



(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



1-0034983

(51)⁸ C12N 7/00; A01N 63/00; A61K 35/76 (13) B

(21) 1-2018-04900

(22) 03/04/2017

(86) PCT/PL2017/050018 03/04/2017

(87) WO 2017/176136 12/10/2017

(30) P.416716 03/04/2016 PL

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/04/2019 373A

(73) PROTEON PHARMACEUTICALS S.A. (PL)

ul. Tylna 3A, 90-364 Łódź, Poland

(72) WOJTASIK, Arkadiusz (PL); GÓRECKA, Elżbieta (PL); WÓJCIK, Ewelina (PL); STAŃCZYK, Małgorzata (PL); KOŁSUT, Joanna (PL); KLIMCZAK, Justyna (PL); DASTYCH, Jarosław (PL); SIWICKI, Andrzej K (PL); SCHULZ, Patrycja (PL).

(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) CÁC CHŨNG THỰC KHUẨN THỂ ĐỀ NGĂN NGỪA VÀ ĐIỀU TRỊ SỰ LÂY NHIỄM CỦA CÁC ĐỘNG VẬT NUÔI

(57) Sáng chế đề cập đến các chủng thực khuẩn thể mới để ngăn ngừa và điều trị sự lây nhiễm của các động vật nuôi, đặc biệt hữu dụng trong nuôi cá. Thực khuẩn thể này được cấp cho các động vật gặp nguy hiểm thông qua sự nhúng chìm, tốt hơn là cách khoảng thời gian 24 giờ. Sự lây nhiễm trong nuôi cá là sự lây nhiễm bởi chủng gây bệnh của *Aeromonas* sp. và *Pseudomonas* sp., đặc biệt là chủng của *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* hoặc *Pseudomonas fluorescens*, trong đó thực khuẩn thể được sử dụng là chủng thực khuẩn thể được chọn từ nhóm được nộp lưu trong Bộ Sưu Tập Vi Sinh Vật Ba Lan có các số nộp lưu sau đây: F/00096 (chủng 25AhydR2PP), F/00094 (chủng 50AhydR13PP), F/00098 (chủng 22PfluR64PP), F/00099 (chủng 67PfluR64PP), F/00100 (chủng 71PfluR64PP), F/00095 (chủng 98PfluR60PP) và F/00101 (chủng 60AhydR15PP).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các chủng thực khuẩn thể mới để ngăn ngừa và điều trị sự lây nhiễm của các động vật nuôi, đặc biệt hữu dụng trong nuôi cá.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nuôi trồng thủy sản là lĩnh vực tăng trưởng nhanh nhất trong sản xuất thực phẩm trên toàn thế giới. Tuy nhiên, một trong những trở ngại chính ngăn cản việc sử dụng chúng hữu hiệu là sự phát triển của các bệnh lây nhiễm ở cá dẫn đến tổn thất kinh tế rất lớn ước tính bằng hàng tỉ đô la mỗi năm. Yếu tố bệnh căn chính chịu trách nhiệm về sự phát triển của sự lây nhiễm này là vi khuẩn, chẳng hạn như *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Edwardsiella*, *Streptococcus*, *Lactococcus* và *Renibacterium* [Pridgeon JW, 2012, Sudheesh PS, 2012]. Theo thực tiễn thông thường, thức ăn được bổ sung kháng sinh để điều trị sự lây nhiễm vi khuẩn ở cá được nuôi. Tuy nhiên, do các cá thể bị bệnh hấp thụ thức ăn ít hơn và tác động của các yếu tố môi trường khác nhau, cách sử dụng thuốc này luôn không thỏa mãn. Hơn nữa, việc sử dụng quá nhiều của kháng sinh dẫn đến xuất hiện chủng vi khuẩn kháng kháng sinh đóng vai trò làm nguồn dự trữ gen kháng kháng sinh. Vì sự chuyển gen ngang, các gen này có thể được chuyển vào các tác nhân gây bệnh khác, bao gồm tác nhân gây bệnh ở người, và ảnh hưởng trực tiếp đến sức khỏe con người. Nhiều chất kháng vi sinh vật được sử dụng rộng rãi trong nuôi trồng thủy sản được WHO phân loại vào nhóm có sự ảnh hưởng quan trọng lên sức khỏe con người [Almeida A, 2009, Heuer OE, 2009]. Do sự phát triển mạnh mẽ và tầm quan trọng của ngành công nghiệp cá ở nhiều khu vực trên thế giới cũng như là sự việc sử dụng rộng rãi và không được điều tiết của kháng sinh ở lĩnh vực này, cần phải thực hiện các hành động nhằm ngăn ngừa sự lan rộng kháng kháng sinh và tối thiểu hóa nguy cơ gây các tác dụng phụ tiềm ẩn cho sức khỏe con người [Heuer O, 2009].

Việc sử dụng của các chế phẩm thực khuẩn thể có thể là giải pháp thay thế đáp lại sự gia tăng tính kháng kháng sinh của vi khuẩn. Thực khuẩn thể là các virus ở vi khuẩn có trong tự nhiên trong môi trường và thể hiện tính đặc hiệu đối với chủng vi

khuẩn hoặc chi vi khuẩn nhất định [Richards GP, 2014]. Trước đây, chúng được sử dụng cả trong việc điều trị và ngăn ngừa các bệnh lây nhiễm ở người [Eyer L., 2007]. Trong những năm gần đây, quan sát thấy có xu hướng gia tăng sự quan tâm về thực khuẩn thể cũng như là sử dụng chúng trong công nghệ sinh học hiện đại làm các chất mang protein và chất mang ADN trong vắc xin và làm giải pháp thay thế cho kháng sinh [Clark J, 2006]. Các kết quả của thử nghiệm lâm sàng và nghiên cứu *in vivo* được thực hiện trong vài năm trước đây xác nhận tính hiệu quả và an toàn cao của các chế phẩm thực khuẩn thể [Pirnay JP, 2012, Eyer J, 2007]. Các ưu điểm chính của liệu pháp thực khuẩn thể so với các kháng sinh được sử dụng rộng rãi là: tác dụng đặc hiệu chỉ chống lại chủng vi khuẩn hoặc chi vi khuẩn nhất định, không tạo ra tính kháng thực khuẩn thể của vi khuẩn nhờ vào tốc độ đột biến nhanh của virus dẫn đến hoạt tính thực khuẩn thể cao chống lại các tác nhân gây bệnh, chi phí điều trị tương đối thấp so với các chi phí liên quan đến việc tạo chế phẩm kháng sinh mới và không có các tác dụng phụ của liệu pháp này [Atterbury RJ, 2007, Bhardwaj SB, 2014].

Việc sử dụng vắc xin từ thực khuẩn thể có nhiều ưu điểm: không mang các gen kháng kháng sinh, bảo vệ ADN virus chống lại sự thoái hóa, phương thức sử dụng qua đường miệng của các vắc xin, sản xuất thực khuẩn thể tương đối rẻ, dễ dàng và rất nhanh chóng trên quy mô lớn [Clark J, 2006].

Có một số dữ liệu chỉ ra rằng tác dụng điều hòa miễn dịch của thực khuẩn thể lên chức năng của cả miễn dịch tế bào bẩm sinh và miễn dịch dịch thể, tức là sự thực bào, sự bùng phát hô hấp của sự sản xuất thực bào và xytokin [Górski A, 2012]. Nghiên cứu của Weber-Dąbrowska và cộng sự đã cho thấy sự ảnh hưởng của thực khuẩn thể lên sự kiểm soát sản xuất xytokin bởi tế bào máu [Weber-Dąbrowska B, 2000].

Các kết quả đã công bố và các giải pháp đã được cấp bằng sáng chế tập trung chủ yếu vào các phương pháp phân lập và xác định đặc điểm phân tử của thực khuẩn thể và ở mức độ thấp hơn nhiều, tập trung vào việc sử dụng thực khuẩn thể để xử lý các tác nhân vi khuẩn gây bệnh trong nuôi trồng thủy sản. Đã chứng minh được rằng thực khuẩn thể VP-1 đặc hiệu với *Vibrio anguillarum* và *Aeromonas salmonicida* [Pereira C, 2011]. Các thực khuẩn thể phân giải PAS-1 và ASP-1 gây ra sự giảm bớt lây nhiễm *Aeromonas salmonicida* ở cá hồi vân [Kim JH, 2012, Công Bố Đơn Sáng Chế Mỹ 2013/0323209 A1], trong khi đó thực khuẩn thể phiAS5 thuộc vào họ

Myoviridae thể hiện phổ hoạt tính rộng chống lại *Aeromonadaceae* và chủng *A. salmonicida* phụ loài *Salmonicida* kháng kháng sinh [Kim JH, 2012]. Đã xác nhận được tác dụng bảo vệ của các thực khuẩn thể được dùng qua đường miệng bằng nghiên cứu được thực hiện trên cá *Plecoglossus altivelis* bị lây nhiễm *P. plecoglossicida* qua thí nghiệm [Park S, 2000]. Hỗn hợp gồm có các thực khuẩn thể PFP1 và PFP12, được phân lập từ cá bị lây nhiễm, có hoạt tính phân giải mạnh chống lại *Pseudomonas fluorescens in vitro* [Prasad Y, 2010]. Sự kết hợp của ba hoặc nhiều hơn ba thực khuẩn thể gây ra sự tan của các thể đột biến của *A. salmonicida* HER 1107 mà không nhạy cảm đối với tác động của từng thực khuẩn thể đơn lẻ. Điều này cho thấy khả năng sử dụng thực khuẩn thể để bảo vệ cá hồi nâu khỏi sự phát triển bệnh nhọt [Imbeault S, 2006]. Có thể áp dụng hỗn hợp của một vài thực khuẩn thể đặc hiệu với vi khuẩn từ chi *Vibrio* trong việc điều trị sự lây nhiễm do *Vibrio anguillarum* gây ra ở cá hồi đại tây dương [Công Bố Đơn Sáng Chế Mỹ 2014/0105866 A]. Việc sử dụng thực khuẩn thể UP87 ở cá *Oreochromis niloticus* làm giảm tổng số lượng vi khuẩn *A. hydrophila* trong máu và không làm tăng tỷ lệ chết ở cá so với các kết quả thu được đối với oxytetracyclin [Cruz-Papa D, 2014]. Thực khuẩn thể AH1 triệu tiêu toàn bộ tỷ lệ chết ở cá bị lây nhiễm *Aeromonas hydrophila* qua thí nghiệm [Wu JL, 1981]. Việc sử dụng thực khuẩn thể phân giải FCP1 ở cá trê bị lây nhiễm chủng kháng kháng sinh của *Flavobacterium columnare* qua thí nghiệm ức chế các triệu chứng lây nhiễm và làm giảm tỷ lệ chết của cá [Prasad Y, 2011].

Vấn đề còn lại là việc sử dụng chế phẩm mà có khả năng ngăn ngừa và điều trị cá bị lây nhiễm các chủng *Aeromonas* sp. và *Pseudomonas* sp. Đó cũng là điều mong muốn để chế phẩm được sản xuất sẽ dễ dàng áp dụng trong thực tiễn nuôi trồng, không gây ra các tác dụng phụ và sẽ có các tác dụng tăng cường sức khỏe khác.

Bất ngờ là, việc sử dụng theo sáng chế mang lại giải pháp cho các vấn đề được đề cập ở trên.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến thực khuẩn thể để ngăn ngừa và điều trị sự lây nhiễm ở các động vật nuôi, đặc biệt là cá, gây ra bởi các chủng vi khuẩn gây bệnh nhạy cảm với các thực khuẩn thể này, trong đó thực khuẩn thể này được dự định cung cấp cho các

động vật gặp nguy hiểm thông qua sự nhúng chìm, hợp lý là cách khoảng thời gian 24 giờ.

Hợp lý là, sự lây nhiễm được điều trị trong nuôi cá là sự lây nhiễm bởi chủng gây bệnh của *Aeromonas sp.* và *Pseudomonas sp.*, đặc biệt là các chủng của *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* hoặc *Pseudomonas fluorescens*, trong đó thực khuẩn thể được sử dụng là chủng thực khuẩn thể được chọn từ nhóm được nộp lưu trong Bộ Sưu Tập Vi Sinh Vật Ba Lan có các số nộp lưu sau đây: F/00096 (chủng 25AhydR2PP), F/00094 (chủng 50AhydR13PP), F/00098 (chủng 22PfluR64PP), F/00099 (chủng 67PfluR64PP), F/00100 (chủng 71PfluR64PP), F/00095 (chủng 98PfluR60PP) và F/00101 (chủng 60AhydR15PP).

Khía cạnh khác của sáng chế là thực khuẩn thể để kích thích sự miễn dịch ở cá chống lại sự lây nhiễm bằng cách kích thích cả hệ miễn dịch bẩm sinh và hệ miễn dịch dịch thể.

Hợp lý là, chủng thực khuẩn thể được sử dụng được chọn từ nhóm được nộp lưu trong Bộ Sưu Tập Vi Sinh Vật Ba Lan có các số nộp lưu sau đây: F/00096 (chủng 25AhydR2PP), F/00094 (chủng 50AhydR13PP), F/00098 (chủng 22PfluR64PP), F/00099 (chủng 67PfluR64PP), F/00100 (chủng 71PfluR64PP), F/00095 (chủng 98PfluR60PP) và F/00101 (chủng 60AhydR15PP).

Sáng chế còn đề xuất chủng thực khuẩn thể được chọn từ nhóm được nộp lưu trong Bộ Sưu Tập Vi Sinh Vật Ba Lan có các số nộp lưu sau đây: F/00096 (chủng 25AhydR2PP), F/00094 (chủng 50AhydR13PP), F/00098 (chủng 22PfluR64PP), F/00099 (chủng 67PfluR64PP), F/00100 (chủng 71PfluR64PP), F/00095 (chủng 98PfluR60PP) và F/00101 (chủng 60AhydR15PP).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Để sáng chế trở nên rõ ràng hơn, nó được minh họa trên các hình vẽ kèm theo.

Fig.1 thể hiện kết quả phân tích tính nhạy cảm của chủng *A. hydrophila* 7966 đối với thực khuẩn thể và chế phẩm thực khuẩn thể. 1 – *A. hydrophila* 7966 với 25AhydR2PP; 2 – *A. hydrophila* 7966 với BAFADOR II; 3 – *A. hydrophila* 7966 với BAFADOR III; 4 – *A. hydrophila* 7966 với BAFADOR IV; 5 – đối chứng sinh trưởng của *A. hydrophila* 7966.

Fig.2 thể hiện kết quả phân tích tính nhạy cảm của chủng *A. hydrophila* 7965 đối với thực khuẩn thể và chế phẩm thực khuẩn thể. 1 – *A. hydrophila* 7965 với 13AhydR10PP; 2 – *A. hydrophila* 7965 với 14AhydR10PP; 3 – *A. hydrophila* 7965 với 85AhydR10PP; 4 – *A. hydrophila* 7965 với BAFADOR II; 5 – đối chứng sinh trưởng của *A. hydrophila* 7965.

Fig.3 thể hiện kết quả phân tích tính nhạy cảm của chủng *A. hydrophila* 49140 đối với thực khuẩn thể và chế phẩm thực khuẩn thể. 1 – *A. hydrophila* 49140 với 50AhydR13PP; 2 – *A. hydrophila* 49140 với BAFADOR II; 3 – *A. hydrophila* 49140 với BAFADOR III; 4 – *A. hydrophila* 49140 với BAFADOR IV; 5 – đối chứng sinh trưởng của *A. hydrophila* 49140.

Fig.4 thể hiện kết quả phân tích tính nhạy cảm của chủng *A. hydrophila* 33658 đối với thực khuẩn thể và chế phẩm thực khuẩn thể. 1 – *A. hydrophila* 33658 với 60AhydR15PP; 2 – *A. hydrophila* 33658 với BAFADOR II; 3 – *A. hydrophila* 33658 với BAFADOR III; 4 – *A. hydrophila* 33658 với BAFADOR IV; 5 – đối chứng sinh trưởng của *A. hydrophila* 33658.

Fig.5 thể hiện kết quả phân tích tính nhạy cảm của chủng *P. fluorescens* 8B/UWM đối với thực khuẩn thể và chế phẩm thực khuẩn thể. 1 – *P. fluorescens* 8B/UWM với 22PfluR64PP; 2 – *P. fluorescens* 8B/UWM với 67PfluR64PP; 3 – *P. fluorescens* 8B/UWM với 71PfluR64PP; 4 – *P. fluorescens* 8B/UWM với BAFADOR II; 5 – *P. fluorescens* 8B/UWM với BAFADOR III; 6 – *P. fluorescens* 8B/UWM với BAFADOR IV; 7 – đối chứng sinh trưởng của *P. fluorescens* 8B/UWM.

Từ Fig.6 đến Fig.9 thể hiện biên dạng giới hạn của các thực khuẩn thể được chọn.

Fig.6 thể hiện biên dạng giới hạn của thực khuẩn thể 60AhydR15PP thu được sau khi phân cắt bằng các enzym giới hạn sau đây: *DraI* (lần 2), *SspI* (lần 4), *AseI* (lần 6). Các lần từ 1 đến 8 – thang ADN (1 kb).

Fig.7 thể hiện biên dạng giới hạn của các thực khuẩn thể 22PfluR64PP (lần 2), 67PfluR64PP (lần 3) và 71PfluR64PP (lần 4) thu được sau khi phân cắt bằng enzym giới hạn *EcoRI*. Lần 1 – thang ADN (1 kb).

Fig.8 thể hiện biên dạng giới hạn của thực khuẩn thể 50AhydR13PP thu được sau khi phân cắt bằng enzym giới hạn *SspI* (lần 2) và biên dạng giới hạn của thực

khuẩn thể 98PfluR60PP thu được sau khi phân cắt bằng enzym giới hạn *EcoRI* (lần 3).
Làn 1 – thang ADN (1 kb).

Fig.9 thể hiện biên dạng giới hạn của thực khuẩn thể 25AhydR2PP (lần 2) thu được sau khi phân cắt bằng enzym giới hạn *EcoRI*. Làn 1 – thang ADN (1 kb).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chế phẩm thực khuẩn thể được sử dụng trong việc ngăn ngừa và trị liệu đối với sự lây nhiễm vi khuẩn trong nuôi cá và khác biệt ở các bước sau đây:

- a) xây dựng bộ sưu tập chủng thực khuẩn thể đặc hiệu với các chủng vi khuẩn được chọn,
- b) tiến hành cấy vạch chủng vi khuẩn được chọn trên môi trường sinh trưởng dạng rắn mà được ủ trong thời gian 48 ± 3 giờ ở nhiệt độ 25°C (mỗi chủng được nhân giống một cách riêng rẽ),
- c) chuẩn bị hai đĩa 96 giếng: một đĩa có môi trường sinh trưởng dạng lỏng (đĩa I) và đĩa thứ hai có môi trường sinh trưởng dạng rắn (đĩa II),
- d) thu lấy khuẩn lạc vi khuẩn đơn lẻ từ đĩa cấy vạch bằng que cấy vòng và chuyển vào giếng thứ nhất của đĩa I, lắc mạnh và đưa vào môi trường dạng rắn của giếng thứ nhất của đĩa II bằng cùng một que cấy vòng; tương tự như vậy, các cặp giếng khác được điền vào, chọn lọc các khuẩn lạc mới đối với mỗi cặp và để lại ba giếng không được điền để đối chứng tính vô trùng của môi trường,
- e) đặt đĩa I vào máy đọc vi đĩa (ở nhiệt độ 25°C) và ủ cho đến khi giá trị của mật độ quang OD_{620} đạt đến trong khoảng từ 0,2 đến 0,3; sau đó bổ sung huyền phù thực khuẩn thể mong muốn (mà chủng vi khuẩn sản xuất được tìm kiếm) vào mỗi giếng của đĩa này, nó được ủ lại trong máy đọc vi đĩa (25°C) và giá trị của mật độ quang được ghi lại cho đến khi thu được đường cong động học của sự nhân bản thực khuẩn thể, dựa trên đó chọn lọc các khuẩn lạc vi khuẩn, là các vật chủ tốt nhất cho sự nhân bản virus,
- f) ủ đĩa II trong thời gian 24 ± 2 giờ ở nhiệt độ 25°C và sử dụng các khuẩn lạc vi khuẩn mà đã được chỉ ra dựa trên các kết quả từ đĩa I để điều chế chất cấy của chủng sản xuất vi khuẩn đối với chủng thực khuẩn thể nhất định,

- g) nuôi cấy chủng vi khuẩn được chọn từ chất cấy đã điều chế trong môi trường sinh trưởng vô trùng, ủ ở nhiệt độ 25°C cho đến khi đạt được mật độ quang (OD₆₂₀) thích hợp sau đó bổ sung huyền phù của chủng thực khuẩn thể thích hợp và ủ trong thời gian 4 giờ ở nhiệt độ 25°C,
- h) sau khi nhân giống thực khuẩn thể, loại bỏ sinh khối vi khuẩn khỏi canh trường lên men thông qua quy trình vi lọc, thu được thành phần sẵn sàng sử dụng của chế phẩm thực khuẩn thể.

Hợp lý là, chủng vi khuẩn được chọn là: *Aeromonas hydrophila* 33658, *Aeromonas hydrophila* 7966, *Aeromonas hydrophila* 49140, *Pseudomonas fluorescens* 4B/UWM/03/13 và *Pseudomonas fluorescens* 8B/UWM/03/13.

Phương pháp này thích hợp để sàng lọc nhanh và dễ dàng các khuẩn lạc vi khuẩn mà thích hợp để nhân giống hiệu quả các thực khuẩn thể mà là đặc điểm quan trọng trong các ứng dụng công nghiệp.

Khía cạnh khác của sáng chế là việc sử dụng chế phẩm thực khuẩn thể, chứa hỗn hợp của các thực khuẩn thể, trong việc ngăn ngừa và trị liệu lây nhiễm vi khuẩn trong nuôi cá gây ra bởi vi khuẩn từ chi *Aeromonas* và *Pseudomonas*. Chế phẩm thực khuẩn thể theo sáng chế được dự định cung cấp cho các động vật gặp nguy hiểm thông qua sự nhúng chìm.

Hợp lý là, chế phẩm được sản xuất thể hiện tác dụng trị liệu mạnh mẽ bởi vì nó làm giảm tỷ lệ chết của cá bị lây nhiễm *Pseudomonas fluorescens* qua thí nghiệm.

Hợp lý là, sự lây nhiễm được điều trị trong nuôi cá là sự lây nhiễm bởi chủng gây bệnh của *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* và *Pseudomonas fluorescens*. Để sản xuất chế phẩm thực khuẩn thể, chủng thực khuẩn thể thích hợp được chọn từ nhóm được nộp lưu trong Bộ Sưu Tập Vi Sinh Vật Ba Lan 17.12.2015 có các số nộp lưu sau đây: F/00096 (chủng 25AhydR2PP), F/00094 (chủng 50AhydR13PP), F/00098 (chủng 22PfluR64PP), F/00099 (chủng 67PfluR64PP), F/00100 (chủng 71PfluR64PP), F/00095 (chủng 98PfluR60PP) và chủng được nộp lưu vào ngày 15.01.2016 có số nộp lưu F/00101 (chủng 60AhydR15PP).

Sáng chế còn đề xuất chủng thực khuẩn thể thích hợp để ngăn ngừa hoặc điều trị sự lây nhiễm bởi chủng gây bệnh của *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* và *Pseudomonas fluorescens* được chọn từ nhóm của; 60AhydR15PP,

25AhydR2PP, 50AhydR13PP, 22PfluR64PP, 67PfluR64PP, 71PfluR64PP và 98PfluR60PP.

Chế phẩm thực khuẩn thể theo sáng chế dựa trên các thành phần tự nhiên của hệ sinh thái và do đó nó không gây ảnh hưởng tiêu cực lên các sinh vật khác ngoài các vi khuẩn gây bệnh đã xác định cụ thể. Điều này đảm bảo rằng chỉ các chủng gây bệnh của *Aeromonas sp.* và *Pseudomonas sp.* được làm giảm có chọn lọc.

Bất ngờ là, chế phẩm thực khuẩn thể theo sáng chế là an toàn và được cá dung nạp tốt được xác nhận bởi các nghiên cứu về huyết học và hóa sinh trên các quần thể của cá chép và cá hồi vân.

Hợp lý là, chế phẩm thực khuẩn thể theo sáng chế thể hiện hoạt tính hỗ trợ miễn dịch mạnh bởi vì nó ảnh hưởng đến sự miễn dịch ở cá chống lại sự lây nhiễm bằng cách kích thích cả hệ miễn dịch bẩm sinh và hệ miễn dịch dịch thể.

Chế phẩm được dự định sử dụng trong chăn nuôi đặc biệt là để đấu tranh chống lại chủng gây bệnh của *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* và *Pseudomonas fluorescens* trong nuôi trồng thủy sản.

Các chủng thực khuẩn thể được bộc lộ trong việc sử dụng này đã được nhận dạng theo phương pháp theo sáng chế. Bất ngờ là, chúng thể hiện phạm vi đặc hiệu rộng, có khả năng làm tan ít nhất là 4 chủng của *P. fluorescens*, 11 chủng của *A. hydrophila* và 5 chủng của *A. salmonicida*. Các chủng thực khuẩn thể có thể ổn định ở nhiệt độ lạnh/ướp lạnh trong thời gian lưu trữ ít nhất là 3 tháng. Hơn nữa, có thể tiến hành nhân giống thành công các chủng này ở quy mô công nghiệp mà không làm mất hoạt tính của chúng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Sự phân lập và đặc điểm của các thực khuẩn thể

Chuẩn bị bộ sưu tập chủng vi khuẩn của chi *Aeromonas spp.* và *Pseudomonas sp.* được phân lập từ người và động vật nuôi.

Ban đầu, chuẩn bị bộ sưu tập của 82 chủng vi khuẩn của *Aeromonas spp.* và *Pseudomonas sp.* (Bảng 1). Sử dụng các chủng này để thử nghiệm tính đặc hiệu của các thực khuẩn thể được phân lập. Bộ sưu tập bao gồm cả chủng tham chiếu có sẵn trong các kho công cộng và thể phân lập thu được từ Đại Học Adam Mickiewicz ở

Poznań và từ Khoa Bệnh Lý Và Miễn Dịch Học Ở Cá của Viện Inland Fisheries ở Olsztyn, và Đại Học Warmia và Mazury ở Olsztyn (Bảng 2).

Bảng 1. Bộ sưu tập chủng vi khuẩn của *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Yersinia* sp., *Renibacterium* sp. và *Enterococcus* sp.

Mã	Chủng
R1	<i>Yersinia ruckeri</i> 29473
R2	<i>Aeromonas hydrophila</i> 7966
R3	<i>Aeromonas hydrophila</i> 1206101
R4	<i>Yersinia ruckeri</i> 5304100
R5	<i>Aeromonas sobria</i>
R6	<i>Aeromonas hydrophila</i> 49140
R7	<i>Yersinia ruckeri</i> 29473
R9	<i>Aeromonas hydrophila</i> 35654
R10	<i>Aeromonas hydrophila</i> 7965
R11	<i>Aeromonas hydrophila</i> 5247167
R12	<i>Aeromonas hydrophila</i> 7965 (290158)
R13	<i>Aeromonas hydrophila</i> 49140
R14	<i>Aeromonas hydrophila</i> 33658 (788242)
R15	<i>Aeromonas hydrophila</i> 33658
R16	<i>Aeromonas hydrophila</i> 35654
R21	<i>Aeromonas hydrophila</i> RK 70363
R22	<i>Aeromonas hydrophila</i> SK 3
R23	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 49140
R24	<i>Aeromonas hydrophila</i> LMG 13656
R25	<i>Aeromonas hydrophila</i> AK 44
R26	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966 ^T
R27	<i>Aeromonas sobria</i> LMG 13469
R28	<i>Aeromonas sobria</i> CIP 7433 ^T
R29	<i>Aeromonas salmonicida</i> LMG 14900 ^T
R30	<i>Aeromonas salmonicida</i> LMG 3782 ^T
R31	<i>Aeromonas salmonicida</i> CDC 0434-84

R32	<i>Aeromonas salmonicida</i> AK 46
R33	<i>Aeromonas salmonicida</i> LMG 3780 ^T
R34	<i>Aeromonas salmonicida</i> LMG 13450
R40	1B/IRS/03/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R41	2B/IRS/03/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R42	3B/IRS/03/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R43	4B/IRS/03/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R44	5B/IRS/04/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R45	6B/IRS/05/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R46	7B/IRS/05/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R47	8B/IRS/05/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R48	9B/IRS/05/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R49	10B/IRS/05/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R50	11B/IRS/05/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R51	12B/IRS/06/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R52	13B/IRS/06/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R53	1B/IRS/04/14K_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R54	2B/IRS/04/14K_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R55	3B/IRS/04/14K_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R56	4B/IRS/04/14P_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R57	1B/UWM/03/13_ <i>Yersinia ruckeri</i>
R58	2B/UWM/03/13_ <i>Pseudomonas fluorescens</i>
R59	3B/UWM/03/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R60	4B/UWM/03/13_ <i>Pseudomonas fluorescens</i>
R61	5B/UWM/03/13_ <i>Pseudomonas fluorescens</i>
R62	6B/UWM/03/13_ <i>Pseudomonas fluorescens</i>
R63	7B/UWM/03/13_ <i>Pseudomonas fluorescens</i>
R64	8B/UWM/03/13_ <i>Pseudomonas fluorescens</i>
R65	9B/UWM/03/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R66	10B/UWM/03/13_ <i>Yersinia ruckeri</i>
R67	11B/UWM/03/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>

R68	13B/UWM/03/13_ <i>Pseudomonas fluorescens</i>
R69	14B/UWM/03/13_ <i>Yersinia ruckeri</i>
R70	15B/UWM/03/13_ <i>Yersinia ruckeri</i>
R71	16B/UWM/04/13_ <i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>
R72	17B/UWM/06/13_ <i>Yersinia ruckeri</i>
R73	18B/UWM/06/13_ <i>Aeromonas salmonicida</i> phụ loài <i>salmonicida</i>
R74	19B/UWM/06/13_ <i>Aeromonas salmonicida</i> phụ loài <i>salmonicida</i>
R75	20B/UWM/06/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R76	21B/UWM/06/13_ <i>Yersinia ruckeri</i>
R77	22B/UWM/06/13_ <i>Aeromonas sobria</i>
R78	23B/UWM/06/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R79	24B/UWM/06/13_ <i>Renibacterium salmonicidum</i>
R80	25B/UWM/07/13_ <i>Aeromonas sobria</i>
R81	26B/UWM/07/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R82	27B/UWM/07/13_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R83	28B/UWM/07/13_ <i>Aeromonas sobria</i>
R84	29B/UWM/07/13_ <i>Pseudomonas fluorescens</i>
R85	30B/UWM/06/14_ <i>Enterococcus</i>
R86	1/14P/UWM_ <i>Yersinia ruckeri</i>
R87	2/14P/UWM_ <i>Yersinia ruckeri</i>
R88	3/14P/UWM_ <i>Yersinia ruckeri</i>
R89	31B/UWM/08/14_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R90	32B/UWM/08/14_ <i>Aeromonas hydrophila</i>
R91	33B/UWM/08/14_ <i>Pseudomonas fluorescens</i>
R92	34B/UWM/08/14_ <i>Yersinia ruckeri</i>

Bảng 2. Các chủng vi khuẩn của *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Yersinia* sp., *Renibacterium* sp. và *Enterococcus* sp.

Số	Vi khuẩn	Số lượng chủng	Nguồn
----	----------	-------------------	-------

1	<i>Aeromonas hydrophila</i>	6	UAM
		38	UWM
2	<i>Aeromonas salmonicida</i>	6	UAM
		2	UWM
3	<i>Aeromonas sobria</i>	2	UAM
		4	UWM
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	9	UWM
5	<i>Renibacterium salmonicidum</i>	1	UWM
6	<i>Enterococcus</i>	1	UWM
7	<i>Yersinia ruckeri</i>	13	UWM

Sự phân lập thực khuẩn thể có hoạt tính chống lại các chủng được chọn của *Aeromonas spp.* và *Pseudomonas sp.* từ các mẫu trong môi trường.

Thực khuẩn thể được phân lập từ các mẫu được lấy từ các ống góp hút vào, địa diện cho giai đoạn ban đầu của quy trình xử lý nước thải, nhận được từ Nhà Máy Xử Lý Chất Thải Chính (Main Sewage Treatment Plant - GOŚ) ở Lodz hoặc từ các mẫu nước thu được từ Viện Inland Fisheries (IRS) ở Żabieniec (Bảng 3).

Bảng 3. Thực khuẩn thể được phân lập và vật chủ của chúng.

Số	Thực khuẩn thể	Nguồn	Vật chủ
1	11AhydR10PP	GOŚ	<i>Aeromonas hydrophila</i> 7965
3	13AhydR10PP	GOŚ	<i>Aeromonas hydrophila</i> 7965
4	14AhydR10PP	GOŚ	<i>Aeromonas hydrophila</i> 7965
5	25AhydR2PP	GOŚ	<i>Aeromonas hydrophila</i> 7966
6	50AhydR13PP	GOŚ	<i>Aeromonas hydrophila</i> 49140
7	53AhydR13PP	GOŚ	<i>Aeromonas hydrophila</i> 49140
8	60AhydR15PP	GOŚ	<i>Aeromonas hydrophila</i> 33658
9	62AhydR11PP	GOŚ	<i>Aeromonas hydrophila</i> 5247167
10	80AhydR10PP	IRS	<i>Aeromonas hydrophila</i> 7965
11	82AhydR10PP	IRS	<i>Aeromonas hydrophila</i> 7965
12	85AhydR10PP	IRS	<i>Aeromonas hydrophila</i> 7965

13	86AhydR10PP	IRS	<i>Aeromonas hydrophila</i> 7965
14	72AsobR5PP	IRS	<i>Aeromonas sobria</i>
15	75AsobR5PP	IRS	<i>Aeromonas sobria</i>
16	76AsobR5PP	IRS	<i>Aeromonas sobria</i>
17	19AhydR15PP	GOŚ	<i>Aeromonas hydrophila</i> 33658
18	22PfluR64PP	GOŚ	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 8B/UWM/03/13
19	23PfluR64PP	GOŚ	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 8B/UWM/03/13
20	67PfluR64PP	GOŚ	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 8B/UWM/03/13
21	69PfluR64PP	GOŚ	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 8B/UWM/03/13
22	70PfluR64PP	GOŚ	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 8B/UWM/03/13
23	71PfluR64PP	GOŚ	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 8B/UWM/03/13
24	88PfluR61PP	IRS	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 5B/UWM/03/13
25	98PfluR60PP	GOŚ	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 4B/UWM/03/13

Tất cả thực khuẩn thể sử dụng trong các thí nghiệm khác nữa được tinh chế bằng cách cấy chuyển theo dãy để tạo mảng đơn lẻ trên đĩa có môi trường Luria-Bertani (LB). Quy trình này cần phải cấy chuyển ít nhất là 5 lần.

Ban đầu tính đặc hiệu của thực khuẩn thể được phân lập bằng phương pháp đĩa này được xác định dựa trên cơ sở khả năng phân giải của các thực khuẩn thể chống lại chủng được chọn của *Aeromonas* spp., và *Pseudomonas* sp., được phân lập từ cá bị bệnh, thu được từ Khoa Bệnh Lý Và Miễn Dịch Học Ở Cá của Viện Inland Fisheries ở Olsztyn (IRS) và Đại Học Warmia và Mazury ở Olsztyn và chống lại các chủng được chọn của *Aeromonas* spp., và *Pseudomonas* sp. mà cấu thành phần mở rộng của bộ sưu tập của các chủng ví dụ được phân lập từ các cá thể bệnh, thu được từ Đại Học Adam Mickiewicz ở Poznań.

Để xác nhận các kết quả này, nghiên cứu về tính đặc hiệu của các thực khuẩn thể được phân lập được lặp lại 3 lần (Bảng 4 và Bảng 5).

Bảng 4. Tính đặc hiệu của các thực khuẩn thể được chọn chống lại các chủng mô hình và môi trường được chọn của *Aeromonas* spp. (bộ sưu tập chủng vi khuẩn của Proteon Pharmaceuticals).

Thực khuẩn thể \ Chủng vi khuẩn	11AhydR10PP	13AhydR10PP	14AhydR10PP	19AhydR15PP	25AhydR2PP	50AhydR13PP	53AhydR13PP	60AhydR15PP	62AhydR11PP	80AhydR10PP	82AhydR10PP	85AhydR10PP	86AhydR10PP	72AsobR5PP	75AsobR5PP	76AsobR5PP
<i>A. hydrophila</i>																
R2	-	-	-	-	p h â n g i ả i t o à n b ộ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R6	-	-	-	-	p h â n g i ả i t o à n b ộ	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

R9	-	-	-	-	p h â n gi ải to à n b ộ	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
R10	-	p h â n gi ải to à n b ộ	p h â n gi ải to à n b ộ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R11	-	-	-	-	-	-	-	-	p h â n gi ải to à n b ộ	-	-	-	-	-	-
R12	-	p h â n gi ải to à n b ộ	p h â n gi ải to à n b ộ	-	-	-	-	-	-	-	p h â n gi ải to à n b ộ	-	-	-	-

[illegible]

						p h â n gi ải to à n b ộ													
R22	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
						p h â n gi ải to à n b ộ													
R23	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
						p h â n gi ải to à n b ộ													
						p h â n gi ải to à n b ộ	p h â n gi ải to à n b ộ	p h â n gi ải to à n b ộ											
R24	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
						p h â n gi ải to à n b ộ	p h â n gi ải to à n b ộ	p h â n gi ải to à n b ộ											
						p h â n gi ải to à n b ộ	p h â n gi ải to à n b ộ	p h â n gi ải to à n b ộ											
R25	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
						p h â n gi ải to à n b ộ	p h â n gi ải to à n b ộ	p h â n gi ải to à n b ộ											

R26	p h â n gi ai to à n b ộ													
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R40	p h â n gi ai to à n b ộ													
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R41	p h â n gi ai to à n b ộ													
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R48	p h â n gi ai to à n b ộ													
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p h â n gi ai to à n b ộ													
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

		p h â n gi ai to à n b ộ	p h â n gi ai to à n b ộ									p h â n gi ai to à n b ộ	p h â n gi ai to à n b ộ	p h â n gi ai to à n b ộ			
R52	-			-	-	-	-	-	-	-	-				+	-	-
R53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
R55	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
R59	-	-	-	-	-	-	-	-	-			p h â n gi ai to à n b ộ	-	-	-	-	-
R65	-	p h â n gi ai to à n b ộ	-	-	-	-	-	-	-			p h â n gi ai to à n b ộ	-	-	-	-	-
R71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>A. salmonicida</i>																	

[illegible]

R5	-	-	-	-	-	-	-	-	phân giải tổng quan	-	-	-	-	-	-	-
R28	-	-	-	-	-				phân giải tổng quan	-	-	-	-	-	-	-
R80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-

„cl” – phân giải toàn bộ; „+” – ức chế sinh trưởng; „-” – không tác dụng

Bảng 5. Tính đặc hiệu của các thực khuẩn thể được chọn chống lại các chủng môi trường được chọn của *Pseudomonas* sp. (bộ sưu tập chủng vi khuẩn của Proteon Pharmaceuticals).

Thực khuẩn thể	Chủng vi khuẩn
	22PfluR64PP
	23PfluR64PP
	67PfluR64PP
	68PfluR64PP
	69PfluR64PP
	70PfluR64PP
	71PfluR64PP
	88PfluR61PP
	98PfluR60PP
	<i>P. fluorescens</i>

									ph ân gi ải to àn bộ
R60	-	-	-	-	-	-	-	-	
	ph ân gi ải to àn bộ	-	ph ân gi ải to àn bộ	ph ân gi ải to àn bộ	ph ân gi ải to àn bộ	ph ân gi ải to àn bộ	ph ân gi ải to àn bộ	ph ân gi ải to àn bộ	ph ân gi ải to àn bộ
R64	ph ân gi ải to àn bộ	-	ph ân gi ải to àn bộ	ph ân gi ải to àn bộ	-	-	ph ân gi ải to àn bộ	-	-
R68	ph ân gi ải to àn bộ	-	ph ân gi ải to àn bộ	-	-	-	-	-	-
R91	ph ân gi ải to àn bộ	-	ph ân gi ải to àn bộ	-	-	-	ph ân gi ải to àn bộ	-	-

„cl” – phân giải toàn bộ; „+” – ức chế sinh trưởng; „-” – không tác dụng

Các thực khuẩn thể đã phân lập được nhân giống bằng cách sử dụng chủng vật chủ làm chủng sản xuất. Các mẫu này được đưa vào phân lập ADN hệ gen của các thực khuẩn thể dựa trên phương pháp cải biến của Su và cộng sự [MT Su, 1998].

Đặc điểm di truyền của thực khuẩn thể

ADN được phân lập của thực khuẩn thể được sử dụng để tiến hành phân tích tính giới hạn bằng các enzym: AseI, DraI, SspI và EcoRI. Các biên dạng giới hạn thu được cho phép xác định đặc điểm di truyền ban đầu của các thực khuẩn thể (Fig.6, Fig.7, Fig.8 và Fig.9). Sau đó, sau khi giải mã trình tự hệ gen, hoàn thiện đặc điểm di truyền chi tiết hơn của thực khuẩn thể. Phân tích các trình tự nhận được bằng cách so sánh với hệ gen của các thực khuẩn thể có sẵn trong cơ sở dữ liệu BLAST, sau đó thiết kế khung đọc mở tiềm năng trong chương trình Artemis và tìm kiếm độ đồng nhất đối với protein của các thực khuẩn thể được mô tả bằng cách sử dụng thuật toán blastp.

Dựa trên cơ sở phân tích đã tiến hành thấy được rằng:

- Thực khuẩn thể 60AhydR15PP, được phân loại vào họ Myoviridae (bộ Caudovirales), chứa ADN sợi kép thẳng (dạng vòng của hệ gen) có kích thước xấp xỉ bằng 165 kbp và thể hiện độ tương tự cao đối với nhóm thực khuẩn thể phân giải T4, đặc hiệu chống lại nhiều vi khuẩn từ *Aeromonas* sp.
- Thực khuẩn thể 25AhydR2PP thể hiện độ đồng nhất cao đối với thực khuẩn thể AS7, thuộc vào họ giống T7. Nó được xác định đặc điểm bằng ADN sợi kép thẳng có kích thước xấp xỉ bằng 42 kbp. Nó thuộc vào các thực khuẩn thể phân giải.
- Thực khuẩn thể 50AhydR13PP thể hiện độ đồng nhất cao đối với thực khuẩn thể AS7, thuộc vào họ giống T4. Hệ gen của nó có kích thước xấp xỉ bằng 165 kbp.
- Các thực khuẩn thể 22PfluR64PP, 67PfluR64PP, 71PfluR64PP được phân loại vào họ Podoviridae (bộ Caudovirales) có đuôi ngắn, không co lại và capsit hai mươi mốt chứa ADN sợi kép thẳng có kích thước xấp xỉ bằng 40 kbp. Chúng thể hiện độ tương tự cao đối với thực khuẩn thể phân giải của nhóm T7 đặc hiệu với nhiều vi khuẩn của *Pseudomonas* sp..
- Trình tự của thực khuẩn thể 98PfluR60PP không thể hiện độ tương tự đối với các họ thực khuẩn thể đã biết trước đây. Tuy nhiên, phân tích so sánh chi tiết của các protein cụ thể cho phép tìm thấy độ đồng nhất với các protein thực khuẩn thể thông thường cần thiết để tiến hành chu trình phân giải. Hệ gen của 98PfluR60PP có kích thước là 74 kb.

Ví dụ 2. Sản xuất chế phẩm

Xác định và tối ưu hóa các điều kiện để nhân giống thực khuẩn thể ở quy mô phòng thí nghiệm.

Thực hiện tối ưu hóa đối với mỗi chủng thực khuẩn thể bằng cách sử dụng chủng vi khuẩn chủ.

Tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy sau đây: thể tích chất cấy của cả môi trường nuôi cấy vi khuẩn và thực khuẩn thể, thời gian nuôi cấy của môi trường nuôi cấy sạch và ủ môi trường nuôi cấy bị lây nhiễm, nhiệt độ nuôi cấy, tốc độ sục khí và loại môi trường sinh trưởng. Môi trường YES ở độ pH 7,0 được chọn làm môi trường sinh trưởng. Thể tích tối ưu của chất cấy vi khuẩn được ước tính bằng 2×10^9 CFU trên mỗi 0,5 lít môi trường nuôi cấy. Tùy thuộc vào chủng thực khuẩn thể, môi trường nuôi cấy được điều chỉnh đến mật độ quang $OD_{620} = 0,2-0,8$. Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu của môi trường nuôi cấy vi khuẩn được thiết lập ở 25°C . Tốc độ sục khí tối ưu hóa để nuôi cấy đạt được ở 140 vòng/phút bằng máy lắc Ecotron từ công ty Infors. Trong quy trình tối ưu hóa, đã quan sát thấy rằng sự bổ sung 1% theo thể tích của thực khuẩn thể có hàm lượng chuẩn bằng 10^9 PFU/ml (5ml trên mỗi 0,5 l môi trường nuôi cấy) là chất cấy tối ưu của thực khuẩn thể.

Phát triển công nghệ sản xuất và tinh chế huyền phù thực khuẩn thể.

Các giai đoạn sản xuất

1. Khuếch đại trong bình phản ứng sinh học

Bước thứ nhất trong dây chuyền sản xuất là khuếch đại các hạt thực khuẩn thể mà phá hủy một cách đặc hiệu tế bào vi khuẩn của chủng được chọn của *Aeromonas* spp., hoặc *Pseudomonas* sp. Điều này đạt được bằng cách cấy môi trường sinh trưởng bằng chủng sản xuất vi khuẩn và nuôi cấy cho đến khi thu được mật độ quang thích hợp, sau đó bổ sung chất cấy thực khuẩn thể vào và thực hiện quy trình tăng sinh các hạt thực khuẩn thể (các điều kiện đã thảo luận ở trên). Ngay khi kết thúc quy trình khuếch đại, môi trường nuôi cấy được chuyển theo phương thức vô trùng bằng cách sử dụng bơm nhu động sang giai đoạn tiếp theo của quy trình sản xuất. Mỗi chủng thực khuẩn thể được khuếch đại dưới dạng nuôi cấy riêng rẽ. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chúng

tôi sử dụng bình phản ứng sinh học nâng khí nén 5 lít (thể tích hoạt động là 4 lít) mà ưu điểm chính của nó là sử dụng túi khuếch đại hiện đại, sẵn có.

2. Loại bỏ sinh khối

Để hoàn thành quy trình khuếch đại thực khuẩn thể cần phải loại bỏ phần vi khuẩn còn lại khỏi canh trường nuôi cấy. Để đạt mục đích này, tiến hành vi lọc tiếp tuyến bằng cách sử dụng màng có kích thước lỗ bằng 0,45 μm , và sau đó vi lọc bằng cách sử dụng màng có kích thước lỗ bằng 0,22 μm . Quy trình này đảm bảo thu được huyền phù vô trùng có sự giảm rất ít ở hàm lượng chuẩn của các hạt thực khuẩn.

3. Thử nghiệm hoạt tính của thành phần được sản xuất ra

Sau khi hoàn thành quy trình lọc, huyền phù thực khuẩn thể được đưa vào thử nghiệm hoạt tính biểu diễn bằng đơn vị PFU/ml (đơn vị tạo mảng/ml). Thực hiện việc xác định hoạt tính theo quy trình "Đếm Thực Khuẩn Thể Trong Huyền Phù Bằng Thử Nghiệm Tạo Mảng Phủ Aga Kép" (Enumeration of Bacteriophages in Suspension by Double Agar Overlay Plaque Assay) đã được công nhận ở Proteon Pharmaceuticals SA (Chứng Nhận Thực Hành Tốt Phòng Thí Nghiệm Số 10/2015/DPL).

4. Sản xuất chế phẩm thực khuẩn thể cuối cùng

Trong bước này, trộn lẫn các thành phần đã được sản xuất. Trước khi trộn, tính thể tích của các thành phần tương ứng, đảm bảo hàm lượng mỗi thành phần bằng nhau trong chế phẩm. Phép tính này dựa trên hoạt tính đã xác định trước đây (PFU/ml). Sau đó chế phẩm cuối cùng được phân ước và lưu trữ ở nhiệt độ từ 2 đến 8°C.

Ví dụ 3. Nghiên cứu về hiệu quả và độ an toàn của chế phẩm thực khuẩn thể

Trong các nghiên cứu được tiến hành này sử dụng 3 chế phẩm thực khuẩn thể của các hợp phần sau đây:

- BAFADOR II: 60AhydR15PP, 62AhydR11PP, 13AhydR10PP, 14AhydR10PP, 85AhydR10PP, 22PfluR64PP, 67PfluR64PP, 71PfluR64PP,
- BAFADOR III: 60AhydR15PP, 25AhydR2PP, 50AhydR13PP, 22PfluR64PP, 67PfluR64PP, 71PfluR64PP, 98PfluR60PP
- BAFADOR IV: 60AhydR15PP, 25AhydR2PP, 50AhydR13PP, 22PfluR64PP, 98PfluR60PP

Xác định đặc điểm của tất cả các chế phẩm ở trên theo hàm lượng tương đương của các thành phần và hoạt tính bằng 10^8 PFU/ml.

Điều chế các chế phẩm thực khuẩn thể theo cách mà mỗi thực khuẩn thể được đưa vào quy trình khuếch đại đã tối ưu hóa, loại bỏ sinh khối vi khuẩn bằng cách vi lọc và xác định hoạt tính của nó theo PFU/ml. Trộn huyền phù của các thực khuẩn thể được sản xuất theo hàm lượng bằng nhau thu được chế phẩm thực khuẩn thể cuối cùng. Các chế phẩm này được thử nghiệm độ tinh khiết vi sinh không chỉ ra sự có mặt của vi khuẩn.

Nghiên cứu *in vitro*

Dựa trên phép đo mật độ quang (OD_{620}) của chủng vi khuẩn, khả năng của các chế phẩm thực khuẩn thể và thành phần thực khuẩn thể đã được phát triển để làm giảm số lượng tế bào vi khuẩn được thử nghiệm.

3 chế phẩm thực khuẩn thể (BAFADOR II, BAFADOR III và BAFADOR IV) và 11 thực khuẩn thể khác (13AhydR10PP, 14AhydR10PP, 25AhydR2PP, 50AhydR13PP, 60AhydR15PP, 62AhydR11PP, 85AhydR10PP, 22PfluR64PP, 67PfluR64PP, 71PfluR64PP và 98PfluR60PP) được sử dụng trong nghiên cứu này.

5 chủng vi khuẩn được sử dụng làm hệ thống thử nghiệm: *A. hydrophila* 7966, *A. hydrophila* 7965, *A. hydrophila* 49140, *A. hydrophila* 33658 và *P. fluorescens* 8B/UWM.

Tất cả các thí nghiệm được tiến hành thành ở ba bản sao trên đĩa 96 giếng. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn có mật độ quang khoảng 0,2 được trộn với huyền phù của thực khuẩn thể theo tỷ lệ thể tích 1:1 (100 μ l:100 μ l). Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 21 giờ. Ghi lại giá trị OD_{620} cứ 20 phút một lần.

Các kết quả thu được thể hiện trên các hình vẽ từ Fig.1 đến Fig.5.

Dựa trên các kết quả thu được, đã phát hiện ra rằng hỗn hợp của các thực khuẩn thể có lợi hơn nhiều trong việc khống chế chủng vi khuẩn so với thành phần thực khuẩn thể riêng lẻ. Hơn nữa, các nghiên cứu này đã xác nhận hiệu quả tốt hơn của các chế phẩm BAFADOR III và BAFADOR IV so với chế phẩm BAFADOR II.

Nghiên cứu in vivo

Đánh giá độ an toàn của chế phẩm thực khuẩn thể nguyên mẫu trong việc bảo vệ cá được nuôi chống lại các tác nhân vi khuẩn gây bệnh.

Nghiên cứu được thực hiện có sự cộng tác với Đại Học Warmia và Mazury.

Quy trình thí nghiệm 1

Nguyên liệu thí nghiệm là 20 cá chép, 20 cá hồi vân và 20 cá trê Châu Âu được giữ trong các bể riêng rẽ và được xử lý bằng chế phẩm thực khuẩn thể BAFADOR II ở nồng độ bằng 10^5 PFU/ml trong thời gian 1 giờ thông qua sự nhúng chìm. Thực hiện đánh giá các thông số về mặt huyết học và hóa sinh được chọn của máu cá trước khi sử dụng chế phẩm thực khuẩn thể BAFADOR II và trong thời gian 1, 2 và 3 ngày sau khi sử dụng.

Bảng 6. Sự ảnh hưởng của chế phẩm thực khuẩn thể được sử dụng thông qua sự nhúng chìm lên các thông số về mặt huyết học và hóa sinh được chọn ở cá chép (n = 20, giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn; *ý nghĩa thống kê $p < 0,05$)

Các thông số đo	Ngày lấy mẫu máu (ngày sau khi nhúng chìm)			
	Trước khi nhúng chìm	1	2	3
Số đếm hồng cầu (RBC) (triệu/mm)	$1,5 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,3$
Dung tích hồng cầu (Ht) (%)	$32,5 \pm 3,2$	$34,5 \pm 3,4$	$34,9 \pm 3,2$	$33,4 \pm 2,9$
Hemoglobin (Hb) (g%)	$10,6 \pm 1,4$	$11,4 \pm 1,4$	$11,6 \pm 1,6$	$10,8 \pm 1,5$
Lượng hemoglobin trung bình trong một hồng cầu (g/l)	$58,4 \pm 7,5$	$56,5 \pm 8,4$	$55,9 \pm 7,5$	$57,9 \pm 8,5$
Nồng độ hemoglobin trung bình trong một hồng cầu (g/l)	$25,6 \pm 5,5$	$26,4 \pm 4,8$	$27,6 \pm 5,2$	$26,8 \pm 4,9$
Cortisol (ng/l)	179 ± 27	185 ± 32	191 ± 45	187 ± 35
Glucosa (mg/l)	110 ± 15	115 ± 14	114 ± 12	118 ± 16
Hoạt tính aspartat transaminaza (AST) (U/l)	$84,2 \pm 12,5$	$86,5 \pm 13,8$	$87,2 \pm 14,5$	$88,9 \pm 13,3$
Hoạt tính alanin transaminaza (ALT) (U/l)	$2,5 \pm 0,8$	$2,7 \pm 0,7$	$2,8 \pm 0,6$	$2,9 \pm 0,8$

Bảng 7. Sự ảnh hưởng của chế phẩm thực khuẩn thể được sử dụng thông qua sự nhúng chìm lên các thông số về mặt huyết học và hóa sinh được chọn ở cá hồi vân (n = 20, giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn; *ý nghĩa thống kê $p < 0,05$).

Các thông số đo	Ngày lấy mẫu máu (ngày sau nhúng chìm)			
	Trước nhúng chìm	1	2	3
Đếm hồng cầu (RBC) (triệu/mm)	$2,4 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,6$	$2,7 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,4$
Dung tích hồng cầu (Ht) (%)	$39,8 \pm 4,5$	$40,5 \pm 4,1$	$41,6 \pm 3,8$	$42,5 \pm 3,9$
Hemoglobin (Hb) (g%)	$26,5 \pm 3,8$	$28,2 \pm 3,2$	$27,8 \pm 2,9$	$28,9 \pm 3,6$
Lượng hemoglobin trung bình trong một hồng cầu (g/l)	$58,4 \pm 7,5$	$56,5 \pm 8,4$	$55,9 \pm 7,5$	$57,9 \pm 8,5$
Nồng độ hemoglobin trung bình trong một hồng cầu (g/l)	$31,5 \pm 5,2$	$32,8 \pm 4,5$	$34,2 \pm 4,8$	$33,6 \pm 4,2$
Cortisol (ng/l)	192 ± 34	198 ± 32	197 ± 35	191 ± 38
Glucose (mg/l)	185 ± 23	192 ± 26	193 ± 27	189 ± 25
Hoạt tính aspartat transaminaza (AST) (U/l)	$96,5 \pm 22,4$	$98,5 \pm 2,5$	$97,8 \pm 24,2$	$98,5 \pm 24,4$
Hoạt tính alanin transaminaza (ALT) (U/l)	$4,6 \pm 1,2$	$4,9 \pm 1,5$	$4,8 \pm 1,4$	$4,7 \pm 1,7$

Bảng 8. Sự ảnh hưởng của chế phẩm thực khuẩn thể được sử dụng thông qua sự nhúng chìm lên các thông số về mặt huyết học và hóa sinh được chọn ở cá trê (n = 20, giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn; *ý nghĩa thống kê $p < 0,05$).

Các thông số đo	Ngày lấy mẫu máu (ngày sau khi nhúng chìm)			
	Trước khi nhúng chìm	1	2	3
Số đếm hồng cầu (RBC) (triệu/mm)	$1,5 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,5$	$1,8 \pm 0,5$	$1,6 \pm 0,5$

Dung tích hồng cầu (Ht) (%)	19,7 ± 1,5	20,8 ± 1,1	21,4 ± 1,8	20,3 ± 1,9
Hemoglobin (Hb) (g%)	21,5 ± 2,8	22,4 ± 2,2	23,8 ± 2,8	22,7 ± 2,6
Cortisol (ng/l)	142 ± 31	148 ± 34	147 ± 29	141 ± 27
Glucose (mg/l)	165 ± 20	162 ± 19	163 ± 21	168 ± 22

Dựa trên các kết quả thu được, chúng tôi chứng tỏ rằng chế phẩm thực khuẩn thể BAFADOR II không có tác dụng tiêu cực lên các thông số về mặt huyết học được chọn (số đếm hồng cầu, dung tích hồng cầu, hemoglobin), hoạt tính của các enzym ở gan: AST, ALT và hàm lượng glucose tăng lên trong thời gian 3 ngày sau khi sử dụng ở cá chép (Bảng 6), cá hồi vân (Bảng 7) và cá trê (Bảng 8). Ngoài ra, quan sát thấy không có sự thay đổi đáng kể ở hàm lượng cortisol, hormon tiết ra trong khi căng thẳng.

Quy trình thí nghiệm 2

Nguyên liệu thí nghiệm là 20 cá chép, 20 cá hồi vân và 20 cá trê Châu Âu được giữ trong các bể riêng rẽ và được xử lý bằng chế phẩm thực khuẩn thể BAFADOR II ở nồng độ bằng 10^5 PFU/ml trong thời gian 1 giờ thông qua sự nhúng chìm. Thực hiện đánh giá các thông số được chọn về miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào ở máu cá trước khi sử dụng thành phẩm thực khuẩn thể BAFADOR II và trong thời gian 3, 5 và 7 ngày sau khi sử dụng.

Bảng 9. Sự ảnh hưởng của chế phẩm thực khuẩn thể được sử dụng thông qua sự nhúng chìm lên các thông số miễn dịch được chọn ở cá chép (n = 20, giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn; *ý nghĩa thống kê $p < 0,05$)

Các thông số đo	Ngày lấy mẫu máu (ngày sau khi nhúng chìm)			
	0	3	5	7
Hoạt tính bùng phát hô hấp của thực bào (RBA, OD 620 nm)	0,46 ± 0,03	0,58 ± 0,5*	0,75 ± 0,05*	0,85 ± 0,04*
Hoạt tính tiêu diệt tiềm năng của thực bào (PKA, OD 620 nm)	0,38 ± 0,04	0,49 ± 0,5*	0,60 ± 0,04*	0,75 ± 0,05*

Hoạt tính tăng sinh của các tế bào lympho được kích thích bởi ConA (OD 620 nm)	0,49 ± 0,05	0,62 ± 0,5*	0,86 ± 0,04*	0,91 ± 0,05*
Hoạt tính tăng sinh của các tế bào lympho được kích thích bởi LPS (OD 620 nm)	0,32 ± 0,04	0,56 ± 0,7*	0,69 ± 0,07*	0,79 ± 0,05*
Hoạt tính lysosym trong huyết thanh (mg/l)	1,8 ± 0,4	2,9 ± 0,6*	3,6 ± 0,4*	4,1 ± 0,4*
Hoạt tính ceruloplasmin trong huyết thanh (IU)	64,5 ± 5,9	72,5 ± 4,6*	73,5 ± 4,8*	74,0 ± 5,2*
Tổng số protein huyết thanh (g/l)	43,5 ± 4,0	50,3 ± 3,5*	51,0 ± 4,5*	50,8 ± 4,2*
Ig trong huyết thanh (g/l)	7,5 ± 0,6	8,9 ± 0,7*	9,6 ± 0,8*	10,5 ± 0,7*

Bảng 10. Sự ảnh hưởng của chế phẩm thực khuẩn thể được sử dụng thông qua sự nhúng chìm lên các thông số miễn dịch được chọn ở cá hồi vân (n = 20, giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn; *ý nghĩa thống kê p<0,05)

Các thông số đo	Ngày lấy mẫu máu (ngày sau khi nhúng chìm)			
	0	3	5	7
Hoạt tính bùng phát hô hấp của thực bào (RBA, OD 620 nm)	0,46 ± 0,03	0,58 ± 0,5*	0,75 ± 0,05*	0,85 ± 0,04*
Hoạt tính tiêu diệt tiềm năng của thực bào (PKA, OD 620 nm)	0,38 ± 0,04	0,49 ± 0,5*	0,60 ± 0,04*	0,75 ± 0,05*
Hoạt tính tăng sinh của các tế bào lympho được kích thích bởi ConA (OD 620 nm)	0,49 ± 0,05	0,62 ± 0,5*	0,86 ± 0,04*	0,91 ± 0,05*
Hoạt tính tăng sinh của các tế bào lympho được kích thích bởi LPS (OD 620 nm)	0,32 ± 0,04	0,56 ± 0,7*	0,69 ± 0,07*	0,79 ± 0,05*
Hoạt tính lysosym trong huyết thanh (mg/l)	1,8 ± 0,4	2,9 ± 0,6*	3,6 ± 0,4*	4,1 ± 0,4*
Hoạt tính ceruloplasmin trong huyết thanh (IU)	64,5 ± 5,9	72,5 ± 4,6*	73,5 ± 4,8*	74,0 ± 5,2*

Tổng số protein huyết thanh (g/l)	43,5 ± 4,0	50,3 ± 3,5*	51,0 ± 4,5*	50,8 ± 4,2*
Ig trong huyết thanh (g/l)	7,5 ± 0,6	8,9 ± 0,7*	9,6 ± 0,8*	10,5 ± 0,7*

Bảng 11. Sự ảnh hưởng của chế phẩm thực khuẩn thể được sử dụng thông qua sự nhúng chìm lên các thông số miễn dịch được chọn ở cá trê (n = 20, giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn; *ý nghĩa thống kê p<0,05)

Các thông số đo	Ngày lấy mẫu máu (ngày sau khi nhúng chìm)			
	0	3	5	7
Hoạt tính bùng phát hô hấp của thực bào (RBA, OD 620 nm)	0,39 ± 0,05	0,58 ± 0,4*	0,72 ± 0,05*	0,79 ± 0,04*
Hoạt tính tiêu diệt tiềm năng của thực bào (PKA, OD 620 nm)	0,30 ± 0,04	0,47 ± 0,4*	0,58 ± 0,05*	0,67 ± 0,05*
Hoạt tính tăng sinh của các tế bào lympho được kích thích bởi ConA (OD 620 nm)	0,41 ± 0,04	0,56 ± 0,5*	0,69 ± 0,06*	0,75 ± 0,04*
Hoạt tính tăng sinh của các tế bào lympho được kích thích bởi LPS (OD 620 nm)	0,32 ± 0,04	0,47 ± 0,4*	0,61 ± 0,05*	0,70 ± 0,05*
Hoạt tính lysosym trong huyết thanh (mg/l)	2,6 ± 0,4	3,4 ± 0,5	4,2 ± 0,6*	4,9 ± 0,5*
Hoạt tính ceruloplasmin trong huyết thanh (IU)	61,0 ± 6,5	72,5 ± 4,5*	74,0 ± 5,5*	73,0 ± 4,5*
Tổng số protein huyết thanh (g/l)	41,5 ± 3,0	50,0 ± 3,5	51,5 ± 4,0*	52,0 ± 3,5*
Ig trong huyết thanh (g/l)	6,8 ± 0,5	7,9 ± 0,7	8,8 ± 0,5*	9,5 ± 0,5*

Dựa trên các kết quả thu được, chứng tỏ rằng chế phẩm BAFADOR II làm tăng ở mức có ý nghĩa thống kê đối với các thông số đo của miễn dịch tế bào bẩm sinh (hoạt tính bùng phát hô hấp và hoạt tính tiêu diệt tiềm năng của thực bào, hoạt tính tăng sinh của tế bào lympho) và miễn dịch dịch thể (hoạt tính lysozym và ceruloplasmin, tổng số protein huyết thanh và Ig trong huyết thanh) ở các loài cá được

điều trị. Các thay đổi này chỉ được quan sát thấy sau 3 ngày sử dụng chế phẩm thực khuẩn thể.

Đánh giá hiệu quả của chế phẩm thực khuẩn thể nguyên mẫu trong việc bảo vệ cá được nuôi chống lại các tác nhân vi khuẩn gây bệnh.

Nghiên cứu được thực hiện có sự cộng tác với Đại Học Warmia và Mazury.

Mục đích nghiên cứu: Đánh giá khả năng sử dụng thực khuẩn thể để ngăn ngừa sự lây nhiễm vi khuẩn ở cá do *Pseudomonas* sp. gây ra.

Nguyên liệu thí nghiệm là cá chép bị lây nhiễm qua thí nghiệm bằng cách tiêm qua màng bụng các chủng trong môi trường *Pseudomonas fluorescens* được phân lập từ cá bị lây nhiễm và nhận dạng trên mức độ hóa sinh bằng thử nghiệm API. Cá bị lây nhiễm bằng huyền phù vi khuẩn ở nồng độ bằng 6×10^8 CFU/ml (liều lượng 0,2ml trên mỗi con cá). Các chế phẩm thực khuẩn thể (BAFADOR II, III và IV) được sử dụng thông qua sự nhúng chìm trong thời gian một giờ.

Quy trình thí nghiệm 3

Nguyên liệu thí nghiệm là 100 cá chép phân chia ngẫu nhiên thành 5 nhóm giống nhau được giữ trong các bể riêng rẽ. Cá từ các nhóm 2, 3, 4 và 5 bị lây nhiễm qua thí nghiệm bằng cách tiêm qua màng bụng chủng trong môi trường *Pseudomonas fluorescens* được phân lập từ cá bị lây nhiễm và nhận dạng bằng cách sử dụng thử nghiệm API. Cá bị lây nhiễm bằng huyền phù vi khuẩn ở nồng độ bằng 6×10^8 CFU/ml (liều lượng 0,2ml trên mỗi con cá). Chế phẩm thực khuẩn thể (BAFADOR II) được sử dụng thông qua sự nhúng chìm ở nồng độ bằng 10^5 PFU/ml trong thời gian một giờ.

Bảng 12. Sơ đồ sử dụng vi khuẩn và thực khuẩn thể.

Số	Số lượng cá	Mô tả thí nghiệm
1	20	Đối chứng âm không bị lây nhiễm và không được điều trị bằng chế phẩm thực khuẩn thể
2	20	Đối chứng dương bị lây nhiễm <i>P. fluorescens</i> ở nồng độ bằng 6×10^8 CFU/ml (liều lượng 0,2ml/con cá)

3	20	Nhóm bị lây nhiễm <i>P. fluorescens</i> : ở nồng độ bằng 6×10^8 CFU/ml (liều lượng 0,2ml/con cá) và được điều trị bằng chế phẩm thực khuẩn thể (BAFADOR II) ở nồng độ bằng 10^5 PFU/ml (25ml chế phẩm ở nồng độ bằng 10^8 PFU/ml trên mỗi 2,5 l nước, nhúng trong 1 giờ) trong thời gian 24 giờ sau khi lây nhiễm
4	20	Nhóm bị lây nhiễm <i>P. fluorescens</i> : ở nồng độ bằng 6×10^8 CFU/ml (liều lượng 0,2ml/con cá) và được điều trị bằng chế phẩm thực khuẩn thể (BAFADOR II) ở nồng độ bằng 10^5 PFU/ml (25ml chế phẩm ở nồng độ bằng 10^8 PFU/ml trên mỗi 2,5 l nước, nhúng trong 1 giờ) trong thời gian 48 giờ sau khi lây nhiễm
5	20	Nhóm bị lây nhiễm <i>P. fluorescens</i> : ở nồng độ bằng 6×10^8 CFU/ml (liều lượng 0,2ml/con cá) và điều trị bằng chế phẩm thực khuẩn thể (BAFADOR II) ở nồng độ bằng 10^5 PFU/ml (25ml chế phẩm ở nồng độ bằng 10^8 PFU/ml trên mỗi 2,5 l nước, nhúng trong 1 giờ) trong thời gian 24 giờ và 48 giờ sau khi lây nhiễm

Ước tính tỷ lệ chết của cá trong suốt quá trình thí nghiệm (Bảng 13). Dựa trên các kết quả thu được, chứng tỏ rằng chế phẩm thực khuẩn thể làm giảm tỷ lệ chết của cá trong các nhóm được điều trị bằng thực khuẩn thể cả sau 24 giờ (nhóm 3), và 48 giờ (nhóm 4) sau khi lây nhiễm *Pseudomonas fluorescens* qua thí nghiệm (chết lần lượt là 20 và 30%). Tác dụng trị liệu mạnh nhất được quan sát thấy sau khi sử dụng kép chế phẩm bằng cách nhúng chìm trong thời gian 24 giờ và 48 giờ sau khi lây nhiễm (nhóm 5; chết 15%).

Bảng 13. Tỷ lệ chết của cá chép được nuôi sau khi lây nhiễm *P. fluorescens* qua thí nghiệm và sử dụng chế phẩm thực khuẩn thể (BAFADOR II).

Ngày	Nhóm số				
	1	2	3	4	5
2.10.2015	0	0	0	0	0
3.10.2015	0	1	0	0	0
4.10.2015	0	3	1	2	0
5.10.2015	0	3	1	2	1
6.10.2015	0	3	1	1	1
7.10.2015	0	1	1	1	1
8.10.2015	0	0	0	0	0

Tỷ lệ chết (theo mẫu)	0	11	4	6	3
Tổng tỷ lệ chết	0%	55%	20%	30%	15%

Quy trình thí nghiệm 4

Nguyên liệu thí nghiệm là 100 cá chép phân chia ngẫu nhiên thành 5 nhóm giống nhau được giữ trong các bể riêng rẽ. Cá từ các nhóm 2, 3, 4 và 5 bị lây nhiễm qua thí nghiệm bằng cách tiêm qua màng bụng các chủng trong môi trường *Pseudomonas fluorescens* được phân lập từ cá bị lây nhiễm và nhận dạng bằng cách sử dụng thử nghiệm API. Cá bị lây nhiễm bằng huyền phù vi khuẩn ở nồng độ bằng 6×10^8 CFU/ml (liều lượng 0,2ml trên mỗi con cá). Chế phẩm thực khuẩn thể (BAFADOR III) được sử dụng bằng cách nhúng chìm ở nồng độ bằng 10^5 PFU/ml trong thời gian một giờ.

Bảng 14. Sơ đồ sử dụng vi khuẩn và thực khuẩn thể

Số	Số lượng cá	Mô tả thí nghiệm
1	20	Đối chứng âm không bị lây nhiễm và không được điều trị bằng chế phẩm thực khuẩn thể
2	20	Đối chứng dương bị lây nhiễm <i>P. fluorescens</i> ở nồng độ bằng 6×10^8 CFU/ml (liều lượng 0,2ml/con cá)
3	20	Nhóm bị lây nhiễm <i>P. fluorescens</i> ở nồng độ bằng 6×10^8 CFU/ml (liều lượng 0,2ml/con cá) và điều trị bằng chế phẩm thực khuẩn thể (BAFADOR III) ở nồng độ bằng 10^5 PFU/ml (25ml chế phẩm ở nồng độ bằng 10^8 PFU/ml trên mỗi 2,5 l nước, nhúng trong 1 giờ) trong thời gian 24 giờ sau khi lây nhiễm
4	20	Nhóm bị lây nhiễm <i>P. fluorescens</i> ở nồng độ bằng 6×10^8 CFU/ml (liều lượng 0,2ml/con cá) và điều trị bằng chế phẩm thực khuẩn thể (BAFADOR III) ở nồng độ bằng 10^5 PFU/ml (25ml chế phẩm ở nồng độ bằng 10^8 PFU/ml trên mỗi 2,5 l nước, nhúng trong 1 giờ) trong thời gian 48 giờ sau khi lây nhiễm

5	20	Nhóm bị lây nhiễm <i>P. fluorescens</i> ở nồng độ bằng 6×10^8 CFU/ml (liều lượng 0,2ml/con cá) và điều trị bằng chế phẩm thực khuẩn thể (BAFADOR III) ở nồng độ bằng 10^5 PFU/ml (25ml chế phẩm ở nồng độ bằng 10^8 PFU/ml trên mỗi 2,5 l nước, nhúng trong 1 giờ) trong thời gian 24 giờ và 48 giờ sau khi lây nhiễm
---	----	--

Ước tính tỷ lệ chết của cá trong suốt quá trình thí nghiệm (Bảng 15). Các kết quả thu được cho thấy rằng chế phẩm thực khuẩn thể theo sáng chế làm giảm tỷ lệ chết của cá trong các nhóm được điều trị bằng các thực khuẩn thể, ở cả sau 24 giờ (nhóm 3), và 48 giờ (nhóm 4) sau khi lây nhiễm *Pseudomonas fluorescens* qua thí nghiệm (chết lần lượt là 15 và 25%). Tác dụng trị liệu mạnh nhất được quan sát thấy sau khi sử dụng kép chế phẩm bằng cách nhúng chìm trong thời gian 24 giờ và 48 giờ sau khi lây nhiễm (nhóm 5; chết 10%).

Bảng 15. Tỷ lệ chết của cá chép nuôi sau khi lây nhiễm qua thí nghiệm với *P. fluorescens* và điều trị bằng chế phẩm thực khuẩn thể (BAFADOR III).

Ngày	Nhóm số				
	1	2	3	4	5
12.10.2015	0	0	0	0	0
13.10.2015	0	1	0	0	0
14.10.2015	0	3	1	1	0
15.10.2015	0	3	1	2	1
16.10.2015	0	3	1	1	1
17.10.2015	0	0	0	1	0
18.10.2015	0	0	0	0	0
Tỷ lệ chết (theo mẫu)	0	10	3	5	2
Tổng tỷ lệ chết	0%	50%	15%	25%	10%

Nguyên liệu thí nghiệm là 100 cá chép phân chia ngẫu nhiên thành 5 nhóm giống nhau được giữ trong các bể riêng rẽ. Cá từ các nhóm 2, 3, 4 và 5 bị lây nhiễm qua thí nghiệm bằng cách tiêm qua màng bụng các chủng trong môi trường *Pseudomonas fluorescens* được phân lập từ cá bị lây nhiễm và nhận dạng bằng cách sử dụng thử nghiệm hóa sinh API. Cá bị lây nhiễm bằng huyền phù vi khuẩn ở nồng độ bằng 6×10^8 CFU/ml (liều lượng 0,2ml trên mỗi con cá). Chế phẩm thực khuẩn thể (BAFADOR IV) được sử dụng thông qua sự nhúng chìm ở nồng độ bằng 10^5 PFU/ml trong thời gian một giờ.

Bảng 16. Sơ đồ sử dụng vi khuẩn và thực khuẩn thể

Số	Số lượng cá	Mô tả thí nghiệm
1	20	Đối chứng âm không bị lây nhiễm và không được điều trị bằng chế phẩm thực khuẩn thể
2	20	Đối chứng dương bị lây nhiễm <i>P. fluorescens</i> ở nồng độ bằng 6×10^8 CFU/ml (liều lượng 0,2ml/con cá)
3	20	Nhóm bị lây nhiễm <i>P. fluorescens</i> ở nồng độ bằng 6×10^8 CFU/ml (liều lượng 0,2ml/con cá) và điều trị bằng chế phẩm thực khuẩn thể (BAFADOR IV) ở nồng độ bằng 10^5 PFU/ml (25ml chế phẩm ở nồng độ bằng 10^8 PFU/ml trên mỗi 2,5 l nước, nhúng trong 1 giờ) trong thời gian 24 giờ sau khi lây nhiễm
4	20	Nhóm bị lây nhiễm <i>P. fluorescens</i> ở nồng độ bằng 6×10^8 CFU/ml (liều lượng 0,2ml/con cá) và điều trị bằng chế phẩm thực khuẩn thể (BAFADOR IV) ở nồng độ bằng 10^5 PFU/ml (25ml chế phẩm ở nồng độ bằng 10^8 PFU/ml trên mỗi 2,5 l nước, nhúng trong 1 giờ) trong thời gian 48 giờ sau khi lây nhiễm
5	20	Nhóm bị lây nhiễm <i>P. fluorescens</i> ở nồng độ bằng 6×10^8 CFU/ml (liều lượng 0,2ml/con cá) và điều trị bằng chế phẩm thực khuẩn thể (BAFADOR IV) ở nồng độ bằng 10^5 PFU/ml (25ml chế phẩm ở nồng độ bằng 10^8 PFU/ml trên mỗi 2,5 l nước, nhúng trong 1 giờ) trong thời gian 24 giờ và 48 giờ sau khi lây nhiễm

Ước tính tỷ lệ chết của cá trong suốt quá trình thí nghiệm (Bảng 17). Các kết quả thu được cho thấy rằng chế phẩm thực khuẩn thể theo sáng chế làm giảm tỷ lệ chết của cá trong các nhóm được điều trị bằng các thực khuẩn thể, ở cả sau 24 giờ (nhóm

3), và 48 giờ (nhóm 4) sau khi lây nhiễm *Pseudomonas fluorescens* qua thí nghiệm (chết lần lượt là 15 và 25 %). Tác dụng trị liệu mạnh nhất được quan sát thấy sau khi sử dụng kép chế phẩm bằng cách nhúng chìm trong thời gian 24 giờ và 48 giờ sau khi lây nhiễm (nhóm 5; chết 10%).

Bảng 17. Tỷ lệ chết của cá chép được nuôi sau khi lây nhiễm *P. fluorescens* qua thí nghiệm và điều trị bằng chế phẩm thực khuẩn thể (BAFADOR IV).

Ngày	Nhóm số				
	1	2	3	4	5
22.10.2015	0	0	0	0	0
23.10.2015	0	1	0	0	0
24.10.2015	0	3	1	1	0
25.10.2015	0	3	1	2	1
26.10.2015	0	2	1	1	0
27.10.2015	0	1	0	1	1
28.10.2015	0	0	0	0	0
Tỷ lệ chết (theo mẫu)	0	11	3	5	2
Tổng tỷ lệ chết	0%	55%	15%	25%	10%

Dựa trên các thí nghiệm thực hiện, chứng tỏ rằng tỷ lệ chết của cá được làm giảm đáng kể trong các nhóm được điều trị bằng các thực khuẩn thể, trong cả 24 giờ và 48 giờ sau khi lây nhiễm *Pseudomonas fluorescens* qua thí nghiệm. Tác dụng trị liệu mạnh nhất được quan sát thấy sau khi sử dụng kép chế phẩm bằng cách nhúng chìm trong thời gian 24 giờ và 48 giờ sau lây nhiễm. Hơn nữa, đã quan sát thấy rằng tỷ lệ chết ở cá là nhỏ nhất trong các thí nghiệm mà các chế phẩm thực khuẩn thể BAFADOR III và BAFADOR IV được sử dụng trong đó. Trong các nghiên cứu này, tỷ lệ chết sau khi sử dụng kép chế phẩm là ở mức độ bằng 10% trong khi trong trường hợp của BAFADOR II là ở mức độ bằng 15%.

Tổng hợp kết quả có liên quan đến độ an toàn và hiệu quả của các chế phẩm thực khuẩn thể ở cá được nuôi.

1. Chế phẩm thực khuẩn thể không ảnh hưởng đến các thông số ở máu về hóa sinh và huyết học ở cá được nuôi.
2. Chế phẩm thực khuẩn thể kích thích cả hệ miễn dịch tế bào bẩm sinh và miễn dịch dịch thể ở cá được nuôi.
3. Chế phẩm thực khuẩn thể làm giảm tỷ lệ chết của cá được nuôi bị lây nhiễm chủng vi khuẩn gây bệnh.

Tài liệu tham khảo

Pridgeon JW, and Klesius PK. Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. CAB Reviews 2012, 7, No. 048doi: 10.1079/PAVSNNR20127048.

Sudheesh PS, Al-Ghabshi A, Al-Mazrooei N, Al-Habsi S. Comparative pathogenomics of bacteria causing infectious diseases in fish. *Int J Evol Biol.* 2012;2012:457264.

Almeida A, Cunha A, Gomes NC, Alves E, Costa L, Faustino MA. Phage therapy and photodynamic therapy: low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. *Mar Drugs.* 2009, 30;7(3):268-313.

Heuer OE, Kruse H, Grave K, Collignon P, Karunasagar I, Angulo FJ. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin Infect Dis.* 2009, 15;49(8):1248-53.

Richards GP. Bacteriophage remediation of bacterial pathogens in aquaculture: a review of the technology, *Bacteriophage*, 4:4, e975540, DOI: 10.4161/21597081.2014.97554.

Eyer L, Pantůcek R, Růžicková V, Doskar J. [New perspectives of the phage therapy]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2007, 13(6):231-5 Clark JR, March JB. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends Biotechnol.* 2006, 24(5):212-8.

Pirnay JP, Verbeken G, Rose T, Serge Jennes S, Zizi M, Isabelle Huys I, Rob Lavigne R, Maia Merabishvili M, Mario Vaneechoutte M, Angus Buckling A, De Vos D. Introducing yesterday's phage therapy in today's medicine. *Future Virol.* 2012, 7(4): 379–390.

Atterbury RJ, Van Bergen MA, Ortiz F, Lovell MA, Harris JA, De Boer A, Wagenaar JA, Allen VM, Barrow PA. Bacteriophage therapy to reduce salmonella colonization of broiler chickens. *Appl Environ Microbiol.* 2007, 73(14):4543-9.

Bhardwaj SB. Bacteriophage Therapy: A possible new alternative for oral diseases. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.*2014, 3(6) 437-442.

Górski A, Międzybrodzki R, Borysowski J, Dąbrowska K, Wierzbicki P, Ohams M, Korczak-Kowalska G, Olszowska-Zaremba N, Łusiak-Szelachowska M, Kłak M, Jończyk E, Kaniuga E, Gołaś A, Purchla S, Weber-Dąbrowska B, Letkiewicz S, Fortuna W, Szufnarowski K, Pawełczyk Z, Rogóż P, Kłosowska D. Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. *Adv Virus Res.* 2012, 3:41-71.

Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Górski A. Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2000,48(6):547-51.

Pereira C, Silva YJ, Santos AL, Cunha A, Gomes NC, Almeida A. Bacteriophages with potential for inactivation of fish pathogenic bacteria: survival, host specificity and effect on bacterial community structure. *Mar Drugs.* 2011, 9(11):2236-55.

Kim JH, Son JS, Choi YJ, Choresca CH, Shin SP, Han JE, Jun JW, Kang DH, Oh C, Heo SJ, Park SC. Isolation and characterization of a lytic Myoviridae bacteriophage PAS-1 with broad infectivity in *Aeromonas salmonicida*. *CurrMicrobiol.* 2012, 64(5):418-26.

United States Patent Application Publication US 2013/0323209 A1. Novel bacteriophage and its use for preventing proliferation of pathogenic bacteria.

Kim JH, Son JS, Choi YJ, Choresca CH, Shin SP, Han JE, Jun JW, Park SC. Complete genomic sequence of a T4-like bacteriophage, phiAS4, infecting *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Arch Virol.* 2012, 157(2):391-5.

Park SC, Shimamura I, Fukunaga M, Mori KI, Nakai T. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Appl Environ Microbiol.* 2000, 66(4):1416-22.

Prasad Y, Kumar D, Sharma AK, Nisha D, Ninawe AS. Isolation and efficacy characterizations of lytic bacteriophages against antibiotic resistant *Pseudomonas fluorescens* from Sub Himalaya region. *Biochem. Cell. Arch.* 2010, 10:21 SA-29.

Imbeault S, Parent S, Lagace M, Uhland CF, Blais JF. Using Bacteriophages to prevent furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* in farmed brook trout. *J AquatAnim Health* 2006, 18 (3): 203-214.

United States Patent Application Publication US 2014/0105866 A1. Bacteriophages useful for the prophylaxis and therapy of *Vibrio anguillarum*.

Cruz-Papa D, Candare CM, Cometa GL, Gudez DE, Guevara AM, Relova MB, Pap RD. *Aeromonas hydrophila* Bacteriophage UP87: An Alternative to Antibiotic Treatment for Motile *Aeromonas* Septicemia in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). The Philippine agriculturist 2014, 97(1):96-101.

Wu JL, Hui-Ming Lin HM, Jan L, Hsu YL, Chang LH. Biological Control of Fish Bacterial Pathogen, *Aeromonas hydrophila*, by Bacteriophage AH 1. Fish Pathology 1981, 15 (3/4):271-276.

Prasad Y, Arpana, Kumar D, Sharma AK. Lytic bacteriophages specific to *Flavobacterium columnare* rescue catfish, *Clarias batrachus* (Linn.) from columnaris disease. J Environ Biol. 2011, 32(2):161-8.

Su MT, Tyamagondlu V. V., Bodmer R. 1998. Large- and small-scale preparation of bacteriophage lambda lysate and DNA. BioTechniques, 25(1): 44-6.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chúng thực khuẩn thể được chọn từ nhóm được nộp lưu trong Bộ Sưu Tập Vi Sinh Vật Ba Lan có các số nộp lưu sau đây: F/00096 (chủng 25AhydR2PP), F/00094 (chủng 50AhydR13PP), F/00098 (chủng 22PfluR64PP), F/00099 (chủng 67PfluR64PP), F/00100 (chủng 71PfluR64PP), F/00095 (chủng 98PfluR60PP) và F/00101 (chủng 60AhydR15PP).

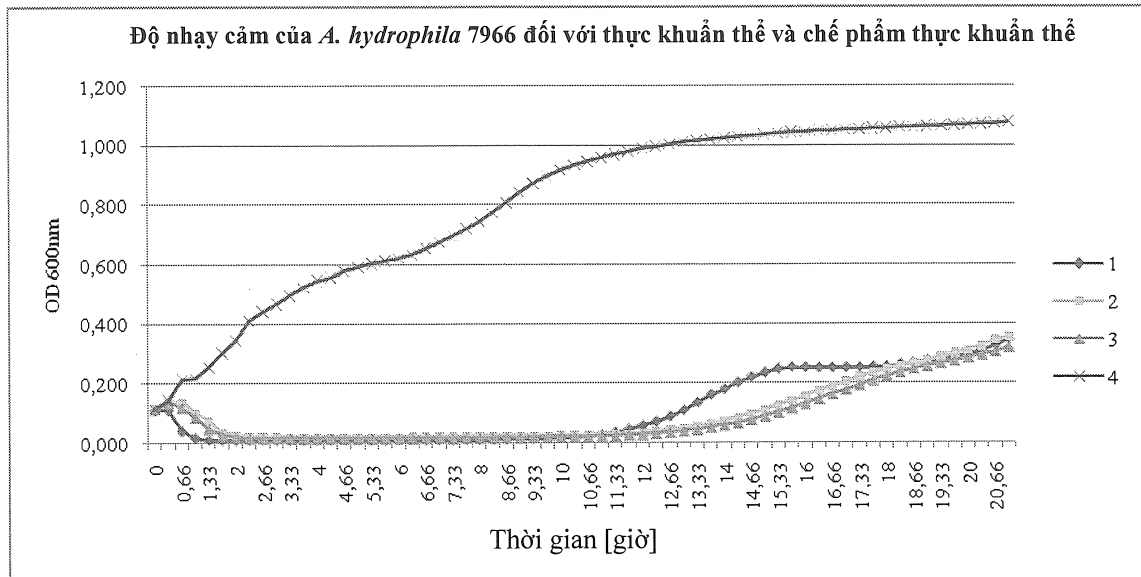


Fig. 1

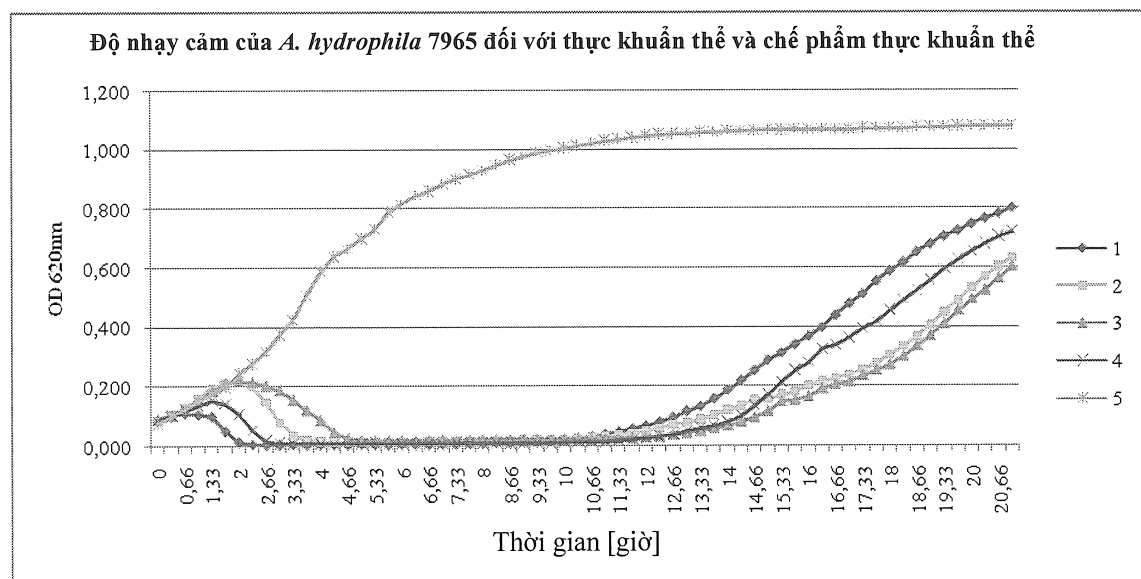


Fig. 2

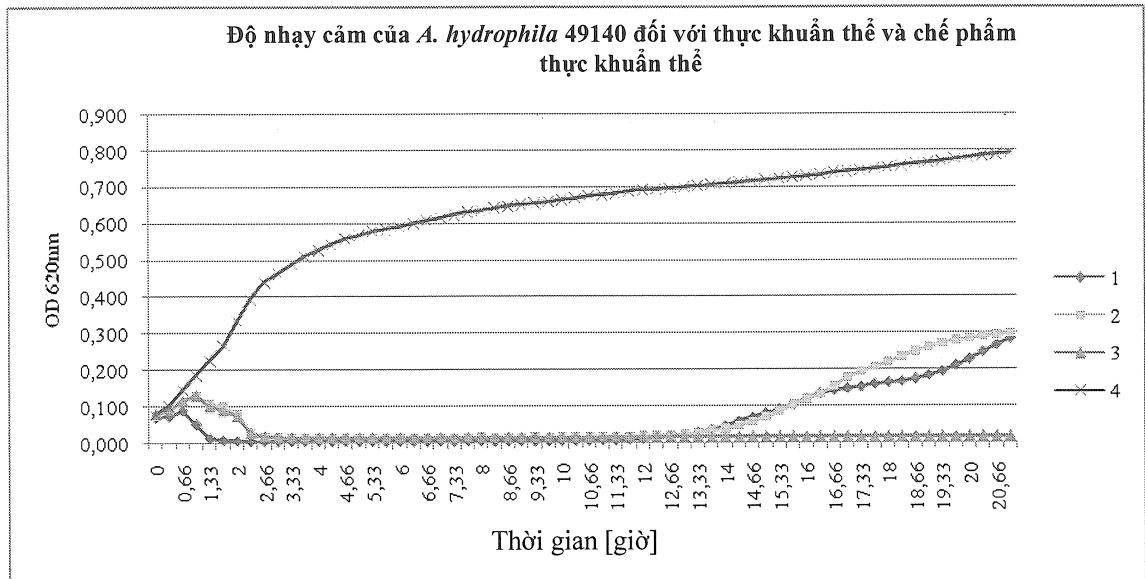


Fig. 3

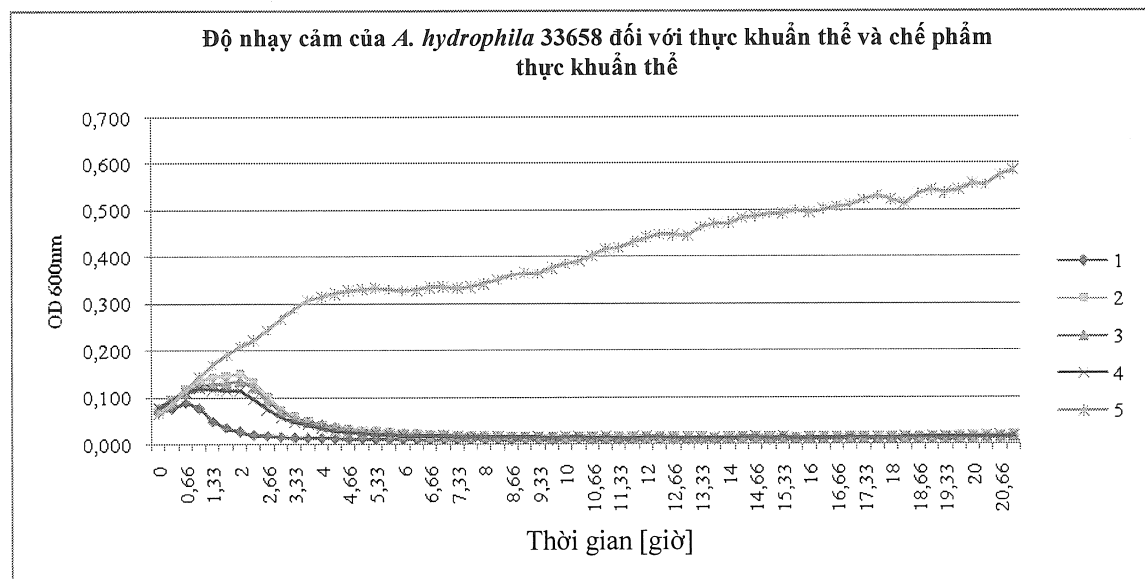


Fig. 4

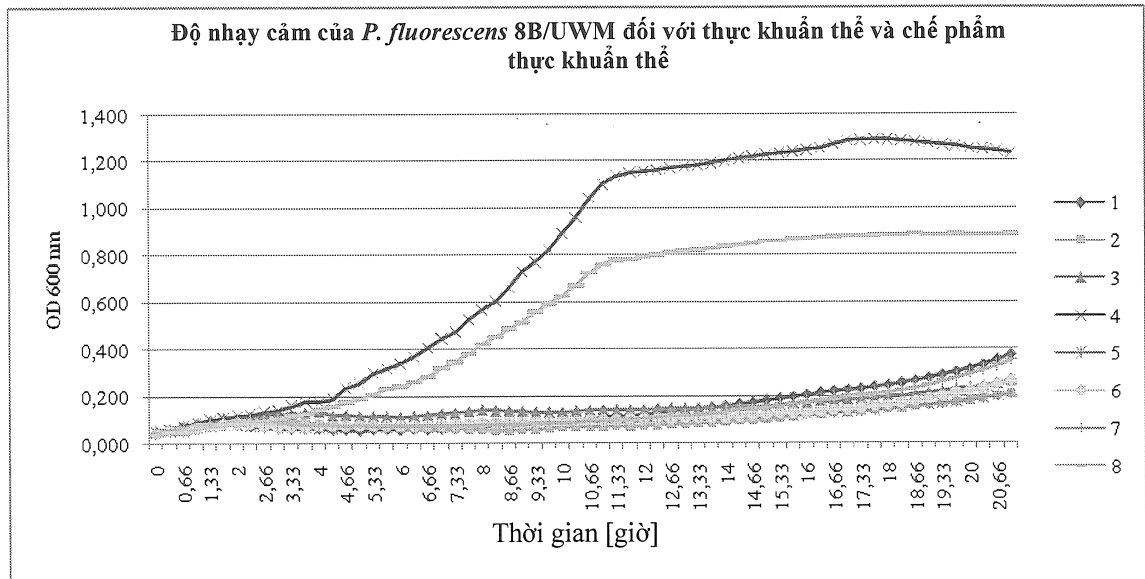


Fig. 5

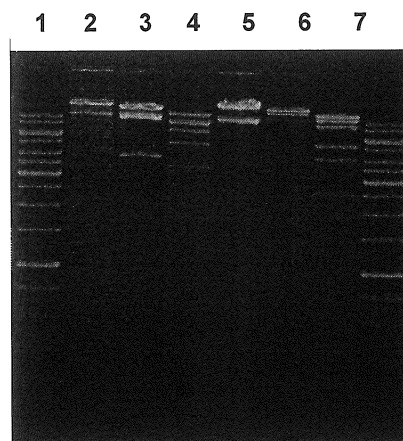


Fig. 6

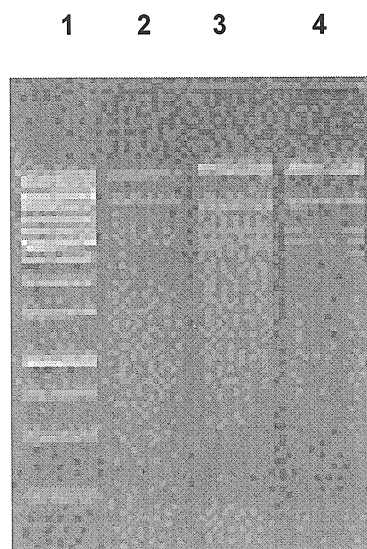


Fig. 7

4/4

1 2 3

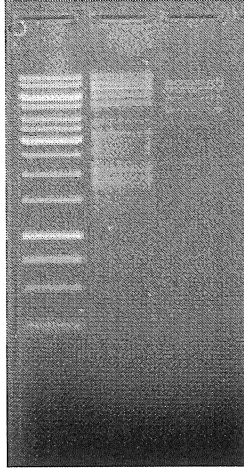


Fig. 8

1 2 3

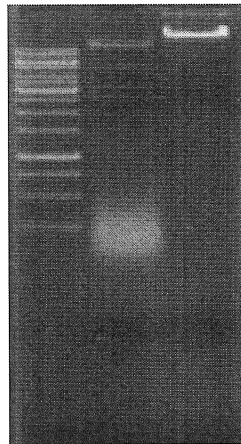


Fig. 9