



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

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

(11)



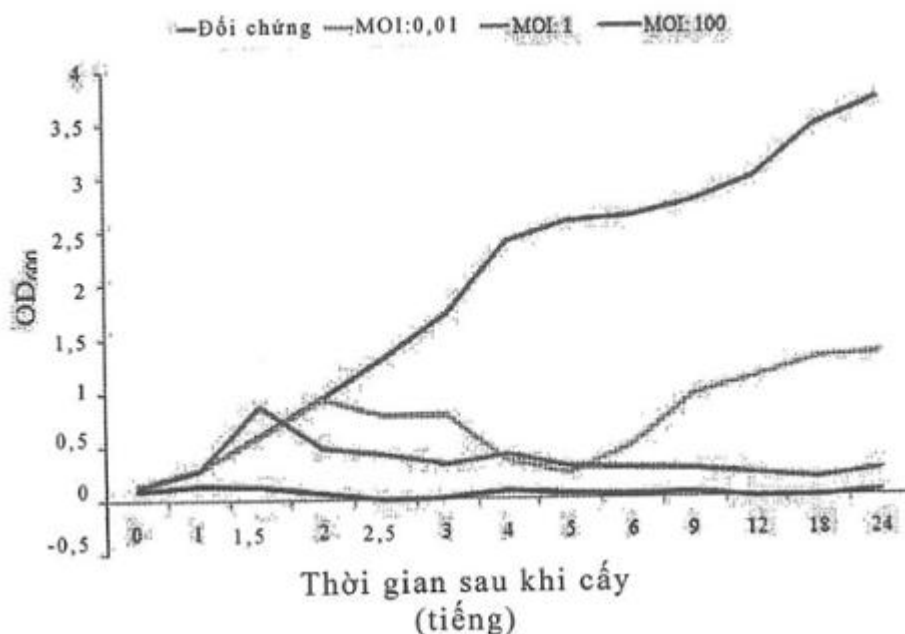
1-0036255

(51)⁷ C12N 7/00; A61P 31/04; A23K 1/17; (13) B
A61K 39/12

- (21) 1-2015-00234 (22) 19/04/2013
(86) PCT/KR2013/003334 19/04/2013 (87) WO/2013/191363 27/12/2013
(30) 10-2012-0067606 22/06/2012 KR; 10-2012-0067811 25/06/2012 KR
(45) 25/07/2023 424 (43) 25/06/2015 327A
(73) CTC BIO, INC. (KR)
1F., 13, Jungdae-ro 40-gil, Songpa-gu, Seoul 138-858, Republic of Korea
(72) SUNG, Kihong (KR); CHOI, Dae-keon (KR); KIM, Jaehoon (KR).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) THỂ THỰC KHUẨN CAUDOVIRALES SIPHOVIRIDAE VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA THỂ THỰC KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập tới thể thực khuẩn mới mà mới được phân lập và đã được xác định, chế phẩm chứa hoạt chất tương tự làm thành phần hoạt tính để ức chế sự tăng sinh của vi khuẩn hoặc diệt nó, và sáng chế có thể được sử dụng linh hoạt làm chế phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn, chế phẩm xử lý nước dằn, thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng, phụ gia thức ăn và các loại tương tự.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế liên quan đến thể thực khuẩn mới mà gần đây mới được phân lập và được xác định, chế phẩm chứa thể thực khuẩn này dùng làm hoạt chất nhằm ức chế sự tăng sinh của vi khuẩn hoặc diệt nó, chế phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn, chế phẩm để xử lý nước dằn, thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng, và phụ gia thức ăn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vibrio parahaemolyticus là trực khuẩn gram-âm thuộc họ *Vibrionaceae*, được biết là lây nhiễm cho người, những người có bệnh tiềm ẩn ở tình trạng miễn dịch bị suy giảm như là bệnh gan, nghiện rượu và tiểu đường, ăn phải cá và động vật có vỏ bị nhiễm vi khuẩn sống hoặc thức ăn nấu chưa chín kỹ, hoặc có vết thương tiếp xúc với nước biển nhiễm bẩn. Tại nhiều quốc gia bao gồm Hàn Quốc và Nhật Bản, các trường hợp nhiễm khuẩn liên tục tăng lên mỗi năm do thói quen ăn cá sống và động vật có vỏ, và được nhìn nhận là vấn đề nghiêm trọng tần suất xuất hiện khá cao. Gần đây, cùng với trào lưu ăn cá sống và động vật có vỏ gia tăng tại nhiều quốc gia phương Tây, các đợt bùng phát bệnh do nhiễm vi khuẩn lan ra khắp nước Mỹ, châu Âu, và trên toàn thế giới. Bệnh nhiễm khuẩn này được biết là có liên quan mật thiết tới loài hàu, và bởi vì các vi khuẩn này tích cực tái sinh sôi khi nhiệt độ nước tăng, hoạt động mua bán và phân phối hàu bị cấm mỗi mùa hè, đặc biệt là trong khoảng thời gian từ tháng 6 đến tháng 9 khi loài này sinh sôi mạnh nhất. Cụ thể, cần phải cẩn trọng hơn do sự gia tăng các bữa ăn tập thể và dạng tương tự có thể dẫn tới đại dịch.

Aeromonas, *Aeromonas hydrophila* di động thuộc họ *Aeromonadaceae*, lây nhiễm cho nhiều loại cá và gây ra nhiễm trùng máu, chảy máu, loét và triệu chứng tương tự, có thể gây chết hàng loạt, kết quả là gây ra thiệt hại kinh tế đáng kể. Cụ thể, tại các trang trại nuôi trồng thủy sản trong nước, bệnh nhiễm khuẩn *Aeromonas hydrophila* có thể gây lây nhiễm nghiêm trọng do việc gây giống được tiến hành trong không gian rất chật chội và hạn hẹp. Ví dụ tiêu biểu về cá ở trang trại nuôi trồng thủy

sản như là cá chép và cá vàng đều từng phải chịu thiệt hại nặng nề bởi vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* trong trang trại nuôi cá khắp khu Jincheon, tỉnh Bắc Chungcheong.

Aeromonas hydrophila vốn là vi khuẩn sinh trưởng dưới nước, thường được ngăn ngừa bằng cách xử lý bằng thuốc kháng sinh trong nhiều trường hợp. Do đó, hầu hết *Aeromonas hydrophila* thể hiện tính kháng thuốc kháng sinh, và lượng thuốc kháng sinh còn lại trở thành mối đe dọa với sức khỏe quốc gia và còn gây thiệt hại do sự xuất hiện của các vi khuẩn kháng thuốc trở nên nghiêm trọng hơn.

Mặt khác, thể thực khuẩn là virus mà đặc biệt lây nhiễm vi khuẩn, và được tìm ra bởi Twort, nhà vi khuẩn học người Anh, vào năm 1915, trong nghiên cứu của ông về hiện tượng mà cụm khuẩn *micrococcus* khi phân hủy đã biến vi khuẩn thành trong suốt. Vào năm 1917, nhà vi khuẩn học người Pháp d'Herelle tìm ra rằng có thứ gì đó phân hủy *Shigella dysenteriae* trong phần lọc từ phân của bệnh nhân bị chứng kiết lỵ, và tiếp tục nghiên cứu nhằm xác định được thực thể đó, dẫn tới việc tìm ra sự tồn tại của thể thực khuẩn nghĩa là "vi khuẩn ăn". Những trị liệu sử dụng thể thực khuẩn vẫn được nghiên cứu nhưng chỉ ở Đông Âu và Liên Xô sau sự phát triển của thuốc kháng sinh. Tuy nhiên, gần đây, do vi khuẩn gây bệnh kháng đa thuốc và siêu vi khuẩn do việc sử dụng quá mức và/hoặc sử dụng sai thuốc kháng sinh đã được báo cáo thường xuyên, và nhiều vấn đề của thuốc kháng sinh thông thường vẫn xuất hiện, thể thực khuẩn dần nhận được sự chú ý như là giải pháp thay thế cho thuốc kháng sinh. Hơn nữa, thể thực khuẩn có lợi thể nhờ thời gian phát triển ngắn và chi phí phát triển thấp, khả năng chọn lựa vi khuẩn, tính bền vững, tác dụng phụ và các ưu điểm khác khi so sánh với thuốc kháng sinh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Do vậy, mục đích của sáng chế là đề xuất thể thực khuẩn mới được phân lập có hoạt tính diệt khuẩn đối với *Vibrio parahaemolyticus*, chế phẩm chứa thực khuẩn này để ức chế sự tăng sinh của *Vibrio parahaemolyticus* hoặc diệt nó hoặc phương pháp ức chế sự tăng sinh của *Vibrio parahaemolyticus* hoặc diệt nó, chế phẩm xử lý nước dần

hoặc phương pháp xử lý nước dần, dược phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* hoặc phương pháp để phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng, và phụ gia thức ăn cho cá và động vật có vỏ.

Ngoài ra, mục đích khác của sáng chế là đề xuất thể thực khuẩn mới được phân lập có hoạt tính diệt khuẩn đối với *Aeromonas hydrophila*, chế phẩm chứa thực khuẩn này để ức chế sự tăng sinh của *Aeromonas hydrophila* hoặc diệt nó hoặc phương pháp ức chế sự tăng sinh của *Aeromonas hydrophila* hoặc diệt nó, dược phẩm để phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn *Aeromonas hydrophila* hoặc phương pháp để phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn *Aeromonas hydrophila*, thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng, và phụ gia thức ăn cho cá.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các đối tượng và các khía cạnh khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng qua mô tả dưới đây của phương án thực hiện khi xem xét hình vẽ minh họa kèm theo, trong đó:

FIG. 1 thể hiện kết quả tác động điện di xung điện trường lên PVP-1 gADN và bước thủy phân bởi 12 endonucleaza giới hạn. Hàng M thể hiện gen đánh dấu PFG ở khoảng thấp (New England Biolabs). Hàng 1 biểu thị thể thực khuẩn gADN không thủy phân. Hàng 2 đến 13 biểu thị mẫu thủy phân thể thực khuẩn gADN lần lượt được tạo bởi SacII, Sau3AI, MspI, XbaI, NotI, HindIII, SmaI, SphI, NcoI, HpaII, SpeI và EcoRI (New England Biolabs). Kích thước bộ gen của PVP-1 được ước tính là khoảng 100 kb;

FIG. 2 là kết quả việc quan sát PVP-1 đã nhuộm âm tính bằng kính hiển vi điện tử. A là hình ảnh phóng đại của một PVP-1 duy nhất, B là hình ảnh của nhóm PVP-1 và C là hình ảnh thể hiện PVP-1 ức chế sự phát triển của *Vibrio parahaemolyticus*;

FIG. 3 thể hiện hoạt tính diệt khuẩn của PVP-1 kháng *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 33844 mà được cùng nuôi cấy với PVP-1 có MOI (tính đa nhiễm) lần lượt là 0,01, 1 và 100. Kết quả thể hiện giá trị trung bình $\pm$ độ lệch tiêu chuẩn từ ba thử nghiệm;

FIG. 4 thể hiện kết quả tác động điện di gel trường xung điện lên PAH1-C gADN (trái) và PAH6-C gADN (phải), và phân hủy chúng bằng 12 enzym endonucleaza giới hạn. Hàng M chứng tỏ gen đánh dấu PFG ở khoảng thấp (New England Biolabs). Hàng 1 biểu thị thể thực khuẩn gADN mà không thủy phân. Hàng 2 đến 13 đại diện mẫu thủy phân thể thực khuẩn PAH1-C và PAH6-C lần lượt được tạo ra bởi SacII, Sau3AI, MspI, XbaI, NotI, HindIII, SmaI, SphI, NcoI, HpaII, SpeI và EcoRI (New England Biolabs). Kích thước bộ gen của hai thể thực khuẩn gADN được ước tính là khoảng 50 kb;

FIG. 5 là kết quả việc quan sát PAH1-C (trái) hoặc PAH6-C (phải) được nhuộm màu âm tính bằng kính hiển vi điện tử;

FIG. 6 thể hiện hoạt động tiêu vi khuẩn của PAH1-C và PAH6-C kháng *Aeromonas hydrophila* AH16, mà được cùng nuôi cấy với PAH1-C và PAH6-C có MOI (tính đa nhiễm) lần lượt là 0,01, 1 và 100. Kết quả thể hiện giá trị trung bình $\pm$ độ lệch tiêu chuẩn từ ba thử nghiệm; và

FIG. 7 thể hiện hiệu quả trị liệu của PAH1-C và thể thực khuẩn PAH6-C kháng nhiễm *Aeromonas hydrophila* trên cá chạch.

Phương pháp tối ưu

Dưới đây, các phương án được ưu tiên trong sáng chế sẽ được mô tả chi tiết cùng với viện dẫn các hình vẽ kèm theo. Trước khi mô tả, nên hiểu rằng thuật ngữ này được sử dụng trong bản mô tả và yêu cầu bảo hộ kèm theo không nên được phân tích giới hạn chỉ ở các nghĩa tổng quát và nghĩa từ điển, mà nên diễn giải dựa trên ý nghĩa và khái niệm tương thích với khía cạnh kỹ thuật của sáng chế trên nguyên tắc cơ bản mà các tác giả sáng chế được phép để xác định thuật ngữ thích hợp cho diễn giải tốt nhất. Bởi vậy, những phương pháp được đề xuất dưới đây chỉ là các ví dụ ưu tiên cho mục đích minh họa, không dự định giới hạn phạm vi của bản mô tả, chính vì vậy nên hiểu rằng các phương án khác tương đương và sửa đổi có thể được tiến hành trong đó mà không vượt ra khỏi tinh thần và phạm vi của bản mô tả.

Mô tả chi tiết sáng chế

[*Thể thực khuẩn PVP-1 mới và sử dụng nó để ức chế sự tăng sinh của Vibrio parahaemolyticus*]

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến thể thực khuẩn có hoạt tính diệt đặc hiệu đối với *Vibrio parahaemolyticus*.

Cụ thể, thể thực khuẩn khác biệt về mặt hình thái học thuộc họ *siphovirida* và bộ *Caudovirales*, và có số mẫu nộp lưu: KCTC 12130BP.

Các tác giả sáng chế thu thập mẫu trầm tích từ nước biển ở trại nuôi hàu ở vùng biển phía nam của Hàn Quốc, đồng thời phân lập và xác định thể thực khuẩn có hoạt tính diệt *Vibrio parahaemolyticus*. Thể thực khuẩn này được đặt tên là PVP-1, và được ký thác tại viện lưu giữ giống mẫu Hàn Quốc dưới số nộp lưu KCTC 12130BP vào ngày 3 tháng 2 năm 2012.

Các tác giả sáng chế đã phân lập thể thực khuẩn (dưới đây gọi là PVP-1) sử dụng *Vibrio parahaemolyticus* của ATCC 33844 làm vật chủ và phân hủy nó, và đã xác nhận được rằng PVP-1 có hoạt tính diệt khuẩn bằng cách tạo mảng với *Vibrio parahaemolyticus*.

Ngoài ra, do việc quan sát mặt hình thái học PVP-1 qua kính hiển vi điện tử đã xác nhận rằng thể thực khuẩn này thuộc họ *siphoviridae* và bộ *Caudovirales*.

Hơn nữa, do việc phân tích bộ gen PVP-1, đã xác nhận rằng thể thực khuẩn này được cấu thành từ chuỗi xoắn kép ADN (dsADN) và kích thước bộ gen của nó là khoảng 100 kb, và đã phát hiện được rằng PVP-1 là thể thực khuẩn đầu tiên có khả năng lây nhiễm cho *Vibrio parahaemolyticus* mà thuộc họ *siphoviridae*, bởi vì toàn bộ bộ gen PVP-1 không có sự tương đồng với thể thực khuẩn khác.

Thể thực khuẩn PVP-1 theo sáng chế có thể được nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy thể thực khuẩn thông thường theo số lượng lớn. Để làm môi trường nuôi cấy, môi trường cần bao gồm nguồn cacbon, nguồn nitơ, vitamin và chất khoáng có thể được sử dụng. Ví dụ như, NB (canh dinh dưỡng), môi trường dịch thể TSB (canh đậu tương tripsin), hoặc môi trường đặc TSA (thạch đậu tương tripsin) và dạng tương tự có thể được sử dụng. Việc nuôi cấy có thể được tiến hành dưới điều kiện nuôi cấy thông

thường. Để loại bỏ môi trường nuôi cấy trong dung dịch nuôi cấy và chỉ thu hoạch các tế bào tập trung, có thể sử dụng quay ly tâm hoặc lọc, và bước này có thể được tiến hành tùy theo nhu cầu của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các tế bào tập trung có thể được bảo quản bằng đông lạnh hoặc đông khô để không bị mất hoạt tính của chúng.

PVP-1 thể hiện độ nhạy đối với *Vibrio parahaemolyticus*.

Tốt hơn là, *Vibrio parahaemolyticus* là *Vibrio parahaemolyticus* ATCC27969, ATCC33844, ATCC17802, VP01, VP02, VP03, VP04, VP05, VP06, VP07, VP08, VP09, VP10, VP11, VP13, VP14, VP17, VP18, VP20, VP21, VP22, VP23, VP24, VP25, VP26, hoặc VP27.

Tốt hơn là, *Vibrio parahaemolyticus* là chủng kháng đa thuốc.

Do đó, theo một phương án khác, sáng chế liên quan đến chế phẩm chứa thể thực khuẩn PVP-1 hoặc môi trường nuôi cấy của nó như hoạt chất để ức chế sự tăng sinh của *Vibrio parahaemolyticus* hoặc diệt nó, hoặc phương pháp ức chế sự tăng sinh của *Vibrio parahaemolyticus* hoặc diệt nó bằng cách xử lý theo cách tương tự.

Theo một phương án khác, sáng chế liên quan đến thể thực khuẩn PVP-1 hoặc môi trường nuôi cấy của nó, hoặc thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng và phụ gia thức ăn cho cá và động vật có vỏ chứa thành phần trên làm hoạt chất. Tốt hơn là, nó liên quan đến thể thực khuẩn PVP-1 hoặc môi trường nuôi cấy của nó, hoặc thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng và phụ gia thức ăn cho cá và động vật có vỏ chứa thành phần trên làm hoạt chất để ức chế sự tăng sinh của *Vibrio parahaemolyticus* hoặc diệt nó của thể thực khuẩn này.

Chế phẩm ức chế sự tăng sinh của *Vibrio parahaemolyticus* hoặc diệt nó, thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng và phụ gia thức ăn theo sáng chế thể hiện tính đặc hiệu rất cao với *Vibrio parahaemolyticus*, so với các chất hiện có. Do đó, chúng có tác dụng tuyệt vời khi chỉ diệt *Vibrio parahaemolyticus* mà không có tác dụng phụ như diệt vi khuẩn có lợi và vẫn diệt được vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh và mầm bệnh kháng đa thuốc; và chế phẩm loại này có vòng đời sản phẩm dài hơn các sản phẩm hiện hành bởi vì chúng không thúc đẩy dung nạp hoặc kháng chống lại mầm bệnh.

Trong bản mô tả của sáng chế, 'thuốc kháng sinh' có nghĩa là chất bảo quản, chất diệt khuẩn và chất kháng vi sinh vật.

Phụ gia thức ăn có thể được thêm vào thức ăn nuôi cá hoặc động vật có vỏ.

Hoặc, khi sản xuất thức ăn, PVP-1 hoặc môi trường nuôi cấy của nó có thể được trực tiếp thêm vào thức ăn, nhưng không trộn lẫn vào thức ăn chỉ sau khi được sản xuất riêng biệt dưới dạng phụ gia thức ăn.

Cá và động vật có vỏ có thể bao gồm hàu, trai, cua, tôm hoặc cá, nhưng không chỉ giới hạn trong số các loài đó.

Theo một phương án khác, sáng chế liên quan đến thể thực khuẩn PVP-1 hoặc môi trường nuôi cấy của nó, hoặc chế phẩm xử lý nước dằn chứa thể thực khuẩn làm hoạt chất; và phương pháp xử lý sinh học nước dằn bằng cách sử dụng chế phẩm tương tự. Tốt hơn là, sáng chế liên quan đến thể thực khuẩn PVP-1 hoặc môi trường nuôi cấy của nó, hoặc chế phẩm xử lý nước dằn chứa thể thực khuẩn làm hoạt chất để ức chế sự tăng sinh của *Vibrio parahaemolyticus* hoặc diệt nó; và phương pháp sinh học để xử lý nước dằn bằng cách sử dụng chế phẩm tương tự.

Chế phẩm xử lý nước dằn có thể diệt khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, chế phẩm này có thể có trong nước dằn, hoặc ức chế sự tăng sinh của vi khuẩn.

'Nước dằn' đề cập tới nước biển được trữ trong bể chứa ở đáy tàu và được tháo ra ngoài nhằm giữ cân bằng để tránh bị nghiêng về một bên khi hàng hóa được dỡ xuống hoặc chất lên tàu, hoặc để ngăn chân không vọt trời lên khỏi bề mặt nước khiến không thể điều khiển được tàu.

Trong bản mô tả của sáng chế, 'nước dằn' đề cập tới nước dằn được trữ trong bể chứa nước dằn và cũng là nước được bơm vào để tích trữ trong bể chứa nước dằn.

Trong bản mô tả của sáng chế, 'tàu' nghĩa là bất kỳ loại tàu nào trên biển trong đó bao gồm tàu ngầm, tàu nổi, sà lan nổi, kho lưu trữ nổi, và thiết bị nổi để tích trữ hoặc chất và dỡ hàng hóa.

Chế phẩm ức chế sự tăng sinh của *Vibrio parahaemolyticus* hoặc diệt nó, chế

phẩm xử lý nước dần, thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng và phụ gia thức ăn cho cá và động vật có vỏ có thể được sản xuất ở thể lỏng như là dung dịch, huyền phù, nhũ tương, nhưng cũng có thể được sản xuất ở thể rắn dựa trên thể thực khuẩn đã được làm khô như là dạng bột, dạng hạt nhỏ, dạng viên nén hoặc dạng viên nang.

Chế phẩm ức chế sự tăng sinh của *Vibrio parahaemolyticus* hoặc diệt nó, chế phẩm xử lý nước dần, thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng và phụ gia thức ăn cho cá và động vật có vỏ có thể còn bao gồm chất dẫn thuốc có thể chấp nhận được, và có thể được phối trộn chất dẫn thuốc. Chất dẫn thuốc có thể chấp nhận được đề cập tới chất dẫn thuốc không kích thích sinh vật và không ức chế hoạt tính sinh học và đặc tính. Chế phẩm có thể được sản xuất dưới dạng chất dễ phân tán trong nước, dạng bột dễ phân tán trong nước, dạng dung dịch dễ phân tán trong nước, chất lỏng, dung dịch gốc nước, dạng bột hoặc dạng viên nang dễ hòa tan trong nước bởi chất hoạt động bề mặt hoặc chất phụ trợ và dạng tương tự cho mục đích ổn định chế phẩm phù hợp để đóng gói thực tế. Để làm một ví dụ về chất hoạt động bề mặt, chất hoạt động bề mặt được chọn từ nhóm bao gồm: muối natri hoặc muối canxi của hợp chất sulfonat như là alkyl(C₈~C₁₂)arylsulfonat, dialkyl(C₃~C₆)arylsulfonat, dialkyl(C₈~C₁₂)sulfosuxinat, ligninsulfonat, naphtalensulfonat ngưng tụ, naphtalensulfonatformalin ngưng tụ, alkyl(C₈~C₁₂)naphtalensulfonatformalin ngưng tụ và polyoxyetylenalkyl(C₈~C₁₂)phenylsulfonat; muối natri hoặc muối canxi của hợp chất sulfat như là alkyl(C₈~C₁₂)sulfat, alkyl(C₈~C₁₂)arylsulfat, polyoxyetylenalkyl(C₈~C₁₂)sulfat và polyoxyetylenalkyl(C₈~C₁₂)phenylsulfat; muối natri hoặc muối canxi của hợp chất suxinat như là polyoxyalkylen suxinat; chất hoạt động bề mặt mang điện tích âm như là natri benzoat, alkylcacboxylat và dạng tương tự; chất hoạt động bề mặt không mang điện tích như là polyoxyetylenalkyl(C₁₂~C₁₈)ete, polyoxyetylenalkyl(C₈~C₁₂)phenylete, polyoxyetylenalkyl(C₈~C₁₂)phenylpolyme và etylenoxit propylenoxit copolyme; polycacboxylat; Triton 100; và Tween 80 có thể được sử dụng một mình hoặc trong hỗn hợp của hai hoặc nhiều hợp chất, và sẽ là dễ hiểu với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật rằng ngoài các chất hoạt động bề mặt đã nhắc tới, chất hoạt động bề mặt khác cũng có thể được sử dụng. Để làm chất phụ trợ, có thể sử dụng bentonit, hoạt thạch, đất sét, cao lanh, canxi cacbonat, cát thạch anh, đá bột, đất tảo cát, đất sét axit, zeolit, đá trân châu, cacbon trắng, amoni sulfat, ure, đường glucoza, dextrin, bột đậu, gạo, lúa mì, đất sét vàng, đường glucoza

và tinh bột, nước và dạng tương tự có thể được sử dụng một mình hoặc trong hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất, và sẽ là dễ hiểu với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật rằng ngoài chất phụ trợ đã nhắc tới, chất phụ trợ khác cũng có thể được sử dụng.

Sẽ là dễ hiểu với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật rằng nồng độ thể thực khuẩn hoặc hàm lượng của thể thực khuẩn sấy khô trong chế phẩm ức chế sự tăng sinh của *Vibrio parahaemolyticus* hoặc diệt nó, chế phẩm xử lý nước dần, thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng và phụ gia thức ăn cho cá và động vật có vỏ có thể được điều chỉnh tùy ý theo mục đích sử dụng. Ví dụ, trong trường hợp của chế phẩm xử lý nước dần, chế phẩm này có thể được điều chỉnh khác nhau theo các yếu tố như là lượng nước dần, số *Vibrio parahaemolyticus* trên một đơn vị thể tích và lượng PVP-1 trong chế phẩm tương ứng (hoặc thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng, hoặc phụ gia thức ăn cho cá và động vật có vỏ), và phương pháp tạo ra chế phẩm hoặc dùng chế phẩm.

Chế phẩm ức chế sự tăng sinh của *Vibrio parahaemolyticus* hoặc diệt nó, chế phẩm xử lý nước dần, thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng và phụ gia thức ăn cho cá và động vật có vỏ còn có thể chứa thể thực khuẩn hoạt tính khác khác PVP-1, và thể thực khuẩn hoạt tính tốt hơn có thể là thể thực khuẩn có hoạt tính diệt khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, nhưng không chỉ giới hạn trong số đó, và cũng bao gồm thể thực khuẩn có hoạt tính diệt khuẩn với vi khuẩn khác.

Hơn nữa, khi xử lý chế phẩm ức chế sự tăng sinh của *Vibrio parahaemolyticus* hoặc diệt nó, chế phẩm xử lý nước dần, thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng và phụ gia thức ăn cho cá và động vật có vỏ, phương pháp thông thường, mà được sử dụng để ức chế sự tăng sinh của *Vibrio parahaemolyticus* hoặc diệt nó trong quá khứ, có thể được sử dụng kết hợp.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế liên quan đến dược phẩm chứa thể thực khuẩn hoặc môi trường nuôi cấy của nó làm hoạt chất để phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, hoặc phương pháp để phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* bằng cách sử dụng dược phẩm này.

Như đã mô tả ở trên, thể thực khuẩn theo sáng chế có hoạt tính diệt đặc hiệu đối với *Vibrio parahaemolyticus* thể hiện tác dụng phòng hoặc điều trị các bệnh khác nhau gây ra bởi nhiễm khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*. Tốt hơn là, bệnh nhiễm khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* là viêm dạ dày ruột, nhiễm độc thực phẩm hoặc nhiễm trùng vết thương, nhưng không chỉ giới hạn trong số các bệnh đó. Hơn nữa, bệnh nhiễm khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* bao gồm triệu chứng thể hiện của bệnh, ví dụ như, nôn, đau dạ dày, sốt, rung mình hoặc tiêu chảy.

Thuật ngữ 'phòng hoặc điều trị' bao gồm ngăn ngừa, ức chế và giảm nhẹ bệnh nhiễm khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*.

Chế phẩm của sáng chế có thể đưa vào động vật dưới dạng dược phẩm, hoặc bằng cách cho ăn sau khi trộn chế phẩm này với thức ăn hoặc cho vào nước uống.

Chế phẩm của sáng chế có thể được đưa vào đối tượng qua các đường dùng thuốc khác nhau như là đường miệng hoặc đường ngoài ruột chỉ khi chế phẩm có thể tiếp cận mô đích đối tượng, và cụ thể, có thể được đưa vào đối tượng bằng các phương pháp thông thường như là đường miệng, đường ruột, đắp thuốc, qua tĩnh mạch, dưới ổ bụng, trong cơ, qua động mạch, qua chân bì, qua mũi, xông thuốc.

Phương pháp của sáng chế để phòng hoặc điều trị bao gồm việc dùng chế phẩm của sáng chế với liều hiệu quả về mặt dược phẩm. Rõ ràng đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này là liều phù hợp hàng ngày có thể được quyết định bởi bác sĩ phụ trách trong phạm vi đánh giá y tế thích hợp. Tốt hơn là, liều hiệu quả về mặt trị liệu cho đối tượng cụ thể có thể được xác định khác nhau theo các yếu tố khác nhau hoặc yếu tố giả định đã biết trong ngành y, ví dụ như, loại và mức độ của phản ứng đạt được, độ tuổi, trọng lượng thân, tình trạng sức khỏe chung, giới tính và chế độ ăn của đối tượng, thời gian dùng thuốc, đường dùng thuốc, tỷ lệ phân phối của chế phẩm, khoảng thời gian điều trị và dược phẩm được sử dụng cùng hoặc đồng thời với chế phẩm đặc hiệu.

[Thể thực khuẩn mới PAH1-C và PAH6-C và sử dụng chúng để ức chế sự tăng sinh của *Aeromonas hydrophila*]

Theo một phương án, sáng chế liên quan đến thể thực khuẩn có hoạt tính diệt

đặc hiệu với *Aeromonas hydrophila*, mà khác biệt ở chỗ thể thực khuẩn này có hình thái học thuộc họ *Myoviridae* và bộ *Caudovirales*, và là thể thực khuẩn có số nộp lưu: KCTC 12128BP hoặc thể thực khuẩn có số nộp lưu: KCTC 12129BP.

Các tác giả sáng chế đã phân lập và xác định được thể thực khuẩn có hoạt tính diệt *Aeromonas hydrophila*, và thể thực khuẩn được đặt tên là PAH1-C và PAH6-C, và được ký thác tại Viện giữ giống mẫu Hàn Quốc lần lượt dưới số nộp lưu KCTC 12128BP và số nộp lưu KCTC 12129BP vào ngày 3 tháng 2 năm 2012.

Các tác giả sáng chế thu thập mẫu chất cặn lắng từ suối Seoam, Haseong, và từ mẫu này thể thực khuẩn được phân lập (dưới đây, gọi là PAH1-C), sử dụng *Aeromonas hydrophila* JUNAH làm vật chủ và phân hủy nó; và phân lập thể thực khuẩn (dưới đây gọi là PAH6-C), phân hủy *Aeromonas hydrophila* JUNAH, từ mẫu thu thập từ trung tâm thay nước Nanji. Đã xác nhận được rằng PAH1-C và PAH6-C có hoạt tính diệt khuẩn bằng cách tạo mảng với *Aeromonas hydrophila*.

Hơn nữa, do việc quan sát hình thái học PAH1-C và PAH6-C qua kính hiển vi điện tử, đã phát hiện được nó thuộc họ *Myoviridae* và bộ *Caudovirales*.

Hơn nữa, do phân tích bộ gen của PAH1-C và PAH6-C đã xác nhận rằng mỗi thể thực khuẩn được cấu thành từ chuỗi xoắn kép ADN (dsADN) có kích thước bộ gen khoảng 50 kb, và đã phát hiện được rằng PAH1-C và PAH6-C1 là thể thực khuẩn mới, bởi vì toàn bộ bộ gen của PAH1-C và PAH6-C1 không có sự tương đồng rõ ràng với thể thực khuẩn khác, và do đó, kích thước bộ gen của PAH1-C và PAH6-C1 khác biệt đáng kể với thể thực khuẩn mà được biết là có tính gây nhiễm cho *Aeromonas hydrophila* cho đến nay.

Trong bản mô tả sáng chế, 'PAH1-C hoặc PAH6-C' bao gồm nuôi cấy thể thực khuẩn cũng như chính thể thực khuẩn.

Thể thực khuẩn PAH1-C hoặc thể thực khuẩn PAH6-C theo sáng chế có thể được nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy thể thực khuẩn thông thường theo số lượng lớn. Để làm môi trường nuôi cấy, môi trường nuôi cấy bao gồm nguồn cacbon, nguồn nito, vitamin và chất khoáng có thể được sử dụng. Ví dụ như, NB (canh dinh dưỡng), môi trường dịch thể TSB (canh đậu tương tripsin), hoặc môi trường đặc TSA (thạch

đậu tương tripsin) và dạng tương tự có thể được sử dụng. Việc nuôi cấy có thể được tiến hành trong điều kiện nuôi cấy thông thường. Để loại bỏ môi trường nuôi cấy trong dung dịch nuôi cấy và thu hoạch chỉ các tế bào được tập trung, quay ly tâm hoặc quá trình lọc có thể được sử dụng, và bước này có thể được tiến hành tùy theo nhu cầu của người có kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật. Các tế bào tập trung có thể được bảo quản bằng đông lạnh hoặc đông khô để không bị mất hoạt tính của nó.

PAH1-C và PAH6-C thể hiện độ nhạy với *Aeromonas hydrophila*.

Cụ thể hơn, PAH1-C thể hiện độ nhạy với *Aeromonas hydrophila* AH1, AH6, AH9, AH16, AK1 và AK9, và PAH6-C thể hiện độ nhạy với *Aeromonas hydrophila* AH7, AH16, AK1 và AK9.

Ngoài ra, tốt hơn là, *Aeromonas hydrophila* là chủng kháng thuốc kháng sinh hoặc chủng kháng đa thuốc.

Do đó, theo một phương án khác, sáng chế liên quan đến chế phẩm chứa PAH1-C hoặc PAH6-C làm hoạt chất để ức chế sự tăng sinh của *Aeromonas hydrophila* hoặc diệt nó, hoặc phương pháp ức chế sự tăng sinh của *Aeromonas hydrophila* hoặc diệt nó bằng cách xử lý tương tự.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế liên quan đến PAH1-C hoặc PAH6-C, hoặc thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng và phụ gia thức ăn cho cá chứa thể thực khuẩn làm hoạt chất. Tốt hơn là, nó liên quan đến thể thực khuẩn PAH1-C hoặc PAH6-C, hoặc thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng và phụ gia thức ăn cho cá chứa thể thực khuẩn làm hoạt chất để ức chế sự tăng sinh của *Aeromonas hydrophila* hoặc diệt nó.

Trong bản mô tả của sáng chế, 'thuốc kháng sinh' nghĩa là chất bảo quản, chất diệt khuẩn và chất kháng vi sinh vật.

Phụ gia thức ăn có thể được thêm vào thức ăn cho cá.

Hoặc, khi sản xuất thức ăn, PAH1-C hoặc PAH6-C có thể được trực tiếp thêm vào thức ăn, không trộn lẫn vào đó sau khi sản xuất riêng biệt dưới dạng phụ gia thức ăn.

Cá có thể bao gồm cá chép, cá rô phi, cá vược, cá tuyết, cá diếc, cá hồi, cá đuối, cá chạch, cá da trơn hoặc bông trắng, nhưng không giới hạn trong số các loại đó.

Chế phẩm ức chế sự tăng sinh của *Aeromonas hydrophila* hoặc diệt nó, thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng và phụ gia thức ăn theo sáng chế thể hiện tính đặc hiệu rất cao với *Aeromonas hydrophila*, so với các nguyên liệu hiện có. Do đó, chúng có hiệu quả xuất sắc chỉ diệt mầm bệnh cụ thể mà không gây tác dụng phụ như diệt vi khuẩn có lợi, và cả diệt mầm bệnh kháng đa thuốc; và chúng có vòng đời sản phẩm dài hơn so với sản phẩm hiện hành bởi vì không thúc đẩy dung nạp hoặc kháng lại mầm bệnh.

Chế phẩm ức chế sự tăng sinh của *Aeromonas hydrophila* hoặc diệt nó, thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng và phụ gia thức ăn có thể được sản xuất ở thể lỏng như là dung dịch, huyền phù, nhũ tương, mà có thể được sản xuất ở thể rắn dựa vào thể thực khuẩn sấy khô như dạng bột, dạng hạt nhỏ, dạng viên nén hoặc dạng viên nang.

Chế phẩm ức chế sự tăng sinh của *Aeromonas hydrophila* hoặc diệt nó, thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng và phụ gia thức ăn có thể còn chứa chất dẫn thuốc có thể chấp nhận được, và có thể được phối trộn với chất dẫn thuốc. Chất dẫn thuốc có thể chấp nhận được đề cập tới chất dẫn thuốc không kích thích sinh vật và không ức chế hoạt tính sinh học và đặc tính. Nó có thể được sản xuất ở dạng chất dễ phân tán trong nước, dạng bột dễ phân tán trong nước, dạng dung dịch dễ phân tán trong nước, chất lỏng, dung dịch gốc nước, dạng bột dễ hòa tan trong nước hoặc dạng viên nang bằng chất hoạt động bề mặt hoặc chất phụ trợ và loại tương tự cho mục đích ổn định chế phẩm phù hợp để đóng gói thực tế. Như một ví dụ về chất hoạt động bề mặt, chất hoạt động bề mặt được chọn từ nhóm bao gồm: muối natri hoặc muối canxi của hợp chất sulfonat như là alkyl(C₈~C₁₂)arylsulfonat, dialkyl(C₃~C₆)arylsulfonat, dialkyl(C₈~C₁₂)sulfosuxinat, ligninsulfonat, naphthalensulfonat ngưng tụ, naphthalensulfonatformalin ngưng tụ, alkyl(C₈~C₁₂)naphthalensulfonatformalin ngưng tụ và polyoxyetylenalkyl(C₈~C₁₂)phenylsulfonat; muối natri hoặc muối canxi của hợp chất sulfat như alkyl(C₈~C₁₂)sulfat, alkyl(C₈~C₁₂)arylsulfat, polyoxyetylenalkyl(C₈~C₁₂)sulfat và polyoxyetylenalkyl(C₈~C₁₂)phenylsulfat; muối natri hoặc muối canxi của hợp chất suxinat như polyoxyalkylen suxinat; chất hoạt động bề mặt mang điện tích âm như là natri benzoat, alkylcacboxylat và chất tương tự;

chất hoạt động bề mặt không mang điện tích như là polyoxyetylenalkyl($C_{12}\sim C_{18}$)ete, polyoxyetylenalkyl($C_8\sim C_{12}$)phenylete, polyoxyetylenalkyl($C_8\sim C_{12}$)phenylpolyme và etylenoxit propylenoxit copolyme; polycacboxylat; Triton 100; và Tween 80 có thể được sử dụng một mình hoặc trong hỗn hợp của hai hoặc nhiều hợp chất, và sẽ là dễ hiểu với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật rằng ngoài chất hoạt động bề mặt đã nhắc tới, chất hoạt động bề mặt khác cũng có thể được sử dụng. Chất phụ trợ có thể là bentonit, hoạt thạch, đất sét, cao lanh, canxi cacbonat, cát thạch anh, đá bột, đất tảo cát, đất sét axit, zeolit, đá trân châu, cacbon trắng, amoni sulfat, ure, đường glucoza, dextrin, bột đậu, gạo, lúa mì, đất sét vàng, đường glucoza và tinh bột, nước và loại tương tự có thể được sử dụng một mình hoặc trong hỗn hợp của hai hoặc nhiều chất, và sẽ là dễ hiểu với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật rằng ngoài chất phụ trợ đã nhắc tới, chất phụ trợ khác cũng có thể được sử dụng.

Sẽ là dễ hiểu với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật rằng nồng độ thể thực khuẩn hoặc hàm lượng thể thực khuẩn sấy khô trong chế phẩm ức chế sự tăng sinh của *Aeromonas hydrophila* hoặc diệt nó, thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng và phụ gia thức ăn có thể được điều chỉnh tùy ý theo mục đích sử dụng.

Chế phẩm ức chế sự tăng sinh của *Aeromonas hydrophila* hoặc diệt nó, thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng và phụ gia thức ăn có thể chứa PAH1-C hoặc PAH6-C, nghĩa là, chỉ một thể thực khuẩn, và còn có thể chứa cả hai thể thực khuẩn. Hơn nữa, chế phẩm này có thể chứa thể thực khuẩn hoạt hóa chứ không chỉ là thể thực khuẩn, và thể thực khuẩn hoạt hóa tốt hơn là có thể là thể thực khuẩn có hoạt tính diệt khuẩn đối với *Aeromonas hydrophila*, nhưng không chỉ giới hạn trong số đó, và còn có thể chứa thể thực khuẩn có hoạt tính diệt khuẩn với vi khuẩn khác.

Hơn nữa, khi xử lý chế phẩm ức chế sự tăng sinh của *Aeromonas hydrophila* hoặc diệt nó, thuốc kháng sinh, thuốc khử trùng và phụ gia thức ăn, phương pháp thông thường mà được sử dụng để ức chế sự tăng sinh của vi khuẩn bao gồm *Aeromonas hydrophila* hoặc diệt nó trong quá khứ, có thể được sử dụng kết hợp, và tốt hơn là, phương pháp thông thường được sử dụng để ức chế sự tăng sinh của *Aeromonas hydrophila* hoặc diệt nó trong quá khứ, có thể được sử dụng kết hợp.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế liên quan đến dược phẩm để phòng

hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn *Aeromonas hydrophila* chứa thể thực khuẩn hoặc môi trường nuôi cấy của nó làm hoạt chất, hoặc phương pháp để phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn *Aeromonas hydrophila* bằng cách sử dụng dược phẩm này.

Như đã mô tả ở trên, thể thực khuẩn theo sáng chế có hoạt tính diệt đặc hiệu với *Aeromonas hydrophila* thể hiện tác dụng phòng hoặc điều trị nhiều bệnh do lây nhiễm *Aeromonas hydrophila* gây ra.

Tốt hơn là, bệnh nhiễm khuẩn *Aeromonas hydrophila* là nhiễm trùng máu, bệnh do khuẩn *Aeromonas* hoặc loét, nhưng không giới hạn ở các bệnh đó. Hơn nữa, bệnh nhiễm khuẩn *Aeromonas hydrophila* bao gồm triệu chứng thể hiện của bệnh, ví dụ như, tiêu chảy hoặc chảy máu, nhưng không chỉ giới hạn ở các triệu chứng đó.

Trong bản mô tả của sáng chế, thuật ngữ 'phòng hoặc điều trị' nghĩa là ngăn ngừa, ức chế hoặc giảm nhẹ bệnh nhiễm khuẩn *Aeromonas hydrophila*.

Chế phẩm của sáng chế có thể được cho động vật dùng dưới dạng dược phẩm, hoặc bằng cách cho ăn sau khi trộn với thức ăn hoặc cho vào nước uống.

Chế phẩm của sáng chế có thể được đưa cho đối tượng dùng qua nhiều đường dùng như là đường miệng hoặc ngoài đường ngoài đường tiêu hóa chỉ khi chế phẩm này có thể tiếp cận mô đối tượng, và cụ thể, có thể được đưa vào đối tượng qua phương pháp thông thường như là đường miệng, đường ruột, đắp thuốc, qua tĩnh mạch, dưới ổ bụng, trong cơ, qua động mạch, qua chân bì, qua mũi, xông thuốc.

Phương pháp của sáng chế để phòng hoặc điều trị bao gồm việc dùng chế phẩm của sáng chế với liều dược phẩm hiệu quả. Rõ ràng với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật rằng liều phù hợp thường ngày có thể được quyết định bởi bác sĩ phụ trách trong phạm vi đánh giá y tế thích hợp. Tốt hơn là liều hiệu quả về mặt trị liệu cho đối tượng cụ thể có thể được xác định theo các yếu tố khác nhau hoặc yếu tố giả định phổ biến trong ngành y tế, ví dụ như, loại và mức độ phản ứng cần đạt tới, độ tuổi, trọng lượng thân, điều kiện sức khỏe chung, giới tính và chế độ ăn của đối tượng, thời gian dùng thuốc, đường dùng thuốc, tỷ lệ phân phối của chế phẩm, khoảng thời gian điều trị và dược phẩm sử dụng cùng hoặc đồng thời với chế phẩm đặc hiệu.

Hiệu quả có lợi

Thể thực khuẩn PVP-1 mới được phân lập theo sáng chế có tác dụng ức chế sự tăng sinh của *Vibrio parahaemolyticus* hoặc diệt nó, và cụ thể, còn có hoạt tính ức chế sự tăng sinh của *Vibrio parahaemolyticus* kháng đa thuốc (hoặc kháng thuốc kháng sinh) hoặc diệt nó. Do đó, nó rất hiệu quả để phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* như viêm dạ dày ruột, nhiễm độc thực phẩm hoặc nhiễm trùng vết thương, và có thể được sử dụng làm thức ăn chăn nuôi, thuốc kháng sinh hoặc khử trùng cũng như chế phẩm xử lý nước dần.

Hơn nữa, thể thực khuẩn mới được phân lập PAH1-C hoặc PAH6-C theo sáng chế có tác dụng ức chế sự tăng sinh của *Aeromonas hydrophila* hoặc diệt nó, và cụ thể, còn có hoạt tính ức chế sự tăng sinh của *Aeromonas hydrophila* kháng thuốc kháng sinh hoặc diệt nó. Do đó, nó rất hiệu quả để phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn *Aeromonas hydrophila* như là nhiễm trùng máu, bệnh do khuẩn *Aeromonas* hoặc loét, và có thể được sử dụng làm thuốc kháng sinh hoặc khử trùng cũng như thức ăn chăn nuôi.

Do vậy, việc sử dụng các thể thực khuẩn mới được phân lập được trông đợi là đóng góp vào tính cạnh tranh trong ngành công nghiệp nuôi trồng thủy sản và sự phát triển của y tế quốc gia.

Ví dụ thực hiện sáng chế

[Ví dụ về thể thực khuẩn PVP-1 mới và sử dụng nó để ức chế sự tăng sinh của *Vibrio parahaemolyticus*]

<Nguyên liệu và phương pháp>

Lấy mẫu vi khuẩn của đối tượng và thể thực khuẩn

Ít nhất 100 ml mẫu chất cặn lắng được thu thập từ nước biển của trại nuôi hàu tại biển miền nam Hàn Quốc và được sử dụng cho việc phân lập thể thực khuẩn.

Phân lập thể thực khuẩn và xác định khu vực vật chủ

Phương pháp thạch hai lớp thông thường được mô tả (AdamsM (1959))

Bacteriophages, Interscience Publisher, NewYork) được sử dụng để phân lập thể thực khuẩn và xác định số lượng đơn vị tạo mảng của nó (các PFU). *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 33844 được sử dụng làm chủng vi khuẩn vật chủ để phân lập thể thực khuẩn. Các hình dạng mảng bám được quan sát thấy sau khoảng thời gian từ 18 đến 24 tiếng ủ. Nguyên liệu đã phân lập được ủ trong 36 tiếng ở 20°C, quay ly tâm trong 20 phút ở tốc độ 100.000m/s², và được lọc qua màng lọc cỡ 0,45µm. 10 ml của 10×TSB được thêm vào 90 ml của nguyên liệu đã lọc, và 10⁶~10⁷ vi khuẩn vật chủ CFU được cấy truyền tại đó sau đó ủ trong ít nhất 12 tiếng. Phần dịch nổi được thu thập sau khi quay ly tâm ở tốc độ 5.000 vòng/phút trong 20 phút, và 10⁸ vi khuẩn vật chủ được phủ trên bề mặt môi trường thạch TSA và, sau khi nhỏ 5~10 µl phần dịch nổi, ủ ở 25°C trong 18 tiếng. Sau khi pha loãng vi khuẩn dung giải 10 lần, hiệu giá được đo và hình dạng mảng bám được quan sát. Chủng thể thực khuẩn tinh khiết thu được bằng ba lượt phân lập mảng riêng lẻ và được ký hiệu là PVP-1. Dịch phân tách của thể thực khuẩn đã lọc được cho kết tủa với 10% (khối lượng/thể tích) polyetylen glycol 8000 trong 1 M NaCl ở 4°C trong 12 tiếng và thu thập bằng cách quay ly tâm ở tốc độ 100.000 m/s² trong 10 phút ở 4°C. Thể thực khuẩn đã tinh lọc được điều chế bằng siêu ly tâm gradient bậc CsCl (gradient bậc: 1,15, 1,45, 1,50 và 1,70g/ml; 2.500.000 m/s²; 22 tiếng; 4°C), thẩm tách trong dung dịch đệm SM (10 mM NaCl, 50 mM Tris [pH7,5] và 10 mM MgSO₄) và được bảo quản ở 4°C cho tới khi sử dụng.

Khu vực vật chủ của PVP-1 được xác định bằng cách nhỏ 10 µl huyền phù thể thực khuẩn được pha loãng (3,3×10⁷ PFU/ml) lên đĩa nuôi cấy thạch hai lớp được cấy *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio vulnificus*. Sau đó, vi khuẩn được ủ ở 37°C trong 20 tiếng, và được kiểm tra sự có mặt hoặc không có mặt hình thành mảng bám.

Phân tích bộ gen của thể thực khuẩn được phân lập

Bộ gen ADN thể thực khuẩn được tinh lọc (gADN) được điều chế như đã mô tả trong “Son JS et al., (2010) Complete genome sequence of a newly isolated lytic bacteriophage, EFAP-1 of *Enterococcus faecalis*, and antibacterial activity of its endoly sin EFAL-1. J Appl Microbiol 108:1769-1779”, và sự có mặt hoặc không có mặt của khả năng phản ứng của bộ gen của thể thực khuẩn kháng DNaza I (20 U/µl), RNaza (5 U/µl) và nucleaza của cây đậu xanh (20 U/µl) (Takara) được kiểm tra theo

hướng dẫn của nhà sản xuất để phân tích bộ gen của thể thực khuẩn trước. Trước tiên, với ít nhất 10^9 PFU/ml nguồn thể thực khuẩn, vỏ protein được loại bỏ với Proteinaza K, phần dịch nổi đã qua xử lý với PCI (phenol-cloform-rượu isoamyllic) được xử lý bằng isopropanol rồi sau đó rửa với etanol 70%, và sau đó bộ gen cuối cùng được tập trung ở dung dịch đệm TE. Bộ gen của thể thực khuẩn tập trung này được điện di khuếch tán trên thạch agarosa 0,7% (1X dung dịch đệm TAE) và sử dụng làm đối chứng, và mỗi nhóm thể thực khuẩn được xử lý bằng enzym DNaza I và RNaza A, nucleaza của cây đậu xanh và sau đó là đánh giá kết quả qua sự có mặt hoặc không có mặt của vạch dương tính.

Ngoài ra, để quan sát chính xác kích thước bộ gen và mẫu thức phân tách enzym giới hạn của thể thực khuẩn gADN, điện di gel trường xung điện được tiến hành như đã được mô tả trước đó trong “Uchiyama J et al., (2008) Iso-lation and characterization of a novel *Enterococcus faecalis* bacteriophage EF24C as a therapeutic candidate. FEMS Microbiol Lett 278:200-206”, với một số biến đổi. Ngắn gọn là, 500 μ l huyền phù thể thực khuẩn được trộn với 2% (khối lượng/thể tích) agarosa NuSieve GTG (FMC BioProducts), đổ vào khuôn nút và hóa rắn. Các nút được đẩy khỏi khuôn vào lượng nhỏ dung dịch đệm phân hủy (500 mM EDTA, 10 mM Tris [pH 8,0], 1% SDS [khối lượng/thể tích] và 1 mg/ml proteinaza K) và được ủ ở 50°C qua đêm. Dung dịch đệm phân hủy được gạn lọc, và mẫu được rửa ba lần bằng dung dịch đệm TE và sau đó phân hủy lần lượt với 10 U SacII, Sau3AI, MspI, XbaI, NotI, HindIII, SmaI, SphI, NcoI, HpaII, SpeI và EcoRI (New England Biolabs) trong 1 tiếng ở 37°C. Các nút được rửa ba lần bằng dung dịch đệm TE, đặt vào giếng nuôi cấy agarosa được chứng nhận bằng trường xung 1,2% (Bio-Rad) trong 0,5× TBE và phủ bằng agarosa NuSieve GTG 0.5% đã nấu chảy. Mẫu được điện di bằng hệ CHEF-DR III (Bio-Rad) ở 6 V/cm với xung lượng từ 5 đến 15 giây trong 16 tiếng ở 14°C trong 0,5× dung dịch đệm TBE.

Soi kính hiển vi điện tử thể thực khuẩn được phân lập

Để phân loại hình thái học của thể thực khuẩn được phân lập, việc quan sát được tiến hành bằng cách sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Nguồn thể thực khuẩn được đặt lên lưới đồng rồi sau đó nhuộm âm tính với uranyl axetat 1% và

làm khô. Chụp ảnh bằng kính hiển vi điện tử được tiến hành ở NICEM, trường cao đẳng nông nghiệp và khoa học đời sống thuộc khuôn viên gwanak của trường Đại học quốc gia Seoul. Hình thái thể thực khuẩn được quan sát bằng Zeiss TEM EM902 (Zeiss) ở điện áp 80 kV. Kích cỡ thể thực khuẩn được tính toán ít nhất bằng mười lần đo.

Phân tích bộ gen của thể thực khuẩn được phân lập

Bộ gen ADN được tách chiết theo phương pháp đã biết trong tài liệu: “Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.”, và được giải trình tự bằng cách sử dụng chất phản ứng tạo trình tự tiêu chuẩn và hệ thống giải trình tự gen Titanium 454 GSFLX (Roche) (khoảng 50×độ che phủ). Toàn bộ trình tự bộ gen thu được bằng trình tự lắp ráp từ phần mềm phân tích trình tự SeqMan II (ADNStar). Các ORF giả định (khung đọc mở) được ước tính bằng cách sử dụng Glimmer 3.02 và GeneMark.hmm, và các chức năng ORF giả định được phân tích bằng cách sử dụng BLASTP và InterProScan. Gen tARN giả định được tìm ra bằng phần mềm tARNscan-SE (v. 1.21).

Thử nghiệm độ nhạy của thể thực khuẩn đối với vi khuẩn vật chủ ở môi trường nuôi cấy canh trường

Trong số nhiều thể thực khuẩn trong nhóm tiềm năng, thể thực khuẩn có khả năng tồn tại dưới nước tốt được chọn và được sử dụng để đánh giá hoạt tính diệt khuẩn của PVP-1 với *Vibrio parahaemolyticus*. PVP-1 ($1,1 \times 10^9$ PFU/ml) và chủng *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 33844 ($9,0 \times 10^6$ CFU/ml) được sử dụng, và thể thực khuẩn tinh lọc và *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 33844 được chia ra thành 3 nhóm MOI (tính đa nhiễm, tỷ lệ định lượng của vi khuẩn và thể thực khuẩn): 0,01, 1 và 100 trong 10 ml TSB mới cho thử nghiệm. Tiêu bản chế phẩm được ủ và lắc ở tốc độ 250 vòng/phút ở 20°C. Vi khuẩn được cấy truyền vào TSB mà không có thể thực khuẩn (đối chứng) được sử dụng làm đối chứng. Độ hấp phụ (OD_{600}) được xác định ở thời điểm 24 tiếng sau khi cấy.

<Kết quả>

Phân lập thể thực khuẩn và khu vực vật chủ

Một loại thể thực khuẩn được phân lập sau tổng cộng 11 lần phân lập. Thể thực khuẩn được phân lập hoàn toàn qua ba lần nhân bản. Thể thực khuẩn được ký hiệu là PVP-1 được phân lập từ nước biển của trại nuôi hàu ở vùng biển phía nam và hình thành mảng bám trên *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 33844.

Độ nhạy và khu vực vật chủ kháng 30 chủng *Vibrio parahaemolyticus* được phân lập và một loại *Vibrio vulnificus* tương ứng được kiểm tra, và cuối cùng được xác định. Tất cả 30 chủng *Vibrio parahaemolyticus* được phân lập đều là chủng kháng đa thuốc. Trong số 30 chủng *Vibrio parahaemolyticus*, 27 chủng *Vibrio parahaemolyticus* tạo thành các mảng. Bởi vậy, đánh giá được rằng PVP-1 thể hiện độ nhạy với *Vibrio parahaemolyticus*. Tuy nhiên, PVP-1 không thể hiện độ nhạy với một loại của *Vibrio vulnificus* được sử dụng trong nghiên cứu này (Bảng 1).

Bảng 1

Tên chủng	Mã số	Môi trường phân lập	Độ nhạy PVP-1
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC27969	ATCC	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC33844	ATCC	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	ATCC17802	ATCC	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP01	Vỏ sò (<i>Cyclina sinensis</i>)	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP02	Nghêu (<i>Venerupis philippinarum</i>)	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP03	Trai biển (<i>Mytilus coruscus</i>)	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP04	Trai biển (<i>Mytilus coruscus</i>)	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP05	Nghêu (<i>Venerupis philippinarum</i>)	++

<i>V. parahaemolyticus</i>	VP06	Vỏ sò (<i>Cyclina sinensis</i>)	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP07	Nước biển	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP08	Nước biển	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP09	Nước biển	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP10	Hàu thái bình dương (<i>Crassostrea gigas</i>)	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP11	Hàu thái bình dương (<i>Crassostrea gigas</i>)	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP12	Hàu thái bình dương (<i>Crassostrea gigas</i>)	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP13	Hàu thái bình dương (<i>Crassostrea gigas</i>)	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP14	Bào ngư (<i>Haliotis discus hannah</i>)	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP15	Nước biển	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP16	Nước biển	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP17	Nước biển	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP18	Hàu thái bình dương (<i>Crassostrea gigas</i>)	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP19	Nước thải	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP20	Nước thải	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP21	Nước thải	+

<i>V. parahaemolyticus</i>	VP22	Nước biển	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP23	Nước biển	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP24	Nước biển	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP25	Nước biển	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP26	Nước biển	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	VP27	Nước thải	+
<i>V. vulnificus</i>	ATCC33148	ATCC	-

*Kết quả thử nghiệm này là kết quả độ nhạy của thể thực khuẩn PVP-1 đối với mỗi trong số các chủng *V. parahaemolyticus* và *V. vulnificus* sau khi nhân bản.

*Độ nhạy được phân loại thành +, ++ tùy theo mức độ và – thể hiện là chủng không có độ nhạy.

Thể thực khuẩn được phân lập được bảo quản ở nơi tối ở nhiệt độ 4°C.

Phân loại và đặc điểm của PVP-1

1) Phân loại thể thực khuẩn theo đặc điểm bộ gen

Nhìn chung, thể thực khuẩn *Siphoviridae* được biết là có bộ gen ADN ở dạng sợi kép (ds). Tương tự, gADN của PVP-1 đã bị thủy phân hoàn toàn bởi enzym DNase I mà không phải bởi RNase A hoặc nucleaza của cây đậu xanh; do vậy, nó được cho là dsADN. Ngoài ra, gADN được tiêu hóa bởi SphI, NcoI và EcoRI, và kích thước của nó được ước tính là khoảng 100 kb (FIG. 1).

2) Phân loại hình thái học của thể thực khuẩn được phân lập

Thể thực khuẩn được phân loại về mặt hình thái học vào họ *Siphoviridae* và bộ *Caudovirales* (FIG. 2), theo chuẩn phân loại Ackermann. Độ dài và độ rộng của đuôi lần lượt là 129 ± 7 nm (trung bình $\pm$ SD) ($n = 10$) và 14 ± 2 nm ($n = 10$), và đường kính đầu là 63 ± 6 nm ($n = 10$).

Kết quả phân tích bộ gen của PVP-1

Bộ gen ADN sợi kép và không dư thừa của PVP-1 có độ dài 111.506 bp với hàm lượng G+C bằng 39,71%. Tổng 157 ORF chứa hơn 40 gốc axit amin và 19 tARN (bao gồm 1 gen giả) đã được xác định, cho thấy PVP-1 là thể thực khuẩn đầu tiên trong họ *Siphoviridae* có khả năng lây nhiễm *Vibrio parahaemolyticus*. 45 ORF cho thấy không có sự tương đồng với các protein trong cơ sở dữ liệu GenBank, trong khi 69 và 40 ORF khác mã hóa các protein có một số điểm tương đồng với các protein liên quan đến thể thực khuẩn và vi khuẩn đã biết. Trong 40 gen liên quan đến vi khuẩn trong thể thực khuẩn PVP-1, 5 ORF (orf34, orf38, orf79, orf85, và orf97) rất tương đồng với các protein liên quan đến *Vibrio* và 35 ORF cùng chung một số điểm tương đồng với các vi khuẩn không liên quan đến hệ sinh vật này. Phân tích thông tin sinh học được tiến hành để chỉ định chức năng giả định cho 69 ORF liên quan đến thể thực khuẩn, và các ORF này được nhóm lại theo ít nhất ba vai trò chức năng, như là, chuyển hóa ADN (orf2, orf3, orf4, orf6, orf7, orf12, orf14, orf15, orf16, orf17, orf18, orf21, orf28, orf32, orf42, và orf52), tạo hình virus (orf139, orf141, orf143, orf144, orf148, orf149, orf153, orf155, orf156, và orf157), và gen tạo hình (orf73, orf82, và orf83). Thú vị là, hầu hết các ORF chứa các gen chuyển hóa ADN và gen tạo hình virus được nhóm lại ở mỗi đầu của bộ gen được giải trình tự theo các vai trò chức năng và có độ tương đồng ($\leq 79\%$) với thể thực khuẩn T5 hoặc thể thực khuẩn giống T5, do vậy nó chỉ ra mối quan hệ gần gũi về gen giữa pVp-1 và các thể thực khuẩn đó. Do vậy, nó chỉ ra mối quan hệ gần gũi về mặt gen giữa PVP-1 và các thể thực khuẩn đó. Ngược lại, không có sự tương đồng về trình tự với thể thực khuẩn *Vibrio* trong môi trường biển thuộc họ *Siphoviridae* (phiHSIC và SIO-2), và tỷ lệ lớn các gen trong PVP-1 không giống với các gen của thể thực khuẩn hoặc vi khuẩn được giải trình tự khác, do vậy có thể coi PVP-1 là loài mới.

Trình tự bộ gen của thể thực khuẩn *Vibrio* PVP-1 được ký thác tại cơ sở dữ liệu GenBank với số nộp lưu JQ340389.

Đánh giá tác dụng của PVP-1 kháng *Vibrio parahaemolyticus*: Thử nghiệm phân giải tế bào vật chủ

Hoạt tính diệt khuẩn của PVP-1 được kiểm tra trong môi trường *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 33844 (FIG. 3). Khi nuôi cấy *Vibrio parahaemolyticus*

không bị nhiễm PVP-1 (đối chứng), trị số OD₆₀₀ tiếp tục tăng lên trong các lần ủ. Ngược lại, khả năng tồn tại của *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 33844 dường như bị chậm lại ở mức MOI 0,01, 1 và 100 cho tới khi 24 tiếng sau khi nhiễm PVP-1 thể thực khuẩn.

[Vi dụ về thể thực khuẩn mới PAH1-C hoặc PAH6-C và công dụng của chúng để ức chế sự tăng sinh của Aeromonas hydrophila]

<Nguyên liệu và Phương pháp>

Lấy mẫu vi khuẩn và thể thực khuẩn ở đối tượng

Việc lấy mẫu được tiến hành ở trạm xử lý nước thải, sông, suối quanh trại nuôi cá và nơi tương tự. Sau khi đánh dấu địa điểm và thời gian lấy mẫu, ít nhất 500 ml mẫu được thu thập, và mỗi 100 ml trong số đó được sử dụng để phân lập thể thực khuẩn. Cụ thể, thể thực khuẩn được phân lập từ suối Seoam, Haseong và trạm thay nước Nanji. Hơn nữa, vi khuẩn được phân lập từ trang trại nuôi trồng thủy sản hoặc các dòng suối ở cùng thời điểm. Các vi khuẩn phân lập được xác định bằng cách sử dụng PCR và Vitek II.

Phân lập thể thực khuẩn và xác định khu vực vật chủ

Phương pháp thạch hai lớp thông thường được mô tả (AdamsM (1959) Bacteriophages. Interscience Publishers, NewYork) được sử dụng để phân lập thể thực khuẩn và đếm số lượng đơn vị tạo mảng bám của nó (PFU). *Aeromonas hydrophila* JUNAH được sử dụng làm vi khuẩn vật chủ để phân lập thể thực khuẩn. Hình dạng mảng bám được quan sát thấy sau khoảng thời gian từ 18 đến 24 tiếng ủ. Nguyên liệu được phân lập được ủ trong 36 tiếng ở 20°C, quay ly tâm trong 20 phút ở tốc độ 100.000 m/s², và được lọc qua màng lọc cỡ 0,45µm. 10 ml 10×TSB được thêm vào 90 ml nguyên liệu lọc, và vi khuẩn vật chủ 10⁶~10⁷ CFU được cấy vào đó, sau đó tiếp tục được ủ ít nhất 12 tiếng. Phần dịch nổi được thu thập sau khi quay ly tâm ở tốc độ 5.000 vòng/phút trong 20 phút, vi khuẩn vật chủ 10⁸ được phủ trên bề mặt của môi trường thạch TSA và sau khi đã nhỏ 5~10 ul phần dịch nổi, ủ ở 25°C trong 18 tiếng. Sau khi pha loãng vi khuẩn đã phân giải 10 lần, hiệu giá được đo và hình dạng mảng bám được quan sát. Chủng thể thực khuẩn tinh khiết thu được bằng ba lần phân lập

màng bám đơn nối tiếp và được ký hiệu là PAH1-C và PAH6-C. Sản phẩm phân giải thể thực khuẩn đã được lọc được cho kết tủa với 10% (khối lượng/thể tích) polyetylen glycol 8000 trong 1M NaCl ở 4°C trong 12 tiếng và được thu gom bằng cách quay ly tâm ở tốc độ 100.000 m/s² trong 10 phút ở 4°C. Thể thực khuẩn đã tinh lọc được điều chế bằng cách siêu ly tâm gradien theo bậc CsCl (gradien bậc: 1,15, 1,45, 1,50 và 1,70g/ml; 2.500.000 m/s²; 22 tiếng; 4°C), thẩm tách trong dung dịch đệm SM (10 mM NaCl, 50 mM Tris [pH7,5] và 10 mM MgSO₄) và được bảo quản ở 4°C cho tới khi sử dụng.

Khu vực vật chủ PAH1-C và PAH6-C được xác định bằng nhỏ giọt 10 µl huyền phù thể thực khuẩn đã pha loãng ($3,3 \times 10^7$ PFU/ml) vào đĩa nuôi cấy thạch hai lớp được cấy *Aeromonas hydrophila* và *Aeromonas Sorbia*. Sau đó, vi khuẩn được ủ ở 37°C trong 20 tiếng, và kiểm tra sự có mặt hoặc không có mặt hình thành mảng bám.

Phân tích bộ gen của thể thực khuẩn được phân lập

ADN bộ gen của thể thực khuẩn được tinh lọc (gADN) được chuẩn bị như được mô tả trong tài liệu “Son JS et al., (2010) Complete genome sequence of a newly isolated lytic bacteriophage, EFAP-1 of *Enterococcus faecalis*, and antibacterial activity of its endolysin EFAL-1. J Appl Microbiol 108:1769-1779”, và có hoặc không có khả năng phản ứng của bộ gen của thể thực khuẩn kháng DNaza I (20 U/µl), RNaza (5 U/µl) và nucleaza của cây đậu xanh (20 U/µl) (Takara) được kiểm tra theo hướng dẫn của nhà sản xuất để phân tích trước bộ gen của thể thực khuẩn. Trước hết, đối với ít nhất 10^9 PFU/ml nguồn thể thực khuẩn, vỏ protein được loại bỏ bằng proteinaza K, phần dịch nổi được điều trị bằng PCI (phenol-cloform-rượu isoamyllic) được điều trị bằng isopropanol, sau đó rửa bằng 70% etanol, và sau đó bộ gen cuối cùng được tập trung ở đệm TE. Bộ gen của thể thực khuẩn tập trung được điện phân trong gel agarosa 0,7% (1X đệm TAE) và được sử dụng làm đối chứng, và mỗi nhóm thể thực khuẩn được điều trị bằng DNaza I và RNaza A, nucleaza của cây đậu xanh, sau đó đánh giá kết quả thông qua sự có mặt hiện hoặc không có mặt của dải dương tính.

Ngoài ra, để quan sát chính xác kích thước bộ gen và mô hình phân cắt enzym giới hạn của thể thực khuẩn gADN, điện di gel trường xung điện được tiến hành như được mô tả trong tài liệu “Uchiyama J et al., (2008) Iso-lation and characterization of a

novel *Enterococcus faecalis* bacteriophage EF24C as a therapeutic candidate. FEMS Microbiol Lett 278:200-206”, với một số biến đổi. Một cách ngắn gọn, 500 μ l huyền phù thể thực khuẩn được trộn với 2% (khối lượng/thể tích) agarosa NuSieve GTG (FMC BioProducts), đổ vào khuôn nút và hóa rắn. Các nút được đẩy khỏi khuôn vào lượng nhỏ dung dịch đệm phân hủy (500 mM EDTA, 10 mM Tris [pH 8,0], 1% SDS [khối lượng/thể tích] và 1 mg/ml proteinaza K) và ủ ở 50°C qua đêm. Dung dịch đệm phân hủy được gạn lọc, và mẫu được rửa ba lần sử dụng chất đệm TE và sau đó được phân hủy với lần lượt 10 U SacII, Sau3AI, MspI, XbaI, NotI, HindIII, SmaI, SphI, NcoI, HpaII, SpeI và EcoRI (New England Biolabs) trong 1 tiếng ở 37°C. Các nút được rửa ba lần bằng cách sử dụng dung dịch đệm TE, đặt vào giếng nuôi cấy agarosa được xác định bằng trường xung 1,2% (Bio-Rad) trong 0,5 $\times$ TBE và phủ với agarosa NuSieve GTG 0,5% đã nấu chảy. Mẫu được điện di bằng hệ CHEF-DR III (Bio-Rad) ở 6 V/cm với xung lượng từ 5 đến 15 giây trong 16 tiếng ở 14°C trong 0,5 $\times$ dung dịch đệm TBE.

Soi bằng kính hiển vi điện tử thể thực khuẩn được phân lập

Để phân loại hình thái học của thể thực khuẩn được phân lập, việc quan sát được tiến hành bằng cách sử dụng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Nguyên liệu thể thực khuẩn được đưa lên lưới đồng, sau đó nhuộm màu âm tính với uranyl axetat 1% và làm khô. Tiến hành chụp ảnh bằng kính hiển vi điện tử ở NICEM, trường cao đẳng nông nghiệp và khoa học đời sống thuộc khuôn viên gwana của trường Đại học quốc gia Seoul. Hình thái thể thực khuẩn được quan sát bằng cách sử dụng Zeiss TEM EM902 (Zeiss) ở điện áp 80 kV. Kích cỡ thể thực khuẩn được tính toán ít nhất bằng mười lần đo.

Thử nghiệm độ nhạy thể thực khuẩn đối với vi khuẩn vật chủ ở môi trường nuôi cấy canh trường

Các hoạt động tiêu khuẩn của PAH1-C và PAH6-C đối với *Aeromonas hydrophila* được đánh giá. Việc đánh giá được tiến hành bằng cách sử dụng PAH1-C ($1,1 \times 10^{10}$ PFU/ml) và PAH6-C ($1,1 \times 10^{10}$ PFU/ml), và chủng *Aeromonas hydrophila* AH16 ($8,8 \times 10^6$ CFU/ml), thể thực khuẩn đã tinh lọc và *Aeromonas hydrophila* AH16 được chia ra thành 3 nhóm MOI (tính đa nhiễm, tỷ lệ định lượng của vi khuẩn và thể thực khuẩn): 0,01, 1 và 100 trong 10 ml TSB mới để thử nghiệm. Chế phẩm được ủ và

lắc ở tốc độ 250 vòng/phút ở 20°C. Vi khuẩn được cấy vào TSB mà không có thể thực khuẩn (đối chứng) được sử dụng làm đối chứng. Độ hấp phụ (OD₆₀₀) được xác định ở thời điểm 24 tiếng sau khi cấy.

Đánh giá ảnh hưởng của thể thực khuẩn đối với cá thử nghiệm bị nhiễm khuẩn nhân tạo *Aeromonas hydrophila*

Một con chạch (*Cobitis biwae*, độ dài thân trung bình: 14,56 cm, trọng lượng thân trung bình: 14,98 g), được biết là có độ nhạy cao nhất với *Aeromonas hydrophila*, được sử dụng. Vì *Aeromonas hydrophila* được chọn để nhiễm khuẩn nhân tạo, chủng *Aeromonas hydrophila* AH16 gây chết hàng loạt ở cá chạch đã được sử dụng, và làm thể thực khuẩn, PAH1-C và PAH6-C đã được sử dụng. Việc lây nhiễm được tiến hành bằng cách tiêm trong cơ (IM), và cả thể thực khuẩn để xử lý cũng được tiêm theo phương pháp tương tự. Có tổng cộng 4 nhóm thử nghiệm: một nhóm không được điều trị sau khi nhiễm vi khuẩn (20 con), một nhóm được điều trị bằng thể thực khuẩn PAH1-C sau khi nhiễm vi khuẩn (20 con), một nhóm được điều trị bằng thể thực khuẩn PAH6-C sau khi nhiễm vi khuẩn (20 con) và một nhóm được điều trị cùng lúc với thể thực khuẩn PAH1-C và thể thực khuẩn PAH6-C sau khi nhiễm vi khuẩn (20 con). Hơn nữa, mỗi thử nghiệm được lặp lại ba lần để thu được kết quả chính xác hơn. Chủng AH16 được sử dụng để điều trị nhiễm vi khuẩn được nhiễm khuẩn nhân tạo sau khi pha loãng ở nồng độ $3,3 \times 10^7$ CFU/con cá với PBS, PAH1-C và PAH6-C, được sử dụng, được cấy ở nồng độ lần lượt là $1,1 \times 10^9$ CFU/con cá và $1,0 \times 10^9$ PFU/con cá. Dự đoán mỗi nhóm thử nghiệm được quan sát trong bể nước có nhiệt độ 25°C trong 7 ngày.

<Kết quả>

Phân lập thể thực khuẩn và khu vực vật chủ

Hai loại thể thực khuẩn đã được phân lập sau tổng cộng 11 lần phân lập. Thể thực khuẩn được phân lập hoàn toàn thông qua ba lần nhân bản. Thể thực khuẩn được ký hiệu là PAH1-C đã được phân lập từ suối Seoam, Haseong và hình thành mảng bám trên *Aeromonas hydrophila* JUNAH. Ngoài ra, thể thực khuẩn được ký hiệu là PAH6-C đã được phân lập từ trung tâm thay nước Nanji và hình thành mảng bám trên

Aeromonas hydrophila JUNA. H.

Độ nhạy và khu vực vật chủ đối từng loại trong hai loại thể thực khuẩn bằng cách phân lập tổng cộng 8 chủng *Aeromonas hydrophila* và 10 chủng *Aeromonas Sorbia* làm đối tượng đã được kiểm tra lần lượt và cuối cùng đã được xác định. PAH1-C đã hình thành các mảng bám trên 6 chủng *Aeromonas hydrophila* trong số 7 chủng *Aeromonas hydrophila* và 1 chủng *Aeromonas Sorbia* trong số 10 chủng *Aeromonas Sorbia*. Ngoài ra, PAH6-C đã hình thành các mảng bám 4 chủng *Aeromonas hydrophila* trong số 7 chủng *Aeromonas hydrophila* và 1 chủng *Aeromonas Sorbia* trong số 10 chủng *Aeromonas Sorbia*.

Do đó, đã xác định được rằng cả PAH1-C và PAH6-C đều thể hiện độ nhạy đối với *Aeromonas hydrophila* (Bảng 2). Tất cả *Aeromonas hydrophila* trong Bảng 2 dưới đây đều là chủng kháng thuốc kháng sinh, và cụ thể, *Aeromonas hydrophila* JUNA. H. của *Aeromonas hydrophila* được dùng làm vi khuẩn vật chủ là một chủng kháng đa thuốc.

Bảng 2

Tên chủng	STT	Địa điểm phân lập	Độ nhạy	
			PAH1-C	PAH6-C
<i>A. hydrophila</i>	AH1	Cá chép Nhật (<i>Cyprinus carpio carpio</i>)	+	-
<i>A. hydrophila</i>	AH6	Cá Công gô (<i>Phenacogrammus interruptus</i>)	+	-
<i>A. hydrophila</i>	AH7	Cá chân trâu (<i>Poecilia latipinna</i>)	-	+
<i>A. hydrophila</i>	AH9	Cá hồi Thái Bình Dương (<i>Oncorhynchus masou masou</i>)	+	-
<i>A. hydrophila</i>	AH16	Cá chạch (<i>Cobitis biwae</i>)	++	+
<i>A. hydrophila</i>	AK1	Sông Hán	+	++
<i>A. hydrophila</i>	AK9	Nước cống ở tỉnh Gyeonggi	++	++

<i>A. Sorbia</i>	AS1	Cá vàng (<i>Carassius auratus auratus</i>)	+	+
<i>A. Sorbia</i>	AS2	Cá neon (<i>Paracheirodon innesi</i>)	-	-
<i>A. Sorbia</i>	AS3	Cá chép Nhật (<i>Cyprinus carpio carpio</i>)	-	-
<i>A. Sorbia</i>	AK2	Hồ	-	-
<i>A. Sorbia</i>	AK3	Hồ	-	-
<i>A. Sorbia</i>	AK4	Hồ	-	-
<i>A. Sorbia</i>	AK5	Hồ	-	-
<i>A. Sorbia</i>	AK6	Hồ	-	-
<i>A. Sorbia</i>	AK7	Hồ	-	-
<i>A. Sorbia</i>	AK8	Hồ	-	-

Thể thực khuẩn được phân lập được bảo quản ở chỗ tối ở nhiệt độ 4°C.

Phân loại và đặc tính của PAH1-C và PAH6-C

1) Phân loại thể thực khuẩn theo đặc điểm bộ gen

Nhìn chung, thể thực khuẩn *Myoviridae* được biết là chứa bộ gen ADN sợi kép (ds). Tương tự như vậy, các gADN của PAH1-C và PAH6-C được tiêu hóa hoàn toàn bằng DNaza I nhưng không phải bằng RNaza hoặc nucleaza của cây đậu xanh. Do vậy, chúng được cho là dsADN. Ngoài ra, các gADN được tiêu hóa bởi SacII, Sau3AI, MspI, SmaI, NcoI, HpaII và EcoRI, và kích thước của chúng được ước tính là khoảng 50 kb (FIG. 4).

2) Phân loại hình thái học của thể thực khuẩn đã được phân lập

PAH1-C và PAH6-C được phân loại về mặt hình thái vào họ *Myoviridae* và bộ Caudovirales (FIG. 5), theo phân loại của Ackermann. Chiều dài và chiều rộng đuôi lần lượt là $113 \pm 6 / 124 \pm 6$ nm (trung bình $\pm$ SD) ($n = 10$) và $14 \pm 3 / 18 \pm 1$ nm ($n = 10$), và đường kính đầu là $41 \pm 3 / 63 \pm 3$ nm ($n = 10$).

Đánh giá tác dụng của PAH1-C và PAH6-C đối với *Aeromonas hydrophila*

1) Thử nghiệm phân giải tế bào vật chủ

Các hoạt động tiêu khuẩn của PAH1-C và PAH6-C đã được thử nghiệm trên môi trường nuôi cấy *Aeromonas hydrophila* AH16 (FIG. 6). Khi môi trường nuôi cấy *Aeromonas hydrophila* AH16 không bị nhiễm bởi PAH1-C và PAH6-C (đối chứng), giá trị OD₆₀₀ tiếp tục tăng lên trong các lần ủ. Ngược lại, khả năng tồn tại của *Aeromonas hydrophila* AH16 bị chậm lại ở MOI 0,01, 1 và 100 cho tới 24 tiếng sau khi lây nhiễm PAH1-C và PAH6-C.

2) Kết quả đánh giá tác dụng điều trị thể thực khuẩn đối với cá thử nghiệm bị nhiễm khuẩn nhân tạo *Aeromonas hydrophila*

Trong nhóm cấy chỉ với *Aeromonas hydrophila* AH16, tất cả các con cá chết trong vòng 3 ngày, và ở nhóm được điều trị bằng PAH1-C và PAH6-C, quan sát thấy tỷ lệ chết chậm hơn hoặc giảm tỷ lệ chết. Ngoài ra, có thể thấy rằng PAH6-C có tác dụng ức chế bệnh nhiễm khuẩn *Aeromonas hydrophila* tốt hơn so với PAH1-C (FIG. 7).

Khả năng áp dụng công nghiệp

Việc áp dụng thể thực khuẩn theo sáng chế được trình bày là sẽ đóng góp vào việc cải thiện tính cạnh tranh trong ngành công nghiệp nuôi trồng thủy sản và sức khỏe cộng đồng.

Sáng chế đã được mô tả chi tiết. Tuy nhiên, cần hiểu rằng phần mô tả chi tiết sáng chế và các ví dụ cụ thể, trong khi chỉ ra các phương án được ưu tiên của sáng chế, được đưa ra chỉ mang tính minh họa, vì thay đổi và biến đổi khác nhau đều nằm trong tinh thần và phạm vi của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực từ bản mô tả chi tiết này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Thể thực khuẩn *Caudovirales siphoviridae* KCTC 12130BP có số nộp lưu KCTC 12130BP.
2. Chế phẩm ức chế sự phát triển của *Vibrio parahaemolyticus* hoặc diệt nó bao gồm thể thực khuẩn *Caudovirales siphoviridae* KCTC 12130BP theo điểm 1 hoặc môi trường nuôi cấy của nó làm hoạt chất.
3. Chế phẩm ức chế sự phát triển của *Vibrio parahaemolyticus* hoặc diệt nó theo điểm 2, trong đó *Vibrio parahaemolyticus* là chủng kháng đa thuốc.
4. Chế phẩm xử lý nước dẫn chứa thể thực khuẩn *Caudovirales siphoviridae* KCTC 12130BP theo điểm 1 hoặc môi trường nuôi cấy của nó làm hoạt chất.
5. Dược phẩm chứa thể thực khuẩn *Caudovirales siphoviridae* KCTC 12130BP theo điểm 1 hoặc môi trường nuôi cấy của nó làm hoạt chất để phòng hoặc điều trị bệnh nhiễm khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* bao gồm bệnh viêm dạ dày ruột, nhiễm độc thực phẩm, hoặc nhiễm trùng vết thương.
6. Thuốc kháng sinh chứa thể thực khuẩn *Caudovirales siphoviridae* KCTC 12130BP theo điểm 1 hoặc môi trường nuôi cấy của nó làm hoạt chất.
7. Thuốc khử trùng chứa thể thực khuẩn *Caudovirales siphoviridae* KCTC 12130BP theo điểm 1 hoặc môi trường nuôi cấy của nó làm hoạt chất.
8. Phụ gia thức ăn cho cá và động vật có vỏ chứa thể thực khuẩn *Caudovirales siphoviridae* KCTC 12130BP theo điểm 1 hoặc môi trường nuôi cấy của nó làm hoạt chất.

FIG. 1

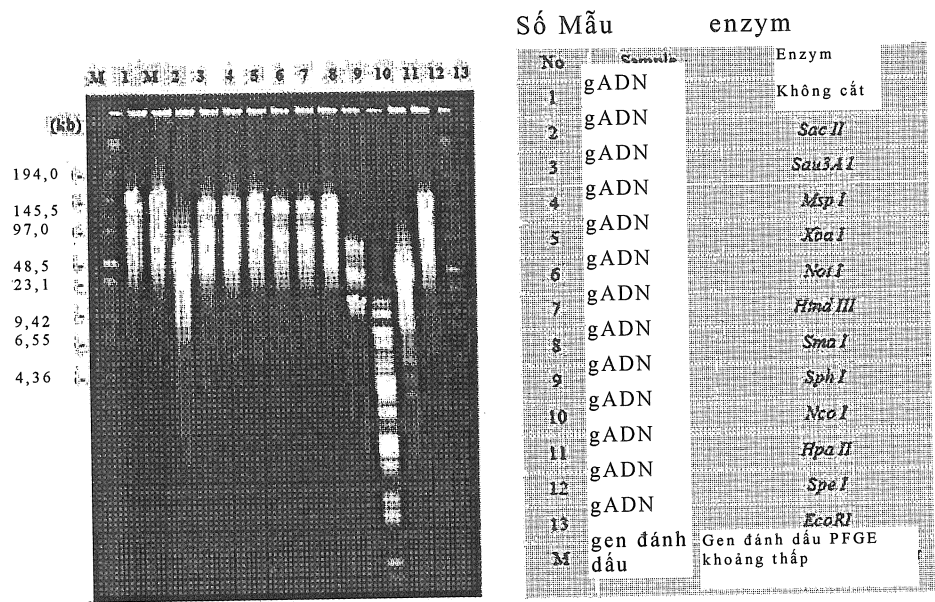


FIG. 2

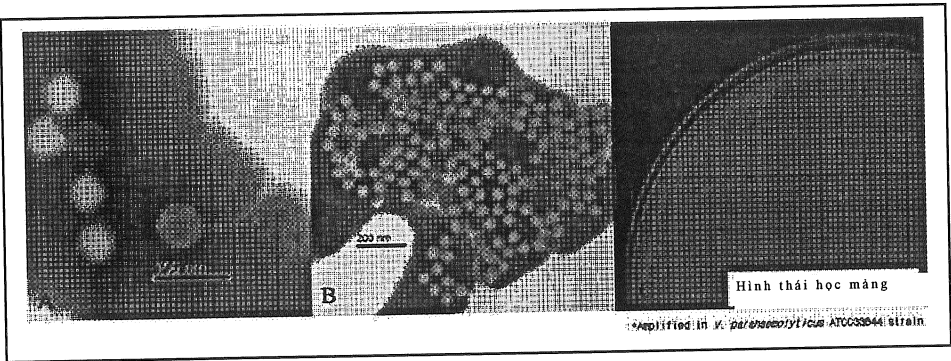


FIG. 3

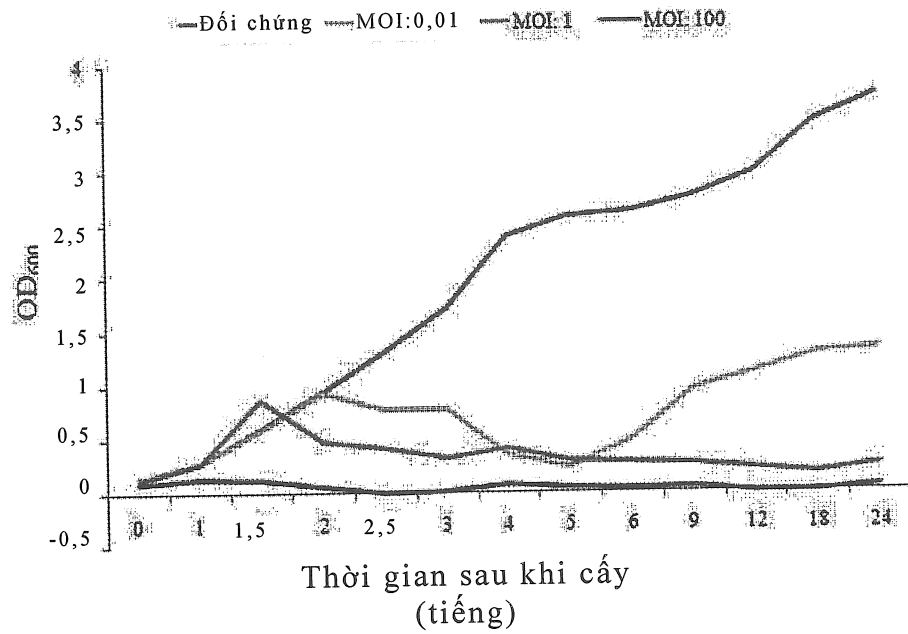


FIG. 4

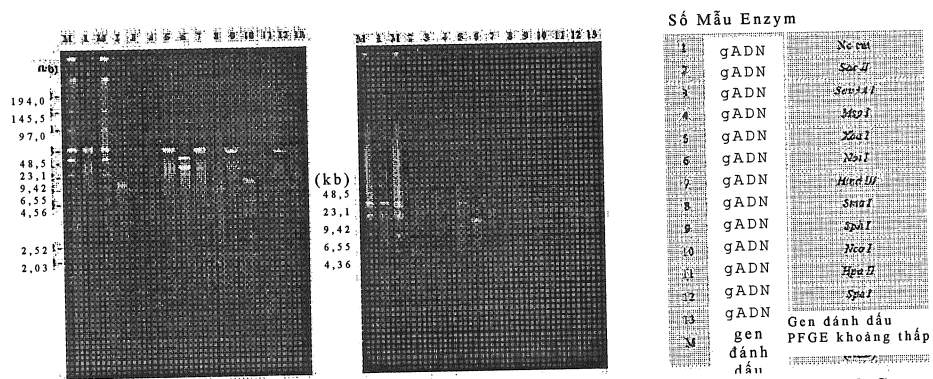


FIG. 5

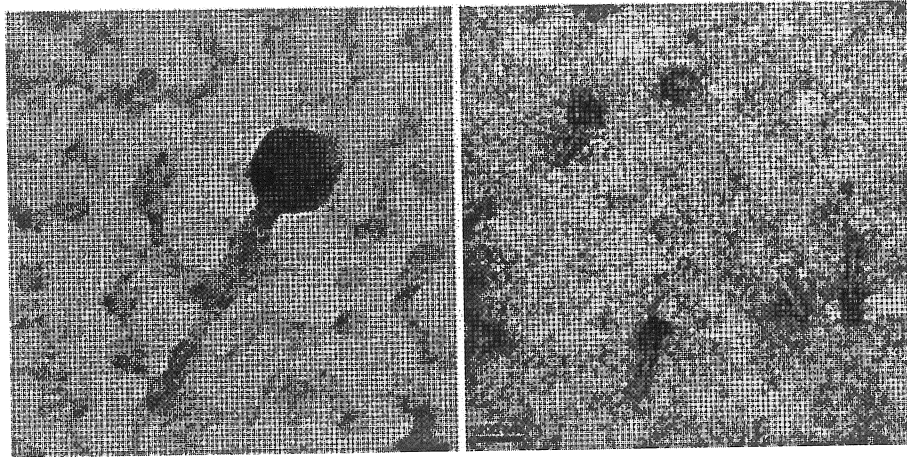


FIG. 6

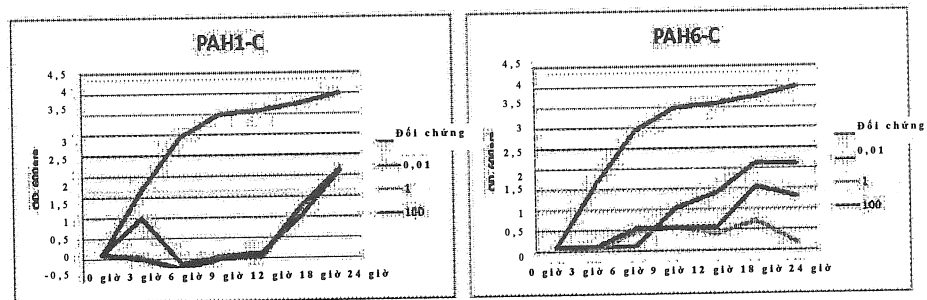


FIG. 7

