



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0040839

(51)⁷ A01N 63/04; C12N 1/14; A61K 36/06; (13) B
A01N 25/12

(21) 1-2019-01019 (22) 25/07/2017
(86) PCT/AU2017/050764 25/07/2017 (87) WO2018/023151 08/02/2018
(30) 2016903096 05/08/2016 AU
(45) 26/08/2024 437 (43) 25/07/2019 376A
(73) INTERNATIONAL ANIMAL HEALTH PRODUCTS PTY LTD (AU)
18 Healey Circuit, Huntingwood, New South Wales 2148, Australia
(72) HEALEY, Kevin (AU); LAWLOR, Chris (AU); KNOX, Malcolm (AU).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) THẺ PHÂN LẬP TINH KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC CỦA VI SINH VẬT
DUDDINGTONIA FLAGRANS VÀ CHẾ PHẨM CHỨA THẺ PHÂN LẬP
DUDDINGTONIA FLAGRANS

(57) Sáng chế đề cập đến thẻ phân lập tinh khiết về mặt sinh học của *Duddingtonia flagrans* (*D. flagrans*) chủng IAH 1297 được nộp lưu ở Viện đo lường quốc gia, 1/153 Bertie Street, Port Melbourne, Victoria 3207, Australia vào ngày 2/8/2016 (số truy cập V16/019156) và/hoặc bào tử của chủng *D. flagrans* phân lập được này và chế phẩm chứa thẻ phân lập này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến giống nuôi cấy tinh khiết về mặt sinh học chứa chủng *Duddingtonia flagrans* (*D. flagrans*) phân lập được IAH 1297 được nộp lưu ở Viện đo lường quốc gia, 1/153 Bertie Street, Port Melbourne, Victoria 3207, Australia vào ngày 2/8/2016 (số truy cập V16/019156) và/hoặc bào tử của chủng *D. flagrans* phân lập được này, chế phẩm chứa chúng, phương pháp và sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Giun tròn ký sinh (giun sán đường ruột) vẫn là mối đe dọa lớn cho sức khỏe và sự khỏe mạnh của động vật chăn thả (với hệ tiêu hóa thích nghi cao với chế độ ăn cỏ) trên toàn thế giới. Cụ thể, động vật chăn thả được tiếp xúc với vật ký sinh ở tần suất rất cao. Động vật chăn thả trở nên bị tái nhiễm sau khi được điều trị do chúng lại ăn phải giun tròn khi được chăn thả trên đồng cỏ bị nhiễm ấu trùng giun sán. Các ấu trùng này có nguồn gốc từ các đồng phân chứa số lượng lớn trứng giun tròn được tích tụ bởi động vật có giun sán.

Cụ thể hơn, như được thể hiện trên Fig. 1, vòng đời cơ bản của giun tròn ký sinh đường dạ dày ruột (gastrointestinal nematodes - GIN) bao gồm giun trưởng thành tại vị trí ưa thích trong đường dạ dày ruột của vật chủ sản xuất số lượng lớn trứng mà được di chuyển qua cơ thể vật chủ tức là, được rơi vào phân. Trong các cục phân hoặc trên cánh đồng, trứng thường trải qua quá trình phát triển thêm qua hai giai đoạn ăn (giai đoạn phát triển này khác nhau giữa các loài ký sinh khác nhau và phụ thuộc vào các điều kiện môi trường). Ấu trùng giai đoạn thứ nhất (L1) lột xác sang ấu trùng giai đoạn thứ hai (L2) và sau đó thành ấu trùng giai đoạn thứ ba lây nhiễm không ăn (L3). Ấu trùng L1 và L2 ăn vật chất hữu cơ trong phân trong khi đó ấu trùng L3 không thể ăn do vẫn còn giữ lại lớp cuticun của giai đoạn L2. Cuticun sử dụng như vỏ bảo vệ khỏi các điều kiện môi trường cực đoan và có thể kéo dài khả năng sống sót của ấu trùng cho đến khi xuất hiện điều kiện tối ưu để

phát triển tiếp (Pugh, D.G. *et al.*, Comp Cont Educ Pract Vet 20 (1998): S112). L3 lây nhiễm sau đó di chuyển từ phân lên trên đồng cỏ xung quanh, nơi mà chúng được ăn bởi các động vật chăn thả khác, theo đó lan truyền bệnh nhiễm ký sinh. Khi vào trong cơ thể vật chủ, L3 vẫn còn lớp vỏ bọc cũ để đáp ứng với sự thay đổi nồng độ CO₂, nhiệt độ và độ pH trước khi chúng đi đến vị trí gây nhiễm. Chúng trải qua hai lần lột xác nữa (L4 và L5) và hoàn thành quá trình phát triển của chúng để trưởng thành ở vị trí ưa thích của chúng trong thời gian 15 - 21 ngày đối với các loài thông thường nhất (Vlassoff, A. *et al.*, (2001) New Zealand Veterinary Journal 49: p213-221).

Trong quá trình di chuyển và thiết lập của ấu trùng/giun sán trưởng thành, sự tổn thương trực tiếp có thể gây ra cho đường tiêu hóa. Tổn thương cũng có thể gây ra bởi hiện tượng viêm tại vị trí nhiễm do vật chủ đáp ứng lại với vật ký sinh xâm nhập. Một vài báo cáo trên toàn thế giới đã cho rằng các bệnh do vật ký sinh như vậy đã gây thiệt hại về kinh tế cho ngành chăn nuôi và ảnh hưởng xấu đến sức khỏe của động vật. Bệnh tiêu chảy, bệnh thiếu máu, sụt cân, khả năng sinh sản giảm, khả năng sản xuất giảm, (ví dụ, chất lượng len, sản xuất sữa, v.v.), và tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong tăng chỉ là một vài trong số các tổn thất nặng nề mà giun tròn ký sinh đường tiêu hóa (GIN) có thể gây ra. Chỉ riêng ngành công nghiệp động vật nuôi nhai lại kích thước nhỏ trên toàn thế giới, ước tính thiệt hại sản xuất lên đến hàng triệu đô la mỗi năm. Khó thu được giá trị chính xác do nhiều yếu tố ảnh hưởng đến sự thiệt hại này bao gồm việc quản trị, nuôi dưỡng, các yếu tố môi trường, áp lực, di truyền và bệnh đồng thời (Vlassoff, A. *et al.*, (2001) New Zealand Veterinary Journal 49: p213-221). Thiệt hại ước tính được về cừu và trâu bò chỉ riêng ở Úc là 1 tỷ đô la Úc và trên toàn thế giới thiệt hại này lên đến hàng chục tỷ đô la (Roeber *et al.*, (2013) Parasite & Vectors 6: p153). Trong một nghiên cứu khác công bố bởi Meat & Livestock Australia Limited (Lane *et al.*, (2015) Report B.AHE.0010 ISBN 9781741918946) ước tính tổng thiệt hại mỗi năm ở Úc do vật ký sinh bên trong là:

Trâu bò 93,6 triệu đô la Úc (70 triệu đô la Mỹ/66 triệu orô) với các thiệt hại sản xuất nằm trong khoảng từ 0,44 đô la đến 3,59 đô la cho mỗi con

Cừu 436 triệu đô la Úc (327 triệu đô la Mỹ/305 triệu ơ rô) với các thiệt hại sản xuất nằm trong khoảng từ 1,29 đô la đến 28,29 đô la cho mỗi con

Dê 2,54 triệu đô la Úc (1,9 triệu đô la Mỹ/1,8 triệu ơ rô) với các thiệt hại sản xuất nằm trong khoảng từ 0 đô la đến 5,34 đô la cho mỗi con.

Các loài động vật nhai lại quý hiếm hoặc không phải là động vật nuôi như hươu cao cổ, linh dương, hươu, linh dương oryx, linh dương đen Đông Phi, linh dương Ấn Độ, linh dương bongo, hươu đuôi vằn, và linh dương đầu bò là một vài trong số nhiều loài guốc chẵn cũng có biểu hiện nhiễm GIN. Việc nhiễm GIN không nghiêm trọng và xuất hiện nhiều ở loài guốc chẵn hoang dã trong môi trường sống tự nhiên của chúng như khi chúng bị nhốt trong các cơ sở động vật học. Các lý do của việc tăng số lượng GIN và mức độ lây nhiễm nghiêm trọng ở loài guốc chẵn bị nhốt là do áp lực, thiếu việc gặm trong các khu đất có rào vây quanh, tăng tỷ lệ chẵn thả, tưới tiêu và không có khả năng gần với cảnh quan. Các điều kiện áp lực do tình trạng nhốt gây ra có thể làm giảm chức năng của hệ miễn dịch và tăng mức độ tiếp xúc của cơ thể với các vật ký sinh và bệnh (Fagiolini, M. (2010) *et al.*, Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 41(4): p662-670). Trong các cơ sở động vật học, khách tham quan phải quan sát động vật trong hàng rào. Vì lý do đó, giảm khả năng gặm, mà cho phép động vật mà là loài nhai gặm tự nhiên trong môi trường hoang dã, như hươu cao cổ, thay vào đó là chẵn thả. Tuy nhiên, khó dự đoán được mức độ lây nhiễm ở “các động vật chẵn thả” ép buộc này so với động vật nuôi chẵn thả, do nó có thể phụ thuộc vào mức độ chẵn thả thực tế được so sánh với việc gặm được cung cấp trong các điều kiện này.

Trên toàn cầu, trong số các vật ký sinh giun tròn (GIN) ký sinh đường tiêu hóa quan trọng nhất của vật nuôi bao gồm các vật ký sinh thuộc giống *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, *Ascaris*, *Nematodirus*, *Strongyloides*, *Trichuris*, *Chabertia*, *Oesophagostomum*, *Cooperia* và *Bunostomum* (Yong, (Yong, 1992). Đối với động vật nhai lại, loài chính là *Haemonchus* spp., *Teladorsagia* (*Ostertagia*) spp., *Cooperia* spp., và *Trichostrongylus* spp. trong khi đối với ngựa loài chính là giun lươn, *Strongylus* spp., *Strongyloides westeri*, *Parascarus equorum*, *Trichostrongylus axei* và *Dictyocaulis*

arnfeldi. Giun tròn trưởng thành ưa thích sống ở một đoạn cụ thể của đường dạ dày ruột của vật chủ (xem bảng 1).

Bảng 1: Giun tròn quan trọng ở động vật chăn thả ở Úc, tên thông thường của chúng và vị trí giải phẫu tại nó chúng trú ngụ.

Vị trí giải phẫu	Tên khoa học	Tên thông thường
Dạ múi khế (động vật nhai lại)	<i>Haemonchus contortus</i>	Giun hai đầu
	<i>H. placei</i>	Giun hai đầu
	<i>Teladorsagia</i> (Ostertagia) spp.	Giun nâu
	<i>Trichostrongylus axei</i>	Giun ký sinh trong dạ dày
Ruột non	<i>Cooperia</i> spp.	Giun ký sinh trong ruột
	<i>Nematodirus</i> spp.	Giun ký sinh trong ruột cỏ đẹp
	<i>Trichostrongylus</i> spp.	Giun gây bệnh tiêu chảy
	<i>Bunostomum trigonocephalum</i>	Giun móc bò
	<i>Strongyloides papillosis</i>	Giun lươn
	<i>Strongyloides westeri</i>	Giun lươn
	<i>Parascarus equorum</i>	Giun đũa
Ruột già	<i>Chabertia ovina</i>	Giun ký sinh ở ruột già
	<i>Oesophagostomum columbianum</i>	Giun kết hạt
	<i>Oe. Vendorsum</i>	-
	<i>Trichuris ovis</i>	Giun tóc
	Cyathostomins	Giun lươn nhỏ
	<i>Strongylus</i> spp.	Giun lươn lớn
	<i>Oxyuris equi</i>	Giun xoắn

Trong số các loài ký sinh này, *H. contortus*, là vật ký sinh trong dạ múi khế của động vật nhai lại, có ý nghĩa lớn đối với tác động kinh tế toàn cầu và bệnh lâm sàng do nó là vật ký sinh hút máu mà có thể gây ra bệnh thiếu máu nghiêm trọng ở động vật và đang thịnh hành trên khắp thế giới nơi có nhiệt độ trung bình hàng tháng là 18°C và lượng mưa là 50mm. Vật ký sinh đặc biệt này, ví dụ, là loài đặc hữu của Đông Nam Hoa Kỳ, Châu Âu và Úc cũng như các khu vực khác có khí hậu nhiệt độ và độ ẩm cao.

https://www.researchgate.net/publication/6904034_Haemonchus_contortus_parasite_problem_No_1_from_tropics_-

❁ [_Polar_Circle_Problems_and_prospects_for_control_based_on_epidemiology.](#)

Hiện nay, phương pháp thông thường để quản lý vật ký sinh đường ruột ở động vật chăn thả là điều trị bằng hóa chất, tức là dùng các tác nhân hóa học nhằm tiêu diệt giun tròn ký sinh gây bệnh. Những hóa chất này được gọi là thuốc diệt giun sán. Phương pháp này đã được sử dụng rất thành công trên khắp thế giới nhưng đã dẫn đến sự phụ thuộc quá mức vào các loại thuốc này, từ đó, dẫn đến việc phát triển tính kháng thuốc mà đang làm giảm hiệu quả của kiểu điều trị này.

Những năm 1960 và 1970, khi chế độ điều trị bằng hóa chất được hình thành, là thời kỳ mà sự sẵn có đầy đủ của thuốc và sự xuất hiện của các loại dược chất mới phát triển mạnh mẽ. Tuy nhiên, kênh cung cấp đã cạn kiệt và triển vọng cho những đổi mới hơn nữa trong điều trị bằng dược chất rất ảm đạm (Ihler, C. F., (2010) *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52 (Suppl 1):S24). Nói chung, khả năng kháng một hóa chất mới trở nên rõ ràng chỉ sau 5 - 10 năm sử dụng, như được thể hiện trên Fig. 2. Gần đây đã có những trường hợp khả năng kháng thuốc đã phát triển với tốc độ nhanh hơn. Ví dụ, trong 2013, người ta đã thông báo rằng monepantel (một loại dược chất diệt giun sán mới) đã trở nên hoàn toàn mất tác dụng kháng *Teladorsagia circumcincta* và *Trichostrongylus colubriformis* chỉ sau hai năm sử dụng tại một trang trại dê ở New Zealand (Scott, I. et al, (2013) *Veterinary Parasitology* 198 (1-2) 166-171. Do sự tuân thủ khác nhau của việc dùng thuốc qua đường miệng, trọng lượng cơ thể ước tính, cũng như dữ liệu dược động học chưa biết, đã dẫn đến

việc sử dụng liều dưới liều điều trị. Điều này, cùng với việc lạm dụng và quản lý đồng cỏ kém đã góp phần gây ra vấn đề kháng thuốc diệt giun sán hiện nay trên toàn thế giới.

Việc sử dụng hóa chất cũng làm phát sinh dư lượng hóa chất trong các sản phẩm thịt và sữa thu được từ động vật nhận. Nó cũng gây ra ô nhiễm môi trường ngoài ý muốn thông qua sự tràn lan và bài tiết qua nước tiểu và phân. Mặc dù khả năng kháng thuốc của vật ký sinh đang gia tăng, nhưng ngành nông nghiệp chăn nuôi thương mại vẫn phải tiếp tục dựa vào việc sử dụng thuốc diệt giun sán.

Từ quan điểm của các vấn đề trên về việc sử dụng thuốc diệt giun sán, hiện vẫn có nhu cầu cấp thiết đối với các phương pháp kiểm soát khác trong các khu vực thương mại, ví dụ, tại các trang trại và/hoặc sở thú. Các phương pháp kiểm soát sinh học cung cấp một phương tiện không sử dụng hóa chất để kiểm soát giun tròn ký sinh bằng cách sử dụng các khả năng của các tác nhân vi sinh vật có đặc tính sinh học phù hợp cho mục đích này. Nấm ăn giun tròn đã xuất hiện trong những năm gần đây như là tác nhân kiểm soát sinh học đầy hứa hẹn đối với giun tròn ký sinh trên vật nuôi (Larsen et al., 1997; Waller and Faedo, 1993). Nhiều nghiên cứu đã thể hiện rằng *Duddingtonia flagrans* (*D. flagrans*) có tiềm năng làm tác nhân kiểm soát. *D. flagrans* là nấm ăn giun tròn được làm thích nghi để bắt giữ và tiêu hóa ấu trùng lây nhiễm của loài giun tròn (giun sán), mà ký sinh trên động vật chăn thả. Bào tử của nấm này có thành đặc biệt dày và vì thế khi được động vật chăn thả ăn vào, có thể nguyên vẹn đi qua đường tiêu hóa của động vật và được tích tụ trong phân của chúng. Cụ thể, *D. flagrans* tạo ra số lượng lớn bào tử vách dày (khoảng 20 μm), sống sót khi đi qua ruột. Như đã thảo luận ở trên, động vật cũng làm rơi trứng của vật ký sinh của chúng vào trong phân của chúng. Trong các cục phân, nấm tăng sinh, bắt giữ và tiêu thụ ấu trùng lây nhiễm mà được nở ra từ trứng giun sán, như được minh họa trên Fig. 3. Điều này làm gián đoạn vòng đời của giun sán và vì thế, *D. flagrans* được coi là có tiềm năng để sử dụng làm tác nhân kiểm soát sinh học đối với giun sán ký sinh của động vật chăn thả.

Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu được thực hiện dựa trên việc sử dụng *D. flagrans* để kiểm soát sinh học đối với giun sán ký sinh trong 20 năm qua, nhưng các kết quả của

nghiên cứu này đã không khả quan, đến nỗi không có sản phẩm thương mại nào xuất hiện. Đặc biệt, rất nhiều nghiên cứu nuôi dưỡng sử dụng nhiều lượng *D. flagrans* làm nổi bật nhiều vấn đề liên quan đến việc phát triển một sản phẩm thương mại chứa *D. flagrans* phù hợp để sử dụng cho động vật chăn thả. Một nghiên cứu được thực hiện năm 2005 nhấn mạnh sự không nhất quán trong kết quả thu được từ các thử nghiệm thực địa, mô tả sự thay đổi cao về hiệu quả thu được khi ăn tự nguyện, có thể nhấn mạnh sự khác biệt về hiệu quả giữa các liều và gây nguy hiểm lớn cho môi trường sử dụng mặc dù chỉ có hiệu quả trong một số nhóm (Paraud *et al.*, *Vet. Res.* (2005) 36: p157-166). Waller *et al.* *Acta. Vet. Scand.* (2006) 47: p23-32) mô tả các thực nghiệm được thực hiện trên ba trang trại cừu thương mại ở Thụy Điển để đánh giá việc dùng *D. flagrans* trong một loạt các hoạt động chăn nuôi thương mại và việc áp dụng thương mại sản phẩm sinh học chứa *D. flagrans* có khả thi hay không. Các thực nghiệm này cho thấy rằng không có lợi ích đáng kể về năng suất của cừu khi được điều trị bằng nấm đối với cả ba trang trại được sử dụng trong nghiên cứu này.

Cũng đã được thông báo bởi tác giả Terrill *et al.* (*Veterinary Parasitology* 186 (2012): p28-37) rằng nghiên cứu về nấm bắt giun tròn đã không được tiếp tục bởi Hiệp hội miền Nam về vật ký sinh động vật nhai lại kích thước nhỏ (SCSRPC) sau một khởi đầu đáng khích lệ vì thiếu nguồn bào tử thương mại. Hơn nữa, việc sử dụng *D. flagrans* có khả thi trong điều kiện chăn thả với hiệu quả tái sản xuất phù hợp hay không, cùng với việc sử dụng lâu dài để giảm số lượng ấu trùng giun tròn ký sinh đường tiêu hóa trên đồng cỏ (do đó làm giảm tỷ lệ lây nhiễm và cải thiện năng suất của động vật) vẫn thấy được. Thực vậy, một đánh giá nữa được công bố bởi Kumar *et al.*, (*J. Parasit. Dis.* (2013) 37(2): p151-157) cho thấy có một nhu cầu cấp thiết để thiết kế một chiến lược kiểm soát vật ký sinh một cách bền vững. Hơn nữa, trong khi các nghiên cứu thực nghiệm gần đây mô tả *D. flagrans* là tác nhân kiểm soát sinh học “có triển vọng nhất” đối với vật ký sinh giun tròn ở động vật chăn thả, các nhà nghiên cứu đã bắt đầu nghiên cứu các tổ hợp của *D. flagrans* với các loại nấm ăn giun tròn khác (ví dụ, xem Da Silva *et al.* *Biomed Res. Intl.* (2015) Article ID 474879). Tuy nhiên, các tổ hợp như vậy vẫn chưa được thử nghiệm trong các cơ sở nông trại và/hoặc vườn thú thương mại và có khả năng gây ra các vấn đề lớn hơn về khả năng

sinh sản và hiệu quả trong các điều kiện đồng ruộng khác nhau so với việc chỉ sử dụng một tác nhân sinh học.

Như đã thảo luận ở trên, việc sử dụng *D. flagrans* để kiểm soát ấu trùng lây nhiễm trên cánh đồng mà vẫn thể hiện hiệu quả sinh sản xuất thống nhất gặp rất nhiều khó khăn do có sự chênh lệch cao giữa các kết quả thu được trong điều kiện thử nghiệm, những kết quả thu được trong các thử nghiệm thực địa và trong môi trường trang trại thương mại, cũng như những khó khăn liên quan đến việc lên men và tăng quy mô để sản xuất số lượng thương mại của sản phẩm có thể sử dụng, tức là các bào tử. Do đó, mặc dù có nhiều nghiên cứu mô tả tiềm năng sử dụng *D. flagrans* như một tác nhân kiểm soát sinh học, nhưng không có chủng nào được sử dụng mà thành công tạo ra được một sản phẩm thương mại. Vẫn cần một chế phẩm chứa *D. flagrans* cung cấp khả năng kiểm soát tái sản xuất sự lây lan và lây nhiễm giun tròn ký sinh trên vật nuôi và đồng cỏ và phù hợp để thương mại hóa và/hoặc có thể ứng dụng để sử dụng trong chiến lược thương mại để kiểm soát ký sinh trùng một cách bền vững.

Bất kỳ thảo luận nào trong tình trạng kỹ thuật trong bản mô tả này không nên được coi là một sự thừa nhận rằng tình trạng kỹ thuật đó được biết đến rộng rãi hoặc là một phần của kiến thức chung trong lĩnh vực này.

Mục tiêu của sáng chế là khắc phục hoặc cải thiện ít nhất một trong những nhược điểm của các phương pháp điều trị trong tình trạng kỹ thuật, hoặc để cung cấp một giải pháp thay thế hữu ích.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mặc dù lĩnh vực này vẫn chưa thành công trong việc tạo ra sản phẩm kiểm soát sinh học chứa *D. flagrans*, trong quá trình nghiên cứu tạo ra sáng chế, các tác giả sáng chế đã tìm cách xác định thể phân lập của chủng *D. flagrans* để sử dụng trong chế phẩm kiểm soát sinh học thích hợp cho ứng dụng thương mại. Các tác giả sáng chế bất ngờ phát hiện ra rằng chủng *D. flagrans* phân lập được, trong sáng chế này được gọi là “IAH 1297”, có các

đặc điểm thích hợp để ứng dụng thương mại. Chủng *D. flagrans* theo sáng chế có nhiều ưu điểm hơn so với các chủng đã biết như được đề cập dưới đây.

Do đó, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến thể phân lập tinh khiết về mặt sinh học của vi sinh vật *Duddingtonia flagrans* (*D. flagrans*) có tất cả các đặc điểm nhận diện của chủng được nộp lưu với số truy cập số V16/019156 ở Viện đo lường quốc gia, 1/153 Bertie Street, Port Melbourne, Victoria 3207, Australia vào 2/8/2016 (trong bản mô tả này được gọi là “chủng IAH 1297”).

Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này hiển nhiên biết được rằng thuật ngữ “thể phân lập tinh khiết về mặt sinh học” như được sử dụng ở đây có nghĩa là thể phân lập được tách ra từ môi trường gồm một hoặc nhiều thành phần mà nó có thể được liên quan nếu được tìm thấy trong tự nhiên hoặc cách khác. Các thuật ngữ “tinh khiết về mặt sinh học” hoặc “thể phân lập” như được sử dụng ở đây không chỉ ra mức độ mà vi sinh vật được tinh chế. Theo một phương án, chủng IAH 1297 là chủng *D. flagrans* duy nhất có mặt trong thể phân lập và theo một phương án khác, chủng IAH 1297 là vi sinh vật duy nhất có mặt trong thể phân lập.

Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này rõ ràng biết được rằng sáng chế đề cập đến chủng IAH 1297 ở dạng bất kỳ trong số các dạng sống của nó (xem thảo luận ở trên liên quan đến các giai đoạn vòng đời khác nhau của *D. flagrans*). Tốt hơn là, chủng IAH 1297 là ở dạng bào tử và tốt hơn nữa là nó ở dạng bào tử vách dày.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa thể phân lập theo khía cạnh thứ nhất. Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa phần có chức năng bất kỳ của vi sinh vật *D. flagrans* chủng IAH 1297, như được mô tả ở đây, bao gồm bào tử. Tốt hơn là, chế phẩm chứa bào tử của chủng IAH 1297 này và, tốt hơn nữa là, bào tử là dạng bào tử vách dày.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa chủng *D. flagrans* được phân lập và/hoặc bào tử của chủng *D. flagrans* phân lập được này (tốt hơn là bào tử vách dày của chủng *D. flagrans* phân lập được này), trong đó chế phẩm này làm gián đoạn

vòng đời của giun tròn ký sinh ở động vật chăn thả, kiểm soát sự lan tràn của giun tròn và thích hợp cho ứng dụng thương mại.

Chế phẩm theo sáng chế có thể sử dụng làm chế phẩm kiểm soát sinh học để làm gián đoạn vòng đời của giun tròn ký sinh mà lây nhiễm cho động vật chăn thả. Chế phẩm kiểm soát sinh học kiểm soát sự lan tràn của giun tròn và thích hợp cho ứng dụng thương mại.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Là sơ đồ thể hiện vòng đời cơ bản của giun tròn ký sinh đường tiêu hóa ở động vật chăn thả.

Fig. 2: Là đồ thị thể hiện sự phát triển của khả năng kháng hóa chất. Đồ thị này chỉ ra năm đưa vào các hóa chất khác nhau và R cho biết năm ghi nhận trường hợp kháng thuốc đầu tiên Waller, P.J., *Acta Tropica* 56(1994)233-243. Thuốc kháng vi sinh vật: SULHPA; sulphonamit, PEN, penixilin; STREP, streptomycin. Chất diệt côn trùng: DDT, dicophan; CYCLO, xyclodien; OP, phosphat hữu cơ; SP, pyrethroit tổng hợp. Chất diệt nấm: AH, hydrocarbon thơm; DOD, dodin; BZ, benzimidazol; DCB, dicarboxamit. Thuốc diệt giun sán: BZ, benzimidazol; LEV, levamisol; AVM, avermectin.

Fig. 3: Là sơ đồ thể hiện ấu trùng giun tròn được bắt giữ bởi *D. flagrans*. Ấu trùng được bắt giữ trong lưới dính chứa nhiều các vòng chắc. Ở phần tiếp xúc, thân của vật ký sinh bị xâm nhập theo đó sợi nấm kéo dài ra để tăng trưởng và lấp đầy thân của giun tròn để tiết diệt hiệu quả giun tròn. Các cơ quan bên trong cuối cùng được hòa tan và hấp thụ. Các đường chấm chấm thể hiện khuẩn ty của nấm bên trong vật ký sinh.

Fig. 4a: Phương pháp tính lượng trứng trong phân (FEC).

Fig. 4b: Phương pháp thử nghiệm làm giảm số lượng trứng trong phân (FECRT)

Fig. 5: Thông tin sản phẩm của Livamol®

Fig. 6: Là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm thực địa trên trâu bò (thử nghiệm trâu bò 1) bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế như được mô tả trong Ví dụ 7 và bảng 3.

Fig. 7: Là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm thực địa trên trâu bò (thử nghiệm trâu bò 2) bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế như được mô tả trong Ví dụ 7 và bảng 3.

Fig. 8: Là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm thực địa trên dê (Thử nghiệm trên dê 1) bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế như được mô tả trong ví dụ 7 và bảng 3.

Fig. 9: Là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm thực địa trên dê (Thử nghiệm trên dê 2) bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế như được mô tả trong ví dụ 7 và bảng 3.

Fig. 10: Là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm thực địa trên dê (Thử nghiệm trên dê 3) bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế như được mô tả trong ví dụ 7 và bảng 3.

Fig. 11: Là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm thực địa trên ngựa (Thử nghiệm trên ngựa 1) bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế như được mô tả trong ví dụ 7 và bảng 3.

Fig. 12: Là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm thực địa trên ngựa (Thử nghiệm trên ngựa 2) bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế như được mô tả trong ví dụ 7 và bảng 3.

Fig. 13: Là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm thực địa trên ngựa (Thử nghiệm trên ngựa 3) bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế như được mô tả trong ví dụ 7 và bảng 4.

Fig. 14: Là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm thực địa trên cừu (Thử nghiệm trên cừu 1) bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế như được mô tả trong ví dụ 7 và bảng 4.

Fig. 15: Là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm thực địa trên cừu (Thử nghiệm trên cừu 2) bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế như được mô tả trong ví dụ 7 và bảng 4.

Fig. 16: Là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm thực địa trên cừu (Thử nghiệm trên cừu 3) bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế như được mô tả trong ví dụ 7 và bảng 4.

Fig. 17: Là đồ thị thể hiện kết quả thử nghiệm thực địa trên cừu (Thử nghiệm trên cừu 4) bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế như được mô tả trong ví dụ 7 và bảng 4.

Mô tả chi tiết sáng chế

Không bị ràng buộc ở lý thuyết cụ thể bất kỳ, tác giả sáng chế cho rằng khi chế phẩm theo sáng chế được cho động vật chăn thả ăn, thì bào tử thành dày của *D. flagrans*

(tốt hơn là bào tử vách dày) vẫn không bị tác động, chống lại việc tiêu hóa và đi qua đường tiêu hóa và cuối cùng đổ vào phân. Bào tử *D. flagrans* của chế phẩm nảy nở trong phân và tạo ra cơ quan bắt giữ để bắt giữ ấu trùng của giun tròn ký sinh và tiêu diệt chúng nhờ đó làm gián đoạn vòng đời của giun tròn ký sinh trong động vật chăn thả. Nhờ đó kiểm soát sự lan tràn của giun tròn từ phân lên trên cánh đồng bằng cách làm giảm số lượng ấu trùng nảy nở từ phân. Bằng cách kiểm soát sự nảy nở của ấu trùng từ phân, chế phẩm theo sáng chế kiểm soát sự lan tràn của giun tròn ký sinh của động vật chăn thả nhờ đó làm giảm khả năng lây nhiễm của giun tròn ký sinh. Ấu trùng bao gồm ví dụ ấu trùng L1, L2 và/hoặc L3. Tốt hơn là, chế phẩm làm giảm sự nảy nở của ấu trùng L3 từ phân và/hoặc trên cánh đồng. Do đó, hiển nhiên với chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này rằng thuật ngữ “kiểm soát sự lan tràn của giun tròn” bao gồm kiểm soát sự lan tràn của giun tròn ký sinh của động vật chăn thả. Cần phải hiểu rằng việc kiểm soát sự lan tràn của vật ký sinh trong động vật chăn thả có nghĩa là làm giảm khả năng lây nhiễm giun tròn ký sinh nhờ đó quần thể nguồn bệnh thấp hơn mức ngưỡng khi đó các vấn đề lâm sàng và/hoặc tổn thất kinh tế của vật nuôi (động vật chăn thả) được giảm xuống.

Ví dụ, chế phẩm theo sáng chế làm gián đoạn vòng đời của giun tròn ký sinh ở động vật chăn thả và kiểm soát sự lan tràn của giun tròn khi mức giảm ấu trùng trong phân và/hoặc trên đồng cỏ là giảm trong khoảng từ 30% đến 100%, hoặc 35% đến 100%, hoặc 40% đến 100%, hoặc 45% đến 100%, hoặc 50% đến 100%, hoặc 55% đến 100%, hoặc 60% đến 100%, hoặc 65% đến 100%, hoặc 70% đến 100%, hoặc 75% đến 100%, hoặc 80% đến 100%, hoặc 85% đến 100%, hoặc 90% đến 100%, hoặc 95% đến 100%, hoặc khoảng 100%. Tốt hơn là, chế phẩm theo sáng chế làm gián đoạn vòng đời của giun tròn ký sinh ở động vật chăn thả và kiểm soát sự lan tràn của giun tròn khi mức giảm ấu trùng trong phân và/hoặc trên đồng cỏ là được giảm trong khoảng từ 50% đến 100%, tốt hơn nữa là trong khoảng từ 70 đến 100%, còn tốt hơn nữa là trong khoảng từ 80 đến 100%. Trong một ví dụ, chế phẩm theo sáng chế làm gián đoạn vòng đời của giun tròn ký sinh trong động vật chăn thả và kiểm soát sự lan tràn của giun tròn khi mức giảm ấu trùng trong phân

và/hoặc trên đồng cỏ là được giảm trong khoảng từ khoảng 50%, hoặc 55%, hoặc 60%, hoặc 65%, hoặc 70%, hoặc 75%, hoặc 80%, hoặc 85%, hoặc 90%, hoặc 95%, hoặc 100%.

Chế phẩm theo sáng chế cũng là chế phẩm thích hợp để ứng dụng thương mại tức là sử dụng cho động vật bị nhốt trong trang trại bao gồm các trang trại thương mại lớn, và/hoặc động vật bị nhốt trong khu đất có rào vây quanh và/hoặc vườn thú. Do đó, nên hiểu rằng chế phẩm theo sáng chế thích hợp để ứng dụng thương mại và có thể được sử dụng trực tiếp cho động vật chăn thả ăn và/hoặc bằng cách trộn vào trong thức ăn và/hoặc được cung cấp dưới dạng thức ăn bổ sung, hoặc chế phẩm theo sáng chế có thể được phối chế thêm và được cung cấp dưới dạng thức ăn, thức ăn bổ sung, viên thức ăn hoặc thuốc thú y. Thức ăn hoặc thức ăn bổ sung có thể là dạng bất kỳ thích hợp cho động vật chăn thả ăn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở; hỗn hợp dạng tơi, thức ăn/chế phẩm bổ sung dạng lỏng, viên hoặc khối để liếm.

Tốt hơn là chế phẩm theo sáng chế là sản phẩm thương mại có ít nhất là một hoặc nhiều đặc điểm sau:

Đặc điểm 1: Có thể sản xuất được với lượng đủ lớn để cho phép triển khai vào hệ thống chăn thả thương mại.

Đặc điểm 2: Có hiệu quả sau khi sản xuất trên quy mô lớn và năng suất trên trang trại và/hoặc động vật bị nhốt trong khu đất có rào bao quanh và/hoặc vườn thú theo yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Đặc điểm 3: An toàn cho động vật tiếp nhận và người huấn luyện chúng.

Đặc điểm 4: Độ ổn định và thời gian bảo quản. Tốt hơn là, sản phẩm kiểm soát sinh học có thời gian bảo quản ít nhất là 12 tháng, hoặc ít nhất là 18 tháng hoặc lâu hơn ở nhiệt độ trong phòng (lên đến 30°C).

Đặc điểm 5: Dạng vật lý thích hợp. Dạng vật lý của sản phẩm nên được làm thích hợp với mục đích sử dụng cuối cùng của nó tức là chảy tự do và dễ pha trộn với thức ăn gia súc.

Đặc điểm 6: Vị ngon - do sản phẩm này được dự định để dùng qua đường miệng thường xuyên trong thức ăn, nên hương vị và kết cấu nên chấp nhận được đối với động vật tiếp nhận.

Đặc điểm 7: Kích thước gói / bao gói - mong muốn có bao gói bền chắc, dễ xử lý ở trang trại và kích thước thích hợp cho người dùng cuối.

Đặc điểm 8: Độ tinh khiết - tác nhân vi sinh vật nên được sản xuất ở dạng tinh khiết thích hợp để sử dụng an toàn cho động vật.

Đặc điểm 9: Phù hợp để sử dụng trong các tình huống cho ăn riêng lẻ hoặc cho ăn theo nhóm. Đôi khi, động vật chăn thả sẽ được cho ăn trên cơ sở riêng lẻ. Thông thường hơn, động vật chăn thả được cho ăn theo cách cho ăn theo nhóm chẳng hạn máng chung. Điều này có thể dẫn đến tình huống là việc ăn thức ăn của động vật nhút nhát bị cản trở và động vật hung dữ hơn có thể tiêu thụ nhiều hơn so với mức chia sẻ của chúng.

Mặc dù đã có nghiên cứu đáng kể đối với *D. flagrans*, nhưng trước sáng chế, sản phẩm thương mại chưa cung cấp được ít nhất là đặc điểm 1 và 2 nêu trên. Theo một phương án, chế phẩm này bao gồm ít nhất là hai, hoặc ít nhất là ba, hoặc ít nhất là bốn, hoặc ít nhất là năm, hoặc ít nhất là sáu, hoặc ít nhất là bảy, hoặc ít nhất là tám hoặc ít nhất là chín đặc điểm trong số các đặc điểm từ 1 đến 9 nêu trên.

Tốt hơn là, chế phẩm này bao gồm mỗi đặc điểm trong số các đặc điểm 1, 2, 3, 6 và 7. Còn tốt hơn nữa là, chế phẩm này bao gồm mỗi đặc điểm trong số các đặc điểm từ 1 đến 9.

Hiệu quả sau khi sản xuất trên quy mô lớn và hiệu suất trên trang trại và/hoặc động vật bị nhốt trong khu đất có rào bao quanh và/hoặc vườn thú theo yêu cầu bảo hộ kèm theo đề cập một phần đến lượng bào tử sống của *D. flagrans* trong chế phẩm. Như vậy, chế phẩm theo sáng chế chứa số lượng sống được của bào tử *D. flagrans* ít nhất là khoảng 1×10^2 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm.

Theo một phương án, chế phẩm theo sáng chế chứa số lượng sống được của bào tử *D. flagrans* trong khoảng từ 1×10^2 đến 1×10^{10} bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm. Ví dụ, chế phẩm theo sáng chế chứa số lượng sống được của bào tử *D. flagrans* là:

1×10^2 đến 1×10^3 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

1×10^3 đến 1×10^4 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

1×10^4 đến 1×10^5 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

1×10^5 đến 1×10^6 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

1×10^6 đến 1×10^7 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

1×10^7 đến 1×10^8 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

1×10^8 đến 1×10^9 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

1×10^9 đến 1×10^{10} bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm.

Tốt hơn là chế phẩm theo sáng chế chứa số lượng sống được của bào tử *D. flagrans* trong khoảng từ 1×10^2 đến 1×10^8 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm.

Theo một phương án khác, chế phẩm theo sáng chế chứa số lượng sống được của bào tử *D. flagrans* là

(a) 1×10^2 đến 5×10^6 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

1×10^2 hoặc 1×10^6 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

1×10^3 đến 1×10^6 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

1×10^3 đến 5×10^5 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

1×10^4 đến 5×10^5 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

1×10^4 đến 1×10^5 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

(b) 1×10^4 đến 1×10^8 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

1×10^4 đến 5×10^7 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

1×10^4 đến 1×10^7 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

1×10^5 đến 5×10^6 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

1×10^5 đến 1×10^6 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc

- (c) 1×10^5 đến 1×10^8 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc 1×10^5 đến 1×10^7 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm, hoặc 1×10^6 đến 1×10^7 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm.

Trong một ví dụ khác, chế phẩm theo sáng chế chứa số lượng sống được của bào tử *D. flagrans* là

- (d) khoảng 1×10^2 , hoặc khoảng $1,5 \times 10^2$, hoặc khoảng 2×10^2 , hoặc khoảng $2,5 \times 10^2$, hoặc khoảng 3×10^2 , hoặc khoảng $3,5 \times 10^2$, hoặc khoảng 4×10^2 , hoặc khoảng $4,5 \times 10^2$, hoặc khoảng 5×10^2 , hoặc khoảng $5,5 \times 10^2$, hoặc khoảng 6×10^2 , hoặc khoảng $6,5 \times 10^2$, hoặc khoảng 7×10^2 , hoặc khoảng $7,5 \times 10^2$, hoặc khoảng 8×10^2 , hoặc khoảng $8,5 \times 10^2$, hoặc khoảng 9×10^2 , hoặc khoảng $9,5 \times 10^2$; hoặc;
- (e) khoảng 1×10^3 , hoặc khoảng $1,5 \times 10^3$, hoặc khoảng 2×10^3 , hoặc khoảng $2,5 \times 10^3$, hoặc khoảng 3×10^3 , hoặc khoảng $3,5 \times 10^3$, hoặc khoảng 4×10^3 , hoặc khoảng $4,5 \times 10^3$, hoặc khoảng 5×10^3 , hoặc khoảng $5,5 \times 10^3$, hoặc khoảng 6×10^3 , hoặc khoảng $6,5 \times 10^3$, hoặc khoảng 7×10^3 , hoặc khoảng $7,5 \times 10^3$, hoặc khoảng 8×10^3 , hoặc khoảng $8,5 \times 10^3$, hoặc khoảng 9×10^3 , hoặc khoảng $9,5 \times 10^3$; hoặc;
- (f) khoảng 1×10^4 , hoặc khoảng $1,5 \times 10^4$, hoặc khoảng 2×10^4 , hoặc khoảng $2,5 \times 10^4$, hoặc khoảng 3×10^4 , hoặc khoảng $3,5 \times 10^4$, hoặc khoảng 4×10^4 , hoặc khoảng $4,5 \times 10^4$, hoặc khoảng 5×10^4 , hoặc khoảng $5,5 \times 10^4$, hoặc khoảng 6×10^4 , hoặc khoảng $6,5 \times 10^4$, hoặc khoảng 7×10^4 , hoặc khoảng $7,5 \times 10^4$, hoặc khoảng 8×10^4 , hoặc khoảng $8,5 \times 10^4$, hoặc khoảng 9×10^4 , hoặc khoảng $9,5 \times 10^4$; hoặc
- (g) khoảng 1×10^5 , hoặc khoảng $1,5 \times 10^5$, hoặc khoảng 2×10^5 , hoặc khoảng $2,5 \times 10^5$, hoặc khoảng 3×10^5 , hoặc khoảng $3,5 \times 10^5$, hoặc khoảng 4×10^5 , hoặc khoảng $4,5 \times 10^5$, hoặc khoảng 5×10^5 , hoặc khoảng $5,5 \times 10^5$, hoặc khoảng 6×10^5 , hoặc khoảng $6,5 \times 10^5$, hoặc khoảng 7×10^5 , hoặc khoảng $7,5 \times 10^5$, hoặc

khoảng 8×10^5 , hoặc khoảng $8,5 \times 10^5$, hoặc khoảng 9×10^5 , hoặc khoảng $9,5 \times 10^5$; hoặc

- (h) khoảng 1×10^6 , hoặc khoảng $1,5 \times 10^6$, hoặc khoảng 2×10^6 , hoặc khoảng $2,5 \times 10^6$, hoặc khoảng 3×10^6 , hoặc khoảng $3,5 \times 10^6$, hoặc khoảng 4×10^6 , hoặc khoảng $4,5 \times 10^6$, hoặc khoảng 5×10^6 , hoặc khoảng $5,5 \times 10^6$, hoặc khoảng 6×10^6 , hoặc khoảng $6,5 \times 10^6$, hoặc khoảng 7×10^6 , hoặc khoảng $7,5 \times 10^6$, hoặc khoảng 8×10^6 , hoặc khoảng $8,5 \times 10^6$, hoặc khoảng 9×10^6 , hoặc khoảng $9,5 \times 10^6$, hoặc
- (i) khoảng 1×10^7 , hoặc khoảng $1,5 \times 10^7$, hoặc khoảng 2×10^7 , hoặc khoảng $2,5 \times 10^7$, hoặc khoảng 3×10^7 , hoặc khoảng $3,5 \times 10^7$, hoặc khoảng 4×10^7 , hoặc khoảng $4,5 \times 10^7$, hoặc khoảng 5×10^7 , hoặc khoảng $5,5 \times 10^7$, hoặc khoảng 6×10^7 , hoặc khoảng $6,5 \times 10^7$, hoặc khoảng 7×10^7 , hoặc khoảng $7,5 \times 10^7$, hoặc khoảng 8×10^7 , hoặc khoảng $8,5 \times 10^7$, hoặc khoảng 9×10^7 , hoặc khoảng $9,5 \times 10^7$, hoặc
- (j) khoảng 1×10^8 , hoặc khoảng $1,5 \times 10^8$, hoặc khoảng 2×10^8 , hoặc khoảng $2,5 \times 10^8$, hoặc khoảng 3×10^8 , hoặc khoảng $3,5 \times 10^8$, hoặc khoảng 4×10^8 , hoặc khoảng $4,5 \times 10^8$, hoặc khoảng 5×10^8 , hoặc khoảng $5,5 \times 10^8$, hoặc khoảng 6×10^8 , hoặc khoảng $6,5 \times 10^8$, hoặc khoảng 7×10^8 , hoặc khoảng $7,5 \times 10^8$, hoặc khoảng 8×10^8 , hoặc khoảng $8,5 \times 10^8$, hoặc khoảng 9×10^8 , hoặc khoảng $9,5 \times 10^8$, hoặc
- (k) khoảng 1×10^9 , hoặc khoảng $1,5 \times 10^9$, hoặc khoảng 2×10^9 , hoặc khoảng $2,5 \times 10^9$, hoặc khoảng 3×10^9 , hoặc khoảng $3,5 \times 10^9$, hoặc khoảng 4×10^9 , hoặc khoảng $4,5 \times 10^9$, hoặc khoảng 5×10^9 , hoặc khoảng $5,5 \times 10^9$, hoặc khoảng 6×10^9 , hoặc khoảng $6,5 \times 10^9$, hoặc khoảng 7×10^9 , hoặc khoảng $7,5 \times 10^9$, hoặc khoảng 8×10^9 , hoặc khoảng $8,5 \times 10^9$, hoặc khoảng 9×10^9 , hoặc khoảng $9,5 \times 10^9$, hoặc khoảng 1×10^{10}

bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm.

Tốt hơn nữa là, chế phẩm theo sáng chế chứa số lượng sống được của bào tử *D. fragrans* bào tử là

- (a) khoảng 1×10^4 , khoảng 3×10^4 , hoặc khoảng 1×10^5 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm; hoặc
- (b) khoảng 1×10^5 , khoảng 5×10^5 hoặc khoảng 1×10^6 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm; hoặc
- (c) khoảng 1×10^6 , khoảng 3×10^6 hoặc khoảng 1×10^7 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm; hoặc
- (d) khoảng 3×10^6 , khoảng 1×10^7 hoặc khoảng 1×10^8 bào tử sống cho mỗi gam chế phẩm.

Chế phẩm được điều chế theo phương pháp thích hợp bất kỳ để tạo ra chủng *D. fragrans* và/hoặc bào tử của chủng *D. fragrans* phân lập được. Tốt hơn là bào tử là bào tử vách dày. Tốt hơn là, phương pháp là phương pháp lên men để cung cấp bào tử sống *D. fragrans* cho mỗi gam chế phẩm theo sáng chế. Trong một ví dụ, chủng *D. fragrans* và/hoặc bào tử của chủng *D. fragrans* phân lập được được tạo ra bằng cách lên men trên cơ chất rắn. Tốt hơn là, cơ chất rắn là ngũ cốc nguyên cám, quả đậu hoặc hạt có dầu được làm ẩm. Ngũ cốc nguyên cám được sử dụng có thể là ngũ cốc nguyên cám thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng cho mục đích bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, lúa mạch, lúa mạch đen, kê, lúa gạo, lúa mì, lúa miến, tiểu hắc mạch, yến mạch, kiều mạch, rau dền, ngô, diêm mạch, hạt teff hoặc đậu lupin. Cơ chất rắn cũng có thể bao gồm hạt đậu được làm ẩm bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, đậu gà, đậu răng ngựa, đậu hà lan, thiết đậu, đậu lupin hoặc đậu xanh; hoặc cơ chất có thể là hạt lấy dầu bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở đậu nành, hạt cải dầu, cây rum, hạt hướng dương và hạt vừng. Ví dụ, phương pháp này có thể là phương pháp được mô tả trong các ví dụ 2 và 3.

Cũng nên hiểu rằng chế phẩm này có thể có dạng bất kỳ sao cho chế phẩm này thích hợp để ứng dụng thương mại như được mô tả ở đây. Ví dụ, chế phẩm này có thể ở dạng chế phẩm đặc bào tử chứa khuẩn ty của *D. fragrans* và/hoặc bào tử của *D. fragrans*, trong

đó tốt hơn là các bào tử này là bào tử vách dày. Ví dụ, khi quá trình lên men trên cơ chất rắn được sử dụng, ngũ cốc nguyên cám có thể được làm khô hoặc được nghiền để tạo ra chế phẩm theo sáng chế, trong đó ngũ cốc nguyên cám này chứa khuẩn ty của *D. flagrans* và/hoặc bào tử của *D. flagrans*, trong đó tốt hơn là bào tử là bào tử vách dày.

Được dự định là chế phẩm theo khía cạnh, phương án, hoặc ví dụ bất kỳ ở đây, bao gồm chế phẩm đặc bào tử được mô tả ở đây, có thể được trộn với hoặc được điều chế thành thức ăn, thức ăn bổ sung, viên thức ăn hoặc thuốc thú y. Thức ăn hoặc thức ăn bổ sung có thể là dạng bất kỳ thích hợp cho động vật chăn thả ăn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở; hỗn hợp dạng tươi, thức ăn/chế phẩm bổ sung dạng lỏng, viên hoặc khối để liếm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chế phẩm theo khía cạnh, phương án, hoặc ví dụ bất kỳ ở đây để sản xuất thức ăn ở dạng bất kỳ, thức ăn bổ sung, viên thức ăn hoặc thuốc thú y để kiểm soát sự lan tràn của giun tròn ký sinh ở động vật chăn thả.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chế phẩm theo khía cạnh, phương án, hoặc ví dụ bất kỳ ở đây để kiểm soát sự lan tràn của giun tròn ký sinh ở động vật chăn thả.

Chế phẩm theo khía cạnh, phương án, hoặc ví dụ bất kỳ ở đây cũng có thể được phối chế để dùng để dễ dàng cung cấp lượng bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày. Theo một phương án, chế phẩm này được phối chế để dùng nhằm cung cấp ít nhất là khoảng 1×10^3 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm này được phối chế để dùng nhằm cung cấp

1×10^3 đến 5×10^8 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến $2,5 \times 10^8$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến 1×10^8 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả

mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến 5×10^7 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả
mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến $2,5 \times 10^7$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả
mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến 1×10^7 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả
mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến 5×10^6 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả
mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến $2,5 \times 10^6$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả
mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến 1×10^6 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả
mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến 5×10^5 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả
mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến $2,5 \times 10^5$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả
mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến 1×10^5 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả
mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến 5×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả
mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến $2,5 \times 10^4$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả
mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến 1×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả
mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến 9×10^3 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả
mỗi ngày.

Tốt hơn là chế phẩm này được phối chế để dùng nhằm cung cấp 1×10^4 đến 1×10^5 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày.

Ví dụ, chế phẩm này được phối chế để dùng nhằm cung cấp:

khoảng 1×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng $1,5 \times 10^4$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng 2×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng $2,5 \times 10^4$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng 3×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng $3,5 \times 10^4$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng 4×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng $4,5 \times 10^4$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng 5×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng $5,5 \times 10^4$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng 6×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng $6,5 \times 10^4$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng 7×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng $7,5 \times 10^4$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng 8×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày,

hoặc

khoảng $8,5 \times 10^4$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng 9×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày hoặc

khoảng 1×10^5 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày.

Tốt hơn nữa là, chế phẩm hoặc sản phẩm kiểm soát sinh học được phối chế để dùng nhằm cung cấp khoảng 1×10^4 , khoảng 3×10^4 hoặc khoảng 1×10^5 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày. Tốt nhất là, chế phẩm hoặc sản phẩm kiểm soát sinh học được phối chế để dùng nhằm cung cấp lượng bào tử *D. flagrans* sống được là khoảng 3×10^4 bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày. Cũng nên hiểu rằng chế phẩm theo sáng chế có thể được phối chế để dùng nhằm cung cấp lượng chuẩn, như mong muốn, của chế phẩm trong đó các lượng nêu trên của bào tử sống được cung cấp mỗi ngày.

Cũng được dự định là “các thành phần bổ sung” có thể được bổ sung vào chế phẩm theo sáng chế mà cũng có thể kiểm soát sự lan tràn của vật ký sinh trong động vật chăn thả ví dụ, các thành phần cung cấp tác dụng “tấn công kép”. Các thành phần bổ sung như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, thuốc diệt giun sán (như abamectin, ivermectin,

pyrantel pamoat, peletierin sulphat) mà có tác dụng kháng giun tròn; hoặc như benzimidazol (BZ), mà cũng là chất diệt trùng (với hoạt độ kháng trùng được truyền qua giun tròn trong ruột và sản dâ), lacton vòng lớn (macrocyclic lactones - ML), imidazothiazol và tetrahydropyrimidin (LV), salixylanilit, nitazoxanit, praziquantel, octadesipeptit (ví dụ emodepsit), derquantel (spiroindol) và các dẫn xuất aminoaxetonitril (AAD) mà có hiệu quả kháng các giun sản khác, các nấm ăn giun tròn khác (như *Purpureocillium lilacinum*, *Stropharia rugosoannulata* hoặc *Coprinus comatus*), tanin, chất khoáng, đất tảo cát, thảo mộc, sản phẩm phụ của nông nghiệp, vacxin hoặc hạt dây oxit đồng (copper oxide wire particles COWP) hoặc tổ hợp của chúng. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm theo khía cạnh, phương án hoặc ví dụ bất kỳ ở đây còn chứa một hoặc nhiều thành phần từ nhóm sau: một hoặc nhiều thuốc diệt giun sản, một hoặc nhiều nấm ăn giun tròn khác, hạt dây oxit đồng (copper oxide wire particles - COWP), tanin, chất khoáng, đất tảo cát, thảo mộc, sản phẩm phụ trong nông nghiệp, một hoặc nhiều vi khuẩn hoặc vacxin. Liều lượng thích hợp của các thành phần bổ sung này sẽ rõ ràng với chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này dựa trên tài liệu khoa học và thương mại (đặc trưng sản phẩm) cũng như kiến thức chung thông thường của chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này. Theo một phương án, chế phẩm này còn chứa COWP. Ví dụ, COWP có thể có mặt trong chế phẩm theo sáng chế với lượng thích hợp để dùng cho động vật với lượng khoảng 10g trong mỗi 100 Kg thể trọng của động vật được điều trị.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát sự lan tràn của giun tròn ký sinh ở động vật chăn thả bao gồm việc dùng chế phẩm theo khía cạnh, phương án hoặc ví dụ bất kỳ ở đây với lượng và trong thời gian đủ để làm giảm số lượng giun tròn ký sinh (giun sản) trên đồng cỏ ít nhất là khoảng 30%. Ví dụ, chế phẩm này được dùng với lượng và trong thời gian đủ để làm giảm số lượng giun tròn ký sinh (giun sản) trên đồng cỏ trong khoảng từ 30% đến 100%, hoặc 35% đến 100%, 40% đến 100%, hoặc 45% đến 100%, hoặc 50% đến 100%, hoặc 55% đến 100%, hoặc 60% đến 100%, 65% đến 100%, hoặc 70% đến 100%, hoặc 75% đến 100%, hoặc 80% đến 100%, hoặc 85% đến 100%, hoặc 90% đến 100%, 95% đến 100%, hoặc khoảng 100%. Tốt hơn là, chế phẩm này

được dùng với lượng và trong thời gian đủ để làm giảm số lượng của giun tròn ký sinh (giun sán) trên đồng cỏ trong khoảng từ 50% đến 100%, tốt hơn nữa là trong khoảng từ 60 đến 100%.

Hiển nhiên với chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này rằng thời gian đủ để làm giảm số lượng giun tròn ký sinh (giun sán) trên đồng cỏ có thể khác nhau theo loại động vật chăn thả, tình trạng sức khỏe và/hoặc khối lượng của động vật, và/hoặc điều kiện của đồng cỏ, thời điểm trong năm, nhiệt độ và/hoặc khí hậu và sẽ được xác định bởi người sử dụng hoặc chuyên gia tư vấn kỹ thuật của họ.

Do sự phát triển của khả năng kháng thuốc và kháng nhiều loại thuốc đối với các hóa chất diệt giun sán, các nhà khoa học trên toàn thế giới đề xuất sử dụng số lượng trứng trong phân (faecal egg counts - FEC) để chỉ ra rằng động vật chăn thả nào cần tẩy giun sán và khi nào. Đã có đề xuất rằng thử nghiệm giảm số lượng trứng trong phân (faecal egg-count reduction test - FECRT) được thực hiện theo thời gian để kiểm tra thuốc diệt giun sán được sử dụng có hiệu quả hay không và/hoặc để xác định loài giun sán bằng cách sử dụng nuôi cấy ấu trùng trong phân (faecal larval cultures - FLC). <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0037327>.

Ví dụ, thời gian đủ để làm giảm số lượng của giun tròn ký sinh (giun sán) trên đồng cỏ ít nhất là một tuần, hoặc ít nhất là 2 tuần, hoặc ít nhất là 3 tuần, hoặc ít nhất là 4 tuần, hoặc ít nhất là 5 tuần, hoặc ít nhất là 6 tuần, hoặc ít nhất là 7 tuần, hoặc ít nhất là 8 tuần, hoặc ít nhất là 9 tuần, hoặc ít nhất là 10 tuần, hoặc trong khoảng từ 1 đến 26 tuần, hoặc 1 đến 15 tuần, hoặc 1 đến 10 tuần, hoặc 1 đến 8 tuần, hoặc 1 đến 6 tuần, hoặc 1 đến 5 tuần, hoặc 1 đến 4 tuần, hoặc 1 đến 3 tuần, hoặc 2 đến 15 tuần, hoặc 2 đến 10 tuần, hoặc 2 đến 8 tuần, hoặc 2 đến 6 tuần, hoặc 2 đến 5 tuần, hoặc 2 đến 4 tuần, hoặc 2 đến 3 tuần. Tốt hơn là, thời gian đủ để làm giảm số lượng của giun tròn ký sinh (giun sán) trên đồng cỏ là trong khoảng từ 2 đến 26 tuần. Theo một phương án của sáng chế, thời gian này nằm trong khoảng từ 12 đến 20 tuần, và cụ thể là 12 đến 16 tuần.

Dự định là chế phẩm theo sáng chế theo khía cạnh, phương án hoặc ví dụ bất kỳ ở đây có thể được dùng trong khoảng thời gian bất kỳ, thậm chí sau khi số lượng của giun

tròn ký sinh (giun sán) trên đồng cỏ đã được giảm. Ví dụ, chế phẩm này có thể được dùng ít nhất một tuần, hoặc có thể được tiếp tục vô thời hạn.

Hiển nhiên với chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này rằng lượng đủ để làm giảm số lượng của giun tròn ký sinh (giun sán) trên đồng cỏ theo phương pháp của sáng chế là lượng bào tử *D. flagrans* sống được chứa trong chế phẩm được dùng cho động vật chăn thả và sẽ khác nhau theo cân nặng của động vật, và sẽ được xác định bởi người sử dụng hoặc chuyên gia tư vấn kỹ thuật của họ.

Theo một phương án, theo phương pháp của sáng chế, lượng được dùng chứa bào tử *D. flagrans* sống ít nhất là khoảng 1×10^3 bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày. Theo một phương án khác, theo phương pháp của sáng chế, lượng được dùng chứa bào tử *D. flagrans* sống nằm trong khoảng từ

1×10^3 đến 5×10^8 bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc 1×10^3 đến $2,5 \times 10^8$ bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến 1×10^8 bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc 1×10^3 đến 5×10^7 bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc 1×10^3 đến $2,5 \times 10^7$ bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến 1×10^7 bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc 1×10^3 đến 5×10^6 bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc 1×10^3 đến $2,5 \times 10^6$ bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến 1×10^6 bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc 1×10^3 đến 5×10^5 bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc 1×10^3 đến $2,5 \times 10^5$ bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến 1×10^5 bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc 1×10^3 đến 5×10^4 bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến $2,5 \times 10^4$ bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

1×10^3 đến 1×10^4 bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày.

Ví dụ, theo phương pháp của sáng chế, lượng được dùng chứa bào tử *D. flagrans* sống là

khoảng 1×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng $1,5 \times 10^4$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng 2×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng $2,5 \times 10^4$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng 3×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng $3,5 \times 10^4$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng 4×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng $4,5 \times 10^4$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng 5×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng $5,5 \times 10^4$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày,

hoặc

khoảng 6×10^4 bào tử *D. flagrans* sống được cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng $6,5 \times 10^4$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng 7×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng $7,5 \times 10^4$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng 8×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng $8,5 \times 10^4$ bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày, hoặc

khoảng 9×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày,

hoặc

khoảng 1×10^5 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày.

Tốt hơn là, theo phương pháp của sáng chế, lượng được dùng chứa khoảng 1×10^4 đến 1×10^5 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày. Tốt hơn nữa là, lượng được dùng chứa khoảng 1×10^4 , khoảng 3×10^4 hoặc khoảng 1×10^5 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày. Tốt nhất là, lượng được dùng chứa khoảng 3×10^4 bào tử *D. flagrans* sống cho mỗi Kg thể trọng của động vật chăn thả mỗi ngày.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chương trình quản lý vật ký sinh được tích hợp (integrated parasite management - IPM) để kiểm soát sự lan tràn của giun tròn ký sinh của động vật chăn thả, trong đó chương trình IPM này bao gồm như sau:

- a) Điều trị cho động vật chăn thả bằng chế phẩm có tác dụng trừ giun sán kháng giun tròn ký sinh;
- b) Chuyển động vật chăn thả sang đồng cỏ sạch, nếu có thể, mà bị lây nhiễm tối thiểu hoặc không chứa ấu trùng của giun tròn ký sinh; và
- c) Dùng chế phẩm bằng cách thực hiện phương pháp theo khía cạnh, phương án hoặc ví dụ bất kỳ ở đây.

Sẽ rõ ràng với chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này rằng thuốc trừ giun sán bất kỳ có thể sử dụng trong điều trị giun tròn ký sinh có thể được sử dụng để điều trị cho động vật chăn thả. Cụ thể là, ví dụ, abamectin, ivermectin, pyrantel pamoat và peletierin sulphat có thể sử dụng thuốc diệt giun sán trong sáng chế. Sau khi giới thiệu phenothiazin vào những năm 1950, việc kiểm soát vật ký sinh trong dạ dày ruột đã đạt được bằng cách sử dụng thuốc diệt giun sán hóa học và chủ yếu dựa vào việc điều trị bằng thuốc diệt vật ký sinh phổ rộng thuộc ba nhóm hóa chất chính: benzimidazol (BZ), lacton vòng lớn (ML) và imidazothiazol/tetrahydropyrimidin (LV). Mặc dù một số thuốc diệt giun sán, bao gồm derquantel (spiroindol) và monepantel (dẫn xuất amino-axetonitril, AAD) đã được phát triển, nhưng thành công trong việc phát hiện thuốc diệt giun sán mới vẫn bị hạn chế trong hai thập kỷ qua. Các thuốc diệt giun sán trên có thể được dùng dưới dạng tổ hợp của một hoặc nhiều chất này. Các liều lượng thích hợp của thuốc trừ giun sán sẽ rõ ràng với chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này và sẽ phụ thuộc vào các thông số thông thường như bản chất của thuốc trừ giun sán, loài động vật, thể trọng của động vật, tình trạng kháng hóa chất của động vật hoặc nhóm và điều kiện khí hậu v.v.

Sẽ hiển nhiên với chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này rằng đồng cỏ sạch ở b) trong khía cạnh trước đó có thể được chuẩn bị theo phương pháp bất kỳ. Tốt hơn là, nếu có thể, đồng cỏ sạch ở mục b) được chuẩn bị bằng cách không chăn thả trên đồng cỏ loài tương tự trong khoảng thời gian khoảng 6 tuần hoặc lâu hơn.

Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng “kiểm soát sinh học” có nghĩa là kiểm soát vật gây hại bằng cách đưa vào kẻ địch hoặc thiên địch tự nhiên.

Trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ “chế phẩm kiểm soát sinh học” bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, thuốc trừ vật gây hại sinh học dùng trong nông nghiệp, hóa chất sinh học dùng trong thú y, chất phụ gia thức ăn, và các sản phẩm có thể sử dụng để kiểm soát vật gây hại trong nông nghiệp.

Phù hợp với các ví dụ và phần mô tả của sáng chế, chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng trong ngữ cảnh của sáng chế khi viện dẫn đến dạng số ít của danh từ ví dụ bào tử, thì dạng số nhiều cũng được bao gồm. Cụ thể, ví dụ, chế phẩm này chứa bào tử bao gồm chế phẩm chứa nhiều bào tử. Với vai trò là một ví dụ nữa, khi nói đến việc điều trị cho động vật bao gồm cả điều trị cho đàn hoặc bầy động vật hoặc nhóm tập hợp bất kỳ của chúng.

Thuật ngữ “động vật chăn thả” theo khía cạnh, ví dụ, hoặc phương án bất kỳ ở đây bao gồm động vật chăn thả quý hiếm (không là động vật nuôi) hoặc động vật nuôi và bao gồm nhưng không bị giới hạn ở cả động vật nhai lại quý hiếm (không là động vật nuôi) hoặc động vật nuôi. Ví dụ, động vật nuôi chăn thả được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, ngựa, dê, cừu, trâu bò, hươu và lạc đà (như lạc đà alpacas và lạc đà không bướu). Trong một ví dụ khác, động vật không phải là động vật nuôi hoặc động vật quý hiếm được chọn từ loài guốc chẵn bao gồm nhưng không bị giới hạn ở hươu cao cổ, linh dương, hươu, linh dương oryx, linh dương đen Đông Phi, linh dương đen Ấn Độ, linh dương bongo, hươu đuôi vằn và linh dương đầu bò. Tốt hơn là, động vật quý hiếm theo sáng chế là động vật được nhốt trong khu đất có rào bao quanh, ví dụ trong vườn thú. Trong một ví dụ khác, động vật chăn thả được chọn từ các động vật bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, động vật có một dạ dày, động vật nhai lại, động vật họ lạc đà và động vật giả nhai lại (động vật nuôi, động vật không phải động vật nuôi hoặc động vật quý hiếm). Trong một ví dụ khác, động vật chăn thả được chọn từ động vật nuôi hoặc động vật hoang dã.

Cũng nên hiểu rằng thuật ngữ “giun tròn ký sinh” theo khía cạnh, ví dụ, hoặc phương án bất kỳ ở đây bao gồm giun tròn ký sinh bất kỳ mà được biết, hoặc sau đó được phát hiện mà lây nhiễm vào động vật chăn thả. Ví dụ giun tròn ký sinh là bất kỳ trong số một hoặc nhiều giun tròn thuộc *Stronglyus spp.*, *Cyathostomum spp.*, *Triodontophorous spp.*,

Trichonema spp., *Oesophagodontus* spp., *Gyalocephalus* spp., *Cylicocylus* spp., *Cylicodontophorus* spp., *Cylicostephanus* spp., *Gongylonema* spp., *Habronema* spp., *Mecistocirrus* spp., *Oxyuris* spp., *Parascaris* spp., *Skrjabinema* spp., *Strongyloides* spp., *Toxocara* spp., *Dictyocaulis* spp., *Muellerius* spp., *Protostrongylus* spp., *Onchocerca* spp., *Parafilaria* spp., *Setaria* spp., *Stephanofilaria* spp., *Thelazia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp., *Bunostomum* spp., *Teladosagia* spp., *Oesophagostomum* spp., *Nematodirus* spp., *Haemonchus* spp., *Chabertia* spp., *Trichuris* spp., và/hoặc *Ostertagia* spp.

Tốt hơn là, giun tròn ký sinh theo khía cạnh, ví dụ hoặc phương án bất kỳ ở đây là một hoặc nhiều giun hai đầu hoặc giun xoắn (*Haemonchus* spp.), giun bờm ngựa hoặc giun bờm ngựa ký sinh trong dạ dày (*Trichostrongylus* spp.), giun ký sinh trong ruột hoặc giun ký sinh trong ruột non (*Cooperia* spp.) và giun móc (*Bunostomum* spp.), giun gây bệnh tiêu chảy (*Trichostrongylus* spp.), giun nâu kích thước nhỏ và trung bình ký sinh trong dạ dày (*Teladosagia* (*Ostertagia*) spp.), giun lươn (*Oesophagostomum* spp.), giun tóc ký sinh trong dạ dày (*Trichostrongylus* spp.), giun kim (*Strongyloides* spp.), giun kết hạt (*Chabertia* spp.), giun tóc (*Trichuris* spp.), giun dây ký sinh trong ruột hoặc giun chỉ (*Nematodirus* spp.), giun đỏ hoặc giun lươn kích thước lớn (bao gồm *Strongylus* spp., *Triodontophorus* spp. và *Oesophagodontus* spp.) và/hoặc giun lươn / giun lươn kích thước nhỏ (bao gồm *Cyathostomum* spp., *Trichonema* spp., *Gyalocephalus* spp., *Cylicocylus* spp., *Cylicodontophorus* spp. và *Cylicostephanus* spp.), giun đũa (*Parascaris* spp.) và giun kim (*Oxyuris* spp.).

Theo một và nhiều phương án, sáng chế tạo ra các ưu điểm sau đây:

- *D. flagrans*, và cụ thể là *D. flagrans* IAH 1297, không được hấp thụ bởi động vật chủ.
- *D. flagrans*, và cụ thể là *D. flagrans* IAH 1297, sống sót đi qua ruột và vào trong phân.
- *D. flagrans*, và cụ thể là *D. flagrans* IAH 1297, vẫn còn ở dạng bào tử là bào tử vách dày cho đến khi gặp các điều kiện môi trường thích hợp phù hợp với giun tròn,

các bào tử này trở nên hoạt động, sau đó nảy nở trong phân nơi mà ấu trùng giun bị bắt giữ, bị làm tê liệt và bị tiêu thụ.

- *D. flagrans* IAH 1297, chứa ít hoặc không chứa các chất chuyển hóa không mong muốn. Nó có mức rất thấp flagranon A, mức không thể phát hiện được của flagranon B và mức không thể phát hiện được của flagranon C. Vì thế sinh vật này nằm trong ngưỡng an toàn của châu Âu hiện nay đối với chất này.
- Như được sử dụng theo sáng chế, *D. flagrans*, và cụ thể là *D. flagrans* IAH 1297, phá vỡ một cách hiệu quả vòng đời của giun sán.
- *D. flagrans*, và cụ thể là *D. flagrans* IAH 1297, được sử dụng theo sáng chế có hiệu quả kháng lại giun sán kháng thuốc và kháng nhiều thuốc.

Trừ khi ngữ cảnh yêu cầu khác đi một cách rõ ràng, thì trong suốt phần mô tả và các điểm yêu cầu bảo hộ, các từ ngữ như “bao gồm”, “có”, và các từ ngữ tương tự, là cần được hiểu với ý nghĩa gồm cả chứ không phải là ý nghĩa loại trừ hay ý nghĩa toàn diện; tức là, với ý nghĩa là “bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở”.

Trong suốt bản mô tả này, trừ khi được quy định khác đi một cách rõ ràng hoặc ngữ cảnh yêu cầu khác, khi nói đến một bước, thành phần vật chất, nhóm các bước hoặc nhóm các thành phần vật chất sẽ được thực hiện để bao gồm một và nhiều (tức là một hoặc nhiều) các bước, các thành phần vật chất, nhóm các bước hoặc nhóm các thành phần vật chất đó.

Mỗi khía cạnh, phương án và/hoặc ví dụ bất kỳ của sáng chế được mô tả ở đây được áp dụng có sửa đổi cụ thể thích hợp cho mỗi khía cạnh, phương án và/hoặc ví dụ bất kỳ trừ khi được quy định cụ thể khác đi.

Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này sẽ đánh giá được rằng sáng chế được mô tả ở đây có thể được biến đổi và sửa đổi khác với những gì được mô tả cụ thể. Cần phải hiểu rằng sáng chế này bao gồm toàn bộ các thay đổi và các cải biến như vậy. Sáng chế cũng gồm tất cả các bước, các dấu hiệu, các chế phẩm và các hợp chất được đề cập hoặc được chỉ rõ trong bản mô tả này; một cách riêng rẽ hoặc một cách kết hợp, và sự kết hợp

bất kỳ và tất cả các kết hợp hoặc hai hoặc nhiều bước hoặc dấu hiệu bất kỳ trong số các bước hoặc các dấu hiệu đã nêu.

Sáng chế không bị giới hạn trong phạm vi của các phương án cụ thể được mô tả ở đây, mà được dự định chỉ nhằm mục đích ví dụ. Các sản phẩm, chế phẩm hoặc phương pháp tương đương về mặt chức năng là rõ ràng trong phạm vi của sáng chế như được mô tả ở đây.

Danh sách các chữ viết tắt:

GIN – giun tròn ký sinh đường tiêu hóa

EP – sản phẩm cuối hoàn chỉnh

MP – sản phẩm nghiên

TGAI – thành phần hoạt tính loại kỹ thuật

LOQ – giới hạn định lượng

LOD – giới hạn phát hiện

HPLC – sắc ký lỏng hiệu năng cao

UV - cực tím

IPM – chương trình quản lý vật gây hại được tích hợp

FEC – số lượng trứng trong phân

FECRT – thử nghiệm làm giảm số lượng trứng trong phân

FLC – giống nuôi cấy ấu trùng trong phân

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng việc tham khảo các ví dụ cụ thể không nhằm mục đích giới hạn mô tả các chế phẩm và phương pháp sử dụng cụ thể. Tuy nhiên, nên hiểu rằng việc mô tả chi tiết các quy trình, chế phẩm và phương pháp cụ thể được bao

gồm chỉ nhằm mục đích giải thích sáng chế. Không nên hiểu theo cách bất kỳ rằng giới hạn về việc mô tả rộng khái niệm của sáng chế là như đã nêu trên.

Ví dụ 1: Phân lập, nuôi cấy và mô tả đặc điểm của *D. flagrans*

Các tác giả sáng chế đã cố gắng xác định thể phân lập *D. flagrans* mà có thể sử dụng để nghiên cứu tiếp nhằm phát triển chế phẩm hoặc sản phẩm kiểm soát sinh học. Không bị ràng buộc ở lý thuyết cụ thể bất kỳ, mong muốn là thể phân lập thích hợp thể hiện mức tăng trưởng khá nhanh và dồi dào, tạo ra lượng lớn bào tử vách dày để dễ dàng tăng quy mô, có khả năng sẵn mồi cao cho hiệu quả giải phóng tối ưu, dễ kiểm soát giải phóng khi làm tác nhân kiểm soát sinh học, không có tác động bất lợi trên sinh vật không phải đích.

25 thể phân lập được kiểm tra và *D. flagrans* IAH 1297 được phát hiện là có tốc độ tăng trưởng, và sản xuất bào tử vách dày tốt, hiệu quả bắt giữ cao và tăng trưởng tốt trên cơ chất dạng hạt so với các chủng khác. Dựa trên các đặc điểm này, thể phân lập *D. flagrans* IAH 1297 nhờ đó được đặt tên là chủng *D. flagrans* IAH 1297 được phân lập theo sáng chế và được nộp lưu ở Viện đo lường quốc gia, 1/153 Bertie Street, Port Melbourne, Victoria 3207, Australia vào 2/8/ 2016 theo yêu cầu của hiệp ước Budapest.

Bằng cách ví dụ không nhằm giới hạn, thử nghiệm dưới đây được sử dụng để xác định các thông số sau.

Thể phân lập nấm

Thể phân lập nấm thu được từ giống cây ban đầu có nguồn gốc từ khảo sát thực địa để phát hiện sự có mặt của nấm ăn giun tròn trong phân, các mẫu phân ủ và đất theo quy trình như được mô tả trong Larsen et al., 1994 (*Veterinary Parasitology* 53:275-281) và sau đó bổ sung vào bộ sưu tập giống nuôi cấy CSIRO. Các giống nuôi cấy truyền được lấy từ dung dịch gốc ban đầu và được giữ trên aga dextroza khoai tây (Potato Dextrose Agar-PDA) vì lý do tinh khiết và khả năng sống bằng cách sử dụng quy trình được nêu dưới đây.

Quy trình nuôi cấy

Các giống nuôi cấy lâu dài được giữ trong chai McCartney PDA 100% để dốc. Các chai này được chuẩn bị bằng cách sử dụng PDA Difco™ có bán trên thị trường theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó 10mL hỗn hợp PDA được tạo huyền phù trong các chai McCartney. Nắp được đặt hờ trên các chai này và được hấp ở 121°C trong 21 phút. Trong khi vẫn còn nóng, nắp đậy được vặn chặt và đặt chai nghiêng góc 45° và sau đó để cho nguội và đông rắn. Chất cấy bào tử sau đó được chuyển từ giống nuôi cấy ban đầu vào bề mặt thạch của chai McCartney bằng cách sử dụng vòng lấy vi khuẩn vô trùng. Các chai McCartney được dán nhãn theo loại môi trường, số ID giống nuôi cấy nấm và ngày cấy, và được lưu giữ trong tủ lạnh ở 4°C để sử dụng trong tương lai.

Các giống nuôi cấy thời gian ngắn có nguồn gốc từ các giống nuôi cấy thời gian dài, được giữ trong các đĩa PDA (đường kính 6 cm). Thạch dextroza khoai tây được chuẩn bị như trên và được hấp trong chai pyrex 1L ở 121°C trong 21 phút. Trong khi vẫn còn nóng, 2mL chất kháng khuẩn ENGEMYCIN® (mà chứa 100 mg/mL oxytetracyclin hydroclorua) được bổ sung vào agar này bằng cách trộn bằng cách đảo ngược. Sau đó các đĩa được rót vào tủ dòng chảy nhiều lớp để đảm bảo độ che phủ hoàn toàn của đĩa petri đến độ sâu khoảng 6 mm. Sau đó các đĩa này được phép để cho nguội và đông rắn trước khi được lưu trữ ở 4°C cho đến khi sử dụng. Bằng cách sử dụng lưỡi dao phẫu thuật vô trùng, các phần agar có kích thước 3 mm x 3 mm chứa giống nuôi cấy nấm được cắt ra và được đặt chính giữa đĩa PDA mới. Sau đó các đĩa được bịt kín bằng Parafilm® để chống hút ẩm và được ủ ở 27°C trong 7 - 10 ngày. Các đĩa được dán nhãn với ID của nấm và được ghi ngày.

Nhiệt độ

Các thể phân lập *D. flagrans* được đánh giá. Năm chế độ nhiệt độ không đổi được thử nghiệm: 12°C, 17°C, 22°C, 27°C và 32°C. Ba đĩa agar dextroza khoai tây (Potato-Dextrose Agar PDA) 1% giống hệt nhau cho mỗi thử nghiệm (đường kính 6 cm) được cấy bằng các nút agar kích thước 2 mm x 2 mm được cắt bằng lưỡi dao vô trùng từ mép khuẩn lạc của các giống nuôi cấy nấm 1-2 tuần tuổi được nuôi trên PDA 1% và được đặt ở giữa của các đĩa agar thử nghiệm. Mỗi mẫu thử nghiệm được ủ trong 14 ngày (hoặc trong thời gian khác được nêu dưới đây) trong máy ấp kiểm soát nhiệt độ Gallenkamp mà được hiệu

chỉnh đến nhiệt độ mong muốn. Trong suốt các thí nghiệm, nhiệt độ trong mỗi tủ thay đổi khoảng $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Các thông số tăng trưởng tỏa tròn và đếm bào tử vách dày được tính hàng ngày.

Tăng trưởng tỏa tròn

Mức tăng trưởng tỏa tròn được đo hàng ngày bằng kính hiển vi phẫu tích nổi ở độ phóng đại 10 X. Mức tăng trưởng tỏa tròn được tính bằng cách đo khoảng cách (mm) từ mép của nút aga đến mép của sự tăng trưởng khuẩn ty hai lần ở các vị trí đối diện. Một trong các hướng này được chọn ngẫu nhiên. Tốc độ tăng trưởng được tính trên số ngày cần để khuẩn ty để đạt đến chu vi bên ngoài của đĩa.

Đếm bào tử vách dày

Số lượng bào tử vách dày được xác định hàng ngày bằng cách đặt lưới 6 cm^2 chia thành các ô vuông mm^2 bên dưới đĩa aga dưới kính hiển vi phân tích phẫu tích nổi ở độ phóng đại 10 X. Lưới này bao gồm năm ô vuông 2 mm^2 được đánh dấu ngẫu nhiên, mà cách nút trung tâm khoảng 12 - 14 mm và các số lượng bào tử vách dày trong năm khu vực này được đếm và số lượng bào tử vách dày trong mỗi cm^2 được tính.

Phân tích thống kê

Phân tích phương sai bằng kiểm định post hoc Tukey bằng cách sử dụng phần mềm Statgraphic (Statgraphics Centurion XV, 2006) được thực hiện ở mỗi nhiệt độ để đánh giá sự khác nhau về số ngày cần để mức tăng trưởng đạt đến chu vi của đĩa petri và cũng xác định sự khác nhau về tốc độ tăng trưởng giữa các thể phân lập. Quy trình tương tự được sử dụng để xác định sự khác nhau về tốc độ sản xuất bào tử của các thể phân lập, ngoài số lượng ngày cần để sản xuất bào tử đầu tiên.

Hiệu quả bắt giữ

Chủng cấy nấm để xác định hiệu quả bắt giữ

Thể phân lập nấm của *D. flagrans* thu được từ giống nuôi cấy ban đầu có nguồn gốc từ thực địa (Larsen et al., 1994), và sau đó được thêm vào CSIRO. Các giống cấy truyền

được lấy từ dịch gốc ban đầu và được giữ trên aga dextroza khoai tây (Potato Dextrose Agar-PDA) bằng quy trình nêu trên. Nguyên liệu bào tử được sử dụng được nuôi trên cơ chất lúa mạch như được nêu dưới đây trong Ví dụ 2 và được thêm vào dịch thử phân ở nồng độ 1×10^6 bào tử vách dày/g phân.

Dịch thử phân

Nguyên liệu phân được thu gom từ cừu không bị giun sán và bị nhiễm *Trichostrongylus colubriformis* được nhốt trong nhà động vật CSIRO ở F.D. McMaster Laboratory-Chiswick, Armidale, NSW, nhằm mục đích duy trì kho giun sán. Phân được thu thập trong một túi gắn vào phía sau của cừu bằng bộ dây thu gom phân và để qua đêm. Cừu được cho ăn 800 g/ngày thức ăn viên với thành phần gồm (g/kg): cỏ linh lăng 500, lúa mì 100, cám mịn còn ít bột 200, cám 175, muối 20 và amoni clorua 5. Cừu bị nhiễm giun sán được cho nhiễm bằng một liều qua đường miệng chứa 20.000 ấu trùng *T. colubriformis* giai đoạn 3. Cừu bị nhiễm giun sán được cho dùng theo liều hàng tuần là 0,25-0,5 mg corticosteroid “Ilium Trimedexil[®], Troy Laboratories Pty Ltd” cho mỗi 10 kg bằng cách bằng cách tiêm trong cơ, để ức chế một phần hệ miễn dịch giúp duy trì tình trạng nhiễm giun sán.

Số lượng trứng trong phân được ước lượng bằng kỹ thuật McMaster cải biến (Whitlock, 1948). Phân chứa trứng giun sán được trộn với phân không chứa giun sán để tạo ra hỗn hợp phân với số lượng trứng khoảng 2500 trứng/g.

25 gam phân được trộn trong cốc Styrofoam với khoảng 7-10 g vermiculit (phụ thuộc vào độ rắn của phân ban đầu) để tạo ra kết cấu vụn ẩm và hỗn hợp phân cừu này sau đó được chuyển sang lọ nuôi cấy 500 g (M.R. Knox *pers. comm.*). Đối với mỗi thể phân lập, sử dụng năm lọ nuôi cấy giống hệt nhau và bào tử vách dày của thể phân lập này được bổ sung vào mỗi lọ trong số các lọ nuôi cấy giống hệt nhau chứa hỗn hợp phân cừu này. Sau khi trộn kỹ, hỗn hợp phân sau đó được nén nhẹ để tạo sự đồng nhất. Sau đó khoảng 10 mL nước cất được bổ sung vào mỗi lọ để duy trì độ ẩm. Năm giống nuôi cấy đối chứng giống hệt nhau được chuẩn bị tương tự mà không bổ sung nguyên liệu bào tử. Các lọ nuôi cấy sau đó được ủ ở 20°C trong 10 ngày.

Sau khi ủ, các lọ nuôi cấy được đổ đầy nước cất và đĩa petri đường kính 20 cm được đặt trên miệng lọ. Sau đó các lọ được đảo ngược, đĩa petri được đổ đầy một nửa nước cất và để ở nhiệt độ trong phòng trong 48 giờ. Sau đó tất cả các ấu trùng giai đoạn 3 (L3) được thu gom bằng cách chắt nước trong đĩa petri cho vào các ống thu gom 50 mL và tạo thành thể tích 50 mL. Formalin được bổ sung ở nồng độ cuối cùng là 1-2 % và sau đó 50 mL dung dịch ấu trùng được làm nóng đến 55- 57°C trong khoảng 1 phút để tiêu diệt ấu trùng (Van Wyk *et al.* 2004 *Veterinary Parasitology* 119:277-306). Ấu trùng được đếm bằng cách lấy 5 mẫu giống nhau của lượng 100 μ L từ mỗi mẫu cho lên kính mang vật của kính hiển vi và đếm ở độ phóng đại 100x. Nếu ấu trùng đếm được nhỏ hơn 10 trong mỗi lượng 100 μ L, thì ấu trùng được để cho ổn định trong tối thiểu 3 giờ trước khi hút chất lỏng dư thừa, cô đến thể tích 5 mL, trước khi đếm lại như đã mô tả.

Ví dụ 2: Phương pháp lên men trên cơ chất rắn/phân tích

Chỉ là ví dụ không nhằm giới hạn, *D. flagrans* có thể được sản xuất bằng cách sử dụng phương pháp lên men trên cơ chất rắn.

Chuẩn bị chủng cấy lỏng cho cơ chất hạt

Canh trường lỏng được tạo ra bằng cách sử dụng dịch chiết nấm men 1 %, KH_2PO_4 0,5 %, NaNO_3 0,1 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 % và tinh bột tan được 2 %. Độ pH được điều chỉnh đến 6,5 bằng cách sử dụng HCl 0,1M và được tiệt trùng trong nồi hấp trong điều kiện lỏng tiêu chuẩn. Sau đó canh trường được để nguội đến khoảng 25°C. Khi nguội, 250 mL canh trường được chứa trong bình tam giác 1,5 L, mà được cấy 8 mẫu bằng nhau của 1/4 đĩa (đường kính 10 cm) của giống nuôi cấy PDA 7 ngày của *D. flagrans* và được ủ trên máy lắc quỹ đạo ở 200 vòng/phút trong 7 ngày ở 28°C.

Chuẩn bị và lên men trên cơ chất rắn

Đối với mỗi cơ chất, ba mẫu 50 g hạt giống nhau được cân trong bình Erlenmeyer 250 mL. Sau đó các mẫu này được làm ẩm bằng nước ở tỷ lệ 1/3 tổng thể tích yêu cầu để đạt được độ ẩm cơ chất là 40 % (xem các Fig. 3.1, 3.2 và 3.3) và được trộn đều. Các mẫu được để ở nhiệt độ trong phòng qua đêm (16 giờ). Sau 16 giờ, các bình này được nút bằng

bông gòn và phủ giấy bạc. Sau đó các bình này được hấp trong các điều kiện lỏng tiêu chuẩn. Sau đó các bình này được chuyển sang tủ dòng chảy tầng và để nguội xuống nhiệt độ trong phòng. Khi nguội, các bình này được cấy bằng thể tích cuối cùng của chủng cấy lỏng để đạt được độ ẩm của cơ chất 40 % bằng cách sử dụng ống đông tiết trùng. Trong trường hợp đối với kê, thể tích này là 24 mL chủng cấy lỏng; đối với đậu lupins thể tích này là 24 mL chủng cấy lỏng cộng 1 mL H₂O tiết trùng; và đối với lúa mạch là 24 mL chủng cấy lỏng cộng 4 mL H₂O tiết trùng. Việc bổ sung H₂O tiết trùng và chủng cấy đối với đậu lupin và lúa mạch là để đảm bảo mỗi bình có lượng bằng nhau chủng cấy nấm được bổ sung trong khi vẫn giữ được độ ẩm của cơ chất ở 40 %. Các giống nuôi cấy được cấy được để yên trước khi được trộn nhẹ sau 24 giờ để đảm bảo rằng tất cả độ ẩm tự do đã được hấp thụ bởi hạt. Sau khi ủ một tuần, cơ chất bị phá vỡ bởi cách lắc mạnh bình. Chúng được ủ thêm trong 25 ngày ở 20°C.

Quy trình làm khô

Sau khi ủ, hạt đã lên men bị phá vỡ bởi cách lắc mạnh bình. Trong tủ dòng chảy tầng, sau đó hạt đã lên men được chuyển sang khay Styrofoam nhỏ, nông, chứa các giống nuôi cấy giống nhau khi nó được xác định là không bị tạp nhiễm. Các khối cơ chất còn lại bị phá vỡ theo cách vô trùng. Các giống nuôi cấy được làm khô trong 10 ngày trong phòng với nhiệt độ kiểm soát được thiết lập là 22°C để đạt được hàm lượng ẩm <10 % (khi được xác định bằng phân tích độ ẩm lò 5 g mẫu con sau khi làm khô trong 2 giờ ở 130°C). Khuấy nhẹ khay định kỳ trong thời gian làm khô này để đảm bảo khô nhanh và đều. Các mẫu đã khô được lưu giữ trong vật chứa 250 mL có nắp vặn được đậy nắp kín ở 20°C để phân tích thêm.

Đếm bào tử vách dày

Sau khi làm khô, các mẫu được xay bằng cách sử dụng máy xay cà phê đã được làm sạch trước. Ba mẫu 0,1 g giống hệt nhau của giống nuôi cấy khô được xay được cân vào trong ống tiêu hóa 50 mL. Các mẫu được tiêu hóa trong 72 giờ bằng cách lắc liên tục trong dung dịch muối đẳng trương chứa 1 % pepsin (1:2500 Pepsin A; Sigma chemicals, Sydney) và axit clohydric 1,7 % (loại AR). Bào tử vách dày được đếm bằng cách sử dụng

máy đếm hồng cầu Spencer Brightline™ và năng suất bào tử được tính là số bào tử vách dày cho mỗi gam nguyên liệu nuôi cấy được làm khô và xay.

Đánh giá khả năng sống- Quy trình nhuộm MTT

Từ các ví dụ trên, 5 g nguyên liệu bào tử đã xay được tạo huyền phù trong 50 mL chất đệm kali phosphat 10 mM (độ pH = 6,9). Thể huyền phù này được sử dụng để phân tích đĩa. Ba phần phân ước 1,0 mL giống hệt nhau của thể huyền phù bào tử được làm loãng được phân tán vào trong các lọ 5mL một lượng 1,0 mL chất lọc 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoli bromua (MTT) (2 mg/ mL) diệt trùng và 2 μ L dung dịch coban clorua 2,5 mM được bổ sung vào mỗi lọ. Các lọ được đóng chặt nắp và được ủ ở 27°C trong 24 - 36 giờ. Sau khi ủ bào tử sống được đếm bằng cách sử dụng dụng cụ đếm hồng cầu. Bào tử sống được nhuộm đỏ hoặc xanh da trời đến xanh/đen và bào tử không sống được không được nhuộm. Chỉ có bào tử thể hiện nhuộm bào tương hoàn toàn mới được đếm là sống (Meier and Charvat, 1993 *American Journal of Botany* 80:1007-1015).

Phân tích thống kê

Sự chênh lệch về số lượng bào tử sống được/g được ước lượng bằng kiểm định ANOVA và kiểm định post hoc Tukey (Statgraphics Centurion XV., 2006).

Ví dụ 3: Tăng quy mô sản xuất để ứng dụng thương mại

Chỉ để làm ví dụ không nhằm giới hạn, *D. flagrans* của chế phẩm theo khía cạnh, phương án hoặc ví dụ bất kỳ ở đây có thể được nhân lên để ứng dụng thương mại như sau. Dưới đây, trong ngữ cảnh của các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn của sáng chế, các thuật ngữ sau đây được sử dụng:

Thành phần hoạt tính loại kỹ thuật (Technical Grade Active Ingredient - TGAI): được dùng để chỉ nguyên liệu thô đã làm khô chứa bào tử vách dày của *D. flagrans* chủng IAH 1297, mà là sản phẩm của phương pháp được mô tả trong ví dụ này, ví dụ 3. Thông thường, sản phẩm này sẽ chứa 1×10^6 hoặc nhiều hơn bào tử sống trong mỗi gam.

Sản phẩm cuối hoàn chỉnh (End-user Product - EP): được dùng để chỉ sản phẩm chứa TGAI được trộn với thành phần thức ăn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bột protein, dầu, mỡ, hydrat cacbon, chất chống oxy hóa, chất bảo quản, vitamin, chất khoáng và chất tạo màu. EP được dự định để sử dụng bởi người chăn nuôi dưới dạng thức ăn bổ sung cho động vật hoặc được trộn vào thức ăn cho động vật.

Sản phẩm nghiền (Mill Product - MP): được dùng để chỉ sản phẩm chứa TGAI được trộn với thành phần thức ăn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, bột protein, dầu, mỡ, hydrat cacbon, chất chống oxy hóa, chất bảo quản, vitamin, chất khoáng và chất tạo màu. MP được dự định để bán cho nhà sản xuất bên thứ ba, ví dụ nhưng không bị giới hạn ở, nhà máy nghiền thức ăn, bác sỹ thú ý hoặc các đối tượng khác mà có thể sử dụng nó làm thành phần trong các sản phẩm mang nhãn hiệu riêng của họ bao gồm thức ăn và thức ăn bổ sung cho động vật. Trong ngữ cảnh của ví dụ không nhằm giới hạn theo sáng chế, MP chứa TGAI với lượng nhiều hơn EP khoảng 15x.

TGAI tinh sạch: Sản phẩm này được dùng để chỉ sản phẩm thu được từ TGAI trong đó mật độ của bào tử vách dày *D. flagrans* được tăng lên so với mật độ trong TGAI mà nó thu được từ đó.

Chế phẩm đặc bào tử được làm khô được tạo ra. Như đã nêu trên, chế phẩm đặc bào tử được làm khô được gọi là thành phần hoạt tính loại kỹ thuật (TGAI). TGAI được sản xuất như sau:

Sơ đồ 1 sản xuất *D. Flagrans*

Quy trình sản xuất *Duddingtonia Flagrans*

Nhận nguyên liệu thô

↓

Phối chế cơ chất lên men

↓

Khử trùng

↓

Cấy bằng giống nuôi cấy tinh khiết

↓

Lên men



Làm khô



Kiểm tra chất lượng



Đóng gói

a. *D. flagrans* được nuôi bằng cách sử dụng phương pháp lên men trên cơ chất rắn tiêu chuẩn như trong ví dụ 2. *D. flagrans* được nuôi trên ngũ cốc nguyên cám được làm ẩm; môi trường tăng trưởng bổ sung được thêm vào, chứa nguồn năng lượng, nguồn nitơ, cũng như các chất dinh dưỡng;

b. Quy trình sản xuất là quy trình 2 bước bao gồm bước tiệt trùng hạt được làm ẩm bằng nhiệt hoặc chiếu xạ tia gamma, cấy lên hạt được làm ẩm bằng canh trường lỏng chứa nấm và có thể bao gồm một số hoặc toàn bộ các thành phần được nêu ở (a). Việc cấy được thực hiện trong điều kiện tiệt trùng và quy trình lên men được phép diễn ra trong vài tuần, thường là khoảng 4 tuần. Bước lên men được thực hiện ở điều kiện nhiệt độ được kiểm soát là 20-28 độ C và hàm lượng ẩm ít thay đổi từ 20% đến khoảng 40 đến 60% độ ẩm. Trong bước lên men, bào tử phát triển tự nhiên, phương pháp khơi mào đặc hiệu cụ thể để cảm ứng sự tạo thành bào tử không được sử dụng trong giai đoạn này.

c. Hiện nay có hai kiểu quy trình lên men được sử dụng. Theo một quy trình, các khay làm bằng thép không gỉ được sử dụng để chứa cơ chất tăng trưởng và không khí hoặc oxy được tuần hoàn trong không gian hơi trong quá trình lên men. Theo quy trình còn lại, cơ chất tăng trưởng được chứa trong các gói có đệm bao gồm các túi nhựa với các dải thông khí, và quy trình lên men được phép diễn ra trên giá, vì thế không lưu thông cưỡng bức không khí không sử dụng sự tuần hoàn ép buộc của không khí hoặc oxy. Quy trình lên men được thiết kế để loại trừ việc xâm nhập của các sinh vật lạ và cho phép tổng cacbon dioxit và không khí đi vào.

d. Bước thứ hai bao gồm việc làm khô hạt đã lên men bằng cách phơi ngoài không khí. Bước này được thực hiện càng nhanh càng tốt ở nhiệt độ thấp để hàm lượng ẩm nhỏ hơn 10%. Bào tử của *D. flagrans* không tách khỏi hạt do *D. flagrans*

sản xuất bào tử mà là một phần dính vào hạt. Khi đã khô, hạt chứa bào tử là nguyên liệu thô của chế phẩm đặc bào tử. Chế phẩm đặc bào tử chứa khuẩn ty mang bào tử khô. Số lượng sống được của bào tử sống trong mỗi gam thu được nằm trong khoảng từ 1×10^5 đến 1×10^{10} bào tử/g.

e. khi hoàn thành bước làm khô sản phẩm (TGAI) được đóng gói vào trong các túi kín, được bao gói và vận chuyển để sản xuất tiếp.

Ví dụ 4: Sản phẩm cuối hoàn chỉnh (End-user Product - EP) và sản phẩm nghiền (Mill Product - MP)

Chỉ là ví dụ không nhằm giới hạn, TGAI được điều chế như được mô tả trong Ví dụ 3 và được phối chế để tạo ra chế phẩm theo sáng chế. Hai sản phẩm được tạo ra, sản phẩm cuối hoàn chỉnh (EP) và sản phẩm nghiền (MP) như được mô tả ở trên.

Như đã nêu trên, để sản xuất EP và MP, TGAI được trộn với thành phần thức ăn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các thành phần bao gồm bột thô protein, dầu, mỡ, hydrat cacbon, chất chống oxy hóa, chất bảo quản, vitamin, chất khoáng và chất tạo màu. Trong sáng chế, ví dụ không nhằm giới hạn, MP chứa TGAI với lượng nhiều hơn EP khoảng 15 lần hoặc nhiều hơn. Sau khi trộn, hỗn hợp này được nghiền để phá vỡ các hạt bào tử để đảm bảo độ đồng nhất. Các sản phẩm hoàn thiện được đóng gói trong túi hoặc vật chứa lớn. Thông thường, các sản phẩm (cả EP và MP) cung cấp lượng tối thiểu là 3×10^4 bào tử sống cho mỗi Kg thể trọng mỗi ngày khi sử dụng (như được đo chẳng hạn trong phương pháp xác định khả năng sống trong Ví dụ 5).

Ví dụ 5: Thử nghiệm đếm trứng trong phân (FEC)

Các phương pháp đếm trứng trong phân (FEC) là đã biết trong lĩnh vực. Các ví dụ về các kỹ thuật đã có sẵn rộng rãi. Một ví dụ hướng dẫn FEC được nêu trên Fig. 4a. Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết được nhiều nguồn phương pháp khác.

Ví dụ 6: Thử nghiệm phát hiện số lượng trứng giảm đi trong phân (FECRT)

Phương pháp của thử nghiệm phát hiện số lượng trứng giảm đi trong phân (FECRT) là đã biết rõ trong lĩnh vực. Các ví dụ về các kỹ thuật đã có sẵn rộng rãi. Một ví dụ hướng

dẫn FECRT được nêu trên Fig. 4b. Chuyên gia trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết được nhiều nguồn phương pháp khác.

Ví dụ 7

Chỉ là ví dụ không nhằm giới hạn, các thử nghiệm đánh giá hiệu quả được thực hiện với chế phẩm theo sáng chế. Chế phẩm theo sáng chế được tạo ra ví dụ, theo Ví dụ 3 và được phối chế thêm để tạo ra EP theo Ví dụ 4.

Một chuỗi các thử nghiệm đối chứng giả được ở trâu bò, cừu, dê và ngựa được thực hiện theo thực hành nghiên cứu lâm sàng tốt (Good Clinical Practice - GCP) VICH (Hội nghị quốc tế về hài hoà hoá các thủ tục kỹ thuật đối với đăng ký các sản phẩm thuốc dùng trong thú y) ở các vị trí lãnh thổ và các mùa ở Úc để đánh giá khả năng của EP trong việc làm giảm sự phát triển và di chuyển của ấu trùng từ phân ra đồng cỏ.

Tóm lại, đối với các thử nghiệm trong thời gian ngắn ở trâu bò, dê và ngựa, phân được thu gom từ động vật thử nghiệm trước khi điều trị và được đặt lên vị trí cánh đồng cỏ (phân đối chứng). Các động vật tương tự sau đó được điều trị bằng EP và phân lại được thu gom sau khoảng 1 tuần (phân đã điều trị). Các phân này sau đó cũng được đặt lên các vị trí trên đồng cỏ. Tại các khoảng thời gian mỗi 2 tuần (từ 2 đến 8 tuần sau điều trị) các mẫu từ cánh đồng xung quanh các cục phân được chọn ngẫu nhiên (điều trị và đối chứng) các mẫu phân được thu gom và được kiểm tra ấu trùng giun tròn. Sau đó ấu trùng được phát hiện được phân biệt về loài (như ấu trùng ký sinh đối với loài vật chủ được bao gồm) và tổng số lượng ấu trùng ký sinh cho mỗi mẫu được tính. Hiệu quả điều trị được xác định bằng cách so sánh số lượng ấu trùng trên cánh đồng của hai nhóm (được điều trị và đối chứng).

Đối với các nghiên cứu chăn thả trong thời gian dài ở cừu, hai nhóm cừu bị nhiễm giun sán được chăn thả trên các mảnh đất riêng rẽ, một nhóm được nhận EP và nhóm còn lại nhận giả dược. Hiệu quả điều trị đối với khả năng lây nhiễm ấu trùng trên cánh đồng được xác định bằng cách chăn thả đồng thời các nhóm cừu theo dõi không bị giun sán và

hiệu quả điều trị được đo bằng cách so sánh tổng số giun sán của hai nhóm cừu theo dõi này.

Các loài giun sán gặp phải trong các thử nghiệm này được thể hiện trên bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Các loài giun sán được gặp trong thử nghiệm hiệu quả EP (chứa bào tử vách dày của *D. flagrans* chủng IAH 1297)

Loài giun sán	Gia súc	cừu	Dê	Ngựa
<i>Cooperia spp.</i>	X	X		
<i>Cyathostomes</i>				X
<i>Haemonchus spp.</i>	X	X	X	
<i>Nematodirus spp.</i>		X	X	
<i>Oesophagostomum spp.</i>	X		X	
<i>Ostertagia spp.</i>	X			
<i>Strongylus spp.</i>				X
<i>Teladorsagia spp.</i>		X	X	
<i>Trichostrongylus spp.</i>	X	X	X	X

Mức giảm có ý nghĩa về mặt thống kê ($P < 0,05$) về tổng số lượng giun sán trong các con cừu theo dõi thu được trong mỗi thử nghiệm trên cừu. Đối với các thử nghiệm trên trâu bò, dê và ngựa, số liệu cộng gộp cho mỗi loài động vật được phân tích, cho thấy rằng hiệu quả điều trị có ý nghĩa về mặt thống kê ở $P \leq 0,01$ trong mỗi trường hợp, như được thể hiện dưới đây.

Các thử nghiệm đối với EP được tóm tắt dưới đây được thực hiện theo VICH GL9 GCP (tháng 6/2000) và Hiệp hội toàn cầu về sự phát triển của kỹ sinh trùng thú y (WAAVP) Hướng dẫn đánh giá hiệu quả của thuốc diệt giun sán ở động vật nhai lại.

Các nghiên cứu hiệu quả trong thời gian ngắn đối với thức ăn bổ sung (EP) (trâu bò, ngựa và dê)

Một chuỗi các thử nghiệm đối chứng giả được thực hiện để đánh giá khả năng của EP trong việc làm giảm sự phát triển và di chuyển từ phân lên đồng cỏ ở trâu bò, ngựa và dê.

Trong các thử nghiệm này các sản phẩm sau được sử dụng:

1. Livamol®: Sản phẩm giả dược (xem mô tả sản phẩm ở Fig. 5) - thức ăn bổ sung dinh dưỡng cho động vật do International Animal Health Products Pty Ltd sản xuất, dưới đây được gọi là “Livamol®”.
2. EP - chứa TGAI được phân tán trong Livamol® và dưới đây được gọi là “EP”.

Tóm lại, các động vật thử nghiệm được chọn mang nhiều loại giun tròn ký sinh, bao gồm chủng kháng thuốc trừ giun sán, trong một số trường hợp các động vật này được tăng cường bằng cách nhiễm trùng nhân tạo. Các động vật được cho ăn Livamol® trong khoảng 1 tuần trước khi thu gom phân, mà sau đó được đặt bằng tay lên cánh đồng cỏ ở (các) vị trí thử nghiệm (phân đối chứng). Sau đó các động vật tương tự được điều trị bằng EP (cung cấp tối thiểu là 3×10^4 bào tử vách dày sống được của *D. flagrans*/kg thể trọng/ngày trong khoảng 1 tuần) và phân lại được thu gom và được đặt lên đồng cỏ như trên ở các vị trí tương tự (phân đã điều trị). Vào các khoảng thời gian mỗi 2 tuần (từ 2 đến 8 tuần sau điều trị) các mẫu đồng cỏ xung quanh các mẫu phân bám lên được chọn ngẫu nhiên được thu gom và được kiểm tra ấu trùng giun tròn. Sau đó ấu trùng đã phát hiện được phân biệt theo loài (như ấu trùng ký sinh đối với các loại vật chủ tham gia) và tổng số ấu trùng vật ký sinh cho mỗi mẫu được tính. Tác động của *D. flagrans* trong các cục phân từ phân được xử lý EP đã chứng minh được là số lượng ấu trùng được phát hiện trên đồng cỏ xung quanh đã giảm.

Các thử nghiệm được tóm tắt dưới đây được thực hiện theo VICH GL9 GCP (6/2000) và WAAVP hướng dẫn đánh giá hiệu quả diệt trừ giun sán ở động vật nhai lại. Các kết quả được tóm tắt trong bảng 3 và trên các Fig. 6 đến 13.

Bảng 3. Tổng quan về các thử nghiệm đánh giá hiệu quả đối với việc bổ sung EP để làm giảm sự phát triển và di chuyển của ấu trùng từ phân của trâu bò, dê và ngựa lên đồng cỏ.

Loài	Số động vật	Thời gian thử nghiệm (ngày)	Vị trí	Mùa	Kết quả (% giảm nảy nở ấu trùng tuần 2-8)	Nghiên cứu tham chiếu
Gia súc	6	6	Armidale NSW	Mùa xuân	75	Thử nghiệm trên trâu bò 1
Gia súc	6	6	Nimmitabel NSW	Mùa xuân	75	Thử nghiệm trên trâu bò 1
Gia súc	6	7	Armidale NSW	Mùa thu	82	Thử nghiệm trên trâu bò 2
Gia súc	6	7	Dayboro QLD	Mùa thu	88	Thử nghiệm trên trâu bò 2
Dê	6	7	Armidale NSW	Mùa xuân	85	Thử nghiệm trên dê 1
Dê	6	7	Nimmitabel NSW	Mùa xuân	8*	Thử nghiệm trên dê 1
Dê	12	9	Armidale NSW	Mùa thu	81	Thử nghiệm trên dê 2
Dê	12	9	Dayboro QLD	Mùa thu	99	Thử nghiệm trên dê 2
Dê	12	7	Dayboro QLD	Mùa xuân/Mùa hè	80	Thử nghiệm trên dê 3
Dê	12	7	Nimmitabel NSW	Mùa xuân/Mùa hè	98	Thử nghiệm trên dê 3
Ngựa	5	7	Armidale NSW	Mùa thu	94	Thử nghiệm trên ngựa 1
Ngựa	6	5	Armidale NSW	Mùa xuân	97	Thử nghiệm trên ngựa 2
Ngựa	6	5	Nimmitabel NSW	Mùa xuân	53	Thử nghiệm trên ngựa 2
Ngựa	6	5	Armidale NSW	Mùa thu	65	Thử nghiệm trên ngựa 3

Ngựa	6	5	Dayboro QLD	Mùa thu	94	Thử nghiệm trên ngựa 3
------	---	---	-------------	---------	----	------------------------

*Vị trí thử nghiệm bị ảnh hưởng bởi tình trạng đóng băng ngay sau khi động phân

Phân tích thống kê (Groves, P 2015) cho thấy hiệu quả điều trị là có ý nghĩa về mặt thống kê ($p \leq 0,01$) đối với tất cả các loài (xem Ví dụ 7).

Trong thử nghiệm trên trâu bò, các loại giun tròn quan sát được là *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Oesophagostomum* spp., *Ostertagia* spp. và *Haemonchus* spp, bao gồm các chủng kháng nhiều thuốc.

Ở dê, giun tròn là *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Nematodirus* spp., *Haemonchus* spp. và *Cooperia* spp. Bao gồm bao gồm các chủng kháng nhiều thuốc. Dê cũng được thử thách với hỗn hợp của ấu trùng giun lươn đường dạ dày-ruột, bao gồm các chủng kháng nhiều thuốc thuộc *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* và *Teladorsagia circumcincta* và thể phân lập mới được xác định gần đây *Cooperia* spp. và *Nematodirus* spp.

Ở ngựa, loài chiếm ưu thế là cyathostomes, tuy nhiên một số *Strongylus* spp. và *Trichostrongylus axei* cũng có mặt.

Giống gây bệnh của vật ký sinh giun tròn đường dạ dày-ruột trên vật nuôi đã thuần hóa có mặt trên toàn thế giới mặc dù có sự khác biệt về sự phổ biến và sự phong phú do sự khác biệt khí hậu. Giống chiếm ưu thế ở Úc là tiêu biểu ở hầu hết các vị trí địa lý nơi mà quá trình sản xuất chăn nuôi xảy ra trên khắp thế giới.

Nghiên cứu hiệu quả lâu dài với EP (cừu)

Một loạt thử nghiệm đối chứng giả dược được thực hiện để đánh giá khả năng của EP trong việc làm giảm sự phát triển và di chuyển của ấu trùng từ phân lên đồng cỏ ở cừu trong một loạt các vị trí địa lý và mùa như được thể hiện dưới đây.

1. Livamol®: Sản phẩm giả dược - thức ăn bổ sung dinh dưỡng cho động vật do International Animal Health Products Pty Ltd sản xuất, dưới đây được gọi là Livamol®.

2. EP - chứa TGAI được phân tán trong Livamol® và dưới đây được gọi là “EP” hoặc “chế phẩm thử nghiệm”.

Trong mỗi thử nghiệm của các thử nghiệm này các nhóm cừu được sử dụng có các vai trò khác nhau:

(1) cừu “gieo giun sán”, mà mang các bệnh lây nhiễm tự nhiên của một loạt các giun sán ký sinh đại diện cho vùng (bao gồm các chủng kháng nhiều thuốc), được sử dụng để làm nhiễm giun sán cho cánh đồng bằng cách thả phân mang trứng giun sán.

(2) cừu “theo dõi”, là con cừu non nhạy với giun sán, không mang nhiều giun sán, được sử dụng để đánh giá mức độ nhiễm giun sán của cánh đồng mà chúng được chăn thả trên đó.

Trong mỗi thử nghiệm, một cặp mảnh đất phù hợp được sử dụng, trong đó một mảnh đất được chăn thả nhóm cừu gieo sán hàng ngày được tiếp nhận chế phẩm bổ sung giả dược (nhóm đối chứng) và mảnh đất còn lại được chăn thả nhóm phù hợp mà hàng ngày được tiếp nhận chế phẩm bổ sung EP, cung cấp liều hàng ngày tối thiểu là 3×10^4 bào tử sống/kg thể trọng (Nhóm điều trị).

Sau khi cừu gieo giun sán được chăn thả trên mảnh đất này trong hai tháng, mức độ nhiễm bệnh của cánh đồng do nhiễm ấu trùng giun tròn được đánh giá bằng cách chăn thả cừu theo dõi nhạy với giun sán trên cánh đồng đó trong khoảng thời gian 3 tuần. Một nhóm theo dõi được chăn thả trên mảnh đất đối chứng và nhóm tương ứng được chăn thả trên mảnh đất EP. Sau đó, các con cừu theo dõi được đem sang các bãi rào kín để cho phép giun sán trong cơ thể chúng trưởng thành và mức độ lây nhiễm của chúng được xác định bằng cách đếm tổng số giun sán (TWC) sau khi giết và rửa ruột. Trong ba thử nghiệm cừu gieo giun sán tiếp tục được chăn thả trên các mảnh đất thử nghiệm trong hai tháng nữa tại thời điểm đó một nhóm theo dõi khác được đưa vào và TWC của chúng được xác định.

Sự khác nhau về TWC giữa hai nhóm theo dõi đã chứng tỏ khả năng của EP trong việc ngăn chặn sự nảy nở của ấu trùng lây nhiễm từ phân của cừu gieo giun sản rơi trên cánh đồng.

Các kết quả được tóm tắt trên bảng 4 và các Fig. 14 - 17. Bằng cách giảm sự lây nhiễm ấu trùng của cánh đồng theo cách tự nhiên, việc sử dụng EP làm giảm đáng kể số lượng giun sản đối với các loài giun sản quan trọng nhất về mặt lâm sàng gặp phải trong các thử nghiệm, bao gồm các chủng kháng nhiều thuốc.

Bảng 4: Tổng quan về các thử nghiệm đánh giá hiệu quả của việc bổ sung EP để làm giảm sự phát triển và di chuyển của ấu trùng từ phân lên đồng cỏ ở cừu

Loài	Động vật gieo giun sản		Vị trí	Mùa	Động vật theo dõi		Tham khảo
	Số lượng động vật	Thời gian điều trị			Số lượng động vật* (thời gian)	Mức giảm tổng số lượng giun sản §	
Cừu	20/20	57 ngày	Armidale NSW	Hè/ Thu	23/23 (21 ngày)	57% (Tuần 14)	Thử nghiệm trên cừu 1
Cừu	30/30	119 ngày	Nimmitabel NSW	Xuân / Hè	10/10 (21 ngày) 10/10 (21 ngày)	20% (tuần 11) 57% (tuần 18)	Thử nghiệm trên cừu 2
Cừu	30/30	122 ngày	Armidale NSW	Xuân / Hè	10/10 (21 ngày) 10/10 (21 ngày)	26% (tuần 11) 84% (tuần 18)	Thử nghiệm trên cừu 3
Cừu	30/30	125 ngày	Gore, QLD	Hè/ Thu	10/10 (21 ngày) 10/10 (21 ngày)	74% (tuần 11) 75% (tuần 18)	Thử nghiệm trên cừu 4

*Số lượng động vật đối chứng/động vật điều trị, § số học có nghĩa là # ngày điều trị trong khi trên mảnh đất thử nghiệm

Giống giun sản gặp phải trong các thử nghiệm này bao gồm *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Teladorsagia* và *Nematodirus*.

Các động vật chăn thả khác được thử nghiệm mà trong đó EP làm giảm mạnh tổng số giun sản bao gồm hươu cao cổ, linh dương, ngựa vằn và linh dương Ấn Độ.

Các nghiên cứu này khẳng định rằng *D. flagrans* theo sáng chế sống sót qua đường ruột và bắt giữ hiệu quả nhiều loại vật ký sinh giun tròn có ý nghĩa về mặt kinh tế của động vật chăn thả bao gồm trâu bò, cừu, ngựa, dê và các động vật trong vườn thú. Các nghiên cứu này đã khẳng định rằng chế phẩm theo sáng chế thích hợp để ứng dụng thương mại để làm giảm sự nhiễm ký sinh giun sán trên đồng cỏ và vì thế quản lý được mức lây nhiễm ở chính động vật, cũng như chứng tỏ lợi ích kinh tế như giảm bệnh và tỷ lệ tử vong, giảm nhu cầu sử dụng thuốc trừ sâu hóa học và năng suất được cải thiện.

Liều dùng hằng ngày yêu cầu của *D. flagrans* chủng IAH 1297 thấp hơn khoảng 10 lần so với các nghiên cứu sử dụng các chủng *D. flagrans* khác. Điều này thể hiện một lợi thế đáng kể so với các chủng *D. flagrans* khác.

Ví dụ 8: Phân tích thống kê thử nghiệm nghiên cứu thời gian ngắn của ví dụ 7

Tại mỗi thời điểm ở mỗi vị trí thử nghiệm số lượng trung bình của ấu trùng ký sinh đối với chế phẩm đối chứng và chế phẩm thử nghiệm được tính. Để xác định tác động của việc điều trị bằng chế phẩm thử nghiệm lên số lượng ấu trùng trên đồng cỏ qua các thử nghiệm, số liệu từ mỗi vị trí đối với các thử nghiệm nhiều vị trí được lấy trung bình và sau đó, đối với mỗi loài động vật, số liệu từ các thử nghiệm được cộng gộp để phân tích theo khoảng thời gian trên đồng cỏ (2, 4, 6, 8 tuần và tổng cho các tuần 2-8). Từ đó, số lượng ấu trùng trung bình tổng thể (chế phẩm đối chứng và chế phẩm thử nghiệm) tại mỗi thời điểm và tổng cho các tuần 2-8 được tính.

Việc xác định ấu trùng tại mỗi khoảng thời gian không độc lập như với mỗi thử nghiệm các mẫu đều là từ các thành phần cộng gộp từ cùng một động vật thử nghiệm. Do đó, thích hợp để xem xét những số liệu này không hoàn toàn độc lập và sử dụng phân tích số đo lặp lại (ANOVA) để so sánh kết quả. Vì thế số liệu được phân tích bằng cách sử dụng ANOVA số đo lặp lại, với phân không được xử lý (đối chứng) so với phân được xử lý (chế phẩm thử nghiệm) và số thử nghiệm là các biến số hiệu quả chính. Tất cả các tương tác được bao gồm trong phân tích.

Các thử nghiệm trên ngựa

Ba thử nghiệm được so sánh, được thực hiện bằng cách sử dụng EP ở ngựa tại 5 vị trí địa lý qua 2 mùa. Các vị trí khác nhau giữa các thử nghiệm vì thế chỉ có số thử nghiệm được sử dụng làm biến số trong phân tích. Các kết quả của phân tích ANOVA được thể hiện trên bảng 5.

Bảng 5: Kết quả phân tích ANOVA đối với ấu trùng ký sinh ở ngựa trên đồng cỏ sau khi được điều trị bằng chế phẩm theo sáng chế

ANOVA ấu trùng ký sinh ở ngựa ^{\1}	Bậc tự do ^{\2}	F ^{\3}	p ^{\4}
Hệ số chặn	1	17,30617	0,000120
Điều trị	1	9,01926	0,004101
Thử nghiệm	2	0,99287	0,377427
Điều trị x Số thử nghiệm	2	0,10607	0,899556
Sai số	52		
Tuần	3	2,87397	0,038105
Tuần x Điều trị	3	1,35383	0,259066
Tuần x Số thử nghiệm	6	3,60055	0,002266
Tuần x Điều trị x Số thử nghiệm	6	2,27763	0,039000
Sai số	156		

Chú thích cho tất cả các bảng ANOVA:

\1: Phân tích các biến số

\2: Đối với mẫu, giá trị này bằng một, nhỏ hơn số nhóm

\3: Tỷ lệ F (tỷ lệ của hai giá trị bình phương trung bình) đối với ANOVA. Nếu là giả thuyết, thì F nên gần bằng 1. Nếu giá trị F lớn hơn, nhiều khả năng là sự thay đổi giữa các nhóm không phải do ngẫu nhiên.

\4: Xác suất rằng tỷ lệ F để so sánh vượt quá giá trị tới hạn chỉ đơn giản là do ngẫu nhiên. Sự có ý nghĩa được chấp nhận nếu $p < 0,05$.

\5: Hệ số chặn là sự ước lượng của biến số phụ thuộc khi tất cả các biến số độc lập bằng 0. Nó cho giá trị dự định của biến số thứ nhất nếu giá trị thứ hai bằng 0. Giá trị P có ý nghĩa đối với hệ số chặn có nghĩa là hệ số chặn khác biệt đáng kể từ 0. Nó không có ý nghĩa với mẫu.

Các giá trị được đánh dấu có sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$)

Bảng 5 cho biết hiệu quả của việc điều trị bằng EP trong khoảng thời gian quan sát 8 tuần là có ý nghĩa về mặt thống kê do là tuần lấy mẫu sau khi điều trị. Có sự tương tác đáng kể giữa thời gian sau điều trị và thử nghiệm và giữa thời gian, thử nghiệm và điều trị.

Bảng 6 cho biết số lượng trung bình của ấu trùng ký sinh trên ngựa trong các mẫu thu được trên cánh đồng trong khoảng thời gian thử nghiệm 8 tuần đối với 3 thử nghiệm cũng như tổng giá trị tương ứng. Số lượng ấu trùng trung bình tổng số đối với các mẫu đối chứng là 2248 ấu trùng so với chỉ có 363 ấu trùng đối với các mẫu được điều trị bằng chế phẩm thử nghiệm ($P=0,004$).

Bảng 6. So sánh hiệu quả điều trị trong khoảng thời gian tám tuần ở ngựa

Điều trị	Thử nghiệm số	Số ngựa	Số vị trí	Số trung bình của ấu trùng ký sinh trên ngựa trong mỗi mẫu trên đồng cỏ sau khi đặt phân				Giá trị trung bình
				2 tuần	4 tuần	6 tuần	8 tuần	
Đối chứng	1955	5	1	921,4	1541,1	3515,0	103,5	1520,3
	2529	12	2	172,3	4262,0	2953,0	1866,7	2313,5
	2633	12	2	202,6	1150,1	2449,9	7840,1	2910,7
Chế phẩm	1955	5	1	0,0	5,2	7,6	379,0	97,9
	2529	12	2	0,0	326,7	18,0	247,3	148,0
	2633	12	2	1040,0	1040,0	442,4	1828,6	843,3
Số liệu tổng quát								
Đối chứng		29	5	432,1	2317,7	2972,6 ^A	3270,1	2248,2 ^A
Chế phẩm		29	5	20,7	457,3	156,0 ^B	818,3	363,1 ^B

A, B – các giá trị trung bình trong cùng cột với các chỉ số trên khác nhau ($p<0,05$)

Các Fig. 11 - 13 cho thấy rằng số lượng ấu trùng ký sinh ở ngựa trên đồng cỏ tăng theo thời gian sau khi đặt phân trên đồng cỏ và con số này tăng nhanh hơn và duy trì ở mức cao hơn nhiều so với phân của ngựa được điều trị bằng chế phẩm thử nghiệm. Sự thay đổi

là rõ rệt qua các thử nghiệm nhưng sự khác biệt đáng kể quan sát được ở 6 tuần sau điều trị (bảng 6). Nói chung, tổng số ấu trùng nảy nở từ phân của động vật được điều trị bằng chế phẩm thử nghiệm trong khoảng thời gian quan sát 8 tuần được giảm đáng kể so với phân đối chứng (các bảng 5 và 6).

Đáp ứng này thay đổi qua ba thử nghiệm (các Fig. 11 - 13) với nhiều ấu trùng được phát hiện hơn ở 4 tuần sau điều trị trong thử nghiệm #2529, ở 6 tuần trong thử nghiệm #1955 và đạt đến giá trị đỉnh chậm hơn ở 8 tuần đối với thử nghiệm #2633. Điều này có thể là do sự khác biệt về các điều kiện khí hậu và địa phương tại mỗi vị trí.

Kết luận về các thử nghiệm trên ngựa

Nói chung, việc sử dụng EP cho ngựa đã làm giảm đáng kể ($P=0,004$) việc phát hiện ấu trùng ký sinh ở ngựa trên đồng cỏ xung quang phân qua khoảng thời gian 8 tuần sau điều trị.

Thử nghiệm trên trâu bò

Hai thử nghiệm được so sánh, được thực hiện bằng cách sử dụng chế phẩm thử nghiệm cho trâu bò tại 4 vị trí địa lý qua 2 mùa. Các vị trí khác nhau giữa các thử nghiệm vì thế chỉ có số thử nghiệm được sử dụng làm biến số trong phân tích. Các kết quả của phân tích ANOVA được thể hiện trên bảng 7.

Bảng 7. Kết quả phân tích ANOVA đối với ấu trùng ký sinh ở trâu bò trên đồng cỏ sau khi được điều trị bằng chế phẩm thử nghiệm.

ANOVA ấu trùng ký sinh ở trâu bò	Bậc tự do	F	p
Hệ số chặn	1	18,02177	0,000111
Điều trị	1	8,32387	0,006039
Số thử nghiệm	1	0,12639	0,723905
Điều trị x Số thử nghiệm	1	0,20544	0,652595
Sai số	44		
Tuần	3	2,87000	0,038915
Tuần x Điều trị	3	1,80555	0,149268

Tuần x Số thử nghiệm	3	3,52724	0,016808
Tuần x Điều trị x Số thử nghiệm	3	1,79432	0,151365
Sai số	132		

Các giá trị được đánh dấu có sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$)

Bảng 7 cho thấy có sự khác biệt đáng kể về phân của trâu bò được điều trị bằng EP so với phân đối chứng trong khoảng thời gian thử nghiệm 8 tuần và sự khác biệt này thay đổi theo thời gian. Có sự tương tác đáng kể giữa các thử nghiệm riêng rẽ qua thời gian.

Bảng 8 cho thấy số lượng trung bình của ấu trùng ký sinh ở trâu bò trong các mẫu trên cánh đồng qua thời gian thử nghiệm 8 tuần đối với 2 thử nghiệm cũng như các giá trị tổng thể tương ứng. Số lượng ấu trùng trung bình tổng số đối với các mẫu đối chứng là 16038 ấu trùng so với 3059 ấu trùng đối với các mẫu được điều trị bằng chế phẩm thử nghiệm ($P = 0,006$).

Bảng 8. So sánh hiệu quả điều trị trong khoảng thời gian tám tuần ở trâu bò

				Số trung bình của ấu trùng ký sinh trên trâu bò trong mỗi mẫu trên đồng cỏ sau khi đặt phân				
Điều trị	Thử nghiệm số	Số trâu bò	Số vị trí	2 tuần	4 tuần	6 tuần	8 tuần	Giá trị trung bình
Đối chứng	2528	12	2	2783,3	25391,1	70701,5	8000,9	14219,2
	2634	12	2	387,5	7485,9	2846,0	41710,8	17857,5
Chế phẩm	2528	12	2	1022,0	6849,5	3991,3	1253,7	3279,1
	2634	12	2	99,4	956,0	4444,2	4963,1	2839,4
Số liệu tổng quát								
Đối chứng		24	4	1585,4	16438,5	21273,7	24855,8 ^A	16038,4 ^A
Chế phẩm		24	4	1008,2	3902,8	4217,8	3108,4 ^B	3059,3 ^B

A, B – các giá trị trung bình trong cùng cột với các chỉ số trên khác nhau ($p < 0,05$)

Fig. 6 - 7 cho thấy rằng ấu trùng trong phân đối chứng tăng nhanh trong khoảng 4 tuần và vì thế giữ ở mức cao cho đến 8 tuần sau điều trị. Trong so sánh, ấu trùng được tìm thấy nảy nở từ phân của trâu bò được điều trị bằng chế phẩm thử nghiệm chỉ tăng ở mức

tối thiểu trong toàn bộ thời gian quan sát. Sự thay đổi là rõ rệt qua các thử nghiệm nhưng sự khác biệt đáng kể quan sát được ở 8 tuần sau điều trị. Nói chung, tổng số ấu trùng nở từ phân của động vật được điều trị bằng EP trong khoảng thời gian quan sát 8 tuần được giảm đáng kể so với phân đối chứng (các bảng 7 và 8).

Đáp ứng này là khác nhau giữa hai thử nghiệm (Fig. 6 - 7), với giá trị ấu trùng đạt được tối đa ở 4 tuần trong thử nghiệm # 2528, trong khi đó trong thử nghiệm # 2634 giá trị đỉnh đạt được chậm hơn ở 8 tuần. Điều này có thể là do sự khác biệt về các điều kiện khí hậu và địa phương tại mỗi vị trí.

Kết luận về các thử nghiệm trên trâu bò

Nói chung, việc điều trị cho trâu bò bằng EP làm giảm đáng kể ($P=0,006$) việc phát hiện ấu trùng ký sinh ở trâu bò trên đồng cỏ xung quanh phân qua khoảng thời gian 8 tuần sau điều trị.

Thử nghiệm trên dê

Ba thử nghiệm được so sánh, được thực hiện bằng cách sử dụng EP ở dê tại 6 vị trí địa lý qua 3 mùa. Do dê có khả năng tạo ra phân khá ít, đối với hai thử nghiệm trên dê (#2635 và #2719) các mẫu phân được gom từ các cặp dê. Các vị trí khác nhau giữa các thử nghiệm vì thế chỉ có số thử nghiệm được sử dụng làm biến số trong phân tích. Các kết quả của phân tích ANOVA được thể hiện trên bảng 9.

Bảng 9. Kết quả phân tích ANOVA đối với ấu trùng ký sinh ở dê trên đồng cỏ sau khi được điều trị bằng chế phẩm thử nghiệm.

ANOVA ấu trùng ký sinh ở dê	Bậc tự do	F	p
Hệ số chặn	1	12,45730	0,000770
Điều trị	1	7,01586	0,010130
Thử nghiệm	2	0,91756	0,404603
Điều trị x Thử nghiệm	2	0,28991	0,749294
Sai số	65		
Tuần	3	2,35840	0,072938

Tuần x Điều trị	3	1,03807	0,376834
Tuần x Thử nghiệm	6	3,39721	0,003284
Tuần x Điều trị x Thử nghiệm	6	1,65194	0,134841
Sai số	195		

Các giá trị được đánh dấu có sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$)

Bảng 9 thể hiện hiệu quả của việc điều trị bằng EP có ý nghĩa về mặt thống kê trong thời gian quan sát 8 tuần. Cũng có sự tương tác đáng kể giữa thời gian và thử nghiệm.

Bảng 10 cho biết số lượng trung bình của ấu trùng ký sinh trên dê trong các mẫu thu được trên cánh đồng trong khoảng thời gian thử nghiệm 8 tuần đối với 3 thử nghiệm cũng như tổng giá trị tương ứng. Số lượng ấu trùng trung bình tổng số đối với phân đối chứng là 12866 ấu trùng so với chỉ có 1834 ấu trùng đối với các mẫu được điều trị bằng chế phẩm thử nghiệm ($P=0,01$).

Bảng 10. So sánh hiệu quả điều trị trong khoảng thời gian tám tuần ở dê

				Số trung bình của ấu trùng ký sinh trên dê trong mỗi mẫu trên đồng cỏ sau khi đặt phân				
Điều trị	Thử nghiệm số	Số dê	Số vị trí	2 tuần	4 tuần	6 tuần	8 tuần	Giá trị trung bình
Đối chứng	2527	12	2	11342,7	50708,0	1187,7	2161,7	16350,8
	2635	12	2	791,9	3800,9	13382,9	8743,3	6679,7
	2719	12	2	48918,1	11026,2	1339,8	985,4	15567,4
Chế phẩm	2527	12	2	650,0	9901,0	692,9	0,0	2811,0
	2635	12	2	26,4	145,3	149,0	79,0	99,9
	2719	11	2	8628,8	1583,0	143,6	10,4	2591,4
Số liệu tổng quát								
Đối chứng		36	6	20350,9	21845,0	5303,4	3964,5	12866,0 ^A
Chế phẩm		35	6	3101,7	3876,4	328,5	29,8	1834,1 ^B

A, B – các giá trị trung bình trong cùng cột với các chỉ số trên khác nhau ($p < 0,05$)

Fig. 8 - 10 cho thấy rằng sự nảy nở của ấu trùng quan sát được là khác nhau trong mẫu trong các nghiên cứu trên ngựa và trâu bò ở chỗ đối với phân dê, sự nảy nở của ấu

trùng ký sinh nhiều hơn trong 2 tuần đầu điều trị và sau đó đã giảm xuống. Sự thay đổi là rõ rệt theo tuần nhưng không phải hoàn toàn, tổng số ấu trùng xuất hiện trong phân của động vật được điều trị bằng chế phẩm theo sáng chế trong khoảng thời gian quan sát 8 tuần giảm so với phân đối chứng (các bảng 5 & 6).

Đáp ứng này khác nhau giữa ba thử nghiệm, với nhiều ấu trùng được phát hiện ở 2 tuần sau điều trị trong thử nghiệm #2719, 4 tuần trong thử nghiệm #2527 và 6 tuần trong thử nghiệm #2635.

Kết luận:

Nói chung, việc sử dụng EP cho dê làm giảm đáng kể ($p=0,01$) việc phát hiện ấu trùng ký sinh ở dê trên đồng cỏ xung quang phân qua khoảng thời gian 8 tuần sau điều trị.

Kết luận chung

Việc điều trị cho ngựa, trâu bò và dê bằng EP dẫn đến việc làm giảm đáng kể ($p<0,01$) ấu trùng ký sinh của cả ba loài động vật này trên đồng cỏ xung quanh phân của chúng trong khoảng thời gian sau điều trị 8 tuần.

Ví dụ 9

Bằng cách chỉ ví dụ không giới hạn, bảng dưới đây là tóm tắt về các vấn đề gặp phải trong việc thiết lập sự an toàn và đạt được phê duyệt theo quy định đối với sản phẩm kiểm soát sinh học thương mại của sáng chế.

Bảng 11 Tóm tắt vấn đề an toàn

Độ an toàn:	Vấn đề	Cách khắc phục	Khung thời gian
Khả năng lây nhiễm/khả năng gây bệnh	1. Cần phải chứng minh rằng <i>D. flagrans</i> chủng IAH 1297 không có khả năng lây	Phương pháp được phát triển để trực tiếp đưa chất cô bào tử dạng bột vào trong khí quản. Thử nghiệm	Các mục 1 - 10 liên quan đến chương trình thử nghiệm độc chất được tiến hành trên động vật thí nghiệm.

	nhiễm/gây bệnh. Phổi là nơi thích hợp nhất cho việc điều tra này vì chúng cung cấp môi trường hiếu khí. Tuy nhiên, ngay cả các bào tử riêng lẻ là quá lớn để xâm nhập vào phổi bằng cách hít (20 micron) khi chúng bị mắc kẹt trong khoang mũi và đường thở.	được thực hiện để xác định liều dung chịu tối đa.	Yêu cầu ban đầu với một phòng thí nghiệm độc chất (RDDT Laboratories, Melbourne) bắt đầu vào tháng 5/2010. Điều này dẫn đến một loạt các cuộc tham vấn với các cơ quan quản lý, tư vấn pháp lý và nhà độc học để quyết định thử nghiệm nào là bắt buộc, chi tiết quy trình thử nghiệm và lựa chọn mục thử nghiệm. Thử nghiệm bắt đầu vào tháng 12 năm 2014 và báo cáo cuối cùng đã nhận được vào tháng 1 năm 2016. Tổng thời gian yêu cầu là 5 năm 8 tháng.
	2. Các nhà quản lý yêu cầu liều lượng cao (để xuất 10^8 bào tử).	Đã phát triển một quy trình tinh chế TGAI để tối đa hóa liều bào tử có thể được sử dụng.	
	3. Việc nhỏ các vật chất dạng hạt gây ra phản ứng sinh lý mà có thể bị nhầm lẫn là	Thử nghiệm bao gồm nhóm đối chứng với các bào tử bất hoạt (chiếu xạ gama) để	

	tác dụng bất lợi do khả năng gây bệnh / độc tính của <i>D. flagrans</i> (ví dụ như viêm phổi không đặc hiệu).	chứng minh rằng các triệu chứng là do hít phải vật chất dạng hạt, không phải do khả năng gây bệnh / độc tính của bào tử.	
	4. Cơ quan quản lý yêu cầu liệt kê các bào tử trong phổi	Phương pháp được phát triển và được phê chuẩn để liệt kê bào tử trong phổi chuột.	
	5. Các cơ quan quản lý yêu cầu chứng minh sự thanh thải các bào tử ra khỏi cơ thể, nhưng cơ chế thanh thải trong phổi chưa được biết rõ đối với việc thanh thải các bào tử 20 micron vì các hạt có kích thước này thường	Thời gian thử nghiệm được kéo dài cho đến khi thanh thải hoàn toàn (6 tuần)	

	không đến được phổi		
Độ bụi	6. Cần định lượng nguy cơ hít phải vật chất dạng hạt của người thực hiện và động vật	Thử nghiệm độ bụi được tiến hành cho thấy thức ăn bổ sung (MP) là thực tế không có bụi	
Cỡ hạt	7. Cần phải chứng minh rằng các hạt mịn hơn quá lớn để người thực hiện và động vật hít phải	Phân tích bằng sàng khô cho thấy thức ăn bổ sung (MP) không có hạt nào có kích thước nhỏ hơn 50 micron	
Độc tính cấp tính qua đường miệng	8. Cần phải chỉ ra rằng <i>D. flagrans</i> chủng IAH 1297 không độc khi dùng qua đường miệng. Cơ quan quản lý yêu cầu liều cao nhất có thể	Đã phát triển quy trình tinh chế (TGAI) để tối đa hóa liều bào tử có thể được sử dụng ở mức liều cao hơn được sử dụng trong các thử nghiệm như vậy (5g / kg thể trọng)	
Kích ứng - Mắt	9. Cần đánh giá sự khó chịu nếu	Các thử nghiệm kích ứng mắt (<i>in</i>	

	EP và MP chứa chất gây kích ứng mắt đã biết (canxi cacbonat)	<i>vitro</i> và <i>in-vivo</i>) được thực hiện với EP	
Kích ứng và độc tính cho da	10. Caxi cacbonat trong EP và MP cũng có thể gây kích ứng da	Các thử nghiệm kích ứng và độc tính cho da được thực hiện với EP	
Độc tính lâu dài qua đường miệng	11. Dữ liệu từ các nghiên cứu trên động vật có vú lâu dài được yêu cầu	Được giải quyết thông qua các nghiên cứu độ an toàn liều cao trong thời gian dài ở động vật mục tiêu	Nghiên cứu trên cừu: Kế hoạch bắt đầu vào tháng 7 năm 2009 và báo cáo nghiên cứu đã nhận được vào tháng 2 năm 2010. Tổng thời gian yêu cầu là 7 tháng.
Độ an toàn đối với động vật mục tiêu	12. Cần chứng minh an toàn lâu dài trong điều kiện đồng cỏ	Các nghiên cứu an toàn liều cao (5-10X) lâu dài (5-10 tuần) được thực hiện ở cừu, trâu bò và dê	Các nghiên cứu trên trâu bò và ngựa: Kế hoạch bắt đầu vào tháng 3 năm 2013 và các báo cáo nghiên cứu đã nhận được vào tháng 12 năm 2013. Tổng thời gian yêu cầu là 9 tháng.
	13. Số lượng lớn bào tử yêu cầu (khoảng 500kg thức ăn bổ sung (EP) cho mỗi thử	Sản xuất TGAi đã được tăng quy mô.	Bắt đầu vào tháng 1 năm 2013, hoàn thành vào tháng 6 năm 2013

	nghiệm với tỷ lệ bao gồm bào tử 10 lần, tương đương với 5 tấn sản phẩm thông thường)		Tổng thời gian yêu cầu là 6 tháng.
Dư lượng	14. Chất chuyển hóa thứ cấp (flagranon A, B và C) của <i>D. fragrans</i> là đã biết, nhưng không có thông tin nào về việc sản xuất chất chuyển hóa bởi chủng IAH 1297.	Tiến hành nghiên cứu lên men; cho thấy rằng flagranon A là chất chuyển hóa chính duy nhất của <i>D. fragrans</i> chủng IAH 1297, mà các flagranon B và C không được tạo ra và các nguyên liệu liên quan về mặt cấu trúc khác ít hơn 5% flagranon A	Kế hoạch dự án bắt đầu vào tháng 10 năm 2014, báo cáo nhận được vào tháng 12 năm 2015. Tổng thời gian yêu cầu là 14 tháng.
	15. Không có dữ liệu độc tính được công bố có sẵn đối với flagranon	Các đặc tính độc tính được nghiên cứu bằng các nghiên cứu bàn giấy in-silico sử dụng công nghệ QSAR	Kế hoạch bắt đầu vào tháng 4 năm 2012, báo cáo nhận được vào tháng 6 năm 2016. Tổng thời gian yêu cầu là 4 năm.

	16. Không có tài liệu tham khảo phân tích có sẵn cho flagranon A	Flagranon A tinh chế được tách và được mô tả đặc điểm bởi chuyên gia hóa học sản phẩm tự nhiên.	Giai đoạn 1: Kế hoạch dự án bắt đầu vào tháng 4 năm 2008, báo cáo nhận được tháng 10 năm 2008. Tổng thời gian yêu cầu là 6 tháng. Giai đoạn 2: Kế hoạch dự án bắt đầu tháng 10 năm 2014 báo cáo nhận được tháng 12 năm 2015. Tổng thời gian yêu cầu là 14 tháng.
	17. Nguyên liệu tham chiếu tinh khiết flagranon A không ổn định, nhưng nguyên liệu bị phân hủy có vẻ tinh khiết về mặt sắc ký, mà dẫn đến kết quả thử nghiệm bị tăng giả tạo.	Thử nghiệm độ ổn định được thực hiện với flagranon A. Nguyên liệu tinh khiết có thể được làm ổn định bằng cách lưu giữ trong ống nhỏ được bịt kín trong tối ở nhiệt độ -80°C, mà không phải -20°C	Kế hoạch dự án bắt đầu vào tháng 10 năm 2014, báo cáo nhận được vào tháng 12 năm 2015. Tổng thời gian yêu cầu là 14 tháng.
	18. Hiện nay chưa có phương pháp phân tích nào để thử	Các phương pháp được phát triển và được phê chuẩn để thử nghiệm	Giai đoạn 1: Kế hoạch bắt đầu vào tháng 4 năm 2013, báo cáo nhận được tháng 3 năm 2014.

	thử nghiệm flagranon A trong TGAI, MP và EP.	flagranon A trong TGAI, MP và EP	Tổng thời gian yêu cầu là 11 tháng. Giai đoạn 2: Kế hoạch bắt đầu từ tháng 7 năm 2015, báo cáo nhận được vào tháng 12 năm 2015. Tổng thời gian yêu cầu là 5 tháng.
		Phân tích các lô TGAI cho thấy trường hợp không mong muốn nhất là mức hấp thu hàng ngày của động vật nhận ở dưới mức yêu cầu cần phải thực hiện thử nghiệm cho ăn để đánh giá dư lượng trong các sản phẩm thức ăn thu được từ động vật nhận	Tổng thời gian yêu cầu là 1 tháng,
	19. Không có dữ liệu về việc công nhân tiếp xúc với flagranon A	Bằng cách sử dụng dữ liệu phân tích từ TGAI và các mô hình tiếp	Tổng thời gian yêu cầu là 1 tháng,

		xúc phù hợp, có thể thấy rằng mức độ tiếp xúc trong trường hợp xấu nhất của công nhân sản xuất và công nhân nông trại xử lý thức ăn bổ sung (EP) dưới mức đáng lo ngại	
	20. Không có dữ liệu về mức độ hấp thu đối với người tiêu dùng ăn các sản phẩm có nguồn gốc từ động vật được điều trị bằng thức ăn bổ sung (EP)	Bằng cách sử dụng số liệu phân tích từ TGAI, cho thấy rằng mức hấp thu trong trường hợp xấu nhất có thể thấp hơn mức lo ngại.	Tổng thời gian yêu cầu là 1 tháng,

Ví dụ 10: Các thử nghiệm độc tính

Chỉ là ví dụ không nhằm giới hạn, thử nghiệm độc tính được thực hiện với chế phẩm theo sáng chế. Chế phẩm này cũng là sản phẩm kiểm soát sinh học. Chế phẩm theo sáng chế được điều chế ví dụ, theo ví dụ 3 và được phối chế thêm để tạo ra EP và/hoặc MP theo ví dụ 4.

Chọn lựa các vật phẩm thử nghiệm

Các vật phẩm thử nghiệm đối với các nghiên cứu này được chọn theo mục đích và phạm vi của thử nghiệm. Các nghiên cứu độc tính cấp tính qua đường miệng, và độc tính cấp tính trong phổi được thực hiện với TGAI tinh khiết tức là chế phẩm cô của bào tử của *D. flagrans* chủng IAH 1297 (thành phần hoạt tính) để đảm bảo rằng liều lượng bào tử cao nhất có thể được dùng trong mỗi trường hợp. Các nghiên cứu khác, như các thử nghiệm kích ứng mắt và da, được thực hiện bằng cách sử dụng EP, mà được coi là phù hợp hơn với người dùng sản phẩm.

Tóm tắt và tổng quan dữ liệu

Bộ nghiên cứu độc tính thực hành tốt phòng thí nghiệm tiêu chuẩn quốc tế được thực hiện được tóm tắt dưới đây; không có nghiên cứu nào chỉ ra bất kỳ nguyên nhân nào đáng lo ngại.

Nghiên cứu độc tính cấp tính qua đường miệng cho thấy rằng bào tử *D. flagrans* trong TGAI tinh khiết không độc. Liều lượng 5000 mg/kg thể trọng ở chuột không gây ra bất kỳ dấu hiệu lâm sàng nào và do đó, liều lượng LD50 qua đường miệng lớn hơn 5000 mg/kg thể trọng.

Trong nghiên cứu độc tính và khả năng lây nhiễm cấp tính trong phổi, bào tử của TGAI tinh khiết được trực tiếp đưa vào phổi do đường kính bào tử nằm trong khoảng từ 20 đến 24 micron có nghĩa là chúng quá lớn để hít được vào phổi. Việc đưa các bào tử vào trong phổi không gây ra các dấu hiệu độc tính hoặc lây nhiễm, ngoại trừ hơi thở nặng nhọc mà được giải quyết trong 3-4 ngày (kết quả tương tự thu được với sản phẩm được làm giảm độc lực). Bào tử cuối cùng đã được thanh thải khỏi phổi.

Nghiên cứu động tính cấp tính trên da được thực hiện bằng cách đưa EP lên miếng dán trên da với liều giới hạn là 5000 mg/kg thể trọng cũng cho thấy không có tác dụng độc tính.

Thử nghiệm kích ứng da cấp tính đã kết luận rằng EP được phân loại là không gây kích ứng khi được đưa lên da thỏ. Thử nghiệm thức ăn bổ sung EP theo phương pháp thử

thử nghiệm CIPAC TM171 về độ bụi cho thấy sản phẩm được xác định là không gây bụi, và điều này sẽ góp phần tạo nên độ an toàn cho sản phẩm.

Thử nghiệm kích ứng mắt cấp tính bằng cách sử dụng EP đã kết luận rằng tác dụng kích ứng kết mạc diễn ra sau 1 giờ, nhưng các tác dụng này đã hoàn toàn bị đẩy lùi trong vòng 72 giờ. Không quan sát thấy có sự ảnh hưởng đến giác mạc. Thông tin này được hỗ trợ bởi một nghiên cứu kích ứng mắt in vitro với mắt gà được tách ra trong đó sản phẩm này không được phân loại là chất gây kích ứng nghiêm trọng hoặc là chất không gây kích ứng.

Các nghiên cứu độ an toàn ở liều cao trong thời gian dài ở mức gấp 5 lần liều đề xuất ở cừu và gấp 10 lần ở trâu bò và ngựa đã khẳng định sự an toàn của TGAI. Các nghiên cứu của các nhà nghiên cứu khác cũng hỗ trợ cho phát hiện này.

Số liệu này đã cung cấp hỗ trợ phê duyệt theo quy định đối với chế phẩm hoặc sản phẩm kiểm soát sinh học theo sáng chế.

Một số đặc tính vật lý liên quan của MP cũng được xác định, đáng chú ý là độ bụi theo phương pháp thử nghiệm CIPAC TM171 và phân tích sàng theo CIPAC TM170. Bằng cách sử dụng tiêu chuẩn CIPAC cho độ bụi, MP được phát hiện là “gần như không có bụi”; và phân tích sàng khô cho thấy không có vật liệu nào được giữ lại hoặc đi qua lưới 50 micron. Ngoài ra, việc xác định kích thước bào tử *D. flagrans* được đề xuất vì có mối quan hệ giữa kích thước khí động học của hạt bụi bất kỳ và khả năng hít vào hoặc hô hấp của nó. Tất cả các kết quả thử nghiệm này cung cấp bằng chứng về bản chất rủi ro thấp của sản phẩm.

Cũng chú ý đến các chất chuyển hóa thứ cấp của *D. flagrans* chủng IAH 1297. Chủng này sản xuất ra chất chuyển hóa chính duy nhất, flagranon A, và kết quả phân tích đã cho thấy rằng nguyên liệu này có mặt ở mức quá thấp để báo động về độc tính.

Tổng quan độc tính của *D. flagrans* chủng IAH 1297 được nêu trong Chuyên gia chất độc học được đăng ký châu Âu. Kết luận:

D. flagrans hoạt động trong phân của động vật được điều trị và không được hấp thụ vào hệ tuần hoàn toàn thân; do vậy, nấm này không có độc tính toàn thân. Điều này đã được xác nhận thông qua một loạt các nghiên cứu độc tính ở động vật thí nghiệm và nghiên cứu độ an toàn ở liều cao trong thời gian dài ở động vật mục tiêu.

Người ta đã kết luận rằng các nghiên cứu trên động vật thí nghiệm và các loài mục tiêu không chỉ ra tác dụng độc tính bất kỳ và các rủi ro do flagranon A (chất chuyển hóa thứ cấp) gây ra cho người tiêu dùng là không đáng kể. Với bản chất của thành phần hoạt tính, không cần thiết phải thực hiện thêm thử nghiệm độc tính nào nữa đối với sản phẩm hoặc các chất này.

Các nghiên cứu về thành phần hoạt tính:

Khả năng lây nhiễm và khả năng gây bệnh:

Những tính chất này được đánh giá bằng phương pháp nghiên cứu khả năng lây nhiễm và độc tính cấp tính đối với phổi của GLP được đề cập dưới đây. Phổi được coi là cơ quan lý tưởng để đánh giá khả năng lây nhiễm và khả năng gây bệnh của *D. flagrans* bởi vì người ta đã chứng minh rằng các bào tử cần oxy để nảy mầm và phổi cung cấp môi trường hiếu khí, không giống như các vị trí thử nghiệm khác (đường dạ dày-ruột hoặc khoang màng bụng).

Lựa chọn vật phẩm thử nghiệm được quyết định bởi nhu cầu phải tối đa hóa liều bào tử có thể được sử dụng. Vật phẩm thử nghiệm được sử dụng là TGAI đã tinh chế, vì nó chứng tỏ không thể đạt được nồng độ cao hơn thông qua các thử nghiệm trong phòng thí nghiệm quy mô nhỏ. Vì các bào tử có đường kính khoảng 20 micron, nên người ta đã quyết định đưa chúng vào bằng cách trực tiếp đưa vào khí quản, bỏ qua mũi và cổ họng nơi các bào tử có thể bị mắc kẹt.

Các nghiên cứu độc tính và khả năng lây nhiễm cấp tính cho phổi.

Một nghiên cứu về độc tính và khả năng lây nhiễm cấp tính cho phổi được thực hiện trên chuột trong đó chuột được điều trị bằng một liều bào tử *D. flagrans* IAH1297 dưới

dạng bột bào tử khô (TGAI tinh khiết), hoặc một lượng tương đương bào tử bị bất hoạt, bằng cách sử dụng phương pháp nhỏ giọt.

Các quan sát hoại tử đã xác nhận rằng các chất lắng bào tử lan rộng trong phổi sau khi bơm vào, theo yêu cầu của nghiên cứu này. Các dấu hiệu lâm sàng quan trọng duy nhất được quan sát là hô hấp khó khăn, hô hấp gây tiếng ồn và tăng nhịp hô hấp ở tất cả các động vật. Những triệu chứng này dần dần được giải quyết trong vòng 3-4 ngày đầu tiên.

Dựa trên kết quả của nghiên cứu này, vật phẩm thử nghiệm, khi dùng cho chuột dưới dạng liều đơn trong khí quản, không gây ra dấu hiệu về độc tính, khả năng lây nhiễm hoặc khả năng gây bệnh. Kết quả này chỉ ra rằng liều tối đa được xác định bởi kích thước và bề mặt vật lý của bào tử chứ không phải bởi độc lực của chúng. Điều này được xác nhận thêm bằng việc tăng thể trọng khi các dấu hiệu lâm sàng đã giảm (sau khoảng 7 ngày) ở động vật được điều trị bằng bào tử hoạt động hoặc bị bất hoạt. Cũng cần lưu ý rằng sau khoảng thời gian 42 ngày, các bào tử sống không được phát hiện trong phổi của động vật được điều trị. Sự thanh thải chậm các bào tử ra khỏi phổi được coi là có liên quan đến các tính chất vật lý của nguyên liệu thử nghiệm, đặc biệt là kích thước bào tử lớn.

Độc tính cấp tính qua đường miệng.

Nghiên cứu độc tính cấp tính qua đường miệng được thực hiện với bào tử *D. flagrans* chủng IAH 1297 trên chuột. Trong nghiên cứu này, 3 chuột được nhận liều đơn qua đường miệng (đưa bằng ống vào dạ dày) của bào tử *D. flagrans* chủng IAH 1297 từ (TGAI tinh chế) ở liều giới hạn là 5000 mg/kg thể trọng (body weight - BW). Động vật được cho nhịn đói qua đêm trước khi điều trị và thức ăn được cung cấp trở lại 3 giờ sau khi dùng theo liều.

Ban đầu, một con cái được điều trị ở mức liều là 5000 mg/kg BW. Không quan sát thấy có trường hợp tử vong nào trên hai con chuột tiếp theo (nhóm xác nhận) đã được điều trị ở mức 5000 mg/kg BW. Không quan sát thấy có trường hợp tử vong ở nhóm xác nhận.

Động vật đã được quan sát riêng lẻ sau khi dùng theo liều trong tối đa 6 giờ sau điều trị và một lần mỗi ngày trong 14 ngày sau đó. Thể trọng được đo vào ngày -1, ngay trước

khi dùng theo liều (ngày 0) và hàng tuần sau đó. Tất cả các động vật đã được kiểm tra tổng thể vào cuối thời gian quan sát. Không có đánh giá khả năng gây bệnh cụ thể được thực hiện, nhưng kiểm tra chặt chẽ động vật về các tác dụng phụ bất kỳ.

Kết luận thử nghiệm:

- Không quan sát thấy có hiện tượng tử vong.
- Việc điều trị bằng bào tử *D. flagrans* (chủng IAH 1297) ở các mức liều lượng là 5,000 mg/kg thể trọng không gây ra dấu hiệu lâm sàng bất kỳ.
- Không có sự thay đổi thể trọng liên quan đến việc điều trị. Thể trọng nằm trong khoảng thường được ghi nhận đối với chủng và độ tuổi này.
- Không có bằng chứng về các quan sát vĩ mô ở mức liều lượng là 5.000 mg/kg BW

Trong các điều kiện của nghiên cứu này, liều gây chết trung bình cấp tính khi dùng qua đường miệng (LD50) của đối tượng thử nghiệm, bào tử *D. flagrans* chủng IAH 1297 (TGAI tinh sạch), là lớn hơn 5000 mg/kg BW (liều giới hạn) trong chuột CRL:(WI) cái.

Trong nghiên cứu này, lượng bào tử cho động vật ăn là lớn hơn 600 lần liều TGAI thương mại được đề xuất trong MP hoặc EP như sau:

Tỷ lệ liều lượng nghiên cứu: 5 g thành phần hoạt tính (TGAI tinh sạch)/kg BW ở $3,8 \times 10^6$ bào tử/g (dựa trên thử nghiệm đối với mẹ cụ thể được sử dụng trong thử nghiệm) bằng $1,9 \times 10^7$ bào tử /kg BW.

Tỷ lệ liều lượng đề xuất: 6 g MP/100 kg BW hoặc 100g EP/100kg thể trọng bằng 30.000 bào tử/kg BW

Riêng năm 2006, Cơ quan an toàn thực phẩm châu Âu (EFSA) đã công bố ý kiến của họ về sự an toàn của *D. flagrans* dưới dạng chất phụ gia thức ăn cho bê. Dữ liệu được xem xét bao gồm một nghiên cứu độc tính cấp tính khi sử dụng qua đường miệng bằng cách sử dụng 5 con chuột cái có nguồn gốc từ chuột 11 tuần tuổi được nhận liều đơn 2000 mg/kg BW. Động vật được theo dõi trong 14 ngày, bị giết bằng cách cho hít khí cacbon dioxit và được mổ xác. Nghiên cứu đã kết luận rằng không có tác dụng độc tính nào quan

sát được và khi khám nghiệm tử thi các cơ quan được kiểm tra ngoại trừ phổi có hình dạng vĩ mô bình thường (các bất thường ở phổi quan sát được cho là do sử dụng cacbon dioxit để giết chuột).

EFSA đã kết luận rằng sản phẩm này có độc tính qua đường miệng với LD50 lớn hơn 2000 mg/kg BW hoặc 2×10^7 bào tử/kg BW. EFSA đã kết luận rằng nấm này có độc tính qua đường miệng rất thấp.

Kích thước bào tử D. flagrans

Việc xác định kích thước bào tử thu được kết quả là bào tử có kích thước là 19 micron và 24 micron. Điều này là phù hợp vì kích thước bào tử này là quá lớn để có thể được hít vào phổi, giúp giảm thiểu mọi rủi ro do hít phải bào tử. Ngoài ra, vì lý do này, nghiên cứu về sự ảnh hưởng đến phổi và khả năng lây nhiễm đã sử dụng các bào tử riêng rẽ làm đối tượng thử nghiệm, được sử dụng bằng cách trực tiếp đặt vào khí quản.

Đánh giá sự tiếp xúc

Không có sự tiếp xúc nào của người tiêu dùng với *D. flagrans* vì nấm này không được hấp thụ bởi động vật nhận.

Người làm việc được giảm thiểu sự tiếp xúc với *D. flagrans* bằng cách thông gió, trang bị máy hút bụi cho thiết bị sản xuất và đóng gói tại nơi làm việc và sử dụng các thiết bị bảo vệ cá nhân.

Một loạt nghiên cứu độc tính và sự an toàn trong thời gian dài đã chỉ ra rằng *D. flagrans* chủng IAH 1297 là nguyên liệu có nguy cơ thấp,

Chất chuyển hóa thứ cấp của D. flagrans

Flagranon là chất chuyển hóa thứ cấp do *D. flagrans* sản xuất và các flagranon A, B và C đã được thông báo. Như được thể hiện trong ví dụ 11, người ra đã phát hiện ra rằng *D. flagrans* chủng IAH 1297 (TGAI) không tạo ra flagranon B và C, và sự tiếp xúc với công nhân sản xuất, nông dân và người tiêu dùng với flagranon A do việc sản xuất và sử dụng TAGI, MP và EP, từ việc tiêu thụ các sản phẩm từ động vật được điều trị đã được

xác định. Người ta nhận thấy rằng mức độ tiếp xúc với con người nằm dưới giá trị Ngưỡng báo động về chất độc của Châu Âu (TTC) là $1,5\mu\text{g/kg BW/ ngày}$ và mức độ tiếp xúc với động vật nằm dưới mức trên mà các nghiên cứu dư lượng được yêu cầu ($4\mu\text{g/kg BW/ ngày}$).

Các nghiên cứu về sản phẩm

Độc tính cấp tính trên da.

Thử nghiệm độc tính trên da được thực hiện bằng cách sử dụng EP vì nó được coi là tá dược có thể đóng góp vào các tác động trên da. Trong thử nghiệm này chuột được điều trị bằng cách đưa một liều EP dạng bán khóa ẩm lên da ở liều giới hạn là 5000mg/kg BW . Lượng nước được sử dụng đủ để làm ẩm vật liệu thử nghiệm để đảm bảo tiếp xúc tốt với da. Khoảng thời gian tiếp xúc là 24 giờ, sau đó quan sát trong vòng 14 ngày. Các quan sát lâm sàng cùng với kiểm tra khả năng sống sót và tử vong đã được thực hiện trên tất cả các động vật vào lúc 1 giờ và 5 giờ sau khi dùng theo liều và hàng ngày trong 14 ngày sau đó. Thử nghiệm được cân trước khi dùng theo liều vào ngày 0, ngày 7 và 14. Tất cả các động vật đều được kiểm tra tổng thể khi giết và khi kết thúc thời gian quan sát.

Kết quả như sau:

- Không quan sát thấy có hiện tượng tử vong trong nghiên cứu này.
- Không có dấu hiệu lâm sàng bất lợi nào quan sát được sau khi điều trị bằng vật phẩm thử nghiệm hoặc trong thời gian quan sát 14 ngày và không quan sát thấy có ảnh hưởng bất kỳ tại vị trí sử dụng.
- Không có sự thay đổi thể trọng liên quan đến việc điều trị.

Thử nghiệm nằm trong khoảng thường được ghi nhận đối với chủng và độ tuổi này.

- Không có bằng chứng về các quan sát tác dụng bất lợi ở mức liều lượng là 5000mg/kg BW khi mổ xác.

Kết luận được rằng liều gây chết trung bình (LD_{50}) của EP sau khi dùng liều đơn qua da lớn hơn 5000mg/kg thể trọng của chuột.

Các thử nghiệm kích ứng mắt cấp tính được thực hiện bằng cách sử dụng EP vì nó được coi là đại diện cho mô hình tiếp xúc thực tế nhất. Thử nghiệm kích ứng mắt *in vitro* được thực hiện bằng cách sử dụng mắt gà được tách ra với EP là vật phẩm thử nghiệm. Quy trình bao gồm việc đưa vật phẩm thử nghiệm trong một liều duy nhất lên giác mạc của mắt của động vật giết mổ đã được tách ra.

Sau các phép đo tham chiếu bằng không, mắt được giữ ở vị trí nằm ngang và vật phẩm thử nghiệm được áp vào trung tâm giác mạc sao cho toàn bộ bề mặt giác mạc được che phủ. Sau 10 giây, bề mặt được rửa sạch bằng nước muối. Mắt đối chứng dương tính được xử lý bằng 30 mg Imidazol. Mắt đối chứng âm tính được xử lý bằng 30 μ L nước muối sinh lý. Trong nghiên cứu, ba mắt được xử lý bằng vật phẩm thử nghiệm, ba mắt được xử lý bằng đối chứng dương tính và một mắt được xử lý bằng đối chứng âm tính được kiểm tra.

Không có hiện tượng sưng giác mạc đáng kể đã được quan sát trong thời gian quan sát bốn giờ. Thay đổi độ đục giác mạc (mức độ nghiêm trọng 0,5 hoặc 1) và thay đổi duy trì florescein (mức độ nghiêm trọng 0,5 hoặc 1) đã được ghi nhận trên tất cả các mắt được xử lý bằng vật phẩm thử nghiệm, hơn nữa các hạt vật phẩm thử nghiệm bị dính vào giác mạc và không thể rửa sạch trong quá trình nghiên cứu. Nhìn chung, các tác động rõ ràng là lớn hơn các tác động tiêu cực, nhưng không đủ để phân loại chúng là nghiêm trọng. Các hạt dính vào giác mạc có khả năng dẫn đến tổn thương giác mạc cơ học *in vivo*.

Thử nghiệm kích thích mắt *in vitro* chỉ ra rằng EP không được phân loại là chất gây kích ứng nghiêm trọng hoặc không gây kích ứng. Các tác giả sáng chế đã kết luận rằng cần có thêm thông tin để phân loại.

Kích ứng mắt in-vivo

Ba con thỏ đực trắng mới thành thục New Zealand được sử dụng trong thử nghiệm này và vật phẩm thử nghiệm (EP) được dùng dưới dạng liều đơn vào trong túi kết mạc của mắt trái với mắt phải không được xử lý dùng làm đối chứng. Tác dụng kích ứng được ghi

ở các thời điểm khác nhau lên đến 72 giờ như hình dưới đây sau khi đưa vật phẩm thử nghiệm vào mắt.

Quan sát với việc nhuộm florescein trong khoảng 24 giờ trước khi xử lý và sau đó là 24, 48 và 72 giờ sau khi xử lý ở tất cả các động vật. Thỏ được điều trị bằng thuốc giảm đau và gây mê theo hướng dẫn quy định. Kết quả thu được từ ba con vật này được sử dụng để phân loại khả năng kích ứng của vật phẩm thử nghiệm. Không có đánh giá khả năng gây bệnh cụ thể được thực hiện, nhưng kiểm tra chặt chẽ động vật về các tác dụng phụ bất kỳ. Mức độ kích ứng kết mạc, mồng mắt và giác mạc được chỉ định một điểm bằng số.

Số liệu sau đây thu được:

Động vật thứ nhất (số: 1393) quan sát lâm sàng:

Vào lúc 1 giờ sau khi sử dụng, đỏ kết mạc (điểm 2), phù kết mạc (điểm 1) và xuất tiết (điểm 2) đã được ghi nhận ở thỏ. Vật phẩm thử nghiệm vẫn còn trong túi mắt tại thời điểm quan sát một giờ ở thỏ. Vào 24 giờ sau khi sử dụng, đỏ kết mạc (điểm 2), phù kết mạc (điểm 1) và xuất tiết (điểm 1) đã được ghi nhận ở thỏ.

Vào 48 giờ sau khi sử dụng, đỏ kết mạc (điểm 1) đã được ghi nhận ở thỏ. Vào 72 giờ sau khi sử dụng, không quan sát thấy các dấu hiệu lâm sàng và không thấy có tác dụng lên kết mạc hoặc giác mạc.

Động vật thứ hai (số: 1398) quan sát lâm sàng:

Vào lúc 1 giờ sau khi sử dụng, đỏ kết mạc (điểm 2), phù kết mạc (điểm 1) và xuất tiết (điểm 2) đã được ghi nhận ở thỏ. Vật phẩm thử nghiệm vẫn còn trong túi mắt tại thời điểm quan sát một giờ ở thỏ. Vào 24 giờ sau khi sử dụng, đỏ kết mạc (điểm 2) và xuất tiết (điểm 1) đã được ghi nhận ở thỏ.

Vào 48 giờ sau khi sử dụng, đỏ kết mạc (điểm 1) đã được ghi nhận ở thỏ. Vào 72 giờ sau khi sử dụng, không quan sát thấy các dấu hiệu lâm sàng và không thấy có tác dụng lên kết mạc hoặc giác mạc.

Động vật thứ ba (số: 1390) quan sát lâm sàng:

Vào lúc 1 giờ sau khi sử dụng, đỏ kết mạc (điểm 2), phù kết mạc (điểm 1) và xuất tiết (điểm 2) đã được ghi nhận ở thỏ. Vật phẩm thử nghiệm vẫn còn trong túi mắt tại thời điểm quan sát một giờ ở thỏ. Vào 24 giờ sau khi sử dụng, đỏ kết mạc (điểm 2) và xuất tiết (điểm 1) đã được ghi nhận ở thỏ

Vào 48 giờ sau khi sử dụng, đỏ kết mạc (điểm 1) đã được ghi nhận ở thỏ. Vào 72 giờ sau khi sử dụng, không quan sát thấy các dấu hiệu lâm sàng và không thấy có tác dụng lên kết mạc hoặc giác mạc.

Nhuộm florescein âm tính ở tất cả các động vật trong khoảng thời gian quan sát. Do không có dấu hiệu lâm sàng nào được quan sát, nên thí nghiệm đã chấm dứt sau 72 giờ quan sát.

Trong quá trình nghiên cứu, mắt đối chứng của mỗi động vật không có triệu chứng. Tình trạng và hành vi chung của động vật là bình thường trong suốt thời gian thử nghiệm. Thể trọng của tất cả các con thỏ được coi là nằm trong phạm vi biến đổi bình thường. Tuy nhiên, sự giảm trọng lượng cơ thể ở mức nhẹ được ghi nhận ở một con vật (số 1393) during khoảng thời gian quan sát.

Các tác giả sáng chế đã kết luận rằng EP, được dùng cho mắt thỏ, gây tác dụng kích ứng kết mạc tại thời điểm một giờ sau khi xử lý mà hoàn toàn bị đẩy lùi trong vòng 72 giờ. Không quan sát thấy có tác dụng lên giác mạc trong nghiên cứu.

Kích ứng da cấp tính

Nghiên cứu kích ứng da cấp tính được thực hiện bằng cách sử dụng EP. Ba (3) con thỏ New Zealand trắng mới thành thục được điều trị bằng cách đưa chế phẩm thử nghiệm (EP) theo cách tại chỗ, bán khóa ẩm lên sườn được cạo còn nguyên vẹn da của chúng. Vật phẩm thử nghiệm được làm ẩm bằng nước để đảm bảo tiếp xúc tốt với da. Thời gian điều trị là 4 giờ.

Việc chấm điểm các phản ứng da được thực hiện tại 1, 24, 48 và 72 giờ sau khi loại bỏ đồ băng bó. Chỉ số kích ứng nguyên phát (primary irritation index - P.I.I.) được tính bằng cách tính tổng điểm tích lũy trung bình ở 24, 48 và 72 giờ và sau đó chia cho số điểm

dữ liệu. Không có đánh giá khả năng gây bệnh cụ thể được thực hiện, nhưng kiểm tra chặt chẽ động vật về các tác dụng phụ bất kỳ.

Trong nghiên cứu này, thu được kết quả sau đây:

- Chỉ số kích ứng nguyên phát bằng 0,00.
- Không quan sát thấy có dấu hiệu da liễu cục bộ ở các động vật được điều trị trong suốt nghiên cứu.
- Không quan sát thấy có độc tính toàn thân ở các động vật trong nghiên cứu và không xảy ra hiện tượng tử vong. Vì không có dấu hiệu lâm sàng nào được quan sát vào 72 giờ sau khi loại bỏ miếng dán, nghiên cứu đã kết thúc sau 72 giờ quan sát.
- Trọng lượng cơ thể của tất cả các con thỏ được coi là nằm trong phạm vi biên đổi bình thường.

Theo tiêu chuẩn phân loại Draize, EP được coi là “không kích ứng” đối với da thỏ (P.I.I. = 0,00).

Quan sát thấy có hiện tượng giảm trọng lượng cơ thể, nhưng động vật đã trở lại trọng lượng cơ thể ban đầu sau khoảng 7 ngày. Sau khoảng thời gian này, không có tác dụng liên quan đến điều trị đối với trọng lượng cơ thể hoặc việc tăng trọng lượng cơ thể và trọng lượng cơ thể nằm trong phạm vi thường thấy đối với chủng và độ tuổi này của chuột.

Các nghiên cứu khác

Nghiên cứu độ bụi

Nghiên cứu độ bụi GLP với MP theo phương pháp thử nghiệm CIPAC MT171 cho thấy rằng nó “gần như không bụi”.

Phân tích bằng sàng

Ngoài ra, nghiên cứu phân tích bằng sàng khô GLP với MP được thực hiện theo CIPAC TM170. Phân tích bằng sàng khô cho thấy không thấy có nguyên liệu được giữ lại trên, hoặc đi qua sàng 50 micron.

Ngoài ra, ở trên đường kính của *D. flagrans* chủng IAH 1297 được thể hiện là khoảng 20 micron.

Các kết quả này là có ý nghĩa do các đặc điểm này sẽ làm giảm khả năng tiếp xúc với mắt và da và bằng cách hít phải.

Các nghiên cứu độ an toàn ở liều lượng cao trong thời gian dài với TGAI trong EP

Các nghiên cứu độ an toàn ở liều lượng cao trong thời gian dài đối với trâu bò, cừu và ngựa được tóm tắt dưới đây.

Nghiên cứu độ an toàn trong thời gian dài ở trâu bò (liều lượng gấp 10 lần)

Nghiên cứu GCP được thực hiện ở trâu bò để khẳng định độ an toàn của TGAI khi được dùng cho trâu bò với tỷ lệ liều lượng được tăng lên (gấp mười lần liều thông thường) trong tám tuần.

20 con bò Angus (cái và đực thiến, tuổi nhỏ hơn 12 tháng) được chọn từ cùng một nhóm động vật và thích nghi với việc tiêu thụ sản phẩm giả dược (Livamol®), 125g/100 kg thể trọng/ngày). Sau đó, chúng được chia thành hai nhóm mỗi nhóm 10 con động vật dựa trên giới tính và thể trọng. Trong 56 ngày tiếp theo, Nhóm 1 (nhóm đối chứng) tiếp tục được nhận sản phẩm giả dược, trong khi đó Nhóm 2 (nhóm thử nghiệm) được nhận 125g/100 kg thể trọng/ngày EP chứa 10 lần lượng thông thường của TGAI (tương đương với tối thiểu 3×10^5 bào tử/kg thể trọng/ngày). Liều lượng này là bằng mười lần liều lượng được sử dụng để kiểm soát giun tròn ký sinh trong ruột (3×10^4 bào tử/kg thể trọng/ngày) ở trâu bò.

Độ an toàn của TGAI được khẳng định bằng việc bác sỹ thú y thăm khám lâm sàng nhiều lần, sự thay đổi thể trọng theo thời gian và sinh hóa huyết thanh và huyết học, so với bò không được điều trị. Việc thăm khám lâm sàng chi tiết được thực hiện vào các ngày -10, 3, 7, 14, 28 và 56, trọng lượng cơ thể được cân vào các ngày -10, 7, 14, 28 và 56, các

mẫu máu được lấy để xét nghiệm sinh hóa huyết thanh và huyết học vào các ngày -10, 14 và 56.

Không có bằng chứng về độc tính hoặc lây nhiễm cấp tính hoặc mãn tính (ngoài bệnh sốt rét ở hai con bò trong nhóm đối chứng) được quan sát trong quá trình nghiên cứu. Nhìn chung, không có dấu hiệu lâm sàng, tăng cân, sinh hóa hoặc huyết học bất lợi nào quan sát được trong nghiên cứu có thể liên quan đến việc cho ăn TGAI trong thời gian kéo dài (56 ngày), liều TGAI bao gồm bào tử *D. flagrans* với lượng gấp 10 lần số lượng cần để kiểm soát giun tròn ký sinh đường ruột ở trâu bò.

Nguyên cứu độ an toàn trong thời gian dài ở ngựa (liều lượng gấp 10 lần)

Nghiên cứu GCP được thực hiện ở ngựa để khẳng định độ an toàn của TGAI khi được sử dụng cho ngựa ở tỷ lệ liều lượng tăng (gấp mười lần liều lượng thông thường) trong tám tuần.

20 con ngựa (ngựa nông trại Úc, máu nóng, thuần chủng; cái, đực thiên, tuổi từ 3 đến 12 tuổi) được chọn từ cùng một nhóm động vật và thích nghi với việc tiêu thụ sản phẩm giả dược (Livamol®, 125g/100 kg thể trọng/ngày). Sau đó, chúng được chia thành hai nhóm mỗi nhóm 10 con được dựa trên thể trọng. Trong 56 ngày tiếp theo, Nhóm 1 (Nhóm đối chứng) tiếp tục nhận được sản phẩm giả dược, trong khi Nhóm 2 (Nhóm thử nghiệm) được cho 125 g/100 kg thể trọng / ngày EP chứa TGAI với lượng gấp 10 lần liều thông thường (tương đương tối thiểu 3×10^5 bào tử/kg thể trọng/ngày). Liều lượng này là bằng mười lần liều lượng được sử dụng để kiểm soát giun tròn ký sinh đường ruột (3×10^4 bào tử/kg thể trọng/ngày) ở (3×10^4 bào tử/kg thể trọng/ngày) ở ngựa.

Độ an toàn của TGAI được xác nhận thông qua việc các bác sĩ thú y thăm khám lâm sàng nhiều lần, thay đổi trọng lượng theo thời gian và sinh hóa huyết thanh và huyết học, so với những con ngựa không được điều trị. Các thăm khám lâm sàng chi tiết được thực hiện vào các ngày -1, 3, 7, 14, 27 và 56, thể trọng được cân vào các ngày -1, 7, 14, 27 và 56, các mẫu máu được lấy để xét nghiệm sinh hóa huyết thanh và huyết học vào các ngày -1, 14 và 56.

Không có bằng chứng về độc tính hoặc lây nhiễm cấp tính hoặc mãn tính quan sát được trong quá trình nghiên cứu. Nhìn chung, không có dấu hiệu lâm sàng, sinh hóa hoặc huyết học bất lợi nào quan sát được trong nghiên cứu có thể liên quan đến việc cho ăn TGAI trong khoảng thời gian dài (56 ngày), liều TGAI chứa bào tử *D. flagrans* với lượng gấp 10 lần số lượng cần để kiểm soát giun tròn ký sinh đường ruột.

Nghiên cứu độ an toàn trong thời gian dài ở cừu (liều lượng gấp 5 lần)

Nghiên cứu GCP được thực hiện ở cừu để khẳng định độ an toàn của TGAI khi được dùng cho cừu ở tỷ lệ liều lượng tăng (năm lần liều lượng thông thường) trong sáu tuần.

Hai mươi (20) con cừu cái Merino khoảng 12-13 tháng tuổi cân nặng khoảng 24,0 đến 32,0 kg được làm thích nghi với việc tiêu thụ sản phẩm giả dược (Livamol®, 100g/100kg/ngày). Sau đó, chúng được phân bổ vào hai nhóm trong đó mỗi nhóm gồm 10 động vật dựa trên trọng lượng cơ thể. Trong 43 ngày tiếp theo, Nhóm 5 (Nhóm đối chứng) tiếp tục nhận được sản phẩm giả dược trong khi Nhóm 6 (Nhóm thử nghiệm) được cung cấp 100g/con/ngày EP chứa 5 lần lượng TGAI thông thường (tương đương với tối thiểu $1,5 \times 10^5$ bào tử vách dày/kg thể trọng/ngày). Liều này nhiều gấp năm lần so với tỷ lệ sử dụng được đề xuất để kiểm soát giun tròn ký sinh đường ruột (3×10^4 bào tử/kg thể trọng/ngày) ở cừu.

Độ an toàn của TGAI được xác nhận thông qua việc các bác sĩ thú y thăm khám lâm sàng nhiều lần, sự thay đổi thể trọng theo thời gian và sinh hóa huyết thanh và huyết học, so với những con cừu được điều trị giả dược. Các thăm khám lâm sàng chi tiết được tiến hành, cân trọng lượng cơ thể và, mẫu máu được lấy để xét nghiệm sinh hóa huyết thanh và huyết học vào các ngày -1, 7, 15, 29 và 43.

Không có bằng chứng về độc tính hoặc lây nhiễm cấp tính hoặc mãn tính quan sát được trong quá trình nghiên cứu. Nhìn chung, không có dấu hiệu lâm sàng, sinh hóa hoặc huyết học bất lợi nào quan sát được trong nghiên cứu có thể liên quan đến việc cho ăn EP

trong khoảng thời gian dài (43 ngày), liều EP chứa bào tử *D. flagrans* với lượng gấp 10 lần số lượng cần để kiểm soát giun tròn ký sinh đường ruột.

Các nghiên cứu độc tính qua đường miệng liều lặp lại cận mãn tính

Thử phân lập Ấn Độ của *D. flagrans* được sàng lọc về tác dụng độc tính có thể trong thời gian ngắn bằng cách sử dụng mô hình chuột nhắt. Sau khi cho ăn lượng 1×10^6 bào tử cho mỗi con mỗi ngày trong một tháng, không có hiện tượng tử vong ở chuột và không có sự khác biệt đáng kể về thể trọng giữa chuột được cho ăn nấm và chuột đối chứng được ghi nhận. Những chuột được ăn nấm và chuột không được ăn nấm có vẻ ngoài, màu sắc và các cử động phản xạ tương tự nhau. Không có bằng chứng về bệnh nấm bên trong quan sát được ở những chuột được ăn nấm và chuột đối chứng và trên các lát mô gan, phổi và thận.

Xác định mức độ ảnh hưởng bất lợi không quan sát được (NOAEL)

Không thấy có tác dụng bất lợi nào được ghi nhận trong nghiên cứu độc tính cấp tính bất kỳ ở động vật thí nghiệm cũng như trong nghiên cứu nuôi dưỡng bất kỳ trong thời gian trung bình hoặc lâu dài ở mức liều TGAI dự kiến hoặc gấp 10 lần mức liều TGAI dự kiến ở bò và ngựa và gấp 5 lần mức liều dự kiến ở cừu. Những nghiên cứu này được hỗ trợ bởi nhiều nghiên cứu trong phạm vi công khai trên gia súc, cừu, dê và ngựa.

Trên cơ sở này các tác giả sáng chế đã kết luận rằng NOAEL lớn hơn 60 g thức ăn bổ sung (MP) cho mỗi 100 kg Bw/ngày tương ứng với nhiều hơn 3×10^5 bào tử/kg Bw/ngày của *D. flagrans* chủng IAH 1297.

Nghiên cứu sinh sản (bao gồm cả độc tính phát triển trước khi sinh).

Do *D. flagrans* không hấp thụ từ đường dạ dày ruột của sinh vật hoặc người được điều trị và ngoài ra bào tử không nảy mầm ở 37°C hoặc khi không có oxy, không có dấu hiệu cho thấy độc tính sinh sản.

Ví dụ 11

Chỉ là ví dụ không nhằm giới hạn, thử nghiệm dư lượng được thực hiện với chế phẩm theo sáng chế. Chế phẩm theo sáng chế được điều chế ví dụ, theo ví dụ 3 và được phối chế thêm để tạo ra EP và/hoặc MP theo ví dụ 4.

Tóm tắt dữ liệu dư lượng

Với vai trò là vi sinh vật tự nhiên, *D. flagrans* IAH 1297 được dùng qua đường miệng ví dụ, do bào tử trong chế phẩm theo sáng chế không được hấp thụ và, vì thế, không thể tạo ra dư lượng trong các mô ăn được.

Anderson *et al.* (1999) đã thông báo về việc xác định các sản phẩm vi sinh vật thứ cấp, các flagranon A, B và C được sản xuất bởi *D. flagrans*. Các tác giả sáng chế đã thực hiện thêm nghiên cứu đối với chủng đơn nhất *D. flagrans* IAH 1297. Một nghiên cứu về chất chuyển hóa thứ cấp của *D. flagrans* chủng IAH 1297 đã phát hiện ra rằng nó sản xuất ra một chất chuyển hóa chính được gọi là flagranon A. Các chất chuyển hóa thứ yếu khác được phát hiện với lượng nhỏ hơn 5% flagranon A và đáng chú ý là không phát hiện được các flagranon B và C. Nghiên cứu này kiểm tra đặc điểm hóa học của flagranon A và đã thông báo tốc độ phân hủy của flagranon A trong điều kiện phòng thí nghiệm có nghĩa là không thể có khả năng chất chuyển hóa này sẽ có nhiều hơn một sự tồn tại chuyển tiếp ngắn trong điều kiện *in vivo* hoặc điều kiện môi trường.

Do chưa có tài liệu về các đặc điểm độc tính của flagranon, một phân tích độc tính in-silico bằng cách sử dụng phần mềm Derek Nexus và Leadscape đã được tiến hành đối với các flagranon A, B và C trên một loạt các điểm cuối và trong một số loài động vật có vú và vi khuẩn. Điều này là cần thiết để mô tả độc tính tiềm tàng của flagranon A, B và C và để đánh giá khả năng chúng có thể có trong các sản phẩm thực phẩm để có thể đánh giá được mọi rủi ro cho người tiêu dùng. Các flagranon B và C không được sản xuất bởi *D. flagrans* chủng IAH 1297 nhưng vẫn được bao gồm để đảm bảo tính đầy đủ. Ngoài ra, phân tích Derek Nexus đầy đủ được thực hiện đối với cả ba loại flagranon. Các bộ độc tính di truyền và gây ung thư cho loài gặm nhấm của Leadscape đã được sử dụng cho cả ba loại flagranon; Ngoài ra, flagranone A được phân tích bằng cách sử dụng bộ độc tính sinh sản.

Flagranon A được dự đoán là gây kích ứng và có khả năng nhạy nhưng không được dự đoán là gây đột biến, gây ung thư hoặc độc tính sinh sản. Không có cảnh báo cấu trúc về độc tính di truyền.

Theo phân tích *in-silico* bằng cách sử dụng phần mềm Derek Nexus và Leadscape, các tác giả sáng chế đã kết luận rằng sự hiện diện tiềm năng của các flagranon trong MP hoặc EP không gây ra nguy cơ hoặc rủi ro độc tính bất kỳ không đáng có cho người tiêu dùng. Kết luận này dựa trên các mục sau:

- Các flagranon B và C, mặc dù được dự đoán là có độc tính di truyền và/hoặc gây đột biến, nhưng không có mặt trong TGAI, MP hoặc EP.
- Kết luận rằng flagranon A không có khả năng gây đột biến, gây ung thư hoặc gây độc cho sinh sản.
- Điều đó, mặc dù được dự đoán là chất gây kích ứng và có khả năng làm nhạy, nhưng nồng độ của flagranon A trong các mô hoặc sản phẩm từ động vật được tiêu thụ có thể thấp hơn đáng kể so với nồng độ mà các tác động đó có thể được thể hiện ở người tiêu dùng.
- Việc xem xét các cấu trúc và tính chất vật lý được tính toán chỉ ra rằng cả ba loại flagranon sẽ bị chuyển hóa và loại bỏ nhanh sau khi hấp thụ, có nghĩa là rất khó có khả năng các mô được tiêu thụ sẽ có bất kỳ dư lượng nào của các hợp chất này.

Dữ liệu về dư lượng

Một loạt các mẻ thương mại của *D. flagrans* chủng IAH 1297 (TGAI) được phân tích flagranon A bằng cách sử dụng phương pháp phân tích được công nhận, với kết quả thay đổi từ 4,4 mg/kg đến 73,6 mg/kg như được thể hiện dưới đây

Bảng 12: Flagranon A thu được trong các mẻ bào tử *D. flagrans* (TGAI)

Báo cáo phân tích số	Ngày	Số mẻ	Kết quả flagranon A (mg/kg)
16-0021-6	19/1/2015	E03079A	4,36
16-0021-1	19/1/2016	E03026	10,5 (10,1)
16-0021-2	19/1/2015	E03039E	14,4

16-0021-7	19/1/2015	E03079B	15,6
16-0021-8	19/1/2015	E03105A	53,2
16-0021-5	19/1/2015	E03064B	48,1
16-0021-9	19/1/2015	E03105B	71,6
16-0021-4	19/1/2015	E03064A	73,9
16-0021-3	19/1/2015	E03039F	19,8
Trung bình (mg/kg)			34,6

Dựa vào dữ liệu trên, mức 100µg/g được chọn là nồng độ tối đa không phân hủy, gấp khoảng ba lần giá trị trung bình.

Khi các liều MP và EP đề xuất được xem xét, các tính toán của flagranon A được thể hiện dưới đây:

Dư lượng trong cơ thể động vật

Trong MP

Hàm lượng flagranon trong *D. flagrans* IAH 1297: Lượng tối đa trong TGAI: 100 mg/kg hoặc 100 µg/g (giá trị không phân hủy) tỷ lệ liều của MP: 6 g/100 kg Bw/ngày hoặc 0,06 g/kg BW/ngày. Do đó, đây là lượng flagranon A tối đa hàng ngày được động vật hấp thụ: $34,6 \mu\text{g/g} \times 0,06 \text{ g/kg BW/ngày} = 2,1 \mu\text{g/kg BW/ngày}$.

Trong EP

Hàm lượng flagranon trong *D. flagrans* IAH 1297: 100 mg/kg hoặc 100 µg/g (giá trị tối đa không phân hủy). Tỷ lệ liều lượng của EP: 100g/100kg Bw/ngày hoặc 1g/kg BW/ngày. Do đó, đây là lượng flagranon A tối đa hàng ngày được động vật hấp thụ: $2,2 \mu\text{g/g} \times 1 \text{ g/kg BW/ngày} = 2,2 \mu\text{g/kg BW/ngày}$.

Trong Quy định (EU) số 283/2013 về yêu cầu dữ liệu đối với thuốc trừ loài gây hại ở EU, chương 6.4, giá trị sẽ đề xuất yêu cầu phân tích dư lượng trong mô động vật (cơ, gan và sữa) là 4 µg/kg BW/ngày chất trong thức ăn chăn nuôi:

“Mục tiêu của các nghiên cứu cho ăn là để xác định dư lượng trong các sản phẩm có nguồn gốc động vật do dư lượng trong thức ăn. Các nghiên cứu cho ăn không cần phải thực hiện khi lượng tiêu thụ dưới 0,004 mg/kg bw/ngày”.

Do đó, mức độ tiếp xúc đối với động vật được điều trị thấp hơn giá trị sẽ đề xuất việc phân tích dư lượng được nêu trong Quy định về thuốc trừ sâu (EU) số 283/2013. Do đó, không cần phải nghiên cứu dư lượng.

Flagranon A được mô tả là chất dễ phân hủy và cấu trúc hóa học của nó chỉ ra rằng chúng dễ bị phân hủy bằng cách chuyển hóa nhanh chóng trong cơ thể sinh vật có vú, do đó nó không có khả năng tích lũy.

Dư lượng trong cơ thể người tiêu dùng

Xem xét rằng lượng tiêu thụ flagranon A tối đa được tính toán trên đối với động vật được điều trị bằng MP và EP là 2,2 µg/kg BW/ngày được phân phối đến các mô động vật ăn được (bỏ qua sự phân hủy do chuyển hóa và tính không ổn định hóa học của flagranon). Xem xét trong một ước tính thận trọng rằng 12,74 g thịt được tiêu thụ cho mỗi kg thể trọng mỗi ngày, thì lượng tiếp xúc sẽ là:

$2,2 \text{ µg/kg mô động vật/ngày} \times 0,0127 \text{ kg mô động vật/kg BW/ngày} = 0,0279 \text{ µg/kg BW/ngày.}$

Kết quả này nằm dưới ngưỡng báo động về độc tính (TTC), ngay cả đối với các cấu trúc hóa học quan trọng nhất (EFSA, 2012), dựa trên hệ thống Phân loại Cramer được nêu dưới đây.

Các giá trị ngưỡng tiếp xúc với người dưới đây là những ước tính thận trọng được sử dụng trong công việc EFSA:

- 0,0025 µg/kg B.W đối với các chất có cảnh báo cấu trúc về độc tính di truyền,
- 0,3 µg/kg B.W đối với các hợp chất phosphat hữu cơ và carbamat với hoạt tính kháng cholinesteraza,
- 1,5 µg/kg B.W đối với các chất thuộc nhóm Cramer III và nhóm Cramer II,
- Và 30 µg/kg B.W đối với các chất thuộc nhóm Cramer I.

Cần nhắc rằng phân tích in-silico đối với flagranon A cho thấy không có cảnh báo cấu trúc về nhiễm độc tính di truyền, mức tiêu thụ tối đa ước tính thận trọng là 0,0279g/kg

BW/ngày thấp hơn 53 lần so với giá trị TTC liên quan là 1,5 g/kg BW/ngày. Các tác giả sáng chế đã kết luận rằng việc tiếp xúc với EP hoặc MP không có các vấn đề cảnh báo độc tính với người tiêu dùng.

Dư lượng của các chất chuyển hóa khác ngoài các flagranon

Ngoài các chất flagranon, các chất chuyển hóa thứ yếu chưa biết được phát hiện trong *D. flagrans* chủng IAH 1297 ở mức thấp hơn 5% lượng flagranon. 18 mức dư lượng tối đa của các chất chuyển hóa thứ yếu này được tính là 5% (tối đa) flagranon A:

Ở động vật:

- $2,1 \times 5\% = 0,105 \text{ } \mu\text{g/kg BW/ngày}$, khi MP được cho ăn
- $2,2 \times 5\% = 0,11 \text{ } \mu\text{g/kg BW/ngày}$, khi EP được cho ăn

Cả hai kết quả này đều thấp hơn mức kích khởi 4 $\mu\text{g/kg BW/ngày}$, do đó, không cần phải có nghiên cứu dư lượng.

Ở người tiêu dùng:

- $0,0279 \times 5\% = 0,001395 \text{ } \mu\text{g/kg BW/ngày}$

Giá trị này thấp hơn giá trị TTC là 0,0025 $\mu\text{g /kg Bw/ngày}$ ngay cả đối với các chất có cảnh báo cấu trúc về độc tính di truyền.

Người tiêu dùng tiếp xúc với flagranon A thông qua việc tiêu thụ các sản phẩm từ động vật được điều trị với lượng nhỏ hơn 0,0279 $\mu\text{g /kg BW/ngày}$ là thấp hơn 53 lần so với giá trị TTC liên quan là 1,5 $\mu\text{g /kg BW/ngày}$. Do mức tiếp xúc thấp hơn TTC từ 53 đến 625 lần, nên flagranon A có thể được coi là không có rủi ro đáng kể đến sức khỏe con người.

Mức tiếp xúc dư lượng đối với công nhân sản xuất và công nhân nông trại

Tóm tắt như sau:

Mức tiếp xúc với chất chuyển hóa thứ cấp flagranon A của công nhân nông trại/người dùng được xác định là nhỏ hơn 0,0135 $\mu\text{g/kg BW/ngày}$ là giá trị thấp hơn 111 lần so với giá trị TTC liên quan là 1,5 $\mu\text{g /kg BW/ngày}$.

Mức tiếp xúc với flagranon A của công nhân sản xuất được xác định là nhỏ hơn 0,0024 $\mu\text{g/ kg Bw/ngày}$ là giá trị thấp hơn 625 lần so với giá trị TTC liên quan là 1,5 $\mu\text{g /kg BW/ ngày}$.

Phương pháp phân tích

Chất cô nắm (TGAI)

Việc phát triển phương thức, xác nhận và kết quả đối với flagranon A trong TGAI được tóm tắt dưới đây.

Phương pháp được phát triển và được phê chuẩn theo SANCO/3030/99 rev.4 11/07/00, APVMA Hướng dẫn thẩm định phương pháp phân tích thành phần hoạt tính và Hướng dẫn thử nghiệm U.S. EPA, OPPTS 830.1800 trong nghiên cứu GLP.

Phạm vi: phương pháp này được áp dụng để xác định flagranon A trong TGAI. Phương pháp được xác nhận trong phạm vi tuyến tính 0 - 1000 mg / kg flagranon A trong TGAI với mức độ phục hồi trong phạm vi 10 - 600 mg / kg.

Các chất chuẩn tham chiếu của flagranon A có độ tinh khiết 99,5%. Các nguyên liệu tham chiếu được lưu trữ trong một tủ đông trên đá khô cho đến khi điều chế dưới dạng dung dịch.

Phương pháp phân tích: Phần lắng flagranon A được chiết từ 10 g mẫu TGAI được trộn và đồng nhất (hạt đã lên men). Các mẫu được ly tâm và phần phân ước của dịch nổi được lấy, làm loãng, lọc và phân tích flagranon A bằng cách sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (high-performance liquid chromatography - HPLC) có phát hiện UV.

Độ chọn lọc/Độ nhiễu: Lượng chất gây nhiễu (nếu có) được đánh giá bằng cách so sánh các kết quả từ việc phân tích các mẫu đối chứng và các mẫu trồng chứa thuốc thử với tiêu chuẩn LOQ. Sắc ký đồ được coi là chấp nhận được để xem các thành phần có trong

chiết phẩm đối chứng và mẫu trồng thuốc thử, có khả năng can thiệp vào phân tích hay không, không xuất hiện ở mức lớn hơn 3% giới hạn định lượng. Không quan sát thấy các chất gây nhiễu với lượng lớn hơn 3% giới hạn định lượng (LOQ).

Độ tuyến tính: Để thiết lập tính tuyến tính của đáp ứng của hệ thống sắc ký phân tích đối với chất thử nghiệm, mười tiêu chuẩn tăng nồng độ flagranon A đã được chuẩn bị. Khoảng nồng độ trong khoảng ít nhất là 80-120% nồng độ dự kiến trong các mẫu thu hồi. Đường cong tiêu chuẩn được xây dựng với các nồng độ flagranon A sau đây: 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50 và 100 mg/L. Độ tuyến tính của hệ thống được chấp nhận khi phân tích thống kê cho thấy độ tuyến tính đáng kể với $r^2 > 0,99$. Mỗi đường cong hiệu chuẩn có hệ số tương quan (r^2) là $\geq 0,99$ do đó cho thấy độ tuyến tính thích hợp.

Độ chính xác và tính chính xác (thu hồi): Các mẫu thu hồi 10, 50 và 150 mg/kg được chuẩn bị bằng cách bổ sung các phần phân ước của dung dịch gốc của flagranon A trên các phần 10 g của mỗi mẫu hạt đối chứng. Các mẫu thu hồi 600 mg/kg được chuẩn bị bằng cách cân khoảng 6 mg flagranon A trên các phần 10 g của mỗi hạt đối chứng. Các nồng độ đối chứng 10, 50, 150 và 600 mg/kg khi được chuyển thành % theo khối lượng tương ứng là 0,001, 0,005, 0,015 và 0,06%. Vì thế, khoảng phục hồi trung bình có thể chấp nhận đối với dữ liệu trong nghiên cứu xác thực phương pháp này là 75-125%.

Một phần phân ước của chiết phẩm được lấy, được lọc trong các ống LC và được phân tích theo phương pháp này. Các mẫu thu hồi được bổ sung chất cô nắm với lượng 10, 50, 150 và 600 mg/kg. Kết quả nằm trong khoảng từ 98-105%.

Độ chính xác của phương pháp được chứng tỏ bằng cách phân tích năm mẫu giống nhau ở các mức xác nhận 10, 50 và 150 mg/kg trong chất cô nắm. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) được xác định ở các mức bổ sung là 10, 50 và 150 mg/kg. Độ chính xác được coi là chấp nhận được nếu $RSD \leq 20\%$. Độ chính xác của dữ liệu thu hồi đối với nghiên cứu này đáp ứng tiêu chuẩn chấp nhận được.

Giới hạn định lượng (Limit of Quantitation - LOQ): Giá trị LOQ được xác định bằng cách phân tích nồng độ LOQ ước lượng tối thiểu là 6 lần. Đáp ứng trung bình ($\bar{X}$) và

độ lệch chuẩn (SD) được tính. Độ lệch chuẩn nên $< 20\%$. LOQ được tính là: $X + (10 \times \text{SD})$. LOQ ước lượng là 1,1 mg/L là tương đương với 11 mg/kg trong mẫu.

Giới hạn phát hiện (Limit of Detection - LOD): LOD được xác định bằng cách phân tích chuẩn hiệu chỉnh thấp nhất mà tạo ra đỉnh (tối thiểu là 6 lần phân tích giống nhau). Đáp ứng trung bình (X) và độ lệch chuẩn (SD) được tính. LOD được tính như sau: $X + (3 \times \text{SD})$. LOD ước tính là 0,005 mg/L tương đương với 0,04 mg/kg trong mẫu.

Độ chính xác của hệ thống: Dung dịch chuẩn flagranon A nồng độ 1 mg/L được bơm mười lần để đánh giá độ chính xác của hệ thống. Độ chính xác của hệ thống được coi là chấp nhận được nếu $\text{RSD} \leq 1\%$ đối với thời gian giữ và $\leq 20\%$ đối với vùng đỉnh. RSD đối với thời gian giữ được phát hiện là 0,1% và RSD đối với vùng đỉnh được phát hiện là 6,9%.

Độ chính xác của phương pháp: Độ chính xác của phương pháp được đánh giá bằng cách phân tích ít nhất là năm mẫu thu hồi mới được chuẩn bị được bổ sung với lượng 10 mg/kg trong hai ngày với các mẫu chuẩn mới được tạo ra cho mỗi phân tích. Độ lệch chuẩn tương đối trong một lần chạy và độ lệch chuẩn tương đối giữa các lần chạy được coi là chấp nhận được nếu $\leq 20\%$ đối với mức bổ sung 10 mg/kg. Độ lệch chuẩn tương đối trong một lần chạy được phát hiện là 2,7% vào ngày 1 và 0,8% vào ngày 2 và độ lệch chuẩn tương đối giữa các lần chạy được phát hiện là 1,9%.

Độ ổn định của dung dịch: Các phân phân ước của các chiết phẩm cuối cùng của các hạt đối chứng không được xử lý được bổ sung flagranon A ở nồng độ là 1 mg/L và 15 mg/L (tương đương với các mức thu hồi 10 mg/kg và 150 mg/kg trong chiết phẩm cuối cùng). Các phân phân ước cũng được bổ sung flagranon A ở các nồng độ là 1 mg/L và 15 mg/L. Nồng độ của chất phân tích được định lượng với các mẫu chuẩn nguyên chất mới được chuẩn bị sau khi lưu giữ 7 ngày ở nhiệt độ khoảng -20°C trong tối. Các chiết phẩm cuối cùng mới được chuẩn bị được bổ sung các nồng độ tương đương để so sánh với các mẫu có độ ổn định 7 ngày. Kết quả nằm trong khoảng từ 101-107%.

Độ tin cậy của phương pháp: Độ tin cậy của phương pháp được kiểm tra bằng cách phân tích lại bộ mẫu chuẩn và mẫu thu hồi được chuẩn bị trước đó và thay đổi thành phần của pha động. Phần còn lại của các điều kiện HPLC-UV được giữ nguyên không đổi. Việc điều chỉnh thành phần của pha động không gây ảnh hưởng lớn đến việc đáp ứng với flagranon A

Các tác giả sáng chế đã kết luận rằng phương pháp này phù hợp với mục đích phân tích flagranon A trong TGAI. Các thông số được phê chuẩn trong nghiên cứu này đáp ứng được tiêu chuẩn chấp nhận được theo SANCO/3030/99 rev.4 11/07/00 APVMA Hướng dẫn thẩm định phương pháp phân tích thành phần hoạt tính và Hướng dẫn thử nghiệm U.S. EPA, OPPTS 830.1800.

MP và EP

Việc phát triển phương pháp, sự phê chuẩn và các kết quả của flagranon A trong MP và EP được tóm tắt dưới đây.

Phương pháp được phát triển và được phê chuẩn theo SANCO/3030/99 rev.4 11/07/00, APVMA Hướng dẫn thẩm định phương pháp phân tích thành phần hoạt tính và Hướng dẫn thử nghiệm U.S. EPA, OPPTS 830.1800 trong nghiên cứu GLP.

Phạm vi: phương pháp này được áp dụng để xác định flagranon A trong MP và EP. Phương pháp được xác nhận trong phạm vi tuyến tính 0 - 1000 mg/kg flagranon A trong chất cô nắm với mức độ thu hồi trong phạm vi 1 - 600 mg/kg.

Các chất chuẩn tham chiếu của flagranon A có độ tinh khiết 99,5%. Các nguyên liệu tham chiếu được lưu trữ trong một tủ đông trên đá khô cho đến khi điều chế dưới dạng dung dịch.

Phương pháp phân tích: Phần lắng của flagranon A được chiết từ 10 g mẫu đồng nhất bằng cách tissumising và lắc. Các mẫu được ly tâm và phần phân ước của dịch nổi được lấy và pha loãng, lọc và phân tích flagranon A.

Độ chọn lọc/Độ nhiễu: Lượng chất gây nhiễu (nếu có) được đánh giá bằng cách so sánh các kết quả từ việc phân tích các mẫu đối chứng và các mẫu trống chứa thuốc thử với

tiêu chuẩn LOQ. Sắc ký đồ được coi là chấp nhận được để xem các thành phần có trong chiết phẩm đối chứng và mẫu trồng thuốc thử, có khả năng can thiệp vào phân tích hay không, không xuất hiện ở mức lớn hơn 3% giới hạn định lượng. Các chất gây nhiễu trong các mẫu đối chứng nằm trong khoảng từ 0,3-0,4% của tiêu chuẩn LOQ

Độ tuyến tính: Để thiết lập tính tuyến tính của đáp ứng của hệ thống sắc ký phân tích đối với chất thử nghiệm, mười tiêu chuẩn tăng nồng độ flagranon A đã được chuẩn bị. Khoảng nồng độ trong khoảng ít nhất là 80-120% nồng độ dự kiến trong các mẫu thu hồi. Đường cong tiêu chuẩn được xây dựng với các nồng độ flagranon A sau đây: 0,0005, 0,001, 0,0025, 0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25 và 0,5 mg/L. Độ tuyến tính của hệ thống được chấp nhận khi phân tích thống kê cho thấy độ tuyến tính đáng kể với $r^2 > 0,99$. Mỗi đường cong hiệu chuẩn có hệ số tương quan (r^2) là $\geq 0,99$ do đó cho thấy độ tuyến tính thích hợp.

Độ chính xác và tính chính xác (thu hồi): Các mẫu thu hồi được chuẩn bị bằng cách bổ sung các phần phân ước của dung dịch được tạo ra từ các mẫu chuẩn tham chiếu của flagranon A vào các phần 10 g của mỗi thức ăn cho động vật đối chứng. Phần phân ước của chiết phẩm được lấy, làm loãng và được lọc trong các ống LC và được phân tích theo phương pháp này. Các mẫu thu hồi được bổ sung MP và EP ở nồng độ 1, 5, 20 và 60 mg/kg. Khoảng thu hồi trung bình chấp nhận được đối với dữ liệu trong nghiên cứu phê chuẩn phương pháp này là 75-125% và giá trị trung bình tìm được là 105%.

Độ chính xác của phương pháp được chứng tỏ bằng cách phân tích năm mẫu giống nhau của mỗi mức MP và EP phê chuẩn. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) được xác định ở mỗi mức bổ sung. Độ chính xác được coi là chấp nhận được nếu $RSD \leq 20\%$. Độ chính xác của dữ liệu thu hồi đối với nghiên cứu này đáp ứng tiêu chuẩn chấp nhận được.

Giới hạn định lượng (Limit of Quantitation - LOQ): Giá trị LOQ được xác định bằng cách phân tích nồng độ LOQ ước lượng tối thiểu là 6 lần. Đáp ứng trung bình (X) và độ lệch chuẩn (SD) được tính. Độ lệch chuẩn nên $< 20\%$. LOQ được tính là: $X + (10 \times SD)$. LOQ ước tính là 0,005 mg/L.

Giới hạn phát hiện (Limit of Detection - LOD): LOD được xác định bằng cách phân tích chuẩn hiệu chỉnh thấp nhất mà tạo ra đỉnh (tối thiểu là 6 lần phân tích giống nhau). Đáp ứng trung bình ($\bar{X}$) và độ lệch chuẩn (SD) được tính. LOD được tính như sau: $\bar{X} + (3 \times \text{SD})$. LOD ước tính là 0,0005 mg/L.

Độ chính xác của hệ thống: Chất chuẩn flagranon A nồng độ 1 mg/L được bơm mười lần để độ chính xác của hệ thống. Các điều kiện của thiết bị được liệt kê trong Bảng 3.5. Độ chính xác của hệ thống được coi là chấp nhận được nếu $\text{RSD} \leq 1\%$ đối với thời gian giữ và $\leq 20\%$ đối với vùng đỉnh. Độ lệch chuẩn tương đối đối với thời gian giữ là 0,18% và độ lệch chuẩn tương đối với vùng đỉnh là 3,8%.

Độ chính xác của phương pháp: Độ chính xác của phương pháp được đánh giá bằng cách phân tích ít nhất là năm mẫu thu hồi mới được chuẩn bị được bổ sung với lượng 1 mg/kg trong hai ngày với các mẫu chuẩn mới được tạo ra cho mỗi phân tích. Độ lệch chuẩn tương đối trong một lần chạy và độ lệch chuẩn tương đối giữa các lần chạy được coi là chấp nhận được nếu $\leq 20\%$ đối với mức bổ sung 1 mg/kg. Độ lệch chuẩn tương đối trong một lần chạy được phát hiện là 6,4% vào ngày 1 và 5,4% vào ngày 2 và độ lệch chuẩn tương đối giữa các lần chạy được phát hiện là 6,0%.

Độ ổn định của dung dịch: Các phần phân ước của các chiết phẩm cuối cùng của các thức ăn cho động vật không được xử lý được bổ sung flagranon A ở nồng độ là 0,005 mg/L và 0,1 mg/L (tương đương với các mức thu hồi 1 mg/kg và 20 mg/kg trong chiết phẩm cuối cùng). Các phần phân ước cũng được bổ sung flagranon A ở các nồng độ là 0,005 mg/L và 0,1 mg/L. Nồng độ của chất phân tích được định lượng với các mẫu chuẩn nguyên chất mới được chuẩn bị sau khi lưu giữ 7 ngày ở nhiệt độ khoảng -20°C trong tối. Các chiết phẩm cuối cùng mới được chuẩn bị được bổ sung các nồng độ tương đương để so sánh với các mẫu có độ ổn định 7 ngày. Các mẫu được phân tích bằng cách sử dụng các điều kiện được liệt kê ở trên. Kết quả nằm trong khoảng từ 95-102%.

Độ tin cậy của phương pháp: Độ tin cậy của phương pháp được kiểm tra bằng cách phân tích lại bộ mẫu chuẩn và mẫu thu hồi được chuẩn bị trước đó và thay đổi thành phần của pha động "A". Phần còn lại của các điều kiện HPLC-UV được giữ nguyên không đổi.

Việc điều chỉnh thành phần của pha động không gây ảnh hưởng lớn đến việc đáp ứng với flagranon A và phương pháp này được coi là tin cậy.

Kết luận được rằng phương pháp này phù hợp cho mục đích phân tích flagranon A trong MP và EP. Các thông số được phê chuẩn trong nghiên cứu này đáp ứng được tiêu chuẩn chấp nhận được theo SANCO/3030/99 rev.4 11/07/00APVMA Hướng dẫn thẩm định phương pháp phân tích thành phần hoạt tính và Hướng dẫn thử nghiệm U.S. EPA, OPPTS 830.1800.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể phân lập thuần khiết về mặt sinh học của vi sinh vật *Duddingtonia flagrans* (*D. flagrans*) chủng IAH 1297, mẫu của chủng này được nộp lưu với số truy nhập V16/019156 tại Viện đo lường quốc gia, 1/153 Bertie Street, Port Melbourne, Victoria 3207.
2. Chế phẩm chứa thể phân lập theo điểm 1.
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chủng IAH 1297 có mặt trong chế phẩm ở dạng bào tử, tốt hơn là bào tử vách dày, và trong đó chế phẩm này làm gián đoạn vòng đời của giun tròn ký sinh, kiểm soát sự lây lan của giun tròn sang động vật ăn cỏ và phù hợp để ứng dụng thương mại.
4. Chế phẩm theo điểm 2 hoặc 3 bao gồm bào tử *D. flagrans* sống với số lượng ít nhất là 1×10^2 bào tử sống trong mỗi gam chế phẩm.
5. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 4, trong đó chế phẩm này chứa bào tử *D. flagrans* sống với số lượng trong khoảng từ 1×10^2 đến 1×10^{10} bào tử sống trong mỗi gam chế phẩm.
6. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó chế phẩm này chứa bào tử *D. flagrans* sống với số lượng trong khoảng từ 1×10^3 đến 1×10^8 bào tử sống trong mỗi gam chế phẩm.
7. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 6, trong đó chế phẩm này ở dạng thể đặc bào tử bao gồm khuẩn ty của *D. flagrans*, và/hoặc bào tử của *D. flagrans*, trong đó tốt hơn là bào tử này là bào tử vách dày.
8. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 7, trong đó chế phẩm được trộn với tá dược và/hoặc chất mang.
9. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 8, trong đó chế phẩm được bào chế để phân phối qua đường miệng cho động vật ăn cỏ.
10. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 9, trong đó chế phẩm này được bào chế để sử dụng cho động vật ăn cỏ, và trong đó chế phẩm này chứa *D. flagrans* với lượng trong khoảng từ 1×10^2 đến 1×10^{10} bào tử sống trong mỗi gam chế phẩm.
11. Chế phẩm theo điểm 10, trong đó chế phẩm này chứa bào tử *D. flagrans* với lượng trong khoảng từ 1×10^3 đến 1×10^8 bào tử sống trong mỗi gam chế phẩm.

12. Chế phẩm theo điểm 11, trong đó chế phẩm này chứa bào tử *D. flagrans* với lượng khoảng 5×10^5 bào tử sống trong mỗi gam chế phẩm.
13. Chế phẩm theo điểm 11, trong đó chế phẩm này chứa bào tử *D. flagrans* với lượng khoảng 3×10^4 bào tử sống trong mỗi gam chế phẩm.
14. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 13, trong đó chế phẩm này được bào chế để sử dụng cho động vật ăn cỏ và trong đó chế phẩm này là ở dạng liều đơn vị để cung cấp một lượng bào tử *D. flagrans* sống trong mỗi Kilogram thể trọng của động vật ăn cỏ mỗi ngày.
15. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 14, trong đó chế phẩm này còn chứa hạt dây oxit đồng (copper oxide wire particles - COWP).
16. Chế phẩm theo điểm 15, trong đó chế phẩm này cung cấp lượng đồng nguyên tố trong khoảng từ 0,05 đến 0,15 g cho mỗi Kilogram thể trọng của động vật ăn cỏ mỗi ngày.
17. Chế phẩm theo điểm 16, trong đó chế phẩm này cung cấp lượng đồng nguyên tố là khoảng 0,085 g cho mỗi Kilogram thể trọng của động vật ăn cỏ mỗi ngày.
18. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 17, còn chứa bất kỳ trong số một hoặc nhiều nguyên liệu có thể sử dụng để làm giảm giun tròn ký sinh (gánh nặng giun sán) cho động vật ăn cỏ.
19. Chế phẩm theo điểm 18, trong đó mỗi một trong số một hoặc nhiều nguyên liệu này được chọn từ nhóm bao gồm tanin, một hoặc nhiều thuốc diệt giun sán, một hoặc nhiều nấm ăn giun tròn khác, hạt dây đồng oxit (COWP), chất khoáng, đất tảo cát, thảo mộc, sản phẩm phụ nông nghiệp, một hoặc nhiều vi khuẩn và vacxin.
20. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 19, trong đó chế phẩm này được trộn với, hoặc ở dạng, thức ăn, thức ăn bổ sung, hoặc chế phẩm thuốc thú y hoặc tổ hợp của chúng.
21. Chế phẩm theo điểm 20, trong đó thức ăn, thức ăn bổ sung hoặc chế phẩm thuốc thú y là ở dạng hỗn hợp tơi, thức ăn lỏng, viên, khối dễ liếm, chế phẩm bổ sung khoáng chất, chế phẩm bổ sung hoặc viên lớn trơ.

22. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 21. trong đó động vật ăn cỏ là động vật nuôi trong nhà hoặc động vật ngoại lai.

23. Chế phẩm theo điểm 22, trong đó động vật ăn cỏ được chọn từ nhóm bao gồm ngựa, trâu bò, cừu, dê, hươu, lạc đà Alpaca, lạc đà không bướu và động vật trong các cơ sở động vật học.

24. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 21, trong đó giun tròn ký sinh là bất kỳ trong số một hoặc nhiều giun tròn sau đây *Strongylus* spp., *Cyathostomum* spp., *Triodontophorus* spp., *Trichonema* spp., *Oesophagodontus* spp., *Gyalocephalus* spp., *Cylicocylus* spp., *Cylicodonotophorus* spp., *Cylicostephanus* spp., *Gongylonema* spp., *Habronema* spp., *Mecistocirrus* spp., *Oxyuris* spp., *Parascaris* spp., *Skrjabinema* spp., *Strongyloides* spp., *Toxocara* spp., *Dictyocaulis* spp., *Muellerius* spp., *Protostrongylus* spp., *Onchocerca* spp., *Paraflaria* spp., *Setaria* spp., *Stephanofilaria* spp., *Thelazia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp., *Bunostomum* spp., *Teladosagia* spp., *Oesophagostomum* spp., *Nematodirus* spp., *Haemonchus* spp., *Chabertia* spp., *Trichuris* spp., và/hoặc *Ostertagia* spp.

25. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 21. trong đó giun tròn ký sinh là một hoặc nhiều trong số giun hai đầu hoặc giun dây (*Haemonchus* spp.), giun tóc hoặc giun tóc ký sinh trong dạ dày (*Trichostrongylus* spp.), giun ký sinh trong ruột hoặc giun ký sinh trong ruột non (*Cooperia* spp.) và giun móc (*Bunostomum* spp.), giun xoắn đen (*Trichostrongylus* spp.), giun nâu ký sinh trong dạ dày kích thước nhỏ và trung bình (*Teladosagia* (*Ostertagia*) spp.), giun kết hạt (*Oesophagostomum* spp.), giun tóc ký sinh ở dạ dày (*Trichostrongylus* spp.), giun chỉ (*Strongyloides* spp.), giun trong ruột miệng lớn (*Chabertia* spp.), giun tóc (*Trichuris* spp.), giun đường ruột cổ mảnh hoặc giun cổ mảnh (*Nematodirus* spp.), giun hổ hoặc giun xoắn (bao gồm *Strongylus* spp., *Triodontophorus* spp. và *Oesophagodontus* spp.) và/hoặc giun lươn/giun lươn nhỏ (bao gồm *Cyathostomum* spp., *Trichonema* spp., *Gyalocephalus* spp., *Cylicocylus* spp., *Cylicodonotophorus* spp. và *Cylicostephanus* spp.), giun đũa (*Parascaris* spp.) và giun kim (*Oxyuris* spp.).

26. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 3 đến 21. trong đó giun tròn ký sinh có tính kháng hoặc kháng đa hóa chất đối với một hoặc nhiều thuốc tẩy giun.

FIG. 1

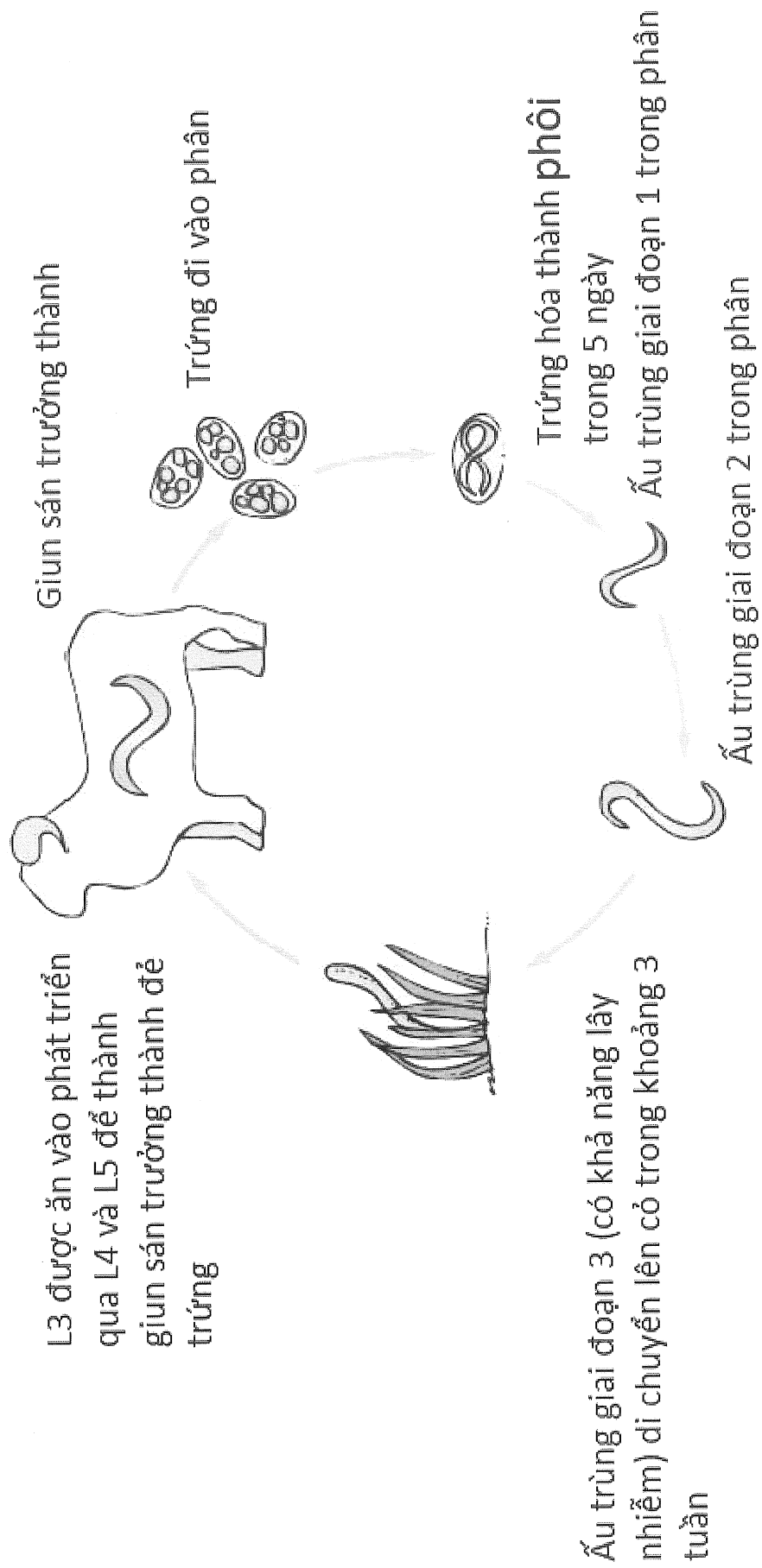


FIG. 2

Năm	Loại thuốc			
	Thuốc kháng sinh	Thuốc diệt côn trùng	Thuốc diệt nấm	Thuốc diệt giun sán
1930	SULPHA			
1940	R	PEN		
		R		
1950		STREP		
		R		
1960		DDT		
		R		
1970		CYCLO		
		R		
1980		OP		
		R		
1990		SP		
		R		
			AH	
			R	
			DOD	
			R	
			BZ	
			R	
				BZ
				R
				LEV
				R
				DCB
				R
				AVM
				R

Sự phát triển của kháng thuốc

FIG. 3

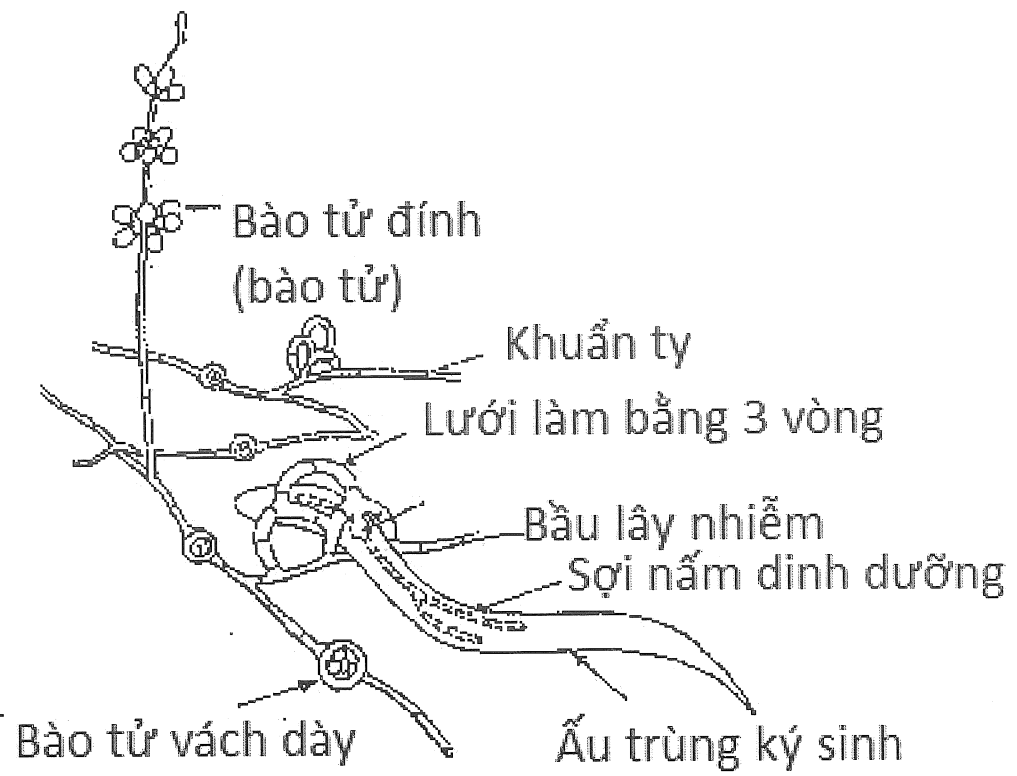


FIG. 4a

wormboss

ĐẾM TRỨNG GIUN SÁN

WEC hoặc thử nghiệm giun sán

Đếm trứng giun sán là một trong các công cụ quản lý giun sán hữu dụng nhất mà nhà chăn nuôi cừu có thể sử dụng. Bạn cũng có thể coi thử nghiệm này là Thử nghiệm giun sán hoặc đơn giản là WEC. Trước đây, thuật ngữ FEC (đếm trứng trong phân) cũng được sử dụng.

Đếm trứng giun sán và việc đếm số lượng trứng giun sán trong mẫu phân cừu.

Kết quả được chuẩn hóa theo số lượng và được biểu diễn dưới dạng “số trứng trong mỗi gam” (epg) phân với các kết quả chính thường được chia cho số trứng giun lươn (bao gồm hầu hết là các loài giun sán có ý nghĩa như giun hai đầu, giun nâu ký sinh trong dạ dày và giun gây bệnh tiêu chảy) và trứng *Nematodirus*.

Số lượng trứng thực tế mà giun sán trở thành nhiều vấn đề với các loài giun có mặt cũng như các yếu tố khác bao gồm mùa và độ tuổi, tình trạng bệnh ký và tình trạng mang thai của cừu. Bạn có thể sử dụng Hướng dẫn quyết định dùng thuốc WormBoss cho vùng của bạn để hỗ trợ bạn trong việc quyết định khi nào thì cho uống thuốc dựa trên số lượng trứng giun sán.

Hầu hết các loài giun sán quan trọng có vẻ giống nhau về số lượng trứng, vì thế việc nuôi cấy ấu trùng là cần thiết để xác định loài có mặt trong mẫu, bổ sung thêm giá trị cho kết quả thử nghiệm.

Số lượng trứng giun sán là một công cụ thiết thực và khá chính xác để ước tính số lượng giun sán trưởng thành ở cừu được theo dõi. Chúng chắc chắn là chính xác hơn nhiều so với đánh giá trực quan và sẽ xác định một vấn đề đang nổi lên từ lâu trước khi dấu hiệu thị giác bất kỳ xuất hiện, tại thời điểm mà, việc thất thoát sản lượng đáng kể sẽ xảy ra.

Chúng cũng sẽ giúp quyết định xem các phương pháp điều trị trước đây có hiệu quả hay không hoặc đánh giá mức độ nhiễm trùng giun được đưa vào bãi chăn thả.

Tuy nhiên, lưu ý rằng có những lúc khi mà việc dùng thuốc theo kế hoạch được đề xuất, không sử dụng số lượng trứng giun sán. Việc điều trị theo kế hoạch thường diễn ra vào một thời điểm cụ thể trong năm, hoặc sự kiện quản lý cừu hoặc dê (tùy theo khu vực) nhằm mục đích làm giảm tổng số giun trong những tháng tới và sẽ được đưa ra không liên quan đến số lượng trứng giun hoặc ở số lượng trứng giun sán thấp hơn nhiều đối với việc dùng thuốc điều trị.

Thu thập mẫu để đếm số lượng trứng giun

Điều quan trọng là thu thập các mẫu từ một số lượng cừu đại diện. Các mẫu từ 20 cá thể cung cấp một dấu hiệu chính xác hơn về số lượng giun sán trên một nhóm hơn 10 mẫu. Đối với các nhóm lớn hơn, đặc biệt là khi giun hai đầu là một vấn đề (vì có thể có sự khác biệt lớn hơn nhiều về số lượng trứng giun cụ thể), các mẫu từ nhiều động vật hơn có ích.

Chi tiết hơn truy cập vào đường dẫn [‘Checking a mob of sheep or goats for worms with a WormTest’](#), bao gồm cách thu gom mẫu.

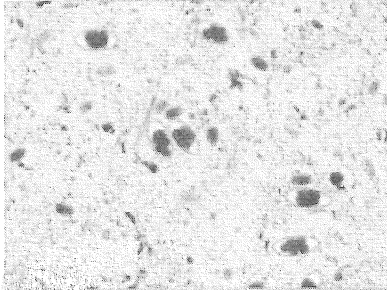
Số lượng trứng giun để nhân giống động vật kháng giun sán

Số lượng trứng giun cũng là cơ sở để chọn cừu hoặc dê kháng giun. Các nhà lai tạo cừu đực hoặc hươu đực sẽ thu thập các mẫu từ các động vật riêng lẻ, thường là xung quanh hoặc từ tuổi cai sữa đến tuổi trưởng thành. Các kết quả được sử dụng để tính giá trị nhân giống cừu Úc đối với số lượng trứng giun (WEC ASBV) hoặc WEC EBV trong KIDPLAN cho dê. Xem thêm ở [breeding for worm resistance in a commercial flock](#) hoặc [Sheep Genetics](#).

Tiến hành đếm trứng giun tại phòng thí nghiệm

FIG. 4a (Tiếp theo)

Khi các mẫu phân được chuyển đến phòng thí nghiệm, một mẫu con được lấy từ mỗi mẫu sẽ được cân cẩn thận. Mẫu này được trộn với một thể tích đã biết của dung dịch muối bão hòa. Một mẫu của hỗn hợp này được đặt trên một phiến kính hiển vi chuyên dụng (Whitlock Universal hoặc Whitlock McMaster) trong đó dung dịch muối bão hòa làm cho trứng giun sán nổi lên trên mặt của hỗn hợp trong phiến kính nơi mà chúng dễ dàng được đếm. Số lượng trứng được nhân với trọng lượng mẫu và hệ số pha loãng để đạt đến trong kết quả số “trứng trên mỗi gram” (epg).



Ảnh: trứng giun tròn ký sinh ở Cừu được nhìn dưới kính hiển vi

Nguồn: Anne Oakenful, NSW DPI (các lưu ý trong khóa học đếm trứng giun sán)

Đếm trứng giun ảo

Đồ họa đếm trứng giun ảo này được phát triển bởi Phó giáo sư Nick Sangster, Đại học Sydney và sự đóng góp của ông cho WormBoss được ghi nhận sâu sắc.

Thực hành đếm trứng giun bằng cách nhấp vào đường dẫn dưới đây.

[Click here to be redirected to the University of Sydney website to practice worm egg counting.](#)

Nếu bạn không có 'flash player', hãy nhấp vào liên kết bên dưới.

[Get flash player.](#)

Nuôi cấy ấu trùng và phân biệt loài

Khi quan trọng là phải biết chính xác loài giun mạnh nào có mặt (ví dụ: khi sự hiện diện của giun hai đầu đang được kiểm tra hoặc sau khi thử nghiệm kháng thuốc của giun) thì sẽ thực hiện việc nuôi cấy giun sán và xác định loài.

Phân đã thu thập còn lại sau khi việc đếm số lượng trứng giun đã hoàn thành được gom lại với nhau trong một cái lọ, trộn với một chất gọi là vermiculit để thông khí cho phân và sau đó được ủ trong lò trong vài ngày để cho trứng nở và phát triển thành ấu trùng giun sán.

Sau đó, ấu trùng được kiểm tra dưới kính hiển vi bởi các kỹ thuật viên phòng thí nghiệm có kinh nghiệm, là người có thể xác định loài của ấu trùng giun sán và đưa ra kết quả mô tả tỷ lệ của từng loài giun sán trong các mẫu phân.



Ảnh được cung cấp bởi Dr. R Woodgate, Bộ Nông nghiệp Tây Úc Department of Agriculture

Bạn có thể tự đếm số lượng trứng giun sán không

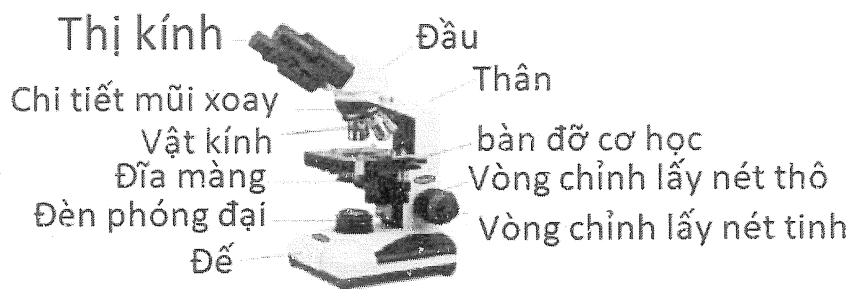
Một số nông dân tự đếm trứng giun; công việc này không khó học

FIG. 4a (Tiếp theo)

Các vật phẩm cần thiết để đếm trứng:

Kính hiển vi ghép phòng thí nghiệm. Kính hiển vi đồ chơi không thích hợp do buồng/phiên đếm trứng không khớp với thấu kính. Kính hiển vi không cần đắt tiền hoặc độc lạ; kính hiển vi một mắt cũ ở các phòng thí nghiệm khoa học ở trường học có thể sử dụng được, nhưng kính hiển vi hai mắt (hai thị kính) ít một hơn khi sử dụng nếu bạn phải thường xuyên đếm trứng.

- Bàn soi cơ học (di chuyển) cũng nên có thay vì phải đẩy buồng đếm xung quanh trên một bàn soi cố định bằng ngón tay. Hầu hết các kính hiển vi ghép sẽ có thị kính (ở phía trên) 10x (độ phóng đại 10 lần), và một hoặc nhiều vật kính (các ống kính hướng xuống phía dưới). Vật kính 4X (để đếm bình thường) và vật kính 10X (để kiểm tra kỹ hơn) cũng cần thiết.
- Cần thận nếu kính hiển vi của bạn có vật kính lớn hơn, ví dụ: ống kính “ngâm trong dầu” 100X. Vô tình sử dụng những loại này với buồng đếm có thể dẫn đến nứt buồng đếm.
- Hầu hết các thành phố thủ đô đều có công ty sửa chữa sau đó bán kính hiển vi cũ (thường là số lượng lớn từ các trường đại học và trường học). Hãy thử tìm kiếm các nhà cung cấp kính hoặc kính hiển vi tại thành phố thủ đô gần nhất của bạn.
- Các nhà cung cấp khóa học thường cung cấp hướng dẫn về việc mua kính hiển vi.



Bản kính mang vật để đếm trứng (ví dụ Whitlock, McMaster). Có thể sử dụng được nhiều năm nếu bạn giữ gìn chúng.

Cân điện tử để cân phân (trừ khi sử dụng phương pháp thay thế). Cân nhà bếp có thang đo đến 1 gam có sẵn ở các cửa hàng bách hóa và nhà bếp có giá từ khoảng 25 đôla.

Cốc, lọ và dụng cụ trộn để chuẩn bị dung dịch phân và trộn muối bão hòa.

Tỷ trọng kế pin (5-10 đôla tại các cửa hàng tự động) để kiểm tra trọng lượng riêng của dung dịch muối (không cần thiết).

Pipet hoặc dụng cụ tương tự để đưa mẫu lên buồng đếm

Muối, ví dụ muối hồ bơi hoặc muối ăn.

Nhà cung cấp kính hiển vi, buồng đếm trứng hoặc bộ dụng cụ hoàn chỉnh

- Bản kính mang vật để đếm trứng có sẵn từ [JA Whitlock & Co](#) (khoảng 130 đôla từ tháng 12/2014), PO Box 51, Eastwood NSW 2122, phone 02 9638 1142. Email.
- ‘FecPak’ kit [Veterinary Health Research](#), Armidale NSW. Email.
- [Eggsact kit](#), NSW, email.
- [FEC Source slides](#), USA. Email.
- Kính hiển vi: Hầu hết các thành phố thủ đô đều có công ty sửa chữa sau đó bán kính hiển vi cũ (thường là số lượng lớn từ các trường đại học và trường học). Hãy thử tìm kiếm các nhà cung cấp kính hoặc kính hiển vi tại thành phố thủ đô gần nhất của bạn.

FIG. 4a (Tiếp theo)

Đào tạo

Đào tạo về cách đếm trứng giun có sẵn thông qua một số cơ quan nhà nước và các tổ chức đào tạo khác, bao gồm:

NSW DPI PROfarm workshop:

Một hội thảo kéo dài 1 ngày có giá từ 330 đô la sử dụng kính hiển vi DPI, được tổ chức thường xuyên tại Camden / Menangle, Tamworth (và đôi khi là các địa điểm khác). Kiểm tra chi tiết và chi phí khi đăng ký.

RuralBiz Training—Online workshop in Worm Egg Counting:

Một hội thảo kéo dài 1 ngày (diễn ra hai tháng một lần) có giá 320 đô la mỗi người (cộng với chi phí thiết bị). Bạn tham gia khóa học từ máy tính tại nhà của bạn qua internet và trong quá trình đào tạo, bạn kết nối kính hiển vi của bạn với máy tính của bạn (với một thị kính đặc biệt được cung cấp bởi RuralBiz Training) và sau đó với người hướng dẫn qua internet. Khóa học RuralBiz cũng bao gồm một đơn vị được công nhận trên toàn quốc (Phát triển các chiến lược phúc lợi và sức khỏe vật nuôi AHCLSK504A). Nếu người tham gia hoàn thành hai nhiệm vụ đánh giá ngắn sau hội thảo, họ sẽ nhận được một chứng chỉ được công nhận trên toàn quốc.

Sau khi hoàn thành khóa đào tạo, bạn sẽ phải cam kết thường xuyên thu thập số lượng mẫu yêu cầu và làm theo các quy trình đếm trứng chính xác để có được kết quả hợp lệ. Kiểm tra định kỳ tính chính xác của số lượng trứng giun mà bạn đếm (kiểm soát chất lượng) bằng cách tiến hành kiểm tra so sánh, hãy hỏi một phòng thí nghiệm được công nhận rằng bạn nên làm thế nào.

Các vật phẩm đắt nhất để đếm trứng giun DIY là kính hiển vi và buồng đếm (và thời gian của bạn). Nếu bạn chăm sóc tốt những thứ này và đếm trứng giun thường xuyên, bạn sẽ phải chi tiền cho những món đồ này nhiều lần.

Tuy nhiên, việc đếm trứng DIY không phải dành cho tất cả mọi người. Trong một số trường hợp, có thể sử dụng thời gian của bạn tốt hơn bằng cách đến một phòng thí nghiệm và yêu cầu họ đếm trứng cho bạn.

Nếu bạn muốn biết loài giun có mặt, bạn sẽ phải gửi mẫu phân đến phòng thí nghiệm cung cấp dịch vụ đó (nuôi cấy và phân biệt ấu trùng).

Lưu ý rằng các khóa học này dạy cách để đếm số lượng trứng giun tròn (tuyến trùng), may mắn là kỹ thuật đếm trứng giun hữu ích nhất để học. Các phương pháp khác nhau và liên quan hơn được yêu cầu để đếm số lượng sán lá ký sinh ở gan và dạ dày.

Ấn phẩm sau đây cung cấp thông tin chi tiết về các kỹ thuật ký sinh trùng tiêu chuẩn (tuyến trùng) (giun tròn):

Hutchinson GW (2009). Nematode Parasites of Small Ruminants, Camelids and Cattle: Diagnosis with Emphasis on Anthelmintic Efficacy and Resistance Testing.

Đây cũng là một nguồn thông tin tốt ngay cả khi bạn không có kế hoạch tự đếm số lượng trứng.

FIG. 4B: THỬ NGHIỆM GIẢM SỐ LƯỢNG TRÚNG TRONG PHÂN (FEC) (THỬ NGHIỆM IN VIVO)

Cừu và dê

Chi tiết của thử nghiệm này trực tiếp được dựa trên đề xuất của Đảng Công nhân Úc về kháng thuốc diệt giun sán (Anonymous, 1989; Lyndal-Murphy, 1992).

Động vật

(1) sử dụng động vật non, 3—6 tháng tuổi được đã được nhân giống trên đặc điểm được kiểm tra, hoặc động vật già hơn nêu số lượng trứng trên 150 trứng cho mỗi gam phân (epg). Động vật nên chưa được điều trị trong 8-12 tuần trước đó do thử nghiệm này có thể là được thực hiện trên giun sán “được chọn trước” và không đại diện cho quần thể bình thường.

(2) Phân phối ngẫu nhiên động vật, hoặc phân phối theo số lượng trứng trong phân nếu có thể thực hiện được, thành các nhóm đối chứng hoặc điều trị gồm 15 động vật mỗi nhóm. Nhóm đối chứng (không được điều trị) nên được sử dụng để cho phép có sự thay đổi theo cách tự nhiên về số lượng trứng trong khi thử nghiệm. tối thiểu 5 g (10-15 viên) phân được thu gom từ mỗi động vật trực tiếp từ trực tràng. các mẫu phải được đặt trong các vật chứa riêng rẽ được bịt kín và nhanh chóng được chuyển đến phòng thí nghiệm để đếm số lượng trứng. nếu các mẫu còn lại được nuôi cấy để xác định giun tròn, các mẫu không nên được lưu giữ ở nhiệt độ 4°C do nhiệt độ này có thể ảnh hưởng đến việc nở của *Haemonchus contortus*. Nếu số lượng trứng trung bình trong nhóm dưới 150 epg, thì việc đánh giá khách quan của khả năng kháng sẽ không đáng tin cậy. Nếu số lượng trứng trung bình trong dưới 150 epg có thể là thông thường ở cừu trưởng thành.

Điều trị

(1) Động vật được điều trị bằng thuốc diệt giun sán theo liều đề xuất của nhà sản xuất là (a) liều chính xác theo milligram cho mỗi kilogram (nhằm mục đích nghiên cứu) hoặc (b) theo trọng lượng của động vật nặng nhất trong nhóm (để bác sỹ thú y chẩn đoán). Đối với khả năng kháng closantel được nghi ngờ ở *H. contortus*, 2,5 mg/kg có thể được sử dụng để tránh tác động của dư thừa chất do độ tồn dư của nó trong cơ thể (Lyndal-Murphy, 1992). Thuốc diệt giun sán nên được dùng bằng kim tiêm hoặc súng định liều mà đã được hiệu chuẩn trước đó.

(2) Các mẫu phân nên được thu gom trong thời gian 10-14 ngày sau khi điều trị. Nếu lấy mẫu trong khoảng thời gian ngắn sẽ cho các kết quả sai lệch với nhiều thuốc diệt giun sán.

Đếm trứng trong phân

Phương pháp McMaster được cải biến được sử dụng.

(1) Cân 3g phân trong vật chứa thích hợp. Thêm 42ml nước và ngâm trong khoảng từ vài phút đến 1 giờ cho đến khi phân mềm.

FIG. 4B (Tiếp theo)

- (2) Đồng nhất bằng cách sử dụng thiết bị khuấy phòng thí nghiệm hoặc đặt trong bình lắc với các hạt thủy tinh có đường kính khoảng 45 8 mm và lắc cho đến khi các viên bị vỡ ra.
- (3) Rót qua lỗ sàng 100 (lỗ 0,15mm) đường kính 20cm vào bát.
- (4) Lắc chất lỏng và rót 15 ml vào trong ống ly tâm 17ml. Ly tâm trong 2 phút ở tốc độ khoảng 300×g (khoảng 1500vòng/phút trong máy ly tâm bench-top) và nhẹ nhàng rót hoặc lắc dịch nổi.
- (5) Khuấy mạnh ống để làm rời phần lắng, sau đó bổ sung dung dịch natri clorua bão hòa để thu được thể tích như trước (15 ml). Đảo ngược ống năm hoặc sáu lần và ngay sau đó rút mẫu bằng pipet Pasteur và đổ đầy ngăn của phiến kính McMaster. Lặp lại quá trình đảo ngược này và lấp đầy ngăn thứ hai.
- (6) Ở độ phóng đại 40 X, đếm tất cả trứng trong hai lưới kẻ (tổng thể tích 0,3 ml). Nhân số lượng trứng với 50 để thu được số trứng trong mẫu phân. Đối với độ nhạy cao hơn, đếm tất cả số trứng trong mỗi ngăn (tổng thể tích 1 ml và nhân với 15 để thu được epg).

Giải thích số liệu

Tính trung bình số học, tỷ lệ % giảm và khoảng tin cậy 95%. Giá trị trung bình số học ($\bar{X}$) tốt hơn là số trung bình nhân do: (a) nó dễ tính toán hơn; (b) nó cung cấp một giá trị ước lượng tốt hơn về số lượng trứng giun sán; (c) nó là một giá trị đo bảo toàn hơn về hiệu quả chống giun sán. Tỷ lệ % giảm là $100(1 - \bar{X}_t/\bar{X}_c)$ trong đó t là số trứng trong nhóm điều trị trong khoảng thời gian 10-14 ngày và c là số trứng trong nhóm đối chứng trong khoảng thời gian 10 - 14 ngày. Chi tiết của việc tính toán các khoảng tin cậy 95% được nêu trong phần phụ lục. Chương trình máy tính, RESO, có sẵn cho tính toán này (xem Phụ lục). Có khả năng kháng nếu (i) tỷ lệ % giảm về số lượng trứng nhỏ hơn 95% và (ii) mức tin cậy 95% nhỏ hơn 90%. nếu một trong hai tiêu chuẩn này đáp ứng thì nghi ngờ có khả năng kháng. mặc dù tiêu chuẩn này có vẻ hợp lý với benzimidazol và ivermectin ở các quốc gia và với levamisol ở Úc, trong các điều kiện ở Anh, khả năng kháng levamisole được chỉ ra bởi FECRT trên thực địa, nhưng không được xác nhận trong phòng thí nghiệm (C. Hong and K.R. Hunt, unpublished data, 1992). Điều này phản ánh hiệu quả của chế độ ăn đối với dược lý chống giun sán (Taylor et al., 1992).

Xác định các giống và loài có mặt

Các giống và loài giun tròn kháng thuốc diệt giun sán nên được xác định. Vì thế, ấu trùng giai đoạn ba được nuôi cấy riêng rẽ từ trứng trong phân của các nhóm đối chứng và các nhóm được điều trị.

- (1) Thu thập khoảng 50 g phân bằng cách kết hợp các mẫu có kích thước tương tự từ mỗi động vật trong một nhóm điều trị.

FIG. 4B (Tiếp theo)

(2) Đập vụn phân bằng cách sử dụng thìa. Chúng nên ẩm và vụn chứ không ướt. Với phân ướt bổ sung vermiculit hoặc rêu bùn.

(3) Đổ đầy các đĩa nuôi cấy bằng thủy tinh (ví dụ, đĩa kết tinh) bằng hỗn hợp này, đập chứ không bịt kín đĩa, và nuôi cấy trong 7 ngày ở nhiệt độ 22- 27°C.

(4) Thu gom ấu trùng trong thiết bị Baermann, hoặc bằng cách tạo huyền phù hỗn hợp trong nước trong vải bao gói, hoặc để yên hỗn hợp trong đĩa petri chứa nước (chi tiết xem Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF), 1986).

(5) Xử lý ấu trùng bằng iốt Lugol và dán nhãn 100. Hướng dẫn định danh được nêu, ví dụ, trong MAFF (1986).

Trâu bò

Các nhóm gồm 10 động vật được sử dụng. Chúng không cần là bê để cung cấp số lượng trứng trên 150 epg. Chỉ có hai thông báo về giun tròn kháng thuốc được tách từ trâu bò trong thực địa mà được xác nhận bằng các thử nghiệm liều lượng và giết mổ (Eagleson and Bowie, 1986; Jackson et al., 1987). Cho đến khi các chủng giun tròn kháng thuốc tiếp theo được tách từ trâu bò không chắc chắn khi kết luận rằng việc không tạo ra mức giảm số lượng trứng nhỏ hơn 90% có liên quan đến khả năng kháng thuốc.

Ngựa

Động vật thường trong các nhóm rất nhỏ và các nhóm đôi chúng có thể không thực tế. Khả năng kháng thuốc của các loài ký sinh ở ngựa chủ yếu giới hạn ở benzimidazol và được thông báo phổ biến nhất ở cyathostomes (giun lươn nhỏ). Mức giảm số lượng trứng nhỏ hơn 90% cho biết tính kháng với benzimidazol (Bauer et al., 1986).

FIG. 5. Thông tin sản phẩm của LIVAMOL



SẢN PHẨM BỔ SUNG DINH DƯỠNG CHO ĐỘNG VẬT VÀ CHIM ĐỂ CẢI THIỆN ĐIỀU KIỆN BÊN NGOÀI VÀ SỰ BIỂU HIỆN CHUNG CỦA TẤT CẢ CÁC VẬT NUÔI

Dạng trình bày: Bột màu đỏ rất ngon miệng.

Thành phần dinh dưỡng: mỗi phần 200g chứa

THÔNG TIN DINH DƯỠNG			
VITAMIN A	12000 IU	Đồng	3 mg
VITAMIN D3	2400 IU	I ốt	17 µg
VITAMIN B1	0,2mg	Mangan	21 mg
VITAMIN B2	0,4 mg	Coban	16 µg
VITAMIN B6	0,2 mg	Kẽm	5 mg
VITAMIN B12	6,4 µg		
Các mức thành phần hoạt tính này là mức tối thiểu			
Protein			Tối thiểu 20%
Chất béo			Tối thiểu 5%
Chất xơ			Tối thiểu 9%
Canxi (Ca)			Tối thiểu 4% - tối đa 6%
Phospho (P)			Tối thiểu 1,5% - tối đa 2,5%
Muối			Không
Flo tối đa (F)			0,025%
Năng lượng có thể tiêu hóa được trung bình			11MJ/kg

ĐẶC ĐIỂM:

(Úc)

SOUTER'S™ LIVAMOL® là hỗn hợp protein ngon miệng, năng lượng và dầu chứa liên kết không no trong mạch được phối chế để cải thiện điều kiện bên ngoài và sự biểu hiện chung của tất cả vật nuôi, bao gồm ngựa nuôi và động vật biểu diễn. LIVAMOL® đặc biệt thích hợp cho động vật non, già và đang hồi phục sau bệnh hoặc chấn thương. Bằng cách sử dụng kỹ thuật độc đáo để chuyển ri đường lỏng thành dạng bột thuận tiện, LIVAMOL® được tạo ra bằng cách nấu chảy "ri đường khô", với protein và bột của hạt lấy dầu, dầu cá và các vitamin và các chất khoáng thiết yếu, bao gồm canxi và phospho. Kết quả là tạo ra chất phụ gia thức ăn được cô và bổ sung dinh dưỡng mà hấp dẫn và ngon miệng với tất cả các loài động vật và chim. Axit béo omega-3 được chọn và bột protein chứa nhiều dầu có tác dụng tích cực lên da và lông. Màu của da lông cũng được cải thiện và tăng cường bằng cách bổ sung các chất khoáng như kẽm và đồng. LIVAMOL® được phối chế để cung cấp khẩu phần ăn hàng ngày bao gồm protein, axit béo, vitamin và chất khoáng bao gồm canxi và phospho.

(Niu Di lân)

SOUTER'S™ LIVAMOL® là chế phẩm bổ sung dinh dưỡng chứa hỗn hợp bột protein, ri đường, dầu, vitamin và chất khoáng cho ngựa, lợn, gia cầm, dê, cừu và trâu bò.

LIỀU LƯỢNG VÀ CÁC DÙNG:

(Úc & Niu Di lân)

LIVAMOL® có thể được trộn với, được cung cấp bằng cách ăn cùng với thức ăn khác hoặc có thể được sử dụng trong các tỷ lệ phối chế, tốt hơn là theo hướng dẫn của chuyên gia dinh dưỡng hoặc bác sỹ thú y. Một cốc cà phê tiêu chuẩn (300 mL) chứa 200 g LIVAMOL®

Úc		Niu Di lân	
NGŨA:	200 đến 500 g	NGŨA:	200 đến 500 g
NGŨA CON:	100 g cho đến 3 tháng tuổi, sau đó 100 g cho mỗi 100kg cân hơi	NGŨA CON:	100 g cho đến 3 tháng tuổi, sau đó 100 g cho mỗi 100kg cân hơi.
TRÁU BÒ:	500 g đến 1kg (hoặc tỷ lệ 15%).	TRÁU BÒ:	500 g đến 1 kg (hoặc tỷ lệ 15%).
BÊ:	100g cho mỗi 100kg cân hơi	BÊ:	100 g cho mỗi 100 kg cân hơi
DÊ/CỪU:	200 g	DÊ/CỪU:	200 g
DÊ NON VÀ CỪU NON:	25 g cho đến khi ba tháng tuổi, sau đó là tỷ lệ dùng cho cả thể trưởng thành.	DÊ NON VÀ CỪU NON:	25 g cho đến khi ba tháng tuổi, sau đó là tỷ lệ dùng cho cả thể trưởng thành.
GIA CẦM:	Bổ sung vào thức ăn gia cầm đến 25% hoặc cho ăn tự do, 1 đến 2 kg cho mỗi gia cầm trưởng thành 100 (gà nuôi).	GIA CẦM:	Bổ sung vào thức ăn gia cầm đến 25% hoặc cho ăn tự do, 1 đến 2 kg cho mỗi gia cầm trưởng thành 100 (gà nuôi).
LỢN:	5 đến 15% tỷ lệ phối chế, hoặc 25 g cho mỗi 10kg cân hơi	LỢN:	5 đến 15% tỷ lệ phối chế, hoặc 25 g cho mỗi 10kg cân hơi
CHÓ:	25 đến 50 g (1 đến 2 thìa canh).		
LẠC ĐÀ KHÔNG BƯỞU & LẠC ĐÀ ALPACAS:	50 cho mỗi 50 kg g		
LẠC ĐÀ:	200 đến 500 g		

THỜI GIAN CÁCH LY THỊT: NL (Úc)

THỜI GIAN: Không cần phải có thời gian cách ly thịt hoặc sữa (Niu Di lân)

Lập biểu chất độc: không áp dụng (Úc)

Tình trạng quản lý:

Úc: Miễn
Niu Di lân: Miễn

FIG. 5 (Tiếp theo)

Kích thước gói: Úc: 2kg, 10kg & 20kg

Niu Di lân: 2kg, 10kg & 20kg

Số điện thoại miễn phí trên toàn nước Úc: 1800 801 201	Số điện thoại miễn phí trên toàn nước Niu Di lân: 0800 424 999 (0800IAH 999)
Email: info@iahp.com.au	Website: www.iahp.com.au

®LIVAMOL và biểu tượng/từ là nhãn hiệu được đăng ký của International Animal Health Products P/L.

TMSOUTERS là nhãn hiệu của International Animal Health Products PL.

© Copyright 1995 — 2014. Tất cả quyền đều được đảm bảo.

07/2014

FIG. 6

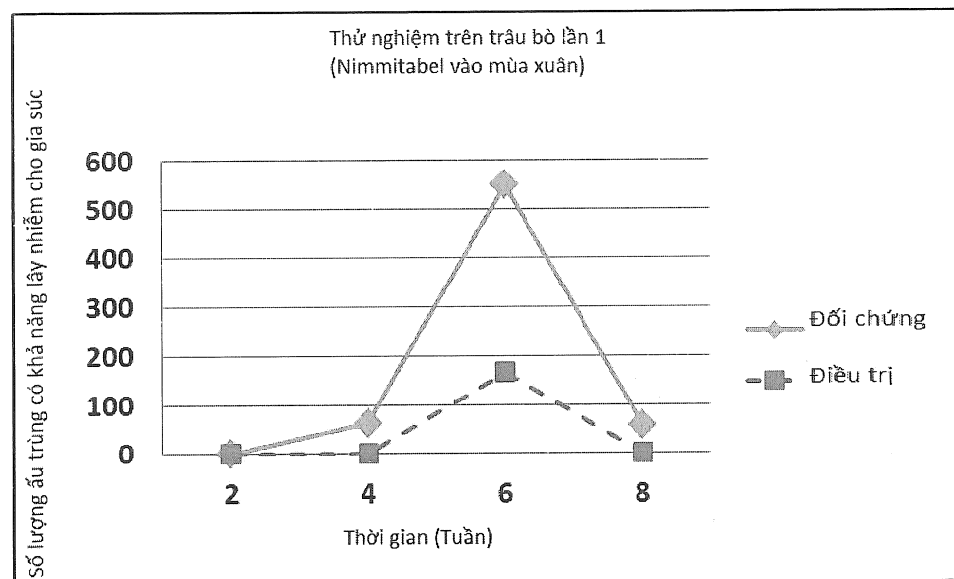
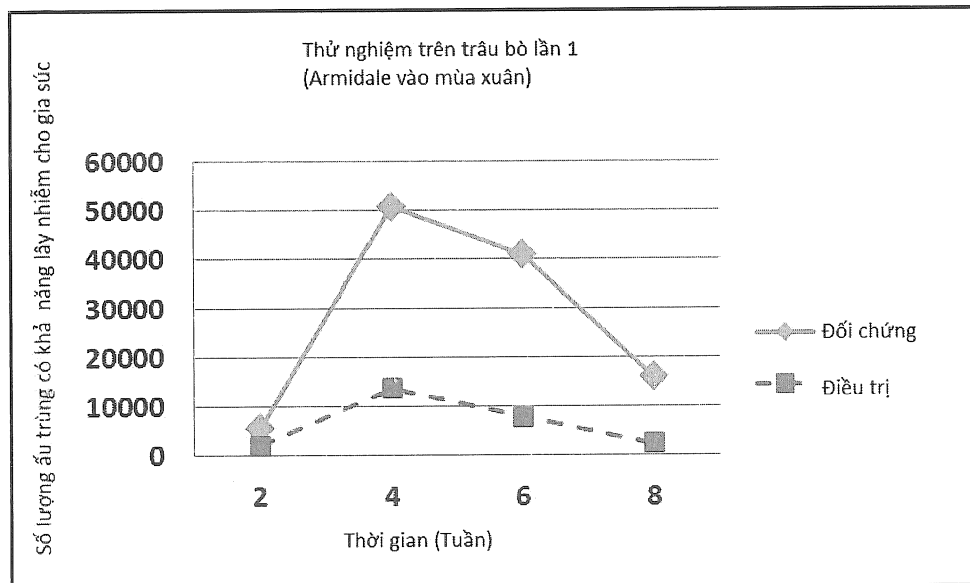


FIG. 7

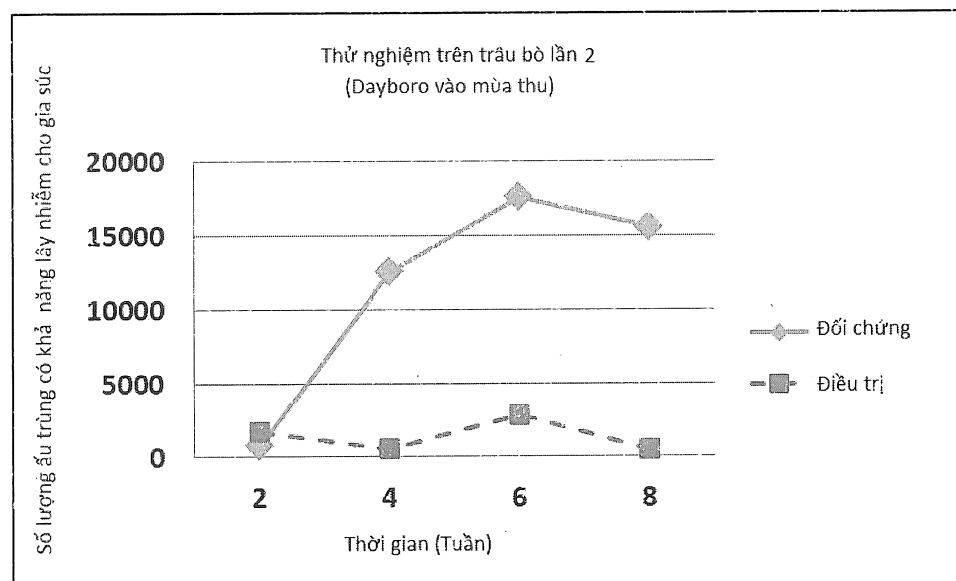
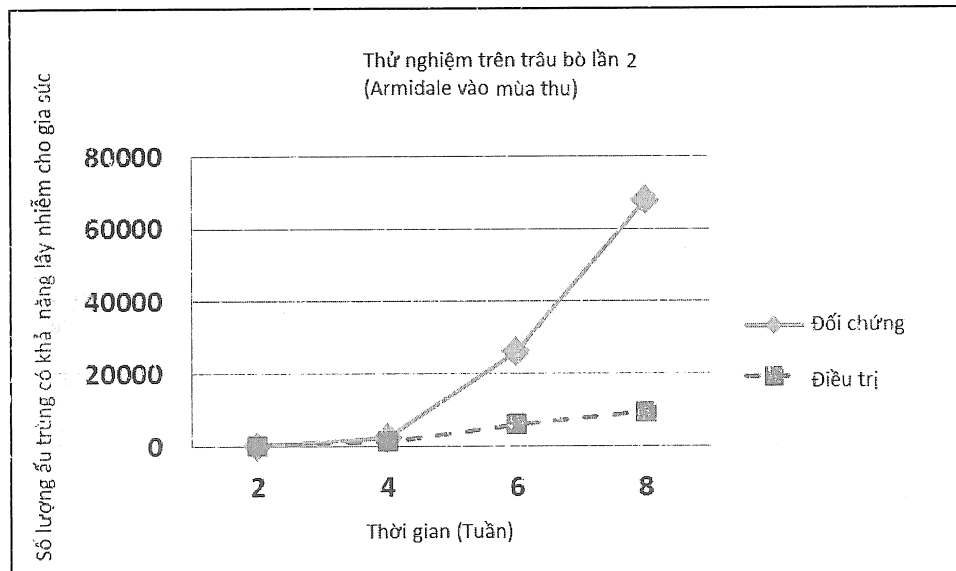


FIG. 8

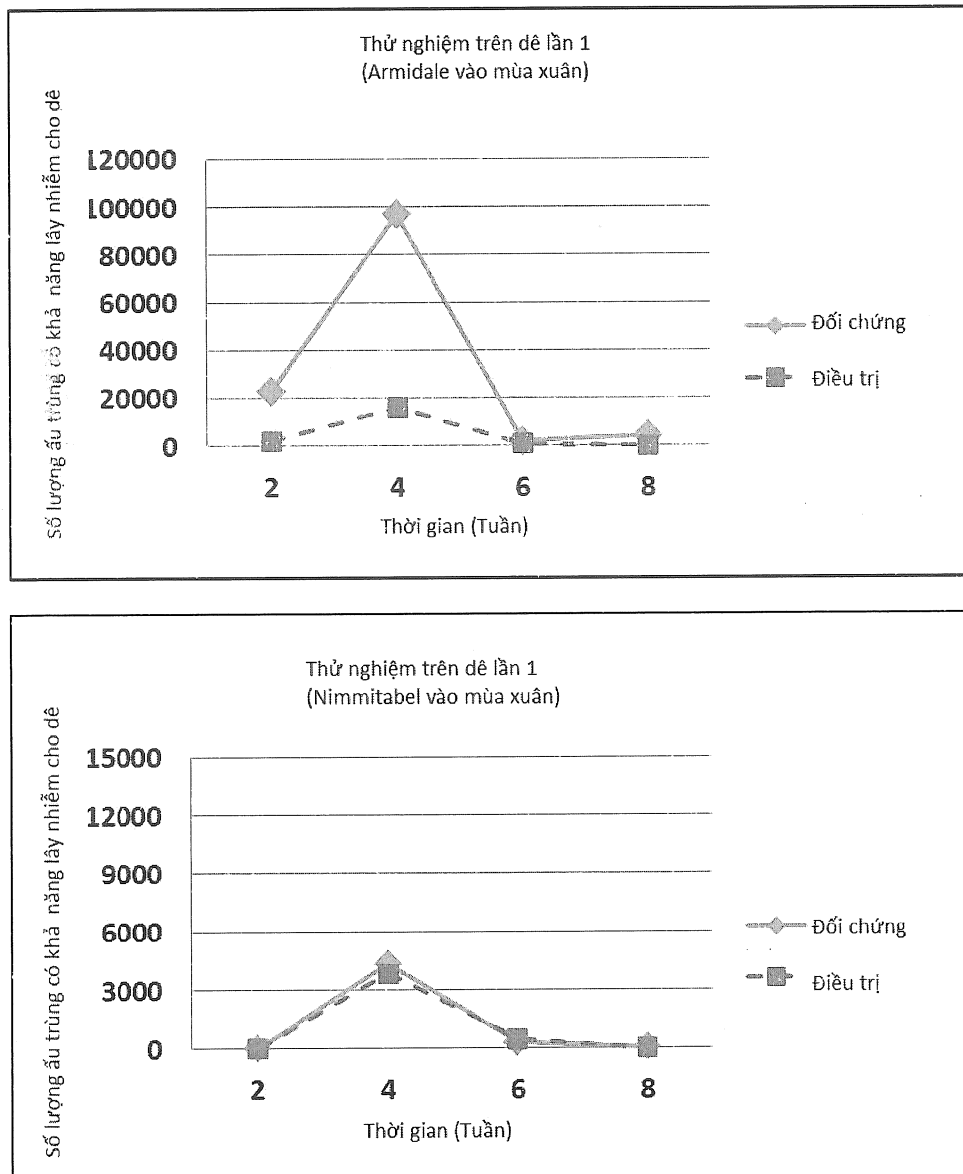


FIG. 9

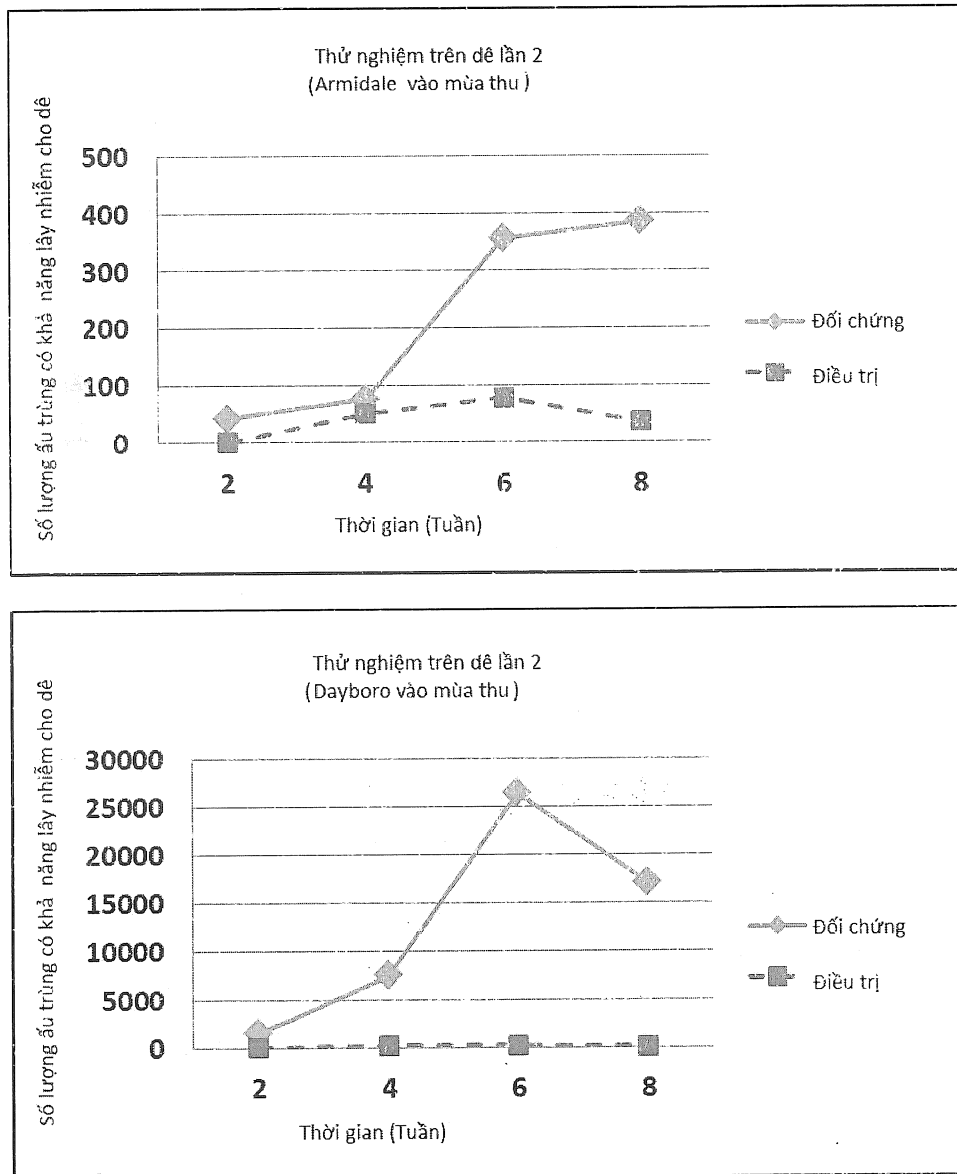


FIG. 10

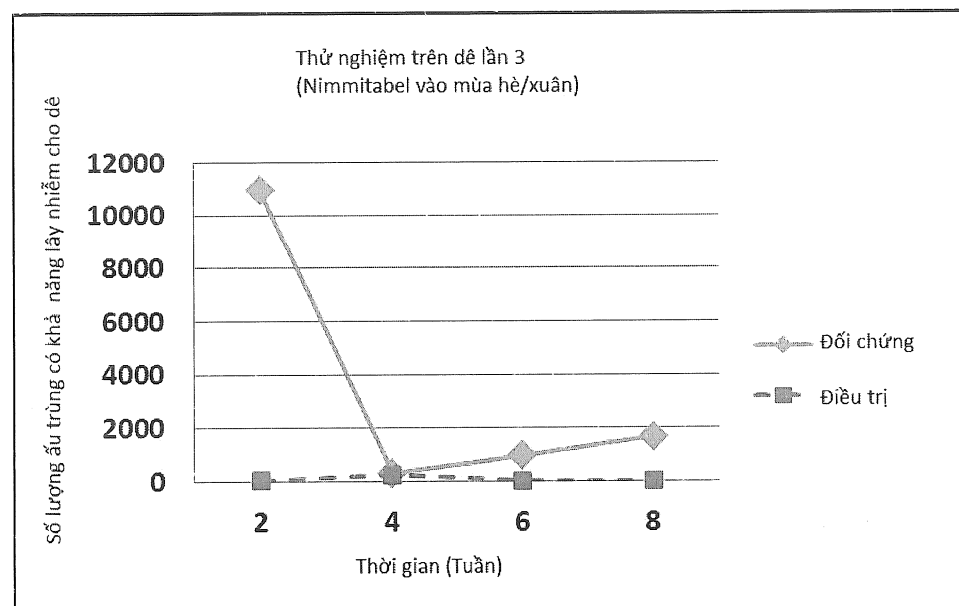
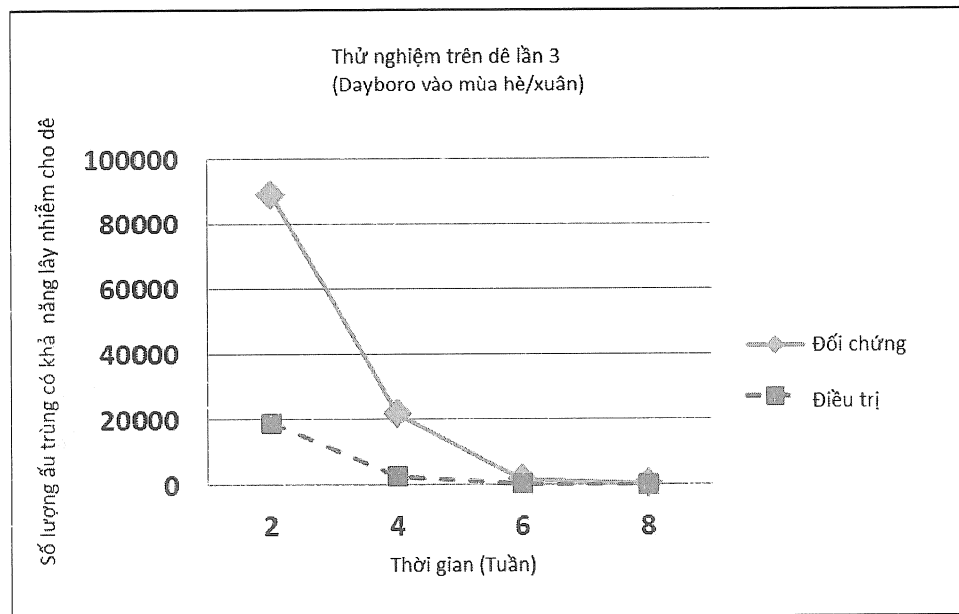


FIG. 11

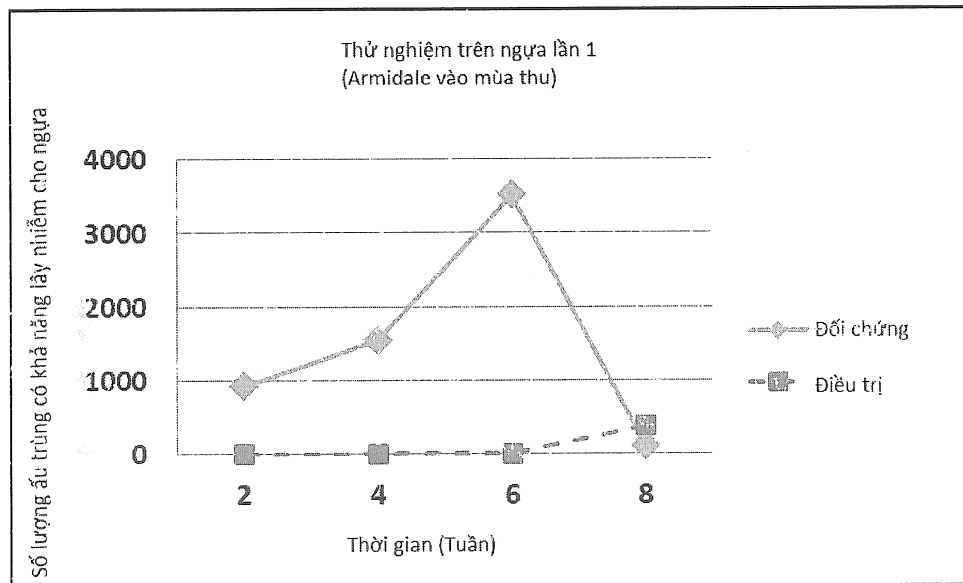


FIG. 12

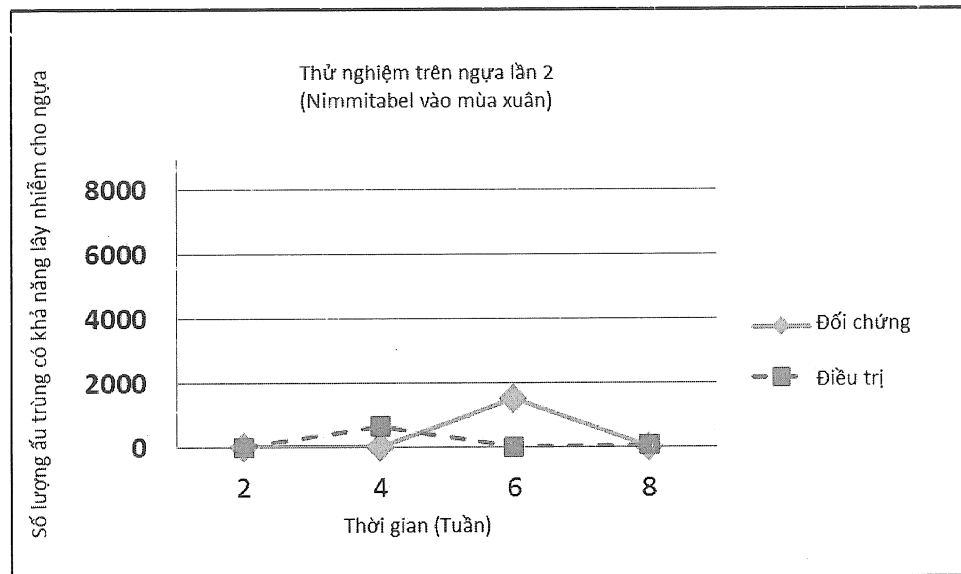
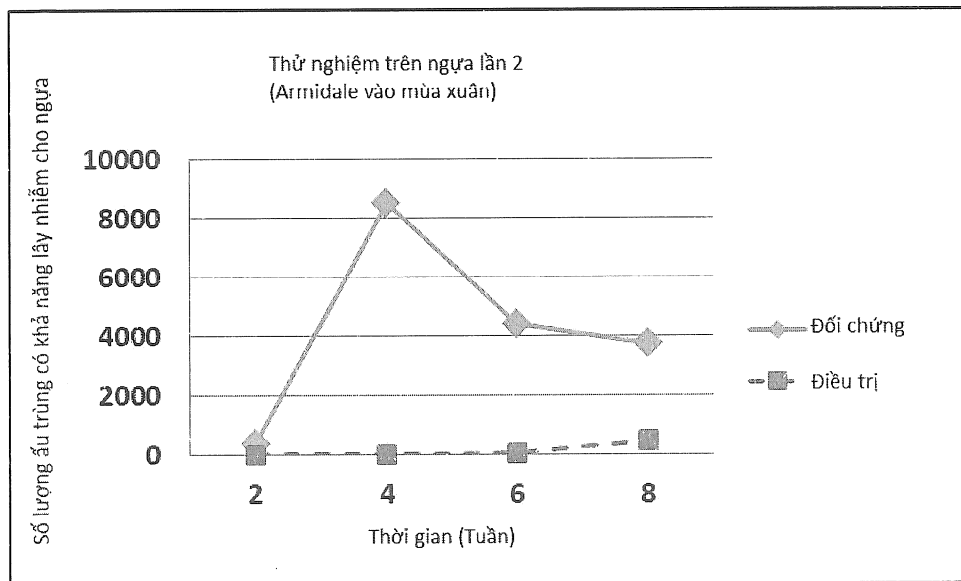


FIG. 13

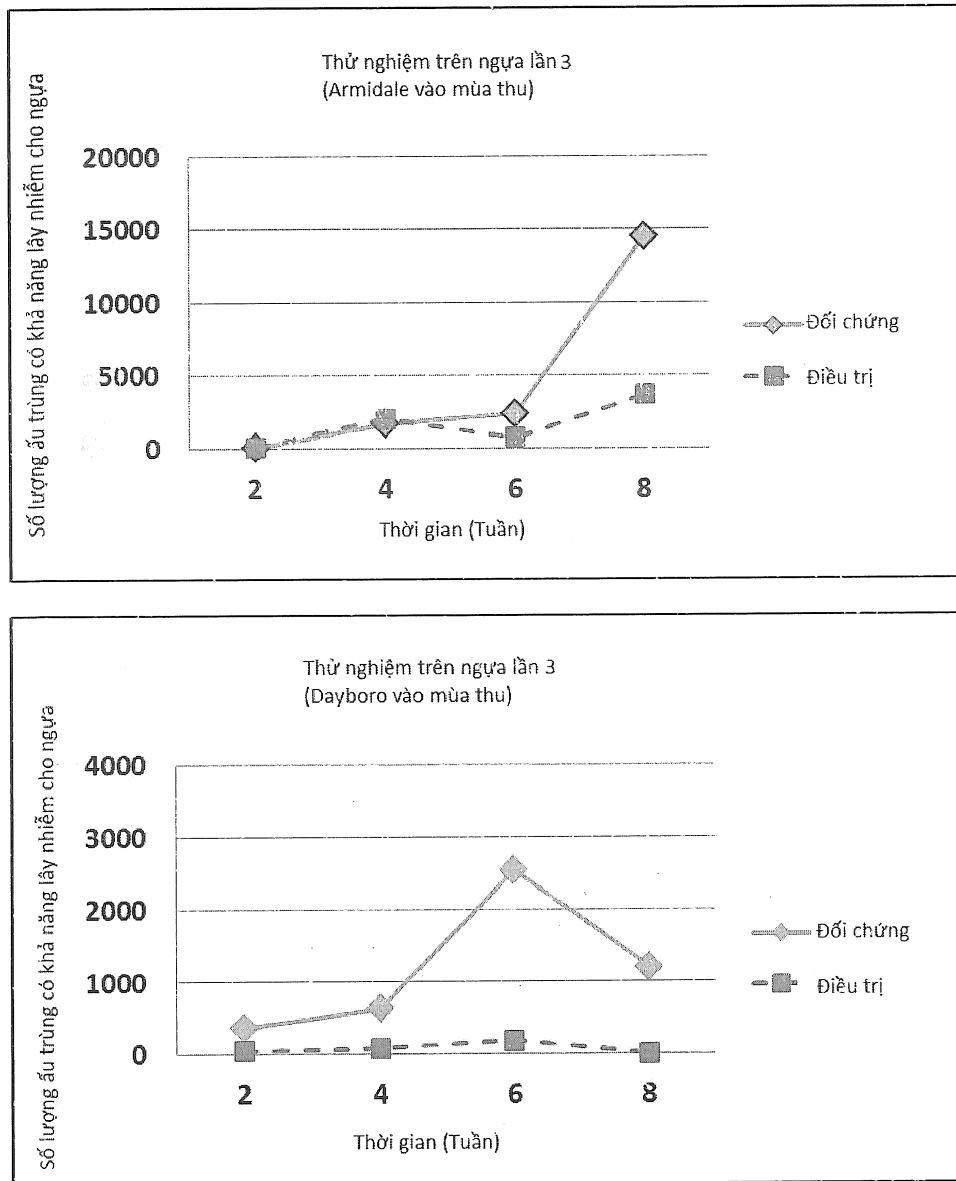


FIG. 14

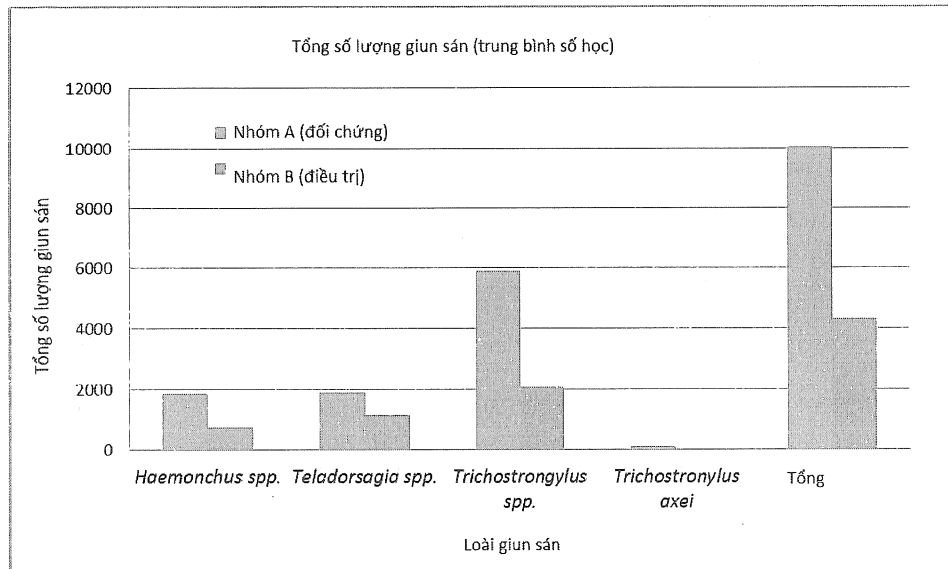


FIG. 15

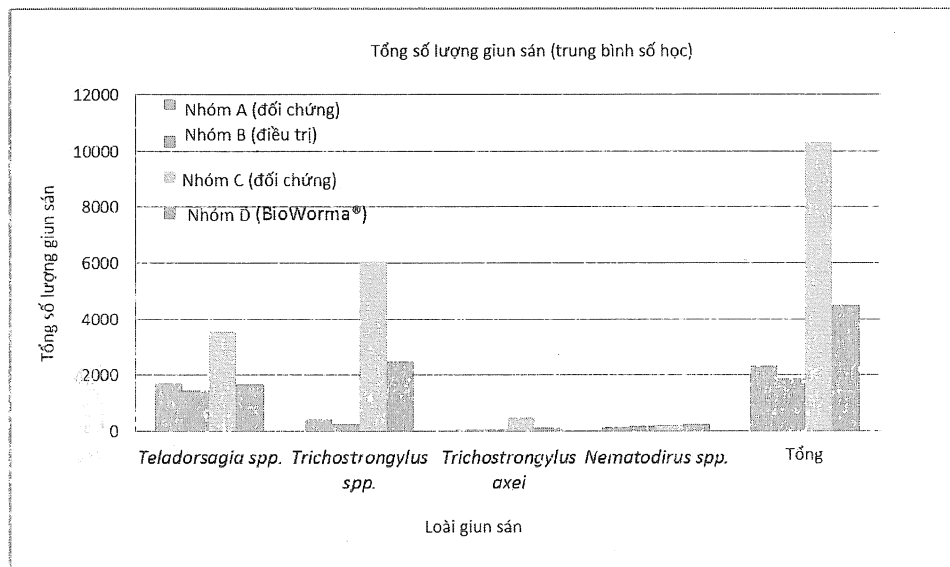


FIG. 16

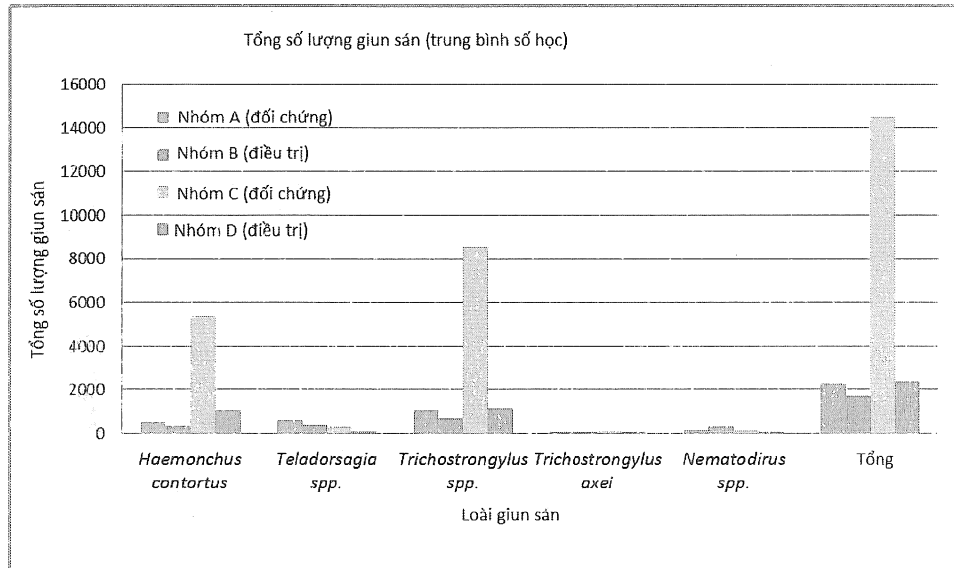


FIG. 17

