



(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)



1-0031758

(51)⁸ A61P 17/00; A61K 35/747; A61K 35/74; (13) B
A61K 35/745

(21) 1-2019-00758

(22) 18/07/2017

(86) PCT/EP2017/068131 18/07/2017

(87) WO/2018/015388 25/01/2018

(30) 16382342.0 18/07/2016 EP

(45) 25/05/2022 410

(43) 27/05/2019 374A

(73) 1. BIONOU RESEARCH, S.L. (ES)

Avda. Capiscol, N° 3, 03530 Sant Joan d'Alacant (Alicante), Spain

2. KOROTT, S.L. (ES)

Calle Fila Benimerines número 61, Polígono I, Santiago Paya, 03801 Alcoy (Alicante), Spain

3. BIOPOLIS, S.L. (ES)

Calle Catedrático Agustín Escardino Benlloch, número 9, Edificio 2, Parc Científic de la Universitat de València, 46980 Paterna (Valencia), Spain

(72) NAVARRO LÓPEZ, Vicente Manuel (ES); RAMÍREZ BOSCA, Ana Adela (ES); PÉREZ ORQUÍN, José Manuel (ES); RAMÓN VIDAL, Daniel (ES); GENOVÉS MARTÍNEZ, Salvador (ES); CHENOLL CUADROS, María Empar (ES); CODONER CORTÉS, Francisco Manuel (ES).

(74) Công ty TNHH Sở hữu công nghiệp Sao Bắc Đẩu (SAO BAC DAU IP CO.,LTD)

(54) CHẾ PHẨM PROBIOTIC HỮU ÍCH TRONG ĐIỀU TRỊ VÀ/HOẶC NGĂN NGỪA VIÊM DA DỊ ỨNG

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm probiotic bao gồm *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis* (*B. lactis*), *Bifidobacterium longum* và *Lactobacillus casei*, cụ thể là các chủng *B. lactis* CECT 8145, *B. longum* CECT 7347 và/hoặc *L. casei* CECT 9104, hữu dụng trong điều trị và/hoặc ngăn ngừa viêm da dị ứng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm probiotic hữu dụng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa viêm da dị ứng. Do đó, sáng chế có thể được xem xét là bao hàm trong lĩnh vực y học, cụ thể là trong điều trị các bệnh về da.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Viêm da dị ứng (AD) là bệnh viêm da, ngứa thuộc tiến trình mạn tính, đặc trưng bởi các tổn thương eczema với mẫu đặc trưng phân bố mà ảnh hưởng đến các bệnh nhân có siêu phản ứng của da đối với các yếu tố môi trường khác nhau mà có hại với các bệnh nhân không dị ứng. Các bệnh nhân dị ứng thường có tiền sử cá nhân hoặc gia đình về bệnh hen hoặc viêm mũi dị ứng hoặc AD, và tăng mức huyết thanh IgE. Viêm da dị ứng hầu như thường ảnh hưởng đến trẻ em, nhưng có thể tiếp tục và /hoặc tấn công có thể xảy ra ở tuổi thanh niên hoặc tuổi trưởng thành.

Sự phổ biến của viêm da dị ứng AD là nằm trong khoảng từ 4 đến 20% dân số. Có sự khác biệt lớn giữa môi trường thành thị và nông thôn, nên sự tác động càng cao ở thành thị. Sự tác động của viêm da dị ứng AD có thể tăng lên với các lý do sau đây: phong cách sống theo phương Tây, tăng độ tuổi tử vong, dân số, thói quen hút thuốc và giảm thời gian cho con bú. Bốn mươi năm phần trăm (45%) trẻ em phát triển viêm da dị ứng AD ở sáu tháng đầu tiên cuộc đời và 85% ở năm năm đầu tiên. Khi bệnh bắt đầu ở trẻ em dưới hai năm tuổi, 20% tiếp tục các triệu chứng ở tuổi thứ bảy.

Trong khi viêm da dị ứng biểu lộ lâm sàng là eczema, cả hai ở các trạng thái cấp tính và mạn tính, thì bệnh này có khả năng biến thiên ở: 1) khoảng biểu lộ lâm sàng; 2) cơ sở di truyền của các biểu lộ lâm sàng, và 3) các cơ chế gây bệnh trải qua các biểu lộ lâm sàng.

Một trong các giả thiết phổ biến nhất giải thích nguồn gốc của viêm da dị ứng nghiên cứu rằng đó là một trong số các biểu lộ, mà ảnh hưởng đến da trong trường hợp này, của quá trình theo hệ thống liên quan đến các cơ quan và hệ thống của cơ thể con người, mà gây ra nhiều triệu chứng như bệnh hen, dị ứng do thức ăn và viêm mũi dị ứng, trong số các triệu chứng khác. Thực tế là, phần lớn các bệnh nhân mắc các bệnh

này có mức cao IgE và bạch cầu ưa eosin trong máu ngoại vi mặc dù cả hệ quả ban đầu và lâm sàng là không rõ ràng.

Liên quan đến các cơ chế sinh lý bệnh học, việc đáp ứng miễn dịch được tin là đóng vai trò chủ yếu trong nguồn gốc ban đầu trong nguồn gốc của nó. Thực tế là, các dữ liệu gần đây chỉ ra các tế bào hình cây (các tế bào trình diện kháng nguyên) và điều hòa các tín hiệu miễn dịch với viêm qua trung gian bởi các tế bào lympho Th2 trong nguồn gốc của viêm da dị ứng AD. Dữ liệu này chỉ ra rằng nguồn gốc sinh lý bệnh học của viêm da dị ứng AD có thể được tìm thấy trong các cơ chế miễn dịch, liên quan đến cả tế bào hình cây của da trình diện kháng nguyên và điều hòa miễn dịch và tín hiệu gây viêm qua trung gian bởi các tế bào lympho Th2. Những gì không được biết hiện tại là nguồn gốc khởi đầu kích thích tầng miễn dịch xuất hiện trong viêm da dị ứng AD.

Bệnh này có khoảng biểu lộ lâm sàng rộng nằm từ các dạng nhỏ như eczema của tay đến các dạng nghiêm trọng hơn như chứng phát ban đỏ da. Không có sự thay đổi cụ thể nào thuộc loại bệnh lý học hoặc phòng thí nghiệm, do đó việc chẩn đoán viêm da dị ứng AD mang tính lâm sàng và việc chẩn đoán chuẩn tuân theo các tiêu chuẩn Hanifin-Rajka (Hanifin JM, *et al.* Acta Derm Venereol 1980;92:44-7)

Các đặc tính lâm sàng của viêm da dị ứng AD biến đổi theo độ tuổi và bao gồm trong các tiêu chuẩn chẩn đoán; chúng bao gồm ngứa, tổn thương eczema và các tổn thương do cào xước.

Ngứa: một trong các phát hiện quan trọng và thống nhất nhất của dị ứng. Bệnh ngứa do dị ứng có cường độ lớn và thường gây ra các bùng phát. Ngứa làm cho các bệnh nhân tổn thương bằng cào xước. Trong khi nguyên nhân của bệnh ngứa chưa được hiểu rõ thì dường như là do sự giải phóng của các chất trung gian và các xytokin.

Eczema: các tổn thương eczema có thể là cấp tính và mạn tính. Các tổn thương cấp tính đặc trưng bởi các vết ban, nốt sần và ban đỏ, có mụn nước, các vết ban ứa dịch và rất ngứa. Lặp lại cào xước và trầy da dẫn đến các tổn thương mạn tính, mà đặc trưng bởi biểu lộ làm dày da đi kèm với hằn cổ trâu và với sự xuất hiện các vết ban sori khô rõ ràng.

Hằn cổ trâu: các thương tổn da bị hằn cổ trâu đặc trưng được quan sát, bao gồm các vết ban không được xác định tốt với việc làm dày da thể hiện các vết gấp và đường da được đánh dấu

Ngứa sần: Các nốt sần nhỏ có mụn nước kín và sự sây sát thành vết là kết quả của việc cào xước mạnh.

Viêm tróc da: các trường hợp dị ứng sâu có thể xuất hiện về mặt lâm sàng giống như viêm tróc da phổ biến, bao gồm trong việc chẩn đoán khác nhau các chứng đỏ da.

Bên cạnh thiết lập chẩn đoán, mức độ nghiêm trọng phải được đánh giá hoặc định lượng. Do đó, các phương pháp và tiêu chuẩn khác nhau đã được phát triển để đánh giá mức độ nghiêm trọng và kiểm soát đáp ứng điều trị, trong các thử nghiệm lâm sàng và các nghiên cứu quan sát và thậm chí trong thực tiễn lâm sàng khi mục đích là để thể hiện sự tiến triển của bệnh nhận chính xác hơn việc mô tả được cung cấp bởi sự nhận thức chủ quan của bệnh nhân, điều dưỡng viên hoặc bác sỹ. Theo khía cạnh này, phương pháp được sử dụng và hiệu quả nhất là chỉ số được gọi là SCORAD (Viêm da dị ứng tính điểm) được phát triển bởi nhóm Lực lượng đặc nhiệm Châu Âu về Viêm da dị ứng, năm 1993 (European Task Force on Atopic Dermatitis. Severity scoring of Atopic Dermatitis: the SCORAD index. *Dermatology* 1993; 186:23-31). Đã chứng tỏ là phương pháp đánh giá tốt nhất mức độ nghiêm trọng của viêm da dị ứng trong các nghiên cứu so sánh, và cũng là tài liệu phổ biến nhất liên quan đến tính pháp lý, tính lặp lại, tính nhạy cảm cảm và tính chấp nhận. SCORAD là hệ thống tính điểm mà xem xét phạm vi và cường độ của năm loại tổn thương viêm da dị ứng AD cơ bản (ban đỏ, chứng phù/nốt sần, rỉ nước/kết vò, tróc và hằn cổ trâu) và các triệu chứng (ngứa và mất ngủ).

Có một số khác biệt liên quan đến giá trị chỉ số SCORAD mà xác định các mức độ nghiêm trọng khác nhau. Một số nhóm người Tây Ban Nha xem là nhẹ, vừa hoặc nghiêm trọng tương ứng với các điểm chỉ số SCORAD lần lượt là <25, từ 25 đến 40 hoặc >40, trong khi các tác giả khác, dựa các tương quan với các thử nghiệm trong phòng thí nghiệm, lần lượt sử dụng các điểm <20, từ 20 đến 40 hoặc >40 để xác định các triệu chứng nhẹ, vừa và nghiêm trọng.

Có sự liên ứng về việc điều trị AD, nhằm, trong trường hợp thứ nhất, ngăn ngừa ngứa và loại trừ tổn thương do viêm; và, thứ hai là, ngăn ngừa tái phát (Muñoz F. 2002. *JANO*, 1432: 52-7; Boguniewicz M, Schmid-Grendelmeier P, and Leung DYM. 2006. *J Allergy Clin Immunol*, 118: 40-3). Để ngăn ngừa ngứa và cào xước, các chất kháng histamin H1 được kê đơn, mặc dù hiệu quả không được chứng minh rõ ràng. Mục đích chủ yếu của việc điều trị eczema là kiểm soát sự thương tổn do viêm

mà cũng giúp kiểm soát ngứa. Do đó, các corticosteroid dùng khu trú có độ mạnh khác nhau được sử dụng tùy thuộc vào tình trạng của bệnh nhân. Các chất có kết quả tốt hơn rõ ràng là các chất kháng histamin H1 truyền thống mà gây giảm đau (hydroxyzin, clemastin, dexchlorpheniramin) và các chất histamin H1 thế hệ mới (dexfenfluramin, loratadin, xetirizin, và các dẫn xuất), là ít giảm đau nhất nhưng đôi khi thể hiện các kết quả không khác biệt đáng kể về mặt thống kê với giả dược (Boguniewicz M, et al 2006. Được trích dẫn trên đây).

Các tác dụng ngược của các corticosteroid dùng khu trú đưa các hạn chế sử dụng. Các phản ứng ngược tại vị trí dùng là phổ biến nhất. Nếu áp dụng quanh mắt, các phản ứng sau đây thường xuất hiện: teo da, đốm xuất huyết, vết teo, chứng tăng lông tóc, mất sắc tố, chứng giãn mao mạch, viêm nang lông và bệnh tăng nhãn áp. Ít thường xuyên hơn là, các tác dụng ngược hệ thống nghiêm trọng hơn cũng đã được mô tả, như ức chế trục-thượng thận nhầy-dưới đồi, trì hoãn sự sinh trưởng hoặc hội chứng cushing.

Sự thiếu đáp ứng với các corticosteroid của một số bệnh nhân và các tác dụng ngược của chúng đã khởi đầu sự phát triển các dược chất mới để điều trị viêm. Trong số các chất ức chế được nghiên cứu tốt nhất là các chất ức chế calcineurin dùng khu trú (tacrolimus và pimecrolimus) Leung, DYM and Bleder, T. 2003, Lancet, 361: 151-60; Muñoz, F. 2002, JANO, 1432: 52-7). Tuy nhiên, vẫn có các nghi ngờ về sự an toàn của các dược chất này trong các điều trị lâu dài. Thực tế là, bản cáo bạch của các sản phẩm chứa tacrolimus hoặc pimecrolimus để điều trị khu trú của viêm da dị ứng chỉ ra rằng chúng chỉ nên được sử dụng ở trẻ em trên hai tuổi mà việc sử dụng các corticosteroid cho chúng không được khuyến cáo hoặc thất bại trước đây.

Việc sử dụng các chất probiotic để điều trị viêm da dị ứng AD đã được nghiên cứu trong các năm gần đây với số lượng nghiên cứu thử nghiệm được giới hạn và các kết quả khác nhau tùy thuộc vào probiotic được sử dụng và độ tuổi của bệnh nhân trong thử nghiệm (Soo-Pk Kim, et al. 2014. Ann Allergy Asthma Immunol. 113: 217e226; Gerasimov, SV et al. 2010. Am J Clin Dermatol, 11:351e361; Farid, R. et al. 2011. Iran J Pediatr. 21:225e230). Các nghiên cứu gần đây nhất, bao gồm phân tích tổng hợp các công bố trước đây, chứng tỏ tác dụng có lợi của việc sử dụng probiotic trong các trường hợp nhất định liên quan đến độ tuổi, chủng vi khuẩn hoặc tổ hợp các probiotic và liều lượng được sử dụng ((Farid, R. et al 2011 cited ad supra; Van del Aa

LB, et al. 2010. Clin Exp Allergy. 40:795e804; Boyle, RJ et al. 2008. Cochrane Database Syst Rev, 4: CD006135; Lee, J. et al. 2008. J Allergy Clin Immunol. 121:116). Các probiotic là thuật ngữ được nghiên cứu nhiều nhất về điều trị viêm da dị ứng và ngăn ngừa các bùng phát mới của bệnh thuộc về các chi *Bifidobacterium* và *Lactobacillus*, do các chất này dường như đạt được các kết quả tốt hơn (Lee, J. et al. 2008. Được trích dẫn trên đây).

Có nhu cầu y tế đã biết để phát triển các điều trị có chất lượng, mà an toàn và có hiệu quả trong điều trị viêm da dị ứng AD lâu dài, do viêm da dị ứng ảnh hưởng đến tỷ lệ quan trọng của dân số, với các ảnh hưởng đáng lưu ý đến chất lượng cuộc sống của họ, mà có thể bị ảnh hưởng bởi các biến chứng y tế, v.v... Các corticosteroid dùng khu trú được xem là điều trị rất hiệu quả, nhưng bao hàm cả rủi ro cao của các tác dụng ngược. Sự kết hợp của các thay thế mới với các corticosteroid dùng khu trú (như các chất ức chế calcineurin) đáp ứng được nhu cầu này, mặc dù rủi ro của các tác dụng ngược với các dược chất mới này chưa được xác định rõ ràng. Do đó, tình trạng kỹ thuật thể hiện rằng có nhu cầu phát triển các chế phẩm mới mà hữu dụng trong điều trị AD, mà chứng tỏ là hiệu quả và không có các tác dụng phụ thông thường của các dược chất được sử dụng cho đến nay.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế là khắc phục các nhược điểm nêu trên trong tình trạng kỹ thuật của sáng chế. Mục đích này đạt được bởi chế phẩm probiotic theo sáng chế.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến chế phẩm probiotic bao gồm *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis* (*B. lactis*), *Bifidobacterium longum* và *Lactobacillus casei*.

Các khía cạnh khác theo sáng chế được bộc lộ trong phần mô tả chi tiết của sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sơ đồ thể hiện phân tích của các thành phần chính của các hồ sơ vi sinh vật về các mẫu phân lấy từ các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng (ký hiệu hình vuông và màu đen) so với các cá thể khỏe mạnh thuộc về vi khuẩn đường ruột typ 1 (ký hiệu

hình tròn và màu xám đen), vi khuẩn đường ruột typ 2 (ký hiệu hình tam giác và màu xám) và vi khuẩn đường ruột typ 3 (ký hiệu hình thoi và màu xám sáng).

Fig.2 là sơ đồ thể hiện phân tích biến đổi của các mẫu phân của các bệnh nhân mắc viêm da so với quần thể khỏe mạnh ở mỗi typ vi khuẩn đường ruột. Hình vẽ này thể hiện các ý nghĩa thống kê sau khi áp dụng thử nghiệm Wilcoxon.

Fig.3 là sơ đồ thể hiện phân tích các thành phần chính của các bệnh nhân mắc viêm da hoặc được phân loại là thuộc về vi khuẩn đường ruột typ 1 (ký hiệu hình vuông và màu đen) so với các mẫu từ quần thể khỏe mạnh của vi khuẩn đường ruột typ 1 (ký hiệu hình tròn và màu xám). Các loại được thể hiện nhiều nhất trong các mẫu được đặt ở phần bên phải phía trên của hình vẽ được thể hiện bằng màu đen và các mẫu mà được thể hiện ở phía dưới trong tình huống này được thể hiện bằng màu xám. Đối với các mẫu được đặt ở góc trái phía dưới, thì xu hướng là ngược lại: ít phong phú càng ít được đánh dấu bằng màu đen trong khi sự phong phú được đánh dấu bằng màu xám.

Fig.4 là sơ đồ thể hiện phân tích các thành phần chính của các bệnh nhân mắc viêm da hoặc được phân loại là thuộc về vi khuẩn đường ruột typ 2 (ký hiệu hình vuông và màu đen) so với các mẫu từ quần thể khỏe mạnh của vi khuẩn đường ruột typ 2 (ký hiệu hình tròn và màu xám). Các loại được thể hiện nhiều nhất trong các mẫu được đặt ở phần bên phải phía trên của hình vẽ được thể hiện bằng màu đen trong khi các mẫu mà được thể hiện ở phía dưới trong tình huống này được thể hiện bằng màu xám. Đối với các mẫu được đặt ở góc trái phía dưới, thì xu hướng là ngược lại: ít phong phú càng ít được đánh dấu bằng màu đen trong khi phong phú được đánh dấu bằng màu xám.

Fig.5 là sơ đồ thể hiện phân tích các thành phần chính của các bệnh nhân mắc viêm da hoặc được phân loại là thuộc về vi khuẩn đường ruột typ 3 (ký hiệu hình vuông và màu đen) so với các mẫu từ quần thể khỏe mạnh của vi khuẩn đường ruột typ 3 (ký hiệu hình tròn và màu xám). Các loại được thể hiện nhiều nhất trong các mẫu được đặt ở phần bên phải phía trên của hình vẽ được thể hiện bằng màu đen trong khi các mẫu mà được thể hiện ở phía dưới trong tình huống này được thể hiện bằng màu xám. Đối với các mẫu được đặt ở góc trái phía dưới, thì xu hướng là ngược lại: ít phong phú càng ít được đánh dấu bằng màu đen trong khi phong phú được đánh dấu bằng màu xám.

Fig.6 thể hiện các kết quả của chỉ số SCORAD một tháng sau khi bắt đầu điều trị bằng chế phẩm probiotic theo sáng chế hoặc giả dược. Các kết quả thể hiện giá trị tuyệt đối của SCORAD đối với mỗi nhóm điều trị (Fig.6A) và giảm % về chỉ số SCORAD trong quá trình điều trị ở cả hai nhóm (Fig.6B). V3, kiểm tra tại 1 tháng. Nhóm A, nhóm tiêu thụ giả dược; Nhóm B, nhóm tiêu thụ chế phẩm probiotic.

Fig.7 thể hiện các kết quả của chỉ số SCORAD trong hai tháng bắt đầu điều trị bằng chế phẩm probiotic theo sáng chế hoặc giả dược. Các kết quả thể hiện giá trị tuyệt đối của SCORAD đối với mỗi nhóm điều trị (Fig.7A) và giảm % về chỉ số SCORAD trong quá trình điều trị ở cả hai nhóm (Fig.7B). V5, kiểm tra tại tháng thứ 2. Nhóm A, nhóm tiêu thụ giả dược; Nhóm B, nhóm tiêu thụ chế phẩm probiotic.

Fig.8 là nhóm tiêu thụ chế phẩm probiotic ba tháng (kết thúc thử nghiệm) sau khi bắt đầu điều trị bằng chế phẩm probiotic theo sáng chế hoặc giả dược. Các kết quả thể hiện giá trị tuyệt đối của SCORAD đối với mỗi nhóm điều trị (Fig.8A) và giảm % về chỉ số SCORAD trong quá trình điều trị ở cả hai nhóm (Fig.8B). V7, kiểm tra tại tháng thứ 3. Nhóm A, nhóm tiêu thụ giả dược; Nhóm B, nhóm tiêu thụ chế phẩm probiotic.

Fig.9 thể hiện % cải thiện về chỉ số SCORAD trong thời gian thử nghiệm được đo ở một tháng, hai tháng và ba tháng (kết thúc thử nghiệm) bắt đầu từ đường chuẩn. Sự khác biệt giữa hai nhóm điều trị có ý nghĩa thống kê từ tháng thứ nhất và các khác biệt này tăng ở các tháng thứ hai và thứ ba của thử nghiệm. Đường nét đứt thể hiện nhóm tiêu thụ chế phẩm probiotic; đường nét liền, nhóm tiêu thụ giả dược.

Fig.10 thể hiện xu hướng theo chỉ số SCORAD theo thời gian, được đo ở một tháng, hai tháng và ba tháng (kết thúc đường chuẩn) sau đường chuẩn. Các khác biệt giữa hai nhóm điều trị có ý nghĩa thống kê. Các đường nét đứt thể hiện nhóm tiêu thụ chế phẩm probiotic; đường nét liền thể hiện nhóm giả dược.

Fig.11 thể hiện xu hướng về số lượng bệnh nhân mắc cơn bùng phát mới của viêm da dị ứng (Fig.11A), tổng số bệnh nhân có các bùng phát mới của viêm da dị ứng (Fig.11B), và phần trăm các bệnh nhân không có các bùng phát mới (Fig.11C); trong quá trình theo dõi trong ba tháng sau khi dừng can thiệp điều trị bằng giả dược hoặc chế phẩm probiotic theo sáng chế. Các khác biệt giữa hai nhóm can thiệp có ý nghĩa thống kê trong đánh giá trong ba tháng sau khi bắt đầu kiểm soát đối với ba biến được phân tích. Đường màu đen: các bệnh nhân tiếp nhận giả dược; đường màu xám, các bệnh nhân tiếp nhận chế phẩm probiotic.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng việc dùng chế phẩm probiotic biến đổi hệ vi sinh vật địa phương trong ruột với cá thể mắc viêm da dị ứng, cùng với điều trị thông thường, ngạc nhiên là cho phép làm thuyên giảm và/hoặc cải thiện sự tiến triển của các bùng phát của viêm da dị ứng ở cá thể. Như được thể hiện trong các ví dụ đi kèm phần mô tả, khi chế phẩm probiotic (bao gồm các vi sinh vật thuộc các chi *Bifidobacterium* và *Lactobacillus*) đã được dùng cùng với điều trị mạn tính thông thường của các bệnh nhân có các bùng phát của viêm da dị ứng, sự cải thiện về chỉ số SCORAD là 82,36% được quan sát trong khi sự cải thiện chỉ số này trong các trường hợp được điều trị bằng điều trị mạn tính thông thường nhưng không có chế phẩm probiotic là 28,4%, các khác biệt được xem xét lâm sàng và có ý nghĩa thống kê. Hơn nữa, sự cải thiện được tạo ra bởi chế phẩm probiotic xảy ra kể từ tháng thứ nhất dùng, duy trì hoặc tăng các khác biệt ở phân tích tiếp theo trong 2 và 3 tháng điều trị. Ngoài ra, ưu điểm khác của việc điều trị AD bằng chế phẩm probiotic theo sáng chế là việc sử dụng corticosteroid bởi các bệnh nhân ở nhóm được điều trị bằng chế phẩm probiotic này là thấp hơn ở nhóm tiếp nhận giả dược.

Ngoài tác dụng có lợi lên sự tiến triển của bệnh ở các bệnh nhân có bùng phát viêm da dị ứng, thì cũng đã quan sát thấy rằng trong ba tháng sau khi gián đoạn điều trị bằng chế phẩm probiotic nêu trên, các cá thể đã tiếp nhận điều trị bằng chế phẩm này đã có ít các bùng phát hơn và thời gian trôi mà không có bệnh lâu hơn các bệnh nhân không tiếp nhận điều trị.

Do đó, ứng dụng của chế phẩm probiotic được mô tả ở đây để điều trị và/hoặc ngăn ngừa viêm da dị ứng được chứng minh.

Các tác giả đã phát triển một số khía cạnh sáng tạo sẽ được mô tả chi tiết sau đây.

Chế phẩm của chế phẩm probiotic theo sáng chế hữu dụng trong điều trị viêm da dị ứng (AD).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến chế phẩm probiotic bao gồm các vi sinh vật *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis* (sau đây được gọi là *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* và *Lactobacillus casei*.

Theo sáng chế, thuật ngữ "chế phẩm probiotic" là chế phẩm bao gồm ít nhất một vi sinh vật mà, khi được tiêu hóa, tương tác với sự trao đổi chất của cá thể và tạo ra tác

dụng có lợi theo cách tương tự. Theo sáng chế, chế phẩm probiotic bao gồm các vi sinh vật *B. lactis*, *B. longum* và *L. casei*, sau đây gọi là, "chế phẩm probiotic theo sáng chế".

B. lactis là vi khuẩn được sử dụng phổ biến làm probiotic, được tìm thấy hầu hết ở sữa chua và các sản phẩm sữa khác, bao gồm sữa công thức cho trẻ sơ sinh. Phân loại khoa học của *B. lactis* là: Giới: *Vi khuẩn* Ngành: *Firmicutes* Lớp: *Actinobacteria*, Bộ: *Bifidobacteria*, Họ: *Bifidobacteriaceae*, Chi: *Bifidobacterium*, Loài: *Bifidobacterium animalis* phân loài *lactis*.

L. casei là vi khuẩn được sử dụng phổ biến làm probiotic, được tìm thấy hầu hết trong sữa chua và các sản phẩm sữa khác, bao gồm sữa công thức cho trẻ sơ sinh. Phân loại khoa học của *L. casei* là: Giới: *Vi khuẩn* Ngành: *Firmicutes* Lớp: *Bacilli* Bộ: *Lactobacillales*, Họ: *Lactobacillaceae*, Chi: *Lactobacillus*, Loài: *Lactobacillus casei*.

Hơn nữa, *B. longum* là vi khuẩn Gram âm, âm tính với catalaza, có hình dạng tròn, nằm trong đường ống dạ dày ruột, nơi mà nó sản sinh axit lactic. Phân loại khoa học của *B. longum* là: Giới: *Vi khuẩn* Ngành: *Firmicutes* Lớp: *Actinobacteria*, Bộ: *Bifidobacteria*, Họ: *Bifidobacteriaceae*, Chi: *Bifidobacterium*, Loài: *Bifidobacterium longum*.

Theo phương án cụ thể, chế phẩm probiotic theo sáng chế bao gồm *B. lactis* CECT 8145 (và/hoặc các chủng thu được từ đó), *B. longum* CECT 7347 (và/hoặc các chủng thu được từ đó) và/hoặc *L. casei* CECT 9104 (và/hoặc các chủng thu được từ đó).

Chủng *B. lactis* CECT 8145 được phân lập từ phân của trẻ em đang cho bú khỏe mạnh nhỏ hơn ba (3) tháng tuổi. Chủng này được nộp lưu ngày 14 tháng 5 năm 2012 theo Hiệp ước Budapest ở Bảo tàng Giống chuẩn Tây Ban Nha là Cơ quan Nộp lưu Quốc tế (tại Building 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, C/ Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia) SPAIN). Số nộp lưu được chỉ định là CECT 8145.

Chủng *L. casei* CECT 9104 được phân lập từ phân của trẻ em đang cho bú và khỏe mạnh nhỏ hơn ba (3) tháng tuổi. Chủng này được nộp lưu ngày 25 tháng 02 năm 2016 theo Hiệp ước Budapest ở Bảo tàng Giống chuẩn Tây Ban Nha là Cơ quan nộp lưu quốc tế (tại Building 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, C/

Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia) SPAIN). Số nộp lưu được chỉ định là CECT 9104.

Chủng *B. longum* CECT 7347 được phân lập từ phân của trẻ em đang cho bú và khỏe mạnh nhỏ hơn ba (3) tháng tuổi và được nộp lưu ngày 20 tháng 12 năm 2007 theo Hiệp ước Budapest ở Bảo tàng Giống chuẩn Tay Ban Nha là Cơ quan nộp lưu quốc tế (tại Building 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, C/ Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia) SPAIN).). Số nộp lưu được chỉ định là CECT 7347.

Sáng chế cũng dự tính các vi sinh vật hoặc vi khuẩn đo thu được từ các vi sinh vật *B. lactis*, *B. longum* và *L. casei* (hoặc các chủng tương ứng *B. lactis* CECT 8145, *L. casei* CECT 9104 và *B. longum* CECT 7347) và có thể là một phần của chế phẩm probiotic theo sáng chế do chúng duy trì khả năng làm thuyên giảm và/hoặc cải thiện sự tiến triển của viêm da dị ứng ở các cá thể mắc bệnh lý này. Các ví dụ về các chủng hoặc vi sinh vật thu được từ các chủng chứa trong chế phẩm probiotic theo sáng chế có thể là các thể đột biến và các sinh vật biến đổi di truyền mà thể hiện các biến đổi trong bộ gen của chúng so với bộ gen của các chủng theo sáng chế, nhưng không ảnh hưởng đến khả năng của các chủng làm thuyên giảm và/hoặc cải thiện sự tiến triển của viêm da dị ứng ở cá thể. Các chủng thu được từ *B. lactis*, *B. longum* và *L. casei* (hoặc từ các chủng của *B. lactis* CECT 8145, *L. casei* CECT 9104 và *B. longum* CECT 7347) có thể được sản sinh tự nhiên hoặc có ý đồ bằng cách gây đột biến, như đã biết trong tình trạng kỹ thuật, như ví dụ, nhưng không giới hạn ở, sự sinh trưởng của chủng bố mẹ với sự có mặt các tác nhân gây đột biến hoặc các tác nhân ứng suất hoặc bằng kỹ thuật di truyền liên quan đến biến đổi, mất và/hoặc thêm các gen đặc hiệu. Do đó, như được chỉ ra trên đây, sáng chế cũng dự tính các sinh vật biến đổi di truyền thu được từ *B. lactis*, *B. longum* và *L. casei* (hoặc từ các chủng *B. lactis* CECT 8145, *L. casei* CECT 9104 và *B. longum* CECT 7347), mà duy trì khả năng làm giảm và/hoặc cải thiện sự tiến triển của viêm da dị ứng ở cá thể và, do đó, được sử dụng trong điều trị viêm da dị ứng. Ví dụ về thử nghiệm để xác nhận liệu sinh vật có khả năng làm giảm và/hoặc cải thiện sự tiến triển viêm da dị ứng ở cá thể được mô tả trong các ví dụ đi kèm ở đây.

Hơn nữa, sáng chế, cũng dự tính các thành phần tế bào, các chất trao đổi và các phân tử được tiết ra bởi *B. lactis*, *B. longum* và *L. casei* hoặc các chủng tương ứng của chúng *B. lactis* CECT 8145, *L. casei* CECT 9104 và/hoặc *B. longum* CECT 7347 cũng

như các chế phẩm chứa các thành phần này, là các tế bào của chúng, các chất trao đổi hoặc các phân tử được tiết ra của chúng, và sử dụng chúng để điều trị và/hoặc ngăn ngừa viêm da dị ứng. Các thành phần tế bào của vi khuẩn có thể bao gồm các thành phần của thành tế bào (như, nhưng không giới hạn ở, peptidoglycan), axit nucleic, các thành phần màng và thành phần khác, như protein, lipid và carbohydrat và tổ hợp của chúng (như lipoprotein, glycolipit hoặc glycoprotein). Các chất trao đổi bao gồm phân tử bất kỳ được tạo ra hoặc biến đổi bởi vi khuẩn nhờ hoạt tính trao đổi chất của nó trong quá trình sinh trưởng, sử dụng nó trong các quy trình công nghệ hoặc trong quá trình bảo quản sản phẩm (chế phẩm probiotic theo sáng chế). Các ví dụ về các chất trao đổi này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axit hữu cơ và vô cơ, protein, peptit, axit amin, enzym, lipid, carbohydrat, lipoprotein, glycolipit, glycoprotein, vitamin, muối, chất khoáng và axit nucleic. Các phân tử được tiết ra bao gồm phân tử bất kỳ được tiết ra hoặc giải phóng ra bên ngoài bởi vi khuẩn trong quá trình sinh trưởng, mà sử dụng nó trong các quy trình công nghệ (ví dụ, xử lý thực phẩm hoặc các dược chất) hoặc trong quá trình bảo quản sản phẩm (chế phẩm probiotic theo sáng chế). Các ví dụ về các phân tử này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axit vô cơ và hữu cơ, protein, peptit, axit amin, enzym, lipid, carbohydrat, lipoprotein, glycolipit, glycoprotein, vitamin, muối, chất khoáng và axit nucleic.

Như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, chế phẩm probiotic theo sáng chế có thể được bào chế để dùng làm dược phẩm, tức là tạo thành một phần của các sản phẩm dược được dùng cho đối tượng (ví dụ, dùng qua đường miệng, dùng khu trú, v.v.), và/hoặc để dùng làm thực phẩm, tức là tạo thành một phần của thực phẩm được tiêu thụ trong chế độ ăn của đối tượng. Theo sáng chế, chế phẩm này dùng để sử dụng để giảm bớt, thuyên giảm, điều trị và/hoặc ngăn ngừa viêm da dị ứng. Do đó, theo phương án cụ thể, chế phẩm probiotic theo sáng chế là dược phẩm và/hoặc chế phẩm dinh dưỡng.

Dược phẩm là tập hợp các thành phần hoặc hợp chất mà được tạo thành ít nhất bởi các vi sinh vật *B. lactis*, *L. casei* và *B. longum*, cụ thể là bởi các chủng *B. lactis* CECT 8145, và/hoặc *L. casei* CECT 9104 và/hoặc *B. longum* CECT 7347 (hoặc các chủng thu được từ đó) ở nồng độ bất kỳ và còn có thể bao gồm một hoặc nhiều thành phần hoặc hợp chất có hoạt tính sinh học, dược học và/hoặc thú y học mà, nhờ dùng cho đối tượng, còn có thể làm tăng, tăng cường và/hoặc thúc đẩy hoạt tính của các

chúng chứa trong chế phẩm probiotic theo sáng chế. Như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, các thành phần hoặc hợp chất bổ sung phải tương hợp với các chủng của chế phẩm probiotic theo sáng chế. Trong ngữ cảnh của sáng chế, thuật ngữ "dược phẩm" cũng bao gồm các chế phẩm thú y.

Các ví dụ về các thành phần hữu dụng hoặc hợp chất được sử dụng trong điều trị viêm da dị ứng mà có thể là một phần của dược phẩm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất kháng histamin H1 truyền thống (ví dụ, hydroxyzin, clemastin và dexchlorpheniramin), các chất histamin H1 được phát triển gần đây (ví dụ, dexfenfluramin, loratadin, cetirizin, và các dẫn xuất) và các chất ức chế calcineurin (ví dụ, tacrolimus và pimecrolimus).

Theo phương án cụ thể, dược phẩm còn bao gồm chất mang dược dụng và/hoặc tá dược.

Thuật ngữ "tá dược" đề cập đến chất giúp hấp thụ các thành phần hoặc hợp chất bất kỳ của chế phẩm probiotic theo sáng chế, cụ thể là, thuộc các chủng theo sáng chế, hoặc ổn định các thành phần hoặc hợp chất và/hoặc hỗ trợ bào chế dược phẩm theo nghĩa tạo ra sự đồng nhất hoặc hương vị làm cho nó dễ chịu hơn. Do đó, các tá dược có thể có chức năng, bằng cách ví dụ nhưng không giới hạn ở đó, gắn kết các thành phần (ví dụ, tinh bột, đường hoặc xenluloza), tạo ngọt, tạo màu, bảo vệ thành phần hoạt tính (ví dụ, cách ly khỏi không khí và/hoặc hơi ẩm), làm đầy viên thuốc, viên nang hoặc cách thể hiện khác hoặc chức năng phân rã để thúc đẩy hòa tan các thành phần, mà không loại trừ các tá dược khác không được liệt kê trong đoạn này. Do đó, thuật ngữ "tá dược" được xác định làm vật liệu, chứa ở dạng galenic, mà được bổ sung vào các thành phần hoạt tính hoặc các thành phần liên quan của chúng để cho phép điều chế và độ ổn định của chúng, biến đổi các đặc tính cảm quan và/hoặc xác định các đặc tính hóa lý của dược phẩm và tính khả dụng sinh học của nó. Tá dược "dược dụng" phải cho phép hoạt tính của các thành phần hoặc hợp chất của dược phẩm, tức là, phải tương hợp với các chủng theo sáng chế.

"Dạng galenic " hoặc "dạng dược" là cấu trúc mà các thành phần hoạt tính và các tá dược được làm thích ứng để tạo ra dược phẩm hoặc dược chất. Nó được xác định bởi tổ hợp của dạng mà dược phẩm được thể hiện bởi nhà sản xuất và dạng mà nó được dùng.

"Tá dược lỏng" hoặc "chất mang" tốt hơn là chất trợ. Các chức năng của chất mang là thúc đẩy sự kết hợp của các thành phần hoặc hợp chất khác, cho phép liều lượng tốt hơn và/hoặc dùng và/hoặc tạo ra sự đồng nhất và tạo thành dược phẩm. Do đó, chất mang là chất được sử dụng trong dược chất để hòa tan các hợp chất hoặc hợp chất bất kỳ của dược phẩm theo sáng chế thành thể tích hoặc trọng lượng thu được; hoặc thậm chí không cần hòa tan các thành phần hoặc hợp chất này, thì có thể cho phép liều lượng và dùng tốt hơn và/hoặc tạo ra sự đồng nhất và tạo thành dược chất. Khi cách thể hiện là chất lỏng, thì chất mang được dùng là chất pha loãng. Chất mang có thể là tự nhiên hoặc không tự nhiên. Các ví dụ về các chất mang được dùng bao gồm, mà không giới hạn ở, nước, dung dịch muối, rượu, dầu thực vật, polyetylen glycol, gelatin, lactoza, tinh bột, amyloza, magie stearat, bột talc, chất hoạt động bề mặt, axit silicic, parafin nhớt, dầu thơm, monoglycerit và diglycerit của các axit béo, các este petroetral của axit béo, hydroxymetylcelluloza, polyvinylpyrrolidon và chất mang được dùng tương tự.

Hơn nữa, tá dược và chất mang phải là dược dụng, tức là, tá dược và chất mang được phép và đánh giá để không gây hỏng cho đối tượng mà nó được dùng. Ngoài ra, chất mang và /hoặc tá dược lỏng có thể là tự nhiên, tức là, xuất hiện trong tự nhiên hoặc không tự nhiên, tức là, chúng có thể hoặc không thể xuất hiện trong tự nhiên nhưng, nếu chúng có trong tự nhiên, thì không tìm thấy trong tự nhiên dạng kết hợp với các chủng của sáng chế.

Trương mỗi trường hợp mà cách thể hiện của dược phẩm sẽ được làm thích ứng với cách dùng dược sử dụng. Do đó, chế phẩm này có thể có mặt ở dạng các dung dịch hoặc dạng bất kỳ khác của việc dùng cho phép về mặt lâm sàng và với lượng hữu hiệu điều trị. Dược phẩm có thể được bào chế ở các chế phẩm dạng rắn, bán rắn hoặc lỏng, như viên nén, viên nang, bột, hạt, dung dịch, thuốc đạn, gel hoặc vi cầu. Theo phương án cụ thể, dược phẩm được bào chế để dùng ở dạng lỏng hoặc ở dạng rắn.

Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm dạng rắn được chọn từ nhóm bao gồm viên nén, viên thuốc hình thoi, kẹo, viên nén nhai được, kẹo cao su, viên nang, túi, bột, hạt, hạt được bao hoặc viên nén được bao, viên nén, viên thuốc, viên ngậm dẹt, viên nén kháng dịch và viên nang và dải phân tán được và/hoặc màng.

Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm dạng lỏng được chọn từ nhóm bao gồm dung dịch dùng qua đường miệng, thể huyền phù, nhũ tương và sirô.

Tương tự, các hệ khác nhau được biết rằng có thể được sử dụng để dùng giải phóng duy trì chế phẩm probiotic theo sáng chế, bao gồm, ví dụ, đóng gói trong các liposom, vi bọt, vi hạt hoặc vi nang và tương tự, của chế phẩm này. Các dạng giải phóng duy trì cũng như các vật liệu và phương pháp để điều chế chúng đã biết trong tình trạng kỹ thuật. Do đó, dạng dùng được qua đường miệng của chế phẩm probiotic theo sáng chế ở dạng giải phóng duy trì còn bao gồm ít nhất một lớp bao hoặc màng. Lớp bao hoặc màng giải phóng duy trì bao gồm, mà không giới hạn ở, polyme bán tổng hợp tự nhiên hoặc tổng hợp, không hòa tan trong nước hoặc được biến đổi, sáp, chất béo, rượu béo, axit béo, chất dẻo hóa bán tổng hợp hoặc tổng hợp tự nhiên hoặc tổ hợp của hai hoặc nhiều của tất cả các dạng nêu trên. Các lớp bao dùng qua đường ruột có thể được áp dụng bằng cách sử dụng các quy trình thông thường đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Ngoài những gì được mô tả nêu trên, sáng chế cũng bao gồm khả năng mà chế phẩm probiotic theo sáng chế có thể được dùng cho đối tượng cùng với các thành phần hoặc hợp chất khác, mặc dù chúng không là một phần của chế phẩm probiotic. Các ví dụ về các thành phần hoặc hợp chất này đã được nêu trong các đoạn nêu trên.

Trong trường hợp chế phẩm probiotic theo sáng chế được điều chế làm chế phẩm dinh dưỡng, chế phẩm dinh dưỡng có thể là thực phẩm hoặc được kết hợp vào thực phẩm hoặc sản phẩm thực phẩm dành cho việc tiêu thụ cho người và động vật. Do đó, theo phương án cụ thể, chế phẩm dinh dưỡng được chọn từ giữa thực phẩm (mà có thể là thực phẩm dùng cho các mục đích dinh dưỡng cụ thể hoặc thực phẩm y tế) và chất bổ sung dinh dưỡng.

Theo sáng chế, thuật ngữ "chế phẩm dinh dưỡng" đề cập đến thực phẩm, mà bất chấp cung cấp các chất dinh dưỡng cho đối tượng tiêu thụ nó, ảnh hưởng theo hướng có lợi đến một hoặc nhiều chức năng của cơ thể, để làm cho đối tượng này sức khỏe tốt hơn và tốt. Theo sáng chế, chế phẩm dinh dưỡng nhằm dễ dàng, tuyên giảm, điều trị và/hoặc ngăn ngừa viêm da dị ứng.

Thuật ngữ "chất bổ sung", đồng nghĩa với thuật ngữ bất kỳ trong số các thuật ngữ "chất bổ sung ăn kiêng", "chất bổ sung dinh dưỡng", "chất bổ sung thực phẩm", hoặc "chất bổ sung đồ ăn" hoặc "chất bù đồ ăn" đề cập đến các sản phẩm hoặc các chế phẩm mà mục đích của nó là bổ sung cho chế độ ăn bình thường bao gồm các nguồn chất dinh dưỡng cô đặc hoặc các chất khác có tác dụng dinh dưỡng lên đối tượng.

Theo sáng chế, "chất" mà có tác dụng dinh dưỡng hoặc sinh lý học lên cá thể khi phần bù thực phẩm được tiêu hóa là các vi sinh vật *B. lactis*, *L. casei* và *B. longum*, cụ thể là các chủng *B. lactis* CECT 8145, và/hoặc *L. casei* CECT 9104 và/hoặc *B. longum* CECT 7347, là một phần của chế phẩm probiotic theo sáng chế. Phần bù thực phẩm có thể ở dạng đơn hoặc dạng kết hợp, và có thể được bán trên thị trường ở dạng liều, tức là trong viên nang, viên thuốc, viên nén và các dạng tương tự khác, túi bột, ống thuốc tiêm của các chất lỏng và các chai phân bổ giọt và các dạng tương tự khác như chất lỏng và bột được chỉ định được đưa vào liều đơn.

Có phổ rộng các chất dinh dưỡng và các thành phần khác mà có mặt trong các chất bù ăn kiêng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, vitamin, chất khoáng, axit amin, axit béo cần thiết, chất xơ, enzym, thực vật và dịch chiết thực vật. Do vai trò của chúng là bù nguồn chất dinh dưỡng trong chế độ ăn, nên chúng không nên được sử dụng làm chất thay thế cho chế độ ăn cân bằng và việc hấp thu không nên vượt quá liều lượng hàng ngày được khuyến cáo rõ ràng bởi bác sỹ hoặc nhà dinh dưỡng học. Chế phẩm probiotic cũng có thể là một phần được gọi là "thực phẩm dùng cho các nhóm đặc biệt", tức là thực phẩm đáp ứng các nhu cầu dinh dưỡng cụ thể.

Các ví dụ về thực phẩm mà có thể bao gồm chế phẩm probiotic theo sáng chế (các vi sinh vật *B. lactis*, *L. casei* và *B. longum*, cụ thể là các chủng *B. lactis* CECT 8145, và/hoặc *L. casei* CECT 9104 và/hoặc *B. longum* CECT 7347 (hoặc các chủng thu được từ đó)) bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thức ăn, sản phẩm sữa, sản phẩm rau, sản phẩm thịt, đồ khai vị, sô cô la, đồ uống, thực phẩm cho trẻ em, ngũ cốc, thực phẩm chiên, sản phẩm bánh mì công nghiệp và bánh quy. Các ví dụ về các sản phẩm sữa bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các sản phẩm thu được từ sữa lên men (ví dụ, nhưng không giới hạn ở, sữa chua hoặc pho mát) hoặc sữa không lên men (ví dụ, nhưng không giới hạn ở, kem, bơ, margarin hoặc whey). Sản phẩm thực vật là, ví dụ, nhưng không giới hạn ở, ngũ cốc ở dạng thể hiện bất kỳ, được lên men (ví dụ, nhưng không giới hạn ở, sữa chua đậu tương hoặc sữa chua yến mạch) hoặc không được lên men và đồ ăn khai vị. Đồ uống có thể là, nhưng không giới hạn ở, sữa không lên men. Theo phương án cụ thể, sản phẩm thực phẩm hoặc thực phẩm được chọn từ nhóm bao gồm nước ép quả hoặc nước ép rau, kem, sữa công thức cho trẻ sơ sinh, sữa, sữa chua, pho mát, sữa lên men, sữa bột, ngũ cốc, sản phẩm nướng, sản phẩm có nguồn gốc từ sữa, sản phẩm thịt và đồ uống.

Ngoài ra, chế phẩm probiotic theo sáng chế có thể bao gồm các vi sinh vật khác ngoài *B. lactis*, *L. casei* và *B. longum*, cụ thể là các chủng *B. lactis* CECT 8145, và/hoặc *L. casei* CECT 9104 và/hoặc *B. longum* CECT 7347. Do đó, theo phương án cụ thể, chế phẩm probiotic theo sáng chế còn bao gồm vi sinh vật được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Saccharomyces* sp., *Kluyveromyces* sp. và các tổ hợp của chúng.

Thậm chí theo phương án cụ thể nữa, *Lactobacillus* sp. là *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* phân loài *bulgaricus*, *L. kefir*, *L. parakefir*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. paraplantarum* hoặc *L. reuteri*; *Streptococcus* sp. là *St. thermophilus*; *Bifidobacterium* sp. là *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. adolescentis* hoặc *B. pseudocatenulatum*; *Saccharomyces* là *S. cerevisiae* hoặc *S. boulardii*; hoặc *Kluyveromyces* sp. là *K. lactis* hoặc *K. marxianus*.

Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm probiotic theo sáng chế được dùng cho đối tượng thông qua chế độ ăn.

Như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, các vi sinh vật *B. lactis*, *L. casei* và *B. longum*, cụ thể là các chủng *B. lactis* CECT 8145, *L. casei* CECT 9104 và/hoặc *B. longum* CECT 7347, phải có mặt trong chế phẩm probiotic theo sáng chế với lượng hữu hiệu điều trị sao cho chúng có tác dụng dễ dàng, thuyên giảm và/hoặc ngăn ngừa viêm da dị ứng.

Theo sáng chế, "lượng hữu hiệu điều trị" là lượng thành phần hoặc hợp chất của dược phẩm, mà khi được dùng cho đối tượng, đủ để tạo ra hiệu quả mong muốn. Thành phần hoặc hợp chất này của dược phẩm đề cập đến các vi sinh vật *B. lactis*, *L. casei* và *B. longum*, cụ thể là các chủng *B. lactis* CECT 8145, *L. casei* CECT 9104 và/hoặc *B. longum* CECT 7347. Như được biết bởi các người có hiểu biết trung bình trong vấn đề này, lượng hữu hiệu điều trị có thể khác nhau tùy thuộc vào, ví dụ, độ tuổi, trọng lượng cơ thể, sức khỏe nói chung, giới tính và chế độ ăn của đối tượng, cũng như theo chế độ và thời gian dùng, tốc độ tiết hoặc kết hợp dược chất, trong số các yếu tố khác.

Do đó, theo phương án cụ thể, tổng nồng độ vi sinh vật của *B. lactis*, *L. casei* và *B. longum*, cụ thể là các chủng *B. lactis* CECT 8145, và/hoặc *L. casei* CECT 9104 và/hoặc *B. longum* CECT 7347 trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 10^3 đến 10^{12} cfu,

tốt hơn là 10^9 cfu. Theo phương án cụ thể khác, liều lượng dùng các vi sinh vật *B. lactis*, *L. casei* và *B. longum*, cụ thể là *B. lactis* CECT 8145, *L. casei* CECT 9104 và/hoặc *B. longum* CECT 7347, trong chế phẩm này là nằm trong khoảng từ 10^6 đến 10^{12} cfu / ngày, tốt hơn là 10^9 cfu / ngày, và thậm chí theo phương án cụ thể khác nữa, chế độ dùng ít nhất một lần hàng ngày, cụ thể là hai lần hàng ngày, và cụ thể hơn nữa là, ba lần một ngày, một lần với mỗi lần hấp thu thực phẩm (bữa sáng, bữa trưa và bữa tối).

Theo phương án cụ thể khác, nồng độ của *B. longum*, cụ thể là chủng *B. longum* CECT 7347, so với tổng nồng độ vi sinh vật có mặt trong chế phẩm được chọn từ giá trị bất kỳ sau đây: 10%, 15 %, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% hoặc 80%. Theo phương án cụ thể khác, nồng độ của *B. lactis*, cụ thể là chủng *B. lactis* CECT 8145, so với tổng nồng độ vi sinh vật có mặt trong chế phẩm được chọn từ giá trị bất kỳ sau đây: 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% hoặc 80%. Theo phương án cụ thể khác, nồng độ *L. casei* cụ thể là chủng *L. casei* CECT 9104, so với tổng nồng độ vi sinh vật có mặt trong chế phẩm được chọn từ giá trị bất kỳ sau đây: 10%, 15 %, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% hoặc 80%. Như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình, chế phẩm theo sáng chế bao gồm sự tổ hợp bất kỳ của các nồng độ đối với mỗi vi sinh vật trong số các vi sinh vật nêu trên.

Theo phương án cụ thể khác, nồng độ của *B. longum* so với tổng nồng độ vi sinh vật có mặt trong chế phẩm ít nhất là nằm trong khoảng từ 25% đến 45%, tốt hơn là ít nhất là 35%; nồng độ *B. lactis* so với tổng nồng độ vi sinh vật ít nhất là nằm trong khoảng từ 25% đến 45%, tốt hơn ít nhất là 35%; và/hoặc nồng độ *L. casei* so với tổng nồng độ vi sinh vật là nằm trong khoảng từ 20% đến 40%, tốt hơn là 30%.

Chế phẩm probiotic theo sáng chế hữu dụng trong điều trị và/hoặc ngăn ngừa viêm da dị ứng ở cá thể, cũng như cải thiện sự tiến triển của viêm da dị ứng ngay khi việc hấp thu chế phẩm probiotic được mô tả ở đây ngừng lại.

Do đó, mục đích khác được mô tả ở đây đề cập đến chế phẩm probiotic được mô tả ở đây để sử dụng làm dược chất.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "dược chất" đề cập đến chất bất kỳ để ngăn ngừa, chẩn đoán, làm thuyên giảm, điều trị hoặc cứu chữa các bệnh ở người và động vật. Trong ngữ cảnh của sáng chế, bệnh này là AD.

Mục đích khác ở đây đề cập đến chế phẩm probiotic như được nêu trên, trong điều trị và/hoặc ngăn ngừa AD ở cá thể mắc bệnh này.

Theo sáng chế, thuật ngữ "đối tượng" tương đương với thuật ngữ "cá thể"; nên cả hai thuật ngữ này có thể được sử dụng thay thế cho nhau ở đây. "Đối tượng" nghĩa là, ngoài cá thể bất kỳ, động vật bất kỳ thuộc về loài bất kỳ. Các ví dụ về các đối tượng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các động vật thuộc mối quan tâm thương mại như chim (chim mái, đà điểu, chim con, ngỗng, gà gô, v.v.); thỏ, thỏ rừng, thú cưng (chó, mèo, v.v.); cừu, gia súc họ dê (dê, v.v.); lợn (lợn nòi, lợn, v.v.); thú nuôi họ ngựa (ngựa, ngựa poni, v.v.); gia súc (bò đực, bò cái, thú nuôi có sừng, v.v.); động vật thuộc mối quan tâm săn bắn, như hươu nai đực, hươu nai, tuần lộc, v.v.; và con người. Tuy nhiên, theo phương án cụ thể, đối tượng là động vật có vú, tốt hơn nếu động vật có vú là con người có chủng tộc, giới tính hoặc độ tuổi bất kỳ.

Theo sáng chế, thuật ngữ "ngăn ngừa" nghĩa là tránh được sự xuất hiện của bệnh hoặc tình trạng bệnh lý ở cá thể, cụ thể là khi cá thể có tình trạng có khuynh hướng thiên về tình trạng bệnh lý, nhưng chưa được chẩn đoán. Theo sáng chế, bệnh hoặc tình trạng bệnh lý là bùng phát viêm da dị ứng.

Theo sáng chế, thuật ngữ "điều trị" hoặc "việc điều trị" bao gồm việc ức chế bệnh hoặc tình trạng bệnh lý, tức là, dừng sự phát triển của nó; làm thuyên giảm bệnh hoặc tình trạng bệnh lý, tức là làm cho thoái lui bệnh hoặc tình trạng bệnh lý học; và/hoặc ổn định bệnh hoặc tình trạng bệnh lý học ở cá thể. Theo sáng chế, bệnh hoặc tình trạng bệnh lý là viêm da dị ứng.

Theo sáng chế, thuật ngữ "viêm da dị ứng" (AD) được hiểu là viêm da do viêm, ngứa, diễn biến mạn tính, đặc trưng bởi sự phát triển của các thương tổn eczema với mô hình phân bố đặc trưng mà ảnh hưởng đến các cá thể có siêu phản ứng da với các yếu tố môi trường khác nhau mà có hại đối với các cá thể dị ứng. Là quy trình viêm mạn tính, có các bùng phát mang bản chất viêm đối với các thương tổn gây siêu phản ứng da do cả vùng gấp nếp da và vùng mở rộng, sau đó là mô hình eczema cấp tính hoặc dưới cấp tính. Viêm da có thể biểu lộ ở nhiều dạng và chỗ ngoài da.

Phương pháp điều trị và/hoặc ngăn ngừa các bệnh viêm da

Khía cạnh khác, phần mô tả bộc lộ phương pháp điều trị viêm da dị ứng ở đối tượng, sau đây là, phương pháp điều trị theo sáng chế, bao gồm việc dùng chế phẩm probiotic được mô tả trong sáng chế cho cá thể có viêm da dị ứng.

Tất cả các thuật ngữ, định nghĩa và phương án cụ thể của các khía cạnh sáng tạo nêu trên là áp dụng được với phương pháp điều trị theo sáng chế.

Xuyên suốt phần mô tả và yêu cầu bảo hộ, từ "bao gồm" và các biến thể của nó không nhằm loại trừ các đặc trưng, phần bổ sung, thành phần hoặc bước khác. Đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, mục đích, ưu điểm và đặc trưng khác theo sáng chế sẽ trở nên rõ ràng, một phần là, từ phần mô tả, một phần là, từ việc đưa vào thực tiễn của sáng chế. Các ví dụ và hình vẽ sau đây được tạo ra bằng cách minh họa và không nhằm làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được minh họa bằng cách thử nghiệm được thực hiện bởi các tác giả mà thể hiện các đặc tính của chế phẩm probiotic theo sáng chế.

Ví dụ 1: Xác định hệ sinh vật địa phương vi khuẩn ở các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD

1.1 Vật liệu và phương pháp

Dựa trên các mẫu phân của 49 bệnh nhân mắc viêm da, dịch chiết vật liệu di truyền (ADN) được tiến hành bằng cách sử dụng sự kết hợp của việc phá vỡ bằng cơ học và bằng enzyme của các thành tế bào và màng để làm tăng hiệu suất chiết và không nghi ngờ về sự có mặt của vi khuẩn có thành tế bào (Gram +). Vật liệu di truyền thu được bằng cách chiết được đo để đánh giá chất lượng và số lượng bằng cách sử dụng Nanodrop 2000 ThermoScientific để kiểm tra các tỷ lệ 260/280 và 260/230 chỉ ra chất lượng chiết (có mặt của các chất ức chế PCR, sắc tố, v.v.). Sau đó, sau khi xác nhận chất lượng của chúng, các thư viện giải trình tự khối được tiến hành, chụp ảnh vùng siêu biến V3-V4 của gen 16s rARN vi khuẩn (dựa trên Klindworth A, et al. (2013) Nucleic Acids Res 41: e1) theo quy trình được mô tả bởi Illumina để phân tích chế phẩm vi sinh vật dựa trên việc chụp ảnh 16s rARN. Mỗi thư viện được định lượng bằng Quant-iT PicoGreen bởi Invitrogen và được trộn đẳng mol để giải trình tự sau đó.

Các mẫu được giải trình tự trên nền tảng MiSeq kết hợp 300 chu kỳ "hai đầu". Các tệp FASTQ thu được được xử lý để đảm bảo phân tích trình tự có chất lượng cao. Với mục đích này, việc kiểm soát chất lượng được tiến hành bao gồm:

1. Kết hợp các đầu để tái cấu trúc các trình tự đơn nhất bằng cách sử dụng chương trình 'pear' v0.9.6. (Zhang J, et al (2014) Bioinformatics 30 (5):614-20).

2. Loại trừ giải trình tự các đầu adaptor và bắt các môi từ các vùng siêu biên V3 và V4 bằng chương trình cutadapt phiên bản 1.9.1. (Martin M (2010) EMBnet.journal [S.L.], 17 (1): 10-12. ISSN 2226-6089.).
3. Loại trừ các trình tự có chất lượng thấp bằng cách sử dụng FASTX-ToolKit phiên bản 0.91.
4. Loại trừ các chimera được tạo ra bởi PCR bằng cách sử dụng chương trình UCHIME (Dec 2015) (Edgar RC, et al (2011) Aug 15; 27 (16): 2194-200) và cơ sở dữ liệu cuối cùng của các chimera.

Các mẫu thu được được so sánh với cơ sở dữ liệu trình tự của 16S rARN (NCBI) bằng cách sử dụng việc sắp hàng cục bộ kiểu BLAST (Altschul SF, et al (1990) J. Mol Biol. 215: 403-410).

Mỗi trình tự trong số các trình tự mà điểm đạt được là tương đồng chín mươi năm phần trăm (95%) được kiểm tra ở phân loại khác nhau thuộc các cấp: Ngành, Họ, Chi và Loài.

Gói thống kê R được sử dụng để thống kê, để cấu trúc các biểu đồ đối với phân tích thành phần chính (PCA).

Thú vị lưu ý rằng có sự biến đổi lớn ở các quần thể vi sinh vật của đường ống tiêu hóa của mỗi cá thể, các nghiên cứu dịch tễ học đề xuất rằng hệ vi sinh vật địa phương của hầu hết tất cả chúng có thể được phân loại là thuộc về ba loại được biết là các typ vi khuẩn đường ruột (Arumugam et al., (2011) Nature 473:174-180). Việc phân loại này dựa trên tính chiếm ưu thế của mỗi typ vi khuẩn đường ruột trong số ba typ vi khuẩn đường ruột này của các thành viên của các chi *Bacteroides*, *Prevotella* hoặc *Ruminococcus*. Vi khuẩn đường ruột typ 1 (ent1) được đề cập đến là khi chi *Bacteroides* chiếm ưu thế, vi khuẩn đường ruột typ 2 (ent2) nếu chi *Prevotella* chiếm ưu thế và vi khuẩn đường ruột typ 3 (ent3) khi chi *Ruminococcus* chiếm ưu thế (Dave et al., (2012). Trans. Res. 160, 246-257).

II. Kết quả

Như nêu trên, chế phẩm vi sinh vật được phân tích ở các mẫu phân từ các cá thể mắc viêm da dị ứng như được so sánh với các cá thể khỏe mạnh.

Như có thể thấy được trên Fig.1, các kết quả thể hiện rằng các hồ sơ vi sinh học của các mẫu từ các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD gần hơn với các cá thể khỏe

mạnh có vi khuẩn đường ruột typ 3 so với các thể khỏe mạnh khác. Như được thể hiện ở phía trên bên trái của Fig.1 nêu trên, cụm các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD (ký hiệu tứ giác và màu đen) cùng với các cá thể khỏe mạnh có vi khuẩn đường ruột typ 3 (ký hiệu hình thoi và màu xám sáng), nhưng có sự phân tán lớn hơn trong trường hợp của các bệnh nhân viêm da dị ứng AD so với các cá thể khỏe mạnh có vi khuẩn đường ruột typ 3. Ngược lại, cụm các cá thể của quần thể khỏe mạnh có vi khuẩn đường ruột typ 1 (ký hiệu hình tròn và màu xám đen) hoặc vi khuẩn đường ruột typ 2 (ký hiệu hình tam giác và màu xám) lần lượt ở phần bên trên, từ trái sang phải, và ở phía trái, từ phía trên xuống. Cũng đáng lưu ý rằng các mẫu tụ lại ở phía tay phải của biểu đồ có sự phong phú lớn hơn của chi *Bacteroides* và *Prevotella* và *Faecalibacterium* ít hơn, trong khi các mẫu tụ lại ở phía trên của biểu đồ trên Fig.1 thể hiện sự vắng mặt rõ ràng của *Prevotella*; do đó các mẫu từ các bệnh nhân khỏe mạnh có vi khuẩn đường ruột typ 2 (sự phong phú lớn hơn của các loài của chi *Prevotella*) được đặt ở góc tay trái bên dưới và thể hiện tăng lên ở *Faecalibacterium* và *Ruminococcus*. Dữ liệu này cho phép chúng ta đề cập rằng quần thể vi sinh vật (microbiome) của các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD gần hơn so với của các cá thể khỏe mạnh có vi khuẩn đường ruột typ 3, nhưng có chế phẩm khác và khả năng biến thiên của vi sinh vật.

Khả năng biến thiên khác nhau và chế phẩm vi sinh vật trong số các cá thể khỏe mạnh có vi khuẩn đường ruột typ 3 và các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD có thể thông báo chi tiết hơn khi khả năng biến thiên của các quần thể vi khuẩn được phân tích ở các mẫu của quần thể khỏe mạnh (với mỗi typ vi khuẩn đường ruột trong số ba typ vi khuẩn đường ruột riêng biệt) đối với các mẫu của các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD bằng chỉ số Shannon (Fig.2). Như được thể hiện trên Fig.2, nói chung, các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD có Khả năng biến thiên lớn hơn so với các cá thể khỏe mạnh, có khoảng trung vị và tứ phân là 2,97 (từ 2,84 đến 3,06) đối với các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng và 1,99 (từ 1,37 đến 2,52); 2,14 (từ 1,50 đến 2,62) và 2,23 (từ 1,91 đến 2,57) lần lượt đối với các cá thể khỏe mạnh có các vi khuẩn đường ruột typ 1, 2 và 3. Cụ thể là, các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD có khả năng biến thiên vi khuẩn cao hơn đáng kể so với khả năng biến thiên ở typ vi khuẩn đường ruột bất kỳ trong các typ vi khuẩn đường ruột của cá thể khỏe mạnh, do ở tất cả trường hợp $p < 0,0001$ về việc so sánh khả năng biến thiên vi sinh vật của các bệnh nhân mắc viêm

da dị ứng AD với khả năng biến thiên vi sinh vật của quần thể khỏe mạnh có các typ vi khuẩn đường ruột khác nhau.

Để xác định vi khuẩn phân biệt quần thể khỏe mạnh với quần thể có viêm da dị ứng, chúng tôi đã tiến hành phân loại các bệnh nhân có viêm da dị ứng dựa trên sự chiếm ưu thế của *Bacteroides* (ent1), *Prevotella* (ent2) hoặc *Ruminococcus* (ent3). Sau đó, chúng tôi đã kiểm tra liệu có các khác biệt nào giữa mỗi typ vi khuẩn đường ruột trong số các typ vi khuẩn đường ruột khác nhau của quần thể khỏe mạnh liên quan đến các typ vi khuẩn đường ruột khác nhau ở những người mắc viêm da dị ứng AD. Trước tiên, từ tổng số 49 bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD, 25 bệnh nhân được phân loại là ent1; hai bệnh nhân là ent2; và 22 bệnh nhân là ent3. Tương tự, trong số 324 đối tượng khỏe mạnh, 298 đối tượng được phân loại là ent1; 21 bệnh nhân là ent2; và 5 bệnh nhân là ent3. Sau đó khả năng biến thiên vi khuẩn được phân tích trong mỗi typ vi khuẩn đường ruột, 1, 2 hoặc 3 trong số các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD như được so sánh với các đối tượng khỏe mạnh.

Fig.3 thể hiện khả năng biến thiên vi khuẩn trong số các đối tượng khỏe mạnh so với các bệnh nhân mắc AD, tất cả có vi khuẩn đường ruột typ 1. Như được thể hiện trên Fig.3, các cá thể khỏe mạnh có sự phong phú lớn hơn của *Bacteroides* so với các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD, trong khi các bệnh nhân mắc AD thể hiện sự phong phú lớn hơn của các chi *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* và, đặc biệt là, sự phong phú thấp hơn của các loài của chi *Alistipes*.

Fig.4 thể hiện khả năng biến thiên vi khuẩn trong số các đối tượng khỏe mạnh so với các bệnh nhân mắc AD, tất cả có vi khuẩn đường ruột typ 2. Trong trường hợp này, không thể phân biệt, đối với các chi vi khuẩn, trong số các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD có vi khuẩn đường ruột typ 2 với các cá thể khỏe mạnh có cùng typ vi khuẩn đường ruột. Mặt khác, hình vẽ này thể hiện mức độ thấp của các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD mà được phân loại là vi khuẩn đường ruột typ 2.

Như đối với trường hợp đối với các cá thể khỏe mạnh và các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD có vi khuẩn đường ruột typ 1, ở các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD được phân loại là vi khuẩn đường ruột typ 3 (Fig.5), có các khác biệt đáng kể giữa các bệnh nhân mắc AD so với các cá thể khỏe mạnh. Như được thể hiện trên Fig.5, các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD có ít loài hơn thuộc về chi *Ruminococcus* so với

các bệnh nhân khỏe mạnh, cũng như ít sự phong phú loài hơn thuộc về chi *Faecalibacterium*.

Với tất cả các kết quả được thể hiện trên đây, rõ ràng là hệ vi sinh vật địa phương của các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD khác nhau trong chế phẩm và khả năng biến thiên được so sánh với hệ vi sinh vật địa phương của quần thể khỏe mạnh. Cũng đã thể hiện rằng có ít bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD hơn thuộc về vi khuẩn đường ruột typ 2, và hơn nữa các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD đó cũng thể hiện tăng khả năng biến thiên vi sinh vật, nhưng có ít vi khuẩn hơn thuộc về các loài của các chi quan trọng ở mỗi typ vi khuẩn đường ruột, cụ thể lần lượt là các chi *Bacteroides* và *Ruminococcus* đối với các vi khuẩn đường ruột typ 1 và 3.

Ví dụ 2: Phân tích hiệu quả của chế phẩm probiotic theo sáng chế trong ngăn ngừa và/hoặc điều trị viêm da dị ứng (AD).

I. Vật liệu và phương pháp

Để đánh giá hiệu quả chế phẩm probiotic theo sáng chế trong việc làm thuyên giảm các triệu chứng, cùng với việc sử dụng các corticosteroid dùng khu trú trong điều trị viêm da dị ứng, thử nghiệm được kiểm soát bằng giả dược, mù đôi, thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên được tiến hành trong nhóm 20 bệnh nhân mắc viêm da dị ứng có độ tuổi từ 4 đến 17 tuổi.

Để làm vậy, các bệnh nhân tham gia vào thử nghiệm được chẩn đoán có viêm da dị ứng theo các tiêu chuẩn của Hanifin và Rajka (Hanifin JM, *et al* Acta Derm Venereol 1980; 92: 44-7), đáp ứng tất cả tiêu chuẩn bao gồm và không có các tiêu chuẩn loại trừ nào được thiết lập trong thử nghiệm. Các đối tượng thử nghiệm cũng đã sử dụng, hoặc có thể sử dụng, các corticosteroid dùng khu trú để điều trị các bùng phát viêm da dị ứng, cùng với các thành phần hoạt tính khác được dùng như điều trị thông thường, như chất làm dịu, các corticosteroid hệ thống, các chất kháng histamin, v.v..

Mỗi bệnh nhân được chỉ định cho việc điều trị này hoặc nhóm giả dược sử dụng ngẫu nhiên hóa 1:1 phân tầng bằng các khối xét các biến: giới tính, độ tuổi, tiền sử gia đình thuộc mức độ thứ nhất theo quan hệ dòng máu có dị ứng hoặc viêm da dị ứng và bắt đầu mạnh mẽ viêm da dị ứng trước bốn tuổi.

Chế phẩm probiotic theo sáng chế bao gồm *Bifidobacterium lactis* CECT 8145, *Bifidobacterium longum* CECT 7347 và *Lactobacillus casei* CECT 9104, được tạo ra ở dạng sản đường và maltotexina, chứa 5×10^{10} cfu / gam.

Dạng và hình dạng của giả dược được dùng giống với chế phẩm theo sáng chế, nhưng chỉ chứa sản maltodextrin và đường.

Chế độ liều của chế phẩm probiotic theo sáng chế hoặc giả dược là một viên nang/ngày.

Đối với việc điều trị các bùng phát viêm da dị ứng mà có thể trải nghiệm bởi các bệnh nhân tham gia thử nghiệm, methylprednisolon axeponat được sử dụng làm corticosteroid dùng khu trú, và khoảng thời gian của việc điều trị này không vượt quá hai tuần. Deflazacort được kê đơn nếu việc điều trị bằng corticosteroid hệ thống được yêu cầu. Desloratadin được sử dụng để điều trị ngứa, và kháng sinh được sử dụng thông thường như axit fusidic được sử dụng đối với các trường hợp bị lây nhiễm viêm da dị ứng.

Giai đoạn điều trị kết thúc mười hai tuần từ lúc tuyển chọn bệnh nhân cho đến khi kiểm tra lần cuối. Sau khi lần kiểm tra bao gồm thử nghiệm (đường chuẩn) và chỉ định điều trị (nhóm điều trị hoặc giả dược), bảy lần kiểm tra được lập trình, diễn ra ở các tuần 4, 8 và 12 từ lúc bắt đầu điều trị bằng chế phẩm theo sáng chế hoặc bằng giả dược. Trong những lần kiểm tra này, chỉ số SCORAD được đánh giá; và ở các tuần 2, 6 và 10, số thu thập dữ liệu (DCL) của mỗi bệnh nhân được cập nhật.

Tất cả các thuốc được uống bởi bệnh nhân trong quá trình thử nghiệm được ghi lại trong các hồ sơ y tế của bệnh nhân và trong DCL, nêu rõ các liều lượng, lộ trình dùng và khoảng thời gian điều trị (ngày bắt đầu và ngày kết thúc), và bao gồm thuốc. Ngoài ra, mỗi lần kiểm tra được ghi lại trong DCL cũng như đối chiếu của các viên nang hoàn lại. Bảng 1 thể hiện các đặc tính nhân khẩu học của các bệnh nhân ở đường chuẩn trong mỗi nhóm điều trị. Bảng 2 thể hiện dòng thời gian của thử nghiệm.

Bảng 1. Các đặc tính lâm sàng và nhân khẩu học của đường chuẩn của các bệnh nhân trong mỗi nhóm điều trị (trang sau).

	Điều trị	Độ tuổi	SD	SEM
Độ tuổi	Giả dược	8,96	3,940	0,804
	Chế phẩm	9,35	3,577	0,702
Scorad	Giả dược	31,6417	5,05129	1,03109
	Chế phẩm	33,3077	3,51351	,68906
Đường chuẩn IgE	Giả dược	292,08	636,537	129,933
	Chế phẩm	428,44	723,861	144,772
Đường chuẩn Eosin	Giả dược	4,73	4,274	0,872
	Chế phẩm	4,96	5,799	1,160
V2 Tổng Corticoit*	Giả dược	3,68	4,224	0,901
	Chế phẩm	3,00	3,240	0,648
V2 Tổng chất kháng histamin*	Giả dược	0,32	0,780	0,166
	Chế phẩm	1,28	2,072	0,414

*: Số ngày điều trị trong 2 tuần; SD: độ lệch chuẩn; SEM: sai số chuẩn trung bình.

Bảng 2. Quy trình thử nghiệm lâm sàng.

Các lần kiểm tra	0 / 1	2	3	4	5	6	7
Tuần	0	2	4	6	8	10	12
Tiêu chuẩn bao gồm/loại trừ	X						
Mẫu chấp thuận thông tin được ký	X						
Hồ sơ y tế	X						
Kiểm tra thân thể	X		X		X		X
Kiểm tra thai nhi	X						X
Các kiểm tra bổ sung	X			X			
SCORAD	X		X		X		X
Điều trị (chế phẩm probiotic hoặc giả dược)	X		X		X		
Sổ ghi chép thu thập thông tin		X		X		X	X
Phân phối điều trị	X		X		X		
Quay lại và đối chiếu điều trị không tiêu thụ được			X		X		X
Đánh giá các sự kiện ngược		X	X	X	X	X	X

Tất cả các phân tích thống kê được thực hiện để thu được các kết quả cuối cùng sau đây được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm SPSS 20.0.

Ngoài ra, thử nghiệm này được cam kết theo bản tuyên bố Helsinki, như được sửa đổi ở các hội đồng thể giới liên tiếp. Hồ sơ y tế và thư đồng ý thông tin thu được đối với tất cả người tham gia (được ký bởi bệnh nhân hoặc người giám hộ của ông ấy/bà ấy hoặc đại diện hợp pháp) theo Bản tuyên bố Helsinki và được phê chuẩn bởi hội đồng viện nghiên cứu và đạo đức.

II. Kết quả

Trước tiên chúng ta phân tích liệu các mẫu chứa trong mỗi nhóm nghiên cứu là đồng nhất, tức là, nhóm giả dược và nhóm tiếp nhận chế phẩm probiotic theo sáng chế. Bảng 3 chứng tỏ rằng yêu cầu này đã đáp ứng do không có khác biệt nào được tìm thấy giữa một biến bất kỳ trong các biến được phân tích đối với mỗi nhóm nghiên cứu.

Bảng 3. Tính đồng nhất của hai mẫu. Các thống kê thử nghiệm^a

	Độ tuổi	SCORAD	Tổng số Corticosteroid V2*	Tổng số chất kháng histamin V2*
Thử nghiệm Mann-Whitney <i>U</i>	286,500	260,500	271,000	223,500
Wilcoxon W	586,500	560,500	596,000	476,500
Z	-0,497	-1,000	-0,088	-1,435
Sig. tiệm cận (Song phương)	0,619	0,317	0,930	0,151

^a Tạo nhóm biến: không có khác biệt xuất hiện trong các biến chính ở đường chuẩn; *: Số ngày điều trị trong 2 tuần.

Như nêu trên, các giá trị trung bình (trung bình và trung vị) và $\pm$ độ lệch chuẩn (SD) được tính toán đối với dữ liệu toàn cầu ở đường chuẩn, ở một tháng và ở hai và ba tháng điều trị. Các giá trị được thể hiện bởi bệnh nhân ở mỗi thời điểm trong các thời điểm này được so sánh với các giá trị được lấy tại lúc bắt đầu thử nghiệm sử dụng thử nghiệm Wilcoxon.

Hiệu quả của chế phẩm theo sáng chế một tháng sau khi bắt đầu điều trị

Sau một tháng điều trị, chỉ số SCORAD được phân tích, so sánh các giá trị giữa các nhóm cũng như các giá trị của đường chuẩn. Bảng 4 thể hiện các thay đổi trong giá trị của các số tuyệt đối và tính là phần trăm.

Bảng 4. Chỉ số SCORAD một tháng sau khi bắt đầu điều trị bằng chế phẩm probiotic theo sáng chế hoặc giả dược.

Điều trị		SCORAD 1 tháng	% thay đổi SCORAD 1 tháng
Giả dược	Trung bình	25,8500	16.0015
	SD	8,02355	23.17611
	Trung vị	24,8500	18.0150
Chế phẩm	Trung bình	19,6182	41.7586
	SD	7,33580	19.27088
	Trung vị	19,5000	40.8150
Thử nghiệm Mann-Whitney U		124.500	79,000
Wilcoxon W		377.500	289,000
Z		-2.406	-3,551
Sig. tiệm cận (Song phương)		0.016	0,000

Như được thể hiện bởi các kết quả trong Bảng 4 và Fig.6, sau một tháng điều trị có các khác biệt đáng kể ở chỉ số SCORAD đối với các nhóm giả dược so với nhóm được điều trị bằng chế phẩm probiotic theo sáng chế. Các Fig.7 và 8 thể hiện các thay đổi trong chỉ số SCORAD ở các lần kiểm tra tương ứng với hai tháng (Fig.7) và ba tháng (Fig.8) để điều trị so với đường chuẩn giữa nhóm được điều trị bằng chế phẩm probiotic theo sáng chế và nhóm giả dược.

Fig.9 thể hiện nhóm được điều trị bằng chế phẩm theo sáng chế có chỉ số SCORAD thấp hơn được đo ở một tháng, hai tháng và ba tháng từ đường chuẩn như được so sánh với nhóm giả dược. Như được thấy trên Fig.9, các khác biệt giữa hai nhóm điều trị đã có ý nghĩa thống kê kể từ tháng điều trị thứ nhất, với các khác biệt này tăng ở 2 (v5) và 3 (V7) tháng từ đường chuẩn.

Fig.10 thể hiện các xu hướng ở chỉ số SCORAD đo được ở một (V3), hai (V5) và ba (V7) tháng sau khi bắt đầu thử nghiệm. Các khác biệt giữa nhóm được điều trị bằng

chế phẩm theo sáng chế và nhóm giả dược có ý nghĩa thống kê, chứng minh các ưu điểm sử dụng chế phẩm trong điều trị ở các bệnh nhân mắc AD.

Liên quan đến việc sử dụng các corticosteroid dùng khu trú ở mỗi nhóm nghiên cứu, ở một tháng điều trị, không có các khác biệt có ý nghĩa thống kê được quan sát giữa hai nhóm điều trị trong các ngày biến đổi để sử dụng các corticosteroid dùng khu trú (Bảng 5) về việc so sánh cả hai nhóm bằng thử nghiệm Wilcoxon với mức ý nghĩa thống kê là năm phần trăm (5%). Ngược lại, xu hướng được quan sát khi các corticosteroid dùng khu trú không được sử dụng, là lớn hơn ở nhóm được điều trị bằng chế phẩm probiotic theo sáng chế so với nhóm giả dược, cụ thể là ở các tháng thứ hai 2 và 3 của thử nghiệm. Đáng chú ý là, đã không đạt được ý nghĩa thống kê chủ yếu do kích cỡ thử nghiệm.

Bảng 5. Phân tích các corticosteroid dùng khu trú được sử dụng trong mỗi nhóm một tháng sau khi bắt đầu thử nghiệm. Biến tạo nhóm được sử dụng để thu được dữ liệu được thể hiện là loại điều trị, tức là, chế phẩm probiotic theo sáng chế hoặc giả dược.

Phân tích thống kê	V3 Tổng số ngày điều trị corticoit
Mann-Whitney <i>U</i> test	210,500
Wilcoxon W	441,500
Z	-0,512
Sig. tiệm cận (song phương)	0,108

Không có các khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm điều trị, tức là chế phẩm probiotic theo sáng chế đối với giả dược, mà được quan sát dựa trên phân tích biến trong các ngày dùng chất kháng histamin trong tháng điều trị thứ nhất (Bảng 6). Biến này được phân tích bằng cách sử dụng thử nghiệm với mức năm phần trăm (5%) ý nghĩa thống kê đối với mỗi nhóm điều trị.

Bảng 6. Phân tích các chất histamin được sử dụng trong mỗi nhóm điều trị một tháng sau đường chuẩn. Biến tạo nhóm được sử dụng để thu được dữ liệu được thể hiện là loại điều trị: chế phẩm probiotic theo sáng chế so với giả dược.

Phân tích thống kê	V3 Tổng số ngày điều trị bằng chất kháng histamin
Mann-Whitney <i>U</i> test	220,500
Wilcoxon W	473,500
Z	-0,578
Sig. tiệm cận (song phương)	0,563

Bảng 7 tóm tắt dữ liệu đối với hiệu quả của chế phẩm probiotic theo sáng chế trong điều trị viêm da dị ứng AD sau một tháng dùng, cụ thể là liên quan đến các biến được phân tích: chỉ số SCORAD, sử dụng các corticosteroid dùng khu trú và các chất kháng histamin, như được so sánh với nhóm giả dược.

Bảng 7. Chỉ số SCORAD, tổng số ngày sử dụng corticosteroid và tổng số ngày sử dụng chất kháng histamin trong nhóm được điều trị bằng chế phẩm probiotic theo sáng chế so với nhóm giả dược.

	Điều trị	Khoảng trung bình	Tổng các khoảng	Ý nghĩa thống kê
SCORAD 1 tháng	Giả dược	26,28	525,50	0,016
	Chế phẩm	17,16	377,50	
% cải thiện SCORAD 1 tháng	Giả dược	14,45	289,00	0,000
	Chế phẩm	27,91	614,00	
V3 Tổng corticosteroid	Giả dược	21,02	441,50	0,608
	Chế phẩm	22,93	504,50	
V3 Tổng chất kháng histamin	Giả dược	22,50	472,50	0,563
	Chế phẩm	21,52	473,50	

Nhiều phân tích hồi quy tuyến tính được tiến hành để đánh giá tác dụng điều trị độc lập bằng chế phẩm probiotic theo sáng chế so với các biến khác mà có thể ảnh hưởng đến SCORAD. Trong phân tích này, biến SCORAD được nhập là biến phụ thuộc. Ngoài biến "loại điều trị", các biến sau đây được bao gồm: "tổng số ngày điều trị bằng chất kháng histamin", "tổng số ngày điều trị bằng corticosteroid" và "SCORAD ở đường chuẩn" của thử nghiệm lâm sàng.

Một tháng sau khi điều trị, chỉ có biến liên quan đáng kể đến chỉ số SCORAD là loại điều trị. Do đó, nhóm được chỉ định điều trị bằng chế phẩm probiotic theo sáng chế liên quan đến việc giảm tuyệt đối trong SCORAD là 9,07 điểm. Tức là, trong số tổng số giảm về SCORAD quan sát được trong nhóm điều trị bằng chế phẩm probiotic theo sáng chế trong suốt tháng thứ nhất, chế phẩm theo sáng chế chiếm sáu mươi sáu phần trăm (66%) của thay đổi này (9,07 trên 13,69 điểm SCORAD). Không có biến cho tổng số ngày điều trị bằng chất kháng histamin cũng như tổng số ngày điều trị bằng corticosteroid là liên quan đến chỉ số SCORAD.

Hơn nữa, sự tiêu thụ corticosteroid hệ thống được đánh giá theo cùng cách như được mô tả đối với việc tiêu thụ corticosteroid dùng khu trú, như biến thứ cấp được mô tả trước. Các kết quả thu được đối với việc tiêu thụ corticosteroid hệ thống không thể hiện các khác biệt đáng kể liên quan đến việc sử dụng các hợp chất này giữa hai nhóm điều trị: chế phẩm theo sáng chế so với giả dược.

Các bệnh nhân tham gia thử nghiệm chỉ ra rằng họ đã chịu các tác dụng ngược nhỏ như đầy hơi trong năm ngày điều trị đầu tiên: ba mươi phần trăm (30%) bệnh nhân dùng chế phẩm theo sáng chế so với mười bốn phần trăm (14%) ở nhóm giả dược.

Tóm lại, trong ví dụ này, các kết quả thể hiện rằng việc dùng chế phẩm probiotic theo sáng chế để điều trị AD có các ưu điểm đối với hiệu quả và khả năng dung nạp so với các kênh đối với các bệnh nhân được điều trị bằng giả dược. Do đó, các thông số được phân tích thể hiện sự cải thiện đáng kể về chỉ số SCORAD ở các bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD được điều trị bằng chế phẩm probiotic theo sáng chế so với nhóm bệnh nhân được điều trị bằng giả dược. Sự cải thiện này có thể được quan sát từ tháng thứ nhất dùng chế phẩm probiotic theo sáng chế, với sự cải thiện được duy trì hoặc tăng lên ở các phân tích tiếp theo ở tháng điều trị thứ 2 và 3.

Hơn nữa, liên quan đến tổng số ngày mà bệnh nhân ở mỗi nhóm phải dùng các corticosteroid dùng khu trú, mặc dù giá trị trung bình này cao hơn một chút ở nhóm dùng chế phẩm probiotic theo sáng chế so với nhóm giả dược (3,3% so với 2,6%), sự khác biệt này là không đáng kể. Ngược lại, về phân tích tiêu thụ corticoid ở mức trong đối tượng hoặc mức trong nhóm (so sánh dùng corticosteroid ở đường chuẩn và ở cuối nghiên cứu trong cùng nhóm), xu hướng diễn biến theo thời gian của việc tiêu thụ steroid thấp hơn được quan sát ở nhóm dùng chế phẩm probiotic theo sáng chế (tiêu thụ các steroid giảm năm mươi năm phần trăm (55%) như được so với nhóm giả dược

(giảm tám phần trăm (8%) trong suốt thời gian theo dõi), mà đạt được ý nghĩa thống kê trong trường hợp này.

Ví dụ 3: Phân tích các tác dụng của việc sử dụng chế phẩm probiotic theo sáng chế trong ngăn ngừa các bùng phát AD.

Trong số hai mươi (20) bệnh nhân mắc viêm da dị ứng AD tham gia trong nghiên cứu này, phân tích tạm thời được tiến hành đối với các bệnh nhân này đạt chỉ số SCORAD là 6. Nhóm bệnh nhân này được đưa vào kiểm soát đặc biệt cho đến khi hoàn thành giai đoạn điều trị ba tháng. Mười (10) bệnh nhân tiếp nhận giả dược (Fig.11, đường màu đen) và chín (9) bệnh nhân tiếp nhận probiotic (Fig.11, màu xám).

Fig.11 thể hiện các kết quả kiểm soát số bùng phát AD ở tất cả các bệnh nhân này từ lúc kết thúc 3 tháng điều trị bằng probiotic cho đến khi 12 sau khi kết thúc điều trị. Do đó, Fig.11 thể hiện xu hướng theo số bệnh nhân mắc bùng phát AD mới (Fig.11A), tổng số bệnh nhân có các bùng phát AD mới (Fig.11B), và phần trăm các bệnh nhân không có các bùng phát mới (Fig.11C); Xem xét tất cả các bệnh nhân được điều trị trước đây, Fig.11 thể hiện số bùng phát, số bệnh nhân và phần trăm các bệnh nhân mắc các AD mới trong giai đoạn 12 tuần không điều trị, là cao hơn trong số các bệnh nhân được tiếp nhận giả dược trước đây so với trong số các bệnh nhân đã tiếp nhận probiotic trước đây.

Do đó, trong tập hợp con các bệnh nhân này, các bệnh nhân điều trị bằng chế phẩm probiotic theo sáng chế lần lượt đã thể hiện sự tái phát thấp và/hoặc tốc độ hủy hoại hơn so với nhóm được điều trị bằng giả dược (1 trên 10 (10%) so với 5 trên 9 (55%)) (Fig.11B).

Các khác biệt giữa hai nhóm can thiệp có ý nghĩa thống kê trong giai đoạn đánh giá ba tháng sau khi việc kiểm soát bắt đầu, đối với ba biến được phân tích.

Dữ liệu chứng minh hiệu quả của probiotic đối với việc ngăn ngừa sự xuất hiện các bùng phát AD mới là: trong ba than sau khi gián đoạn điều trị bằng chế phẩm probiotic nêu trên, các cá thể đã được điều trị bằng chế phẩm này có ít bùng phát hơn và do đó, thời gian không có bệnh lâu hơn so với các bệnh nhân không tiếp nhận điều trị.

Các kết quả này chứng tỏ rằng việc sử dụng chế phẩm theo sáng chế là có hiệu quả trong ngăn ngừa các bùng phát AD mới. Do đó, trong ba tháng sau khi gián đoạn

điều trị bằng chế phẩm probiotic theo sáng chế, các bệnh nhân đã điều trị bằng chế phẩm có ít bùng phát bệnh hơn và do đó, giai đoạn không có bệnh lâu hơn so với các bệnh nhân tiếp nhận giả dược.

Yêu cầu bảo hộ

1. Chế phẩm probiotic bao gồm *Bifidobacterium animalis* phân loài (*B. lactis*), *Bifidobacterium longum* và *Lactobacillus casei*.
2. Chế phẩm probiotic theo điểm 1, trong đó *B. lactis* là *B. lactis* CECT 8145, và/hoặc *B. longum* là *B. longum* CECT 7347 và/hoặc *L. casei* là *L. casei* CECT 9104.
3. Chế phẩm probiotic theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chế phẩm probiotic là dược phẩm hoặc chế phẩm dinh dưỡng.
4. Chế phẩm probiotic theo điểm 3, trong đó dược phẩm bao gồm chất mang dược dụng và/hoặc tá dược.
5. Chế phẩm probiotic theo điểm 3 hoặc 4, trong đó dược phẩm được bào chế để dùng ở dạng lỏng hoặc ở dạng rắn.
6. Chế phẩm probiotic theo điểm 5, trong đó chế phẩm dạng rắn được chọn từ nhóm bao gồm viên nén, viên thuốc hình thoi, kẹo, viên nén nhai được, kẹo cao su, viên nang, túi, bột, hạt, hạt được bao hoặc viên nén được bao, viên nén và viên nén kháng dịch dạ dày và viên nang và dải phân tán được và/hoặc màng.
7. Chế phẩm probiotic theo điểm 5, trong đó chế phẩm dạng lỏng được chọn từ nhóm bao gồm dung dịch dùng qua đường miệng, thể huyền phù, nhũ tương và sirô.
8. Chế phẩm probiotic theo điểm 3, trong đó chế phẩm dinh dưỡng là thực phẩm hoặc chất bổ sung dinh dưỡng.
9. Chế phẩm probiotic theo điểm 8, trong đó thực phẩm được chọn từ nhóm bao gồm nước ép quả hoặc nước ép rau, kem, sữa công thức, sữa, sữa chua, bơ, sữa lên men, sữa bột, ngũ cốc, sản phẩm nướng, các sản phẩm có nguồn gốc từ sữa, sản phẩm thịt và đồ uống.

10. Chế phẩm probiotic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó chế phẩm này còn bao gồm vi sinh vật được chọn từ nhóm bao gồm *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Kluyveromyces sp.* và tổ hợp của chúng.

11. Chế phẩm probiotic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó tổng nồng độ vi sinh vật của các chủng *B. lactis*, *L. casei* và *B. longum* trong chế phẩm nằm trong khoảng từ 10^3 đến 10^{12} cfu, tốt hơn là 10^9 cfu.

12. Chế phẩm probiotic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 11, trong đó nồng độ *B. longum* ít nhất là nằm trong khoảng từ 30% đến 40% so với tổng nồng độ vi sinh vật có mặt trong chế phẩm; và/hoặc nồng độ *B. lactis* ít nhất là nằm trong khoảng từ 30% đến 40% so với tổng nồng độ vi sinh vật; và/hoặc nồng độ *L. casei* ít nhất là nằm trong khoảng từ 25% đến 35% so với tổng nồng độ vi sinh vật.

13. Chế phẩm probiotic theo điểm 12, trong đó nồng độ *B. longum* là 35% so với tổng nồng độ vi sinh vật có mặt trong chế phẩm; nồng độ *B. lactis* là 35% so với tổng nồng độ vi sinh vật, và/hoặc nồng độ *L. casei* là 30% so với tổng nồng độ vi sinh vật.

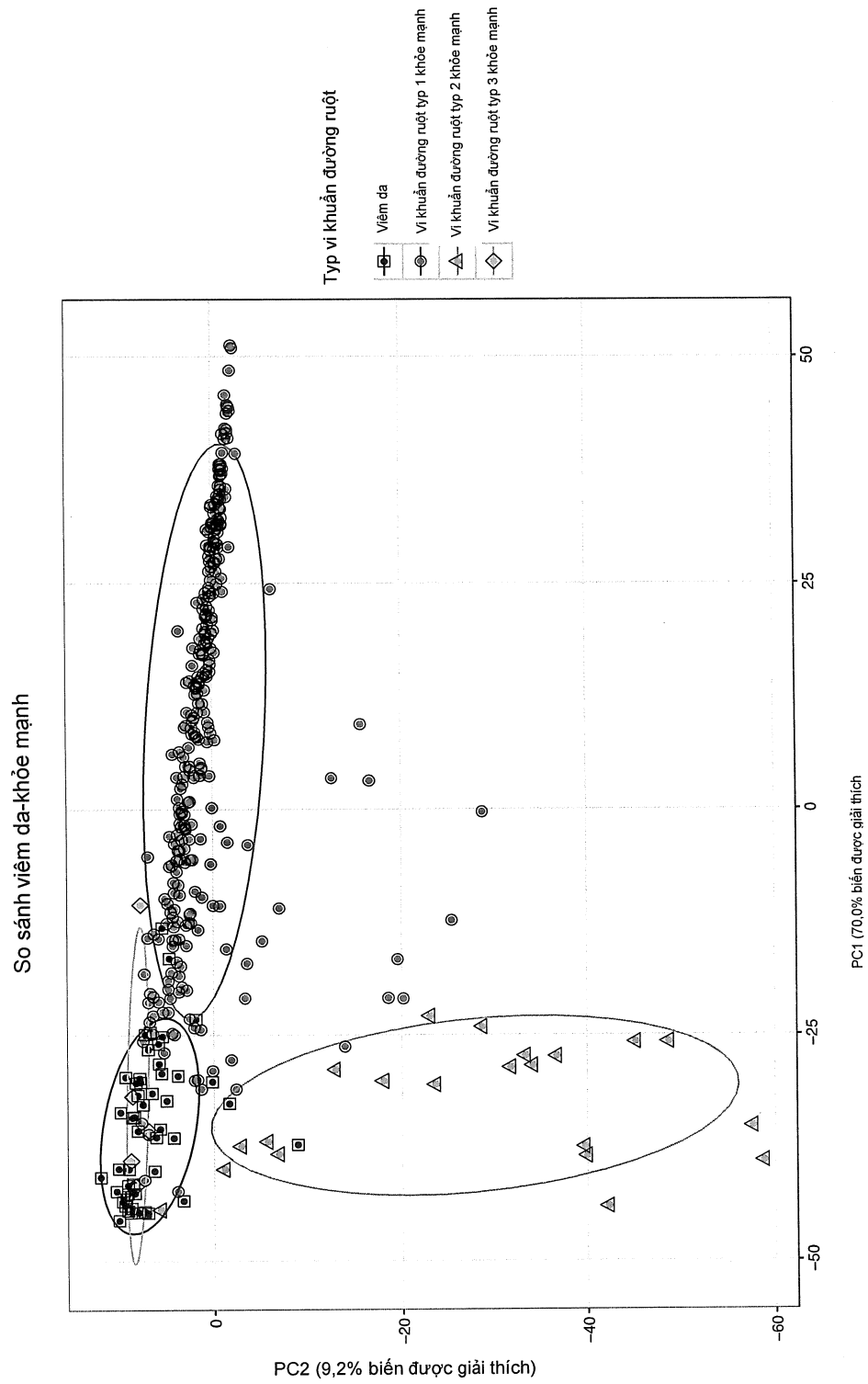
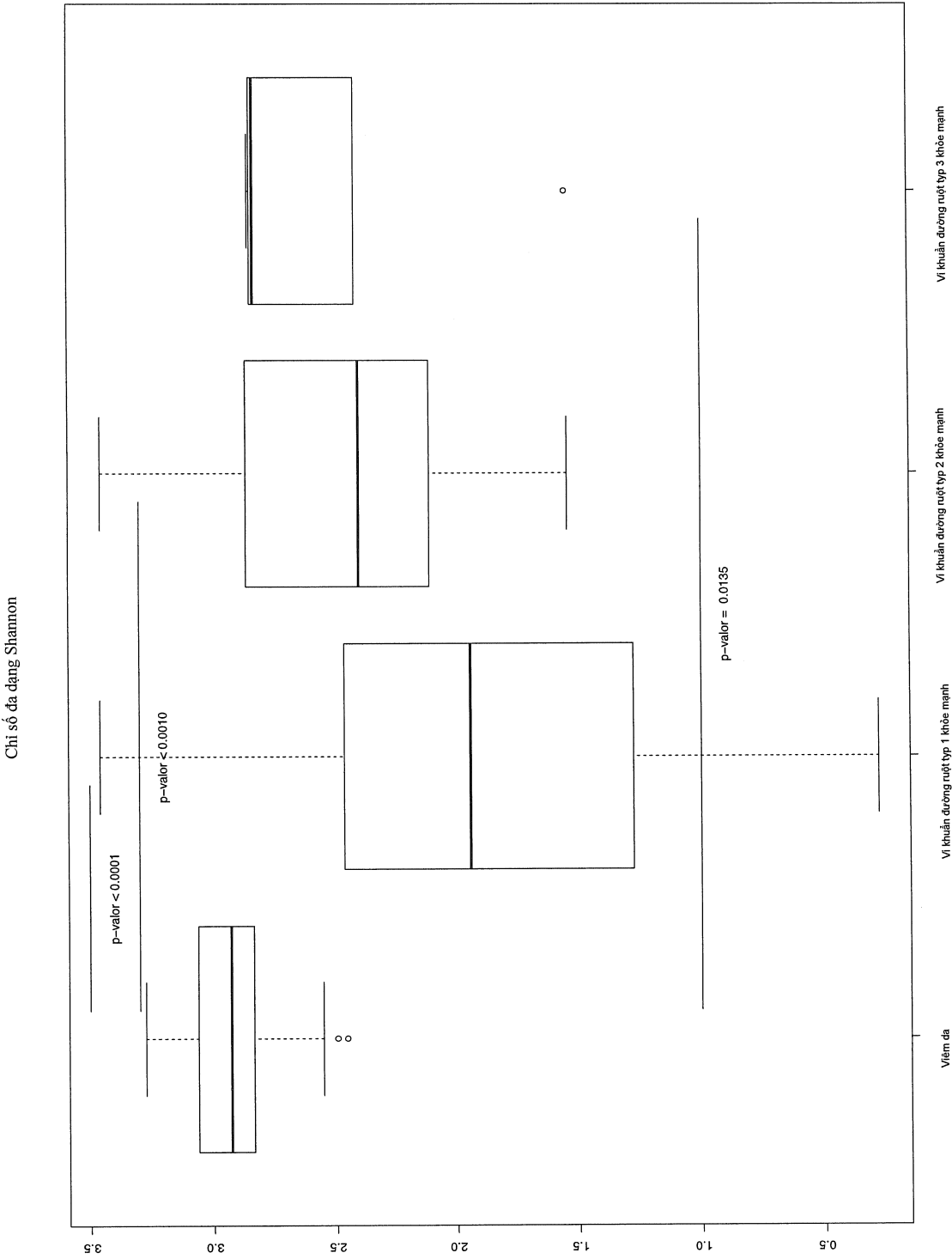


FIG.1



IG.
2

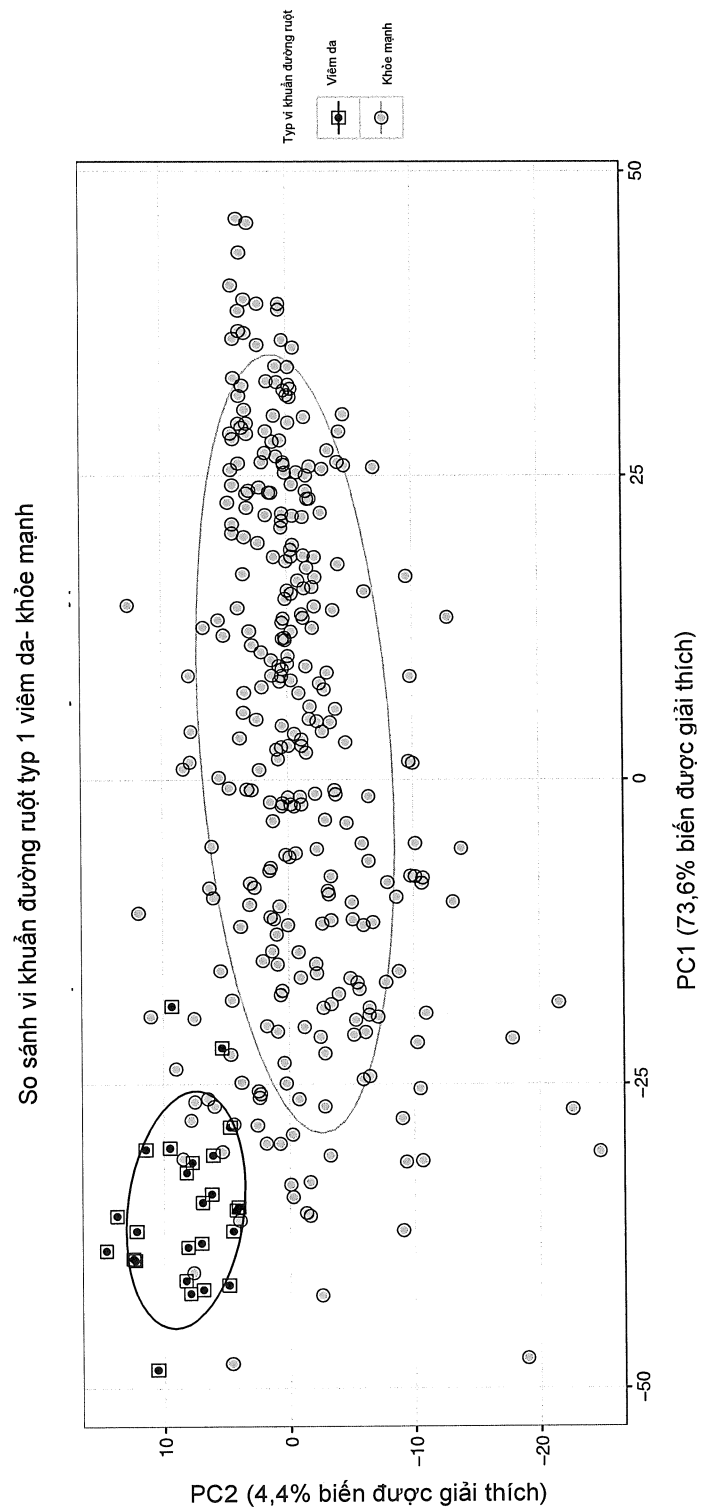


FIG. 3

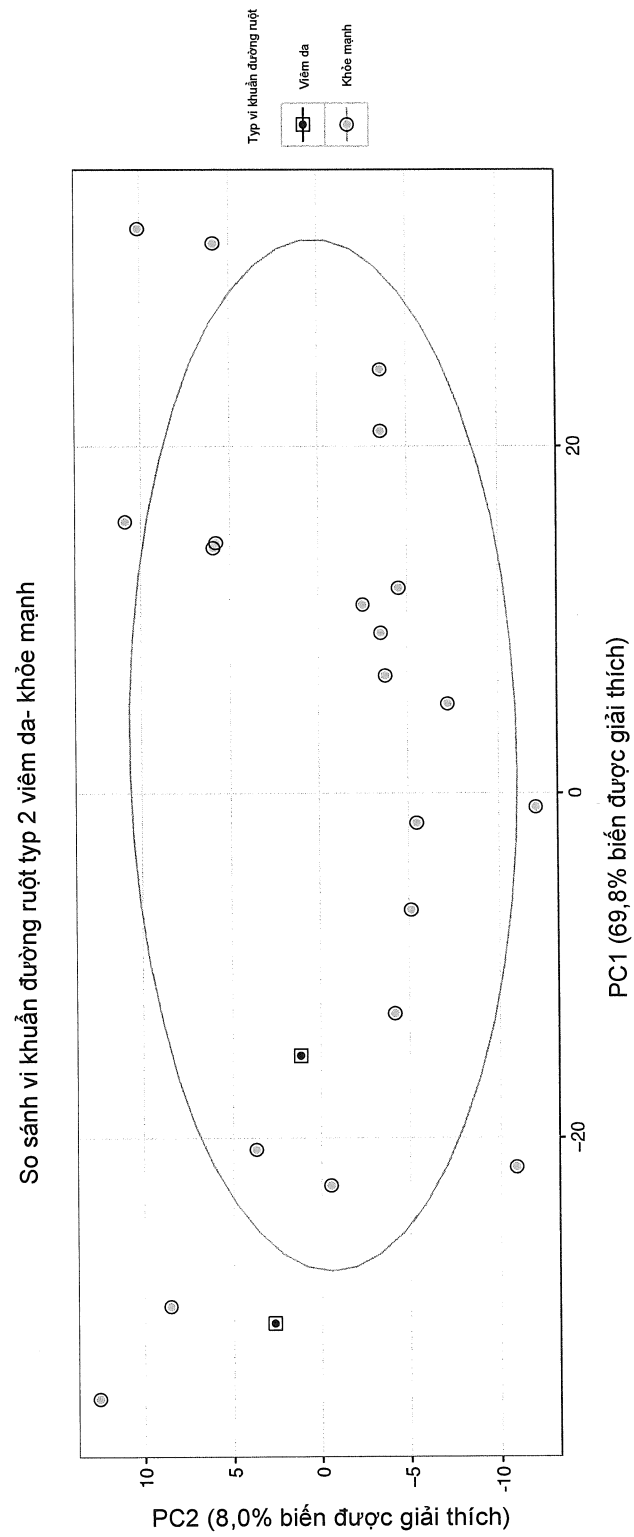
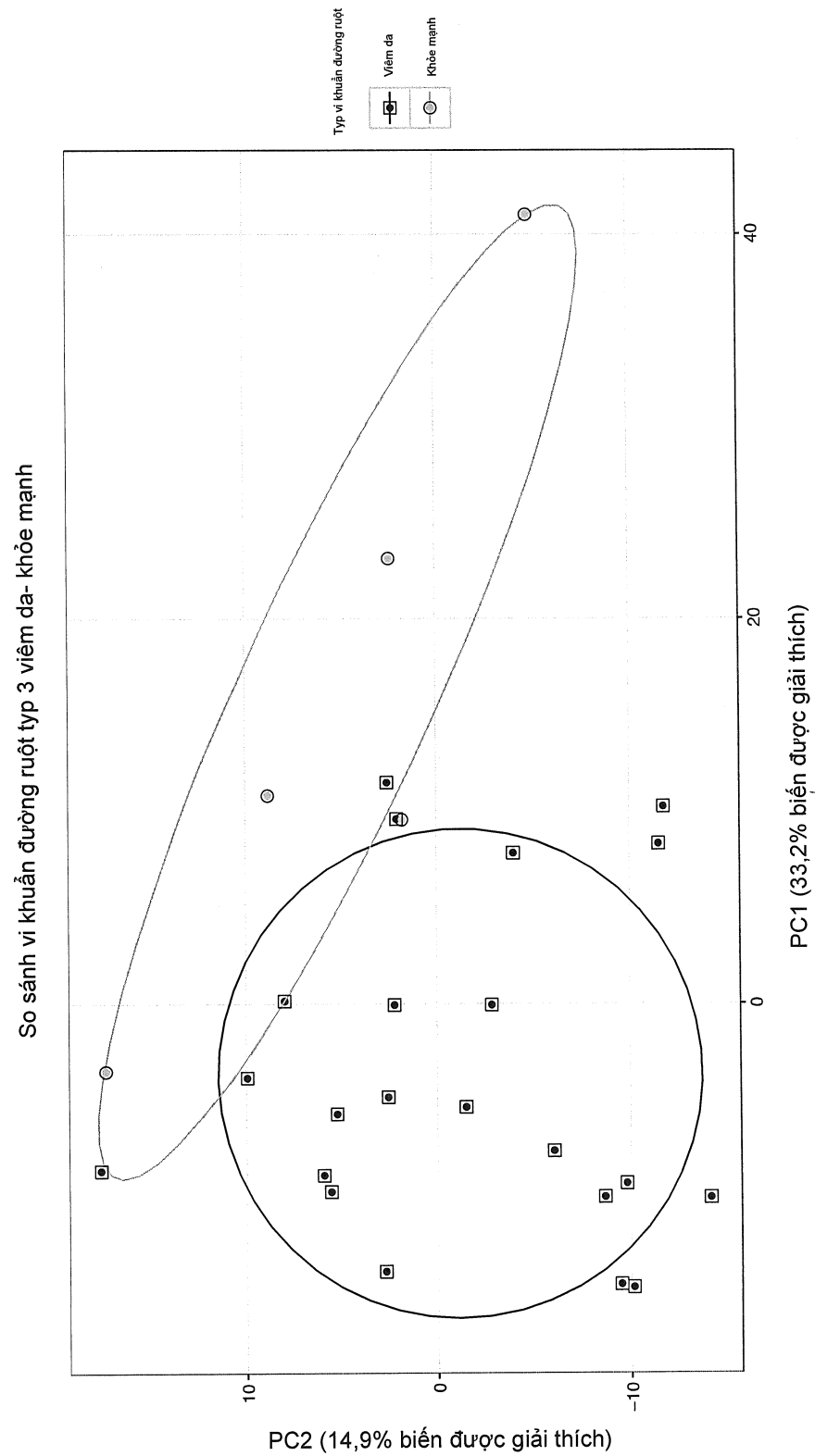
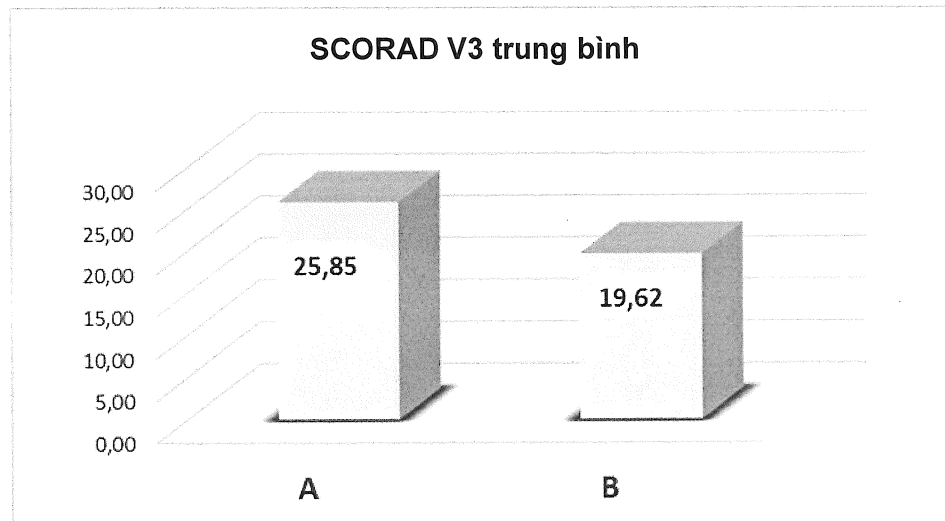


FIG. 4



A



B

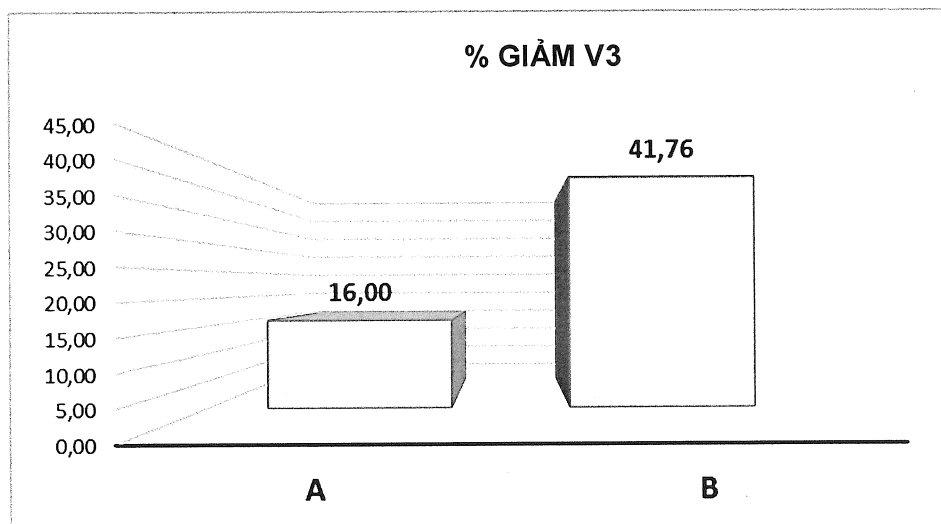
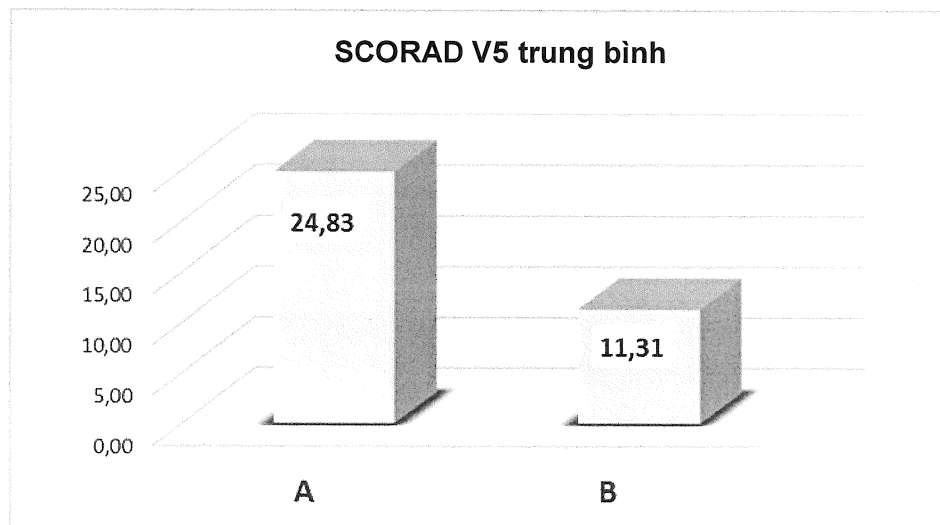


FIG. 6

A



B

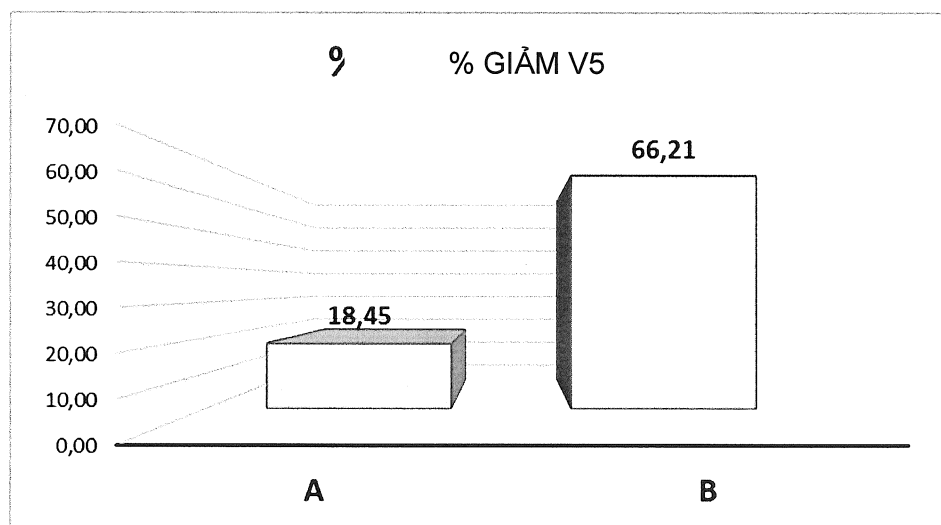
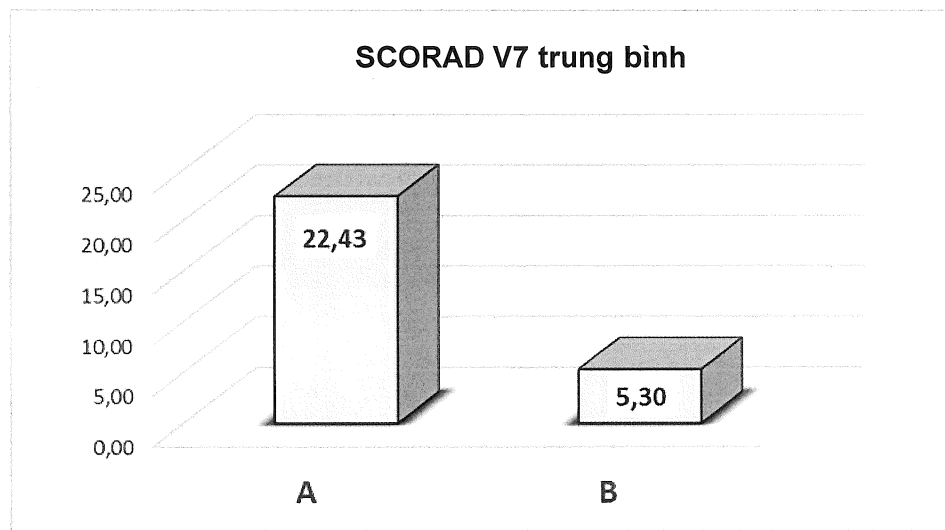


FIG. 7

A



B

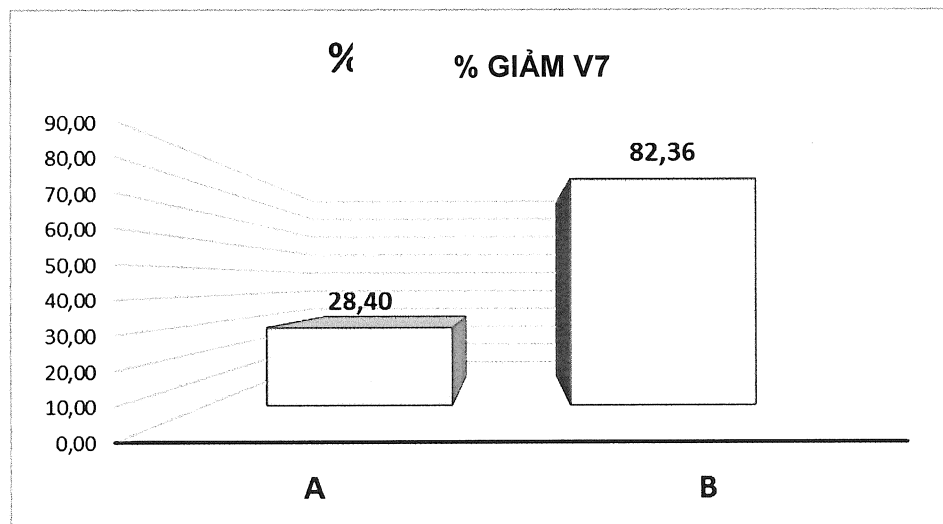
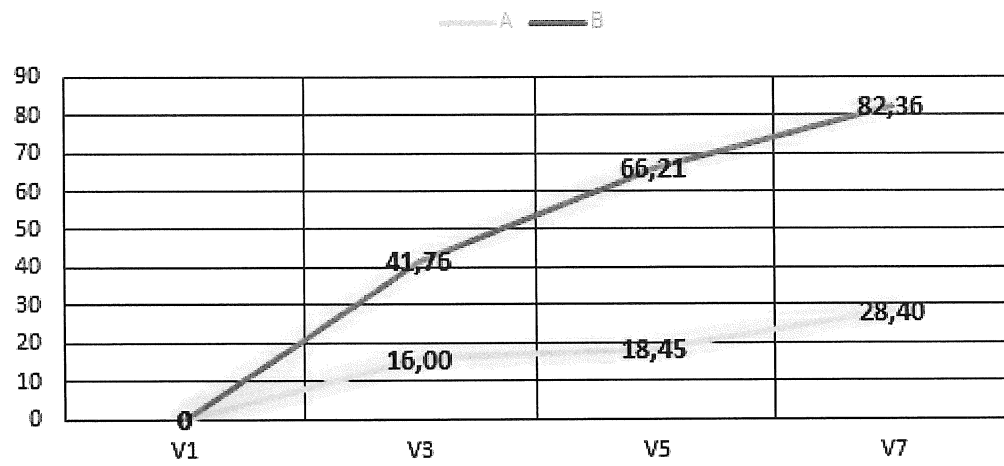
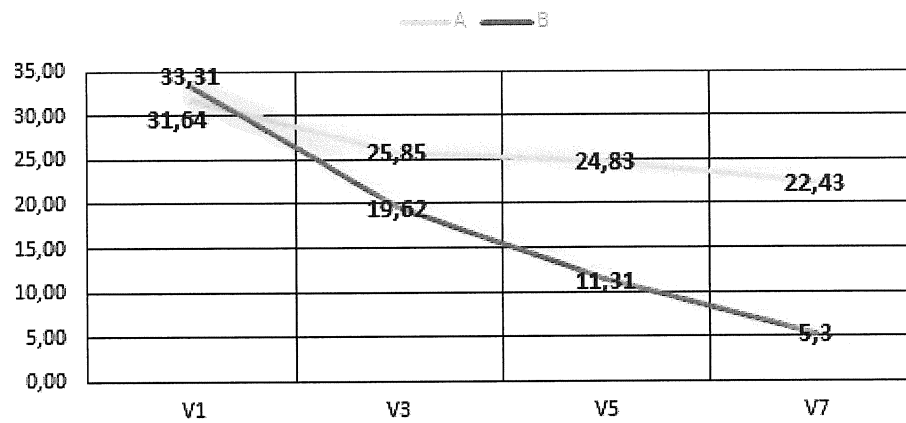


FIG. 8

% GIẢM SCORAD**FIG. 9****TIẾN TRIỂN SCORAD****FIG. 10**

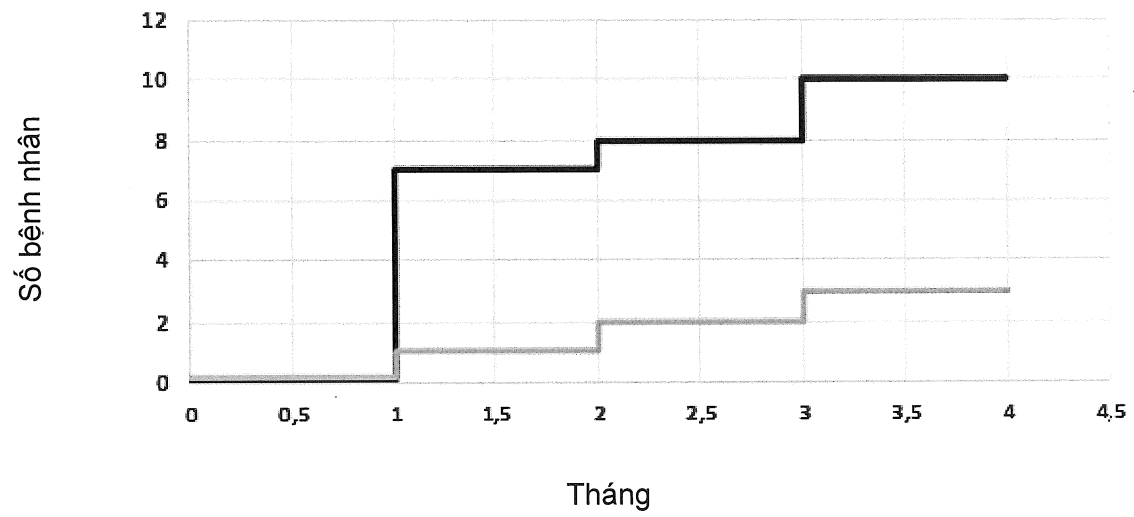


FIG. 11A

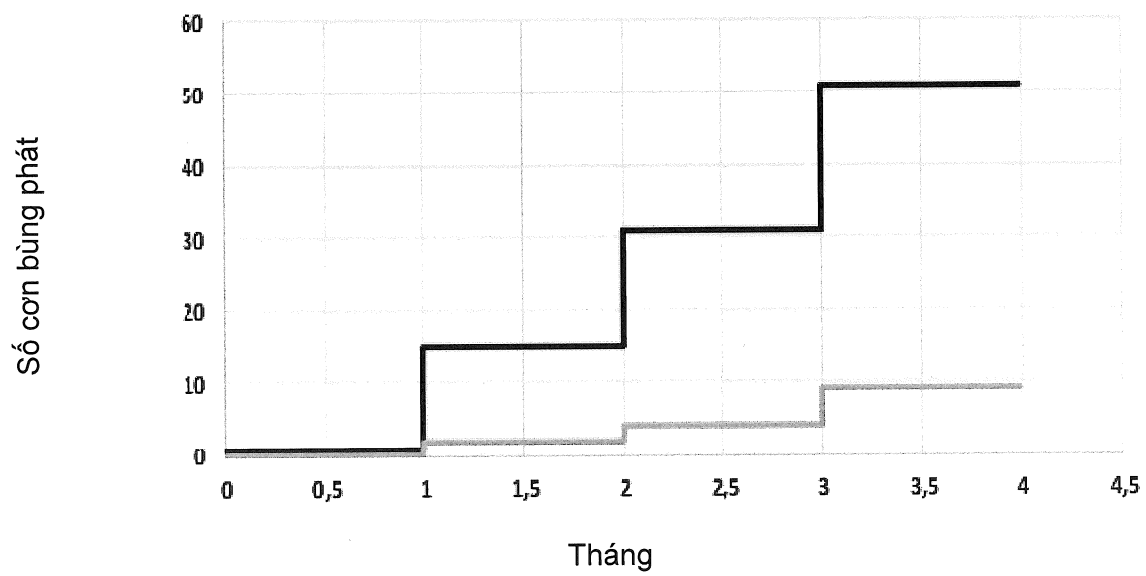


FIG. 11B

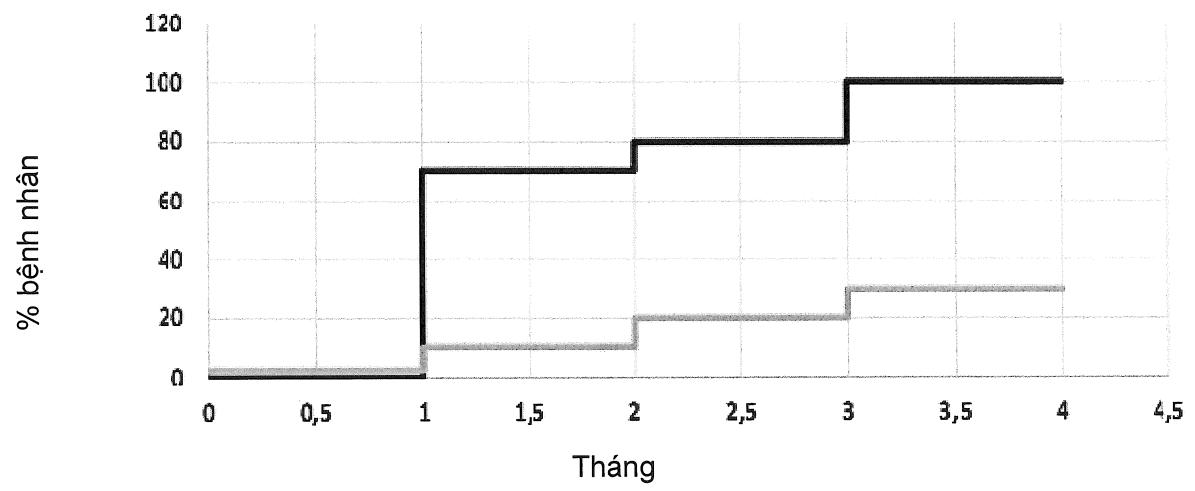


FIG. 11C