



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0043368
(51)⁷ A61K 38/48; A23K 20/10; A23K (13) B
20/163; A23K 10/30; A23K 20/158
-

- (21) 1-2017-01102 (22) 24/08/2015
(86) PCT/US2015/046509 24/08/2015 (87) WO 2016/032944 A4 03/03/2016
(30) 62/041,175 25/08/2014 US
(45) 25/02/2025 443 (43) 25/09/2017 354A
(73) ANATARA LIFESCIENCES LIMITED (AU)
433 Logan Road, Stones Corner, Brisbane, QLD 4120, Australia
(72) MYNOTT, Tracey, L. (AU); WALSH, John (AU).
(74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)
-

- (54) CHẾ PHẨM THÚ Y DÙNG QUA ĐƯỜNG MIỆNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH TIÊU CHẢY

(21) 1-2017-01102

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm thú y dùng qua đường miệng chứa lượng bromelain có hiệu quả điều trị và phòng ngừa bệnh tiêu chảy gây ra bởi các vi sinh vật gây bệnh. Chế phẩm này không tiêu diệt các vi sinh vật gây bệnh, và do đó không tạo thuận lợi cho sự tăng sinh của các sinh vật chống kháng khuẩn.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm thú y dùng qua đường miệng để điều trị bệnh tiêu chảy.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh tiêu chảy là một vấn đề ở lợn và người. Bệnh đi ngoài phân lỏng (bệnh tiêu chảy) ở lợn con là một trong những vấn đề phổ biến nhất ở trang trại nuôi lợn ảnh hưởng đến hàng trăm triệu trong số 1600 triệu lợn con sinh ra trên toàn cầu mỗi năm. Nó dẫn đến mức tăng trọng giảm, chi phí điều trị cao, và tử vong thường xuyên. Lợn con suy giảm về sức khỏe ở độ tuổi sớm, có xu hướng giữ nguyên trọng lượng và nhược điểm đặc tính trong vòng đời sau này. Do đó, các bệnh đi ngoài phân lỏng không chỉ có tác động bất lợi đến sức khỏe của lợn con, mà còn đến khả năng thu lợi nhuận của trang trại.

Bệnh tiêu chảy cũng là vấn đề đáng chú ý ở người. Nó là nguyên nhân tử vong thứ hai trong thế giới phát triển, làm chết hơn 1,5 triệu trẻ em hàng năm và là nguyên nhân dẫn đầu về thiếu dinh dưỡng. Khoảng 4 tỷ trường hợp bệnh tiêu chảy được ước tính xảy ra mỗi năm trong số các trẻ em dưới năm tuổi. Bệnh tiêu chảy cũng là vấn đề đáng chú ý về khách du lịch đối với các khu vực đang phát triển, ảnh hưởng đến 40 triệu người hàng năm, và là vấn đề quan trọng đối với lực lượng quân đội trong các cuộc hành quân.

Có nhiều nguyên nhân khác nhau của bệnh tiêu chảy. *Escherichia coli* sinh độc tố đường ruột (ETEC) là một trong số các nguyên nhân phổ biến nhất của bệnh đi ngoài phân lỏng ở lợn con chưa cai sữa và vừa cai sữa. Các mầm bệnh quan trọng khác bao gồm rotavirus và coccidiosis gây ra bởi *Isospora suis* đơn bào và ảnh hưởng chủ yếu đến lợn con trong ba tuần đầu đời. Tỷ lệ tử vong cao do coccidiosis được quan sát ở các trường hợp đồng nhiễm với ETEC.

ETEC cũng là một trong số các nguyên nhân phổ biến nhất của bệnh tiêu chảy ở trẻ em ở các nước đang phát triển, và có liên quan đến nguy cơ tử vong cao hơn so với các mầm bệnh gây bệnh tiêu chảy khác. ETEC cũng là nguyên nhân phổ biến nhất của bệnh tiêu chảy ở khách du lịch đối với các khu vực đang phát triển với các tỷ lệ tấn công tới 70% trong một số trường hợp. Các mầm bệnh quan trọng khác ảnh hưởng đến trẻ nhỏ dưới năm tuổi ở các nước đang phát triển bao gồm rotavirus, *Cryptosporidium*, *Shigella*, *Aeromonas*, *Vibrio cholerae* O1 và *Campylobacter*. *Enteraggregative E. coli* (EAEC), *Shigella*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, và *Noncholera Vibrios* là các nguyên nhân quan trọng khác của bệnh tiêu chảy của du khách.

Cùng các mầm bệnh ở trên cũng gây ra bệnh tiêu chảy ở Mỹ, cũng như *E. coli* xuất huyết đường ruột (EHEC, hoặc *E. coli* sản sinh độc tố Shiga, STEC), *Listeria*, *Yersinia*, *Cyclospora*, *Giardia*, calciviruses, và các virus đường ruột khác. *Clostridium difficile* là nguyên nhân chính của các truyền nhiễm mắc phải ở bệnh viện. Một cách chọn lọc, các tác nhân này chịu trách nhiệm đối với hơn 200 triệu trường hợp bệnh tiêu chảy ở Mỹ mỗi năm. Trong nhiều trường hợp, tác nhân truyền nhiễm không luôn chịu trách nhiệm. Chẳng hạn, ở các bệnh nhân mắc HIV và các bệnh nhân ung thư, bệnh tiêu chảy có thể dẫn đến do tác dụng phụ mãn tính của liệu pháp hóa học. Bệnh tiêu chảy cũng có thể là kết quả của mất cân bằng hormone được kích ứng bởi các khối u nội tiết, tiểu đường hoặc viêm mãn tính, như ở các bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột.

Tất cả các mầm bệnh gây bệnh tiêu chảy khác biệt đáng kể về các hội chứng lâm sàng mà chúng kích ứng, các cơ chế sinh bệnh, tính độc và dịch tễ học. Một số mầm bệnh, như là ETEC, là không xâm lấn và kích ứng bệnh tiêu chảy bằng cách tấn công qua các yếu tố bám dính đặc hiệu vào các thụ thể tế bào ruột trên ruột non và bằng sự sản sinh các độc tố trong ruột (độc tố trong ruột). Các mầm bệnh khác, như là *Shigella*, là xâm lấn và biến đổi chức năng ngăn chặn trong ruột và kích ứng bệnh tiêu chảy bằng cách kích ứng viêm hoặc làm mất bề mặt hấp thụ và kém hấp thụ. Tính đa dạng này đặt ra một nhiệm vụ lớn

đối với các nhà nghiên cứu đang nỗ lực tạo ra cách phòng ngừa hoặc điều trị hiệu quả và đơn giản chống lại tất cả các nguyên nhân của bệnh tiêu chảy.

Mặc dù sự đa dạng của các mầm bệnh và nhiều yếu tố mà kích ứng bệnh tiêu chảy, các độc tố vi khuẩn hoặc các thể trung gian viêm kích ứng nguyên nhân phổ biến nhất của bệnh tiêu chảy. Các độc tố phát động đặc trưng các phân tử phát tín hiệu như là AMP vòng, GMP vòng hoặc Ca^{2+} nội bào, mà, lần lượt hoạt hóa các kênh clorua (Cl^-) trong ruột dẫn đến tăng bài tiết Cl^- và do đó bài tiết dịch. Khi mức độ bài tiết dịch tăng quá khả năng của ruột kết hấp thụ lại nước và chất điện phân mất từ ruột non, bệnh tiêu chảy xảy ra có thể dẫn đến mất nước trầm trọng và cuối cùng là tử vong. Các tác nhân hóa trị và các tác nhân viêm cũng kích ứng bệnh tiêu chảy bằng cách hoạt hóa các phân tử phát tín hiệu này. Xem Fig.1. Các tác nhân mà hướng đến các đường phát tín hiệu nucleotit hoặc canxi vòng này có thể được mong muốn là các tác nhân chống bài tiết, và vì vậy là các thuốc chống bệnh tiêu chảy phổ rộng có hiệu quả.

Việc ăn vào các vi khuẩn gây bệnh như là *Escherichia coli* có thể gây ra bệnh tiêu chảy ở người và bệnh đi ngoài phân lỏng ở lợn. Bệnh đi ngoài phân lỏng là có liên quan đặc biệt đến nuôi lợn hiện đại, mà thường đòi hỏi các tình trạng sinh trưởng chật hoặc đông đúc .

Các chất kháng sinh là các biện pháp hiệu quả để điều trị bệnh tiêu chảy ở người và bệnh đi ngoài phân lỏng ở lợn. Ở trang trại, các chất kháng sinh có thể cũng được bổ sung đều đặn vào thức ăn động vật để ngăn chặn theo cách phòng ngừa bệnh đi ngoài phân lỏng. Tuy nhiên sử dụng kháng sinh thường xuyên và phổ biến đã làm cho tăng sinh chủng vi khuẩn gây bệnh có tính chống kháng sinh.

Như vậy, có nhu cầu trong lĩnh vực đối với cách điều trị và phòng ngừa bệnh tiêu chảy ở người và bệnh đi ngoài phân lỏng ở lợn mà không khuyến khích tăng sinh thêm chủng vi khuẩn gây bệnh có tính chống kháng sinh.

Tác giả sáng chế đã tìm ra một cách. Giải pháp của tác giả sáng chế không tiêu diệt các vi khuẩn gây bệnh; do đó nó không phải là “kháng sinh” theo nghĩa

thông thường của từ này, và không ủng hộ một cách chọn lọc sự tăng sinh các vi khuẩn có tính chống kháng sinh. Đúng hơn là, giải pháp của tác giả sáng chế chỉ phòng ngừa các vi khuẩn gây bệnh không bám dính vào lớp lót của tuyến dạ dày ruột. Không thể bám dính vào lớp lót của tuyến dạ dày ruột, các vi khuẩn gây bệnh đi qua tuyến dạ dày ruột của động vật chủ không bị tổn hại gì và được loại bỏ trong chất thải rắn của các động vật chủ. Giải pháp của tác giả sáng chế cũng có tác dụng chống lại các vi sinh vật gây bệnh tiêu chảy khác, như là các virus và các sinh vật ký sinh. Giải pháp được tiến hành như vậy bằng cách chặn các đường xâm lấn và bài tiết bên trong các tế bào trong ruột, và không phải bằng cách cố gắng tiêu diệt hoặc hướng vào vi sinh vật gây ra bệnh tiêu chảy. Giải pháp của tác giả sáng chế là không độc và sinh ra chất chuyển hóa hoặc gốc không độc; do đó là thích hợp để sử dụng ở người và trong các động vật làm thực phẩm như là lợn, gia súc và gia cầm, và trong thủy canh (chẳng hạn, cá và động vật có vỏ nuôi). Nó cũng hữu ích cho các động vật nuôi trong nhà như là chó và mèo, cá cảnh v.v.. Tác giả sáng chế sử dụng thuật ngữ “thú y” trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo bao gồm các động vật làm thực phẩm, các động vật nuôi trong nhà và cá. Thêm nữa, nó có thể được tổng hợp sử dụng các kỹ thuật tổng polypeptit trong công nghiệp tiêu chuẩn như là tổng hợp nhựa Fmoc, nhưng cũng có thể theo cách khác được sản xuất từ các chất chiết thực vật.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Dựa trên phân bố lộ được đưa ra ở đây, các thay đổi và thay thế nhất định có thể dễ dàng được thực hiện. Chẳng hạn, chế phẩm của Bảng 1 đưa ra liều dùng thích hợp với điều trị phòng ngừa cho lợn con đang bú để phòng ngừa bệnh đi ngoài phân lỏng. Việc sử dụng để điều trị (chứ không phải là phòng ngừa) bệnh đi ngoài phân lỏng có thể cần liều lượng khác; chuyên gia trong lĩnh vực có thể dễ dàng thu được liều lượng thích hợp. Tương tự, việc sử dụng để điều trị cho lợn trưởng thành hoàn toàn, hoặc người có thể cần liều lượng lớn hơn; chuyên gia trong lĩnh vực có thể dễ dàng thu được liều lượng thích hợp.

Chế phẩm của sáng chế có thể được đề xuất là liều thuốc dùng qua đường miệng, chẳng hạn là bột được tạo hạt cần hoàn nguyên với nước. Để phòng ngừa bệnh đi ngoài phân lỏng sau cai sữa, chế phẩm của sáng chế có thể được đưa ra là liều lượng qua đường miệng chỉ một lần 4mL (0,24 g) vào ngày cai sữa (1-2 ngày trước khi sự tấn công được dự tính cho bệnh đi ngoài phân lỏng). Để phòng ngừa bệnh đi ngoài phân lỏng trước cai sữa, liều lượng dùng qua đường miệng đơn 2mL (0,12 g) có thể được cho dùng ở 2-5 ngày tuổi, phụ thuộc vào giai đoạn gặp vấn đề của trang trại cụ thể. Liều lượng lặp lại có thể cần 3-7 ngày sau. Khi điều trị, chế phẩm của sáng chế có thể được cho dùng (2mL hoặc 4mL) ngay khi các triệu chứng bệnh xuất hiện.

Chế phẩm của sáng chế có thể được đề xuất là chất phụ gia thức ăn, chẳng hạn được tạo ra là bột được tạo hạt mà có thể được bổ sung vào thức ăn cho lợn. Để đảm bảo phân tán hoàn toàn sản phẩm trước tiên nên trộn với lượng thích hợp các thành phần thức ăn trước khi kết hợp vào hỗn hợp cuối. Chế phẩm của sáng chế có thể được cung cấp chỉ là hỗn hợp trộn trước, hoặc hỗn hợp trộn trước được kết hợp vào hỗn hợp cuối. Mức liều lượng được đề xuất là 40mg chế phẩm của sáng chế/kg trọng lượng cơ thể hàng ngày trong 14 liên tục.

Cũng có thể phân phối chế phẩm của sáng chế trong nước qua hệ uống. Theo cách khác, có thể sử dụng bromelain để tạo ra liều thuốc dùng qua đường miệng tương đương, được bào chế với các tá dược và cần hoàn nguyên trong chất lỏng. Để phòng ngừa bệnh đi ngoài phân lỏng sau cai sữa, có thể tạo ra là liều lượng dùng qua đường miệng chỉ một lần (125 mg) vào ngày cai sữa (1-2 ngày trước khi sự tấn công của bệnh đi ngoài phân lỏng có thể được dự tính). Để phòng ngừa bệnh đi ngoài phân lỏng trước cai sữa, liều lượng dùng qua đường miệng đơn 62,5mg có thể được cho dùng ở 2-5 ngày tuổi, phụ thuộc vào giai đoạn gặp vấn đề của trang trại cụ thể. Liều lượng lặp lại có thể cần 3-7 ngày sau. Khi điều trị, nó có thể được cho dùng (62,5 mg hoặc 125 mg) ngay khi các triệu chứng của bệnh xuất hiện.

Theo cách khác, có thể sử dụng bromelain để tạo ra chất phụ gia thức ăn tương đương, chẳng hạn là bột mà có thể được bổ sung vào thức ăn cho lợn. Để đảm bảo phân tán hoàn toàn của sản phẩm trước tiên nên được trộn với lượng thích hợp các thành phần thức ăn trước khi kết hợp vào hỗn hợp cuối. Nó có thể được cung cấp chỉ là hỗn hợp trộn trước, hoặc hỗn hợp trộn trước được kết hợp vào hỗn hợp cuối. Mức liều lượng được đề xuất là 20mg bromelain/kg trọng lượng cơ thể được cho ăn hàng ngày trong 14 ngày liên tiếp.

Theo cách khác, chế phẩm của sáng chế có thể được tạo ra là viên nén và viên nang, và các dạng liều lượng thích hợp khác dùng cho người.

Chuyên gia có trình độ trung bình có thể điều chỉnh chế phẩm của sáng chế cho các chỉ định khác nhau. Chẳng hạn, nó có thể được sử dụng để phòng ngừa và điều trị bệnh đi ngoài phân lỏng ở các động vật nuôi (gia súc, lợn v.v..) và bệnh tiêu chảy ở người. Nó cũng có thể được sử dụng để cải thiện sức khỏe đường ruột bằng cách làm giảm viêm. Theo cách khác, nó có thể được bào chế để thúc đẩy sự hấp thụ thức ăn gia tăng ở các động vật nuôi, do đó thúc đẩy mức tăng trọng và hiệu quả chuyển đổi thức ăn. Nó có thể được sử dụng để làm giảm nhu cầu đối với các chất kháng sinh trong thức ăn động vật, và để cho dùng cấp tính cho người. Nó cũng có thể được sử dụng để cải thiện bệnh viêm ruột ở người.

Do đó, tác giả sáng chế dự định phạm vi hợp pháp của sáng chế này được xác định không chỉ bởi các ví dụ cụ thể được nêu ở trên, mà còn bởi các điểm yêu cầu bảo hộ hợp pháp và các nội dung tương đương được chấp nhận của nó.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ một số nguyên nhân có thể của bệnh tiêu chảy.

Fig.2 là sơ đồ ba cơ chế tác dụng có thể của công thức của tác giả sáng chế.

Fig.3 là đồ thị biểu thị số lượng lợn con sau cai sữa mắc bệnh đi ngoài phân lỏng theo thời gian sau khi cho dùng duy nhất công thức của tác giả sáng chế, được so sánh với lợn con không được điều trị.

Fig.4 là đồ thị thể hiện tổng số điểm lâm sàng của lợn con sau cai sữa theo thời gian sau khi cho dùng duy nhất công thức của tác giả sáng chế, được so sánh với lợn con không được điều trị.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế của tác giả đòi hỏi bào chế huyền phù dùng qua đường miệng dạng nước của bromelain, natri carboxymetyl xenluloza BLANOSE®, axit xitric khan, dầu lexithin 135F EPIKURON® và axit etylendinitrilotetraaxetic, muối dinatri dihydrat (“EDTA”). Chẳng hạn, chế phẩm thích hợp được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1		
Nguyên liệu	Lượng trên mỗi liều đơn vị	Phần trăm (trọng lượng/trọng lượng)
Bromelain q.s	62,5 - 88,4 mg	53,1- 74,7
Natri carboxymetyl xenluloza BLANOSE®	25,9 - 42,4 mg	22 - 36
Axit xitric khan	4,7 - 14,96 mg	4 - 12,7
Dầu lexithin 135F EPIKURON®	3,5 - 9,3 mg	3 - 7,9
Axit etylendinitrilotetraaxetic, muối dinatri dihydrat	0,8 - 1,9 mg	0,7 - 1,6
Tổng	97,4-156,96 mg	100,0

Chế phẩm này tạo ra bột không chảy. Nó có thể được tạo huyền phù trong 2mL nước để cho dùng qua đường miệng cho lợn con đang bú để phòng ngừa bệnh tiêu chảy (“các bệnh đi ngoài phân lỏng”) được kích ứng bởi E. coli, hoặc vi sinh vật khác. Lượng được sử dụng có thể tăng lên khi cho dùng đối với các

động vật cỡ lớn hoặc cho người. Tác giả sáng chế đưa ra chi tiết hơn về mỗi thành phần trong số các thành phần này.

Bromelain

Bromelain là tên chung dùng cho chất chiết protein thủy phân thô thu được từ cây dứa (*Ananas comosus*). Hai dạng bromelain là đã được biết đến; bromelain từ quả thu được từ quả dứa tươi, và bromelain từ thân thu được từ thân của cây. Nguồn bromelain chính bán trên thị trường là bromelain từ thân, và các thuật ngữ “bromelain” và “bromelain từ thân” được sử dụng thay thế được cho nhau.

Bromelain được tạo ra từ các thân sau khi quả được thu hoạch. Thân được bóc, được nghiền và được ép để thu được nước ép chứa các thành phần bromelain hòa tan. Bước chế biến tiếp bao gồm cô đặc, lọc và sấy nước ép được ép để thu bột khô màu nâu hoặc màu trắng-vàng thành phẩm. Chất chiết bromelain thu được là hỗn hợp của các enzym tiêu hóa protein - được gọi là các enzym thủy phân protein hoặc các proteaza - và một số chất khác với lượng ít hơn, như là các peroxidaza, các axit phosphataza, các chất ức chế proteaza, và canxi.

Enzym thủy phân protein chính trong bromelain là bromelain từ thân được gọi là proteaza, CAS 37189-34-7 (EC 3.4.22.32), trong khi proteaza chính trong chất chiết bromelain từ quả được gọi là bromelain từ quả (EC 3.4.22.33). Các enzym proteaza này được gọi là các sulfhydryl proteaza, vì nhóm sulfhydryl tự do của mạch bên cysteine là cần thiết cho chức năng. Bromelain từ thân có tính đặc hiệu rộng đối với sự phân cắt các protein, và có sự ưu tiên mạnh đối với Z-Arg-Arg-|-NHMe trong số các chất có phân tử nhỏ. Bromelain từ quả, có sự ưu tiên mạnh đối với Bz-Phe-Val-Arg-|-NHMe.

Trừ phi được nói rõ theo cách khác (ví dụ “bromelain từ quả”), tác giả sáng chế sử dụng thuật ngữ “bromelain” ở đây là đề cập đến chất chiết thô từ các thân cây dứa, và “protease bromelain từ thân” để mô tả proteaza chính.

Các cây dứa có truyền thống lâu đời làm cây thuốc trong các thổ dân của Nam và Trung Mỹ. Sự phân tách đầu tiên bromelain được ghi nhận bởi nhà hóa học Venezuela Vicente Marcano <http://en.wikipedia.org/wiki/Bromelain> - cite_note-2 vào năm 1891 từ quả của cây dứa. Vào năm 1892, Russell Henry Chittenden, được hỗ trợ bởi Elliott P. Joslin và Frank Sherman Meara, đã nghiên cứu chất này một cách đầy đủ, và gọi nó là 'bromelin'. Sau đó, thuật ngữ "bromelain" được giới thiệu, và ban đầu thuật ngữ được áp dụng cho bất kỳ proteaza nào từ bất kỳ bộ phận nào của họ thực vật Bromeliaceae.

Bromelain có lịch sử lâu đời về việc sử dụng chữa bệnh trong dân gian và hiện đại và tiếp tục được khai thác làm tác nhân chữa bệnh tiềm năng trong thuốc thay thế. Nó cũng được chấp nhận rộng rãi là thuốc điều trị từ thực vật. Bromelain được giới thiệu đầu tiên là phân bổ sung điều trị vào năm 1957. Đầu tiên, nghiên cứu về bromelain được thực hiện ở Hawaii, gần đây hơn đã được thực hiện ở các nước ở châu Á, châu Âu, và Mỹ Latin. Gần đây, các nhà nghiên cứu ở Đức đã nhận được lợi ích lớn trong nghiên cứu bromelain. Hiện tại, bromelain là thuốc thảo dược được sử dụng rộng rãi nhất thứ mười ba ở Đức.

Một số lợi ích điều trị của bromelain là sự ức chế thuận nghịch sự kết tụ tiểu cầu, sự ức chế thuận nghịch đau thắt ngực, sự ức chế thuận nghịch viêm phế quản và viêm xoang, điều trị các chấn thương phẫu thuật, viêm tĩnh mạch huyết khối, và viêm thận-bể thận. Nó có thể cũng được sử dụng sau phẫu thuật hoặc tổn thương để làm giảm sưng (viêm), đặc biệt là cho mũi và xoang. Nó cũng được sử dụng để phòng ngừa sự nhức cơ sau khi luyện tập cường độ cao.

Bromelain cũng đã được báo cáo là can thiệp vào sự sinh trưởng của các tế bào khối u và làm chậm việc đông cục máu. Xem ở www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/natural/895.html. Bromelain cũng được sử dụng cho bệnh sốt mùa hè, điều trị tình trạng về ruột bao gồm sưng và loét (viêm ruột kết mạn loét), loại bỏ mô chết và hỏng sau khi bỏng (mở ổ), phòng ngừa tập trung nước trong phổi (phù phổi), làm chùng các cơ, kích thích co cơ, cải thiện sự hấp thụ các chất kháng sinh, phòng ngừa ung thư, rút ngắn cơn co,

và giúp cơ thể loại bỏ chất béo. Trong sản xuất thực phẩm, bromelain được sử dụng làm chất làm mềm thịt, và làm trong bia.

Điều trị bằng enzym hệ thống (gồm có những sự kết hợp các enzym thủy phân protein như là bromelain, trypsin, chymotrypsin, và papain) đã được nghiên cứu ở châu Âu để điều trị cho các bệnh nhân ung thư vú, đại trực tràng, và u tương bào. Ở chuột nhắt bị mắc viêm ruột kết thực nghiệm, sáu tháng ăn uống bromelain từ thân dừa hoặc từ nước ép tươi đã giảm mức độ nghiêm trọng của viêm ruột kết và giảm số lượng các tổn thương ung thư trong ruột kết.

Các phân bổ sung bromelain, khi uống cùng các dược phẩm khác (Amoxixilin, các chất kháng sinh, các thuốc chống đông/kháng kết tập tiểu cầu), có thể tăng nguy cơ liên quan đến nhịp tim, đông cục máu và xuất huyết sau phẫu thuật.

Các hoạt tính của chống di căn và kháng viêm của bromelain là hình như không phụ thuộc hoạt tính thủy phân protein của nó. Mặc dù chưa được hiểu rõ, nhưng các hiệu quả sinh học khác nhau của bromelain dường như phụ thuộc vào khả năng của nó vượt qua hàng rào màng, tính chất rất khác thường của hợp chất này. <http://en.wikipedia.org/wiki/Bromelain> - cite_note-mlp-nih-6

Là tác nhân kháng viêm tiềm năng, bromelain có thể hữu ích để điều trị viêm khớp, nhưng không được xác nhận trong các nghiên cứu ở người đối với việc sử dụng này, cũng không được chấp thuận có yêu cầu về sức khỏe đối với hiệu quả bởi Cơ quan quản lý thuốc và thực phẩm (Food and Drug Administration) hoặc Cơ quan an toàn thực phẩm châu Âu (European Food Safety Authority). Tài liệu *Natural Medicines Comprehensive Database* đề xuất rằng bromelain, khi được sử dụng liên hợp với trypsin (một proteaza khác) và rutin (một chất được phát hiện trong kiêu mạch) là có hiệu quả như một số thuốc giảm đau quy định trong quản lý viêm xương khớp. Một sản phẩm (WOBENZYME™) kết hợp bromelain với trypsin và rutin là có bán trên thị trường và dường như làm giảm đau và cải thiện chức năng đầu gối ở người bị mắc viêm xương khớp. Tuy nhiên, cơ quan National Institutes of Health lưu ý,

“Không có đủ bằng chứng khoa học để xác định bromelain có tác dụng hay không đối với bất kỳ cách sử dụng khác nào của nó.” *See id.* Bromelain là cũng có sẵn ở một số nước là sản phẩm có tên ANANASE™.

Bromelain không được chứng minh về mặt khoa học là có hiệu quả đối với bất kỳ bệnh nào khác và không được li xăng bởi cơ quan Food and Drug Administration để điều trị rối loạn nào khác.

Bromelain được sản xuất ở Thái Lan, Đài Loan, và các vùng nhiệt đới khác của thế giới nơi các cây dứa được trồng.

Bromelain thể hiện triển vọng về một hiệu quả là thuốc chống bệnh tiêu chảy phổ rộng, khi nó hướng đến nguyên nhân thực của bệnh tiêu chảy, các đường viêm và bài tiết. Bromelain có cơ chế tác dụng ba phần. Xem Fig.2. Đầu tiên, nó ngăn chặn sự gắn các vi khuẩn vào ruột non nhờ đó ngăn chặn sự định cư của chúng. Thứ hai, nó ngăn chặn và đảo ngược tác dụng của các độc tố vi khuẩn, và thể trung gian viêm, nguyên nhân thực của sự bài tiết dịch quá mức và bệnh tiêu chảy. Nó có thực hiện như vậy bằng cách chặn độc tố trong ruột và các đường phát tín hiệu nội bào AMP vòng, GMP vòng và Ca^{2+} được kích ứng thể trung gian viêm mà kích ứng bài tiết dịch trong ruột và bệnh tiêu chảy bài tiết. Thứ ba, bromelain cũng ức chế viêm bằng cách làm giảm sự sản sinh, và tác dụng của các xytokin viêm khuyết tật, bao gồm $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, và IL-6 bằng cách ngăn chặn sự hoạt hóa của các đường kinaza protein hoạt hóa tác nhân phân bào (MAP) ERK-2, JNK và p38. Các đường này và các xytokin viêm khuyết tật đóng vai trò quan trọng trong sự rối loạn chặn trong ruột được kích ứng bởi *Shigella*, *Salmonella*, và *Clostridium difficile*, và trong viêm mạn, như là ở các bệnh nhân mắc bệnh viêm ruột (IBD).

Vì bromelain tác động vào các cơ chế thực của bệnh tiêu chảy, không giống như các chất kháng sinh và các vacxin mà chỉ hướng đến các loại mầm bệnh cụ thể, bromelain sẽ có hiệu quả chống lại phạm vi rộng các nguyên nhân khác nhau của bệnh tiêu chảy. Đồng thời vì bromelain không phải là chất kháng

sinh và không hướng đến các mầm bệnh, nó sẽ không liên quan đến vấn đề phát triển tính chống kháng sinh, là vấn đề nghiêm trọng về sức khỏe toàn cầu.

Việc sử dụng các chế phẩm của sáng chế phòng ngừa viêm khi cai sữa, cải thiện sức khỏe đường ruột, và tăng hấp thụ thức ăn. Cai sữa là giai đoạn tiêu chuẩn trong vòng đời lợn con. Nó phải đương đầu với việc tách khỏi lợn mẹ, việc chuyển từ sữa có khả năng tiêu hóa cao sang thức ăn rắn khó tiêu hóa và phức tạp hơn, môi trường mới, di chuyển và tách khỏi các con cùng lứa, và phối cùng các con lợn không cùng đàn. Các yếu tố căng thẳng này có thể dẫn đến hấp thụ thức ăn giảm và sự sinh trưởng của lợn con giảm đi.

Ngoài ra, các hệ thống miễn dịch và tiêu hóa của các con lợn mới cai sữa vẫn đang hoàn thiện, làm cho lợn con mẫn cảm hơn với các thách thức về kháng nguyên (dinh dưỡng hoặc vi khuẩn), mà có thể dẫn đến các đáp ứng viêm. Viêm kích ứng tác động tiêu cực vào các khả năng tiêu hóa và hấp thụ của đường ruột, và toàn bộ sức khỏe đường ruột tạo thời cơ cho động vật trở nên mẫn cảm hơn với các mầm bệnh. Động vật mà sự hấp thụ thức ăn giảm đi là yếu ở thời điểm phơi nhiễm mầm bệnh sẽ trở nên ốm.

Việc không có thức ăn trong dạ dày lợn con dẫn đến mất cân bằng vi khuẩn, kéo theo khả năng sinh các bệnh cao hơn. Như vậy, thời kỳ cai sữa ngắn trong vòng đời của lợn có thể có các hậu quả tác động sâu rộng, ảnh hưởng bất lợi đến toàn bộ giai đoạn nuôi của lợn.

Hoạt tính kháng viêm của bromelain làm giảm viêm đường ruột, và bảo vệ lợn con khỏi mắc bệnh, cũng như tăng hấp thụ thức ăn của lợn con trong giai đoạn sau cai sữa.

Natri carboxymetyl xenluloza BLANOSE®

Xenluloza để sử dụng trong công nghiệp thu được chủ yếu từ thịt gỗ và bông. Quy trình kraft được sử dụng để tách xenluloza khỏi chất gỗ, thành phần chính khác của cây. Xenluloza không có vị, không có mùi, thấm nước với góc tiếp xúc 20-30, không tan trong nước và hầu hết các dung môi hữu cơ, là bất đối

xúng có thể phân hủy sinh học. Nó có thể bị phá vỡ về mặt hóa học thành các đơn vị glucoza của nó bằng cách xử lý nó với các axit đặc ở nhiệt độ cao.

Xenluloza có nguồn gốc từ các đơn vị D-glucoza, mà kết lại qua các liên kết $\beta(1\rightarrow4)$ -glycosit. Kiểu kết nối này ngược lại với kiểu kết nối đối với các liên kết $\alpha(1\rightarrow4)$ -glycosit có mặt trong tinh bột, glycogen, và các carbohydrat khác. Xenluloza là polyme mạch thẳng: không giống như tinh bột, không xoắn hoặc không phân nhánh, và phân tử nhận sự hình thành kéo dài và đúng hơn là giống như thanh cứng, được trợ giúp bởi sự hình thành bao quanh của các gốc glucoza. Các nhóm hydroxyl phức trên glucoza từ một mạch tạo ra các liên kết hydro với các nguyên tử oxy trên cùng mạch hoặc trên mạch bên cạnh, giữ chắc chắn các mạch cùng cạnh nhau và tạo ra *các vi thớ* với cường độ kéo căng cao. Điều này đem lại cường độ kéo căng trong thành tế bào, nơi các xenluloza vi thớ được khớp thành *hệ polysacarit*.

So với tinh bột, xenluloza cũng kết tinh nhiều hơn. Ngược lại tinh bột chịu kết tinh để chuyển tiếp vô định hình khi được gia nhiệt ngoài khoảng 60–70°C trong nước (như khi nấu), xenluloza cần nhiệt độ 320°C và áp suất 25 MPa để trở nên vô định hình trong nước.

Một số cấu trúc tinh thể khác nhau của xenluloza là đã biết, tương ứng với sự định vị các liên kết hydro giữa và bên trong các dải. Xenluloza tự nhiên là xenluloza I, với cấu trúc I_α và I_β . Xenluloza được tạo ra bởi các vi khuẩn và tảo là giàu về I_α trong khi xenluloza của các thực vật bậc cao hơn chủ yếu gồm I_β . Xenluloza trong các sợi xenluloza được tái tạo là xenluloza II. Sự chuyển đổi xenluloza I thành xenluloza II là không thuận nghịch, đề xuất rằng xenluloza I ổn định biến đổi và xenluloza II ổn định. Bằng các cách xử lý hóa học khác nhau có thể tạo ra các cấu trúc xenluloza III và xenluloza IV. Nhiều tính chất của xenluloza phụ thuộc vào độ dài mạch của nó hoặc mức độ polyme hóa, số lượng các đơn vị glucoza hình thành một phân tử polyme. Xenluloza từ thịt gỗ có các độ dài mạch đặc trưng giữa 300 và 1700 đơn vị; bông và các sợi thực vật khác cũng như xenluloza vi khuẩn có các độ dài mạch nằm trong khoảng từ 800 đến

10.000 đơn vị. Các phân tử với độ dài mạch rất nhỏ thu được từ sự phá vỡ xenluloza đã được biết là các xenlodextrin; ngược lại với xenluloza mạch dài, các xenlodextrin đặc trưng là tan trong nước và các dung môi hữu cơ.

Metyl xenluloza (hoặc metylxenluloza) là hợp chất hóa học thu được từ xenluloza. Nó là bột trắng thấm nước ở dạng nguyên chất và hòa tan trong nước lạnh (mà không hòa tan trong nước nóng), tạo ra dung dịch nhớt trong hoặc gel. Nó được bán với nhiều tên thương mại khác nhau và được sử dụng làm chất gây lắng và chất nhũ hóa trong các sản phẩm thực phẩm và mỹ phẩm khác nhau, và đồng thời là điều trị chứng táo bón. Giống như xenluloza, nó không tiêu hóa được, không độc, và không dị ứng.

Metyl xenluloza không xuất hiện tự nhiên và được sản xuất theo cách tổng hợp bằng cách gia nhiệt xenluloza với dung dịch có tính kiềm (ví dụ dung dịch của natri hydroxit) và xử lý nó với metyl clorua. Trong phản ứng thế dưới đây, các gốc hydroxyl (các nhóm chức $-OH$) được thay thế bằng metoxit (các nhóm $-OCH_3$).

Các loại metyl xenluloza khác nhau có thể được điều chế phụ thuộc vào số lượng các nhóm hydroxyl được thế. Xenluloza là polyme gồm có nhiều phân tử glucoza được liên kết, mỗi loại trong số này để lộ ba nhóm hydroxyl. Mức độ thay thế (DS) của dạng đã nêu của metyl xenluloza được xác định là số lượng trung bình của các nhóm hydroxyl được thế cho mỗi glucoza. Như vậy giá trị lớn nhất theo lý thuyết của DS là 3,0, tuy nhiên giá trị đặc trưng hơn là 1,3 - 2,6. Các chế phẩm metyl xenluloza khác nhau có thể cũng khác nhau về độ dài trung bình của các bộ khung polyme của chúng.

Metyl xenluloza có nhiệt độ hòa tan tiêu chuẩn thấp (LCST) nằm trong khoảng $40^{\circ}C$ và $50^{\circ}C$. Ở nhiệt độ thấp hơn LCST, nó dễ hòa tan trong nước; cao hơn LCST, nó không hòa tan, mà có hiệu quả ngược là khi gia nhiệt dung dịch bão hòa của metyl xenluloza nó sẽ quay lại thể rắn, bởi vì metyl xenluloza sẽ kết tủa. Nhiệt độ ở đó điều này xảy ra phụ thuộc vào giá trị DS, với các giá trị DS cao hơn đem lại độ hòa tan thấp và các nhiệt độ kết tủa thấp hơn vì các nhóm

hydroxyl cực được che. Bước tạo ra dung dịch methyl xenluloza với nước lạnh là khó: khi bột tiếp xúc với nước, lớp gel tạo ra quanh nó, làm chậm đột ngột sự khuếch tán nước vào bột, vì vậy phía bên trong là khô.

Carboxymethyl xenluloza (CMC) hoặc gom xenluloza là dẫn xuất xenluloza với các nhóm carboxymethyl ($-\text{CH}_2\text{-COOH}$) được liên kết với một vài trong số các nhóm hydroxyl của các monome glucopyranoza mà hình thành bộ khung xenluloza. Nó thường được sử dụng là muối natri, natri carboxymethyl xenluloza của nó.

CMC được sử dụng trong khoa học thực phẩm là chất cải biến độ nhớt hoặc chất gây lắng, và làm ổn định nhũ tương trong các sản phẩm khác nhau bao gồm kem. Nó cũng là phần cấu thành của nhiều sản phẩm không phải thực phẩm, như là các chất bôi trơn cá nhân, kem đánh răng, các thuốc nhuận tràng, các viên ăn kiêng, sơn nền nước, chất tẩy rửa, hồ dệt, và các sản phẩm giấy khác nhau. Nó được sử dụng chủ yếu vì nó có độ nhớt cao, không độc, và thường được coi là giảm dị ứng khi nguồn sợi chính là thịt gỗ mềm hoặc xơ bông. CMC được sử dụng rộng rãi trong các sản phẩm thực phẩm không có gluten và các sản phẩm thực phẩm có chất béo được khử. CMC cũng được sử dụng trong lĩnh vực được là chất làm đặc.

Natri carboxymethyl xenluloza, cũng được biết là croscarmellose natri, là natri carboxymethylxenluloza có liên kết ngang nội tại. Nó được sử dụng làm chất siêu phân rã trong các chế phẩm dược.

Công thức ví dụ trong Bảng 1 sử dụng natri carboxymethyl xenluloza BLANOSE® loại dùng trong thực phẩm với tên thương mại BLANOSE®, có bán trên thị trường bởi Ashland Chemical Co., Covington KY USA. Natri carboxymethyl xenluloza loại dùng cho thực phẩm và loại dùng cho dược có trên thị trường từ các nhà cung cấp khác, ví dụ, Sigma-Aldrich Inc. và Spectrum Chemical, Inc. Các chất gel hóa khác có thể được sử dụng ngoài hoặc thay cho natri carboxymethyl xenluloza.

Axit xitric khan

Axit xitric là hóa chất thương mại, có bán trên thị trường bởi nhiều nhà cung cấp khác nhau. Nó được sử dụng chủ yếu làm chất axit hóa, như hương liệu, và như chất tạo chelat.

Axit xitric là axit hữu cơ yếu có công thức $C_6H_8O_7$. Nó là chất bảo quản/bảo toàn tự nhiên và cũng được sử dụng để bổ sung tính axit hoặc vị chua cho các thực phẩm và các đồ uống. Trong hóa sinh, bazơ liên hợp của axit xitric, xitrat, là quan trọng làm chất chất trung gian trong chu kỳ axit xitric, mà xuất hiện trong sự trao đổi chất của tất cả các sinh vật hiếu khí. Nó bao gồm 3 nhóm carboxyl ($R-COOH$).

Ở nhiệt độ trong phòng, axit xitric là bột tinh thể màu trắng. Nó có thể tồn tại ở dạng khan (không có nước) hoặc monohydrat. Dạng khan kết tinh từ nước nóng, trong khi các dạng monohydrat là khi axit xitric được kết tinh từ nước lạnh. Monohydrat có thể được chuyển đổi sang dạng khan bằng cách gia nhiệt khoảng $78^{\circ}C$.

Axit xitric được sử dụng phổ biến làm chất tạo hương và chất bảo quản trong thực phẩm và các đồ uống, đặc biệt là đồ uống ngọt không có cồn. Các tính chất đệm của các xitrat được sử dụng để kiểm soát độ pH trong ngành dược. Tác giả sáng chế chọn axit xitric được sử dụng tuân theo các yêu cầu về độ tinh khiết đối với axit xitric làm chất phụ gia thực phẩm được xác định bởi cơ quan Food Chemicals Codex được công bố bởi dược điển Mỹ (United States Pharmacopoeia).

Không dự định giới hạn ở bất kỳ cơ chế lý thuyết nào, tác giả sáng chế tin rằng axit xitric trong chế phẩm của sáng chế có chức năng là tác nhân nhũ hóa để giữ dầu lexithin ưa chất béo không tách khỏi bromelain thấm nước. Thêm nữa, axit xitric là chất tạo chelat tuyệt vời, liên kết với các kim loại. Chẳng hạn, nó được sử dụng để loại bỏ cặn vôi khỏi các nồi hơi và các thiết bị bay hơi. Nó có thể được sử dụng để làm mềm nước, mà làm cho nó hữu ích trong các chất tẩy rửa xà phòng và giặt. Bằng cách tạo chelat các kim loại trong nước cứng, nó làm cho các chất làm sạch này tạo bọt và tác dụng tốt hơn mà không cần làm

mềm nước. Hoạt tính tạo chelat là quan trọng trong công thức của sáng chế vì ion kim loại có thể can thiệp vào hoạt tính sinh học của bromelain.

Dầu lexithin 135F EPIKURON®

Lexithin có các tính chất của nhũ tương và chất bôi trơn, và là chất hoạt động bề mặt. Lexithin thương mại, như được sử dụng bởi các nhà sản xuất thực phẩm, là hỗn hợp của các phospholipit trong dầu. Lexithin có thể thu được bằng cách loại nhựa trong nước cho dầu được chiết của các hạt. Nó là hỗn hợp của các phospholipit khác nhau, và hợp phần phụ thuộc vào nguồn gốc của lexithin. Nguồn chính của lexithin là dầu đậu tương. Các nguồn khác của lexithin (ví dụ, dầu hướng dương) có thể được sử dụng để tránh các vấn đề dị ứng đậu tương. Các phospholipit chính trong lexithin từ đậu tương và hướng dương là phosphatidyl cholin, phosphatidyl inositol, phosphatidyl etanolamin, và axit phosphatidic. Chúng thường được viết tắt lần lượt là PC, PI, PE, và PA. Các phospholipit được tinh chế được sản xuất bởi các công ty thương mại.

Để cải biến tính chất của lexithin để làm nó phù hợp với sản phẩm mà nó được bổ sung vào, nó có thể được thủy phân bằng enzym. Trong các lexithin được thủy phân, một phần của các phospholipit có một axit béo được loại bỏ bởi phospholipaza. Các phospholipit như vậy được gọi là các lysophospholipit. Phospholipaza được sử dụng thông thường nhất là phospholipaza A2, mà loại bỏ axit béo ở vị trí C2 của glyxerol. Các lexithin cũng có thể được cải biến bằng quy trình được gọi là cắt phân đoạn. Trong quy trình này, lexithin được trộn với rượu, thường là etanol. Một số phospholipit, như là phosphatidylcholin, có độ hòa tan tốt trong etanol, ngược lại hầu hết các phospholipit khác không hòa tan tốt trong etanol. Etanol được tách từ bùn đặc lexithin, sau đó etanol được loại bỏ bằng bay hơi để thu phân đoạn lexithin giàu phosphatidylcholin.

Các phần bổ sung cho chế độ ăn kiêng gồm lexithin có nguồn gốc từ đậu tương được tạo nên từ 19-21% phosphatidylcholin, 8-20% Phosphatidylethanolamin, 20-21% các Inositol phosphatit, 33-35% dầu đậu tương, 2-5% các sterol, 5% các carbohydrat/tự do, 1% ăm, và 5-11% các

phosphatit khác. Lexithin được sử dụng để dùng trong thực phẩm cho người, thức ăn động vật, dược phẩm, sơn, và các ứng dụng công nghiệp khác. Trong công nghiệp dược, lexithin đóng vai trò là chất làm ướt, làm ổn định và chất mang giàu cholin, giúp nhũ hóa và đóng nang, và là chất phân tán tốt. Lexithin được chấp thuận bởi Cơ quan quản lý thực phẩm và thuốc của Mỹ (United States Food and Drug Administration) để sử dụng cho người với tình trạng "được thừa nhận rộng rãi là an toàn." Lexithin cũng được cho phép bởi Liên minh châu Âu là chất phụ gia thực phẩm (được ký hiệu E322). Công thức ví dụ của Bảng 1 sử dụng lexithin làm chất nhũ hóa. Đối với chất nhũ hóa, lexithin đem lại một số ưu điểm. Trong thức ăn động vật, nó giàu hàm lượng chất béo và protein và cải thiện sự tạo viên. Các nghiên cứu tiến hành cho thấy lexithin có nguồn gốc từ đậu tương có các hiệu quả đáng kể đối với việc hạ cholesterol và các triglycerit huyết, trong khi tăng mức HDL ("cholesterol tốt") trong máu của các con chuột. Nó có thể được chuyển hóa hoàn toàn bởi người, như vậy được chấp nhận tốt bởi người và không độc khi được tiêu hóa. (Ngược lại, các chất nhũ hóa khác có thể chỉ được bài tiết qua thận). Tuy nhiên, các chất nhũ hóa khác có thể được sử dụng ngoài hoặc thay cho lexithin.

Axit etylenđinitrilotetraaxetic, muối dinatri dihydrat ("EDTA")

Axit etylenđiaminetetraaxetic, được viết tắt phổ biến là EDTA, là chất tạo chelat. Nó là chất rắn không màu, tan trong nước. Bazơ liên hợp là etylenđiamintetraaxetat.

Tính hữu ích của nó nảy sinh bởi vai trò là chất tạo chelat, tức là khả năng của nó cô lập các ion kim loại như là Ca^{2+} và Fe^{3+} . Hoạt tính tạo chelat là ưu điểm đối với chế phẩm của sáng chế bởi vì ion kim loại (ví dụ, ion kim loại thường có trong nước máy được sử dụng trong trang trại chăn nuôi) có thể can thiệp hoặc ức chế hoạt tính của bromelain.

Sau khi được liên kết bởi EDTA, các ion kim loại còn lại trong dung dịch chỉ thể hiện tính phản ứng giảm đi. EDTA được tạo ra là một số muối, đáng chú ý là dinatri EDTA và canxi dinatri EDTA.

Trong công nghiệp, EDTA chủ yếu được sử dụng để cô lập các ion kim loại trong dung dịch nước. Trong công nghiệp dệt, nó ngăn ngừa các tạp chất ion kim loại khỏi thay đổi màu sắc của các sản phẩm được nhuộm. EDTA ức chế khả năng các ion kim loại, đặc biệt là Mn^{2+} , không xúc tác sự mất cân bằng của hydro peroxit. Theo cách tương tự, EDTA được bổ sung vào một số thực phẩm làm chất bảo quản hoặc chất làm ổn định để phòng ngừa sự biến màu oxy hóa do xúc tác, mà được xúc tác bởi các ion kim loại. Trong các đồ uống ngọt không còn chứa axit ascorbic và natri benzoat, EDTA làm giảm sự hình thành benzen (chất gây ung thư).

EDTA được sử dụng để liên kết các ion kim loại trong thực tế là liệu pháp tạo chelat, ví dụ, để điều trị nhiễm độc thủy ngân và chì. Nó được sử dụng theo cách tương tự để loại bỏ sắt dư khỏi cơ thể. Liệu pháp này được sử dụng để điều trị biến chứng truyền máu lặp lại, như được áp dụng cho điều trị bệnh thiếu máu di truyền (thalassemia). U.S. FDA chấp thuận sử dụng EDTA đối với nhiễm độc chì vào 16/7/1953, với tên thương mại là Versenate, mà được li xăng cho công ty dược Riker. Một số bác sĩ đa khoa khác tin rằng EDTA đóng vai trò làm chất chống oxy hóa mạnh để ngăn các gốc tự do không làm tổn thương các thành mạch máu, do đó làm giảm xơ vữa động mạch. Cơ quan U.S. FDA đã không chấp nhận nó để điều trị xơ vữa động mạch.

Không dự định giới hạn bởi bất kỳ chế độ tác dụng có tính giả thuyết nào, EDTA cũng có thể dùng trong chế phẩm của sáng chế làm chất bảo quản, có thể tăng cường tác dụng bảo quản của axit xitric.

Ngoài hoặc thay cho EDTA, (các) chất tạo chelat khác có thể được sử dụng. Chẳng hạn, phối tử tạo chelat mà liên kết ion kim loại nhưng cũng có khả năng phân hủy sinh học cao hơn và hàm lượng nitơ thấp hơn so với EDTA có thể được sử dụng.

Chẳng hạn, axit iminodisuccinic (IDS) có thể được sử dụng. Được sử dụng trong thương mại từ 1998, axit iminodisuccinic (IDS) phân hủy sinh học 80% chỉ sau 7 ngày. IDS liên kết với canxi đặc biệt tốt và tạo ra các hợp chất ổn

định với các ion kim loại nặng khác. Ngoài có độc tính thấp sau khi tạo chelat so với EDTA, việc sản xuất IDS là thân thiện với môi trường. Ngoài ra, IDS bị suy biến nhờ sử dụng IDS-epimeraza và C-N lyaza được thấy trong *Agrobacterium tumefaciens* (BY6) mà có thể thu được ở quy mô lớn. Ngoài ra, các phản ứng được xúc tác bởi các enzym không cần bất kỳ thừa số hỗ trợ nào và như vậy có thể áp dụng trực tiếp.

Tương tự, axit polyaspartic có thể được sử dụng. Axit polyaspartic, có bán trên thị trường là BAYPURE™ DS 100, được sản xuất theo cách thân thiện với môi trường. Axit polyaspartic, giống như axit iminodisuccinic liên kết với canxi và các ion kim loại nặng khác. Nó có giá trị cao hơn là 7,2 meq/g so với EDTA, mà chỉ có 6,0 meq/g. Trong khi nó có khả năng theo lý thuyết cao hơn, trong các ứng dụng thực tế nó thể hiện hiệu quả thấp trong các dung dịch có nồng độ ion thấp hơn. DS có nhiều ứng dụng thực tế bao gồm các chất ức chế ăn mòn, các chất phụ gia nước thải, và các polyme nông nghiệp. Chất tẩy rửa giặt gốc DS 100 BAYPURE™ là chất tẩy rửa giặt đầu tiên trên thế giới đạt được chứng nhận EU flower ecolable.

Tương tự, axit Etylendiamin-N,N'-disuccinic (EDDS) có thể được sử dụng. Chất đồng phân cấu trúc của EDTA là axit etylendiamin-N,N'-disuccinic có thể tồn tại ba chất đồng phân: (S,S), (R,S)/(S,R) và (R,R), nhưng chỉ chất đồng phân S,S- là có thể dễ phân hủy sinh học. EDDS thể hiện sự phân hủy sinh học tỷ lệ cao đáng ngạc nhiên ở 83% trong 20 ngày. Các tỷ lệ phân hủy sinh học cũng biến đổi các ion kim loại khác nhau được tạo chelat. Chẳng hạn, các phức chất của chì và kẽm với EDDS có cùng tính ổn định nhưng phức chất chì là phân hủy sinh học hiệu quả hơn so với phức chất kẽm. Kể từ 2002, EDDS đã nổi bật về mặt thương mại ở châu Âu ở quy mô lớn với tỷ lệ nhu cầu ước tính tăng khoảng 15% mỗi năm.

Tương tự, axit Metylglyxindiacetic (MGDA) có thể được sử dụng. Có bán trên thị trường bởi BASF GmbH, axit metyglyxindiacetic (MGDA) được sản xuất từ glyxin. MGDA có tỷ lệ phân hủy sinh học cao là >68%, nhưng không

giống các chất tạo chelat khác có thể suy biến mà không có sự hỗ trợ của vi khuẩn được làm thích nghi. Ngoài ra, không giống EDDS hoặc IDS, MGDA có thể đứng vững ở các nhiệt độ cao hơn trong khi duy trì tính ổn định cao cũng như toàn bộ khoảng pH. Kết quả là, độ bền tạo chelat của MGDA là mạnh hơn so với nhiều chất tạo chelat thương mại.

Tương tự, axit L-glutamic axit N,N-diactetic, muối tetra natri (GLDA) có thể được sử dụng. Các chelat gốc aminopolycarboxylat như vậy được sử dụng để kiểm soát các ion kim loại trong các hệ gốc nước.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Tác giả sáng chế đã thử nghiệm chế phẩm trên lợn sinh trưởng trong ba loại môi trường và ba kiểu khí hậu khác nhau, ở các điều kiện chăn nuôi thương mại thực tế, đánh giá hai nhóm lợn có độ tuổi khác nhau – lợn đang bú sữa (chưa cai sữa) và lợn cai sữa.

- Thử nghiệm 1 (Tây ban Nha) – Chế phẩm của sáng chế làm giảm tỷ lệ mắc bệnh, mức độ nghiêm trọng và khoảng thời gian bị bệnh đi ngoài phân lỏng sau cai sữa ở lợn con. Chế phẩm của sáng chế cũng làm giảm nhu cầu đối với các chất kháng sinh và các tỷ lệ chuyển đổi thức ăn được cải thiện (FCR).
- Thử nghiệm 2 (Pháp) – Chế phẩm của sáng chế đã cải thiện mức tăng trọng hàng ngày trung bình, và các tỷ lệ chuyển đổi thức ăn được cải thiện khi được so sánh với các chất kháng sinh trong thức ăn.
- Thử nghiệm 3 (Philippin) - Chế phẩm của sáng chế làm giảm số lượng lợn con chết ở lợn con đang bú sữa so với các chất kháng sinh.
- Thử nghiệm 4 (Úc) - Chế phẩm của sáng chế làm giảm lượng lợn con chết ở lợn con đang bú sữa được so sánh với các chất kháng sinh.

Ví dụ 1 - Tây Ban Nha (lợn con vừa cai sữa).

Mục đích: Đối tượng của nghiên cứu này là để so sánh liều lượng dùng qua đường miệng đơn của chế phẩm của sáng chế (4mL) ở giai đoạn cai sữa có

thể làm giảm bệnh đi ngoài phân lỏng ở trang trại nuôi lợn thương mại có lịch sử nhiễm E. coli.

Đề cương nghiên cứu: Nghiên cứu này là thử nghiệm thực địa ngẫu nhiên, mù so sánh hai nhóm lợn con song song. Tác giả sáng chế đã sử dụng hai Nhóm kiểm nghiệm ($n = 72$ mỗi nhóm): 1. Chế phẩm của sáng chế, và 2. Không điều trị. Vào ngày cai sữa (ngày 0), lợn con trong mỗi lứa được gán ngẫu nhiên vào hai nhóm điều trị khác nhau, được cân và sau đó được gán số nhận dạng (ID) đơn nhất. Liều lượng đơn của chế phẩm của sáng chế sau đó được cho dùng cho một nhóm lợn con mà sau đó được chuyển sang các chuồng cai sữa. Nhóm lợn con còn lại được để chưa điều trị, nhưng được kiểm soát theo cách tương tự.

Các thông số lâm sàng: Lợn con được giám sát hàng ngày về bệnh đi ngoài phân lỏng và các dấu hiệu của bất kỳ bệnh nào khác. Một khi lợn con thể hiện các dấu hiệu của bệnh đi ngoài phân lỏng, các số ID, độ đặc của phân và tình trạng chung của lợn con được ghi nhận sử dụng hệ thống tính điểm (Bảng 2).

Bảng 2. Tính điểm độ đặc của phân và lợn con tình trạng chung.

Độ đặc của phân	Tình trạng chung
0: bình thường	0: bình thường
1: nhão hoặc được tạo thành một phần (trung bình)	1: suy nhược nhẹ
2: lỏng, bán lỏng (vừa phải)	2: suy nhược nghiêm trọng.
3: nhiều và loãng (nghiêm trọng)	

Sự phân loại của các con lợn này về mức độ khỏe, không khỏe hoặc sắp chết được dựa trên tổng số điểm lâm sàng (Bảng 3). Điểm lâm sàng là tổng điểm độ đặc của phân cộng điểm tình trạng chung đối với mỗi con lợn. Điểm này đưa ra chỉ báo tổng thể về sức khỏe của lợn con. Một số lợn con có thể mắc bệnh đi ngoài phân lỏng, nhưng vẫn khỏe, ngược lại lợn con khác có thể mắc bệnh đi

ngoài phân lỏng nhẹ, nhưng sắp chết. Chế phẩm của sáng chế làm giảm đáng kể điểm lâm sàng của lợn con, và do đó đã cải thiện sức khỏe tổng thể của chúng được so sánh với các con lợn chưa được điều trị.

Bảng 3. Phân loại lợn con bằng điểm lâm sàng tổng thể.

Tổng điểm lâm sàng	Phân loại
0	Khỏe
1	Khỏe
2	Không khỏe
3	Sắp chết và cần điều trị riêng.
4+	Sắp chết và cần loại bỏ và/hoặc chết nhân đạo

Các điều trị bằng chất kháng sinh: Tất cả điều trị chất kháng sinh được cho dùng trong nghiên cứu được ghi nhận (ID lợn, ngày, sản phẩm, liều lượng và đường cho dùng).

Trọng lượng lợn con: Lợn con được cân riêng vào ngày 0 (khi cai sữa), ngày 7 và ngày 14. Mức tăng trọng hằng ngày trung bình (ADG) được tính toán.

Hấp thụ thức ăn: Hấp thụ thức ăn mỗi chuồng cũng được đánh giá để xác định tỷ lệ chuyển đổi thức ăn (FCR). FCR bằng sự hấp thụ thức ăn chia cho cân nặng của lợn.

Phân tích dữ liệu: Để đánh giá tỷ lệ mắc bệnh của bệnh đi ngoài phân lỏng, điểm lâm sàng hoặc tình hình mắc bệnh (tình trạng chung + độ đặc của phân), tỷ lệ điều trị và tỷ lệ tử vong, các tường trình thống kê được sử dụng là Linear Mixed Model với các sai số poisson và nhị thức. Room/Sex là như các hiệu quả ngẫu nhiên và Treatment là hiệu quả cố định. Các phân tích được thực hiện bằng GenStat cho Windows. (2007). 10th Edn. VSN International Ltd., Hemel Hempstead, UK. Đối với trọng lượng cơ thể và mức tăng trọng hằng ngày trung bình các tường trình thống kê được sử dụng là Linear Mixed Models với các sai số thông thường. Sai số Loại 1 là $\leq 0,05$.

Các kết quả:

Các thông số lâm sàng:

- Liều lượng đơn của chế phẩm của sáng chế được cho dùng khi cai sữa làm giảm đáng kể tỷ lệ mắc bệnh đi ngoài phân lỏng (từ ngày 0 đến ngày 19 sau cai sữa) là 40% khi được so sánh với lợn chưa được điều trị (Fig.3) ($p<0,05$). Liều lượng đơn này bảo vệ lợn con trong 19 ngày, chỉ ra khoảng thời gian có hiệu lực dài. Nguyên nhân của bệnh đi ngoài phân lỏng ở trang trại này là E. coli.
- Trong suốt thời gian nghiên cứu, tổng điểm bệnh tiêu chảy (tổng số tất cả các điểm bệnh tiêu chảy) trong nhóm lợn con được điều trị bằng chế phẩm của sáng chế là 98, so với 253 trong nhóm chưa được điều trị.
- Chế phẩm của sáng chế cải thiện đáng kể sức khỏe tổng thể ở lợn con hoặc chúng có điểm lâm sàng giảm, do đó ít bị bệnh nghiêm trọng, khi so với lợn con chưa được điều trị (Fig.4) ($p<0,05$).
- Chế phẩm của sáng chế làm giảm đáng kể số lượng lợn bị ốm là 58% ($n = 16$) khi được so sánh với các con lợn chưa được điều trị ($n = 38$) ($p<0,05$).
- Chế phẩm của sáng chế làm giảm nhu cầu về số lượng điều trị kháng sinh là 55% (15 điều trị) so với các đối chứng (33 điều trị).
- Có số lượng tử vong tương đương (tất cả các nguyên nhân) trong nhóm được điều trị bằng chế phẩm của sáng chế (4) và trong nhóm chưa được điều trị (3).

Đặc tính của lợn:

- Mức tăng trọng hằng ngày trung bình ở lợn con được điều trị bằng chế phẩm của sáng chế trong hai tuần sau cai sữa là 22% cao hơn ở lợn con chưa được điều trị (lần lượt là $50 \pm 7,1g$ so với $39 \pm 7,0g$). Vào 42 ngày sau cai sữa,

lợn con được điều trị bằng chế phẩm của sáng chế nặng hơn 0,2 kg (1,6%) so với lợn con đối chứng, nhưng sự gia tăng này là không đáng kể.

- Trong 2 tuần đầu tiên sau cai sữa, lợn con được điều trị bằng chế phẩm của sáng chế có tỷ lệ chuyển đổi thức ăn tốt hơn đáng kể là 8,4% so với lợn chưa được điều trị (lần lượt là $2,84 \pm 1,22$ so với $3,1 \pm 1,20$). Toàn bộ (ngày 0 đến 42) chế phẩm của sáng chế có sự cải thiện 2,7% về các tỷ lệ chuyển đổi thức ăn ($1,46 \pm 0,06$ so với $1,50 \pm 0,06$).

Mặc dù FCR của chế phẩm của sáng chế được cải thiện toàn bộ được so sánh với nhóm chưa được điều trị là vừa phải (0,04 hoặc 2,7%), cần lưu ý rằng mỗi sự cải thiện 0,01 về FCR sẽ làm giảm chi phí thức ăn là \$0,28 đến \$0,30 trên mỗi con lợn (dựa trên các số liệu 2008 – chi phí về thức ăn đã tăng lên đáng kể, do đó các lợi nhuận ở thời điểm hiện tại sẽ cao hơn). Cũng đã tính toán được rằng sự cải thiện 0,1% về FCR lớn hơn có thể cải thiện khả năng lợi nhuận của 200 đơn vị lợn mẹ là xấp xỉ \$6,000 mỗi năm. Sự cải thiện 5% về FCR có giá trị tiềm năng là \$28 triệu đối với công nghiệp thịt lợn của Úc (<http://www.australianpork.com.au>).

Sự cải thiện đặc tính về FCR là quan trọng, khi chi phí thức ăn là chi phí chính đối với sản xuất thịt lợn, thông thường chiếm trên 60 đến 80 phần trăm tổng giá thành sản xuất. Mọi sự cải thiện về FCR sẽ làm giảm các phí thức ăn và cải thiện khả năng thu lợi nhuận.

Kết luận:

Liều lượng đơn của chế phẩm của sáng chế được cho dùng khi cai sữa làm giảm tỷ lệ mắc bệnh, thời gian và mức độ nghiêm trọng của bệnh đi ngoài phân lỏng. Chế phẩm của sáng chế cũng làm giảm nhu cầu đối với các điều trị bằng chất kháng sinh, và cải thiện sự sinh trưởng ở lợn con. Do đó, chế phẩm của sáng chế cải thiện sức khỏe của lợn con và đặc tính, và do đó là năng suất trang trại.

Ví dụ 2 - Pháp (lợn con cai sữa).

Cơ sở: Các chất kháng sinh là chất phụ gia thức ăn để thúc đẩy sự sinh trưởng hiện bị cấm ở châu Âu, tuy nhiên, sự bổ sung các chất kháng sinh được kê đơn để chăn nuôi dưới sự giám sát thú y được cho phép để phòng ngừa và điều trị các tình trạng cấp tính, như là bệnh đi ngoài phân lỏng.

Mục đích: Đối tượng của nghiên cứu này là để so sánh các tỷ lệ chuyển đổi thức ăn của lợn con được cho dùng liều lượng đơn chế phẩm của sáng chế với colistin trong thức ăn, là chất kháng sinh.

Đề cương nghiên cứu: Nghiên cứu này là thử nghiệm thực địa ngẫu nhiên, kiểm soát, mù so sánh ba nhóm lợn con song song, (n=89 mỗi nhóm): 1. Colistin; 2. Chế phẩm của sáng chế; và 3. Không điều trị. Trong nghiên cứu này, toàn bộ các lứa được chọn ngẫu nhiên để nhận các điều trị khác nhau, như vậy các lứa được điều trị toàn bộ.

Việc cai sữa ở trang trại này thực hiện ở 2 giai đoạn. Trong giai đoạn 1, lợn con được cai sữa bằng cách chuyển lợn mẹ đi (vào ngày -5). Sau đó vào ngày 0, lợn con được chuyển sang chuồng cai sữa của chúng.

Ở ngày -5, lợn con Nhóm 1 được cho dùng colistin (9kg chất kháng sinh trộn trước trên mỗi tấn thức ăn) trong thức ăn tập ăn và sau cai sữa trong 14 ngày (ngày -5 đến ngày 9). Hai nhóm khác được cho dùng một mình thức ăn tập ăn và sau cai sữa. Vào ngày 0 (5 ngày sau cai sữa), khi lợn con được chuyển tới các chuồng nuôi lợn con cai sữa, lợn con Nhóm 2 nhận liều lượng đơn chế phẩm của sáng chế. Lợn con Nhóm 3 chưa được điều trị.

Phân tích: Đối với Nghiên cứu 1.

Các kết quả:

Đặc tính của lợn

- Lợn con được điều trị bằng chế phẩm của sáng chế có mức tăng trọng hằng ngày trung bình cao hơn đáng kể trong tất cả các thời kỳ của nghiên cứu được so sánh với lợn con nhận colistin ($P < 0,05$, Bảng 4). Lợn con được điều trị bằng colistin trong thức ăn của chúng có mức tăng trọng thấp nhất trong tất

cả các nhóm, bao gồm kém mức tăng trọng so với các con lợn chưa được điều trị ($P<0,05$).

Bảng 4 - Mức tăng trọng hằng ngày trung bình (g) của tất cả các nhóm.

	Chế phẩm của sáng chế	Colistin	Chưa được điều trị
Tập ăn và sau cai sữa (d-5 đến d9)	252 ± 74	167 ± 67	236 ± 63
Tập ăn	537 ± 105	505 ± 110	542 ± 110
Sau cai sữa	429 ± 81	377 ± 82	426 ± 75
Sau cai sữa và vỗ béo (toàn bộ)	692 ± 65	664 ± 67	678 ± 56

- Toàn bộ (trong 150 ngày tuổi) tổng mức tăng trọng trung bình của lợn con được cho dùng chế phẩm của sáng chế là 2% (hoặc 1,71kg) cao hơn so với lợn đối chứng, và 3,9% (hoặc 3,25 kg) cao hơn so với lợn con được cho dùng colistin trong thức ăn ($P<0,05$).

- Sự hấp thụ thức ăn được xác định chỉ đối với thời kỳ tập ăn và sau cai sữa (d-5 đến d9). Lợn con được điều trị bằng chế phẩm của sáng chế có sự hấp thụ thức ăn cao hơn trong giai đoạn cai sữa được so sánh với lợn con nhận colistin trong thức ăn (Bảng 5).

Bảng 5. Hấp thụ thức ăn (g) trong thời kỳ tập ăn và sau cai sữa

	Chế phẩm của sáng chế	Colistin	Đối chứng
Số chuồng	6	6	6
Nhỏ nhất – Lớn nhất	408 – 499	358 – 479	420 – 529
Trung bình số học	450	417	460

• Tỷ lệ chuyển đổi thức ăn (FCR) được xác định chỉ cho thời kỳ tập ăn và sau cai sữa (d-5 đến d9). Lợn con được điều trị bằng một mình chế phẩm của sáng chế có FCR tốt nhất (1,82) ($P < 0,009$) so với tất cả các nhóm khác (Bảng 5). Lợn con được điều trị bằng chế phẩm của sáng chế có sự cải thiện 33% so với lợn con được điều trị bằng colistin (2,71). Mặc dù lợn con được điều trị bằng chế phẩm của sáng chế có sự hấp thụ thức ăn thấp hơn so với lợn chưa được điều trị (Bảng 5), chúng vẫn có sự cải thiện 7% về FCR so với lợn chưa được điều trị (1,96) (Bảng 6). Các kết quả đặc tính cho thấy rằng chế phẩm của sáng chế có ưu điểm đáng kể so với colistin trong thức ăn.

Bảng 6. Tỷ lệ chuyển đổi thức ăn trong thời kỳ tập ăn và sau cai sữa mỗi nhóm

	Chế phẩm của sáng chế	Colistin	Đối chứng
Số lượng chuồng	6	6	6
Giá trị giữa	1,77	2,59	2,01
Nhỏ nhất – Lớn nhất	1,59 – 2,10	1,75 – 3,42	1,63 – 2,11
Trung bình số học	1,82	2,71	1,96

Hiệu quả tiêu cực của colistin đối với FCR có thể vì tác dụng bất lợi của nó đến hệ đường ruột, và do đó ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe đường ruột và dinh dưỡng của lợn.

Kết luận: Chế phẩm của sáng chế cải thiện mức tăng trọng của lợn con và cải thiện các tỷ lệ chuyển đổi thức ăn.

Ví dụ 3 - Philippin (lợn con chưa cai sữa hoặc lợn con đang bú sữa).

Cơ sở: Trang trại này ở Philippin có tỷ lệ tử vong cao do bệnh đi ngoài phân lỏng.

Mục đích: Đối tượng của nghiên cứu này là để so sánh hiệu quả của chế phẩm của sáng chế với các chất kháng sinh ở lợn con chưa cai sữa.

Đề cương nghiên cứu: Nghiên cứu này là thử nghiệm thực địa ngẫu nhiên so sánh hai nhóm lợn con. Vì tỷ lệ tử vong ở trang trại này là rất cao, không có đối chứng âm (nhóm không được điều trị). Các Nhóm kiểm nghiệm ($n = 38$ mỗi nhóm) là 1. Chế phẩm của sáng chế (2 liều lượng), và 2. Các chất kháng sinh (được cho dùng qua đường miệng mỗi 3 ngày). Lợn con nhận chế phẩm của sáng chế ở 3 ngày tuổi. Liều lượng tiếp theo được đưa ra ở 6 ngày tuổi.

Các kết quả:

Các thông số lâm sàng

- Có ít con chết do bệnh đi ngoài phân lỏng trong nghiên cứu này. Nhưng có số lượng chết thấp hơn đáng kể là 5% (bởi tất cả các nguyên nhân) trong nhóm được điều trị bằng chế phẩm của sáng chế. Tỷ lệ chết là 21% ở lợn con nhận các chất kháng sinh ($P < 0,05$).

Các thông số đặc tính

- Khi cai sữa, lợn con nhận chế phẩm của sáng chế nặng hơn 0,1kg so với lợn con được điều trị bằng các chất kháng sinh. Vì không có các đối chứng âm trong nghiên cứu này, không biết chế phẩm của sáng chế có làm mức tăng trọng lượng so với các con lợn chưa được điều trị, như được quan sát trong các thử nghiệm thực địa khác.

Ví dụ 4 - Úc (lợn con chưa cai sữa hoặc lợn con đang bú sữa).

Mục đích: Đối tượng của nghiên cứu này là để nghiên cứu kỹ hiệu lực của chế phẩm của sáng chế (2mL) khi làm giảm tỷ lệ tử vong và tình hình mắc bệnh ở trang trại Úc có lịch sử mắc bệnh đi ngoài phân lỏng trước cai sữa (đang bú sữa).

Đề cương nghiên cứu: Nghiên cứu được tiến hành ở trang trại nuôi lợn thương mại nằm ở Northern Victoria, Úc. Trang trại này có lịch sử là gặp các vấn đề với bệnh đi ngoài phân lỏng trước cai sữa thường xảy ra vào 3-4 ngày sau khi sinh. Các mẫu phân thu được từ trang trại vào tháng trước nghiên cứu chỉ ra rằng bệnh đi ngoài phân lỏng là do truyền nhiễm kết hợp *E. coli* (K99, các gen

độc tố STa) và Rotavirus. Các cách tiếp cận hiện tại như là các vacxin cũng như các chất kháng sinh đã không kiểm soát được thỏa đáng vấn đề này.

Nghiên cứu này là thử nghiệm thực địa mù, đối chứng placebo, ngẫu nhiên so sánh hai nhóm lợn con song song. Chủ trang trại và các công nhân trong trang trại không được thấy các điều trị này.

Có 21 lứa (233 lợn con) được cho dùng chế phẩm của sáng chế (2mL) ở 2 ngày tuổi (Nhóm 1), trong khi 23 lứa (229 lợn con) nhận placebo (Nhóm 2).

Mỗi nhóm gồm các lứa lợn cái tương đương (hoặc lợn đẻ lần đầu).

Các biện pháp quản lý thông thường của trang trại là cho tiếp tục, bao gồm các điều trị thông thường như là chủng ngừa lợn mẹ, các chất kháng sinh, và các coccidiostat, cũng như nuôi chèo lợn con, mà các con lợn con nhỏ hoặc các con lợn con có sức khỏe kém được chuyển sang lợn mẹ khác.

Thử nghiệm này được tiến hành bởi các bác sĩ thú ý và các chuyên gia nghiên cứu độc lập từ cơ quan Pig Specialist Centre, Victorian Department of Economic Development, Jobs, Transport and Resources. Phân tích thống kê thích hợp được xác định và áp dụng bởi chuyên gia sinh trắc học độc lập.

Thử nghiệm nghiên cứu kỹ tỷ lệ mắc bệnh chết và bệnh đi ngoài phân lỏng, tình hình mắc bệnh (hoặc tình trạng lâm sàng của lợn con), cũng như mức tăng trọng, và mức tăng trọng hàng ngày trung bình (ADG) từ 2 đến 21 ngày tuổi. Lợn con được giám sát hàng ngày về bệnh đi ngoài phân lỏng và các dấu hiệu của bất kỳ bệnh nào khác. Khi lợn con bộc lộ các dấu hiệu về bệnh đi ngoài phân lỏng, các số ID của chúng, độ đặc của phân và tình trạng chung của lợn con được ghi nhận sử dụng hệ thống tính điểm được mô tả trong Bảng 2.

Bất kỳ lợn con nào được thấy bị suy nhược nghiêm trọng được cho chết nhân đạo. Lợn con được cho chết nhân đạo hoặc được phát hiện chết trong thử nghiệm được mổ khám nghiệm trong 12 giờ từ khi chết.

Phân tích dữ liệu:

Có 21- 23 sự lặp lại của hai điều trị được bố trí ngẫu nhiên trong một dãy trại.

Lựa chọn con trong chuồng là đơn vị thực nghiệm.

Phân tích thống kê thích hợp được xác định và được áp dụng bởi chuyên gia sinh trắc học độc lập.

Các điểm bệnh đi ngoài phân lỏng lớn nhất trung bình và các điểm tình hình mắc bệnh trên mỗi chuồng được phân tích theo cách Phân tích về biến (Analysis of Variance- ANOVA) sau $\log_e + 0,05$ được biến nạp để làm ổn định các biến. ADG đối với tất cả lợn con là không thích hợp đối với ANOVA vì các số dư được phân bổ bình thường hoặc đồng đều trên khoảng các giá trị được sắp xếp; do đó kiểm nghiệm Kruskal-Wallis không tham số (không phân bổ) được sử dụng.

Tỷ lệ chết và tỷ lệ mắc bệnh của bệnh đi ngoài phân lỏng và tình hình mắc bệnh được phân tích sử dụng Exact Binary Regression (Hồi quy nhị phân chính xác), thích hợp cho các cỡ tế bào nhỏ. Các kiểm nghiệm hai bên về ý nghĩa được sử dụng.

Các ANOVA và Kruskal Wallis Test được tiến hành sử dụng phiên bản R 2.7.2 (2008). R Foundation for Statistical Computing. Exact Binary Regression được tiến hành với StatExact (Cytel Statistical Software, Cytel Software Corporation, MA, USA).

Các kết quả:

Các thông số lâm sàng

Nghiên cứu được thiết kế là nghiên cứu phòng ngừa, mà chế phẩm của sáng chế được cho dùng cho lợn con trước sự tấn công của bệnh đi ngoài phân lỏng được dự tính. Tuy nhiên, trước khi cho dùng sản phẩm, bệnh đi ngoài phân lỏng là rõ ràng ở 59 trong số 462 lợn con (12,8%). Mặc dù sớm hơn so với sự tấn công của bệnh đi ngoài phân lỏng được dự tính, tất cả lợn con đã được gộp trong nghiên cứu, và không có các loại trừ.

Bảng 7 thể hiện số lượng các tỷ lệ tử vong trước cai sữa ở cả hai nhóm do tất cả các nguyên nhân. Chế phẩm của sáng chế làm giảm đáng kể tỷ lệ tử vong lợn con là 47,8% ($p < 0,02$). Trong số lợn con được điều trị bằng chế phẩm của sáng chế, 19 trong số 233 (8,2%) lợn con bị chết so với 36 trong số 229 (15,7%) lợn con bị chết trong nhóm đối chứng.

Bảng 7 – Tỷ lệ tử vong trước cai sữa (tất cả các nguyên nhân)

Điều trị	Số lợn mỗi nhóm	Số lợn	tỷ lệ tử vong%
Chế phẩm của sáng chế	233	19	8,2%
Chưa được điều trị	229	36	15,7%
% giảm			47,8%

Nguyên nhân chết cơ bản lợn con trong nghiên cứu này (81,8%) được chuẩn đoán là bệnh đi ngoài phân lỏng và còi cọc do ốm dựa trên các phát hiện sau khi chết.

Căn nguyên

Các mẫu được thu gom từ 24 lợn con nhỏ hơn 7 ngày tuổi. Không có mầm bệnh nổi trội được nhận dạng trong nghiên cứu này. Hai mươi ba mẫu phân được đưa đi cấy (hiếu khí và kỵ khí) để phân lập các nguyên nhân về vi khuẩn có thể có của bệnh tiêu chảy (*E. coli* và *Clostridia*). Một con lợn con được điều trị bằng chế phẩm của sáng chế được thử nghiệm dương tính về *E. coli* không tan huyết (STa dương tính), và hai phân lập *E. coli* tan huyết (K88) thu được từ hai lợn con từ Nhóm đối chứng. Một trong số các lợn con đối chứng này có sự đồng truyền nhiễm với *E. coli* không tan huyết (K88). Không có *Clostridia spp.* được phân lập. Chín trong số 21 (42,8%) mẫu phân được thử nghiệm là dương tính hoặc dương tính yếu bởi Rotavirus ELISA (IDEXX Rota-Corona-K99, IDEXX Montpellier SAS, France). Tuy nhiên, không mẫu nào trong số 7

mẫu là dương tính đối với rotavirus RTPCR, cũng không có các tổn thương trong ruột chỉ báo các truyền nhiễm rotavirus.

Ở tỷ lệ cao 26/53 (49%) của lợn con được mổ khám nghiệm có dạ dày rỗng đề xuất rằng bệnh tiêu chảy/còi cọc do ốm xuất hiện trong trang trại này có thể được quy cho sự hấp thụ sữa non và sữa không đầy đủ ở lợn con, dẫn đến sự hấp thụ dinh dưỡng kém tối ưu ở lợn con và sự bảo vệ tiết sữa kém.

Tình hình mắc bệnh

Chế phẩm của sáng chế cũng làm giảm tình hình mắc bệnh nghiêm trọng, hoặc bệnh đe dọa tuổi thọ (Điểm 4). Trong số lợn con mà có bệnh đe dọa tuổi thọ, hoặc được coi là sắp chết, 36 trong số 38 lợn con đối chứng bị chết, so với 19 trong số 28 lợn con sắp chết trong nhóm được điều trị bằng chế phẩm của sáng chế.

Các thông số đặc tính

Bảng 8 thể hiện giá trị trung bình và khoảng mức tăng trọng (từ ngày điều trị, Ngày 2 đến Ngày 21) và mức tăng trọng hằng ngày trung bình (ADG) đối với cả hai nhóm.

Bảng 8 – Mức tăng trọng và ADG từ Ngày 2 đến khi cai sữa ở 21 ngày.

Điều trị	Số chuồng	Cỡ lứa (cai sữa)	Mức tăng trọng trung bình (g) (nhỏ nhất – lớn nhất)	ADG trung bình (g/ngày) (nhỏ nhất – lớn nhất)
Chế phẩm của sáng chế	21	10,19	4.188 (2.512 đến 5.279)	199 (120 đến 251)
Đối chứng	23	8,48	3.964 (939 đến 5.205)	189 (45 đến 248)
% tăng			5,7%	5,6%

Chế phẩm của sáng chế làm tăng mức tăng trọng và mức tăng trọng hằng ngày trung bình là 5,7% (hoặc 224g trên mỗi lợn con) và 5,6%. Nhưng những gia tăng

này không có ý nghĩa về thống kê ($p=0,49$) ở mức lứa (nhưng là có ý nghĩa ở mức lợn con cá thể, $p<0,04$).

Đánh giá và kết luận:

Các kết quả của nghiên cứu này đề xuất rằng chế phẩm của sáng chế có thể được sử dụng làm giảm tỷ lệ tử vong trước cai sữa ở các trang trại mà gặp vấn đề với bệnh tiêu chảy/còi cọc do ốm có căn nguyên không cụ thể.

Còi cọc do ốm và ngừng tăng trưởng là nguyên nhân chết chính trong lợn con ở tuần thứ nhất của vòng đời. Lợn con mà không ăn sữa non trong 24 giờ đầu sau khi sinh gặp rủi ro chết sớm là kết quả của việc cắn bởi lợn mẹ hoặc phơi nhiễm do hấp thụ năng lượng không đầy đủ. Không giống như trẻ em, không có các kháng thể được truyền sang lợn con qua nhau thai từ lợn mẹ. Không có các kháng thể như mẹ, lợn con miễn cảm cao với truyền nhiễm. Nếu chúng sống qua được vài ngày đầu, nhưng tiếp tục hấp thụ sữa không đầy đủ, lợn con có khả năng không chịu nổi sự nhiễm bệnh bởi sự miễn dịch do tiết sữa thấp (từ các kháng thể sữa và các yếu tố miễn dịch trong sữa của lợn mẹ) so với các con cùng lứa khỏe mạnh hơn. Các con lợn này không duy trì sự hấp thụ sữa đầy đủ, do sự sản sinh sữa kém bởi lợn mẹ hoặc sự tiêu thụ kém bởi lợn con có khả năng không chịu nổi sự tử vong sớm do không có khả năng cạnh tranh với các con cùng lứa hoặc nhiễm bệnh về sau trong vòng đời.

Trong nghiên cứu này, chế phẩm của sáng chế giảm một nửa tỷ lệ tử vong trước cai sữa trong số lợn con đang bú sữa ở trang trại thương mại. Rõ ràng là chế độ tác dụng của nó là nhờ cải thiện thể chất và do đó khả năng sống sót của lợn con sắp chết trong tuần thứ nhất của vòng đời. Điều này được chứng minh bởi tỷ lệ thấp (45,2%) của lợn con được điều trị bằng chế phẩm của sáng chế được phân loại là sắp chết về mặt lâm sàng mà chết hoặc phải chịu để cho chết nhân đạo, so với 76,6% trong Nhóm đối chứng theo cùng loại lâm sàng.

Lợn con được điều trị bằng chế phẩm của sáng chế lớn nhanh hơn 5,7% so với lợn con trong nhóm đối chứng. Mặc dù sự chênh lệch mức tăng trọng này là không đáng kể, nhưng điều này tương đương với xấp xỉ chênh lệch 225g

trọng lượng hơi khi cai sữa. Trọng lượng khi cai sữa có liên quan tích cực đến sự sinh trưởng tiếp theo và sự sống của lợn con.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm thú y dùng qua đường miệng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh đi ngoài phân lỏng ở lợn con cai sữa hoặc chưa cai sữa chứa bromelain, carboxymetyl xenluloza, lexithin và EDTA, trong đó chế phẩm này là bột không chảy chứa 53,1 đến 74,7% trọng lượng bromelain hoặc huyền phù của bột này trong chất lỏng thích hợp.
2. Chế phẩm thú y dùng qua đường miệng theo điểm 1, trong đó chế phẩm này không có polyme tan trong ruột.
3. Chế phẩm thú y dùng qua đường miệng theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa axit xitric.
4. Chế phẩm thú y dùng qua đường miệng để làm giảm khả năng mắc bệnh đi ngoài phân lỏng ở lợn con mà được dùng cho lợn con trong một liều lượng đơn với lượng hữu hiệu để điều trị, chứa bromelain, carboxymetyl xenluloza, lexithin và EDTA, trong đó chế phẩm này là bột không chảy chứa 53,1 đến 74,7% trọng lượng bromelain hoặc huyền phù của bột này trong chất lỏng thích hợp.
5. Chế phẩm thú y dùng qua đường miệng để làm giảm khả năng mắc bệnh đi ngoài phân lỏng trước cai sữa ở lợn con mà được dùng trước khi cai sữa cho lợn con, chứa bromelain, carboxymetyl xenluloza, lexithin và EDTA, trong đó chế phẩm này là bột không chảy chứa 53,1 đến 74,7% trọng lượng bromelain hoặc huyền phù của bột này trong chất lỏng thích hợp, trong đó lượng chế phẩm được sử dụng cung cấp liều lượng đơn từ 40 đến 60 mg/kg bromelain.
6. Chế phẩm thú y dùng qua đường miệng để làm giảm khả năng mắc bệnh đi ngoài phân lỏng sau cai sữa ở lợn con mà được dùng khi cai sữa cho lợn con, chứa bromelain, carboxymetyl xenluloza, lexithin và EDTA, trong đó chế phẩm này là bột không chảy chứa 53,1 đến 74,7% trọng lượng bromelain hoặc huyền phù của bột này trong chất lỏng thích hợp, trong đó lượng chế phẩm được sử dụng cung cấp liều lượng đơn từ 20 đến 30 mg/kg bromelain.
7. Chế phẩm thú y dùng qua đường miệng để làm giảm lượng lợn con chết trong quần thể lợn con mà được dùng cho mỗi con lợn con trong quần thể lợn con

trong một liều lượng đơn với lượng hữu hiệu để điều trị, chứa bromelain, carboxymetyl xenluloza, lexithin và EDTA, trong đó chế phẩm này là bột không chảy chứa 53,1 đến 74,7% trọng lượng bromelain hoặc huyền phù của bột này trong chất lỏng thích hợp.

8. Chế phẩm thú y dùng qua đường miệng theo điểm 1, trong đó chất lỏng thích hợp là nước.

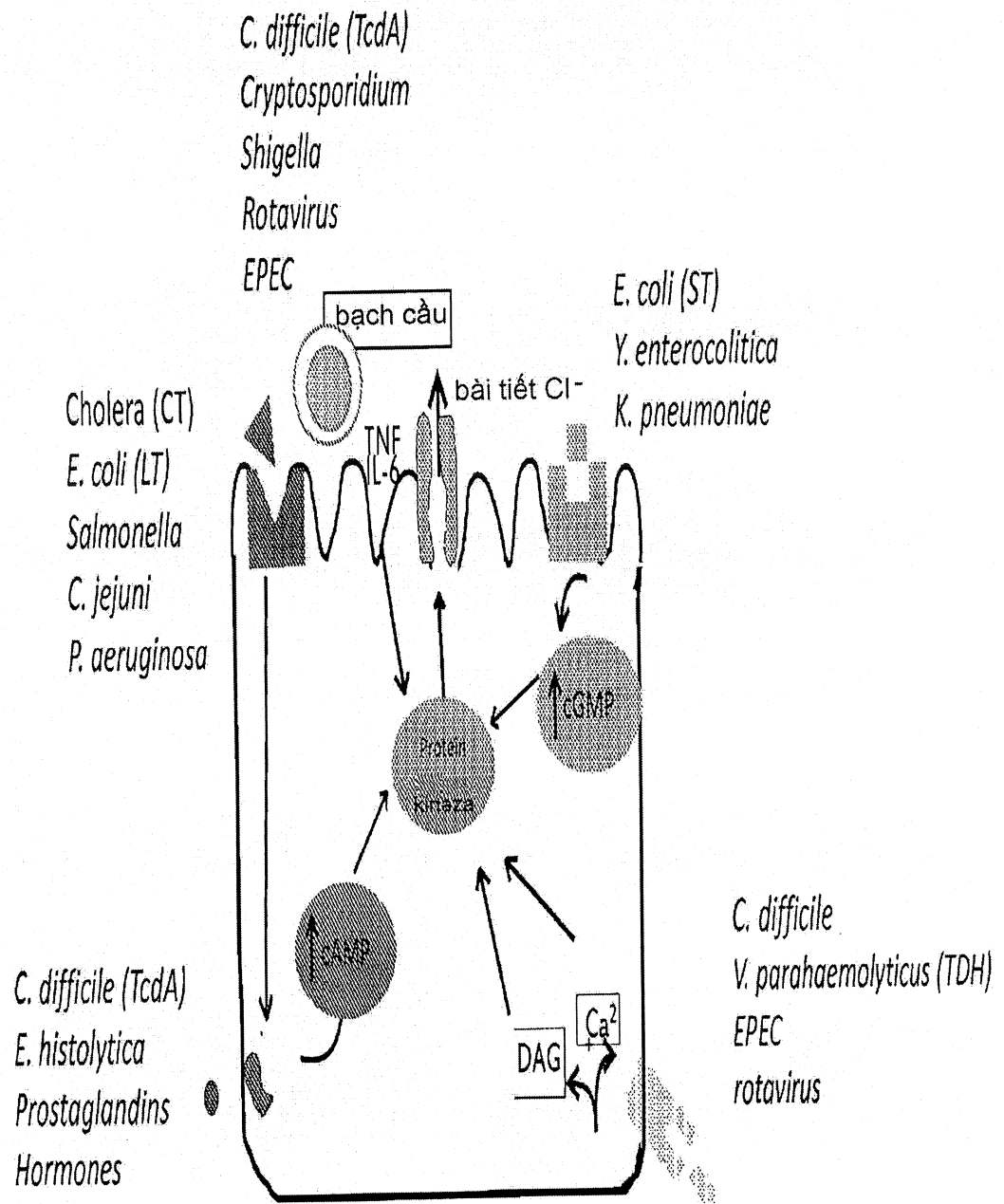


Fig.1 - Có nhiều nguyên nhân gây bệnh tiêu chảy khác nhau tác động bởi việc hoạt một hoặc nhiều đường bài tiết tế bào.

Viswanathan et al., *Nature Review Microbiol*, 2009; Hodges & Gill. *Gut Microbes*. 2010.

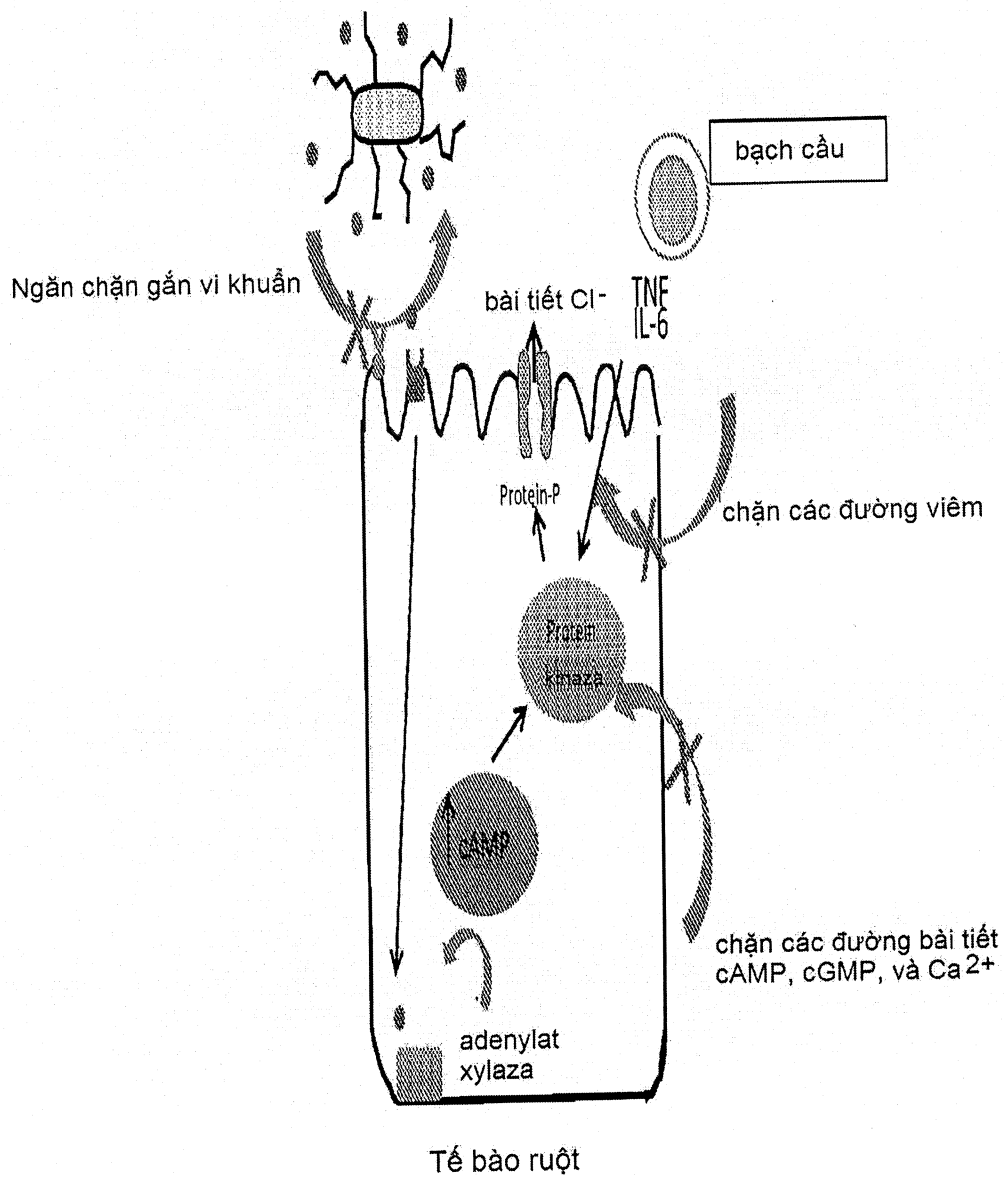


Fig.2- Cơ chế tác dụng của chế phẩm của sáng chế. Cơ chế tác dụng ba phần - tạo ra sự bảo vệ phổ rộng chống lại các vi khuẩn, các sinh vật ký sinh, các virus và viêm

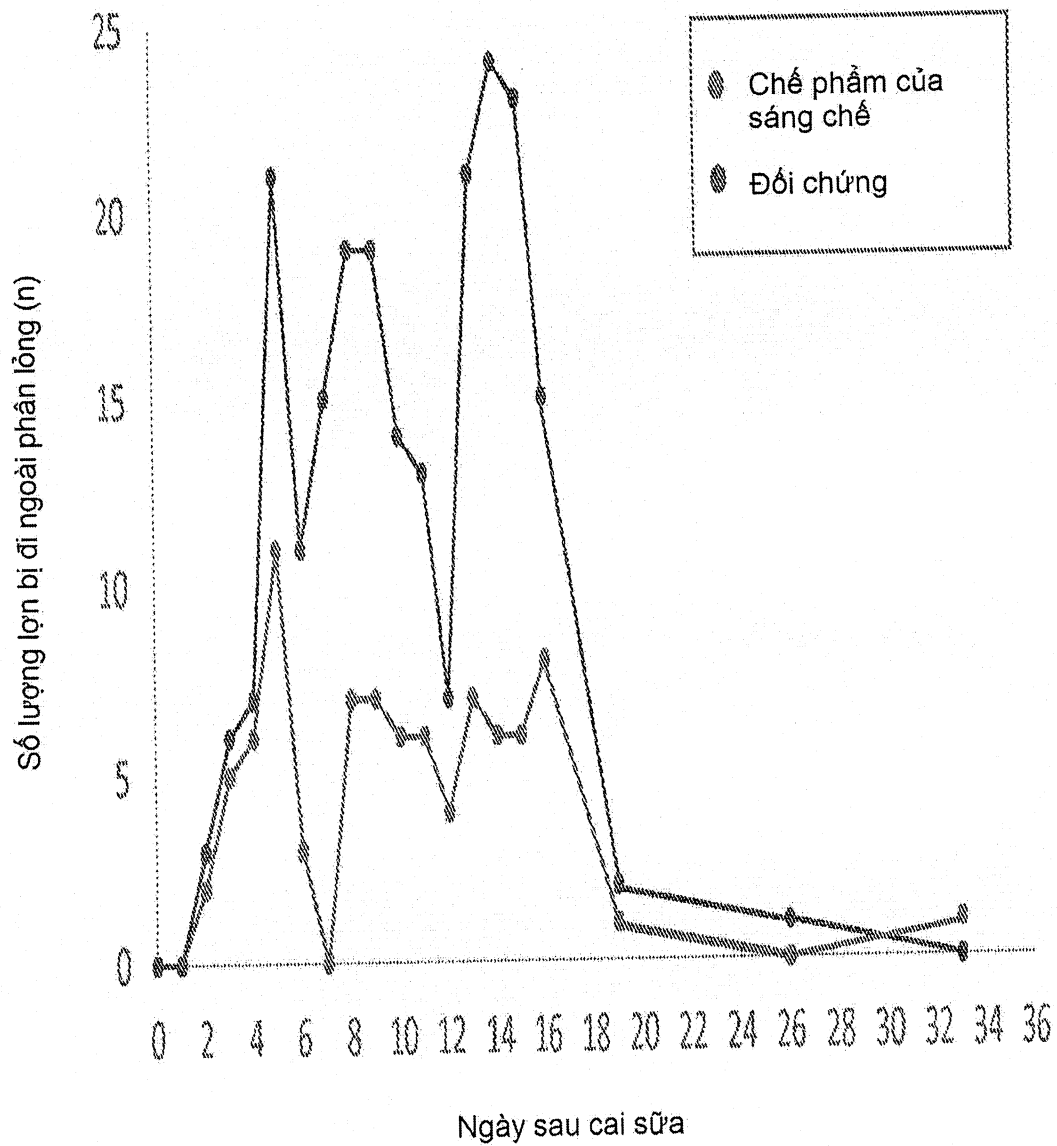


Fig.3- Một nhóm lợn con được cho dùng liều lượng đơn qua đường miệng (4mL) chế phẩm của sáng chế khi cai sữa (ngày 0), hoặc chưa được điều trị (đối chứng). Chế phẩm của sáng chế làm giảm đáng kể tỷ lệ mắc bệnh đi ngoài phân lỏng (bệnh tiêu chảy) ($P < 0,05$).

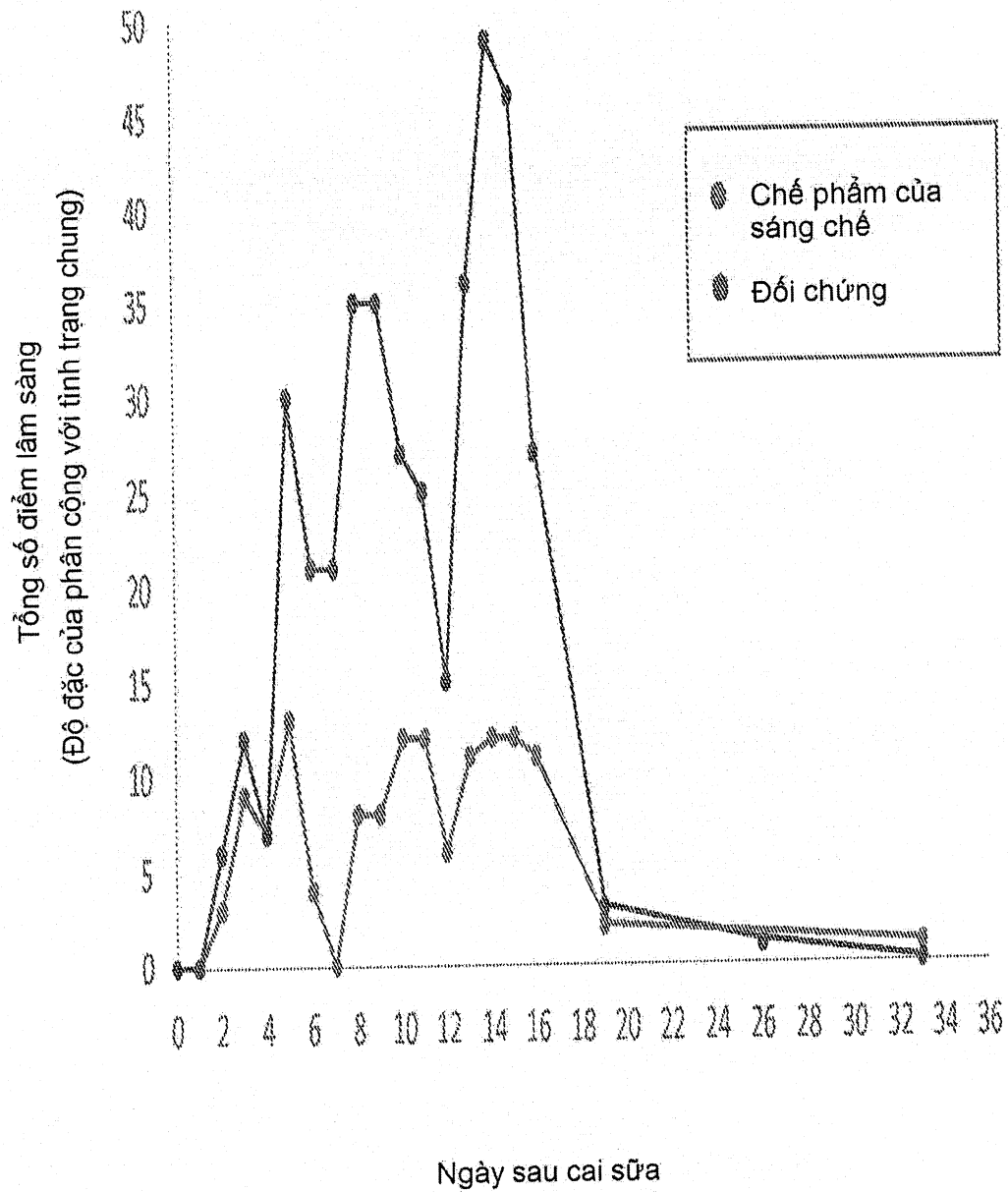


Fig.4- Một nhóm lợn con được cho dùng liều lượng đơn qua đường miệng chế phẩm của sáng chế khi cai sữa (ngày 0). Nhóm lợn con thứ hai chưa được điều trị (Đối chứng). Chế phẩm của sáng chế làm giảm đáng kể điểm lâm sàng, và do đó cải thiện sức khỏe của lợn con ($P < 0,01$).