



(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)



1-0029683

(51)⁷ C12N 1/20; A61P 31/04; A61K 35/74; (13) B
A61P 1/12

(21) 1-2015-00272

(22) 18/07/2013

(86) PCT/CA2013/000660 18/07/2013

(87) WO/2014/012172 23/01/2014

(30) 61/674,179 20/07/2012 US

(45) 25/10/2021 403

(43) 25/03/2015 324A

(73) PREVTEC MICROBIA INC. (CA)

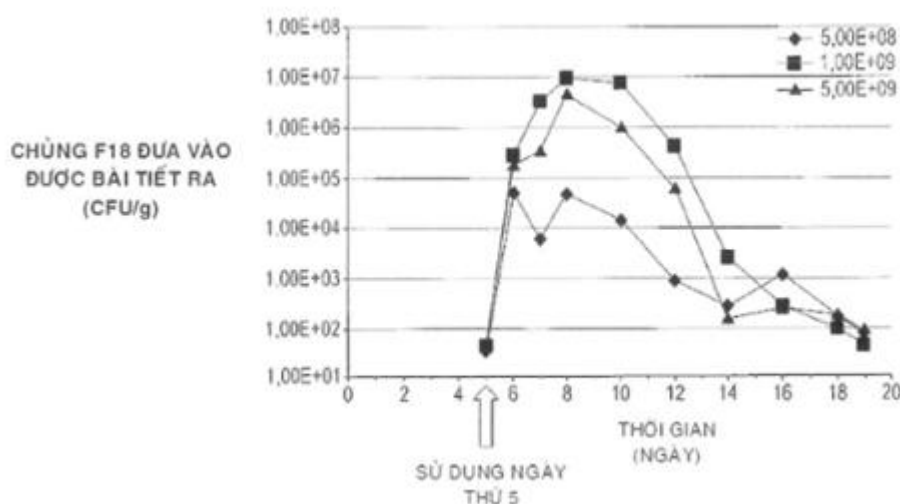
1250 René-Lévesque Boulevard West, 38th Floor, Montréal, Québec H3B 4W8,
Canada

(72) John Morris FAIRBROTHER (CA); Éric NADEAU (CA); Clarisse DESAUTELS
(CA).

(74) Công ty Luật TNHH quốc tế BMVN (BMVN INTERNATIONAL LLC)

(54) CHỦNG *E.COLI* PHÂN LẬP KHÔNG GÂY BỆNH VÀ CHẾ PHẨM CHỨA
CHỦNG *E.COLI* NÀY

(57) Sáng chế đề xuất chủng *E.coli* phân lập được nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ mẫu quốc tế của Canada (IDAC) vào ngày 20/06/2013 và có số truy cập chỉ định là 200613-01. Sáng chế cũng mô tả phương pháp sử dụng chủng này để phòng ngừa bệnh phù hoặc bệnh tiêu chảy do sự lây nhiễm *E.coli* gây bệnh F18 ở động vật.



Lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng *E.coli* F18 không gây bệnh và chế phẩm chứa nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh phù và bệnh tiêu chảy thường là các bệnh phổ biến ở động vật được nuôi dưỡng bởi người chăn nuôi. Ví dụ, bệnh phù ở lợn con đã cai sữa thường do chủng *Escherichia coli* mã hóa bởi độc tố shiga (toxin-encoding *Escherichia coli*-STEC) mã hóa độc tố shiga kiểu 2e (Stx2e) (MacLeod và các đồng tác giả, 1991, Vet Pathol 28:66-73), trong khi bệnh tiêu chảy kích thích bài tiết ở lợn con mới đẻ và lợn con đã cai sữa thường do các chủng *Escherichia coli* gây độc tố trong ruột (enterotoxigenic *Escherichia coli* strains-ETEC) mã hóa đối với các độc tố trong ruột bền với nhiệt (STa, STb, EAST1) và/hoặc không bền nhiệt (LT) (Gyles và Fairbrother, 2010, *Escherichia coli*. Trong tài liệu: Pathogenesis of bacterial infections in animals, ed. Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO, xuất bản lần thứ tư, trang 267-308. Blackwell Publishing, Ames, IA; Nagy và các đồng tác giả, 1997, Microb Pathog 22:1 -1 1). Một số chủng gây bệnh biểu hiện cả gen Stx2e và gen độc tố ruột và do đó, có khả năng gây các triệu chứng của bệnh phù và các triệu chứng của bệnh tiêu chảy trong cùng một động vật (STEC/ETEC) (Barth và các đồng tác giả, 2007, Berl Munch Tierarztl Wochenschr 120:307-316).

Thiếu sót liên quan đến nhiều chế phẩm chữa bệnh và phòng bệnh thông thường và các phương pháp để điều trị sự lây nhiễm vi khuẩn đường ruột có liên quan đến các triệu chứng của bệnh phù và/hoặc bệnh tiêu chảy là độ khả dụng và độ an toàn của chúng thấp. Do đó, có nhu cầu về chế phẩm và các phương pháp chữa bệnh hoặc phòng ngừa được cải thiện đối với bệnh phù và/hoặc bệnh tiêu chảy.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh mở rộng không giới hạn, sáng chế đề xuất chủng *Escherichia coli* phân lập được nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ mẫu quốc tế của Canada (International

Depository Authority of Canada-IDAC) vào ngày 20/06/2013 và có số truy cập chỉ định là 200613-01.

Theo khía cạnh mở rộng không giới hạn khác, sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa bệnh đường ruột *Escherichia coli* gây bệnh F18 (*E.coli*) ở động vật, bao gồm cho động vật sử dụng một lượng có tác dụng chủng *E.coli* sống được nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ mẫu quốc tế của Canada (IDAC) vào ngày 20/06/2013 và có số truy cập chỉ định là 200613-01 theo đường ruột.

Theo khía cạnh mở rộng không giới hạn khác, sáng chế mô tả phương pháp phòng ngừa bệnh phù hoặc bệnh tiêu chảy do lây nhiễm *Escherichia coli* gây bệnh F18 (*E.coli*) ở động vật, bao gồm việc cho động vật sử dụng một lượng hữu hiệu chủng *E.coli* sống được nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ mẫu quốc tế của Canada (IDAC) vào ngày 20/06/2013 và có số truy cập chỉ định là 200613-01 theo đường ruột.

Theo một phương án không bị giới hạn, chủng *E.coli* sống ở dạng đông khô. Theo một phương án không bị giới hạn khác, chủng *E.coli* sống được kết hợp với chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi, ví dụ, chủng *E.coli* sống có thể được pha loãng, kết hợp vào, hoặc tạo huyền phù trong chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi. Theo một phương án không bị giới hạn khác, chủng *E.coli* sống có dạng lạnh đông.

Các khía cạnh và dấu hiệu này và khác nữa của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sau khi xem xét phần mô tả sau đây về các phương án cụ thể của sáng chế, kết hợp với các hình vẽ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Mô tả chi tiết các phương án của sáng chế được đề xuất dưới đây, có tham khảo đến các hình vẽ kèm theo, trong đó:

Fig.1: là đồ thị không giới hạn minh họa sự bài tiết qua phân của chủng F18 không gây bệnh sau khi sử dụng chủng F18 không gây bệnh sống theo các liều lượng thay đổi, biểu diễn bởi lôgarit ngược giá trị trung bình của các đơn vị tạo khuẩn lạc lôgarit (colony forming units-CFU).

Fig.2: là đồ thị không giới hạn minh họa sự bài tiết qua phân của chủng thử thách gây bệnh F18-STEC: so sánh giữa các động vật đã được điều trị bằng chế phẩm hỗn hợp và các động vật đối chứng.

Fig.3: là đồ thị không giới hạn minh họa quá trình tạo khuẩn lạc bởi chủng thử thách gây bệnh F18-STEC trong các đoạn ruột khác nhau: so sánh giữa các động vật đã được điều trị bằng chế phẩm hỗn hợp và các động vật đối chứng.

Fig.4: là đồ thị không giới hạn minh họa sự phát hiện miễn dịch của IgM kháng lại tua vi khuẩn F18 trong các mẫu huyết thanh: so sánh giữa các động vật đã được điều trị bằng chế phẩm hỗn hợp và các động vật đối chứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Nói chung, STEC ở lợn và nhiều chủng ETEC ở lợn biểu hiện yếu tố di truyền F18. Yếu tố di truyền F18 là tua vi khuẩn thúc đẩy quá trình tạo khuẩn lạc của vi khuẩn trên bề mặt niêm mạc ruột (Fairbrother và các đồng tác giả 2006, Postweaning *Escherichia coli* diarrhea and edema disease. Trong tài liệu: Diseases of swine, ed. Straw B, Zimmermann JJ, D'Allaire S, Taylor DJ, xuất bản lần thứ 9, trang 649-662. Blackwell Publishing, Ames, IA). Người ta cho rằng sự bám dính trung gian tua vi khuẩn F18 của tế bào vi khuẩn biểu hiện F18 với thụ thể tế bào ruột, thụ thể ECF18R, thụ thể này được phơi nhiễm bởi tế bào đường ruột ở ruột non trên màng tế bào chất ngọn của chúng (Vogeli và các đồng tác giả 1996, Anim Genet 27:321-328; Waddell và các đồng tác giả 1996, Infect Immun 64:1714-1719).

Một số chủng STEC và STEC/ETEC ở lợn có thể biểu hiện sự bám dính tua vi khuẩn dính tế bào hoặc không tua vi khuẩn cùng với tua vi khuẩn F18, đặc biệt là tua vi khuẩn F4 hoặc F5 hoặc "bám dính liên quan đến sự bám dính khuếch tán" (Adhesin involved in diffuse adherence-AIDA) (Barth và các đồng tác giả, 2007, Berl Munch Tierarztl Wochenschr 120:307-316; DebRoy và các đồng tác giả 2009, J Vet Diagn Invest 21:359-364; Fairbrother và các đồng tác giả, supra; Niewerth và các đồng tác giả: 2001, Clin Diagn Lab Immunol 8:143-149). Trong khi sự bám dính AIDA xuất hiện thường xuyên trong cả hai loại vi khuẩn gây bệnh, tua vi khuẩn F4 hoặc F5 là hiếm gặp trong các chủng này.

Trong nông trại, bệnh tiêu chảy sau cai sữa (post-weaning diarrhea-PWD) và bệnh phù (edema disease-ED) ở lợn thường xuất trong hai tuần đầu sau khi cai sữa và có liên quan đến sự lây nhiễm các chủng *E.coli* tạo độc tố đường ruột gây bệnh F4 hoặc F18 (ETEC) đối với PWD và lây nhiễm các chủng *E.coli* tạo độc tố F18 Shiga gây bệnh (STEC) đối với ED. Đối với cả hai chủng này, tua viền (ví dụ, F4 hoặc F18) cho phép sự bám dính của vi khuẩn với thụ thể đặc hiệu của chúng, định vị trên lông tơ ruột non, sau đó bị phân cắt bởi vi khuẩn và tạo khuẩn lạc trong đường ruột.

Đối với PWD, các thụ thể F4 được biểu hiện trong khoảng 30 đến 40% số lợn và các thụ thể F18 được phát hiện trong khoảng 70 đến 80% số lợn. Các chủng gây bệnh tạo sự tổ hợp nhiều độc tố như LT, STa và STb. Lợn bị lây nhiễm ETEC-F4 thường thể hiện tỷ lệ tử vong rất cao, tăng trưởng chậm, giữ nước và dễ bị tiêu chảy mà các triệu chứng này thường làm động vật bị lây nhiễm chết.

Đối với ED, các thụ thể F18 được phát hiện trong khoảng 70 đến 80% số lợn. Độc tố liên quan đến STEC là Stx2e, vasotoxin hoạt động trên các tế bào màng trong của mạch dẫn đến bệnh phù và các dấu hiệu thần kinh tiếp theo bao gồm mất điều hòa, bò lan và cuối cùng, như đối với PWD, thường làm cho động vật lây nhiễm bị chết.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "*E.coli* F18" hoặc "chủng F18" đề cập đến chủng *E.coli* biểu hiện yếu tố di truyền F18 (tua viền).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "*E.coli* F4" hoặc "chủng F4" đề cập đến chủng *E.coli* biểu hiện yếu tố di truyền F4 (tua viền).

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận thấy rằng chủng F18 không gây bệnh được mô tả ở đây có thể được thao tác sao cho thu được chủng đột biến hoặc chủng biến thể của chúng, chủng mà có tất cả các đặc tính xác định của chủng được mô tả ở đây, mà không cần cố gắng quá mức. Các phương pháp tạo các chủng đột biến hoặc chủng biến thể là thông dụng và đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Ví dụ, Patent Mỹ số 7,371,558 mô tả tóm tắt về một số phương pháp để tạo "thể đột biến hoặc biến thể của chúng". Các phương pháp đặc hiệu để tạo các thể đột biến bằng cách sử dụng chất phóng xạ hoặc chất hóa học cũng đã được mô tả trong các tài liệu trong lĩnh vực này. Ví dụ, xem Thomas D. Brock in Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Second Edition (1989) Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass., hoặc Deshpande,

Mukund V., Appl. Biochem. Biotechnol. 36, 227 (1992). Chủng đột biến hoặc chủng biến thể của chúng cũng có thể được xác định như có bộ gen hoặc các bộ phận quan trọng của chúng mà lai hóa dưới các điều kiện nghiêm ngặt cao thành bộ gen của chủng được mô tả ở đây. Người có kỹ thuật trung bình trong lĩnh vực sẽ có thể nhận ra tầm quan trọng của bộ phận của bộ gen cần có để cân nhắc liệu chủng này là "thể đột biến hoặc biến thể của chúng". Như vậy, người có kỹ thuật trung bình trong lĩnh vực sẽ dự đoán một cách hợp lý rằng sáng chế có thể được áp dụng thực tế bằng cách sử dụng chủng biến thể hoặc chủng đột biến của chúng, mà không cần cố gắng quá mức.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "lượng có tác dụng" đề cập đến lượng sẽ tạo ra phản ứng sinh học mong muốn của mô, hệ hoặc động vật. Lượng có tác dụng chủng *E.coli* F18 sống như được mô tả ở đây có thể là, ví dụ, tuy nhiên không bị giới hạn ở lượng đủ để phòng ngừa sự lây nhiễm vi khuẩn đường ruột, giảm thiểu sự bài tiết vi khuẩn, phòng ngừa bệnh do lây nhiễm vi khuẩn đường ruột, và các bệnh tương tự. Lượng có tác dụng được sử dụng có thể thay đổi phụ thuộc vào một số yếu tố. Ví dụ, một số yếu tố có thể được chọn từ kiểu động vật, trọng lượng ban đầu của động vật, kỳ sinh trưởng của động vật, môi trường, chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi liên quan đến chủng vi sinh sống, ví dụ, điều kiện trang trại động vật, kiểu và cách quản lý sản xuất, tình trạng vệ sinh của trang trại, tâm trạng của động vật sau khi cai sữa hoặc ủ, thức ăn và dinh dưỡng bổ sung được sử dụng, tình trạng sức khỏe của động vật và các bệnh hoặc điều trị đồng phát, và các yếu tố tương tự. Ví dụ, lượng có tác dụng có thể là, tuy nhiên không bị giới hạn ở lượng bất kỳ được chọn trong khoảng từ 5×10^6 đến 3×10^{10} CFU. Người có trình độ kỹ thuật trung bình trong lĩnh vực sẽ có thể xác định được lượng có tác dụng thích hợp mà không cần cố gắng quá mức.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "động vật" chỉ động vật nhỏ hoặc động vật trưởng thành bất kỳ thích hợp để sử dụng theo sáng chế. Theo một phương án không bị giới hạn, thuật ngữ "động vật" là chỉ lợn. Theo một phương án không bị giới hạn, lợn là lợn chưa cai sữa. Theo một phương án không bị giới hạn khác, lợn là lợn sau cai sữa. Người có trình độ kỹ thuật trung bình trong lĩnh vực sẽ có thể xác định được động vật thích hợp mà không cần cố gắng quá mức.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "phân phối qua ruột" chỉ đường dùng cho phép chủng vi sinh vật cuối cùng tới được ống dạ dày-ruột, và tốt hơn nữa là ruột. Theo một phương án không bị giới hạn, việc phân phối qua ruột được thực hiện bởi việc sử dụng chủng vi sinh vật theo đường miệng. Theo một phương án không bị giới hạn khác, việc phân phối qua ruột được thực hiện theo đường trực tràng, ví dụ bằng viên đạn. Người có trình độ kỹ thuật trung bình trong lĩnh vực sẽ có thể xác định được đường dùng thích hợp mà không cần cố gắng quá mức.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi" chỉ chất mang, chất pha loãng hoặc tá dược bất kỳ mà tương thích với chủng vi sinh vật được mô tả ở đây và có thể cung cấp cho động vật mà không có tác dụng ngược. Các chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi thích hợp đã biết trong lĩnh vực, tuy nhiên không bị giới hạn ở nước, nước muối, glucoza, dextroza, các dung dịch đệm, và các chất tương tự. Tốt hơn nếu chất mang như vậy không độc cho chủng vi sinh vật và không gây hại cho động vật. Nó cũng có thể không bị thoái hóa sinh học. Chất mang có thể là chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi dạng rắn hoặc lỏng. Chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi dạng rắn thích hợp là chất mang không độc có thể ăn được. Ví dụ, chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi dạng rắn này có thể là thức ăn gia súc dạng rắn thông thường như một thành phần của chế độ ăn của động vật thông dụng bao gồm các sản phẩm ngũ cốc, như bột đại mạch, bột ngô hoặc phế phẩm lúa mì, các sản phẩm quả hạch và hạt, như bánh hạt nghiền đã bóc vỏ hoặc bánh hạt bông, hoặc bánh hạt bông đã chiết, cùng với lượng nhỏ nhất, ví dụ, thức ăn từ chim muông, thức ăn rong biển, thức ăn từ xương, bột xương, đá phấn, muối, urê và các vitamin; hoặc nó có thể là chất pha loãng hoặc chất mang rắn, tro không có giá trị dinh dưỡng, ví dụ, cao lanh, bột tac, canxi cacbonat, đất tẩy màu, đất sét attapulgius, vỏ hào nghiền hoặc đá vôi nghiền; hoặc nó có thể là tinh bột lactoza. Theo cách thực hiện cụ thể khác, chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi dạng rắn khác có thể là ngô nghiền, thức ăn từ đậu tương, bột whey, mỡ động vật, và các chất tương tự. Chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi dạng lỏng thích hợp là, ví dụ, nước và tốt hơn là nước uống; sữa như sữa nguyên kem hoặc sữa gầy; hoặc môi trường nuôi cấy như nước canh thịt đậu nành trypson (trypsone soy broth-TSB). Người có trình độ kỹ thuật trung bình trong lĩnh vực sẽ có thể xác định

được chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi thích hợp mà không cần cố gắng quá mức.

Phạm vi của yêu cầu bảo hộ không bị giới hạn bởi các phương án được ưu tiên như nêu trong các ví dụ sau, tuy nhiên cần được hiểu theo nghĩa rộng nhất phù hợp với toàn bộ bản mô tả.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

a) Chủng *E.coli* F18 không gây bệnh

Chủng *E.coli* được nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ mẫu quốc tế của Canada (IDAC) vào ngày 20/06/2013 và có số truy cập chỉ định là 200613-01 được phân lập từ phân lợn trong năm 1996 tại phòng thí nghiệm có thẩm quyền OIE đối với *Escherichia coli* (EcL) tại Khoa Thuốc Thú y (Faculte de medicine veterinaire-FMV), trường đại học Montreal (Universite de Montreal-UdeM), Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada by Dr. J.M. Fairbrother.

Việc xác định chủng được thực hiện bằng cách sử dụng hệ API. Mã API 20E đối với Master Seed là 5004552. Việc định kiểu huyết thanh của chủng liên quan đến kiểu huyết thanh O141:K94:H-.

Việc định kiểu virus của chủng được thực hiện bằng cách lai hóa khuẩn lạc và/hoặc phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction-PCR). Việc định kiểu virus chứng tỏ rằng chủng là dương tính đối với F18 và AIDA trong khi nó âm tính với các độc tố sau: STa, STb, LT, EAST1, Stx1, Stx2, CNF, F4, F5, F6, F17, F41, P, AFA, Eae, Paa, Tsh, các gen Aerobactin. Do đó, chủng này là chủng *E.coli* không gây bệnh.

Chủng kháng với các chất kháng sinh: amoxicillin, ampicillin, clindamycin, doxyxycilin, erythromycin, neomycin, penicilin, spectinomycin, streptomycin, sunfaclopyridazin, sunfadimetoxin, sunfathiazol, tiamulin, tilmicosin, tetraxycilin (clo và oxy) và tylosin, trong khi nhạy với các chất kháng sinh sau: apramycin, ceftiofur, colistin, danofloxacin, enrofloxacin, và gentamixin.

b) Chủng *E.coli* F4 không gây bệnh

Chủng *E.coli* F4 không gây bệnh cũng có thể được sử dụng kết hợp với chủng *E.coli* F18 không gây bệnh được mô tả ở đây. Theo một phương án không bị giới hạn, chủng *E.coli* F4 không gây bệnh là chủng không gây bệnh bất kỳ biểu hiện yếu tố di truyền F4. Theo một phương án không bị giới hạn, chủng *E.coli* F4 không gây bệnh là chủng tái tổ hợp, ví dụ, chủng pMK005 (Kehoe và các đồng tác giả, J Bacteriol. 1983 Sep;155(3):1071-7). Theo một phương án không bị giới hạn khác, chủng *E.coli* F4 không gây bệnh là chủng tự nhiên, ví dụ, chủng được nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ mẫu quốc tế của Canada vào ngày 21/01/2005 và có số truy cập chỉ định là IDAC 210105-01, như được mô tả trong Patent Mỹ số 7,981,411.

Ví dụ 2

Theo khía cạnh rộng, mục đích của nghiên cứu này là để đánh giá tác động của các liều dùng theo đường miệng khác nhau chứa chủng F18 không gây bệnh được mô tả ở đây đến sự bài tiết phân của chúng và đến các đáp ứng thể dịch toàn thân kháng F18.

Bảng 1 sau đây tóm tắt chung về sơ đồ nghiên cứu:

Ngày	Sự kiện
0	Lợn được đưa đến phòng thí nghiệm và phân thành 3 nhóm
0-5	Giai đoạn làm thích nghi môi trường
2 và 5 đến 19	Lấy mẫu phân làm PCR
5	Tiêm chủng
5 đến 8, 10, 12, 14, 16, 18 và 19	Lấy mẫu phân để đếm chủng vắc-xin sống (dựa vào khuẩn lạc tan huyết)
5, 10, 12, 15 và 19	Lấy mẫu máu
8	Mổ xác khám nghiệm đầu tiên
19	Mổ xác khám nghiệm cuối cùng và kết thúc thử nghiệm

I – Mô hình nghiên cứu

a) Động vật

Lấy mẫu máu của 50 con lợn đang được nuôi dưỡng để phân tích phát hiện tình trạng thụ thể F18 và lợn được đánh dấu vào tai. Lợn cai sữa được chọn (đực và cái), độ tuổi nằm trong khoảng từ 17 đến 20 ngày, được cung cấp từ trang trại địa phương ở Monterege, Quebec, Canada. Các con lợn được vận chuyển đến các khu chuồng cách ly. Trang trại được chọn thể hiện gần đây không có hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome-PRRS) (ít nhất trong 6 tháng gần đây) và các thời kỳ bệnh sau cai sữa. Lợn là lợn khỏe mạnh và có trọng lượng nằm trong khoảng từ 4 đến 6kg. Sử dụng tổng số 21 con lợn dương tính đối với tình trạng thụ thể F18, phân chia ngẫu nhiên bằng cách sử dụng số thẻ đánh dấu trên tai thành 3 nhóm, mỗi nhóm 7 con (ba liều chế phẩm F18 khác nhau). Vào ngày thứ 2 sau khi cai sữa, lấy mẫu phân để xác định có tạo khuẩn lạc với các chủng dương tính F4 và chủng dương tính F18 hay không bằng cách sử dụng PCR. Không phát hiện con nào dương tính với các vi khuẩn dương tính F4 hoặc vi khuẩn dương tính F8 vào ngày thứ 2 sau khi cai sữa.

b) Điều kiện chuồng trại và thức ăn

Các nhóm điều trị được giữ trong các phòng riêng biệt. Cho lợn được tiếp cận tự do với nước và cho ăn hai lần một ngày trong quá trình nghiên cứu. Chế độ ăn của lợn bao gồm bột đậu nành chất lượng cao như được mô tả trong Patent Mỹ số 6,355,859. Không đồng thời sử dụng thuốc hoặc tiêm chủng trong quá trình nghiên cứu.

c) Chuẩn bị và sử dụng chủng

Hai đường cong sinh trưởng được chuẩn bị theo cách giống nhau để đánh giá thời gian cần thiết để chủng *E.coli* F18 không gây bệnh đạt được hiệu suất tối ưu của chúng. Working Seed (WS) được sử dụng để chuẩn bị đường cong sinh trưởng và mẹ nuôi cấy mà được sử dụng để điều chế chế phẩm F18. 1ml WS được sử dụng để cấy truyền 500mL TrypticSoy Broth mà không có các nguyên liệu có nguồn gốc động vật. Mẹ nuôi cấy được ủ trong khoảng 6,5 giờ ở 37°C kèm theo khuấy (180 vòng/phút). Thực hiện đếm cá thể sống để đánh giá hiệu suất của mẹ nuôi cấy chủng F18 và sử dụng phản ứng PCR để chứng tỏ rằng chủng thích hợp được sử dụng trong quá trình thử nghiệm. Dựa vào kết

quả này, mẹ nuôi cấy được điều chỉnh để đáp ứng được các liều lượng cần thử nghiệm, sử dụng TSB tiệt trùng mà không cần các vật liệu có nguồn gốc động vật: Nhóm 1, 5×10^8 CFU/liều; Nhóm 2, 1×10^9 CFU/liều; và Nhóm 3, 5×10^9 CFU/liều.

Chín liều chế phẩm chủng F18 không gây bệnh được chuẩn bị cho mỗi hỗn hợp, 2 con lợn hoặc nhiều hơn được điều trị để bù sự hao hụt chế phẩm bất kỳ. 6ml chế phẩm F18 được cung cấp theo đường miệng cho mỗi con lợn. Chế phẩm F18 được cung cấp vào ngày thứ 5 sau cai sữa bằng cách sử dụng ống thực quản.

II – Quan sát và đánh giá

a) Sức khỏe chung

Quan sát sức khỏe chung của lợn hai lần một ngày: hành vi, sự mất nước, sự thèm ăn, và điều kiện sinh lý chung. Sự vận động và lông cũng được đánh giá.

b) Bệnh tiêu chảy

Độ đặc của phân được cho điểm hàng ngày như sau: 0, bình thường; 1, dạng nhão; 2, có xuất hiện dịch lỏng nhưng các hạt rắn nhiều hơn dịch lỏng; 3, xuất hiện dịch lỏng nhiều hơn các hạt rắn; và 4, lỏng hoàn toàn.

c) Sự bài tiết của chủng F18 không gây bệnh được sử dụng

Vào ngày thứ 2 và ngày thứ 5 đến 19 sau khi cai sữa, thử nghiệm phân bằng PCR (nhiều thành phần: LT, STa, STb và F4; F18, Stx2e và AIDA) sau khi làm giàu trong canh thịt Luria-Bertoni (LB) để kiểm tra sự có mặt của chủng F18 không gây bệnh được sử dụng trong mỗi nhóm. Mẫu dương tính đối với F18 được cho là dương tính đối với chủng F18 không gây bệnh được sử dụng. Vào ngày thứ 5 đến 8, 10, 12, 14, 16, 18 và 19 sau khi cai sữa, thực hiện đếm cá thể sống trên các mẫu phân sử dụng Tryptic Soy Agar II (TSA II) - 5% huyết thanh cừu để đánh giá mức chủng F18 không gây bệnh được sử dụng bài tiết ra sau khi đưa vào. Chỉ đếm các khuẩn lạc tan huyết có hình thái *E.coli* điển hình.

d) Đánh giá miễn dịch học

Thu gom các mẫu máu vào ngày 5, 10, 12, 5 và 19 sau khi cai sữa để đánh giá phản ứng miễn dịch tối ưu bởi ELISA theo liều lượng chủng 18 không gây bệnh được sử dụng.

III – Mô xác khám nghiệm

a) Mô xác khám nghiệm

Thực hiện mô xác khám nghiệm lần đầu vào ngày thứ 3 sau khi tiêm chủng, vào ngày 8 sau khi cai sữa trên 2 con lợn được chọn ngẫu nhiên, và đánh giá các bất thường về trọng lượng. Thực hiện mô xác lần thứ hai vào cuối quá trình nghiên cứu, tức là vào ngày thứ 19 sau khi cai sữa, là ngày thứ 14 sau khi tiêm chủng trên tất cả các con lợn còn lại.

b) Độ đặc của phân trong ruột

Độ đặc của phân trong ruột được cho điểm số trong ruột chảy, ruột hồi, ruột tịt, ruột kết và ruột thẳng như sau: 0, bình thường; 1, nhão; 2, xuất hiện dịch lỏng nhưng hạt rắn nhiều hơn dịch lỏng; 3, xuất hiện dịch lỏng nhiều hơn hạt rắn hoặc lỏng hoàn toàn.

c) Sự tạo khuẩn lạc bởi chủng vắc-xin trong ruột hồi

Lấy mẫu phần ruột hồi dài khoảng 2cm nằm ở đoạn khoảng 10cm đầu gần chỗ nối ruột hồi manh tràng. Thực hiện đếm vi khuẩn sống sử dụng TSA II - 5% huyết thanh cừu, trong đó chỉ đếm các khuẩn lạc tan huyết có hình thái *E.coli* điển hình.

IV – Kết quả

Không quan sát thấy con nào chết ở cả lợn được điều trị và lợn đối chứng trong toàn bộ nghiên cứu. Tất cả lợn được chọn là dương tính đối với thụ thể F18 như phương pháp PCR-RFLP. Nói chung, lợn có tình trạng sức khỏe tốt trong suốt quá trình nghiên cứu. Một vài con lợn chứng tỏ rằng xuất hiện tỷ lệ chết giảm trước khi sử dụng chủng *E.coli* F18 không gây bệnh hoặc do tổn thương, do đó không liên quan đến việc sử dụng F18 không gây bệnh.

Trong quá trình nghiên cứu này, điểm số bằng 2 hoặc cao hơn được coi là bệnh tiêu chảy. Trên 21 con lợn, 5 con thể hiện bệnh tiêu chảy nhẹ sau khi sử dụng F18. 1

con lợn (lợn số 5 trong nhóm 3) bị bệnh tiêu chảy (điểm số = 3) trong hai ngày liên tiếp (Bảng 2a, 2b và 2c).

Thử nghiệm hàng ngày mẫu phân bằng PCR để phát hiện sự xuất hiện của chủng F18 được đưa vào; 3 con lợn trong nhóm 2 (1×10^9 CFU/liều) dương tính đối với chủng F18 được đưa vào, cuối cùng, vào ngày thứ 11 sau khi tiêm chủng, trong đó nhóm 3 (5×10^9 CFU/liều) có 1 con lợn dương tính vào ngày thứ 10, 1 con lợn vào ngày thứ 8 và 3 con lợn vào ngày thứ 7 sau khi tiêm chủng. Đối với nhóm 1 (5×10^8 CFU/liều), 1 con lợn dương tính đối với chủng F18 không gây bệnh được sử dụng vào ngày thứ 8 sau khi tiêm chủng, 1 con lợn vào ngày thứ 7 và 2 con lợn vào ngày thứ 6 sau khi tiêm chủng (Bảng 2a, 2b và 2c).

Bảng 2a: Điểm số, thời gian và mức độ của bệnh tiêu chảy đối với nhóm được cung cấp 5×10^8 CFU/liều

ID	Điểm số bệnh tiêu chảy* ¹ vào ngày* ²																			Thời gian* ³		Mức độ* ⁴
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Max = 14	Max = 56
9	0	0	ND	ND	ND	1	0	0	2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	1	2
18	0	0	ND	ND	ND	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	3
23	0	0	ND	ND	ND	0	0	1	1	0	0	0	0	0	ND	0	0	0	0	0	0	2
27	0	0	ND	ND	ND	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3
30	0	0	ND	ND	ND	0	0	0	0	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	0	0
33	0	0	ND	ND	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
50	0	0	ND	ND	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MD* ⁵	0	0				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2

Bảng 2b: Điểm số, thời gian và mức độ của bệnh tiêu chảy đối với nhóm được cung cấp 1×10^9 CFU/liều

ID	Điểm số bệnh tiêu chảy* ¹ vào ngày* ²																			Thời gian* ³		Mức độ* ⁴
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Max = 14	Max = 56
6	0	0	ND	ND	ND	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	5
26	0	0	ND	ND	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	ND	ND	ND	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
34	0	0	ND	ND	ND	0	0	0	0	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	0	0
37	0	0	ND	ND	ND	0	1	3	1	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	1	5
42	0	0	ND	ND	ND	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
45	0	0	ND	ND	ND	2	2	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	6
MD* ⁵	0	0				0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Bảng 2c: Điểm số, thời gian và mức độ của bệnh tiêu chảy đối với nhóm được cung cấp 5x10⁹CFU/hiệu

Điểm số bệnh tiêu chảy* ¹ vào ngày* ²																					Thời gian* ³		Mức độ* ⁴
ID	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	Max = 14	Max = 56	
4	0	0	ND	ND	ND	0	0	E	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	2	0	1	9	
5	0	0	ND	ND	ND	0	0	0	0	1	0	1	3	3	0	2	1	1	1	1	3	14	
13	0	0	ND	ND	ND	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	1	3	
17	0	0	ND	ND	ND	0	1	0	0	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	0	1		
21	0	0	ND	ND	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
46	0	0	ND	ND	ND	0	0	0	0	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	0	0	0	
49	0	0	ND	ND	ND	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
MD* ⁵	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	

*¹ Độ đặc của phân được cho điểm như sau: 0, bình thường; 1, nhão; 2, xuất hiện dịch lỏng nhưng hạt rắn nhiều hơn dịch lỏng 3, xuất hiện dịch lỏng nhiều hơn hạt rắn; và 4, lỏng hoàn toàn;

*² Ngày thứ 5: cung cấp chủng F8 được đưa vào;

*³ Thời gian bị tiêu chảy (Số ngày với số điểm=2= hoặc lớn hơn đối với lợn sau thời gian tiêm chủng; ngày thứ 6 đến 19);

*⁴ Mức độ tiêu chảy (Điểm số tiêu chảy lũy tích của lợn sau thời gian tiêm chủng; ngày thứ 6 đến 19);

*⁵ Trung bình điểm số tiêu chảy.

Đường kẻ đậm theo chiều dọc ký hiệu ngày cuối cùng mà phát hiện ra chủng F18 (chủng vacxin) bởi PCR.

ND: không thực hiện

E: Không có

D: chết (cho mổ xác khám nghiệm)

Sự bài tiết qua phân của chủng F18 không gây bệnh được sử dụng cũng được đánh giá bằng cách đếm số vi khuẩn từ các mẫu phân vào ngày thứ 5 đến 8, 10, 12, 14, 16, 18 và 19. Fig.1 thể hiện sự bài tiết chủng vi sinh vật sau khi sử dụng. Mức vi khuẩn được bài tiết ở liều lượng thấp hơn (5×10^8 CFU) là lớn hơn hai mẫu khác, quan sát thấy sự bài tiết cao nhất ở các con lợn trong nhóm 2, được sử dụng liều lượng 1×10^9 CFU.

Không quan sát thấy sự bất thường về trọng lượng đối với các bộ phận bên trong. Độ đặc của phân trong ruột được đánh giá về sự tích tụ dịch lỏng.

Trong nghiên cứu này, điểm số = 2 hoặc cao hơn được cho là tích tụ dịch lỏng trong đoạn ruột vào ngày mổ xác khám nghiệm. Bảng 3a, 3b và 3c thể hiện rằng 1 con lợn trong nhóm 1 có hai đoạn liên tiếp có tích tụ dịch lỏng (điểm số = 2). Các con lợn khác không thể hiện sự tích tụ dịch lỏng.

Không quan sát thấy có hiện tượng không mong muốn liên quan đến việc sử dụng chủng *E.coli* F18 không gây bệnh trong quá trình nghiên cứu, chứng tỏ rằng các liều lượng thử nghiệm nói chung là an toàn.

Dựa vào đánh giá sự bài tiết chủng vi sinh vật, PCR và đếm vi khuẩn chứng tỏ rằng mức 1×10^9 CFU/liều là liều lượng thích hợp để thu được sự bài tiết qua phân kéo dài của chủng này. Cả hai thử nghiệm đều chứng tỏ rằng việc sử dụng chủng F18 không gây bệnh ở mức 1×10^9 CFU/liều được bài tiết trong quãng thời gian dài hơn so với các liều lượng thử nghiệm khác.

Bảng 3a: Điểm số độ đặc của phân trong ruột và phạm vi và mức độ sự tích tụ dịch lỏng trong ruột đối với nhóm được sử dụng 5x10⁸ CFU/liều

ID	Ngày khám nghiệm	mô xác	Điểm số dịch lỏng trong ruột *1					Phạm vi*2 (Max=5)	Mức độ*3 (Max=15)
			Ruột chảy	Ruột hồi	Ruột tịt	Ruột kết	Ruột thẳng		
9	8		0	E	1	2	2	2	5
18	19		0	0	0	0	0	0	0
23	19		0	0	0	0	0	0	0
27	19		0	0	0	0	0	0	0
30	8		0	E	0	0	0	0	0
33	19		0	0	0	0	0	0	0
50	19		0	0	0	0	0	0	0
MD*4 Ngày thứ 8			0	E	0.5	1	1	1.5	3.5
MD*4 Ngày thứ 19			0	0	0	0	0	0	0

Bảng 3b: Điểm số độ đặc của phân trong ruột và phạm vi và mức độ sự tích tụ của dịch lỏng trong ruột đối với nhóm được sử dụng 1x10⁹ CFU/liều

ID	Ngày khám nghiệm	mô xác	Điểm số dịch lỏng trong ruột *1					Phạm vi*2 (Max=5)	Mức độ*3 (Max=15)
			Ruột chảy	Ruột hồi	Ruột tịt	Ruột kết	Ruột thẳng		
6	19		0	0	0	1	0	0	1
26	19		0	0	0	0	0	0	0
29	19		0	0	0	1	0	0	1
34	8		0	0	0	0	0	0	0
37	8		0	0	0	0	0	0	0
42	19		0	E	0	0	0	0	0
45	19		0	E	0	0	0	0	0
MD*4 Ngày thứ 8			0	0	0	0	0	0	0
MD*4 Ngày thứ 19			0	0	0	0	0	0	0

Bảng 3c: Điểm số độ đặc của phân trong ruột và phạm vi và mức độ sự tích tụ của dịch lỏng trong ruột đối với nhóm được sử dụng 5x10⁹ CFU/liều

ID	Ngày mô khám nghiệm	Điểm số dịch lỏng trong ruột *1				Phạm vi*2 (Max=5)	Mức độ*3 (Max=15)
		Ruột chảy	Ruột hôi	Ruột tịt	Ruột thắt		
4	19	1	0	0	0	0	1
5	19	0	1	0	1	0	3
13	19	0	E	1	0	0	2
17	8	0	0	0	0	0	0
21	19	1	E	1	0	0	2
46	8	0	0	0	0	0	0
49	19	0	0	0	0	0	0
MD*4 Ngày thứ 8		0	0	0	0	0	0
MD*4 Ngày thứ 19		0	0	0	0	0	2

- 1* Độ đặc của phân trong ruột được cho điểm trong ruột chảy, ruột hôi, ruột tịt, ruột kết, và ruột thẳng, như sau: 0, bình thường; nhão; 2, xuất hiện dịch lỏng nhưng hạt rắn nhiều hơn dịch lỏng; 3, xuất hiện dịch lỏng nhiều hơn hạt rắn lỏng hoàn toàn.
- 2* Mức độ tích tụ của dịch lỏng trong ruột (số đoạn ruột có điểm số = 2 hoặc cao hơn)
- 3* Mức độ tiêu chảy (Điểm số độ đặc của phân trong ruột lũy tích đối với các đoạn ruột)
- 4* Trung bình điểm số độ đặc của phân trong ruột
- NID: Không thực hiện

Ví dụ 3

Theo khía cạnh rộng, mục đích của nghiên cứu này là đánh giá hiệu quả của chế phẩm hỗn hợp, bao gồm các chủng F4 và *E.coli* F18 không gây bệnh được mô tả ở đây.

Bảng 4 sau đây tóm tắt tổng thể lịch trình nghiên cứu:

Ngày	Sự kiện
0	Đưa lợn đến phòng thí nghiệm và phân thành 2 nhóm
0 đến 5	Giai đoạn làm thích nghi môi trường
1, 12, 14, 16, 18 và 19	Lấy mẫu phân làm PCR
4, 12, 17 và 19	Lấy mẫu máu
5	Sử dụng liều lượng hoặc thuốc vờ theo đường miệng
12, 13 và 14	Cho thử thách
12, 14, 16, 18 và 19	Lấy mẫu phân để đếm cá thể sống của chủng được thử thách
19	Mổ xác khám nghiệm cuối cùng và kết thúc thử nghiệm

I – Mô hình nghiên cứu

a) Động vật

Lấy mẫu máu của 50 con lợn được nuôi dưỡng để phân tích phát hiện thụ thể F18 và các lợn này được đánh dấu vào tai. Lợn cai sữa được chọn (đực và cái), độ tuổi nằm trong khoảng từ 17 đến 21 ngày, do trang trại thương mại nằm trong vùng Monterege, Quebec, Canada cung cấp. Vận chuyển lợn đến các khu nghiên cứu cách ly. Trang trại chúng nhận gần đây (trong vòng 6 tháng gần đây), không có hội chứng hô hấp và sinh sản lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome -PRRS) và các giai đoạn bệnh sau khi cai sữa. Lợn là lợn khỏe mạnh và có trọng lượng nằm trong khoảng từ 4 đến 6kg.

Sử dụng tổng số 20 con lợn, được chia ngẫu nhiên sử dụng số đánh dấu trên tai. Sử dụng phần mềm ngẫu nhiên để phân bố ngẫu nhiên 20 con lợn thành 2 nhóm, mỗi nhóm 10 con (nhóm đối chứng và nhóm sử dụng chế phẩm). Vào ngày thứ 1 sau khi cai sữa, lấy mẫu phân để xác định việc xuất hiện tạo khuẩn lạc của chủng dương tính F4-ETEC gây bệnh và các chủng dương tính F18-ETEC/STEC có nguồn gốc từ trang trại sử dụng phân tích PCR. Các gen được đánh dấu là STa, STb, LT, F4, Stx2 và F18. Không phát hiện con lợn nào dương tính đối với vi khuẩn F4-ETEC hoặc F18-ETEC/STEC vào ngày thứ 1 sau khi cai sữa.

b) Điều kiện chuồng trại và thức ăn

Giữ các nhóm được điều trị và các nhóm đối chứng trong các phòng khác nhau. Cho lợn tiếp cận tự do với nước và thức ăn trong quá trình nghiên cứu. Chế độ ăn của lợn bao gồm bột đậu nành chất lượng cao như được mô tả trong Patent Mỹ số 6,355,859. Không cung cấp đồng thời thuốc hoặc tiêm chủng trong quá trình nghiên cứu.

c) Chuẩn bị và sử dụng chủng

Chế phẩm hỗn hợp đã hoàn ẩm được pha loãng để thu được ít nhất 5×10^8 CFU/chủng trong liều lượng 6mL. Thuốc vờ bao gồm 6ml nước tinh khiết. Chế phẩm hỗn hợp và thuốc vờ được đưa vào theo đường miệng bằng cách sử dụng ống tiêm có ống bằng cao su.

d) Chuẩn bị và sử dụng chủng thử thách (F18-STEC EcL14724)

Chủng thử thách này được lưu mẫu tại Cơ quan có thẩm quyền lưu giữ mẫu quốc tế của Canada (IDAC) vào ngày 9/07/2013 và có số truy cập chỉ định là 090713-01.

Chuẩn bị mẹ nuôi cấy để thu được liều lây nhiễm là 1×10^{11} CFU/1 con lợn. Sau khi đưa 10mL canxi cacbonat 1,2% (CaCO_3), 5ml chủng thử thách vào theo đường miệng cho tất cả các lợn bằng cách sử dụng ống thực quản. Chủng thử thách được đưa vào 3 ngày liên tiếp, tức là ngày 12, 13 và 14 sau khi cai sữa ở nồng độ 1×10^{11} CFU/liều hàng ngày.

e) Quan sát và đánh giá

Quan sát sức khỏe chung của lợn hai lần hàng ngày: hoạt động, sự thèm ăn, tình trạng sinh lý chung, vận động và lông. Quan sát sự mất nước và nhiệt độ cơ thể một lần

một ngày. Sự bài tiết của chủng thử thách được đánh giá bởi PCR và đếm vi khuẩn sống (CFU). Phân tích các mẫu máu sử dụng các thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (Enzyme-Linked Immunosorbent assays-ELISA). Kết quả được tính là phần trăm dương tính (percentage of positivity-PP%) so với mẫu đối chứng dương tính.

II – Mô xác khám nghiệm

Sự tạo khuẩn lạc bởi chủng thử thách ở ruột hồi và ruột tịt được xác định như sau. Lấy mẫu đoạn dài 2cm của ruột hồi tại đoạn dài 10cm đầu gần chỗ nối ruột hồi manh tràng cũng như phần của ruột tịt. Thực hiện đếm vi khuẩn sống bằng cách sử dụng TSA II - 5% huyết thanh cừu, trong đó chỉ đếm các khuẩn lạc tan huyết có hình thái *E.coli* điển hình sau 12 đến 18 giờ nuôi cấy ở 37°C.

III – Kết quả

a) Thông tin chung

Từ 50 con lợn được thử nghiệm, 30 con dễ bám dính chủng F18 và 20 con được chọn ngẫu nhiên để thử nghiệm. Nói chung, lợn có sức khỏe tốt trước khi thử thách.

Bảng 5 sau đây thể hiện kết quả PCR của chủng thử thách đã bài tiết từ phân của các con lợn được điều trị và con lợn đối chứng:

	Lợn (%) bài tiết chủng thử thách vào ngày sau ngày thử thách cuối cùng (ngày sau cai sữa)			
	0 (14)	2 (16)	4 (18)	5 (19)
Thuốc vờ	100%	100%	67%	56%
Chế phẩm hỗn hợp	100%	60%	0%	0%

Như được chứng minh trong Bảng 5, việc sử dụng chế phẩm hỗn hợp làm giảm sự bài tiết của chủng thử thách so với các con lợn sử dụng thuốc vờ. Hơn một nửa lợn sử dụng thuốc vờ (56%) vẫn bài tiết chủng thử thách trong 5 ngày sau ngày thử thách cuối cùng (cuối thử nghiệm) trong khi không phát hiện chủng thử thách ở các con lợn được điều trị bằng chế phẩm hỗn hợp sớm hơn 4 ngày so với ngày thử thách cuối cùng.

Fig.2 thể hiện đếm vi khuẩn sống (CFU)/g chủng thử thách đã thải ra từ phân của lợn được điều trị và lợn đối chứng. Nhìn thấy đỉnh nồng độ chủng thử thách đã thải ra

sau khi cai sữa ngày thứ 14 (0 ngày sau thử thách) đối với cả lợn được điều trị và lợn đối chứng. Trong các lợn được điều trị, nồng độ của chủng thử thách trong phân bắt đầu giảm vào ngày thứ 2 sau ngày thử thách lần cuối (ngày thứ 16 sau khi cai sữa), và quan sát thấy tiếp tục giảm so với thuốc vờ vào ngày thứ 4 và 5 sau ngày thử thách cuối. Các kết quả này là theo kết quả PCR. Chính xác hơn, việc sử dụng chế phẩm hỗn hợp làm giảm mức thải ra chủng thử thách bởi khoảng 2 logarit vào ngày thứ 5 sau ngày thử thách cuối (cuối nghiên cứu).

b) Sự tạo khuẩn lạc ở ruột hồi và ruột tịt bởi chủng thử thách

Quan sát thấy các sai khác về sự tạo khuẩn lạc trong ruột giữa lợn được điều trị và lợn sử dụng thuốc vờ đối với cả các đoạn mô trong ruột (ruột hồi và ruột tịt). Fig.3 chứng tỏ rằng việc sử dụng chế phẩm hỗn hợp làm giảm đáng kể sự tạo khuẩn lạc trong ruột bởi chủng thử thách. Chính xác hơn, việc sử dụng chế phẩm hỗn hợp làm giảm sự tạo khuẩn lạc của chủng thử thách trong ruột hồi và ruột tịt khoảng 2 logarit vào ngày thứ 5 sau ngày thử thách cuối (cuối thử nghiệm).

c) Đánh giá phản ứng miễn dịch

Đánh giá sự có mặt của IgM toàn thân kháng F18 tua viên trong các mẫu huyết thanh sử dụng ELISA đặc hiệu. Lợn được điều trị bằng chế phẩm hỗn hợp thể hiện phản ứng miễn dịch đặc hiệu sớm 7 ngày sau khi sử dụng (Fig.4).

Dựa vào việc làm giảm sự tạo khuẩn lạc chủng thử thách, giảm sự bài tiết và kích thích các kháng thể kháng F18 đặc hiệu, nghiên cứu này đề xuất rằng việc sử dụng chế phẩm chứa chủng F18 không gây bệnh theo đường ruột được mô tả ở đây là có khả năng phòng ngừa sự lây nhiễm vi khuẩn đường ruột *E.coli* F18.

Ví dụ 4

Theo khía cạnh rộng, mục đích của nghiên cứu này là đánh giá hiệu quả của chủng *E.coli* F18 không gây bệnh được mô tả ở đây.

I – Mô hình nghiên cứu

a) Động vật

Trước khi đưa động vật vào khu thử nghiệm, 10 con lợn được nuôi dưỡng cỡ 10 lứa đẻ, trong tổng số khoảng 100 con lợn, được lấy mẫu ở trạm nuôi lợn nái để phân lập ADN và sàng lọc đối với tình trạng thụ thể F18 (RF18+) bởi phương pháp RFLP-PCR. 30 con lợn RF18+ được phân bố ngẫu nhiên giữa các nhóm bằng khối chặn theo lứa đẻ (theo tỷ lệ 1:1), với sự tạo thành cỡ chặn $n = 6$. Các con lợn được chỉ định vào một trong các nhóm sau: T1 được cho sử dụng chủng thử nghiệm F18 không gây bệnh ($n=15$); và T2 được cho sử dụng thuốc vờ ($n=15$).

Các con lợn thuộc nhóm được điều trị (T1) được đưa vào chỗ quây trong phòng thử nghiệm và các con lợn trong nhóm sử dụng thuốc vờ (T2) được đưa vào chỗ quây trong phòng thử nghiệm khác cho đến giai đoạn thử thách. Vào ngày thử thách, tức là 11 ngày sau khi sử dụng chủng *E.coli* F18 không gây bệnh hoặc thuốc vờ, trước khi thử thách, lợn thuộc nhóm T1 ($n = 15$) và T2 ($n = 15$) được chuyển vào hai khu quây riêng nằm trong phòng thử thách. Tất cả 15 con lợn trong nhóm điều trị đặc biệt được đưa vào khu quây tương ứng. Trong toàn bộ nghiên cứu, các con lợn được cho tiếp cận tự do với nước, ngoại trừ trong thời gian thu nước lại trước khi tiêm chủng. Cho lợn ăn bột đậu nành chất lượng cao hai lần một ngày (Patent Mỹ số U.S. 6,355,859).

Vào ngày thứ 1 sau khi cai sữa, lấy mẫu phân để xác định sự tồn tại của khuẩn lạc với chủng dương tính F4-ETEC gây bệnh và các chủng dương tính F18-ETEC/STEC bắt nguồn từ trang trại sử dụng phân tích PCR. Các gen đích là STa, STb, LT, F4, Stx2 và F18. Không phát hiện con lợn nào dương tính đối với vi khuẩn F4-ETEC hoặc F18-ETEC/STEC vào ngày thứ 1 sau khi cai sữa. 3 con lợn thuộc nhóm T1 được rút khỏi nghiên cứu vì các lý do sức khỏe của lợn. Các hiện tượng bất lợi được cho là không liên quan đến việc sử dụng chủng *E.coli* F18 không gây bệnh.

Bảng 6 sau đây tóm tắt chung về lợn được sử dụng:

Loài	Lợn nuôi trong nhà (Pen Ar Lan Naima). Giống lợn này là giống lai có bán tại Mỹ, Châu Âu và Châu Á
Số lượng và giới tính	30 con; 30% con đực bị thiến và 70 con cái
Nhà cung cấp	Trang trại thương mại, Montérégie, Québec, Canada

Tuổi khi thử nghiệm	Điều khoản thử nghiệm nhằm cung cấp chủng thử nghiệm cho lợn có độ tuổi khoảng 17 ngày
Trọng lượng khi bắt đầu nghiên cứu	3,120-7,295kg
Làm quen với môi trường	1 ngày
Thuốc	không sử dụng đồng thời thuốc hoặc tiêm chủng trong 3 ngày trước khi nghiên cứu và trong quá trình nghiên cứu đối với bất kỳ con lợn làm nghiên cứu nào

Bảng 7 sau đây tóm tắt chung về mô hình nghiên cứu:

Ngày hoạt động	T1	T2
Ngày 2	Đưa lợn vào RF18+ vào khu chuồng biệt lập và phân ngẫu nhiên lợn, kiểm soát sức khỏe chung và trọng lượng	
Ngày 0 (khoảng 17 ngày tuổi)	Cung cấp F18 không gây bệnh	Thuốc vờ
Ngày 1-11	Kiểm soát sức khỏe hàng ngày	
Ngày 11, 12, 13	Thử thách bằng F8-STEC	
Ngày 11 đến 18	Quan sát về sức khỏe	
Ngày 18	Mổ xác khám nghiệm và vi sinh	

II – Quy trình và kiểm tra

Lợn thuộc nhóm T1 và nhóm T2 có thể không được đưa vào do bản chất của sản phẩm thử nghiệm (tức là, vacxin sống) yêu cầu lợn được điều trị cần được nhốt riêng với nhóm đối chứng điều trị bằng thuốc vờ. Dung dịch chủng *E.coli* F18 không gây bệnh và thuốc vờ được chuẩn bị bởi người không liên quan đến giai đoạn phát triển của lợn. Mã "A" và "B" được ký hiệu ngẫu nhiên cho dung dịch chủng *E.coli* F18 không gây bệnh và thuốc vờ. Các phòng được chỉ định điều trị ngẫu nhiên và ký hiệu là phòng 1 và 2. Mỗi phòng chứa tất cả lợn thuộc nhóm T1 hoặc tất cả lợn thuộc nhóm T2 được

đưa vào trong một khu quây. Người liên quan đến các giai đoạn phát triển của lợn và làm phân tích thí nghiệm không được biết về việc điều trị và vị trí phòng. Đối với giai đoạn mổ xác khám nghiệm, trình tự lợn cho mổ xác khám nghiệm được chỉ định ngẫu nhiên và lợn được ký hiệu lại là từ A đến AD. Người thực hiện mổ xác khám nghiệm không biết về ký hiệu lợn và cách điều trị. Mã số ngẫu nhiên được giữ trong phong bì dán kín bởi người thống kê sinh học chịu trách nhiệm.

a) Chuẩn bị và sử dụng chủng *E.coli* F18 không gây bệnh

Chủng *E.coli* F18 không gây bệnh được nuôi cấy trong thùng gây men, sau đó lạnh đông vi khuẩn và bảo quản ở -78°C trong các lọ thủy tinh dung tích 10mL chứa 200 liều lượng thấp. Vi khuẩn lạnh đông được pha loãng với nước ở nhiệt độ trong phòng trước khi sử dụng.

Liều được sử dụng một lần một ngày sau khi cai sữa (Ngày 0) ở mức khoảng 3×10^8 CFU trong 2-mL liều. Sử dụng liều lượng theo đường miệng bằng cách sử dụng ống tiêm nối với ống cao su. Các lợn đối chứng được nhận cùng lượng dung dịch thuốc vờ (nước).

b) Chủng thử thách (chủng F18-STEC EcL 14724)

Chủng thử thách được sử dụng trong thử nghiệm này được phân lập lại từ lợn (#381) trước khi được thử thách bằng chủng EcL 14724 (dương tính đối với Stx2, F18ab, AIDA và Paa). Chủng thử thách được cho sử dụng qua đường miệng một lần trong 3 ngày liên tiếp 11, 12 và 13 của nghiên cứu ở mức liều lượng khoảng 1×10^{10} CFU/lợn. Mỗi liều lượng thử thách được đưa vào bằng cách sử dụng viên nang gelatin thay thế cho việc sử dụng ống thông thực quản. Carbadox (kháng sinh kích thích giải phóng shigatoxin) được cho sử dụng theo đường miệng trong viên nang gelatin ngay sau khi sử dụng chủng thử thách để kích thích giải phóng Shigatoxin.

c) Đánh giá sức khỏe chung

Quan sát sức khỏe chung của lợn một lần một ngày trước giai đoạn thử thách. Sau lần thử thách thử nhất, kiểm soát sức khỏe của lợn hai lần hàng ngày, bao gồm tâm trạng, sự mất nước, sự thèm ăn và dấu hiệu lâm sàng bất kỳ liên quan đến bệnh phụ: mất điều hòa, phù mắt hoặc các chi, đột tử.

d) Đánh giá sự chảy tháo của chủng thử thách

Sự chảy tháo phân của chủng thử thách được định tính bằng cách sử dụng phương pháp Most-Probable-Number PCR (MPN-PCR) đích là gen mã hóa đối với protein chính FedA của F18 tua viên.

e) Mô xác khám nghiệm

Thực hiện mô xác khám nghiệm 7 ngày sau khi thử thách lần đầu. Sự tạo khuẩn lạc ở ruột tịt bởi chủng thử thách được định tính bằng cách sử dụng phương pháp Most-Probable-Number PCR đích là gen mã hóa đối với protein chính FedA của F18 tua viên bằng cách sử dụng phần mô dài khoảng 2cm².

III – Kết quả

Phân tích PCR chứng tỏ hiệu quả của việc sử dụng Chủng F18 không gây bệnh để phòng ngừa sự bài tiết chủng gây bệnh tạo độc tố shigatoxin F18 thách thức. Quan sát thấy sự chảy tháo phân giảm khoảng 2,5 logarit ở lợn được điều trị so với lợn sử dụng thuốc vờ 4 ngày sau thử thách lần cuối (Bảng 8). 4 ngày sau khi thử thách lần cuối, 93% lợn sử dụng thuốc vờ chảy tháo nhiều hơn 1×10^5 CFU chủng thử thách/g mẫu phân trong khi chỉ 42% lợn được điều trị có hiện tượng này (Bảng 9).

Bảng 8 sau đây thể hiện sự chảy tháo chủng thử thách 4 ngày sau thử nghiệm lần cuối:

	Trung bình lượng chảy tháo (CFU của chủng thử thách/g mẫu phân)
Lợn sử dụng thuốc vờ	$7,8 \times 10^6$
Lợn được điều trị	$5,2 \times 10^4$

Bảng 9 sau đây thể hiện tỷ lệ lợn chảy tháo chủng thử thách ở lượng vi khuẩn khác nhau 4 ngày sau khi thử thách lần cuối:

	CFU của chủng thử thách/g mẫu phân
--	------------------------------------

	$<1 \times 10^4$	10^4	10^5	$>1 \times 10^6$
Lợn sử dụng thuốc vờ	0%	7%	33%	60%
Lợn được điều trị	25%	33%	17%	25%

Quan sát thấy giảm khoảng 1 logarit chủng thử thách được phát hiện trong ruột tịt đối với các lợn được điều trị (cho sử dụng chủng *E.coli* F18 không gây bệnh) so với lợn sử dụng thuốc vờ 5 ngày sau thử thách lần cuối (Bảng 10). 5 ngày sau thử thách lần cuối, hơn 53% lợn sử dụng thuốc vờ chảy tháo nhiều hơn 1×10^5 CFU chủng thử thách/g phân ở mô ruột tịt trong khi chỉ 8% động vật điều trị đạt được kết quả này (Bảng 11). Hơn 80% lợn sử dụng thuốc vờ có tạo khuẩn lạc trong ruột tịt bởi nhiều hơn 1×10^4 CFU chủng thử thách/g ruột tịt so với 50% lợn được điều trị 5 ngày sau thử thách lần cuối (Bảng 11).

Bảng 10 sau thể hiện sự tạo khuẩn lạc ở ruột tịt bởi chủng thử thách 5 ngày sau thử thách lần cuối:

	Trung bình tạo khuẩn lạc trong phân (CFU chủng thử thách/g mô phân)
Lợn sử dụng thuốc vờ	$3,4 \times 10^5$
Lợn được điều trị	$1,5 \times 10^4$

Bảng 11 sau đây thể hiện tỷ lệ lợn có tạo khuẩn lạc trong ruột tịt bởi chủng thử thách ở lượng vi khuẩn khác nhau 5 ngày sau khi thử thách lần cuối:

	CFU của chủng thử thách/g mẫu phân				
	$<1 \times 10^2$	10^2	10^3	10^4	$>1 \times 10^5$
Lợn sử dụng thuốc vờ	7%	7%	7%	27%	53%
Lợn được điều trị	8%	17%	25%	42%	8%

Dựa vào việc làm giảm tạo khuẩn lạc chủng thử thách và giảm bài tiết, nghiên cứu này đề xuất rằng sự sử dụng theo đường ruột chế phẩm chứa chủng *E.coli* F18 không gây bệnh có khả năng phòng ngừa sự lây nhiễm vi khuẩn đường ruột gây bệnh phù *E.coli* F18.

Các điều sau đây mô tả chi tiết hơn các ví dụ về các phương án không hạn chế theo sáng chế:

Các điều:

Điều 1: Chủng *E.coli* phân lập được nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ mẫu quốc tế của Canada (IDAC) vào ngày 20/06/2013 và có số truy cập chỉ định là 200613-01.

Điều 2: Chủng *E.coli* phân lập theo điều 1, trong đó chủng này ở dạng đông khô.

Điều 3: Chủng *E.coli* phân lập theo điều 1, trong đó chủng này ở dạng đông lạnh.

Điều 4: Chủng *E.coli* phân lập theo điều 1, trong đó chủng này ở dạng kết hợp với chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi.

Điều 5: Chế phẩm chứa chủng *E.coli* phân lập theo điều bất kỳ trong số các điều từ 1 đến 3 và chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi.

Điều 6: Chế phẩm theo điều 5, còn bao gồm *E.coli* phân lập sống không gây bệnh, biểu hiện F4 tua viên.

Điều 7: Chế phẩm theo điều 6, trong đó *E.coli* không gây bệnh này mà biểu hiện F4 tua viên là chủng được nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ mẫu quốc tế Canada (IDAC) vào ngày 21/01/2005 và có số truy cập chỉ định là IDAC 210105-01.

Điều 8: Phương pháp phòng ngừa sự lây nhiễm qua đường ruột *E.coli* gây bệnh ở động vật, bao gồm việc cho động vật sử dụng một lượng hữu hiệu chủng *E.coli* sống được nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ mẫu quốc tế của Canada (IDAC) vào ngày 20/06/2013 và có số truy cập chỉ định là 200613-01 theo đường ruột.

Điều 9: Phương pháp theo điều 8, trong đó việc sử dụng theo đường ruột đạt được bằng cách đưa chủng *E.coli* sống vào qua đường miệng.

Điều 10: Phương pháp theo điều 8 hoặc 9, trong đó chủng *E.coli* sống này ở dạng đông khô.

Điều 11: Phương pháp theo điều 8 hoặc 9, trong đó chủng *E.coli* sống này có dạng lạnh đông.

Điều 12: Phương pháp theo điều 8 hoặc 9, trong đó chủng *E.coli* sống này ở dạng kết hợp với chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi.

Điều 13: Phương pháp theo điều bất kỳ trong số các điều từ 8 đến 12, trong đó lượng có tác dụng ít nhất là 5×10^7 CFU.

Điều 14: Phương pháp theo điều bất kỳ trong số các điều từ 8 đến 12, trong đó động vật là lợn.

Điều 15: Phương pháp phòng ngừa bệnh phù hoặc tiêu chảy do lây nhiễm *E.coli* gây bệnh F18 ở động vật, bao gồm việc cho động vật sử dụng chủng *E.coli* sống được nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ mẫu quốc tế của Canada (IDAC) vào ngày 20/06/2013 và có số truy cập chỉ định là 200613-01 theo đường ruột.

Điều 16: Phương pháp theo điều 15, trong đó việc sử dụng theo đường ruột đạt được bằng cách đưa chủng *E.coli* sống vào theo đường miệng.

Điều 17: Phương pháp theo điều 15 hoặc 16, trong đó chủng *E.coli* sống này có dạng đông khô.

Điều 18: Phương pháp theo điều 15 hoặc 16, trong đó chủng *E.coli* sống này có dạng lạnh đông.

Điều 19: Phương pháp theo điều 15 hoặc 16, trong đó chủng *E.coli* sống này ở dạng kết hợp với chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi.

Điều 20: Phương pháp theo điều bất kỳ trong số các điều từ 15 to 19, trong đó lượng có tác dụng ít nhất là 5×10^7 CFU.

Điều 21: Phương pháp theo điều bất kỳ trong số các điều từ 15 đến 20, trong đó động vật này là lợn.

Điều 22: Sử dụng một lượng hữu hiệu lượng có tác dụng chủng *E.coli* sống được nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ mẫu quốc tế của Canada (IDAC) vào ngày 20/06/2013 và có số truy cập chỉ định là 200613-01 để phòng ngừa sự lây nhiễm đường ruột *E.coli* gây bệnh ở động vật, chủng này phù hợp để phân phối qua đường ruột ở động vật.

Điều 23: Sử dụng một lượng hữu hiệu chủng *E.coli* sống được nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ mẫu quốc tế của Canada (IDAC) vào ngày 20/06/2013 và có số truy cập chỉ định là 200613-01 để bào chế chế phẩm sử dụng để phòng ngừa sự lây nhiễm đường ruột *E.coli* gây bệnh ở động vật, chế phẩm thích hợp để phân phối qua đường ruột ở động vật.

Điều 24: Sử dụng một lượng hữu hiệu chủng *E.coli* sống được nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ mẫu quốc tế của Canada (IDAC) vào ngày 20/06/2013 và có số truy cập chỉ định là 200613-01 để phòng ngừa bệnh phù hoặc bệnh tiêu chảy do sự lây nhiễm *E.coli* gây bệnh F18 ở động vật, chủng này thích hợp để sử dụng theo đường ruột ở động vật.

Điều 25: Sử dụng một lượng hữu hiệu chủng *E.coli* sống được nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ mẫu quốc tế của Canada (IDAC) vào ngày 20/06/2013 và có số truy cập chỉ định là 200613-01 để bào chế chế phẩm để sử dụng phòng ngừa bệnh phù hoặc bệnh tiêu chảy do lây nhiễm *E.coli* gây bệnh F18 ở động vật, chế phẩm này thích hợp để sử dụng theo đường ruột ở động vật.

Điều 26: Sử dụng theo điều bất kỳ trong số các điều 22 to 25, trong đó chủng *E.coli* sống này thích hợp để sử dụng theo đường miệng.

Điều 27: Sử dụng theo điều bất kỳ trong số các điều từ 22 đến 26, trong đó chủng *E.coli* sống này có dạng đông khô.

Điều 28: Sử dụng theo điều bất kỳ trong số các điều từ 22 đến 26, trong đó chủng *E.coli* sống này có dạng lạnh đông.

Điều 29: Sử dụng theo điều bất kỳ trong số các điều từ 22 đến 26, trong đó chủng *E.coli* sống này ở dạng kết hợp với chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi.

Điều 30: Sử dụng theo điều bất kỳ trong số các điều từ 22 đến 29, trong đó lượng có tác dụng này ít nhất khoảng 5×10^7 CFU.

Điều 31: Sử dụng theo điều bất kỳ trong số các điều từ 22 đến 30, trong đó động vật là lợn.

Điều 32: Chủng *E.coli* phân lập theo điều bất kỳ trong số các điều từ 1 đến 4, để sử dụng phòng ngừa sự lây nhiễm đường ruột *E.coli* gây bệnh ở động vật, chủng này thích hợp để sử dụng theo đường ruột ở động vật.

Điều 33: Chúng *E.coli* phân lập theo điều bất kỳ trong số các điều từ 1 đến 4, để sử dụng bào chế chế phẩm để sử dụng phòng ngừa sự lây nhiễm đường ruột *E.coli* gây bệnh ở động vật, chế phẩm này thích hợp để sử dụng theo đường ruột ở động vật.

Điều 34: Chúng *E.coli* phân lập theo điều bất kỳ trong số các điều từ 1 đến 4, để sử dụng phòng ngừa bệnh phù hoặc tiêu chảy do sự lây nhiễm *E.coli* gây bệnh F18 ở động vật, chủng này thích hợp để sử dụng theo đường ruột ở động vật.

Điều 35: Chúng *E.coli* phân lập theo điều bất kỳ trong số các điều từ 1 đến 4, để sử dụng bào chế chế phẩm để sử dụng phòng ngừa bệnh phù hoặc tiêu chảy do lây nhiễm *E.coli* gây bệnh F18 ở động vật, chế phẩm này thích hợp để sử dụng theo đường ruột ở động vật.

Lưu ý rằng các tiêu đề chính và tiêu đề phụ có trong toàn bộ bản mô tả sáng chế là để thuận tiện cho người đọc, không có nghĩa làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Hơn nữa, một số lý thuyết được đề xuất và mô tả ở đây; tuy nhiên cho dù chúng là đúng hay sai nhưng chúng sẽ không làm giới hạn phạm vi của sáng chế miễn là sáng chế được thực hiện theo mô tả sáng chế mà không cần xem xét đến bất kỳ lý thuyết hoặc sơ đồ phản ứng cụ thể nào.

Người có kỹ thuật trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng trong toàn bộ bản mô tả sáng chế, từ được sử dụng ở số ít sẽ bao hàm các phương án gồm một hoặc nhiều. Người có kỹ thuật trung bình trong lĩnh vực cũng sẽ hiểu rằng trong toàn bộ bản mô tả, thuật ngữ "bao gồm", đồng nghĩa với "gồm", "chứa" hoặc "đặc trưng bởi" là kể cả hoặc không hạn chế và không loại trừ các yếu tố và các bước phương pháp được bổ sung, chưa liệt kê.

Trừ khi được xác định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học ở đây có nghĩa giống nhau như thường được hiểu bởi người có kỹ thuật trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế đề cập đến. Trong trường hợp có mâu thuẫn, tài liệu sáng chế bao gồm các định nghĩa sẽ quyết định.

Trong khi các nghiên cứu được mô tả ở đây sử dụng lợn cai sữa, người có kỹ thuật trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu ngay rằng lợn được điều trị có thể thay thế bằng lợn chưa cai sữa.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "xung quanh", "khoảng" hoặc "xấp xỉ" thường có nghĩa trong khoảng 20%, ưu tiên trong khoảng 10%, và ưu tiên hơn nữa là trong khoảng 5% giá trị hoặc phạm vi đã cho. Lượng số học đưa ra ở đây thường là gần đúng; có nghĩa là thuật ngữ "xung quanh", "khoảng" hoặc "xấp xỉ" có thể được phỏng đoán nếu không được nêu rõ ràng.

Tất cả các tài liệu tham khảo nêu trong toàn bộ bản mô tả này được đề kết hợp ở đây là để tham khảo.

Phạm vi của yêu cầu bảo hộ sẽ không bị giới hạn bởi các phương án nêu trong các ví dụ, tuy nhiên cần được hiểu theo nghĩa rộng nhất phù hợp với toàn bộ phần mô tả.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng *E.coli* phân lập đã nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ mẫu quốc tế của Canada (IDAC) vào ngày 20/06/2013 và có số truy cập được chỉ định là 200613-01.
2. Chủng *E.coli* phân lập theo điểm 1, trong đó chủng này ở dạng đông khô.
3. Chủng *E.coli* phân lập theo điểm 1, trong đó chủng này ở dạng đông lạnh.
4. Chủng *E.coli* phân lập theo điểm 1, trong đó chủng này được kết hợp với chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi.
5. Chế phẩm chứa chủng *E.coli* phân lập đã được nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ mẫu quốc tế của Canada (IDAC) vào ngày 20/06/2013 và có số truy cập được chỉ định là 200613-01 và chất mang được chấp nhận trong thức ăn cho vật nuôi.
6. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó chế phẩm này còn chứa *E.coli* sống không gây bệnh được phân lập biểu hiện F4 tua viên.
7. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó *E.coli* không gây bệnh biểu hiện F4 tua viên là chủng đã nộp lưu tại Cơ quan lưu giữ mẫu quốc tế của Canada (IDAC) vào ngày 21/01/2005 và có số truy cập được chỉ định là IDAC 210105-01.

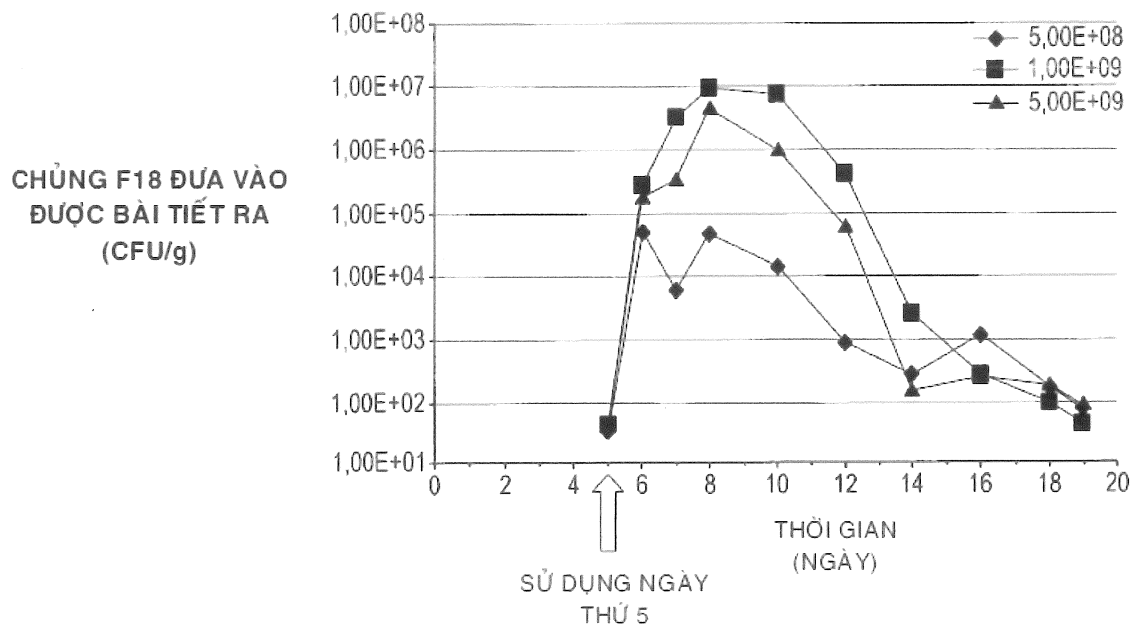


FIG. 1

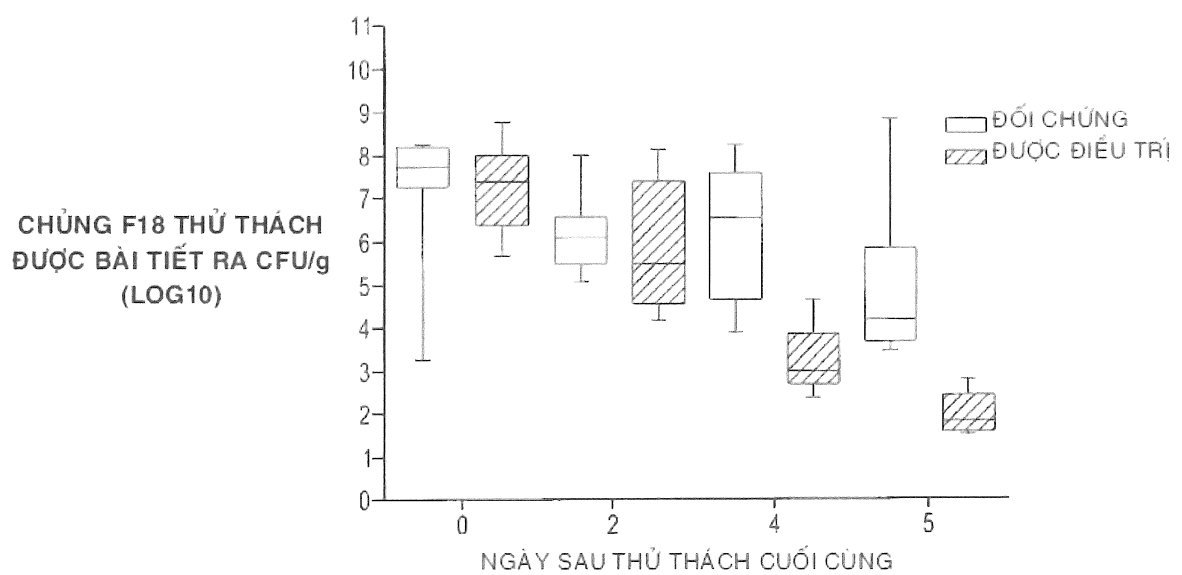


FIG. 2

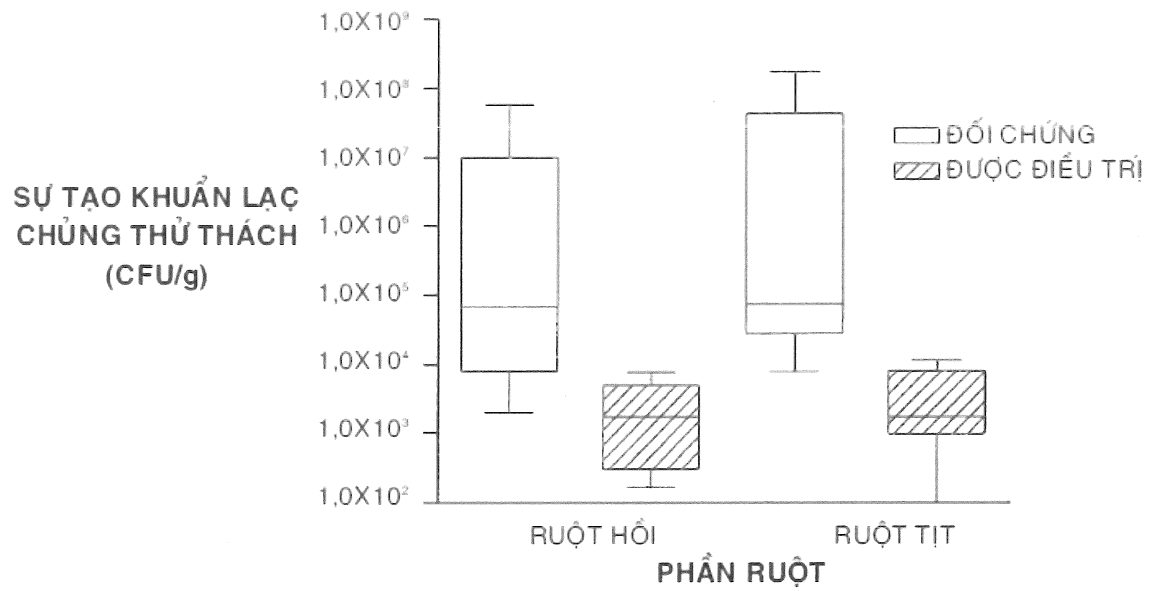


FIG. 3

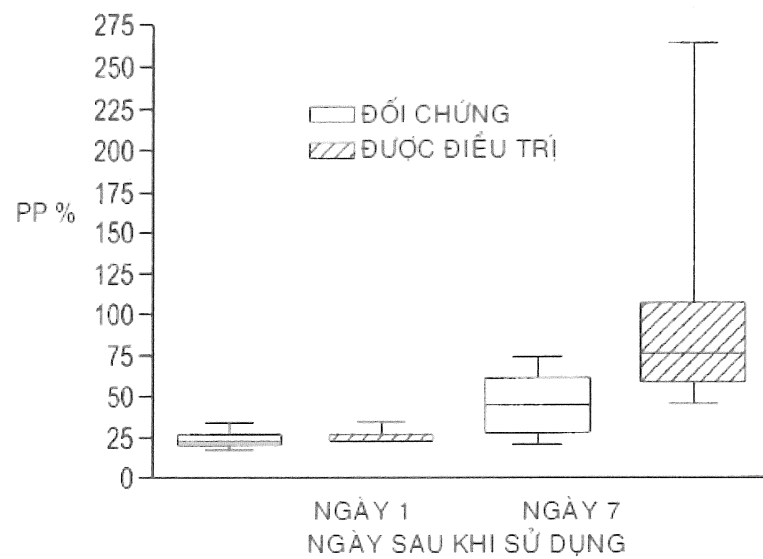


FIG. 4