



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

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

(11)



2-0003714

(51) **C12Q 1/68**
2022.01

(13) **Y**

(21) 2-2023-00450

(22) 04/12/2020

(67) 1-2020-07045

(45) 25/09/2024 438

(43) 25/02/2021 395

(73) Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội (VN)
334 Nguyễn Trãi, quận Thanh Xuân, thành phố Hà Nội

(72) Bùi Thị Việt Hà (VN); Nguyễn Thị Vân Anh (VN); Trần Thị Thanh Huyền (VN);
Mai Thị Đàm Linh (VN); Phan Thùy Dương (VN).

(54) **CHẾ PHẨM VIÊN ĐẶT PHỤ KHOA ĐỂ HỖ TRỢ NGĂN NGỪA VÀ ĐIỀU TRỊ
BỆNH VIÊM NHIỄM ÂM ĐẠO VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VIÊN
ĐẶT PHỤ KHOA NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm viên đặt phụ khoa chứa các probiotic để hỗ trợ ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm âm đạo do nhiễm khuẩn hoặc nấm gây ra. Chế phẩm viên đặt phụ khoa theo sáng chế chứa vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 với một tỷ lệ cho phép đồng thời sinh trưởng và phát triển trong môi trường âm đạo, tạo màng và cân bằng môi trường pH thích hợp, giúp ức chế vi khuẩn gây bệnh phát triển, nhưng không gây kích ứng viêm. Ngoài ra sáng chế còn đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm viên đặt phụ khoa chứa các probiotic này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ vi sinh, cụ thể là sáng chế đề cập đến chế phẩm viên đặt phụ khoa để hỗ trợ ngăn ngừa và điều trị viêm nhiễm âm đạo và quy trình sản xuất chế phẩm này. Chế phẩm probiotic chứa lợi khuẩn thuộc họ *Lactobacillus*, cụ thể là bao gồm hai chủng *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 cho phép cân bằng hệ vi sinh trong môi trường âm đạo, giúp hỗ trợ ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm nhiễm âm đạo.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Viêm nhiễm phụ khoa hiện nay được coi là bệnh nhiễm trùng phổ biến ở các nước nhiệt đới như Việt Nam, khoảng 90% phụ nữ trong độ tuổi sinh đẻ mắc bệnh này. Viêm nhiễm phụ khoa có thể gây ra những khó chịu, ảnh hưởng đến sức khỏe, đời sống, khả năng lao động của phụ nữ. Bệnh cũng có thể gây ra những hậu quả nặng nề như: chửa ngoài tử cung, vô sinh, ung thư cổ tử cung. Ở phụ nữ đang mang thai, nếu bị viêm âm đạo, cổ tử cung có thể gây sảy thai, đẻ non, ối vỡ non, nhiễm khuẩn ối, nhiễm khuẩn sơ sinh. Viêm âm đạo do vi khuẩn là bệnh phổ biến trong các bệnh lý nhiễm trùng đường sinh dục dưới của phụ nữ trong độ tuổi sinh sản. Các tác nhân chính gây ra bệnh viêm âm đạo chủ yếu bởi các vi khuẩn như *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, nấm. Các vi khuẩn kỵ khí này, phát triển quá mức và thay thế nhóm vi khuẩn có lợi của âm đạo.

Probiotic có nhiều cơ chế kháng khuẩn âm đạo và cân bằng hệ vi sinh đường sinh dục ở phụ nữ như sinh chất kháng khuẩn, H_2O_2 , sản sinh axit lactic, hay khả năng bám dính lên niêm mạc âm đạo để cạnh tranh, ức chế sự sinh trưởng của các vi sinh vật gây bệnh. Đã có nhiều nghiên cứu chứng minh tác dụng của các probiotic thuộc chi *Lactobacillus* trong việc hỗ trợ điều trị viêm nhiễm âm đạo. Ví dụ đầu tiên là thử nghiệm của Falagas và cộng sự (Falagas, 2007) về tác dụng của viên nén *Lactobacillus acidophilus* đặt ở âm đạo trong 6-12 ngày hay uống *L. acidophilus* hoặc *L. rhamnosus* GR-1 và *L. fermentum* RC-14 trong 2 tháng có thể giúp chữa trị và làm giảm sự tái phát nhiễm khuẩn âm đạo đồng thời giúp gia tăng *lactobacilli* trong âm đạo và phục

hồi một hệ vi sinh âm đạo bình thường một cách thường xuyên hơn là dùng axit axetic hoặc không điều trị. Mastromarino và cộng sự (Mastromarino et al., 2008) cũng đã tiến hành nghiên cứu xác định hiệu quả của viên nén đặt âm đạo chứa *Lactobacilli* trong điều trị nhiễm khuẩn âm đạo và trong việc khôi phục hệ vi sinh vật âm đạo khỏe mạnh trên 39 phụ nữ có so sánh với nhóm sử dụng giả dược. Sản phẩm được chỉ định dùng liên tục trong 7 ngày. Các chỉ số lâm sàng, điểm số Gram âm đạo và các triệu chứng đã được so sánh với những người ở lần khám đầu tiên và những người đã hoàn thành điều trị và 2 tuần sau đó. Sau khi hoàn thành điều trị, tất cả bệnh nhân trong nhóm sử dụng *Lactobacilli* ($n = 18$) không còn nhiễm khuẩn âm đạo, cho thấy hệ vi sinh vật âm đạo bình thường (83%) hoặc trung gian (17%). Ngược lại, chỉ có 2 bệnh nhân không còn nhiễm khuẩn âm đạo, hệ vi sinh vật âm đạo trung gian (12%) trong số 16 phụ nữ được điều trị bằng giả dược ($p < 0,001$). Hai tuần sau khi hoàn thành điều trị, việc điều trị đã thành công với 61% số bệnh nhân được điều trị bằng *Lactobacilli* so với 19% số bệnh nhân điều trị thành công được điều trị bằng giả dược ($p < 0,05$). Trong nhóm điều trị, tổng số bệnh nhân có triệu chứng và cường độ của các triệu chứng nhiễm khuẩn âm đạo đặc biệt là viêm âm đạo đã giảm đáng kể ở cả hai lần theo dõi tiếp theo. Macklaim và cộng sự (Macklaim, 2015) khi kết hợp điều trị kháng sinh kèm với probiotic *L. reuteri* RC-14 và *L. rhamnosus* GR-1 sử dụng qua đường uống cho các bệnh nhân thì thu được kết quả: số lượng *L. iners* hoặc *L. crispatus* gia tăng mạnh ở âm đạo phụ nữ cùng với khả năng phục hồi cân bằng nội mô dẫn đến việc sử dụng kết hợp probiotic và kháng sinh trong điều trị nhiễm khuẩn âm đạo. Điều đó chứng tỏ khả năng khôi phục cân bằng nội mô có liên quan đến việc sử dụng kết hợp probiotic với điều trị kháng sinh trong việc nhiễm khuẩn âm đạo hiệu quả. Trong một nghiên cứu khác về đánh giá tác dụng chế phẩm sinh học probiotics dạng thuốc đặt âm đạo đã được thực hiện trên 35 phụ nữ khỏe mạnh trong nghiên cứu của Maria (Maria, 2016), mỗi phụ nữ được kiểm tra ba lần trong quá trình nghiên cứu. Người tình nguyện được hướng dẫn nhận và sử dụng thuốc đặt SYN BIO (*L. rhamnosus* IMC 501 và *L. paracasei* IMC 502) mỗi ngày và duy trì trong 7 ngày. Các miếng gạc âm đạo được thu thập 3 lần, mỗi lần cách nhau 7 ngày sau khi sử dụng SYN BIO để xác định số lượng *Lactobacilli* có mặt, giá trị pH và chẩn đoán BV dựa vào thang điểm hình thái vi khuẩn của Nugent trên tiêu bản nhuộm Gram (quan sát trên 10 vi trường) và chẩn đoán xác định BV khi đạt từ 7 - 10 điểm (Nugent, 1991). Khi đánh giá khả năng dung nạp

trong điều trị được dựa trên phân tích các loại và sự xuất hiện của các tác dụng bất lợi, kết quả thu được cho thấy thuốc đặt âm đạo probiotic được dung nạp tốt và không có tác dụng phụ nào đã được báo cáo. Điểm số Nugent trung gian đã được ghi chép lại ở 40% phụ nữ tại lần khám thứ nhất và các điểm trung gian này trở lại bình thường vào ngày thứ 7 (kết thúc điều trị) ở 20% phụ nữ tham gia. SYN BIO đã góp phần làm tăng đáng kể lượng *Lactobacilli* tại lần khám thứ 2. Các kỹ thuật sinh học phân tử đã cho thấy sự hiện diện của hai chủng có nguồn gốc từ SYN BIO ở 100% phụ nữ khám lần 2 và 34% khi đến thăm khám lần 3. Không có thay đổi đáng kể nào được ghi nhận về độ pH giữa các lần thăm khám.

Trên thị trường hiện nay một số sản phẩm probiotic nhập ngoại chứa các chủng thuộc chi *Lactobacillus* được khuyến cáo sử dụng hỗ trợ điều trị các bệnh viêm nhiễm âm đạo và đường tiết niệu, ví dụ như sản phẩm Optibac của Anh chứa 2,3 tỷ vi khuẩn, gồm 2 chủng *Lactobacillus rhamnosus* GR-1® và *Lactobacillus reuteri* RC-14, sản phẩm ReNew Life Ultimate Flora Vaginal Support Probiotic của Hoa Kỳ bao gồm 10 loại vi khuẩn khác nhau trong đó chủ yếu là các *Lactobacillus*, sản phẩm Fem-Dophilus® của Hoa Kỳ chứa hơn 1 tỷ vi khuẩn gồm 2 chủng *Lactobacillus rhamnosus* GR-1® và *Lactobacillus reuteri* RC-14®, sản phẩm Jarro-Dophilus Probiotics For Women của Mỹ gồm 4 loài *Lactobacillus* thường có mặt trong âm đạo phụ nữ: *L. crispatus* LbV 88, *L. gasseri* LbV 150, *L. jensenii* LbV 116, *L. rhamnosus* LbV 96. Nhìn chung các sản phẩm đó đều có tác dụng duy trì khu hệ vi sinh vật âm đạo khỏe mạnh, giúp giảm bớt sự kết dính của vi khuẩn vào đường tiết niệu, giúp giảm tần suất viêm bàng quang tái phát và hỗ trợ hệ thống miễn dịch khỏe mạnh.

Với nhiều ưu điểm sử dụng các loài *Lactobacillus* có lợi thế rất lớn trong việc chế các vi khuẩn gây viêm nhiễm âm đạo. Mặc dù các chế phẩm đang lưu hành trên thị trường có khả năng bảo vệ phụ nữ khỏi những bệnh viêm nhiễm phụ khoa, tuy nhiên do các chế phẩm này được phát triển từ những vi sinh vật ở các vùng, miền khác nhau nên hiệu quả không được như mong muốn, các chế phẩm này thường nhanh chóng giảm hiệu quả do khác biệt hệ vi sinh vật lây nhiễm cũng như độc tính ngày càng cao của vi sinh vật gây bệnh. Do đó, vẫn luôn có nhu cầu phát triển những chế phẩm viên đặt phụ khoa trên cơ sở các vi sinh vật có lợi mới, cho phép ức chế, đàn áp được vi sinh vật gây bệnh để có khả năng hỗ trợ, ngăn ngừa, điều trị cấp đồng thời duy trì được hệ vi sinh âm đạo khỏe mạnh, giúp tăng chất lượng cuộc sống.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, bằng cách phân lập và phối hợp các chủng vi sinh hữu ích cho phép chúng phát triển và cân bằng pH trong môi trường âm đạo, sáng chế đã phát triển chế phẩm ức chế sự phát triển cân bằng hệ vi sinh trong môi trường âm đạo, giúp hỗ trợ ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm nhiễm âm đạo. Theo đó, sáng chế đề cập đến chế phẩm viên đặt phụ khoa để hỗ trợ ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm âm đạo và quy trình sản xuất chế phẩm này.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chế phẩm viên đặt phụ khoa để hỗ trợ ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm âm đạo, trong đó chế phẩm này ở dạng viên nén bao gồm hỗn hợp tá dược rắn và ít nhất 1×10^9 CFU/g tế bào vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1 và 2×10^8 CFU/g tế bào vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.2 và hai chủng vi khuẩn này có số nộp lưu lần lượt là H1 và H2 tại phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó chế phẩm này có tổng lượng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 có khả năng phát triển trong môi trường âm đạo đạt ít nhất 10^9 CFU/g.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm viên đặt phụ khoa để hỗ trợ ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm âm đạo theo sáng chế, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) hoạt hóa chủng giống gốc bằng cách thu nhận chủng giống gốc vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 có số nộp lưu H1 và H2, tương ứng từ phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam, tiếp đó độc lập cấy các chủng giống gốc này vào môi trường MRS và nuôi cấy trong điều kiện lắc, nhiệt độ khoảng từ 35 đến 45°C trong từ 1 đến 2 ngày để thu chủng giống gốc vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 được hoạt hóa;

b) chuẩn bị môi trường lên men bằng cách hòa với nước cất các thành phần bao gồm glucoza từ 18 đến 20 g/l, pepton từ 9 đến 12g/l, cao nấm men từ 13 đến 17g/l,

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ từ 1 đến 3g/l, Tween 80 từ 0,8 đến 1,2 ml/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ từ 0,1 đến 0,3g/l, $MnSO_4$ từ 0,02 đến 0,07g/l, CH_3COONa từ 2 đến 6g/l, sau khi khử trùng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100 °C đến 120 °C trong khoảng từ 15 phút đến 20 phút, để nguội thu được môi trường lên men;

c) lên men sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 bằng cách bổ sung độc lập dịch nuôi cấy chủng giống gốc vi khuẩn đã được hoạt hóa vào môi trường lên men theo tỷ lệ từ 0,5 đến 10% (thể tích/thể tích), sau đó nuôi cấy độc lập trong điều kiện kỵ khí ở nhiệt độ từ 35°C đến 45°C, tốc độ khuấy từ 50 đến 100 vòng/phút, pH duy trì trong khoảng từ 6 đến 7 trong khoảng từ 1 đến 2 ngày thu được môi trường nuôi cấy;

d) thu sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm hoặc lọc môi trường nuôi cấy để thu sinh khối, tiếp đó rửa sinh khối bằng dung dịch đệm muối phosphat (PBS) nồng độ từ 10 mM đến 50 mM, trong điều kiện pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0 trong khoảng từ 10 phút đến 30 phút ở nhiệt độ từ 4°C đến 7°C thu được sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2, tương ứng; và

e) thu chế phẩm viên đặt phụ khoa bằng cách hòa tan NaCl, dinatri hydrogenphosphat và KH_2PO_4 theo tỷ lệ 90:7:3 với nước đến nồng độ 10g/l, tiếp đó bổ sung sữa bột tách kem đến nồng độ từ 1,5 đến 2kg/lít rồi bổ sung một lượng sinh khối tế bào vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 đến nồng độ ít nhất 1×10^9 CFU/g và *Lactobacillus reuteri* H2 đến nồng độ ít nhất 2×10^8 CFU/g, cuối cùng bổ sung một lượng dung dịch đệm PBS vừa đủ để thu hỗn hợp dạng sệt, sau khi trộn đều và đông khô chế phẩm này ở nhiệt độ trong khoảng từ -40 °C đến -60 °C trong khoảng từ 20 đến 30 giờ thu được chế phẩm dạng bột màu trắng ngà, sau khi ép tạo viên ở 4°C thu được chế phẩm viên đặt phụ khoa để hỗ trợ ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm âm đạo.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các chủng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 có số nộ lưu H1, chủng vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 có số nộ lưu H2 được lưu tại tại phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là ảnh chụp hình thái khuẩn lạc và nhuộm Gram vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1, trong đó (A) là hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn *Lactobacillus*

rhamnosus H1 mọc trên đĩa thạch và (B) là ảnh nhuộm Gram vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1, (C) là hình ảnh tế bào của chủng *Lactobacillus rhamnosus* H1 dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Hình 2 là ảnh chụp hình thái khuẩn lạc và nhuộm Gram vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2, trong đó (A) là hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 mọc trên đĩa thạch và (B) là ảnh nhuộm Gram vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2, (C) là hình ảnh tế bào của chủng *Lactobacillus reuteri* H2 dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế được mô tả chi tiết với các phương án thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án này chỉ nhằm mục đích mô tả chi tiết sáng chế chứ không nhằm mục đích hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Các chủng vi khuẩn được sử dụng theo sáng chế được phân lập và tuyển chọn trực tiếp từ âm đạo phụ nữ khỏe mạnh. Theo đó, các tác giả đã tiến hành phân lập trực tiếp các chủng vi sinh vật từ dịch âm đạo của những người phụ nữ khỏe mạnh. Sau khi phân lập, tuyển chọn, đánh giá các chủng dựa trên khả năng phát triển trong môi trường kỵ khí, kháng lại vi sinh vật gây bệnh đường âm đạo, khả năng sinh axit lactic, tạo pH cân bằng môi trường trong âm đạo, trong số hàng trăm chủng vi khuẩn, các tác giả đã thu được 2 chủng thuộc loài *Lactobacillus rhamnosus* và *Lactobacillus reuteri* có hiệu quả vượt trội. Các chủng này được đánh số *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2, tương ứng.

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 là chủng vi khuẩn thuộc họ *Lactobacillus*, chủng này có khuẩn lạc mọc trên môi trường MRS, pH từ 6 đến 7, có hình thái tròn nhầy, mép răng cưa, màu trắng trong, kích thước khoảng từ 2 đến 5 mm. Vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 là vi khuẩn Gram dương hình que, kích thước chiều ngang khoảng 1 μm , sống trong môi trường kỵ khí tùy nghi được các tác giả phân lập từ dịch âm đạo ở người. Vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 kháng lại *E. coli* gây bệnh ở đường âm đạo, sinh axit lactic ở mức trung bình (0,40 g/mL sinh khối).

Các thử nghiệm đánh giá về điều kiện nuôi cấy cho thấy vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 theo sáng chế sinh trưởng rất nhanh ở nhiệt độ 37°C và có khả năng

phát triển được cả trong điều kiện hiếu khí và kỵ khí, pH từ kiềm đến trung tính ở âm đạo, tạo màng biofilm nhanh có tác dụng ức chế cạnh tranh dinh dưỡng và môi trường sống với các vi sinh vật gây bệnh ở âm đạo. Hình thái khuẩn lạc và hình ảnh nhuộm Gram của chủng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 này được thể hiện trên Hình 1. Trong đó (A) là hình thái khuẩn lạc và (B) là hình ảnh nhuộm Gram của vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1, là hình ảnh tế bào của chủng *Lactobacillus rhamnosus* H1 dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Các thử nghiệm *in vitro* cho thấy vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 theo sáng chế an toàn, không sinh độc tố và không chứa plasmit mang gen kháng chất kháng sinh. Kiểm tra kết quả trên cây phân loại và so sánh trình tự 16S trên ngân hàng gen cho thấy chủng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 là một chủng mới, có độ tương đồng trình tự 16S rARN so với chủng gần nhất trong cây phân loại là *Lactobacillus rhamnosus* NCTC13764 là 99,6%. Chủng vi khuẩn này có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1 với mã số truy cập trên Ngân hàng gen là MK 791735. Hiện chủng vi khuẩn này đang được nộp lưu với mã H1 và được lưu tại phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam.

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 là chủng vi khuẩn thuộc họ *Lactobacillus*, chủng này có khuẩn lạc mọc trên môi trường MRS, pH từ 6 đến 7, khuẩn lạc có hình thái tròn màu trắng đục, mép tròn, kích thước khoảng từ 1 đến 3 mm, bề mặt bóng. Vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 là vi khuẩn Gram dương hình que, kích thước chiều ngang nhỏ hơn 1 μ m, sống trong môi trường kỵ khí tùy nghi được các tác giả phân lập từ dịch âm đạo ở người. Vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 kháng lại vi khuẩn *E. coli* và *C. albican* gây bệnh ở đường âm đạo, sinh lượng lớn axit lactic (0,80 g/mL sinh khối).

Các thử nghiệm đánh giá về điều kiện nuôi cấy cho thấy vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 sinh trưởng rất nhanh ở nhiệt độ 37°C và có khả năng phát triển được trong điều kiện kỵ khí tùy nghi, pH từ kiềm đến trung tính ở âm đạo, tạo màng biofilm nhanh có tác dụng ức chế cạnh tranh dinh dưỡng và môi trường sống với các vi sinh vật gây bệnh ở âm đạo. Hình thái khuẩn lạc và hình ảnh nhuộm Gram của chủng vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 này được thể hiện trên Hình 2. Trong đó (A) là hình thái khuẩn lạc và (B) là hình ảnh nhuộm Gram của vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2,

(C) là hình ảnh tế bào của chủng *Lactobacillus reuteri* H2 dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Các thử nghiệm *in vitro* cho thấy vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 phân lập được an toàn, không sinh độc tố và không chứa plasmit mang gen kháng chất kháng sinh. Kiểm tra kết quả trên cây phân loại và so sánh trình tự 16S trên ngân hàng gen cho thấy chủng vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 là một chủng mới, có độ tương đồng trình tự 16S rARN so với chủng gần nhất trong cây phân loại là *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 là 99,6%. Chủng vi khuẩn này có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.2 với mã số truy cập trên Ngân hàng gen là MK791734. Hiện chủng vi khuẩn này đang được nộp lưu với mã H2 và được lưu tại phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chế phẩm probiotic để ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm âm đạo, trong đó chế phẩm này bao gồm hỗn hợp chứa ít nhất 1×10^9 CFU/g vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và ít nhất 2×10^8 CFU/g vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 số nộp lưu lần lượt là H1, H2 tại phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam.

Lượng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 thu được bằng cách nuôi cấy vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2, tương ứng, sau đó loại bỏ dịch nuôi cấy, thu sinh khối. Các sinh khối vi khuẩn này được phối trộn với nhau theo tỷ lệ nhất định để thu chế phẩm viên đặt phụ khoa. Lượng sinh khối *Lactobacillus rhamnosus* H1 có trong chế phẩm theo sáng chế ít nhất là 1×10^9 CFU/g và *Lactobacillus reuteri* H2 có trong chế phẩm theo sáng chế ít nhất là 2×10^8 CFU/g. Tốt nhất là lượng sinh khối của vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 có trong chế phẩm theo sáng chế gấp từ 2 đến 3 lần lượng sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2.

Các tác giả đã thử nghiệm và thấy rằng, để duy trì được pH ổn định ở âm đạo, lượng vi khuẩn cần được phát triển theo một tỷ lệ nhất định để đảm bảo khả năng thích ứng của vi khuẩn khi phát triển. Lượng vi khuẩn được sử dụng tính theo lượng vi khuẩn hữu ích, nghĩa là lượng vi khuẩn sống, có khả năng phát triển trực tiếp trong môi trường âm đạo cho phép cạnh tranh và tiêu diệt vi khuẩn có hại, điều hòa môi

trường pH âm đạo. Theo đó, chế phẩm theo sáng chế có tổng lượng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 có khả năng phát triển trong môi trường âm đạo đạt ít nhất 10^8 CFU/g.

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 theo sáng chế đã được nộp lưu tại phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam với số nộp lưu H1 và có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1.

Chủng vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 thu theo sáng chế đã được nộp lưu tại phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam với số nộp lưu H2 và có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.2.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm chế phẩm viên đặt phụ khoa để hỗ trợ ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm âm đạo, trong đó quy trình này bao gồm các bước a) hoạt hóa chủng giống gốc; b) chuẩn bị môi trường lên men; c) lên men sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2; d) thu sinh khối vi khuẩn; và e) thu chế phẩm viên đặt phụ khoa.

Trong bước hoạt hóa chủng giống gốc bằng cách thu nhận chủng giống gốc vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 có số nộp lưu H1 và chủng vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 có số nộp lưu H2 từ phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam. Tiếp đó, các chủng này độc lập được cấy vào môi trường MRS và nuôi cấy trong điều kiện lắc, nhiệt độ khoảng từ 35 đến 45°C trong từ 1 đến 2 ngày để hoạt hóa và thu chủng giống gốc vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 được hoạt hóa.

Vi khuẩn giống gốc có thể là chủng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 có số nộp lưu H1 và chủng vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 được nuôi cấy, lưu giữ trong điều kiện lưu thông thường hoặc có thể ở dạng đông sâu trong Nitơ lỏng. Trường hợp bảo quản đông sâu, trước khi hoạt hóa, chủng giống gốc này cần được tan đông và cấy lên môi trường phục hồi để thu khuẩn lạc trước khi cấy hoạt hóa chủng giống *Lactobacillus rhamnosus* H1 và chủng vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2. Lượng vi khuẩn có trong môi trường hoạt hóa sau khi nuôi cấy đạt khoảng 10^6 tế bào/ml.

Trong bước chuẩn bị môi trường lên men, thành phần môi trường nuôi cấy bao gồm glucoza, pepton, cao nấm men, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, Tween80, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4$, CH_3COONa được chuẩn bị để pha chế làm môi trường lên men vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2. Các thành phần môi trường này được pha chế tạo thành môi trường lỏng với nồng độ xác định, tối ưu cho sự phát triển của vi khuẩn nuôi cấy. Cụ thể, các thành phần môi trường nuôi cấy được hòa với nước cất sao cho glucoza từ 18 đến 20g/l, pepton từ 9 đến 12g/l, cao nấm men từ 13 đến 17g/l, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ từ 1 đến 3g/l, Tween 80 từ 0,8 đến 1,2 ml/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ từ 0,1 đến 0,3g/l, $MnSO_4$ từ 0,02 đến 0,07g/l, CH_3COONa từ 2 đến 6g/l. Các tác giả đã thử nghiệm và xác định thành phần nuôi cấy tối ưu để vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 phát triển tối ưu nhằm thu được lượng sinh khối lớn nhất. Sau khi khử trùng môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100°C đến 120°C trong khoảng từ 15 đến 20 phút, để nguội thu được môi trường lên men. Môi trường lên men này được sử dụng để nuôi cấy lên men sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2, tương ứng.

Trong công đoạn lên men sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2, tiến hành bổ sung độc lập dịch nuôi cấy chủng giống *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 đã được hoạt hóa vào môi trường lên men đã được khử trùng ở trên. Tỷ lệ dịch nuôi cấy chủng giống *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 đã được hoạt hóa với môi trường lên men là từ 0,5 đến 10% (thể tích/thể tích), tương ứng. Sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ từ 35°C đến 45°C, tốc độ khuấy từ 50 đến 100 vòng/phút, pH duy trì trong khoảng từ 6 đến 7. Thời gian nuôi cấy được duy trì trong khoảng từ 1 đến 2 ngày để vi khuẩn sinh trưởng, phát triển nhằm thu sinh khối. Bằng thực nghiệm, các tác giả đã nhận thấy rằng, với điều kiện nuôi cấy nêu trên, thời gian nuôi cấy khoảng 2 ngày, sinh khối vi khuẩn thu được là tốt nhất.

Với mục đích thu sinh khối vi khuẩn sống, các điều kiện nuôi cấy được tối ưu cho hai chủng vi khuẩn sao cho có thể thu được lượng sinh khối lớn nhất. Tuy nhiên, sinh khối vi khuẩn thu được này có khả năng phát triển và có hoạt tính sản sinh axit lactic khi được sau khi đông khô và đưa vào môi trường âm đạo.

Để thu sinh khối, cần ly tâm hoặc lọc dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2. Quá trình này tốt nhất là ly tâm để thu sinh

khối. Theo một phương án ưu tiên, quá trình thu sinh khối được thực hiện bằng cách lọc qua màng lọc. Tiếp đó rửa sinh khối bằng dung dịch đệm muối phosphat (phosphate saline buffer: PBS) nồng độ từ 10 mM đến 50 mM trong điều kiện pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0. Thời gian rửa sinh khối trong khoảng từ 10 phút đến 30 phút ở nhiệt độ từ 4°C đến 7°C. Quá trình rửa có thể thực hiện từ 2 đến 3 lần và thu được sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 sạch. Sinh khối vi khuẩn này bao gồm vi khuẩn sống được bảo quản ở dạng đông khô hoặc đông lạnh trước khi sử dụng để sản xuất chế phẩm viên đặt phụ khoa theo sáng chế.

Trong bước thu chế phẩm viên đặt phụ khoa, tiến hành hòa tan NaCl, dinatri hydrogenphosphat và KH_2PO_4 theo tỷ lệ 90:7:3 với nước đến nồng độ 10g/l. Các muối này đóng vai trò tá dược nhằm ổn định môi trường, cung cấp điều kiện ức chế vi khuẩn có hại phát triển gây viêm nhiễm. Tiếp đó bổ sung sữa bột tách kem đến nồng độ nằm trong khoảng từ 1,5 đến 2kg/lít. Sữa bột tách kem là sữa thu được sau khi tách kem, đông khô. Ngoài ra, sữa bột tách kem có thể là sữa bột sau khi tách kem, đông khô hoặc được bổ sung đường sacaroza có bán trên thị trường. Thành phần này có trong chế phẩm viên nén vừa nhằm cung cấp môi trường dinh dưỡng cho vi sinh vật phát triển, vừa đóng vai trò tá dược giúp liên kết các thành phần và tan trong điều kiện môi trường âm đạo.

Theo một phương án thực hiện cụ thể, sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 thu được ở trên được trộn với tá dược theo tỷ lệ 3/7 (trọng lượng/trọng lượng). Nồng độ vi khuẩn sau khi phối trộn đạt ít nhất 1×10^9 CFU/g vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và 2×10^8 CFU/g vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2. Hai chủng vi khuẩn này cho phép kết hợp, hỗ trợ nhau phát triển thành hệ vi sinh, giúp cân bằng pH, độ ẩm phù hợp với môi trường pH âm đạo của phụ nữ khỏe mạnh. Lượng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 ít nhất là 1×10^9 CFU/g và *Lactobacillus reuteri* H2 ít nhất là 2×10^8 CFU/g. Tốt nhất là lượng sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 gấp từ 2 đến 3 lần lượng sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 để khi phát triển chúng tạo ra môi trường axit, giúp kìm hãm sự phát triển của các vi sinh vật gây bệnh.

Sau khi bổ sung một lượng sinh khối tế bào vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 đến nồng độ ít nhất 1×10^9 CFU/g và *Lactobacillus reuteri* H2 đến nồng độ ít nhất

2×10^8 CFU/g, trộn đều và bổ sung một lượng dung dịch đệm PBS vừa đủ (nếu cần) để thu hỗn hợp dạng sệt. Sau khi trộn đều, chế phẩm được dàn trên khay và đông khô ở nhiệt độ trong khoảng từ -40°C đến -60°C trong khoảng từ 20 đến 30 giờ. Theo một phương án cụ thể, điều kiện đông khô được thực hiện như sau: tỷ lệ cơ chất 30%, nhiệt độ mẫu -30°C trong 3 giờ, nhiệt độ ngưng – 86°C , điều kiện chân không 50 mTor, sau khi đông khô, thu được chế phẩm dạng bột, màu trắng ngà.

Quá trình này nhằm loại bỏ nước, chuyển vi khuẩn về trạng thái ngủ. Sau khi đông khô, thu được chế phẩm dạng bột màu trắng ngà. Chế phẩm dạng bột này được ép tạo viên ở 4°C . Viên nén này có thể còn được bao nang giúp bảo quản hoặc có thể được phủ lớp màng bảo quản. Do đông khô vi khuẩn ở nhiệt độ thấp trong khoảng từ 20 đến 30 giờ, vi khuẩn chuyển về trạng thái không hoạt động, nhưng sẽ hoạt động nhanh chóng khi đưa vào môi trường thuận lợi. Điều này giúp tăng hiệu quả của chế phẩm, nhưng đồng thời tăng được thời gian bảo quản. Chế phẩm ở dạng viên đặt phụ khoa thu được theo sáng chế được dùng để hỗ trợ ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm âm đạo.

Trong chế phẩm viên đặt phụ khoa thu được theo sáng chế, vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 thu được từ vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 có số nộp lưu H1 tại phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam và có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1 với lượng ít nhất 1×10^9 CFU/g.

Trong chế phẩm viên đặt phụ khoa theo sáng chế, vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 thu được từ vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 có số nộp lưu H2 tại phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam và có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.2 với lượng ít nhất 2×10^8 CFU/g.

Đơn vị tính độ sống của vi khuẩn CFU/g được coi là số lượng vi khuẩn có khả năng mọc thành khuẩn lạc, được xác định bằng phương pháp pha loãng và cấy trải trên đĩa thạch. Phương pháp này được thực hiện bằng cách thu nhận mẫu, lắc đều, sau đó hút 1 ml sản phẩm probiotic theo sáng chế, pha loãng với dung dịch NaCl 0,9% theo tỷ lệ 1/10 rồi pha loãng theo loạt tiếp bằng dung dịch NaCl 0,9% với nồng độ 1/10 đến tỷ lệ 10^{-6} rồi cấy 100 μl lên môi trường thạch MRS, pH từ 6 đến 7 chứa glucoza từ 18 đến 20g/l, pepton từ 9 đến 12g/l, cao nấm men từ 13 đến 17g/l, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ từ 1 đến

3g/l, Tween 80 từ 0,8 đến 1,2 ml/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ từ 0,1 đến 0,3g/l, MnSO_4 từ 0,02 đến 0,07g/l, CH_3COONa từ 2 đến 6g/l, thạch từ 16 đến 20 g/l đối cả hai chủng *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2. Sau khi cấy, đậy nắp và để yên 15 phút ở nhiệt độ phòng rồi úp ngược đĩa nuôi ở 37°C trong khoảng từ 48 đến 72 giờ để thu nhận khuẩn lạc. Sau khoảng 48 giờ đến 72 giờ, khuẩn lạc trên môi trường nuôi cấy mỗi đĩa được đếm và lựa chọn đĩa thạch có nồng độ pha loãng môi trường thạch có khoảng từ 10 đến 200 khuẩn lạc. Các nồng độ pha loãng được chọn có độ pha loãng trong khoảng từ 10^{-6} đến 10^{-8} đối với *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2.

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 có số nộp lưu H1 tại phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam. Chủng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 này có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1.

Sáng chế cũng đề cập đến chủng vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 có số nộp lưu H2 tại phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam. Chủng vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 này có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.2.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Sản xuất chế phẩm viên đặt phụ khoa

Chủng giống gốc vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 có số nộp lưu lần lượt là H1 và H2 được cung cấp bởi phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam. Các mẫu chủng giống gốc này được nuôi trên môi trường thạch nghiêng.

Thiết bị lên men, máy ly tâm, dụng cụ thí nghiệm, các nguyên liệu, hóa chất như glucoza, pepton, cao nấm men, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, tween 80, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MnSO_4 , CH_3COONa , thạch được mua từ nhà cung cấp, môi trường MRS chuẩn dùng cho nuôi cấy được mua từ nhà cung cấp (Merck).

+ Thu sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2

Cấy độc lập từng mẫu chủng giống gốc *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 trong ống thạch nghiêng vào trong 1 lít môi trường MRS đã được tiệt trùng, nuôi cấy hoạt hóa ở nhiệt độ từ 35 đến 45°C trong 2 ngày để hoạt hóa chủng giống *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2.

Cân 2000g glucoza, 1000 g pepton, 1500 g cao nấm men, 200 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 100 ml dung dịch Tween 80, 20 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g $MnSO_4$, 500 g CH_3COONa và hòa tan trong 100 lít nước RO. Sau khi khử trùng ở nhiệt độ 110°C trong 20 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, thu được môi trường lên men.

Bổ sung 1 lít môi trường nhân giống MRS vào 100 lít môi trường đã được chuẩn bị ở trên, tiến hành nuôi cấy ở nhiệt độ từ 35°C, tốc độ khuấy 100 vòng/phút, thời gian nuôi từ trong 2 ngày.

Chuyển toàn bộ môi trường nuôi cấy vào thiết bị ly tâm để thu sinh khối. Tiếp đó rửa sinh khối bằng dung dịch đệm muối phosphat (PBS) ở pH=7,5, nồng độ 20 mM trong 15 phút ở 5°C. Rửa sinh khối 3 lần, thu được sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2, tương ứng. Sinh khối vi khuẩn này được kiểm tra khả năng sinh trưởng, sinh khối được sử dụng để tạo chế phẩm viên đặt phụ khoa.

+ Thu chế phẩm viên đặt phụ khoa

Bổ sung 90g NaCl, 7g dinatri hydrogenphosphat, 3g KH_2PO_4 vào thiết bị khuấy, tiếp đó cấp 10L nước RO, khuấy đến khi thu được dung dịch đồng nhất. Khử trùng dung dịch này ở nhiệt độ 121°C trong 15 phút, sau đó làm mát về nhiệt độ phòng.

Bổ sung 2 kg sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và 1,6 kg sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 thu được ở trên. Tiếp đó, bổ sung 1,54 kg sữa bột tách béo và trộn đều. Đổ hỗn hợp ra khay và cài đặt chương trình cho quá trình đông khô: nhiệt độ từ -40°C đến -60°C trong khoảng từ 20 đến 30 giờ. Các lô phối trộn sau khi đông khô sẽ thành bột trắng ngà. Tiếp đó, cho chế phẩm này vào thiết bị ép tạo viên ở 4°C để thu được viên nén dạng bầu dục, mỗi viên có trọng lượng 5g, kích thước khoảng 1x2cm.

Ví dụ 2. Đánh giá khả năng sống của vi khuẩn trong chế phẩm

Để xác định khả năng sống của vi khuẩn có trong chế phẩm, các viên nén được bảo quản trong điều kiện môi trường bình thường, sau đó tiến hành kiểm tra, đánh giá

khả năng sống của vi khuẩn sau 18 tháng sản xuất. Phương pháp thử nghiệm được tiến hành bằng phương pháp nuôi cấy, pha loãng theo loạt và nuôi cấy trong 2 ngày trên môi trường chuẩn để xác định khả năng sống của vi khuẩn sau quá trình lưu hành trên thị trường so với lượng vi khuẩn sau khi sản xuất. Kết quả nuôi cấy được nêu trong Bảng 1 bên dưới.

Bảng 1. Kết quả đánh giá khả năng sống của vi sinh vật trong chế phẩm viên đặt phụ khoa sau khi sản xuất và sau 18 tháng bảo quản

STT	Chi tiêu	Đơn vị tính	Sau khi sản xuất	Sau 18 tháng
1	Màu sắc		Trắng ngà	Trắng ngà
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CFU/g	$1,2 \times 10^9$	1×10^9
3	<i>Lactobacillus reuteri</i>	CFU/g	$5,0 \times 10^8$	2×10^8

Theo bảng trên cho thấy, lượng vi khuẩn có khả năng phát triển thành khuẩn lạc có khả năng duy trì được khả năng sinh trưởng sau 18 tháng với lượng suy giảm không đáng kể. Điều này cho thấy hiệu quả vượt trội của phương pháp theo sáng chế để thu chế phẩm viên đặt phụ khoa chứa vi khuẩn *Lactobacillus* theo sáng chế.

Ví dụ 2. Đánh giá khả năng kích ứng và kiểm tra độ an toàn của chế phẩm

Để đánh giá khả năng kích ứng và kiểm tra độ an toàn của chế phẩm thu được, tiến hành thử nghiệm khả năng kích ứng trên người tình nguyện đối với viên đặt phụ khoa thu được từ Ví dụ 1.

Đối tượng thử nghiệm là nữ giới khỏe mạnh, không có triệu chứng viêm nhiễm âm đạo, tuổi từ 25 đến 40, không mắc các bệnh phụ khoa, tình nguyện thử nghiệm. Số lượng tham gia thử nghiệm là 30 người. Thời gian thử nghiệm 14 ngày, viên đặt phụ khoa được đặt khu trú theo hướng dẫn của bác sỹ. Trong toàn bộ quá trình thử nghiệm, các đối tượng tham gia được yêu cầu không quan hệ tình dục, các sinh hoạt khác được thực hiện bình thường. Kết quả thăm khám được thực hiện bởi bác sỹ chuyên khoa trước và sau khi thử nghiệm.

Chia ngẫu nhiên 30 người tình nguyện thử nghiệm thành 2 nhóm, mỗi nhóm 15 người. Nhóm 1 (TN1) sử dụng 1 viên/ngày, nhóm 2 (TN2) sử dụng 2 viên/ngày, cách nhau 12 giờ. Các tiêu chí đánh giá bao gồm các biểu hiện kích ứng như ngứa, sưng, rát, các chỉ số sinh học như huyết áp, nhịp tim, chỉ số sinh hoá như urê, creatinin,

enzym GOT (Glutamat Oxaloacetic Transaminase), GPT (Glutamat pyruvat transaminase) liên quan tới chức năng gan thận, các chỉ số công thức máu (số lượng hồng cầu, hematocrit, số lượng bạch cầu, % bạch cầu lympho, % bạch cầu đơn nhân, % bạch cầu hạt trung tính, số lượng tiểu cầu).

Kết quả thử nghiệm cho thấy, đối với cả hai nhóm thử nghiệm, không có biểu hiện liên quan đến biểu hiện kích ứng, các chỉ số liên quan đến huyết áp, nhịp tim, chỉ số sinh hoá như urê, creatinin, enzym GOT (Glutamat Oxaloacetic Transaminase), GPT (Glutamat pyruvat transaminase) liên quan tới chức năng gan thận, các chỉ số công thức máu không thay đổi.

Có thể thấy rằng, viên đặt phụ khoa theo sáng chế an toàn với người, không gây kích ứng âm đạo khi sử dụng khu trú và chứng tỏ an toàn với sức khoẻ người bệnh. Như vậy, với liều dùng dự định khuyến cáo cho bệnh nhân đặt 1-2 viên/ngày thì chế phẩm hoàn toàn an toàn với sức khoẻ âm đạo phụ nữ.

Ví dụ 3. Thử nghiệm lâm sàng khả năng hỗ trợ điều trị bệnh viêm nhiễm âm đạo

Để thử nghiệm lâm sàng, tiến hành trên 50 bệnh nhân tình nguyện tham gia nghiên cứu. Các bệnh nhân được lựa chọn tham gia trên cơ sở tình nguyện và có thể yêu cầu dừng hoặc từ chối thử nghiệm tại thời điểm bất kỳ nếu muốn.

Thử nghiệm được tiến hành sau khi đệ trình giấy phép được chấp thuận bởi Hội đồng Y đức (số IRB-1906, ngày 28/04/2020), thời gian thử nghiệm được thực hiện từ tháng 09/2020 đến tháng 11/2020 tại cơ sở điều trị lâm sàng.

Bệnh nhân tham gia thử nghiệm là bệnh nhân được xác định bị viêm âm đạo do nhiễm khuẩn *Gardnerella vaginalis* và/hoặc nấm *Candida albicans*. Các bệnh nhân đều có biểu hiện chung là ngứa rát âm đạo, mùi hôi, tiểu buốt, màu sắc dịch tiết âm đạo từ trắng đến vàng xám. Đối tượng thử nghiệm về khả năng hỗ trợ điều trị là viên đặt phụ khoa thu được từ Ví dụ 1.

Chia ngẫu nhiên 50 bệnh nhân tham gia thử nghiệm thành hai nhóm, mỗi nhóm 25 người. Phác đồ điều trị theo khuyến cáo (clindamycin với bệnh nhân nhiễm vi khuẩn, ketoconazol với bệnh nhân nhiễm nấm và phối hợp cả hai loại kháng sinh này nếu bệnh nhân được xác định nhiễm cả vi khuẩn và nấm trong 7 ngày). Bệnh nhân được tiếp tục theo dõi cho đến ngày thứ 14 (7 ngày sau khi kết thúc phác đồ điều trị) để đánh giá khả năng tái nhiễm.

Nhóm đối chứng (ĐC): Sử dụng liệu pháp kháng sinh dạng uống trong vòng 7 ngày với liều lượng như sau: (i) clyndamicin 1 viên 500 mg/lần x 2 lần/ngày với bệnh nhân nhiễm vi khuẩn; (ii) Ketoconazole 1 viên 200 mg/lần x 2 lần/ngày với bệnh nhân nhiễm nấm; clyndamicin 1 viên 500 mg/lần x 2 lần/ngày với bệnh nhân nhiễm vi khuẩn; (iii) Clyndamicin 1 viên 500 mg và Ketoconazole 1 viên 200 mg/lần x 2 lần/ngày với bệnh nhân nhiễm cả vi khuẩn và nấm.

Nhóm thử nghiệm (TN): Sử dụng liệu pháp kháng sinh với liệu trình như nhóm đối chứng nhưng kết hợp với chế phẩm viên đặt phụ khoa thu được từ Ví dụ 1 với liều lượng 1 viên/lần x 2 lần/ngày liên tục trong 14 ngày. Kết quả thu được thể hiện ở Bảng 2 và 3 bên dưới:

Bảng 2: Kết quả thử nghiệm điều trị lâm sàng viên đặt phụ khoa trong hỗ trợ điều trị viêm nhiễm âm đạo

stt	Chỉ số	ĐC			TN		
		Ngày 0	Ngày 7	Ngày 14	Ngày 0	Ngày 7	Ngày 14
1	Mùi hôi ở âm đạo*	3,2	1,0	1,4	3,4	0,8	0,6
2	Ngứa rát âm đạo*	3,3	1,0	1,5	3,6	0,9	0,8
3	Tiểu buốt*	2,3	0,7	1,0	2,5	0,3	0,1
4	Màu sắc dịch tiết âm đạo [#]	2,8	1,3	1,7	2,9	1,1	1,0
5	pH (n)	25	25	25	25	25	25
	3,8-5,0 (n)	1	18	16	3	20	10
	>5,0 (n)	24	7	9	22	5	15
	<3,8 (n)	0	0	0	0	0	0

* Điểm trung bình tính từ điểm khảo sát của 25 bệnh nhân/nhóm, với 0: không triệu chứng; 1: nhẹ; 2: trung bình; 3: nặng; 4: rất nặng;

[#] Điểm trung bình tính từ điểm khảo sát của 25 bệnh nhân/nhóm, với 1: trắng trong; 2: trắng đục; 3: vàng; 4: xám.

Kết quả thử nghiệm trên Bảng 2 cho thấy so với nhóm ĐC, nhóm TN được điều trị bổ sung bằng cách sử dụng viên đặt phụ khoa theo sáng chế có các chỉ số lâm sàng như (i) mùi hôi ở âm đạo, (ii) ngứa rát âm đạo, (iii) tiểu buốt, và (iv) màu sắc dịch tiết âm đạo sau ngày 7 điều trị đều cho kết quả rất tốt, vượt trội so với nhóm đối chứng. Kết quả này cho thấy hiệu quả của chế phẩm viên đặt phụ khoa có tác dụng hỗ trợ tăng hiệu quả điều trị bệnh viêm nhiễm vi khuẩn và nấm đối với bệnh nhân mắc bệnh viêm nhiễm phụ khoa khi kết hợp với kháng sinh.

Kết quả trên Bảng 2 cũng cho thấy rằng, so với nhóm ĐC, nhóm TN được điều trị bổ sung chế phẩm viên đặt phụ khoa đều có các chỉ số lâm sàng như (i) mùi hôi ở âm đạo, (ii) ngứa rất âm đạo, (iii) tiểu buốt, và (iv) màu sắc dịch tiết âm đạo ở ngày 14, (sau 7 ngày kết thúc phác đồ điều trị) không những không bị tăng, mà còn có xu hướng giảm. Trong khi đó ở nhóm ĐC, các chỉ số này lại có xu hướng tăng lên sau điều trị. Kết quả chứng tỏ chế phẩm viên đặt phụ khoa theo sáng chế có tác dụng ngăn ngừa tái viêm nhiễm phụ khoa.

Bệnh nhân được kiểm tra xét nghiệm vi sinh tại thời điểm ngày 0, ngày 7 và ngày 14 của quá trình điều trị. Kết quả xét nghiệm được thể hiện trên Bảng 3.

Bảng 3: Kết quả xét nghiệm vi sinh của nhóm bệnh nhân tham gia thử nghiệm

stt	Chỉ số thử nghiệm	GV*	CA*	GV* và CA*	Chỉ số Nugent ^(b)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> **	<i>Lactobacillus reuteri</i> **
1	Số bệnh nhân dương tính ở ngày 0 trước điều trị $n0$ ($\% = n0/n25$)						
	ĐC- ngày 0	7 (28)	8 (32)	10 (40)	NA [#]	0 (0)	0 (0)
	TN- ngày 0	9 (36)	5 (20)	11 (44)	NA [#]	0 (0)	0 (0)
2	Số bệnh nhân còn lại dương tính ở ngày 7 kết thúc điều trị $n7$ ($\% = n7/n0$) và ngày 14 sau điều trị 7 ngày $n14$ ($\% = n14/n0$)						
	ĐC- ngày 7	2 (29)	3 (37)	4 (40)	NA [#]	0 (0)	0 (0)
	TN- ngày 7	2 (22)	1 (20)	3 (27)	NA [#]	25 (100)	25 (100)
	ĐC- ngày 14	3 (42)	5 (63)	6 (60)	NA [#]	0	0
	TN- ngày 14	1 (11)	1 (20)	2 (18)	NA [#]	25 (100)	25 (100)
3	Tỷ lệ giảm lượng vi sinh vật ^(a) trung bình (lần); thay đổi chỉ số Nugent ^(b) trung bình (trước-sau) của bệnh nhân; và số lượng bệnh nhân xuất hiện vi sinh vật có lợi ở âm đạo** ($n/\%$) sau ngày 3 điều trị						
	ĐC-ngày 3	32	48	39/42	8,3- 3,8	NA [#]	25 (100)
	TN- ngày 3	64	73	68/78	8,5- 2,4	NA [#]	25 (100)

* GV: *Gardnerella vaginalis*; CA: *Candida albicans*

** Sự xuất hiện hai loài lợi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* và *Lactobacillus reuteri* có trong chế phẩm viên đặt phụ khoa trong dịch âm đạo bằng kỹ thuật RT-PCR SYBR đặc hiệu cho loài.

NA: không thực hiện

^(a) Tỷ lệ giảm lượng vi sinh vật trung bình = $2^{-\Delta Ct}$ trong đó $\Delta Ct = Ct$ ngày 3 - Ct ngày 0

^(b) Chỉ số Nugent: 0-3: vi sinh vật có lợi chiếm ưu thế; 4-6: Giảm vi sinh vật có lợi và có mặt các vi sinh vật gây bệnh; 7-10: không có mặt vi sinh vật có lợi và vi sinh vật gây bệnh chiếm ưu thế.

Kết quả thử nghiệm cho thấy đã xuất hiện đồng thời cả *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 trong dịch âm đạo phụ nữ sau khi sử dụng viên đặt phụ khoa theo sáng chế với liều dùng 2 viên/ngày ở thời điểm ngày thứ 3 và thứ 7. Để kiểm định, các tác giả đã sử dụng phương pháp RT-PCR để định tính loài vi khuẩn, ngoài ra phương pháp cấy trải dùng để định lượng độ sống của 2 loài *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2. Kết quả này chứng tỏ các vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 từ viên đặt phụ khoa đã cư trú được trong âm đạo và phát triển, giúp kìm hãm vi khuẩn và nấm gây bệnh hiệu quả.

Kết quả trên Bảng 3 cho thấy, so với nhóm ĐC, nhóm TN được điều trị bổ sung chế phẩm viên đặt phụ khoa có các chỉ số xét nghiệm như số bệnh nhân (i) dương tính GV, (ii) dương tính CA ở ngày 7 kết thúc điều trị so với ngày 0 trước điều trị đều giảm rất mạnh. Điều này càng khẳng định rằng chế phẩm viên đặt phụ khoa theo sáng chế có tác dụng hỗ trợ tiêu diệt vi sinh vật gây bệnh, làm tăng hiệu quả điều trị của kháng sinh.

So với nhóm ĐC, nhóm TN được điều trị bổ sung chế phẩm viên đặt phụ khoa có các chỉ số xét nghiệm như số bệnh nhân (i) dương tính GV, (ii) dương tính CA ở ngày 14 (7 ngày sau khi kết thúc điều trị kháng sinh) đều có xu hướng giảm so với ngày 7 (kết thúc điều trị kháng sinh). Trong khi đó ở nhóm ĐC, các chỉ số này lại có xu hướng tăng lên. Kết quả chứng tỏ Lacvagin có tác dụng ngăn ngừa chống tái viêm nhiễm lại các vi sinh vật gây viêm nhiễm phụ khoa như *Gardnerella vaginalis* và *Candida albicans*. Chế phẩm viên đặt phụ khoa theo sáng chế cho phép bảo vệ lâu dài, ngăn ngừa tái nhiễm một cách hiệu quả.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chế phẩm viên đặt phụ khoa theo sáng chế được phát triển từ hai chủng vi khuẩn lợi khuẩn là *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 được phân lập từ dịch âm đạo của phụ nữ khỏe mạnh với các đặc tính phát triển được chọn lọc tối ưu, hai chủng vi khuẩn này có khả năng phát triển đồng thời, cho phép tạo ra chế phẩm an toàn, có hiệu quả ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm âm đạo cho phụ nữ.

Chế phẩm viên đặt phụ khoa theo sáng chế được phát triển bằng cách kết hợp hai chủng vi khuẩn sinh axit lactic có đặc tính khác nhau, cho phép hỗ trợ phát triển để tạo

ra hệ vi sinh có ích khỏe mạnh, cạnh tranh, ức chế sự lây nhiễm, phát triển của vi sinh vật gây bệnh. Chế phẩm sinh cho phép phát triển hệ vi sinh vật âm đạo khỏe mạnh, giúp ngăn ngừa, loại bỏ vi sinh vật gây bệnh một cách tự nhiên, giúp giảm thiểu sự phụ thuộc vào các chế phẩm vệ sinh phụ nữ. Bên cạnh đó, chế phẩm có tác dụng rõ rệt trong hỗ trợ tăng hiệu quả điều trị của kháng sinh và phòng ngừa tái viêm nhiễm phụ khoa.

Bằng cách sử dụng lợi khuẩn chi *Lactobacillus* kết hợp với việc sản xuất, xử lý sinh khối, chế phẩm viên đặt phụ khoa theo sáng chế bền, có thời gian sử dụng kéo dài vượt trội, trên 18 tháng mà vẫn giữ được khả năng sinh trưởng, giúp giải quyết được vấn đề khả năng sống của các chế phẩm vi sinh hiện có. Chế phẩm theo sáng chế an toàn cho người sử dụng. Chế phẩm cho phép bào chế được ở dạng viên nén đặt khu trú trực tiếp trong âm đạo, giúp hỗ trợ điều trị bệnh viêm nhiễm đường âm đạo cấp. Ngoài ra, chế phẩm theo sáng chế dễ sử dụng, cho phép bảo vệ kéo dài, chống tái nhiễm hiệu quả.

Quy trình sản xuất chế phẩm theo sáng chế trên cơ sở nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường lỏng nên đơn giản, dễ phát triển, không cần những thiết bị phức tạp có thể phát triển trên quy mô lớn. Bằng công nghệ lên men vi sinh, và công nghệ phối trộn trước và sau khi đông khô cho phép thu nhận vi khuẩn và bảo quản được vi khuẩn với mật độ cao và thời gian bảo quản dài.

YÊU CẦU BẢO HỘ

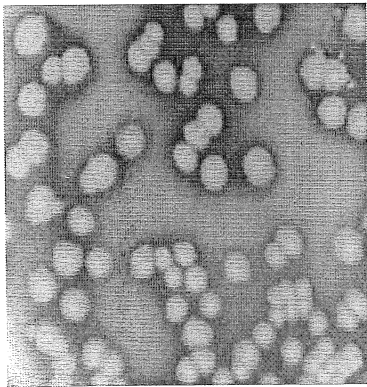
1. Chế phẩm viên đặt phụ khoa để hỗ trợ ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm âm đạo, trong đó chế phẩm này ở dạng viên nén bao gồm hỗn hợp tá dược rắn và ít nhất 1×10^9 CFU/g tế bào vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.1 và 2×10^8 CFU/g tế bào vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 có trình tự 16S nêu trong SEQ ID NO.2 và hai chủng vi khuẩn này có số nộp lưu lần lượt là H1 và H2 tại phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam.
2. Chế phẩm viên đặt phụ khoa theo điểm 1, trong đó chế phẩm này có tổng lượng vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và vi khuẩn *Lactobacillus reuteri* H2 có khả năng phát triển trong môi trường âm đạo đạt ít nhất 10^8 CFU/g.
3. Quy trình sản xuất chế phẩm viên đặt phụ khoa để hỗ trợ ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm âm đạo theo điểm 1 hoặc 2, trong đó quy trình này bao gồm các bước:
 - a) hoạt hóa chủng giống gốc bằng cách thu nhận chủng giống gốc vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 có số nộp lưu H1 và H2, tương ứng từ phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam, tiếp đó độc lập cấy các chủng giống gốc này vào môi trường MRS và nuôi cấy trong điều kiện lắc, nhiệt độ khoảng từ 35 đến 45°C trong từ 1 đến 2 ngày để thu chủng giống gốc vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 được hoạt hóa;
 - b) chuẩn bị môi trường lên men bằng cách hòa với nước cất các thành phần bao gồm glucoza từ 18 đến 20 g/l, pepton từ 9 đến 12g/l, cao nấm men từ 13 đến 17g/l, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ từ 1 đến 3g/l, Tween 80 từ 0,8 đến 1,2 ml/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ từ 0,1 đến 0,3g/l, $MnSO_4$ từ 0,02 đến 0,07g/l, CH_3COONa từ 2 đến 6g/l, sau khi khử trùng ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 100 °C đến 120 °C trong khoảng từ 15 phút đến 20 phút, để nguội thu được môi trường lên men;
 - c) lên men sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2 bằng cách bổ sung độc lập dịch nuôi cấy chủng giống gốc vi khuẩn đã được hoạt

hóa vào môi trường lên men theo tỷ lệ từ 0,5 đến 10% (thể tích/thể tích), sau đó nuôi cấy độc lập trong điều kiện kỵ khí ở nhiệt độ từ 35°C đến 45°C, tốc độ khuấy từ 50 đến 100 vòng/phút, pH duy trì trong khoảng từ 6 đến 7 trong khoảng từ 1 đến 2 ngày thu được môi trường nuôi cấy;

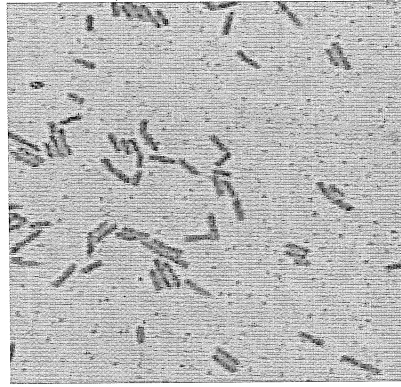
d) thu sinh khối vi khuẩn bằng cách ly tâm hoặc lọc môi trường nuôi cấy để thu sinh khối, tiếp đó rửa sinh khối bằng dung dịch đệm muối phosphat (PBS) nồng độ từ 10 mM đến 50 mM, trong điều kiện pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 8,0 trong khoảng từ 10 phút đến 30 phút ở nhiệt độ từ 4°C đến 7°C thu được sinh khối vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 và *Lactobacillus reuteri* H2, tương ứng; và

e) thu chế phẩm viên đặt phụ khoa bằng cách hòa tan NaCl, dinatri hydrogenphosphat và KH_2PO_4 theo tỷ lệ 90:7:3 với nước đến nồng độ 10g/l, tiếp đó bổ sung sữa bột tách kem đến nồng độ từ 1,5 đến 2kg/lít rồi bổ sung một lượng sinh khối tế bào vi khuẩn *Lactobacillus rhamnosus* H1 đến nồng độ ít nhất 1×10^9 CFU/g và *Lactobacillus reuteri* H2 đến nồng độ ít nhất 2×10^8 CFU/g, cuối cùng bổ sung một lượng dung dịch đệm PBS vừa đủ để thu hỗn hợp dạng sệt, sau khi trộn đều và đông khô chế phẩm này ở nhiệt độ trong khoảng từ -40 °C đến -60 °C trong khoảng từ 20 đến 30 giờ thu được chế phẩm dạng bột màu trắng ngà, sau khi ép tạo viên ở 4°C thu được chế phẩm viên đặt phụ khoa để hỗ trợ ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm âm đạo.

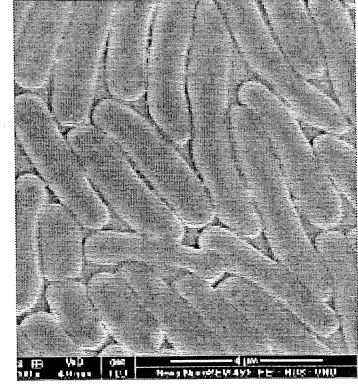
HÌNH 1



(A)

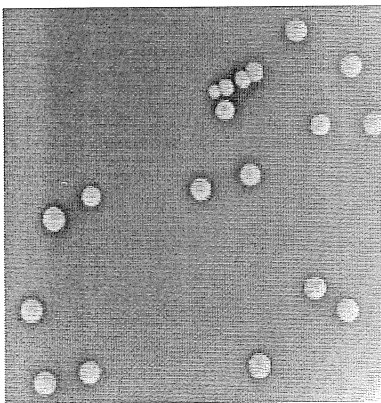


(B)

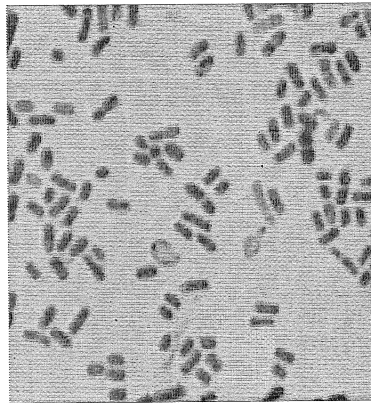


(C)

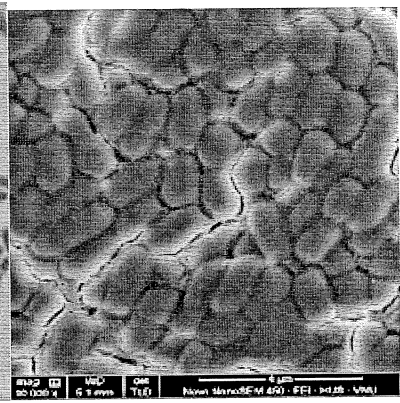
HÌNH 2



(A)



(B)



(C)

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội					
<120>	Chế phẩm viên đặt phụ khoa để hỗ trợ ngăn ngừa và điều trị bệnh viêm nhiễm âm đạo và quy trình sản xuất chế phẩm này					
<130>						
<160>	2					
<170>						
<210>	1					
<211>	1172					
<212>	ARN					
<213>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> H1					
<220>						
<223>	16S					
<220>						
<400>	1					
ccggcccaaa	cttctacggg	aggcagcagt	agggattctt	ccacaatgga	cgcaagtttg	60
aaggagcaac	gccgcgtgag	tgaagaaggc	tttcgggtcg	taaaactctg	ttgttgggaga	120
agaatgttcg	gcagagtaac	tgttgtcggc	gtgacgggat	ccaaccagaa	agccacggct	180
aactacgtgc	cagcagccgc	ggtaatacgt	aggtggcaag	cgttatccgg	atattattggg	240
cgtaaagcga	gcgcaggcgg	ttttttaagt	ctgatgtgaa	agccctcggc	ttaaccgagg	300
aagtgcattcg	gaaactggga	aacttgagtg	cagaagagga	cagtgggaact	ccatgtgtag	360
cgggtgaaatg	cgtagatata	tggaagaaca	ccagtggcga	aggcggctgt	ctggtctgta	420
actgacgctg	aggctcgaaa	gcatgggtag	cgaacaggat	tagataccct	ggtagtccat	480
gccgtaaacg	atgaatgcta	ggtgttgagg	ggtttccgcc	cttcagtgcc	gcagctaacg	540
cattaagcat	tccgcctggg	gagtacgacc	gcaagggttg	aactcaaagg	aattgacggg	600
ggcccgccaca	agcgggtggag	catgtggttt	aattcgaagc	aacgcgaaga	accttaccag	660
gtcttgacat	cttttgatca	cctgagagat	caggtttccc	cttcgggggc	aaaatgacag	720
gtggtgcatg	gttgtcgtca	gctcgtgtcg	tgagatgttg	ggttaagtcc	cgcaacgagc	780
gcaaccctta	tgactagtgtg	ccagcattta	gttgggcact	ctagtaagac	tgccggtgac	840
aaaccggagg	aaggtgggga	tgacgtcaaa	tcatcatgcc	ccttatgacc	tgggctacac	900
acgtgctaca	atggatggta	caacgagttg	cgagaccgcg	aggtcaagct	aatctcttaa	960
agccattctc	agttcggact	gtaggctgca	actcgcctac	acgaagtcgg	aatcgctagt	1020
aatcgcggat	cagcacgccg	cggtgaatac	gttcccgggc	cttgtagaca	ccgcccgtca	1080
caccatgaga	gtttgtaaca	cccgaagccg	gtggcgtaac	ccttttaggg	agcgagccgt	1140
ctaaggtggg	acaaatgatt	aggggtgaagt	cg			1172

<210> 2

<211> 210

<212> ARN

<213> Lactobacillus reuteri H2

<220>

<223> 16S

<220>

<400> 2

taaagccggtt ctcagttcgg actgtaggct gcaactcgcc tacacgaagt cggaatcgct	60
agtaatcgcg gatcagcatg ccgcggtgaa tacgttcccg ggcttgtac acaccgccg	120
tcacaccatg ggagtttgta acgccc aaag tcggtggcct aacctttatg gagggagccg	180
cctaaggcgg gacagatgac tgggggaagt	210