bổ sung ΦCJ8

^E Nhóm kiểm chứng âm tính không được gây nhiễm bằng SE sau khi cho ăn thức ăn bình thường không được bổ sung ΦCJ8

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

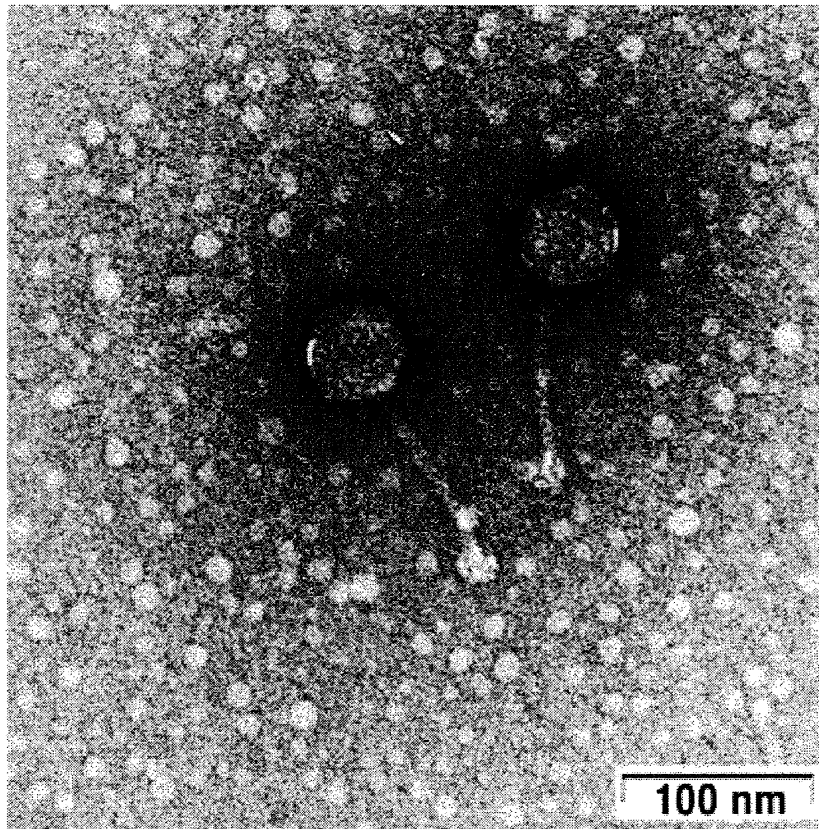
Thế thực khuẩn mới theo sáng chế có hoạt tính kháng khuẩn đặc hiệu với *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*, và *Salmonella pullorum* mà không làm ảnh hưởng đến vi khuẩn có lợi, và có tính chịu axit, nhiệt và sấy rất tốt, và do đó thế thực khuẩn mới theo sáng chế có thể được điều chế thành chế phẩm có thể được sử dụng rộng rãi để ngăn ngừa và điều trị các bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* hoặc *Salmonella pullorum* bao gồm bệnh phó thương hàn, ngộ độc thực phẩm do nhiễm *Salmonella*, bệnh thương hàn, và bệnh bạch ly thương hàn, và dùng làm hoạt chất trị liệu, chất kháng khuẩn, thức ăn hoặc nước uống dùng cho vật nuôi, chất làm sạch và chất khử trùng.

Mặc dù các phương án ưu tiên theo sáng chế được bộc lộ chỉ nhằm mục đích minh họa, nhưng người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng các cải biến, bổ sung và thay thế khác nhau vẫn có thể được sử dụng, mà không vượt quá phạm vi và nội dung của sáng chế như được bộc lộ trong phần yêu cầu bảo hộ kèm theo.

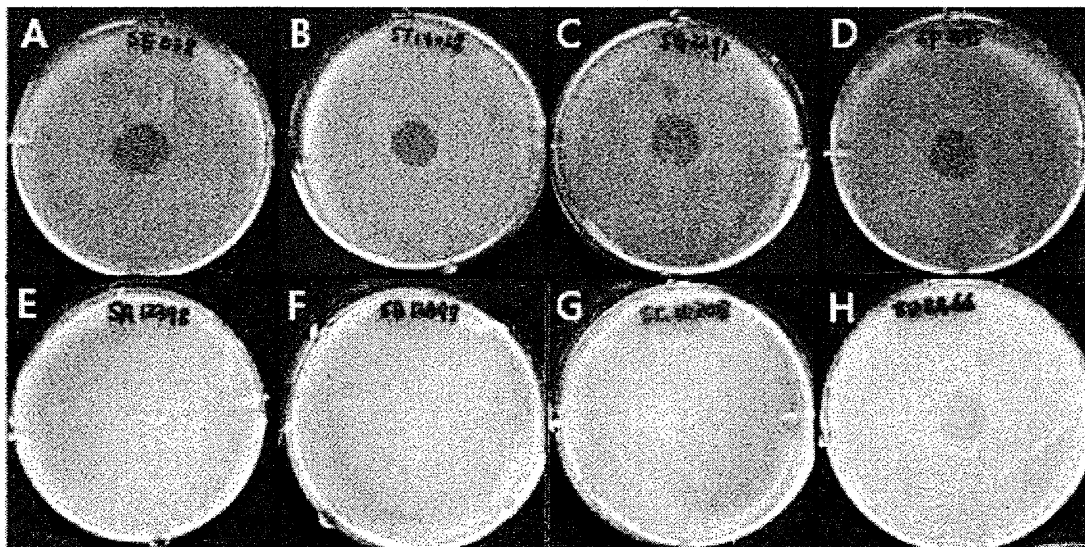
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể thực khuẩn phân lập có hoạt tính kháng khuẩn đặc hiệu với một hoặc nhiều vi khuẩn *Salmonella* được chọn từ nhóm bao gồm *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* và *Salmonella pullorum* được lưu giữ với số truy nhập là KCCM11148P.
2. Chế phẩm dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi một hoặc nhiều chủng *Salmonella* được chọn từ nhóm bao gồm *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* và *Salmonella pullorum* chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo điểm 1.
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi *Salmonella enteritidis* hoặc *Salmonella typhimurium* là bệnh phó thương hàn và ngộ độc thực phẩm do nhiễm *Salmonella*, bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi *Salmonella gallinarum* là bệnh thương hàn, và bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi *Salmonella pullorum* là bệnh bạch ly thương hàn.
4. Chế phẩm kháng sinh dùng để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi một hoặc nhiều chủng *Salmonella* được chọn từ nhóm bao gồm *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum* và *Salmonella pullorum* chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo điểm 1.
5. Thức ăn dùng cho vật nuôi, trong đó thức ăn này chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo điểm 1.
6. Nước uống dùng cho vật nuôi, trong đó nước uống này chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo điểm 1.
7. Chất khử trùng, trong đó chất khử trùng này chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo điểm 1.
8. Chất làm sạch, trong đó chất làm sạch này chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo điểm 1.

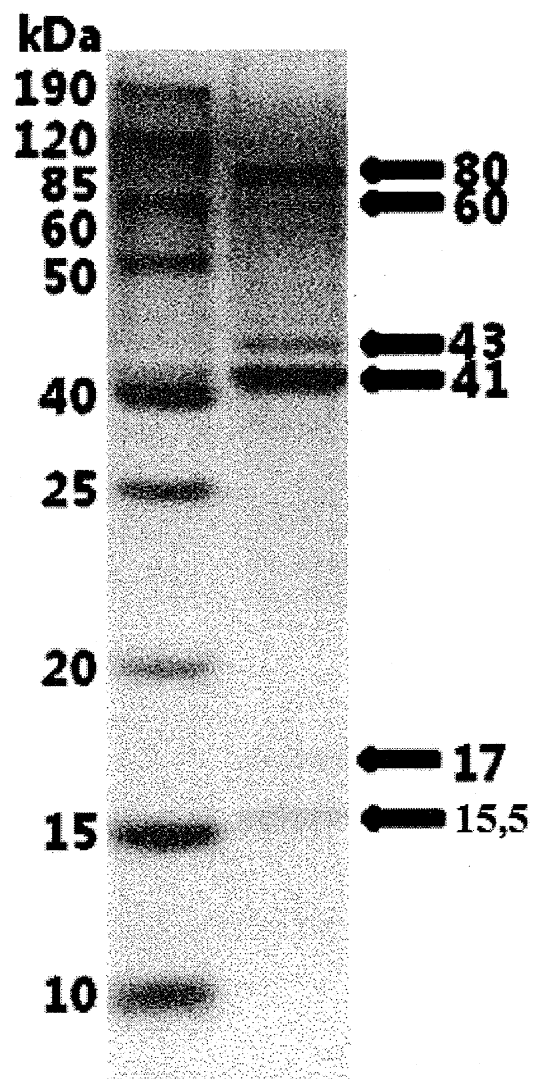
【Fig. 1】



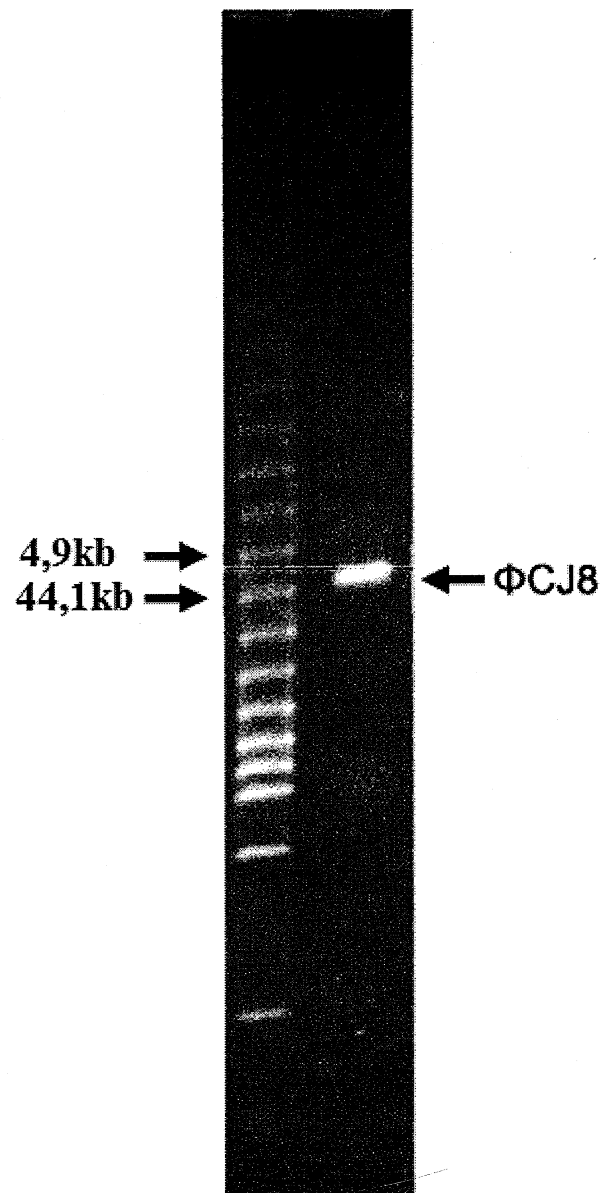
【Fig. 2】



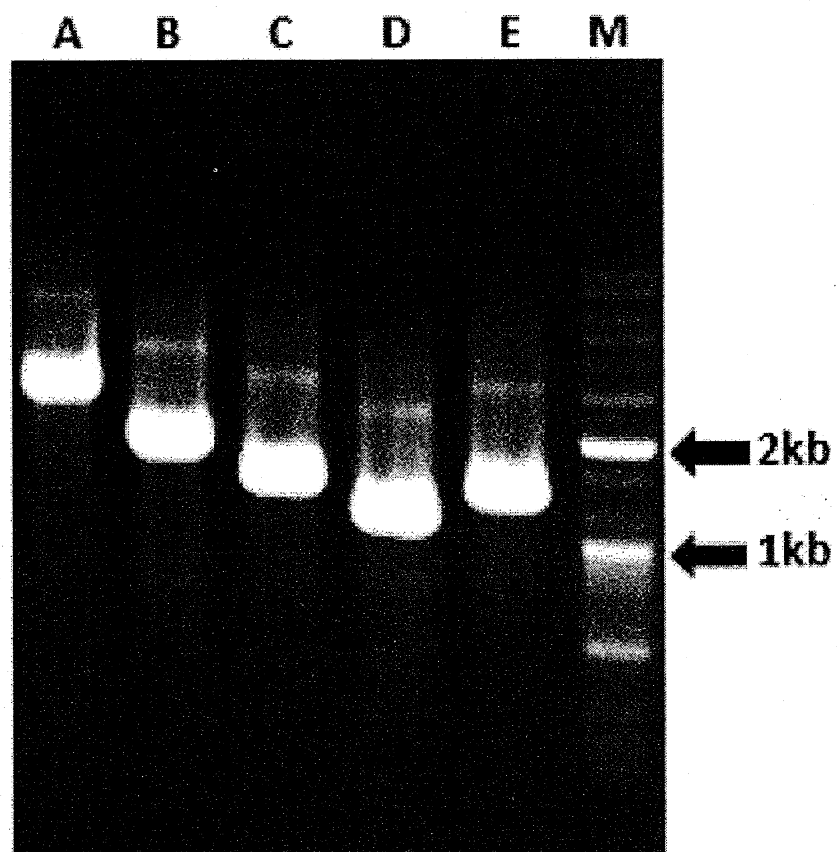
【Fig. 3】

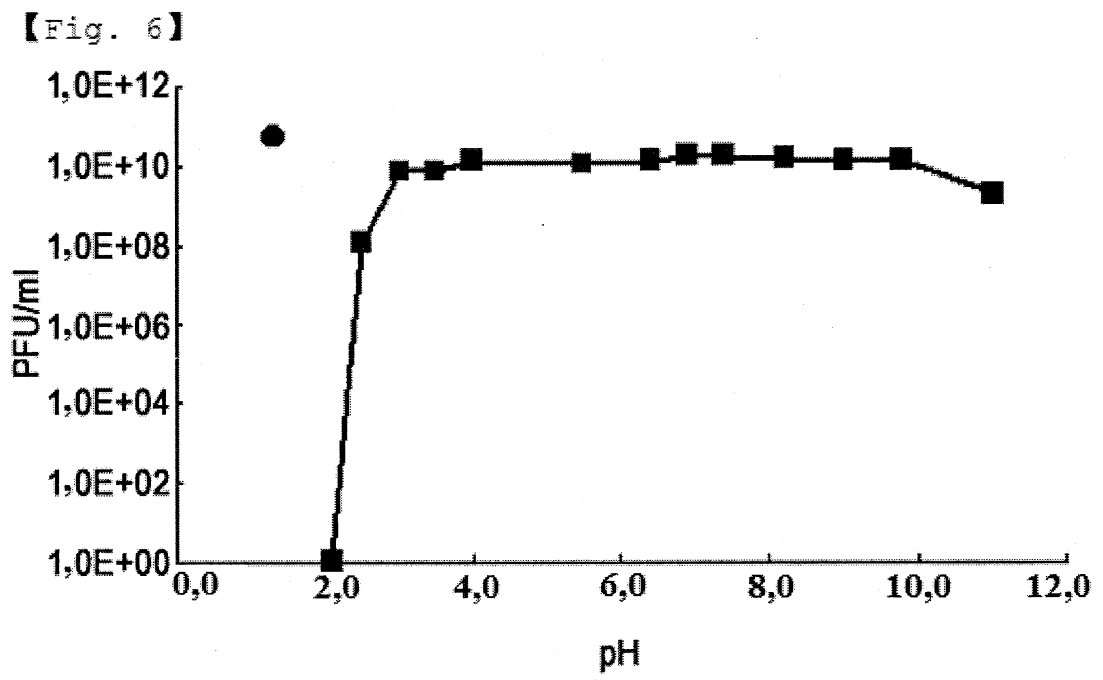


【Fig. 4】

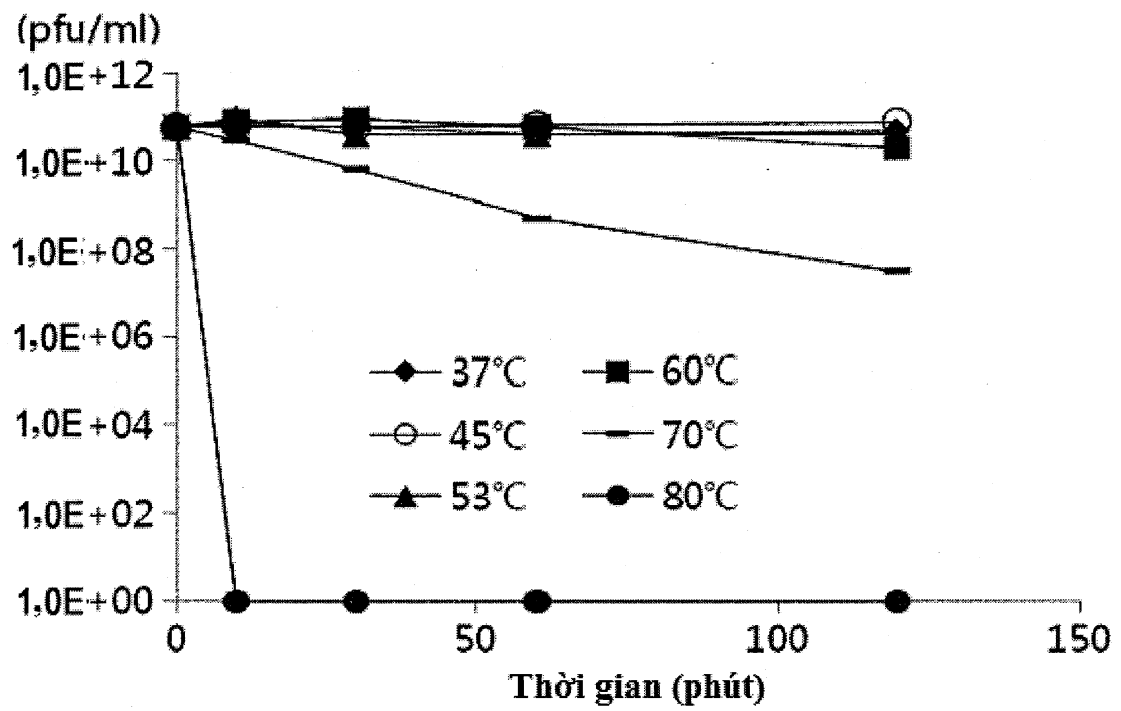


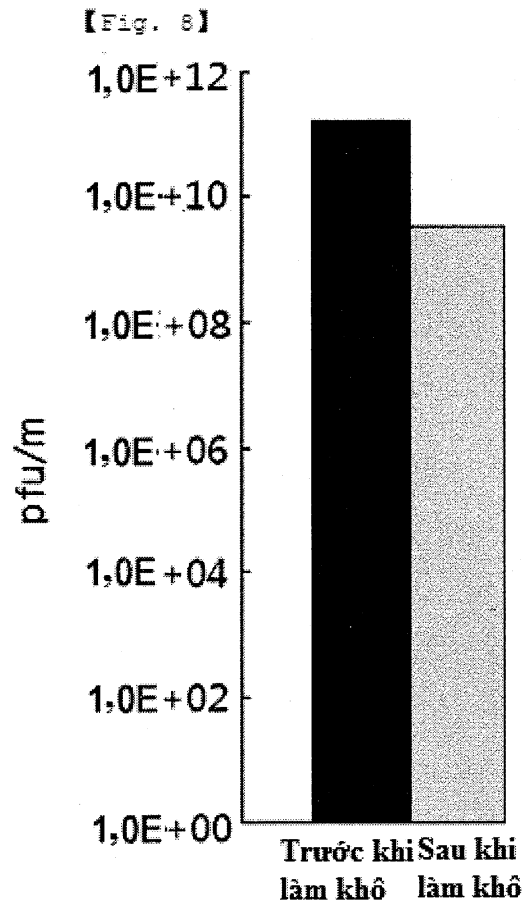
【Fig. 5】

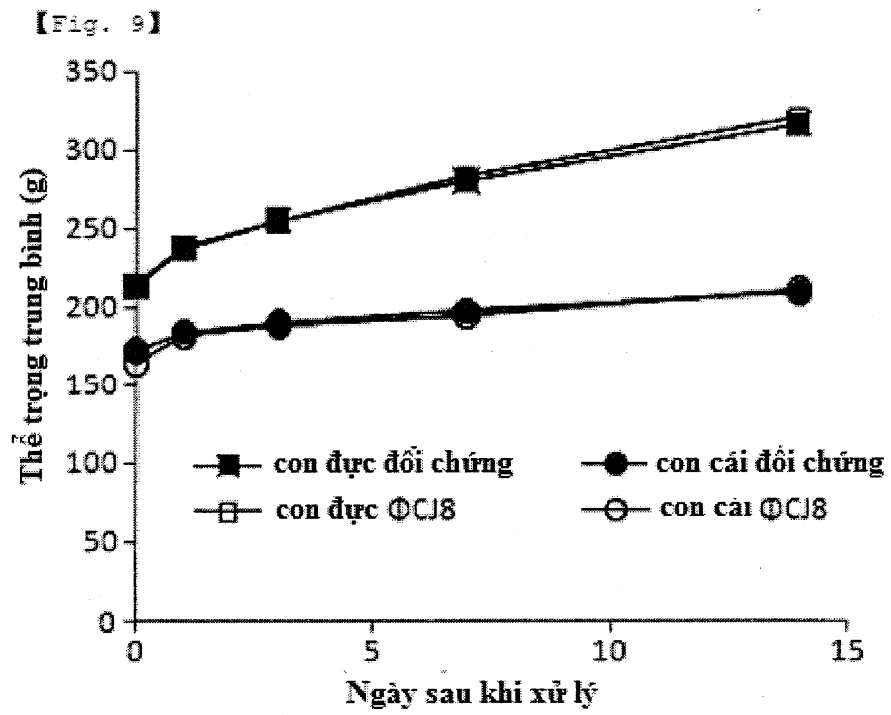




【Fig. 7】







DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION

<120> **THẺ THỰC KHUẨN PHÂN LẬP VÀ CHẾ PHẨM DÙNG ĐỂ NGĂN NGỪA HOẶC ĐIỀU TRỊ CÁC BỆNH
NHIỄM KHUẨN CHỨA THẺ THỰC KHUẨN NÀY**

<130> OPA10134/PCT

<150> US 61/425,553

<151> 2010-12-21

<160> 17

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 687

<212> ADN

<213> Thẻ thực khuẩn KCCM11148P

<400> 1

acagctacgg gaccgcaggg cgcgttcott aatctgcatt gtaagttccc ggcccttcgtc	60
gctggcttcg gcacaggtaa atcggaagtc atgtgcaact ccgccctgtt agacagcatg	120
gaagggtggtg gtgattcact tatcgtcttg tatgaacoga catacgacct ggtgcgcctt	180
atcctcgccc cgcgtatgga agaaaagttg totgattggg gtattcgtta caagtacaat	240
aaatcaaaca acatagtcta tacatcatcc gggcaattcg gggattttgt cctgcgtaca	300
ttggataacc cggcgogaat cgtgggttac gaatcttttc gcgcacaaat agacgaattg	360
gacacgttaa ataaagacca ccccgagcac gcctggaaca aagctatcgc ccgtaaccgt	420
cagttgccgc gcacatatcg ttggaatacc ccaaagcctg ctaatacaga ttcgggtattt	480
aatacacgtc acygccttcg ttttgtggtc catggatggg ttgacaaaaa gaatcgtggg	540
tgtgagatcc atcacgccc gataacttct aaatcatttc taccggacga tcatgtccag	600
gctttgogaa atacgaatcc tctttccttg aaatgtgctc tatctgtccg cgaatttggt	660
gtcttaaagt ccggctacaa ttcatta	687

<210> 2

<211> 525

<212> ADN

<213> Thê thực khuẩn KCCM11148P

<400> 2

tcgggggtcca tgccaaacat cttacctgcg gttacgcagt aaatatccag cccggcgcg	60
aacgtatcaa gcgcggtttc ttgccccgcc agccatgcaa gccacggcc ttcgacgtta	120
gagtaatccg caacaacaaa cttacgcccg gcttccggga taatgcagct tcggacggt	180
gacgctgtta gcttgccac atcaaacgg cggtgtgcac ggcctttaag taacgcggca	240
ataccctat ccagttcatc gtctgataa taccgcgcg ccaggttttg cggctgaaaa	300
cctttcccg cccacgcac tgttcgcttc tctctccgt attgccggca accacggcg	360
cggtcatctg aaaaacggcc taacagcaac ggcgcgaatt tcttcaatgt ggaaaaaca	420
accaccacc gtctcactac aatagtgcg acaaaaacaa gtaaattcac atccttcac	480
aaatatttaa tgatgacttt tgtgcatttg tgaattcgg gcgc	525

<210> 3

<211> 650

<212> ADN

<213> Thê thực khuẩn KCCM11148P

<400> 3

acgcaaaccg tcgcgtaaa cgtccgctg gtaaacaaag cctgtatcag tcatccagac	60
attccgccga actatgggac ccggactatt gcgacgaatt aatccggttc ttgcacgca	120
cgtcatggga actcgtaccc acgtctaaag gcgacgaacg cccgcttacc caggataaac	180
cgccatcact ggcccgtttc gcactacaca taggcgtaac cgttcgatt atcaagctgt	240
ggctgcgaga ggctcctgcc ttgctgaag catacgaaac ggcgcaggcc ctggaagag	300
cgtatttcac tgagaccggt gctgcggga tatctgtac gttcgcgca gcaaaacttg	360

ggcttaataa aactgttgtg gaagaagcgc gcgacgaacc aattagcgaa gtaactatta	420
aggtgggtgtc cgggtgaacgt tgatatcaca gctacgggac cgcagggcgc gttcottaat	480
ctgcattgta agttcccggc cttcgctcgt ggcttcggac caggtaaatc tgaacgaatg	540
cgcaaccccg ccttgotaca cagcgtggaa ggaggtagt cttcccttct cttcgtctct	600
caacctacct attatctttt tccccctccc tttttctccc ataattggacg	650

<210> 4

<211> 931

<212> ADN

<213> Thở thực khuẩn KCCM11148P

<400> 4

actggcgact cagcgcgta ggttctgtaa accgggtaac tatggttgtg ctgcggtgaga	60
catgggagta ccacgaacct ggaaacgagt tcgaaactaa atacggcgag cagtaccgcg	120
tgctggacat tgacaccgat ggtaattatc gtcagcgact gttccgtttc gatgcggaag	180
gcggagctca ggaagaggtt gtggagattt acccagattt aggggagtcg ttacgtggcg	240
taattccgtt tacotttatc ggagctacca ataacgacgc caccattgac gacgtctctt	300
tgttgccatt ggccgagctt aatatcgggc actaccggaa cagtgcgtgat aacgaggaat	360
caagttttgt agttggccag cctacgctgt ttatctaccc oggggataac cttacaccac	420
agtcgttcaa ggaagccaac cccaacggca tcaaatttgg cagtcggtgc gggcataacc	480
ttggttatgg tggtagcgt caacttattc aggcgggcga aaacaacctg gcccgccaga	540
atatgttgga caaagaacaa caggctatcc agattggcgc acagcttatt accccaaccc	600
agcaaattac cgcggaatcg gcgcgcatcc aacgcggcgc ggatacgtcc gttatgtcca	660
caatcgcccc taacgtaagt caggcgtata ctgatgcttt acgatgggtt gotatgatgt	720
tgggtaagcc agaagattct gaagtcgagt tccagcttat catggatttc ttcctgcaac	780
ctatgacagc acaggacagg gctgcgtgca tggcagacat taatgccgga ttactgcccc	840
ccactgctta ttacgtgcg ttgcgtaagg cgggggtgac tgactgaacc gaogaggata	900
ttctgaacgc tattgagatg cacctttgcc g	931

<210> 5

<211> 988

<212> ADN

<213> Thử thực khuẩn KCCM11148P

<400> 5

```

gacaatgtgg gtgcttagcc gcctgtttcg caacgggcag ctaacagaag aagaccgggt      60
attaatcctc gccccgttgc gtgttgctgc gggtagctgg cccgcggaac aaactaagtg      120
ggggttccct tgcccttgtg tcatcgatgc aaccggttcg gagaagcgcc gcatagcggc      180
gctggagtcg gacgctaatt tgggtgtgcac taactacgaa gttatcgagt ggctgattga      240
ttactacggc aaagaagact ggccttttac tgttatcgtg gccgatgaga gcacgaaact      300
gaaatctttc cgcagccgtt caggcggtag caagcgggca aaggcgctta gtaaggtggc      360
gttcggtaaa gttaagcgtt tcattaacct gaccggtaca ccatcaccaa acggcctcaa      420
agacttgtgg ggtcagaact ggttcacatga cgcgggtgaa cgccttgggt cttcatacac      480
ggcctttacc gatagatggt ttaactcggc acagaaaggc aaatctgcga tggcgcgggg      540
gtaccatgct cggccaggcg cggataacga gattcaccag aagatgaagg atatcagcct      600
taccattgat gccgcgaggt ggttcgggtg tgaagcaccg gttattgtac cggttgagat      660
tgacctgccg aagaaagcgc gtcaagccta catcgatatg gaggaggagt tattcgcgga      720
actggagagc ggagaagttg aagcggctaa cgcgcgctgt aaaacggcta agtgcttgca      780
gattgcttcc ggtgcogtgt atgtgttcgg gcccggtgg tgaagcaacg aaagactggg      840
ataaagtgca ctacgctaaa cctcgatgct ttagagtcca ttgtcgagga gttgaaggtg      900
cgccgctgct ggttgacctt tctcttttag actaacttag aactgcagtc ctcaggcgca      960
tccctottac gcagcagatc ctttcgcc                                     988

```

<210> 6

<211> 19

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 6

cgttccttaa tctgcattg 19

<210> 7
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi
 <400> 7

gctatgggtga cgltgttg 18

<210> 8
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi
 <400> 8

atgccaaaca tcttacc 17

<210> 9
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> đoạn mỗi
 <400> 9

gtattgcag tagtgtcg 18

<210> 10
 <211> 19
 <212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 10

ggtaaaca aaa gcctgtatc 19

<210> 11

<211> 18

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 11

gattttgcac gtatctcg 18

<210> 12

<211> 19

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 12

gttcgaaact aaatacggc 19

<210> 13

<211> 19

<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mỗi

<400> 13

gcgataaaag agtctatag 19

<210> 14
<211> 18
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn mỗi
<400> 14

cagctaacag aagaagac 18

<210> 15
<211> 19
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn mỗi
<400> 15

gatacgttt atttctgc 19

<210> 16
<211> 17
<212> ADN
<213> trình tự nhân tạo
<220>
<223> đoạn mỗi
<400> 16

gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 17
<211> 16
<212> ADN

<213> trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 17

aacagctatg accatg 16