



(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



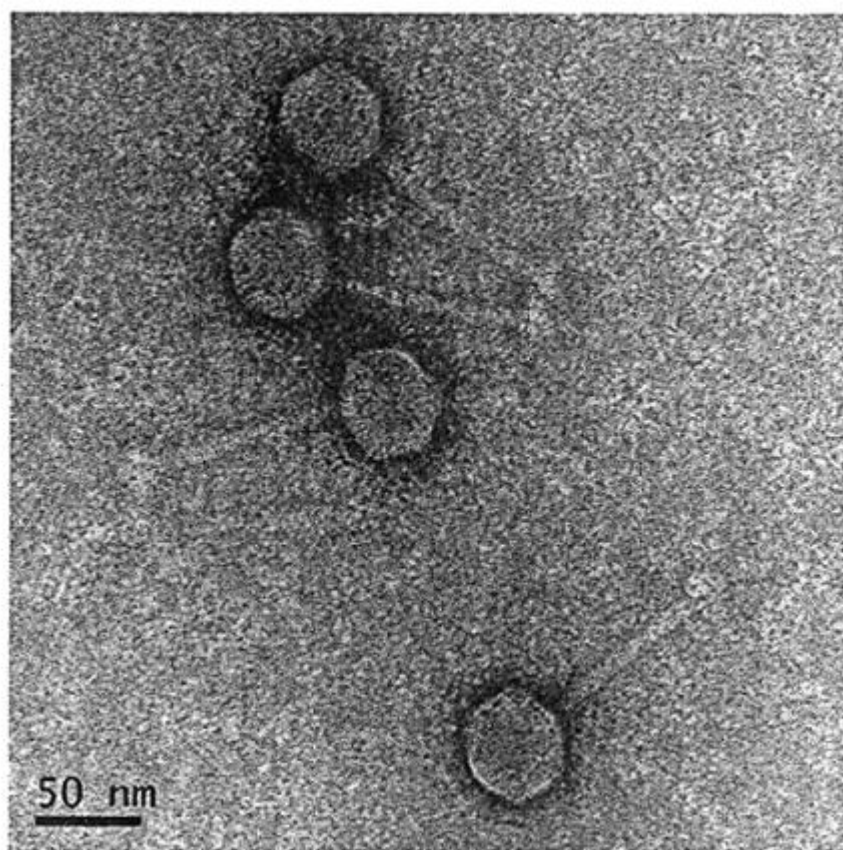
1-0025270

(51)⁷ A61K 38/16; A61P 31/12; A61P 31/00; (13) B
A61K 38/17; A61K 39/02

-
- (21) 1-2012-00753 (22) 03/09/2010
(86) PCT/KR2010/005999 03/09/2010 (87) WO2011/028059 10/03/2011
(30) 61/239,748 03/09/2009 KR
(45) 25/08/2020 389 (43) 26/11/2012 296A
(73) CJ CHEILJEDANG CORPORATION (KR)
292, Ssangnim-dong, Jung-gu, Seoul 100-400, Republic of Korea
(72) SHIN, Soo An (KR); PARK, Min Tae (KR); CHOI, Hyang (KR); CHO, Young
Wook (KR); KANG, In Hye (KR); CHOI, Su Jin (KR).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)
-

(54) THẺ THỰC KHUẨN VÀ CHẾ PHẨM CHỨA THẺ THỰC KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến thẻ thực khuẩn mới có hoạt tính kháng khuẩn đặc hiệu kháng một hoặc nhiều vi khuẩn *Salmonella* được chọn từ nhóm gồm *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum* và *Salmonella Pullorum* mà không làm ảnh hưởng đến vi khuẩn có lợi. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm, thức ăn hoặc nước uống cho vật nuôi, chất làm sạch và chất khử trùng dùng để phòng ngừa và điều trị các bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum* hoặc *Salmonella Pullorum* bao gồm bệnh phó thương hàn, ngộ độc thực phẩm nhiễm *Salmonella*, bệnh thương hàn, và bệnh bạch ly thương hàn hoặc dùng để khống chế vi khuẩn *Salmonella*.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến thể thực khuẩn mới. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa thể thực khuẩn này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

Bệnh ở gia cầm gây ra bởi *Salmonella bacterium* là bệnh thương hàn gà (Fowl Typhoid - FT), bệnh này gây ra bởi mầm bệnh *Salmonella Gallinarum* (dưới đây được gọi là SG). Bệnh thương hàn gà (FT) là bệnh nhiễm trùng máu ở gia cầm như gà nhà và gà tây, và diễn biến của bệnh có thể là cấp tính hoặc mạn tính với tỷ lệ tử vong cao. Gần đây, đã có thông báo rằng bệnh thương hàn gà thường xảy ra ở Châu Âu, Nam Mỹ, Châu Phi và Đông Nam Á, và mức thiệt hại đang tăng dần theo từng năm. Sự bùng nổ của bệnh FT ở Hàn Quốc đã được thông báo từ năm 1992 và những thiệt hại kinh tế do FT gây ra ở gà nâu đẻ trứng là rất nghiêm trọng (Kwon Yong-Kook. 2000

annual report on avian diseases. Information publication by National Veterinary Research & Quarantine Service. March, 2001; Kim Ae-Ran et al., The prevalence of pullorum disease-fowl typhoid in grandparent stock and parent stock in Korea, 2003, Korean J Vet Res(2006) 46(4): 347~353).

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

Ở Hàn Quốc, quá trình bùng phát bệnh thương hàn gà và bệnh bạch lỵ gà đã tăng dần từ những năm 1990, gây thiệt hại kinh tế cho người nông dân. Vì lý do này, vaccin SG sống với độc lực giảm đã được sử dụng cho gà giò để phòng ngừa bệnh thương hàn gà từ năm 2004 (Kim Ae-Ran et al., The prevalence of pullorum disease-fowl typhoid in grandparent stock and parent stock in Korea, 2003, Korean J Vet Res(2006) 46(4): 347~353). Hiệu lực của nó không rõ rệt, và vaccin sống không được phép sử dụng cho gà mái do có nguy cơ nhiễm bệnh truyền qua trứng. Đáng tiếc là trên thị trường vẫn chưa có phương pháp phòng ngừa chống lại bệnh bạch lỵ gà, không giống như bệnh thương hàn gà. Do đó, rất cần có các phương pháp mới để phòng ngừa bệnh thương hàn gà và bệnh bạch lỵ gà.

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

SE và ST là nguyên nhân gây bệnh phó thương hàn ở gia cầm, lợn, và gia súc. Bệnh phó thương hàn gây ra bởi vi khuẩn *Salmonella* là bệnh nhiễm khuẩn cấp tính hoặc mạn tính ở đường tiêu hóa của vật nuôi, và có các triệu chứng chính là sốt, viêm ruột, và nhiễm trùng máu, đôi khi có viêm phổi, viêm khớp, sảy thai và viêm vú. Bệnh phó thương hàn xuất hiện trên toàn thế giới, và xuất hiện nhiều nhất vào các tháng mùa hè (T.R. Callaway et al. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of the food

supply as related to *Salmonella*. J Anim Sci 2008.86:E163-E172). Ở gia súc, các triệu chứng điển hình bao gồm chứng chán ăn, sốt, bệnh tiêu chảy phân nâu sẫm hoặc nhầy dính máu. Bệnh nhiễm khuẩn cấp tính ở bê gây chết nhanh chóng, và bệnh nhiễm khuẩn trong quá trình mang thai gây chết thai do nhiễm trùng máu, dẫn đến sảy thai sớm (www.livestock.co.kr). Ở lợn, bệnh phó thương hàn được đặc trưng lâm sàng bởi ba hội chứng cấp tính chính: nhiễm trùng máu cấp, viêm ruột cấp và viêm ruột mạn. Nhiễm trùng máu cấp xảy ra ở lợn 2~4 tháng tuổi, và thường gây chết trong vòng 2~4 ngày sau khi khởi phát triệu chứng. Viêm ruột cấp xảy ra trong giai đoạn vỗ béo, và kèm theo là tiêu chảy, sốt cao, viêm phổi và các biểu hiện thần kinh. Có thể thấy đổi màu da ở một số trường hợp nặng. Viêm ruột mạn đi kèm với tiêu chảy kéo dài (www.livestock.co.kr).

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

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

Theo báo cáo của Trung tâm kiểm soát và phòng ngừa dịch bệnh Hoa Kỳ (CDC - The Centers for Disease Disease Control and Prevention, USA), 16% trường hợp ngộ độc thức ăn ở người xảy ra trong khoảng từ năm 2005 đến năm 2008 là do vi khuẩn *Salmonella* gây ra, trong đó do SE và ST gây ra lần lượt là 20% và 18%. Liên quan đến chứng ngộ độc thức ăn do *Salmonella* ở người trong khoảng từ năm 1973 đến năm 1984, các thực phẩm liên quan làm vật truyền bệnh được nhắc đến trong báo cáo là thịt gà (5%), thịt bò (19%), thịt lợn (7%), các sản phẩm từ sữa (6%) và thịt gà tây (9%). Vào các năm 1974~1984, thử nghiệm về sự nhiễm khuẩn ở gà giò trong quá

trình giết mổ cho thấy tỷ lệ nhiễm *Salmonella* là 35% hoặc cao hơn. Vào năm 1983, *Salmonella* được phân lập ở 50,6% gà, 68,8% gà tây, 60% ngỗng, 11,6% thịt lợn và 1,5% thịt bò. Ngoài ra, nghiên cứu tổng quan được tiến hành vào năm 2007 cho thấy rằng salmonella được tìm thấy ở 5,5% thịt gia cầm sống và 1,1% thịt lợn sống. Đặc biệt, đã phát hiện ra rằng SE thường có bắt nguồn từ trứng hoặc thịt gia cầm đã nhiễm bệnh, và ST thường có bắt nguồn từ thịt lợn, thịt gia cầm, và thịt bò đã nhiễm bệnh (www.cdc.gov). Ví dụ, chứng ngộ độc thức ăn do SE gây ra đã gia tăng nhanh chóng ở Hoa Kỳ, Ca-na-đa và Châu Âu từ năm 1988, và các nghiên cứu dịch tễ cho thấy rằng chứng ngộ độc thức ăn này là do trứng hoặc các thực phẩm từ trứng gây ra (Agre-Food Safety Information Service (AGROS). Domestic and foreign food poisoning occurrence and management trend. 2008.02). Việc đánh giá nguy cơ được FAO và WHO tiến hành vào năm 2002 cho thấy rằng tỷ lệ mắc bệnh phó thương hàn ở người được truyền qua trứng và thịt gia cầm dường như có mối quan hệ tuyến tính với sự lan tràn của *Salmonella* ở gia cầm. Điều này có nghĩa là khi sự lan tràn của *Salmonella* ở gia cầm giảm xuống, thì tỷ lệ mắc bệnh phó thương hàn ở người cũng sẽ giảm xuống (*Salmonella* control at the source; World Health Organization. International Food Safety Authorities Network (INFOSAN) Information Note No. 03/2007). Gần đây, những lo ngại về vấn đề an toàn thực phẩm đã gia tăng do sự bùng phát của salmonella từ các sản phẩm khác nhau như lạc, rau bina, cà chua, hạt hồ trăn, hạt tiêu, và gần đây nhất là bột nhão để làm bánh quy (Jane Black and Ed O'Keefe. Overhaul of Food Safety Rules in the Works. Washington Post Staff Writers Wednesday, July 8, 2009).

Với các lý do này, ở Đức các trường hợp nhiễm *Salmonella* cần được thông báo (theo mục 6 và mục 7 trong luật phòng ngừa bệnh nhiễm khuẩn ở Đức – the German law on infectious disease prevention, Infektionsschutzgesetz). Từ năm 1990 đến năm 2005, số trường hợp nhiễm đã được thông báo chính thức đã giảm từ khoảng 200.000 trường hợp xuống khoảng 50.000 trường hợp. Ước tính rằng có một phần năm người ở Đức mang *Salmonella*. Ở Mỹ, có xấp xỉ 40,000 trường hợp nhiễm *Salmonella* được báo cáo mỗi năm (en.wikipedia.org/wiki/Salmonella#cite_note-2).

Do đó, nhu cầu cấp bách là cần không chế được SE và ST, do vi khuẩn gây bệnh phó thương hàn cho vật nuôi và người gây ra. Các nỗ lực hợp tác giữa USDA và FDA đã phát triển nhiều chiến lược hữu hiệu để phòng ngừa bệnh phó thương hàn - là bệnh nhiễm khuẩn lây qua thực phẩm ở trên 1 triệu trường hợp ở Hoa Kỳ. Trong số đó đã có quy định cuối cùng được FDA ban hành, nhằm làm giảm khả năng nhiễm bệnh ở trứng. Hiện nay, FDA yêu cầu rằng các sản phẩm từ trứng cần phải được kiểm nghiệm

thường xuyên đối với salmonella gây chết người trong quá trình sản xuất, bảo quản và vận chuyển. Kết quả là, mỗi năm tránh được khoảng 79.000 ca mắc bệnh và 30 ca tử vong do trứng đã nhiễm bệnh gây ra (Jane Black and Ed O'Keefe. Overhaul of Food Safety Rules in the Works. *Washington Post* Staff Writers Wednesday, July 8, 2009). Ở Đan Mạch, các đánh giá thận trọng từ việc phân tích chi phí-lợi ích bằng cách so sánh giữa chi phí để khống chế *Salmonella* trong khu vực sản xuất với toàn bộ chi phí y tế công cộng để chữa bệnh phó thương hàn cho thấy rằng việc khống chế *Salmonella* đã tiết kiệm cho nền kinh tế Đan Mạch 14,1 triệu đô la Mỹ trong năm 2001 (*Salmonella* control at the source. World Health Organization. International Food Safety Authorities Network (INFOSAN) Information Note No. 03/2007).

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

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

Sau khi tìm ra thể thực khuẩn, thoát tiên người ta rất tin tưởng vào việc sử dụng chúng để điều trị bệnh nhiễm khuẩn. Tuy nhiên, khi các kháng sinh phổ rộng đã được sử dụng phổ biến, thì thể thực khuẩn được xem là không cần thiết do nó có phổ đích riêng biệt. Tuy vậy, việc sử dụng sai và quá mức kháng sinh đã làm tăng nỗi lo ngại về việc kháng kháng sinh và tác dụng có hại của các kháng sinh còn dư trong thực phẩm (Cislo, M *et al.* Bacteriophage treatment of suppurative skin infections. Arch Immunol.Ther.Exp. 1987,2:175-183; Kim sung-hun *et al.*, Bacteriophage; New Alternative Antibiotics. biological research information center, BRIC). Cụ thể, đã biết rằng chất kích thích tăng trưởng kháng vi sinh vật (antimicrobial growth promoter - AGP) được bổ sung vào thức ăn vật nuôi để thúc đẩy quá trình tăng trưởng gây ra sự kháng kháng sinh, và do đó gần đây việc sử dụng chất kích thích tăng trưởng kháng vi sinh vật (AGP) đã bị cấm. Ở Châu Âu, việc sử dụng tất cả các chất kích thích tăng trưởng kháng vi sinh vật (AGP) đã bị cấm từ năm 2006. Hàn Quốc đã đưa ra lệnh cấm sử dụng một số AGP từ năm 2009, và đang xem xét việc hạn chế sử dụng tất cả các AGP trong tương lai.

Những lo lắng ngày càng tăng về việc sử dụng các kháng sinh này làm sống lại mối quan tâm về thể thực khuẩn làm chất thay thế kháng sinh. Bảy thể thực khuẩn khổng chế *E.coli* O157:H đã được bộc lộ trong patent Mỹ số 6,485,902 (Sử dụng thể thực khuẩn để khổng chế *Escherichia coli* O157 (Use of bacteriophages for control of *Escherichia coli* O157) - được cấp bằng năm 2002). Hai thể thực khuẩn để khổng chế nhiều loại vi sinh vật khác nhau được bộc lộ trong patent Mỹ số 6.942.858 (được cấp bằng cho Nymox năm 2005). Nhiều hãng đã cố gắng tích cực để phát triển nhiều sản phẩm khác nhau bằng cách sử dụng thể thực khuẩn. Hãng an toàn thực phẩm EBI (Châu Âu) đã phát triển chất phụ gia thực phẩm để phòng ngừa chứng ngộ độc thực phẩm gây ra bởi *Listeria monocytogenes*, có tên là Listex-P100, là sản phẩm thể thực khuẩn đầu tiên được Cơ quan thực phẩm và dược phẩm Mỹ (US FDA) phê chuẩn. Sản phẩm trên cơ sở thể thực khuẩn, LMP-102 cũng được phát triển dưới dạng chất phụ gia thực phẩm kháng *Listeria monocytogenes*, được phê chuẩn là GRAS (Generally regarded as safe – nói chung là an toàn). Năm 2007, nước rửa trên cơ sở thể thực khuẩn được OmniLytics sản xuất được phát triển để phòng việc nhiễm *E.coli* O157 ở thịt bò trong quá trình giết mổ, được Cục thanh tra và an toàn thực phẩm của Bộ Nông nghiệp Mỹ (USDA's Food Safety and Inspection Service - FSIS) phê chuẩn. Ở Châu Âu, thể thực khuẩn *Clostridium sporogenes* NCIMB 30008 và thể thực khuẩn *Clostridium tyrobutiricum* NCIMB 30008 được đăng ký dưới dạng chất bảo quản thức

ăn phòng chống nhiễm *Clostridium* vào thức ăn lần lượt vào năm 2003 và 2005. Điều này cho thấy rằng việc nghiên cứu ứng dụng thể thực khuẩn để sử dụng chúng làm kháng sinh chống lại mầm bệnh ký sinh trên vật nuôi vẫn đang được tiếp tục.

Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu không chế sinh học bằng thể thực khuẩn đều tập trung vào việc không chế *E.coli*, *Listeria* và *Clostridium*. *Salmonella* cũng là mầm bệnh ký sinh trên vật nuôi, và những thiệt hại do mầm bệnh này gây ra vẫn không thuyên giảm. Như đã nêu trên đây, do SE và ST kháng nhiều thuốc, nên việc giám sát tính kháng vi sinh vật đã được tiến hành trên quy mô toàn Hàn Quốc theo Nghị định bắt buộc của Dự luật về phòng chống bệnh lây nhiễm (Executive Order 16961), Sắc lệnh bắt buộc của Dự luật về phòng chống bệnh lây nhiễm (Ministry of Health and Welfare's Order 179), và Tổ chức của Viện y tế Quốc gia (Executive Order 17164). Do đó, cần phải phát triển thể thực khuẩn có thể không chế *Salmonella*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Theo sáng chế, các tác giả sáng chế đã tiến hành nghiên cứu sâu rộng và cẩn thận về thể thực khuẩn, được phân lập từ các nguồn tự nhiên, nhiễm salmonella gây bệnh ở gia cầm, nhằm khắc phục các vấn đề phát sinh khi lạm dụng hoặc dùng quá mức các kháng sinh phổ rộng, như dùng thuốc hoặc nhiều thuốc kháng khuẩn, dư lượng thuốc, v.v., từ đó nhận thấy rằng một số thể thực khuẩn phân lập có hoạt tính kháng khuẩn đặc hiệu kháng *Salmonella Enteritidis* (SE), *Salmonella Typhimurium* (ST), *Salmonella Gallinarum* (SG) và *Salmonella Pullorum* (SP) mà không ảnh hưởng đến các vi khuẩn có lợi, ngoài tính bền axit và bền nhiệt và chịu đựng sấy khô tuyệt vời, như được xác định theo các đặc tính hình thái, hóa sinh và đặc tính di truyền của chúng, và do đó các thể thực khuẩn này có thể được sử dụng làm các hoạt chất trong chế phẩm để phòng ngừa và điều trị các bệnh do *Salmonella Enteritidis* hoặc *Salmonella Typhimurium* gây ra, như bệnh phó thương hàn ở vật nuôi và ngộ độc thực phẩm do nhiễm *Salmonella*, và các bệnh do *Salmonella Gallinarum* hoặc *Salmonella Typhimurium* gây ra, cụ thể như bệnh thương hàn và bệnh bạch ly thương hàn. Cũng như vậy, thể thực khuẩn theo sáng chế có thể được đưa vào các sản phẩm khác nhau để không chế vi khuẩn *Salmonella*, bao gồm chất phụ gia thức ăn và nước uống cho vật nuôi, chất khử trùng chuồng trại và chất làm sạch cho các sản phẩm thịt.

Giải pháp kỹ thuật

Mục tiêu của sáng chế là đề xuất thể thực khuẩn mới có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu kháng một hoặc nhiều vi khuẩn *Salmonella* được chọn từ nhóm gồm *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum* và *Salmonella Pullorum*.

Mục tiêu khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm phòng ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi một hoặc nhiều vi khuẩn *Salmonella* được chọn từ nhóm gồm *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, và *Salmonella Pullorum*, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này.

Mục tiêu khác nữa của sáng chế là đề xuất chất phụ gia thức ăn hoặc nước uống cho vật nuôi.

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

Mục tiêu khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh phó thương hàn và ngộ độc thực phẩm nhiễm *Salmonella* gây ra bởi *Salmonella Enteritidis* hoặc *Salmonella Typhimurium* bằng cách sử dụng chế phẩm chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này. Cũng như vậy, sáng chế đề xuất phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị bệnh thương hàn và bệnh bạch lỵ thương hàn gây ra bởi *Salmonella Gallinarum* và *Salmonella Pullorum*.

Hiệu quả có lợi

Ngoài tính bền axit, bền nhiệt và chịu đựng sấy tuyệt vơi, thể thực khuẩn mới theo sáng chế có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu kháng một hoặc nhiều chủng *Salmonella* được chọn từ nhóm gồm *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum* và *Salmonella Pullorum*. Do đó, thể thực khuẩn mới này có thể được sử dụng để không chế *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum* hoặc *Salmonella Pullorum* cũng như để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum* hoặc *Salmonella Pullorum* gây ra bao gồm bệnh phó thương hàn, ngộ độc thực phẩm nhiễm *Salmonella*, bệnh thương hàn gà hoặc bệnh bạch lỵ gà.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

FIG.1 là hình ảnh của ΦCJ7 chụp bằng kính hiển vi điện tử, cho thấy ΦCJ7 thuộc kiểu hình thái của họ Siphoviridae, được đặc trưng bởi capsit cùng cỡ và đuôi dài co rút được;

FIG.2 là ảnh chụp thể hiện quá trình hình thành các mảng ΦCJ7 trong thăm vi khuẩn *Salmonella*: A: trong thăm vi khuẩn chứa SE; B: trong thăm vi khuẩn chứa ST; C: trong thăm vi khuẩn chứa SG; D: trong thăm vi khuẩn chứa SP; E: trong thăm vi khuẩn chứa SA; F: trong thăm vi khuẩn chứa SB; G: trong thăm vi khuẩn chứa SC; H: trong thăm vi khuẩn chứa SD. Các vết tan được tạo thành trong các thăm vi khuẩn chứa SE, ST, SG và SP, nhưng không tạo thành trong thăm vi khuẩn chứa SA, SB, SC và SD.

FIG.3 thể hiện kết quả SDS-PAGE (natri dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis - điện di trên gel natri đodexyl sulfat polyacrylamit) của thể thực khuẩn ΦCJ7 đã phân lập, trong đó thể hiện các kiểu protein của thể thực khuẩn này, bao gồm protein chính có kích thước 38 kDa, 63 kDa, 52 kDa và 12 kDa (Chế phẩm See-blue plus 2 prestained-standard (của Invitrogen) được sử dụng làm chất đánh dấu); FIG.4 thể hiện kết quả của PFGE (pulse-field gel electrophoresis - điện di trên gel trong trường xung điện) của thể thực khuẩn ΦCJ7 đã phân lập, cho thấy tổng kích thước bộ gen nằm trong khoảng từ 39,2 kbp đến 44,1 kbp với kích thước chuẩn của ADN bằng 5 kbp (Bio-rad) được dùng làm chất đánh dấu kích thước);

FIG.5 thể hiện kết quả PCR (Polymerase Chain Reaction – Phản ứng chuỗi polymeraza), được tiến hành bằng cách sử dụng mỗi bộ đoạn mồi của ADN bộ gen ΦCJ7, trong đó A: bộ đoạn mồi SEQ ID NO. 5 và 6, B: bộ đoạn mồi SEQ ID NO. 7 và 8, C: bộ đoạn mồi SEQ ID NO. 9 và 10, D: bộ đoạn mồi SEQ ID NO. 11 và 12. Tất cả sản phẩm PCR có chiều dài 500 bp ~ 3 kbp;

FIG.6 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm về tính bền axit trên thể thực khuẩn ΦCJ7, cho thấy số thể thực khuẩn sống sót ở độ pH = 2,1, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,5, 6,4, 6,9, 7,4, 8,0, 9,0 và 11,0. Thể thực khuẩn ΦCJ7 này không bị mất hoạt tính của nó lên tới độ pH 3,0, nhưng lại mất hoạt tính hoàn toàn ở độ pH=2,5 hoặc thấp hơn, so với nhóm đối chứng;

FIG.7 là đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm về tính bền nhiệt trên thể thực khuẩn ΦCJ7, cho thấy số thể thực khuẩn sống sót ở các nhiệt độ 37, 45, 53, 60, 70, 80°C và ở thời điểm 0, 10, 30, 60, 120 phút. Thể thực khuẩn ΦCJ7 này duy trì được hoạt tính của nó ở 60°C lên tới 2 giờ, hoạt tính của nó bị mất một chút khi để ở 82°C trong 10 phút và hoạt tính của nó bị mất hoàn toàn khi để lâu hơn;

FIG.8 thể hiện kết quả của thử nghiệm về tính bền sấy của thể thực khuẩn ΦCJ7 với sự hỗ trợ của máy sấy phun xịt (Lab Plant), trong đó sự thay đổi về nồng độ chuẩn độ trong điều kiện sấy được xác định khi so sánh với nồng độ chuẩn độ trước khi sấy, và

cho thấy hoạt tính của nó được duy trì 100%;

FIG.9 là đồ thị biểu thị thể trọng của chuột theo thời gian 1, 3, 7, 10 và 14 ngày sau và trước khi dùng thể thực khuẩn ΦCJ7, cho thấy không có sự thay đổi đáng kể về thể trọng so với nhóm đối chứng (■; nhóm chuột đực đối chứng, □; nhóm chuột đực thử nghiệm được cho dùng ΦCJ7, ●; nhóm chuột cái đối chứng, ○; nhóm chuột cái thử nghiệm được cho dùng ΦCJ7); và

FIG.10 là đồ thị thể hiện tác dụng làm sạch của ΦCJ7. Cho thấy ΦCJ7 có tác dụng trong tất cả các điều kiện nước nhẹ, dịch pha loãng hữu cơ, và nước nhẹ+20% sữa. Cụ thể, tác dụng tốt nhất thu được sau 2,5 giờ điều trị bằng ΦCJ7. Sản phẩm có bán trên thị trường Harasol (Yuhan Corporation, Korea), là nhóm đối chứng dương tính, có tác dụng tuyệt vời trong điều kiện nước nhẹ, nhưng không có tác dụng trong dịch pha loãng hữu cơ, và tác dụng giảm mạnh trong điều kiện nước nhẹ + sữa 20% (■; nhóm đối chứng nước nhẹ, □; nhóm đối chứng dịch pha loãng hữu cơ, ; nhóm đối chứng nước nhẹ + sữa 20%, ●; ΦCJ7 nước nhẹ, ○; ΦCJ7 dịch pha loãng hữu cơ; ΦCJ7 nước nhẹ + sữa 20%, ▲; nước nhẹ Harasol, △; dịch pha loãng hữu cơ Harasol; nước nhẹ Harasol + sữa 20%).

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến thể thực khuẩn mới có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu kháng *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, hoặc *Salmonella Pullorum*.

Thể thực khuẩn theo sáng chế thuộc nhóm kiểu hình thái B1 của họ Siphoviridae với cấu trúc hình thái chứa capsit cùng cỡ và đuôi dài, không co rút được, được đặc trưng bởi tổng kích thước bộ gen bằng 38~45 kbp và các protein cấu trúc chính có kích thước nằm trong khoảng từ 37 đến 40 kDa, nằm trong khoảng từ 62 đến 65 kDa, nằm trong khoảng từ 51 đến 54 kDa và nằm trong khoảng từ 10 đến 13 kDa.

Theo phương án ưu tiên, thể thực khuẩn theo sáng chế có tính đặc hiệu loài chỉ có khả năng gây nhiễm *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, hoặc *Salmonella Pullorum*.

Theo phương án ưu tiên, thể thực khuẩn theo sáng chế có tổng kích thước bộ gen xấp xỉ bằng 38~45 kbp, tốt hơn là xấp xỉ 39,2~44,1 kbp. Ngoài ra, thể thực khuẩn này có thể chứa một hoặc nhiều phân tử axit nucleic được chọn từ nhóm gồm SEQ ID NO. từ 1 đến 4 làm các phần bộ gen của nó. Tốt hơn, nếu thể thực khuẩn này chứa các phân tử axit nucleic có các SEQ ID NO. 1 đến 4 làm các phần bộ gen của nó.

Khi PCR được tiến hành trong điều kiện có mặt bộ đoạn mỗi được chọn từ các SEQ ID NO. 5 và 6, SEQ ID NO. 7 và 8, SEQ ID NO. 9 và 10 và SEQ ID NO. 11 và 12, với bộ gen của thể thực khuẩn theo sáng chế làm mẫu, thì mỗi sản phẩm PCR có chiều dài 500 bp ~ 3 kbp. Tốt hơn nếu khi PCR được tiến hành trong điều kiện có mặt bộ đoạn mỗi nêu trên tương ứng, thì mỗi sản phẩm PCR có chiều dài 500 bp ~ 3 kbp.

Thuật ngữ "phân tử axit nucleic", như được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm các phân tử ADN (gADN và cADN) và ARN. Thuật ngữ "nucleotit", khi được dùng cùng nhau, tạo nên đơn vị cấu trúc của các phân tử axit nucleic, bao gồm các nucleotit tự nhiên và đường hoặc chất tương tự được cải biến bằng bazơ của chúng.

Thể thực khuẩn theo sáng chế có protein cấu trúc chính có kích thước nằm trong khoảng từ 37 đến 40 kDa, nằm trong khoảng từ 62 đến 65 kDa, nằm trong khoảng từ 51 đến 54 kDa và nằm trong khoảng từ 10 đến 13 kDa, và tốt hơn là tương ứng với kích thước tương ứng xấp xỉ bằng 38 kDa, 63 kDa, 52 kDa và 12 kDa.

Ngoài ra, thể thực khuẩn theo sáng chế có đặc tính hóa sinh bền axit, bền nhiệt và bền sấy.

Chi tiết hơn, thể thực khuẩn theo sáng chế có tính bền axit và nhiệt tuyệt vời sao cho nó có thể sống sót trong khoảng trị số pH rộng từ 3,0 đến 11,0 và khoảng nhiệt từ 37°C đến 70°C. Liên quan đến khả năng chịu đựng sấy của thể thực khuẩn, chúng có thể tồn tại được ngay cả trong điều kiện nhiệt độ và sấy cao 120°C/70°C. Về tính bền axit, bền nhiệt và bền sấy ưu việt của chúng, thể thực khuẩn theo sáng chế có thể được sử dụng trong khoảng nhiệt độ và độ pH rộng, chứng tỏ có nhiều ứng dụng trong chế phẩm và sản phẩm dùng để phòng ngừa và điều trị các bệnh cho vật nuôi và các bệnh ở người gây ra bởi vật nuôi.

Thể thực khuẩn theo sáng chế đã được phân lập từ các mẫu nước thải ở lò mổ gà, và xác định được là có hoạt tính diệt khuẩn đặc hiệu kháng SG, SP, ST và SE và các đặc điểm nêu trên, được gọi là thể thực khuẩn ΦCJ7 và được nộp lưu ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (361-221, Honje 1, Seodaemun, Seoul) vào ngày 14 tháng 8 năm 2009 với số truy cập KCCM11030P.

Trong phần ví dụ cụ thể của sáng chế này, các mẫu nước thải được thu thập từ lò mổ gà và được sử dụng để phân lập thể thực khuẩn từ đó, có thể làm tan tế bào chủ SE. Nhận thấy chúng cũng có khả năng làm tan SG, SP và ST (FIG.2 và Bảng 1). Ngoài ra, dưới kính hiển vi điện tử, thử nghiệm hình thái đã khẳng định rằng thể thực khuẩn (ΦCJ7) thuộc kiểu hình thái B1 của họ Siphoviridae (FIG. 1)

Nhận thấy rằng thể thực khuẩn ΦCJ7 theo sáng chế có các protein cấu trúc xấp

xi bằng 38 kDa, 63 kDa, 52 kDa và 12 kDa, như được xác định bởi phân tích mẫu protein (FIG.3).

Ngoài ra, phân tích bộ gen cho thấy rằng ΦCJ7 có tổng kích thước của bộ gen xấp xỉ 44,1~39,1 kbp (FIG.4), với các phân tử axit nucleic có các SEQ ID NO. 1 đến 4 được đưa vào (Ví dụ 6). Cũng như vậy, nhận thấy thể thực khuẩn theo sáng chế có mức độ tương đồng về di truyền rất thấp so với các thể thực khuẩn đã biết như được xác định bằng cách so sánh mức độ tương đồng về đặc điểm di truyền với các loài khác, chứng tỏ rằng thể thực khuẩn này là thể thực khuẩn mới (Bảng 2). Cụ thể hơn, khi tiến hành PCR bằng cách sử dụng các bộ đoạn môi SEQ ID NO. 5 và 6, SEQ ID NO. 7 và 8, SEQ ID NO. 9 và 10, và SEQ ID NO. 11 và 12, được gọi là ΦCJ7, các sản phẩm PCR thu được có kích thước 500 bp ~ 3 kbp (FIG.5).

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

ΦCJ7 được đánh giá về độ ổn định trong các điều kiện phổ pH, nhiệt độ, và sấy rộng. Nhận thấy ngoài việc duy trì được độ ổn định ngay cả sau khi sấy ở nhiệt độ cao (FIG. 8), thể thực khuẩn còn sống sót ở khoảng pH từ 3,0 đến 11,0 (FIG.6) và khoảng nhiệt độ từ 37°C đến 70°C (FIG.7).

Cũng như vậy, cũng nhận thấy rằng các chủng kiểu hoang SE, ST, SG và SP thuộc tế bào vật chủ ΦCJ7 (Bảng 3).

Khi dùng ΦCJ7 qua đường miệng, quan sát thấy chuột vẫn giữ được khối lượng (FIG.9), tỷ lệ tử vong, các triệu chứng chung (Bảng 4) và sự bất thường ở các cơ quan (Bảng 5) không đổi.

Cũng như vậy, thử nghiệm khử trùng cho thấy rằng khi sử dụng ở nông trại có vật nuôi, nhận thấy thể thực khuẩn ΦCJ7 có khả năng không chế salmonella hữu hiệu (Bảng 7) và có hoạt tính kháng khuẩn kháng các chủng salmonella tuyệt vời và không đổi trong các điều kiện khác nhau, so với các chất khử trùng thông thường làm các nhóm đối chứng dương tính (Bảng 7).

Các số liệu này cho rằng thể thực khuẩn ΦCJ7 theo sáng chế có thể được có thể được đưa dễ dàng vào nhiều sản phẩm khác nhau để không chế vi khuẩn *Salmonella*.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi một hoặc nhiều vi khuẩn *Salmonella* được chọn từ nhóm gồm *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, và *Salmonella Pullorum*, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này.

Theo phương án ưu tiên, chế phẩm này có thể chứa kháng sinh.

Do có hoạt tính kháng khuẩn đặc hiệu kháng *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, và *Salmonella Pullorum*, nên thể thực khuẩn theo sáng chế có thể được dùng để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh gây ra bởi vi khuẩn. Tốt hơn, nếu ví dụ về các bệnh nhiễm khuẩn bao gồm bệnh phó thương hàn và ngộ độc thực phẩm nhiễm *Salmonella* gây ra bởi *Salmonella enteritidis* hoặc *Salmonella Typhimurium*, bệnh thương hàn gây ra bởi *Salmonella Gallinarum* và bệnh bạch lỵ thương hàn gây ra bởi *Salmonella Pullorum* include, nhưng không chỉ giới hạn bởi các bệnh này.

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

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

Chế phẩm theo sáng chế bao gồm ΦCJ7 với lượng nằm trong khoảng từ 5×10^2 đến 5×10^{12} pfu/ml, và tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 1×10^6 đến 1×10^{10} pfu/ml.

Chế phẩm theo sáng chế có thể bao gồm tá dược lỏng được dùng, và có thể được bào chế cùng với chất mang để tạo ra thực phẩm, thuốc, và các chất phụ gia thực phẩm.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “tá dược lỏng được dùng” được dùng để chỉ chất mang hoặc chất pha loãng không gây kích ứng đáng kể cho cơ thể và không làm thoái biến hoạt tính sinh học và các đặc tính của hoạt chất được dùng. Để sử dụng trong quá trình bào chế chế phẩm thành chế phẩm lỏng, tá dược lỏng được dùng phải thích hợp về mặt vô trùng và tương hợp sinh học. Các ví dụ bao gồm nước muối, nước vô trùng, dung dịch Ringer, dung dịch đệm nước muối sinh lý, dịch truyền albumin, dung dịch dextroza, dung dịch maltodextrin, glyxerol và etanol. Chúng có thể được sử dụng riêng hoặc phối hợp với nhau. Nếu cần, có thể bổ sung các chất phụ gia

thông thường khác như chất chống oxy hóa, dung dịch đệm, chất kìm khuẩn, v.v. vào chế phẩm. Khi kết hợp thêm chất pha loãng, chất phân tán, chất diện hoạt, tá dược dính và tá dược trơn, chế phẩm theo sáng chế có thể được bào chế thành chế phẩm dùng để tiêm như dung dịch nước, hỗn dịch và nhũ tương, hoặc viên tròn, viên nang, thuốc cốm, hoặc viên nén.

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

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

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

Chế phẩm phân liều dùng qua đường miệng theo sáng chế có thể được bào chế ở các dạng bao gồm viên nén, viên ngậm dẹt, kẹo ngậm, hỗn dịch nước hoặc hỗn nhũ dịch, thuốc bột hoặc thuốc cốm, nhũ tương, viên nang cứng hoặc mềm, xirô, hoặc cồn thuốc. Dạng phân liều dùng qua đường miệng như viên nén và viên nang có thể bao gồm tá dược dính như lactoza, sacaroza, sorbitol, manitol, tinh bột, amylopectin, xenluloza hoặc gelatin, tá dược như đicanxi phosphat, tá dược rã như tinh bột ngô hoặc tinh bột khoai lang, tá dược trơn như magie stearat, canxi stearat, natri stearyl fumarat, hoặc sáp polyetylen glycol. Đối với viên nang, chất mang lỏng như lipit cũng có thể được sử dụng.

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

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

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến thức ăn và nước uống cho động vật, bao gồm hoạt chất là thể thực khuẩn này.

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

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

Các vi sinh vật khác không phải mầm bệnh có thể được bổ sung vào chất phụ gia thực phẩm theo sáng chế. Vi sinh vật khác có sẵn có thể được chọn từ nhóm gồm *Bacillus subtilis* có thể tạo ra proteaza, lipaza và invertaza, chủng *Lactobacillus* sp. có khả năng sử dụng hoạt tính vật lý và khả năng phân hủy trong điều kiện kỵ khí, như

trong dạ dày của gia súc, nấm dạng sợi như *Aspergillus oryzae* (J AnimalSci 43: 910-926, 1976) làm tăng khối lượng gia súc, tăng sản xuất sữa và giúp tiêu hóa và hấp thu thức ăn, và nấm men như *Saccharomyces cerevisiae* (J Anim Sci 56:735-739, 1983).

Thức ăn cho vật nuôi chứa ΦCJ7 theo sáng chế có thể bao gồm thức ăn có nguồn gốc thực vật, như thóc, quả hạch, phụ phẩm thực phẩm, tảo biển, sợi, phụ phẩm thuốc, dầu, tinh bột, bột, và phụ phẩm thóc, và thức ăn có nguồn gốc động vật như protein, chất khoáng, chất béo, protein đơn bào, động vật nổi, và thức ăn thừa, nhưng không chỉ giới hạn ở các thức ăn này.

Chất phụ gia thực phẩm chứa ΦCJ7 theo sáng chế này có thể bao gồm các chất phụ gia để phòng ngừa sự suy giảm chất lượng, như chất kết dính, chất nhũ hóa, và chất bảo quản, và các chất phụ gia để tăng tính hữu dụng, như axit amin, vitamin, enzym, probiotic, chất tạo hương, nitơ không phải protein, silicat, chất đệm, chất màu, dịch chiết, và oligosacarit, nhưng không chỉ giới hạn ở những chất này.

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

Vẫn theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến chất làm sạch hoặc chất khử trùng, chứa hoạt chất là thể thực khuẩn này.

Chất khử trùng chứa hoạt chất là thể thực khuẩn rất hữu ích để ngăn ngừa vệ sinh thực phẩm, chẳng hạn, nhiễm độc thực phẩm. Cụ thể, chất khử trùng có thể được dùng không chỉ là tác nhân hoặc chất phụ gia thực phẩm để phòng ngừa nhiễm salmonella, mà còn dùng trong sản xuất vật nuôi không nhiễm salmonella. Để tiêu diệt *Salmonella*, chất khử trùng cũng có thể được phun xịt vào nước thải từ vật nuôi trong nhà và được dùng trong chuồng gia cầm, lò mổ, khu vực nhiễm bẩn nơi vật nuôi bị chết, khu vực đun nấu và các thiết bị đun nấu, và khu vực bất kỳ mà gia cầm hoạt động.

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

Vẫn theo phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, hoặc *Salmonella Pullorum* gây ra, bao gồm bước dùng thể thực khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn đặc hiệu kháng *Salmonella*.

Enteritidis, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, hoặc *Salmonella Pullorum* cho động vật cần điều trị.

Theo phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, hoặc *Salmonella Pullorum*, bao gồm bước dùng chế phẩm phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh do *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, hoặc *Salmonella Pullorum* gây ra cho động vật cần điều trị.

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

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

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

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế có thể được hiểu rõ hơn thông qua các ví dụ dưới đây, chúng chỉ nhằm mục đích minh họa, chứ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

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

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

Cho 50ml mỗi mẫu lấy từ lò mổ gà và thực vật loại bỏ nước thải xung quanh vào ống ly tâm, và ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 10 phút, sau đó lọc dịch nổi bằng cách sử dụng màng lọc có kích thước lỗ 0,45µm. Trộn 18ml dịch lọc mẫu với 150µl môi trường nuôi cấy lactic chứa *Salmonella Enteritidis* (dưới đây được gọi là “SE”)

($OD_{600}=2$) và 2ml môi trường Luria-Bertani 10x (dưới đây gọi là môi trường LB gồm trypton 10g; dịch chiết nấm men 5g; NaCl 10g; trong thể tích cuối cùng 1l). Hỗn hợp này được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ, và sau đó đem ly tâm ở tốc độ 4000vòng/phút trong 10 phút, sau đó dịch nổi được lọc bằng cách sử dụng màng lọc có kích thước lỗ $0,2\mu\text{m}$. Trộn riêng rẽ 3ml aga 0,7% (khối lượng/thể tích) và 150 μl môi trường nuôi cấy lacc chứa SE ($OD_{600}=2$), và được đổ vào đĩa LB, và để hóa rắn. Trải 10 μl dịch nuôi cấy lên đĩa này, và nuôi cấy trong 18 giờ ở nhiệt độ 37°C (aga 0,7% được sử dụng làm “aga đỉnh”, và việc chuẩn độ dịch tan thể thực khuẩn được tiến hành trên aga đỉnh, gọi là kỹ thuật phủ aga mềm).

Dịch pha loãng chứa môi trường nuôi cấy mẫu chứa dịch tan thể thực khuẩn được trộn với 150 μl môi trường nuôi cấy lacc chứa SE ($OD_{600}=2$), tiến hành thử nghiệm phủ aga mềm để tạo ra các vết tan đơn lẻ. Do vết tan đơn lẻ chứa cùng một thể thực khuẩn, nên một vết tan được lấy ra và hòa tan vào 400 μl dung dịch SM (NaCl, 5,8g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2g; Tris-Cl 1M (độ pH=7,5), 50ml; H_2O , trong thể tích cuối cùng 1l), và để trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng để phân lập thể thực khuẩn đơn lẻ. Để khuếch đại thể thực khuẩn đã phân lập, 100 μl dịch nổi được lấy từ dung dịch thể thực khuẩn đơn, và được trộn với 12ml aga 0,7% và 500 μl môi trường nuôi cấy lacc chứa SE, tiếp theo tiến hành thử nghiệm phủ aga mềm trên đĩa LB (đường kính 150mm). Khi quá trình tiêu hoàn thành, đổ 15ml dung dịch SM vào đĩa, sau đó đĩa này được lacc nhẹ trong 4 giờ ở nhiệt độ trong phòng để làm tách thể thực khuẩn khỏi aga đỉnh. Thu hồi dung dịch SM chứa thể thực khuẩn đã tách, và bổ sung cloroform đến 1% thể tích cuối, và trộn kỹ trong 10 phút. Sau khi ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút, dịch nổi thu được được lọc bằng cách sử dụng màng lọc có kích thước lỗ $0,2\mu\text{m}$, và bảo quản trong tủ lạnh cho đến khi sử dụng.

1-2. Mề thể thực khuẩn ở quy mô lớn

Thể thực khuẩn đã chọn được nuôi cấy với số lượng lớn bằng cách sử dụng SE. SE được nuôi cấy lacc. Sau khi một phần gồm $1,5 \times 10^{10}$ cfu (colony forming unit - đơn vị tạo khuẩn lạc) được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút, các hạt được tái tạo huyền phù trong 4ml dung dịch SM. Thể thực khuẩn gồm $7,5 \times 10^7$ pfu (plaque forming unit – đơn vị tạo vết tan) được chủng ngừa vào đó ở MOI (MOI: multiplicity of infection - hệ số nhiễm=0,005), sau đó được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 20 phút. Dung dịch này được tiêm vào 150ml môi trường LB trong bình thốt cổ, và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong 5 giờ. Bổ sung cloroform đến lượng tương đương với 1% thể tích

cuối trước khi lắc dung dịch nuôi cấy trong 20 phút. Bổ sung lần lượt DNaza I và RNaza A đến nồng độ cuối 1µg/ml. Để dung dịch này ở nhiệt độ 37°C trong 30 phút. Bổ sung lần lượt NaCl và PEG (polyetylen glycol) đến nồng độ cuối 1M và 10% (khối lượng/thể tích), và để ở nhiệt độ 4°C thêm 3 giờ nữa. Ly tâm dung dịch này ở nhiệt độ 4°C và tốc độ 12000 vòng/phút trong 20 phút để loại dịch nổi. Huyền phù chứa các hạt trong 5ml dung dịch SM được để ở nhiệt độ phòng trong 20 phút và được trộn kỹ với 4ml chloroform. Sau khi ly tâm ở nhiệt độ 4°C và tốc độ 4000 vòng/phút trong 20 phút, lọc dịch nổi bằng cách sử dụng màng lọc có kích thước lỗ 0,2µm, và sử dụng siêu ly tâm gradient nồng độ glyxerol để tinh chế ΦCJ7 (nồng độ: 40%, 5% glyxerol ở tốc độ 35000 vòng/phút và ở nhiệt độ 4°C trong 1 giờ). ΦCJ7 đã tinh chế được tái tạo huyền phù trong 300µl dung dịch SM, tiếp đó chuẩn độ. ΦCJ7 được nộp lưu ở Trung tâm nuôi cấy vi sinh vật Hàn Quốc (361-221, Honje 1, Seodaemun, Seoul) vào ngày 17 tháng 8 năm 2009 với số truy cập KCCM11030P.

Ví dụ 2: Thử nghiệm khả năng nhiễm ΦCJ7 của *Salmonella*

Để phân tích thể thực khuẩn đã chọn về hoạt tính gây tan trên các loài *Salmonella* không phải SE, tiến hành gây nhiễm chéo với các loài *Salmonella* khác. Kết quả là, ΦCJ7 không gây nhiễm SC (*Salmonella Choleraesuis*), SD (*Salmonella Derby*), SA (*Salmonella arizonae*), và SB (*Salmonella bongori*), nhưng lại gây nhiễm SE (*Salmonella Enteritidis*), ST (*Salmonella Typhimurium*), SG (*Salmonella Gallinarum*) và SP (*Salmonella Pullorum*) (xem Ví dụ 11). Các kết quả được tóm tắt trong Bảng 1 dưới đây và được thể hiện ở FIG.2.

Bảng 1
Nhiễm ΦCJ7 vào *Salmonella*

Kiểu huyết thanh	Tên chủng	Tạo vết tan	Kiểu huyết thanh	Tên chủng	Tạo vết tan
SE	SGSC 2282	O	SA	ATCC 13314	X
ST	ATCC 14028	O	SB	ATCC 43975	X
SG	SGSC 2293	O	SC	ATCC 10708	X

SP	SGSC	O	SD	ATCC	X
	2295			6960	

* ATCC: Trung tâm nguồn sinh học toàn cầu

* SGSC: Trung tâm lưu trữ di truyền salmonella

Ví dụ 3: Hình thái học của thể thực khuẩn ΦCJ7

ΦCJ7 đã tinh chế được pha loãng trong dung dịch gelatin 0,01%, và sau đó được cố định trong dung dịch glutaraldehyt 2,5%. Mẫu được nhỏ lên đĩa mica đã phủ cacbon (khoảng 2,5x2,5 mm), để thích nghi trong 10 phút, và được rửa bằng nước cất vô trùng. Màng cacbon được gắn trên lưới đồng, và nhuộm bằng 4% uranyl axetat trong 30-60 giây và được sấy. Tiến hành kiểm tra dưới kính hiển vi điện tử truyền qua JEM-1011 (ở 80kV, độ phóng đại 120.000 ~ 200.000 lần), như được thể hiện ở FIG.1, kết quả là, ΦCJ7 đã tinh chế có đặc điểm hình thái học có capsit cùng cỡ và đuôi dài không co rút được, chứng tỏ rằng nó thuộc kiểu hình thái B1 của họ Siphoviridae.

Ví dụ 4: Phân tích kiểu protein của ΦCJ7

15μl dung dịch ΦCJ7 đã tinh chế có độ chuẩn 10^{12} pfu/ml được trộn với 3μl dung dịch mẫu 5X SDS, và được làm nóng trong 5 phút. Protein toàn phần của ΦCJ7 được cho chạy trên gel NuPAGE Bis-Tris 4-12% (Invitrogen). Sau đó, gel này được nhuộm bằng xanh coomassie trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các dải chính được phát hiện ở các kích thước xấp xỉ 38 kDa, 63 kDa, 52 kDa và 12 kDa, như được thể hiện trong FIG. 3.

Ví dụ 5: Tổng kích thước bộ gen ADN của ΦCJ7

ADN trong bộ gen của ΦCJ7 được phân lập bằng cách sử dụng phương pháp siêu ly tâm. Liên quan tới vấn đề này, bổ sung EDTA (axit etylenđiamintetraaxetic (độ pH=8,0)) vào môi trường nuôi cấy ΦCJ7 đã tinh chế, proteinaza K, và SDS (natri đodexyl sulfat) đến nồng độ cuối lần lượt bằng 20mM, 50μg/ml, và 0,5% (khối lượng/thể tích) và sau đó ủ ở nhiệt độ 50°C trong 1 giờ. Bổ sung thể tích phenol tương đương (độ pH=8,0) và trộn kỹ. Sau khi ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút và ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút, dịch nổi được trộn kỹ với thể tích PCI tương đương (phenol:chloroform:rượu isoamyl=25:24:1). Ly tâm tiếp ở tốc độ 12000 vòng/phút và ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút để tạo ra dịch nổi, sau đó dịch nổi này được trộn với 1/10 thể tích natri axetat 3M và hai lượng thể tích etanol lạnh 95%, và để ở -20°C

trong 1 giờ. Sau khi ly tâm ở 0°C và ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 10 phút, dịch nổi này được loại bỏ hoàn toàn, và hạt ADN được hòa tan trong 50µl TE (Tris-EDTA (độ pH=8,0)). Pha loãng ADN đã chiết 10 lần, và đo hệ số hấp thụ ở OD₂₆₀ để xác định nồng độ của nó. Nạp 1µg ADN bộ gen tổng cộng vào gel agarosa PFGE (pulse-field gel electrophoresis - điện di trên gel trong trường xung điện) 1%, tiến hành điện di ở nhiệt độ trong phòng trong 20 giờ với sự hỗ trợ của chương trình hệ thống BIORAD PFGE 7 (khoảng kích thước 25-100 kbp; thời gian chuyển 0,4-2,0 giây, dạng quét tuyến tính; điện áp thuận 180V; điện áp nghịch 120V). Như được thể hiện trong FIG.7, ΦCJ7 có kích thước ADN bộ gen xấp xỉ bằng 39,2~ 44,1 kb.

Ví dụ 6: Phân tích đặc điểm di truyền của ΦCJ7

Việc phân tích đặc điểm di truyền của ΦCJ7 đã tinh chế được bắt đầu bằng cách phân cắt kép 5µg ADN trong bộ gen của ΦCJ7 bằng enzym giới hạn *StuI* và *NruI*, *AfeI* và *HinCII*, và *SnaBI* và *PvuII*. Vật truyền pCL1920 (Promega) được phân cắt bằng *Sma I*, và được xử lý bằng CIP (calf intestinal alkaline phosphatase - phosphatase kiềm ruột bê). Vật truyền T-blunt (Sogent) cũng được sử dụng. ADN trong bộ gen đã phân cắt được trộn với vật truyền này theo tỷ lệ 3:1, và được gắn ở nhiệt độ 16°C trong 2 giờ. Vật truyền tái tổ hợp thu được được chuyển vào *E.coli* DH5α, sau đó được đặt vào đĩa LB chứa spexinomycin hoặc kanamycin và X-gal (5-bromo-4-clo-3-indolyl-beta-D-galactopyranosit) để chọn lọc xanh/trắng. Các khuẩn lạc đã chọn được nuôi cấy trong 16 giờ trong môi trường nuôi cấy chứa kháng sinh, đồng thời lắc. Sau đó, chiết các plasmit bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế plasmit (Promega).

Việc tách dòng plasmit được xác định bằng PCR bằng cách sử dụng bộ đoạn mồi chứa FRT135 và FRT136 (các SEQ ID NO. 13 và 14) và M13 xuôi và M13 ngược (các SEQ ID NO. 15 và 16), và việc chọn lọc chỉ được tiến hành đối với các mảnh xen có kích thước 1 kbp hoặc lớn hơn. Các trình tự bazơ của chúng được phân tích bằng cách sử dụng các bộ đoạn mồi. Từ đó, thu được các trình tự bazơ như được thể hiện lần lượt trong các SEQ ID NO. từ 1 đến 4, mỗi trình tự này có kích thước 500 bp ~ 3 kbp, và được phân tích mức độ tương đồng về trình tự với sự hỗ trợ của chương trình NCBI blastx, và các kết quả được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

Mức tương đồng trình tự giữa ΦCJ7 và các thể thực khuẩn khác

Số	Sinh vật	Protein	Blastx			
			Nghi ngờ	Chủ thể	Tỷ lệ tương đồng	Trị số e
1	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> KS7	protein giả thuyết	118-567	17-166	146/150 (97%)	6e-84
	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> SETP3	protein tương tự enolaza	567-1031	1-155	145/155 (93%)	5e-76
	Thể thực khuẩn MB78	protein giả thuyết	659-297	1-120	113/121 (93%)	2e-60
2	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> SETP3	protein giả thuyết	618-472	75-123	40/49 (81%)	8e-31
	Thể thực khuẩn <i>Enterobacteria</i> T1	Endinuclaza giả định	108-479	261-384	123/124 (99%)	5e-60
	Thể thực khuẩn <i>Erwinia</i> Era103	protein giả thuyết	498-119	1-119	69/119 (57%)	1e-31
3	<i>Escherichia coli</i>	hypoxanthin phosphoribosyl-transferaza	489-268	109-182	73/74 (98%)	1e-33
	<i>Shigella flexneri</i>	hypoxanthin-guanin phosphoribosyl-transferaza	285-506	126-199	73/74 (98%)	1e-65
4	Thể thực khuẩn <i>Salmonella</i> KS7	protein giả thuyết	103-1131	3-346	349/371 (94%)	0e-00
			1128-25	212-581	161/166 (96%)	3e-93

Ví dụ 7: Thiết kế trình tự đoạn môi đặc hiệu với ΦCJ7

Để nhận diện ΦCJ7, tiến hành xác định cấu trúc đoạn môi đặc hiệu với ΦCJ7 dựa trên cơ sở các SEQ ID NO. từ 1 đến 4. Tiến hành PCR bằng cách sử dụng mỗi bộ đoạn môi của các SEQ ID NO. 5 và 6, SEQ ID NO. 7 và 8, SEQ ID NO. 9 và 10 và SEQ ID NO. 11 và 12. Bổ sung 0,1μg ADN trong bộ gen của thể thực khuẩn và 0,5pmol mỗi đoạn môi vào hỗn hợp đã trộn trước (Bioneer), và điều chỉnh thể tích cuối cùng đến 20μl. Tiến hành PCR với 30 chu kỳ biến tính; 94°C trong 30 giây, gắn môi; 60°C trong 30 giây, và polyme hóa; 72°C, 1 phút. Do đó, các sản phẩm PCR thu được có kích thước xấp xỉ 500 bp ~ 3 kbp với các bộ đoạn môi có các SEQ ID NO. 5 và 6, SEQ ID NO. 7 và 8, SEQ ID NO. 9 và 10 và SEQ ID NO. 11 và 12. Các kết quả được thể hiện trong FIG. 5.

Ví dụ 8: Độ bền pH của thể thực khuẩn

Để xác định xem ΦCJ7 có tồn tại trong môi trường có độ pH thấp như dạ dày gà hay không, tiến hành thử nghiệm về độ ổn định của ΦCJ7 trong khoảng pH rộng (độ pH=2,1, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,5, 6,4, 6,9, 7,4, 8,2, 9,0, 9,8 và 11,0). Điều chế các dung dịch có độ pH khác nhau (dung dịch đệm natri axetat (độ pH=4,0, pH=5,5 và pH=6,4)), dung dịch đệm natri xitrat (độ pH=2,5, pH=3,0, pH=3,5), dung dịch đệm natri phosphat (độ pH=6,9 và pH=7,4), Tris-HCl (độ pH=8,2, pH=9,0 và pH=11,0)) ở nồng độ 2M. Trộn 180μl mỗi dung dịch pH với 20μl dung dịch thể thực khuẩn ($1,0 \times 10^{11}$ pfu/ml) để thu được nồng độ của mỗi dung dịch pH bằng 1M, sau đó ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng này được pha loãng theo chuỗi, và nuôi cấy 10μl mỗi dịch pha loãng ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ aga mềm, và tiến hành đo độ chuẩn của dịch tan thể thực khuẩn. So sánh sự thay đổi về độ chuẩn theo các giá trị pH khác nhau để đánh giá độ ổn định của thể thực khuẩn theo giá trị pH so với độ chuẩn của ΦCJ7 ở 0 giờ. Kết quả cho thấy rằng thể thực khuẩn không bị mất hoạt tính của nó và duy trì được độ ổn định xuống còn pH=3,0. Tuy nhiên, nó bị mất hoạt tính ở pH=2,5 hoặc thấp hơn. Các kết quả được thể hiện trong FIG..6.

Ví dụ 9: Độ bền nhiệt của thể thực khuẩn

Để sử dụng làm chất phụ gia thực phẩm, thể thực khuẩn được đánh giá độ ổn định với nhiệt phát sinh trong quá trình chế biến. Cụ thể, 200μl dung dịch ΦCJ7 ($1,0 \times 10^{11}$ pfu/ml) được ủ ở các nhiệt độ 37°C, 45°C, 53°C, 60°C, 70°C, hoặc 80°C trong thời gian 0 phút, 10 phút, 30 phút, 60 phút, và 120 phút. Dung dịch này được pha

loãng theo chuỗi, và nuôi cấy 10 μ l mỗi dịch pha loãng ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ aga mềm để xác định độ chuẩn của dịch tan thể thực khuẩn. So sánh sự thay đổi về độ chuẩn theo nhiệt độ và thời gian phơi nhiễm được đánh giá để xác định độ ổn định với nhiệt của thể thực khuẩn so với độ chuẩn ở 0 giờ và 37°C. Các kết quả cho thấy rằng thể thực khuẩn không bị mất hoạt tính của nó ở nhiệt độ 70°C lên đến 2 giờ, bị mất hoạt tính của nó ở nhiệt độ 80°C trong 10 phút, nhưng bị mất hoạt tính hoàn toàn khi bị phơi nhiễm ở 80°C trong hơn 10 phút. Các kết quả được thể hiện trong FIG.7.

Ví dụ 10: Khả năng chịu đựng trong điều kiện sấy khô của thể thực khuẩn

Để sử dụng làm chất phụ gia thực phẩm, thể thực khuẩn được đánh giá về khả năng chịu đựng trong điều kiện sấy khô trong quá trình chế biến. Trên cơ sở các kết quả của thử nghiệm về độ ổn định nhiệt, tiến hành thử nghiệm về khả năng chịu đựng này bằng cách sử dụng máy phun sấy (Lab Plant). Dextrin và đường đều là chất khử trùng được bổ sung lần lượt với lượng 40% và 2% (khối lượng/thể tích) vào 50 mL dung dịch Φ CJ7 có độ chuẩn 1,0x10¹¹ pfu/ml. Dung dịch thu được được phun vào bên trong máy phun sấy trong đó mặt trong và mặt ngoài của máy được duy trì lần lượt ở 120°C và 70°C. Từ đó, 0,3g bột thu được được tái tạo huyền phù trong 2 mL dung dịch SM và được xác định giá trị độ chuẩn. Sau khi sấy khô, thể thực khuẩn hoàn toàn không bị giảm hoạt tính so với độ chuẩn trước khi sấy. Các kết quả được thể hiện trong FIG.8.

Ví dụ 11: Phổ của các chủng tế bào vật chủ kiểu đại nhiễm thể thực khuẩn

Hoạt tính gây tan của thể thực khuẩn Φ CJ7 được đánh giá đối với *Salmonella Enteritidis* kiểu đại Hàn Quốc (36 chủng), *Salmonella Typhimurium* (22 chủng), *Salmonella Gallinarum* (56 chủng), *Salmonella Pullorum* (19 chủng), *Salmonella Choleraesuis* (2 chủng), *Salmonella Derby* (4 chủng) và *Salmonella Arizona* (1 chủng), và *Salmonella Bongori* (1 chủng), thu được từ Phòng thí nghiệm bệnh gia cầm, Ban thuốc thú y, Đại học quốc gia Seoul, và Trung tâm Nghiên cứu và Đánh giá quốc gia Thú y và Trung tâm không chế và phòng bệnh Hàn Quốc (Laboratory of Avian Diseases, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, and National Veterinary Research and Quarantine Service and the Korea Centers for Disease Control and Prevention), ngoài các chủng được sử dụng trong sáng chế SE (SE SGSC 2282), ST (ATCC ST14028), SG (SGSC SG2293) và SP (SGSC SP2295). Trộn 150 μ l

môi trường nuôi cấy lắc mỗi chủng ($OD_{600}=2$), và nuôi cấy 10 μ l dung dịch Φ CJ7 (10^{10} pfu/ml) ở nhiệt độ 37°C trong 18 giờ bằng phương pháp phủ aga mềm để kiểm tra tạo vết tan. Quan sát thấy rằng thể thực khuẩn Φ CJ7 có hoạt tính gây tan bằng 94% đối với tất cả các chủng SE, ST, SG và SP. Các kết quả được thể hiện ở Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3
Hoạt tính gây tan của Φ CJ7 kháng các chủng kiểu đại Hàn Quốc
SE, ST, SG, và SP

Kiểu huyết thanh	Tên chủng	Tạo vết tan Φ CJ7	Kiểu huyết thanh	Tên chủng	Tạo vết tan Φ CJ7
SG	SNU SG1	O	ST	SNU ST1	O
	SNU SG2	O		SNU ST2	O
	SNU SG3	O		SNU ST3	O
	SNU SG4	O		SNU ST4	O
	SNU SG5	O		SNU ST7	O
	SNU SG6	O		SNU ST8	O
	SNU SG7	O		SNU ST11	O
	SNU SG8	O		SNU ST12	O
	SNU SG9	O		SNU ST13	X
	SNU SG10	O		SNU ST14	O
	SNU SG11	O		SNU ST17	O
	SNU SG12	O		SNU ST18	O
	SNU SG13	O		SNU ST19	X
	SNU SG14	O		SNU ST20	O
	SNU SG15	O		SNU ST25	O
	SNU SG16	O		SNU ST26	O
	SNU SG17	O		SNU ST37	O
	SNU SG18	O		SNU ST38	O
	SNU SG19	O		SNU ST41	O
	SNU SG20	O		SNU ST42	O
	SNU SG21	O		ATCC UK1	O
	SNU SG22	O		ATCC 14028S	O

	SNU SG23	O		SGSC STM141	O
	SNU SG24	O		SGSC STM260	O
	SNU SG25	O		SGSC STM SA2197	O
	SNU SG26	O	SE	SGSC SE2282	O
	SNU SG27	O		SGSC SE2377	O
	SNU SG28	O		PT4 S1400194	O
	SNU SG30	O		PT4 LA52	O
	SNU SG31	O		NVRQS SE004	O
	SNU SG32	O		NVRQS SE005	O
	SNU SG33	O		KCDC SE008	O
	SNU SG34	O		KCDC SE009	O
	SNU SG36	O		KCDC SE010	O
	SNU SG37	O		KCDC SE011	O
	SNU SG38	O		KCDC SE012	O
	SNU SG39	O		KCDC SE013	O
	SNU SG40	O		KCDC SE014	O
	SNU SG41	O		KCDC SE015	O
	SNU SG42	O		KCDC SE016	O
	SNU SG43	O		KCDC SE017	O
	SNU SG44	O		KCDC SE018	O
	SNU SG45	O		KCDC SE019	O
	SNU SG46	O		KCDC SE020	O
	SNU SG47	O		KCDC SE021	O
	SNU SG48	O		KCDC SE022	O
	SNU SG49	O		KCDC SE023	O
	SNU SG50	O		KCDC SE024	O
	SGSC SG9184	O		KCDC SE025	O
	SGSC SG2292	O		KCDC SE026	O
	SGSC SG2293	O		KCDC SE027	O
	SGSC SG2744	O		KCDC SE028	O
	SGSC SG2796	O		KCDC SE029	O
SP	SNU SP1	O		KCDC SE030	O

	SNU SP4	O		KCDC SE031	O
	SNU SP5	O		KCDC SE032	O
	SNU SP8	O		KCDC SE033	O
	SNU SP11	O		KCDC SE034	O
	SGSC SP2294	O		KCDC SE035	O
	SGSC SP2295	O		KCDC SE036	O
	SGSC SP2737	O		KCDC SE037	O
	SGSC SP2739	O	SC	ATCC SC10708	X
	SGSC SP2742	O		ATCC SC2929	X
	SGSC SP2743	O	SD	ATCC SD6960	X
	SGSC SP2745	O		ATCC SD2466	O
	SGSC SP2751	O		ATCC SD2467	O
	SGSC SP4663	O		ATCC SD2468	X
	SGSC SP4664	O	SA	ATCC SA13314	X
	SGSC SP4665	O	SB	ATCC SB43975	X
	SGSC SP4666	O			
	SGSC SP4667	O			
	SGSC SA1684	O			

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

* SGSC: Trung tâm lưu trữ di truyền salmonella

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

* KCDC : Trung tâm không chế và phòng ngừa bệnh ở Hàn Quốc

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

Để sử dụng an toàn trong việc phòng ngừa bệnh phó thương hàn, ngộ độc thực phẩm nhiễm *Salmonella*, bệnh thương hàn và bệnh bạch lỵ thương hàn, thể thực khuẩn được thử nghiệm độc tính in vivo. Thử nghiệm độc tính được tiến hành với các liều riêng rẽ dùng qua đường miệng. Trong thử nghiệm này, chuột được cho dùng liều riêng rẽ chứa ΦCJ7 qua đường miệng và được kiểm tra về độc tính cấp tính để xác định nồng độ gây chết xấp xỉ của ΦCJ7. Để đạt được mục đích này, trước tiên, chuột được và chuột cái (SD) không chứa mầm bệnh đặc hiệu (specific-pathogen free - SPF) 7 tuần tuổi, mỗi nhóm gồm 10 con, được để đói trong 24 giờ trước khi cho dùng ΦCJ7.

Vào ngày dùng thể thực khuẩn, 5 con chuột đực và 5 con chuột cái được cho dùng ΦCJ7 qua đường miệng với liều 10 mL/kg có độ chuẩn 1×10^{12} pfu/ml bằng cách sử dụng đầu dò qua đường miệng, đồng thời 5 con thuộc nhóm đối chứng được cho dùng hỗn hợp 20mM Tris-HCl và 2mM MgCl₂ qua đường miệng. Bốn giờ sau khi dùng qua đường miệng, cung cấp thức ăn cho chuột. Bốn giờ kiểm tra một lần, bắt đầu từ phút thứ 30 sau khi dùng trong ngày dùng thể thực khuẩn. Sau đó, chúng được kiểm tra các triệu chứng chung 1 lần/ngày trong 14 ngày. Không có con nào bị chết. ΦCJ7 không gây ra các triệu chứng nhiễm độc cũng như các triệu chứng lâm sàng đáng chú ý. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 4 và 5 dưới đây. Thể trọng được ghi lại trước và sau khi dùng 1, 3, 7, 10 và 14 ngày. Không thấy có sự thay đổi đáng kể về thể trọng, chứng tỏ rằng ΦCJ7 không gây ra phản ứng độc tính đủ để làm giảm sự thèm ăn hoặc thay đổi thể trọng. Các kết quả này được thể hiện ở FIG.9. Nhận thấy không có triệu chứng bất thường đáng chú ý ở cơ quan bất kỳ như được kiểm tra bằng cách khám nghiệm và bằng mắt thường. Do đó, thể thực khuẩn ΦCJ7 mới là không có độc tính.

Bảng 4

Thử nghiệm độc tính khi dùng ΦCJ7 qua đường miệng
đối với tỷ lệ tử vong và các triệu chứng chung

Giới tính	Liều pfu/kg	Tỷ lệ tử vong cuối		Dấu hiệu lâm sàng	
		Đực	Cái	Đực	Cái
Đực	Đối chứng	0/5	0/5	0/5	0/5
	10^{13}	0/5	0/5	0/5	0/5
Cái	Đối chứng	0/5	0/5	0/5	0/5
	10^{13}	0/5	0/5	0/5	0/5

Bảng 5

Thử nghiệm độc tính khi dùng ΦCJ7 qua đường miệng
đối với sự bất thường ở các cơ quan

Giới tính	Liều (pfu/kg)	Nhận thấy rõ ràng	Tần suất
Đực	Đối chứng	N.A.D ^a	5/5
	10^{13}	N.A.D	5/5
Cái	Đối chứng	N.A.D	5/5
	10^{13}	N.A.D	5/5

a: không phát hiện thấy triệu chứng bất thường.

Ví dụ 13: Hiệu lực của thể thực khuẩn

Để đánh giá hiệu lực của ΦCJ7 để dùng trong phòng ngừa và điều trị các bệnh do *Salmonella* gây ra, thể thực khuẩn được đánh giá về khả năng khống chế salmonella ở nông trại nuôi gà, trong đó 20.000 con gà đẻ trứng được nuôi trong điều kiện khắc nghiệt kháng nhiễm salmonella.

Nước uống chứa ΦCJ7 ở nồng độ 10^6 pfu/L được cấp trong tổng thời gian 25 ngày. Trước tiên, nó được cấp trong 17 ngày. Sau đó, nước uống không chứa ΦCJ7 được cấp trong 10 ngày trước khi bắt đầu cấp lại nước uống chứa ΦCJ7 trong 8 ngày. Trước và sau khi cấp ΦCJ7, tiến hành kiểm tra salmonella trong môi trường ổ rơm và bụi và để nuôi các mẫu gà non, lông và vỏ trứng. Trước khi cấp ΦCJ7, phát hiện thấy có salmonella ở lông nơi ấp trứng và gà non, chứng tỏ rằng rất khó để khống chế salmonella ở nông trại rộng mặc dù các thiết bị khống chế salmonella đã được vận hành ở đó. Trái lại, sau khi cấp ΦCJ7, không phát hiện thấy vi khuẩn salmonella ở các môi trường và các mẫu nuôi này. Do đó, việc cấp ΦCJ7 ở dạng nước uống là có tác dụng phòng ngừa sự lây lan salmonella và khống chế salmonella. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 6 dưới đây.

Bảng 6
Tác dụng tẩy uế của ΦCJ7 đối với *Salmonella*

	Ngày	Môi trường		Mẫu nuôi		
Trước khi cấp		Ổ rơm	Bụi	Gà	Lông	Vỏ trứng
	-30	-	-	-	+	-
	-21	+	+	-	+	-
	-16	-	-	+	-	-
	-13	-	-	-	+	-
Cấp sơ bộ ΦCJ7	0	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-

	10	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-
Cấp ngắt quãng	-10	-	-	-	-	-
	-7	-	-	-	-	-
	-4	-	-	-	-	-
	-1	-	-	-	-	-
Cấp thứ cấp ΦCJ7	0	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-

Ví dụ 14: Hiệu lực của thể thực khuẩn trong chất khử trùng

Để đánh giá hiệu lực của thể thực khuẩn làm chất làm sạch kháng salmonella. Nhằm mục đích so sánh, harasol (Yuhan Corporation, natri hypochlorua 4,6%, chất khử trùng ở chuồng gia cầm, ngân hàng và nước uống) được sử dụng làm nhóm đối chứng trong điều kiện nước nhẹ, nguyên liệu hữu cơ, và sữa.

ΦCJ7 có độ chuẩn 10^9 pfu/ml, harasol (natri hypochlorua 4,6%), và chủng SE được tạo ra. Sau khi phát triển tới O.D.=0,5, SE được pha loãng 5 lần trong nước nhẹ để thu được O.D.= 0,1. Hai bình thốt cổ 250mL, mỗi bình chứa 50mL nước nhẹ, dịch pha loãng nguyên liệu hữu cơ, hoặc 20% sữa pha loãng trong nước nhẹ, được điều chế. Thể thực khuẩn được bổ sung với lượng 10^7 pfu vào một bình đồng thời 1/240 dịch pha loãng parasol được bổ sung vào bình còn lại. Bổ sung vào mỗi bình 2 mL môi trường nuôi cấy vi khuẩn có O.D.=0,1, sau đó ủ ở 37°C và 200 vòng/phút bằng cách lấy mẫu ở 0,5 giờ, 2,5 giờ, 6 giờ, và 10 giờ. Các mẫu này được pha loãng theo chuỗi và được dàn vào các thăm LB. Sau khi ủ ở 37°C trong 18 giờ, các tế bào được đếm để xác định hoạt tính kháng khuẩn. Khi sử dụng nước nhẹ, chất khử trùng thông thường có hoạt tính kháng khuẩn thay đổi trong phạm vi rộng phụ thuộc vào điều kiện. Trái lại, thể thực khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn đồng nhất ngay cả trong các điều kiện khác

nhau. Các kết quả được thể hiện ở FIG.10.

Ví dụ 15: Hiệu lực của thể thực khuẩn trong chất làm sạch

Để sử dụng làm chất làm sạch cho sản phẩm thịt, thể thực khuẩn được đánh giá khả năng khống chế vi khuẩn salmonella so với chất làm sạch thông thường (4~6% Natri hypochlorua). Để tiến hành, miếng ức gà 50g được mua từ cửa hàng. Môi trường nuôi cấy lactic chứa SE (O.D.=2) được điều chỉnh tới nồng độ 10^8 cfu/ml và phân phối đồng đều với lượng 200 μ L lên miếng ức gà này, sau đó để khô ở nhiệt độ trong phòng trong 12 phút. Thể thực khuẩn Φ CJ7 được cấp với nồng độ 10^9 pfu/L, 10^{10} pfu/L, và 10^{11} pfu/L và 50 ppm trong các bình xịt tương ứng và chất làm sạch clorua có nồng độ 50 ppm trong bình xịt. Chúng được phun xịt với tốc độ 1 lần/giây trong 10 giây. Các miếng ức gà đã xử lý được đặt trong các hộp sạch tương ứng, sau đó bổ sung 30mL dung dịch đệm SM. Các hộp này được lắc theo đường bán nguyệt. Dịch WCR (whole carcass rinse - nước rửa thịt) thu được như vậy được pha loãng theo chuỗi và dịch pha loãng được phân phối vào môi trường LB, sau đó ủ ở 37°C trong 18 giờ để xác định số lượng SE. Ngay sau khi xử lý, nhận thấy chất làm sạch tiêu diệt được vi khuẩn salmonella. Tuy nhiên, thể thực khuẩn Φ CJ7 được xác định là có tác dụng rất tốt. Ngoài ra, theo thời gian, thể thực khuẩn có hoạt tính làm sạch không đổi, so với hợp chất hóa học. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 7 dưới đây.

Bảng 7
So sánh tác dụng làm sạch giữa Φ CJ7 và chất làm sạch

Thời gian (phút)	Chất	Tỷ lệ khử <i>Salmonella</i> (%)
0	Dung dịch đệm SM	
	PHI 10^9 pfu/L	3,70
	PHI 10^{10} pfu/L	1,27
	PHI 10^{11} pfu/L	48,09
	Clorua 50 ppm	(+14,50)
30	Dung dịch đệm SM	
	PHI 10^9 pfu/L	21,31
	PHI 10^{10} pfu/L	22,45
	PHI 10^{11} pfu/L	68,71
	Clorua 50 ppm	9,52

200	Dung dịch đậm SM	
	PHI 10 ⁹ pfu/L	36,00
	PHI 10 ¹⁰ pfu/L	43,75
	PHI 10 ¹¹ pfu/L	49,63
	Clorua 50 ppm	12,59
1440	Dung dịch đậm SM	
	PHI 10 ⁹ pfu/L	24,39
	PHI 10 ¹⁰ pfu/L	60,58
	PHI 10 ¹¹ pfu/L	73,33
	Clorua 50 ppm	13,33

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Ngoài tính bền axit, nhiệt và sấy tuyệt vời như đã nêu trên, thể thực khuẩn mới theo sáng chế có hoạt tính kháng khuẩn đặc hiệu kháng một hoặc nhiều vi khuẩn *Salmonella* được chọn từ nhóm gồm *Salmonella Enteritidis* (SE), *Salmonella Typhimurium* (ST), *Salmonella Gallinarum* (SG), và *Salmonella Pullorum* (SP) mà không làm ảnh hưởng đến vi khuẩn có lợi, chúng có thể được sử dụng rộng rãi làm hoạt chất cho chất trị liệu, thức ăn hoặc nước uống cho vật nuôi, chất làm sạch và chất khử trùng dùng để phòng ngừa và điều trị các bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum* hoặc *Salmonella Pullorum* bao gồm bệnh phó thương hàn, ngộ độc thực phẩm nhiễm *Salmonella*, bệnh thương hàn, và bệnh bạch ly thương hàn.

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



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

To, CJ CheilJedang Corporation
500 5-GA NAMDAEMUN-RO
CHUNG-KU, SEOUL
REPUBLIC OF KOREA

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : Bacteriophage ΦCJ7	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCCM11030P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on August. 14. 2009. (date of the original deposit) ¹	
IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : Korean Culture Center of Microorganisms Address : 361-221, Yurim B/D Hongje-1-dong, Seodaemun-gu SEOUL 120-091 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized person(s) Date: August. 14. 2009.

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired; where a deposit made outside the Budapest Treaty after the acquisition of the status of international depositary authority is converted into a deposit under the Budapest Treaty, such date is the date on which the microorganism was received by the international depositary authority.

Form BP/4

Sole page

한국미생물보존센터 (KCCM) PRESIDENT

120-091 서울특별시 서대문구 용재동 361-221 Tel: 02-391-0950, 396-0950 Fax: 02-392-2859 E-mail: kicc@kccm.or.kr

KOREAN CULTURE CENTER OF MICROORGANISMS INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

361-221 Hongje-1dong, Seodaemun-gu, Seoul, 120-091, Korea Tel: 82-2-391-0950, 396-0950 Fax: 82-2-392-2859 E-mail: kicc@kccm.or.kr

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể thực khuẩn phân lập, có hoạt tính kháng khuẩn đặc hiệu kháng một hoặc nhiều vi khuẩn *Salmonella* được chọn từ nhóm gồm *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum* và *Salmonella Pullorum*, được nộp lưu với số truy cập KCCM11030P.
2. Chế phẩm dùng để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn gây ra bởi một hoặc nhiều chủng *Salmonella* được chọn từ nhóm gồm *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Gallinarum*, và *Salmonella Pullorum*, bao gồm hoạt chất là thể thực khuẩn theo điểm 1.
3. Chất kháng sinh chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo điểm 1.
4. Thức ăn cho vật nuôi chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo điểm 1.
5. Nước uống cho vật nuôi chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo điểm 1.
6. Chất khử trùng chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo điểm 1.
7. Chất làm sạch chứa hoạt chất là thể thực khuẩn theo điểm 1.

FIG.1

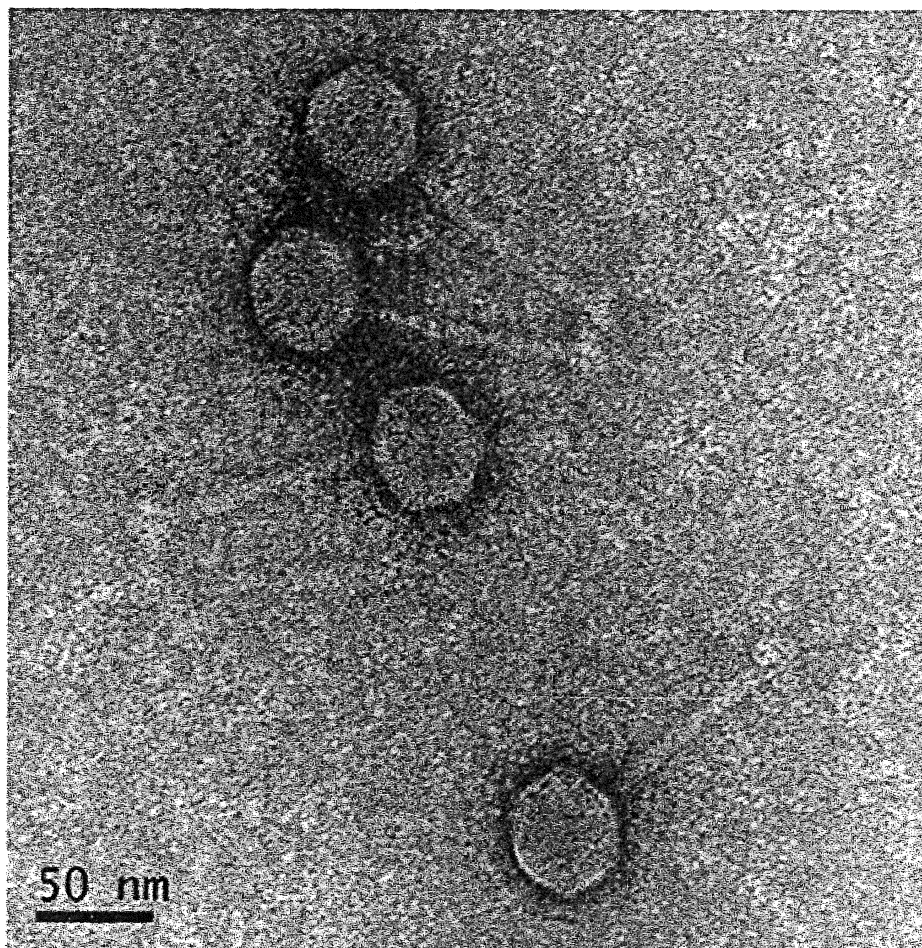


FIG.2

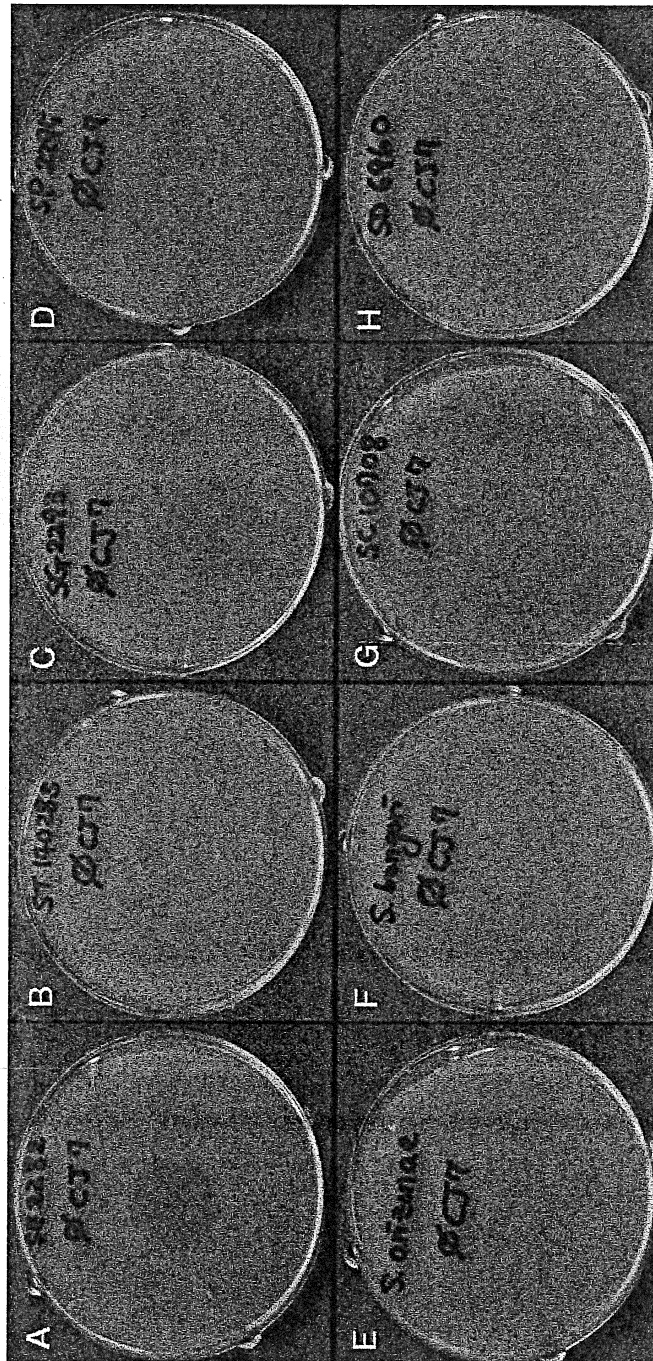


FIG.3

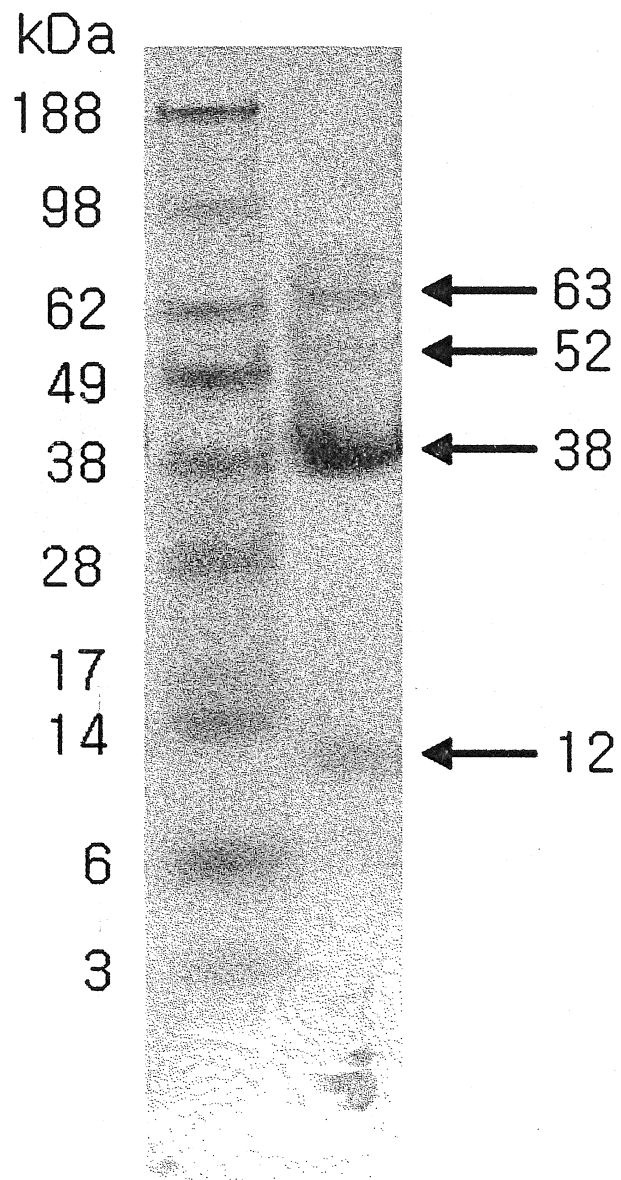


FIG.4

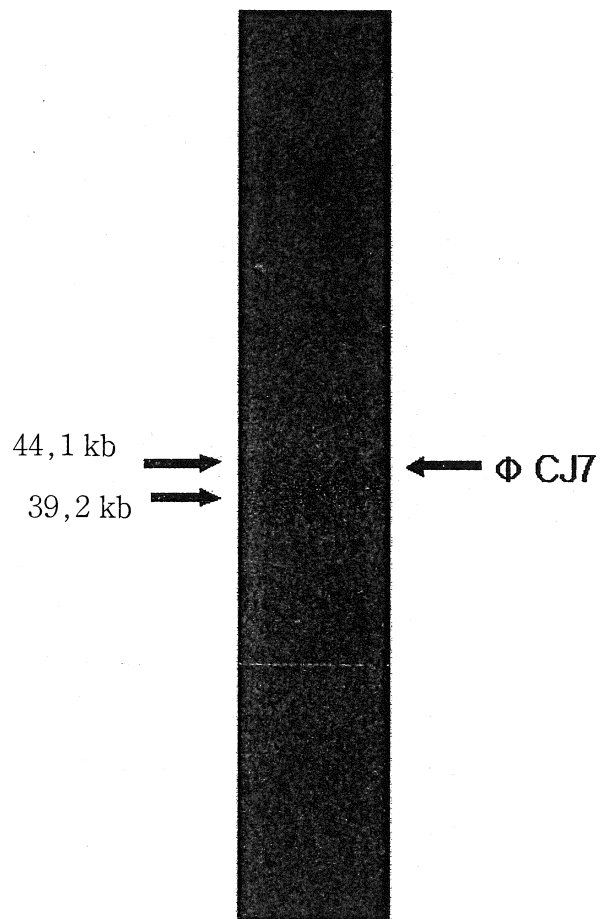


FIG.5

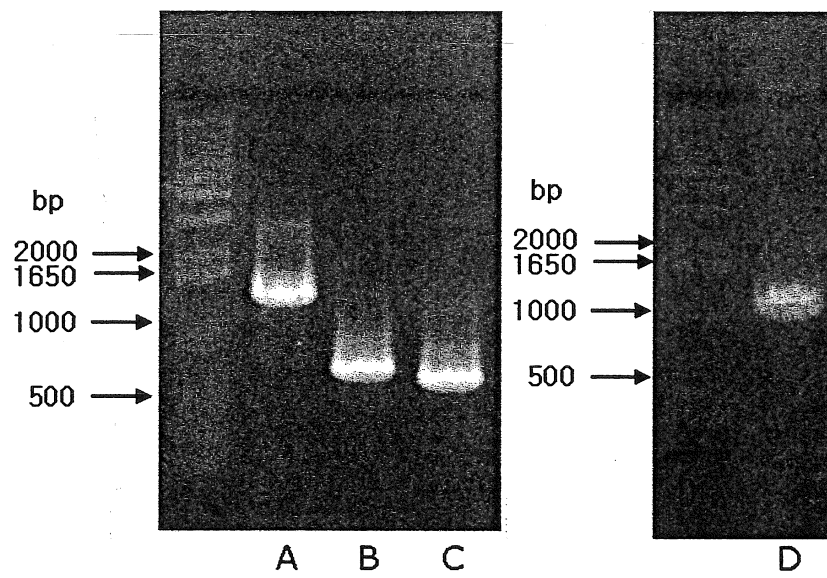


FIG.6

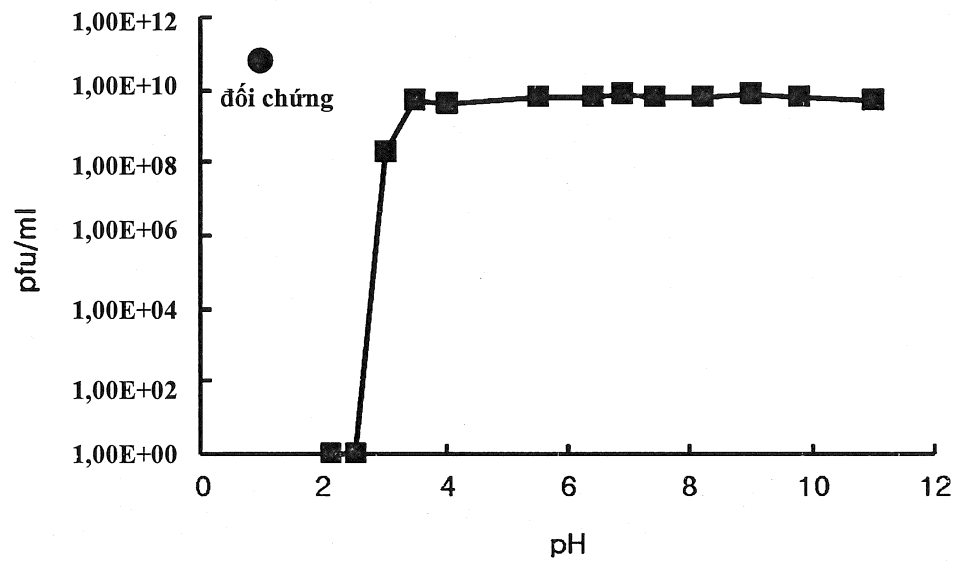


FIG.7

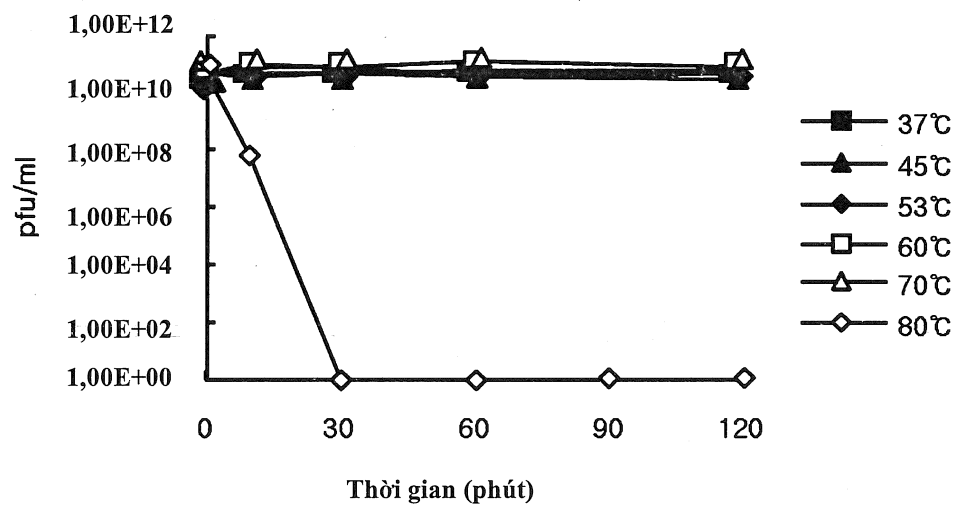


FIG.8

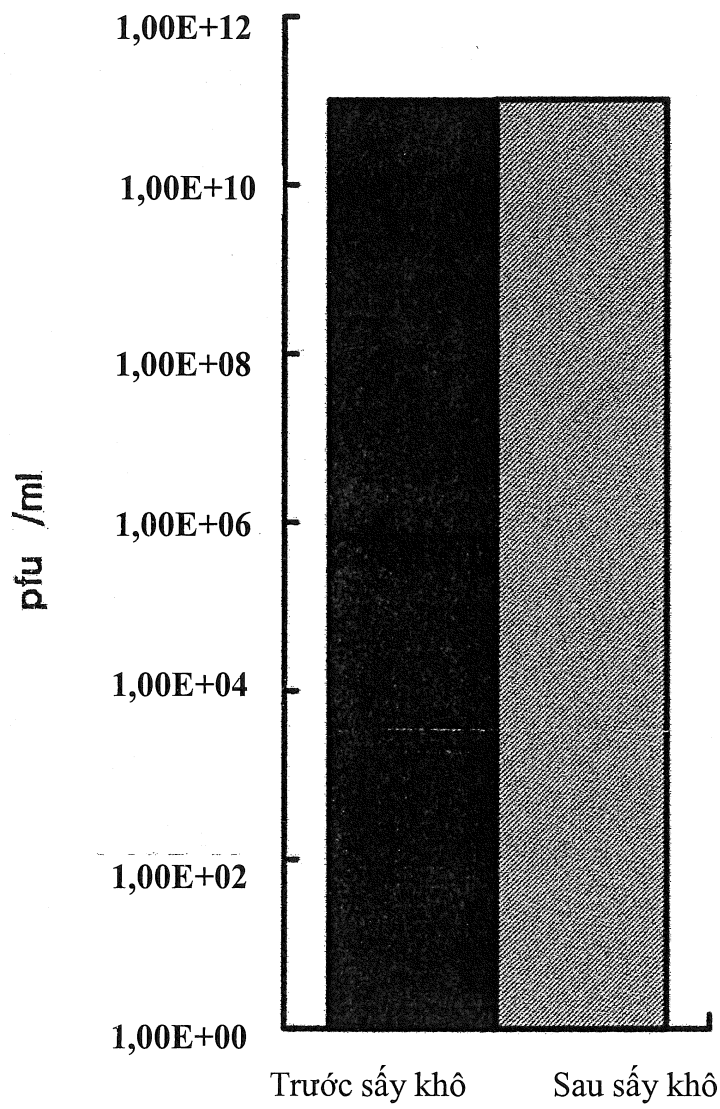


FIG. 9

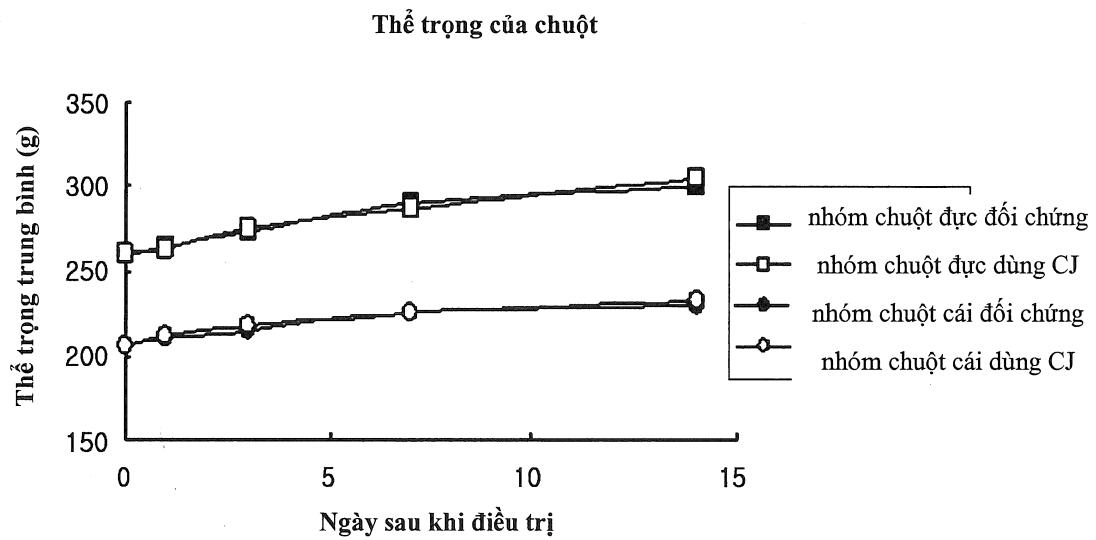
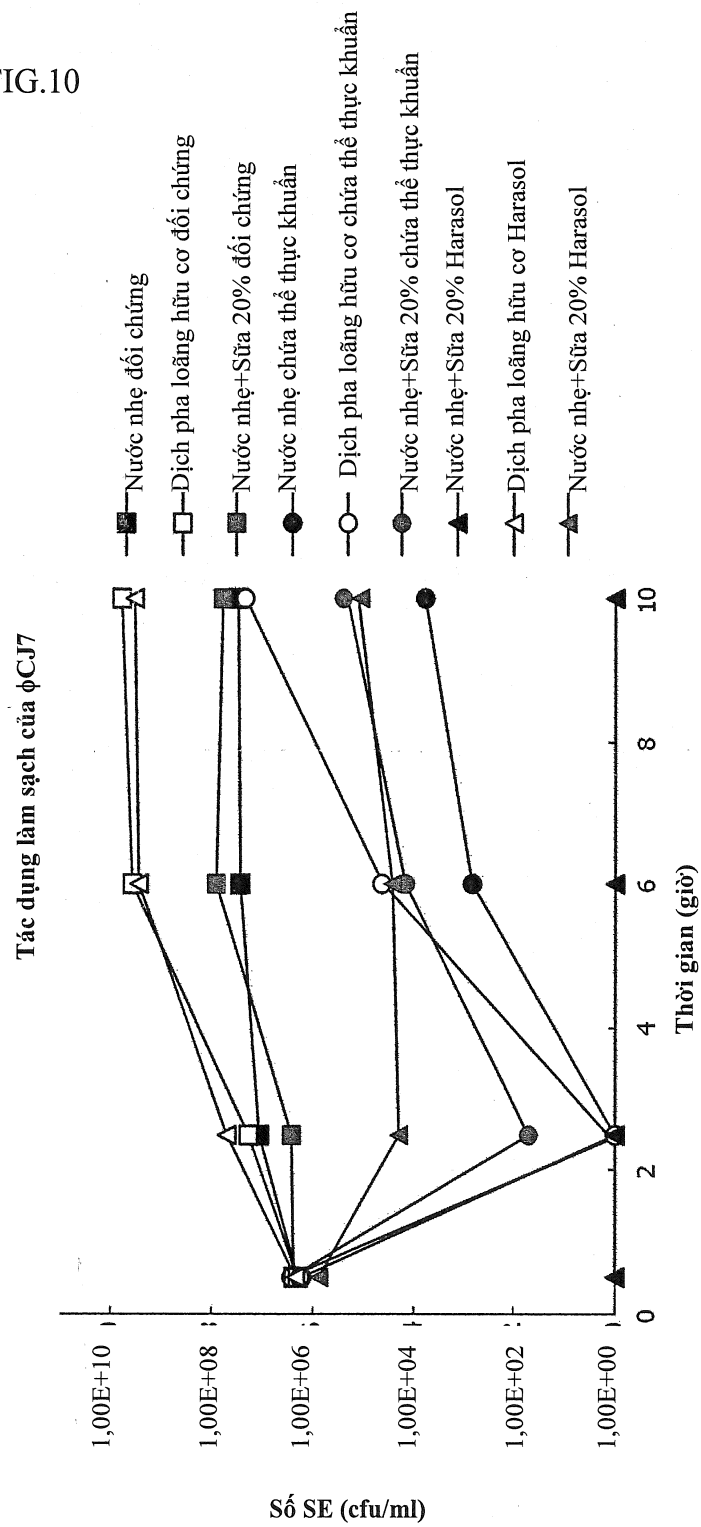


FIG.10



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> CJ Cheiljedang Corporation

<120> Tế bào thực khuẩn và chế phẩm chứa tế bào thực khuẩn này

<130> OPA10064/PCT

<150> US61/239.748

<151> 2009-09-03

<160> 16

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1394

<212> ADN

<213> Tế bào thực khuẩn KCCM11030P

<400> 1

cctatagtat cgaaaggcta ctcgatgacg cgaggaaca acgtgtggcg agtagacctg 60

gccggtggcg gggttcgcca ggggcgtgat acatacttg atatgtccc gattaacgtt 120

accctggtcg tatcaccgtt ggggcggcaa gcattcctca gttcatgga gaaggtagac 180

ggaggggctt ccagtttctg gatgaaacac gacttgggtc aggtatcga ggattaccag 240

gttactctaa catctacgtg gaacgagtc accgacgacg ggaagaactg ggtaataact 300

ttcacggcca cagccgagaa atcaccattc caggaagccg gcagcgctg tcttaaccag 360

aatctgcccg acttatatgg atgctacggc gattgtcttg gtgaatttct taaaacttac 420

ggagtgtacc aaactacatt ccctgaatc tgggaccaa tgcaatgagt caggaatcag 480

tagaagcggc ataccggcgt aagctggcgt ccaatcccga tggcgagatg gattttatta 540

ccctggagat atcccaccct ctcttttga agcgctggtt gcttgtcgc ggggctaacg 600

acttgaccgc tactctagag acgggtgagg ttgttacatt cgagggtacg ccgatggagg 660

ccaagaacgc cgccaacaat aacgatatgg accagaccgc ctctttctct ttgccgatg 720

tgcttaatat actggacgag gaaatggacc gcatccctta tgataataag gaattgcca 780

aattcatctt ccggcggtac gtgagcacgg acctgtcata cccatgcgat gggccggtgg 840

tatatgaatt gcaaactc acacaagaga aaggagtgtt cacagcggaa acaggtacac 900

ccatgcttaa ccaacgagct accggaatcc tgatgacgcc ggaggagatt cctttacttc 960

gagggatact gacatcgtga atattaacga ttacactggc ctgccgtatg acttccgccg 1020

ccgtaattgt tggcaccacg tccgcaacgt ccgggctgac gcggggttat caactccaat 1080

gttcgatgta acaagcccaa cggcaataga tgcagcttgc gatgacggcc attcagaccc 1140

taaaggtctt aggcgagtcg ttactccgca gaattttgac gccgttctac tcggtgtgaa 1200

acatcgaggg cggatagtggt ggcacgctgg ggtatattac gaagggatgg ttagccactg 1260

tgagctggcg tccagacagg ttagactgga tagtctggaa gacctaaag atacttattc 1320

ggagattgaa ttttggcgct agtaattcac tacacacgaa acgaagacgg cacatttgac 1380

gttaaacggt atcg 1394

<210> 2

<211> 672

<212> ADN

<213> Tế bào thực khuẩn KCCM11030P

<400> 2

aaccgggagg tgtgccgta ttatgcgtat aagttcgggg attgtatgat ttcagcacat 60

cacgggcatt gttctaactt tactaaagta gagcagtcta taataggtaa gtatcgggag 120

atgtacgggc agtgaagtt cacatatgtc catacgggtc acctacacca ccgggcggtt 180

aaagagacta atcttctaatt tgttgagcaa caccagacat tagcggctaa agatgagtat 240

tctagtaaag gcggttatta ttcaggtaga agcgcaaagtg tgattacata ccataaacgt 300

tacggggagg tgtcccgcat aagtatacct gttgaaatgc tgcgagacat aaaccccaaa 360

tcaacatact aaaatgtagg tgaaaggatg gattggagtg aggttttttag ctacaaaaac 420

ggcgtcctat actggaaagt caaatcatgt cgccgtaacg atgtgaatgt aggggatgtg 480

gccgggagtt tgtgtaaaaa cggctattgg tatgtcatgt tcggtaacg taagtttaaa 540

aggtctaggg tgggtgatga gatgttctca ggtaagattc caaaaggatt tgtcatagac 600

cacaccaacc atgatacctg tgacgacaga attgaaaacc tgtcatgcaa atccagaagg 660

gacaacatgg tt 672

<210> 3

<211> 581

<212> ADN

<213> Thể thực khuẩn KCCM11030P

<400> 3

gacggatggc ttgctgcgtg atctggatgt gttctccacg tccggactgg ccttgcctg 60

gcgtaccgtc acgggatttc caacctcaag ctgaaacacg ccaaccacaa ataaaaatgc 120

catgccggat gcaacacatc cggcaacttc acacttactc gtccagcaga atcactttgc 180

cgatatacgg cagatgacgg taacgctgtg cgtaatcaat gccgtaacc accacaaact 240

catccgggat cgagaaaccg ataaattcta ccgggacgtt cacttcacga cgggacggtt 300

tatccagcag cgtacaaatc gccagcgact tcggttcgcg caggcttaag atctcacga 360

ctttcgacag tgtatccccg agtcgatgat atcttcaaca atcagcacgt ccttgccacg 420

gatatcttca tccagatctt tgaggatttt cacatcatgg gtggtggaca tgccgctacc 480

gtagctggag gcggtcataa agtcgacttc atgagatacc tgaacttcac ggcacaggtc 540

cgccataaac ataatgagc cacgcagcaa ggcacggtc a 581

<210> 4

<211> 1008

<212> ADN

<213> Thể thực khuẩn KCCM11030P

<400> 4

acaggcaatt tagcatactc atggtcgct cgcaatcgcc gtgaggaacg cgctgacatt 60

aacgtttaca ccacgacctc cggcacctgg gatgagttg ttgaacttat gcaaccgctt 120

aaacgttcgc gccggaaccc caagacagac cccggctaca ttaccgccgc ttgtaccgcc 180

acggtaagct ctaccgtaa agaagccgcc gaaggatatgt tctatcgctg caatgcgtct 240

gttacgtctt catccctggc ctatgccgac gtggacagcg cgacgccgga agagttcgca 300

accgactgtg agatggtgcg cgagtcacgt tacgcaatga tgctctacac cacggcatcc 360

cacaccgaag aagcgccgcg ctaccgctc gttatgcctg tacgcactcc ggtaaccggt 420

ggcgacatca tccgcatccg gtacggcctg ttggcacact tcctaaagg tcgtgacgtg 480

gatagcgccg gggtcacctt gtcgcagcct atgtaccgcc cgccggtagg aagccaggtc 540

atcgtgtctg aaagtagccg catgattacg gcgagcaagc ttatggagga agttcctgaa 600

attaacgtta ccggtgcttc tgattataaa gttccggagg gtgaacaatc cgaattaacc 660

gacctgttg aagagttgc tttgaattc ggccggacgta tgaccgaccg cggcctgcaa 720

atgcccgcca cgccggagca cgccgcccac tacactaccg gcgaacctaa gcaggacgac 780

ttcctgttct gttggccg cgacggcttc gagcgacca acgttacct gtaccacgat 840

accgacctgg tagctacggg cgggatgaag cctggcggac gggatatgtg ggcttacgct 900

tgtgcggcca ccggcttacc tttgaccgt gtggagtgcc gcttgggtgg gcggaggggg 960

tcacttgca cgaagaagac ctggacgacg agaccaccag caccacaa 1008

<210> 5

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 5

cctatagtat cgaaaggc

18

<210> 6

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 6

cgataacgtt taacgtcaaa tg

22

<210> 7

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 7

aaccgggagg tgcgccg

18

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 8

aaccatgttg tcccttctgg

20

<210> 9

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 9

gacggatggc ttgctgcg

18

<210> 10

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 10

tgaccgatgc cttgctgc

18

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 11

acaggcaatt tagcatactc

20

<210> 12

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 12

ttgtggtgct ggtggttctt cg

22

<210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 13

cgggcctctt cgctattacg 20

<210> 14

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 14

aggcttaccc gtcttactgt 20

<210> 15

<211> 17

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 15

gtaaaacgac ggccagt

17

<210> 16

<211> 16

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> đoạn mồi

<400> 16

aacagctatg accatg

16