



(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)



1-0026087

(51)<sup>7</sup> A61K 9/20; A61P 1/12; A61K 35/76;  
A61K 47/48

(13) B

(21) 1-2015-04184

(22) 30/04/2014

(86) PCT/EP2014/058840 30/04/2014

(87) WO 2014/177622 06/11/2014

(30) 13305568.1 30/04/2013 EP

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/05/2016 338A

(73) 1. FERRING B.V. (NL)

Polaris Avenue 144, 2132 JX Hoofddorp, Netherlands

2. INSTITUT PASTEUR (FR)

25-28, rue de Docteur Roux, 75015 Paris, France

(72) DANGLAS, Pascal (FR); DEBARBIEUX, Laurent (FR).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) CHỨNG THẺ THỰC KHUẨN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHỨNG THẺ THỰC  
KHUẨN NÀY DÙNG ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH VIÊM RUỘT

(57) Sáng chế đề xuất dược phẩm chứa: (i) ít nhất một chủng thể thực khuẩn có khả năng tạo ra sự nhiễm gây tan ở chủng *Escherichia coli* bám dính-xâm nhập; và (ii) chất mang dược dụng; để điều trị bệnh viêm ruột. Sáng chế còn đề xuất ít nhất một chủng thể thực khuẩn có khả năng tạo ra sự nhiễm gây tan ở chủng *Escherichia coli* bám dính-xâm nhập để sử dụng trong điều trị bệnh viêm ruột.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế thuộc lĩnh vực liệu pháp thể thực khuẩn dùng trong điều trị các bệnh viêm ruột.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Các thể thực khuẩn là các virus gây nhiễm vi khuẩn bằng sự tương tác đặc hiệu.

Bệnh Crohn (CD: Crohn's disease), còn được gọi là bệnh viêm đoạn ruột hồi, là bệnh viêm ruột mà có thể tác động đến phần bất kỳ của đường dạ dày-ruột từ miệng đến hậu môn, gây ra rất nhiều triệu chứng khác nhau. Bệnh này chủ yếu là gây đau bụng, tiêu chảy, nôn, hoặc giảm cân, nhưng cũng có thể gây ra các biến chứng bên ngoài đường dạ dày-ruột như phát ban trên da, viêm khớp, viêm mắt, mệt mỏi, và thiếu tập trung.

Mặc dù vẫn chưa biết được nguyên nhân chính xác gây bệnh CD, nhưng có vẻ như tổ hợp của các yếu tố môi trường và tổ chất di truyền gây ra bệnh này. Bệnh CD được cho là bệnh tự miễn, trong đó hệ miễn dịch của cơ thể tấn công đường dạ dày-ruột, gây viêm; bệnh này được phân loại là loại bệnh viêm ruột (IBD: inflammatory bowel disease).

Ở bệnh nhân mắc bệnh CD, quan sát thấy sự biểu hiện bất thường của phân tử bám dính tế bào liên quan tới kháng nguyên gây ung thư phôi 6 (CEACAM6: carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6) tại bề mặt đỉnh của biểu mô ruột hồi và các tổn thương ruột hồi CD bị xâm chiếm bởi *Escherichia coli* bám dính-xâm nhập (AIEC: adherent-invasive *Escherichia coli*) gây bệnh.

Chưa có biện pháp chữa bệnh Crohn bằng dược phẩm hay bằng phẫu thuật nào là đã biết. Cụ thể, cả bệnh IBD nói chung và bệnh CD nói riêng đều không thể điều trị được bằng thuốc kháng sinh (nhằm chống lại *E. coli* gây bệnh). Các phương án điều trị chỉ giới hạn ở việc kiểm soát các triệu chứng, duy trì sự thuyên giảm, và ngăn ngừa sự tái phát.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa: (i) ít nhất một chủng thể thực khuẩn có khả năng tạo ra sự nhiễm gây tan ở chủng *Escherichia coli* bám dính-xâm nhập; và (ii) chất mang được dụng; để điều trị bệnh viêm ruột (IBD).

Sáng chế còn đề xuất ít nhất một chủng thể thực khuẩn có khả năng tạo ra sự nhiễm gây tan ở chủng *Escherichia coli* bám dính-xâm nhập để sử dụng trong điều trị bệnh viêm ruột.

Sáng chế còn đề xuất chủng thể thực khuẩn P1 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4694 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Sáng chế còn đề xuất chủng thể thực khuẩn P2 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4695 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Sáng chế còn đề xuất chủng thể thực khuẩn P3 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4696 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Sáng chế còn đề xuất chủng thể thực khuẩn P4 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4697 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Sáng chế còn đề xuất chủng thể thực khuẩn P5 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4698 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Sáng chế còn đề xuất chủng thể thực khuẩn P6 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4699 hoặc

biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Sáng chế còn đề xuất chủng thể thực khuẩn P8 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4700 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Sáng chế cũng sử dụng chủng thể thực khuẩn CLB\_P2 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4675 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Đối với mục đích của sáng chế, biến thể của chủng thể thực khuẩn được xem là có cùng hoạt tính gây tan giống như chủng thể thực khuẩn này nếu nó thực hiện ít nhất “+” kháng lại ít nhất một trong số các chủng AIEC LF82, 07081, 07082, 07076 và 06075 trong “thử nghiệm in vitro về khả năng gây nhiễm của các thể thực khuẩn ở các chủng AIEC” được mô tả trong Ví dụ 3 dưới đây. Theo phương án được ưu tiên, biến thể được xem là có cùng hoạt tính gây tan nếu nó thực hiện ít nhất “+” kháng lại tất cả năm chủng AIEC LF 82, LF 06075, LF 07076, LF 07081 và LF 07082 (các chủng AIEC LF 06075, LF 07076, LF 07081 và LF 07082 cũng được viết tắt trong bản mô tả này là 06075, 07076, 07081 và 07082, một cách tương ứng). Các chủng AIEC này đã được nộp lưu bởi Université Lille 2 – Droit et Santé, 42 Rue Paul Duez, 59000 Lille (Pháp) tại Bảo tàng giống quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4712 (LF 82), CNCM I-4713 (LF 06075), CNCM I-4714 (LF 07076), CNCM I-4715 (LF 07081) và CNCM I-4716 (LF 07082).

Đối với mục đích của sáng chế, biến thể của một trong số các chủng thể thực khuẩn từ P1 đến P6, P8 và CLB\_P2 được xem là có cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này nếu nó có độ tương đồng trình tự ít nhất 80% trên ít nhất 70% chiều dài, tốt hơn là độ tương đồng trình tự ít nhất 90% trên ít nhất 80% chiều dài và tốt hơn nữa là hoàn toàn tương đồng trình tự trên ít nhất 90% chiều dài (được xác định bằng thuật toán BLAST) với protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (đối với các biến thể của P1 đến P6) hoặc thể thực khuẩn RB69 (đối với các biến

thể của P8) hoặc thể thực khuẩn JS98 (đối với các biến thể của CLB\_P2), như được mô tả dưới đây trong phần “Nhận diện các protein capsit chính”.

Theo phương án được ưu tiên, biến thể của thể thực khuẩn có cùng hoạt tính gây tan giống như thể thực khuẩn này. Theo phương án khác, biến thể của thể thực khuẩn có cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như thể thực khuẩn này.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Sáng chế đề xuất được phẩm chứa: (i) ít nhất một chủng thể thực khuẩn có khả năng tạo ra sự nhiễm gây tan ở chủng *Escherichia coli* bám dính-xâm nhập; và (ii) chất mang dược dụng; để điều trị bệnh viêm ruột.

Sáng chế còn đề xuất ít nhất một chủng thể thực khuẩn có khả năng tạo ra sự nhiễm gây tan ở chủng *Escherichia coli* bám dính-xâm nhập để sử dụng trong điều trị bệnh viêm ruột.

"Chủng *Escherichia coli* bám dính-xâm nhập (AIEC)" trong bản mô tả này cần được hiểu là chỉ chủng *E. coli* có khả năng xâm nhập trung bình là bằng hoặc cao hơn 0,1% ở dịch cấy tế bào của dòng tế bào ruột I-407. Nói cách khác, chủng AIEC có khả năng xâm nhập dịch cấy tế bào ruột I-407 với chỉ số xâm nhập bằng hoặc cao hơn 0,1% của nguyên liệu cấy ban đầu (được tính là 100%), khi được thử nghiệm theo thử nghiệm về sự xâm nhập được mô tả dưới đây trong phần “Thử nghiệm về sự xâm nhập” (xem thêm tài liệu Darfeuille-Michaud et al. (2004), *Gastroenterology* 127:412-421).

Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế về chủng AIEC là LF82, LF82SK (được nộp lưu bởi Université d'Auvergne, 49 Boulevard François Mitterrand, 63001 Clermont-Ferrand (Pháp) tại Bảo tàng giống quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4723), các chủng được liệt kê trong Bảng 1 dưới đây trong bản mô tả này và các chủng được liệt kê trong danh sách sau đây (tham khảo tài liệu Darfeuille-Michaud et al. (2004), *Gastroenterology* 127:412-421, đặc biệt là trang 417, Bảng 2): LF31, LF71, LF123, LF138, LF9, LF15, LF28, LF50, LF65, LF119, LF128, LF130, LF73, LF100, LF110, LF134, LF105, LF49-2, LB11, và LF45-2. Theo một phương án, chủng *Escherichia coli* bám dính-xâm nhập là LF82, 07081, 07082, 07076 hoặc 06075, đặc biệt là LF82.

Theo một phương án, chủng *Escherichia coli* bám dính-xâm nhập có mặt trong ruột kết của đối tượng. Theo phương án khác, chủng *Escherichia coli* bám dính-xâm nhập có mặt trong ruột hồi của đối tượng. Theo phương án khác nữa, chủng *Escherichia coli* bám dính-xâm nhập có mặt trong một hoặc nhiều phần ruột (non và/hoặc già) của đối tượng.

Theo một phương án, ít nhất một chủng thể thực khuẩn là P1 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4694 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Theo một phương án, ít nhất một chủng thể thực khuẩn là P2 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4695 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Theo một phương án, ít nhất một chủng thể thực khuẩn là P3 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4696 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Theo một phương án, ít nhất một chủng thể thực khuẩn là P4 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4697 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Theo một phương án, ít nhất một chủng thể thực khuẩn là P5 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4698 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Theo một phương án, ít nhất một chủng thể thực khuẩn là P6 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4699 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Theo một phương án, ít nhất một chủng thể thực khuẩn là P8 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4700 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Theo một phương án, ít nhất một chủng thể thực khuẩn là CLB\_P2 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4675 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất được phẩm chứa nhiều hơn một chủng thể thực khuẩn, còn được gọi là "hỗn hợp thể thực khuẩn". Hỗn hợp thể thực khuẩn theo sáng chế chứa tổ hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều chủng trong số các chủng P1, P2, P3, P4, P5, P6, P8 và CLB\_P2 và các biến thể có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình của chúng. Tốt hơn là, các thể thực khuẩn trong hỗn hợp thể thực khuẩn được dự định dùng để điều trị đối tượng hoặc nhóm đối tượng cụ thể sẽ được chọn dựa trên chủng AIEC hoặc các chủng AIEC được nhận diện và được chọn để chống lại.

Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế về bệnh viêm ruột là bệnh Crohn (CD), bệnh viêm loét đại tràng (ulcerative colitis - UC), bệnh viêm ruột mạn tính (IBD mạn tính) như, nhưng không bị giới hạn ở, bệnh viêm ruột kết hiển vi, bệnh về bụng và bệnh viêm mạch. Theo một phương án, bệnh IBD là bệnh CD hoặc UC. Theo phương án khác, bệnh viêm ruột là sự tái phát của các tổn thương ruột hồi sau phẫu thuật (như phẫu thuật loại bỏ ít nhất một phần ruột non ở bệnh nhân mắc bệnh CD). Sự tái phát có thể được đo bằng điểm số Rutgeerts.

Theo một phương án, bệnh IBD không phải là do sự nhiễm khuẩn gây ra. Phương án này dựa trên việc quan sát thấy rằng bệnh IBD là bệnh tự miễn mà thường không được xem là bệnh do vi khuẩn gây ra. Thay vào đó, sự nhiễm khuẩn có thể là cùng lúc với bệnh IBD, nhưng không nhất thiết là tác nhân gây bệnh. Việc quan sát này bổ sung thêm vào phát hiện bất ngờ của sáng chế, cụ thể là việc áp dụng liệu pháp thể thực khuẩn để điều trị bệnh không phải do vi khuẩn gây ra.

Vì lý do đó, có thể có, ví dụ, các chủng AIEC ở các thành viên trong gia đình của đối tượng mắc bệnh IBD, mặc dù các thành viên trong gia đình không mắc bệnh này. Tương tự, các chủng AIEC cũng có thể được phát hiện thấy ở các đối tượng không mắc bệnh IBD và cũng không liên quan đến các đối tượng mắc bệnh IBD, như cũng có thể thấy được trong Bảng 1 dưới đây.

"Điều trị" trong bản mô tả này cần được hiểu là bao gồm việc làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng đặc trưng cho bệnh; làm giảm tốc độ tiến triển của bệnh; phục hồi sau khi mắc bệnh, cứu chữa khỏi bệnh, việc duy trì sự thuyên giảm và phòng ngừa bệnh như ngăn ngừa sự tái phát.

"Đối tượng" trong bản mô tả này có thể là đối tượng giống đực hoặc giống cái. Đối tượng có thể là người hoặc động vật có vú bất kỳ khác.

Liều và chế độ sử dụng được phẩm theo sáng chế nhất thiết phải phụ thuộc vào hiệu quả điều trị bệnh cần đạt được (ví dụ, điều trị bệnh IBD) và có thể thay đổi theo các chủng thể thực khuẩn cụ thể trong được phẩm, đường sử dụng, và độ tuổi và tình trạng bệnh lý của từng đối tượng cụ thể được cho sử dụng được phẩm này.

Liều dùng cho người có thể chứa liều thể thực khuẩn nằm trong khoảng từ  $10^4$  đến  $10^{11}$  đơn vị tạo mảng (pfu: plaque forming unit). Liều mong muốn có thể được trình bày ở dạng một liều mỗi ngày hoặc ở dạng nhiều phân liều được sử dụng vào các khoảng thời gian thích hợp.

Trong sáng chế, thuật ngữ "chất mang được dụng" liên quan đến chất mang, chất độn hoặc chất pha loãng không độc, có thể chấp nhận được về mặt dược lý, các chất này được định nghĩa là môi trường dẫn thuốc được sử dụng phổ biến trong việc bào chế các được phẩm để sử dụng cho động vật hoặc người.

Dược phẩm theo sáng chế có thể còn chứa các chất bổ trợ dược dụng, và tùy ý các chất trị liệu khác. Chất bổ trợ, còn được gọi là thành phần phụ, bao gồm các chất bổ trợ thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này như, nhưng không bị giới hạn ở, chất tạo nền, chất làm đặc, chất kết dính, chất làm trơn, chất điều chỉnh độ pH, chất bảo vệ, chất tăng cường độ nhớt, chất hút, chất gây rã, bao gồm chất gây rã không sủi bọt và sủi bọt, chất hoạt động bề mặt, chất chống oxy hóa, chất làm ướt, chất tạo màu, chất tạo hương vị, chất che mùi vị, chất làm ngọt, chất bảo quản và chất tương tự. Ngoài tính chất dược dụng, chất bổ trợ phải "có thể chấp nhận được" theo nghĩa là chúng tương thích với các thành phần khác của dược phẩm, bao gồm thể thực khuẩn.

Các dược phẩm và đường sử dụng bao gồm các dược phẩm và đường sử dụng thích hợp để sử dụng cho hoặc qua miệng (bao gồm má, dưới lưỡi và trong khoang miệng), trực tràng, mũi, cục bộ (bao gồm qua da), mắt, tai, âm đạo, phế quản, phổi hoặc ngoài đường tiêu hóa (bao gồm dưới da, trong cơ, trong tĩnh mạch, trong da, trong bụng, trong màng phổi, trong túi bọt và trong vỏ) hoặc sử dụng thông qua mô cấy. Dược phẩm hoặc đường sử dụng có thể được làm thích hợp để tạo ra hiệu quả mục tiêu của chủng thể thực khuẩn theo sáng chế. Theo phương án cụ thể, dược phẩm theo sáng chế được sử dụng qua đường miệng. Các dược phẩm này có thể được bào chế bằng phương pháp bất kỳ đã biết rõ trong lĩnh vực dược phẩm. Các phương pháp này bao gồm bước kết hợp chủng thể thực khuẩn theo sáng chế với chất mang dược dụng và tùy ý một hoặc nhiều chất bổ trợ.

Các dược phẩm thích hợp để sử dụng qua đường miệng có thể được trình bày ở dạng các đơn vị liều rời rạc (dạng liều) như viên tròn, viên nén, viên bao đường hoặc viên nang, hoặc ở dạng bột hoặc viên cốm, hoặc ở dạng dung dịch hoặc hỗn dịch. Dược phẩm này cũng có thể được trình bày ở dạng viên liều cao hoặc bột nhào. Dược phẩm này còn có thể được bào chế thành dạng thuốc đạn hoặc dung dịch thụt để sử dụng trong trực tràng.

Để sử dụng ngoài đường tiêu hóa, các dược phẩm thích hợp bao gồm thuốc tiêm vô trùng chứa nước và không chứa nước. Các dược phẩm này có thể được trình bày trong vật chứa liều đơn vị hoặc đa liều, ví dụ, ống thuốc tiêm và lọ đóng kín, và có thể được bảo quản trong điều kiện được làm khô lạnh (được làm đông khô) chỉ yêu cầu phải bổ sung chất mang lỏng vô trùng, ví dụ, nước, trước khi sử dụng.

Để sử dụng qua da, ví dụ, gel, bột nhão hoặc thuốc phun có thể được dự tính.

Các dược phẩm hoặc chế phẩm thích hợp để sử dụng trong phổi, ví dụ, bằng cách xông hít qua mũi, bao gồm bụi mịn hoặc sương mù mà có thể được tạo ra nhờ dụng cụ bơm hơi, dụng cụ phun sương, hoặc dụng cụ phun sol khí có điều áp và đo liều.

Sáng chế còn bao gồm kit chứa dược phẩm theo sáng chế và hướng dẫn sử dụng dược phẩm để sử dụng như được mô tả ở trên, tùy ý cùng với vật liệu bao gói.

Sáng chế còn đề xuất chủng thể thực khuẩn P1 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4694 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Sáng chế còn đề xuất chủng thể thực khuẩn P2 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4695 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Sáng chế còn đề xuất chủng thể thực khuẩn P3 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4696 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Sáng chế còn đề xuất chủng thể thực khuẩn P4 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4697 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Sáng chế còn đề xuất chủng thể thực khuẩn P5 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4698 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Sáng chế còn đề xuất chủng thể thực khuẩn P6 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4699 hoặc

biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

Sáng chế còn đề xuất chủng thể thực khuẩn P8 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4700 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Sáng chế được mô tả thêm trong các ví dụ nêu dưới đây, các ví dụ này không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế được yêu cầu bảo hộ theo bất kỳ cách nào.

#### **Phương pháp**

##### **Thử nghiệm về sự xâm nhập**

Dòng tế bào Intestine-407 (I-407) thu được từ hồng tràng và ruột hồi phôi người được sử dụng làm mô hình về các tế bào biểu mô ruột chưa được biệt hóa. Dòng tế bào này được mua từ Flow Laboratories (Flow Laboratories Inc., Mc Lean, VA).

Các tế bào Intestine-407 này được cấy giống trong đĩa nuôi cấy mô loại 24 giếng (Polylabo, Strasbourg, Pháp) với mật độ là 4.105 tế bào/giếng và được ủ trong 20 giờ. Các đơn lớp tế bào được rửa hai lần bằng PBS (pH 7,2). Sự xâm nhập của vi khuẩn vào các tế bào biểu mô được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm bảo vệ gentamixin (Falkow et al. (1987), Rev. Infect. Dis. 9 (Suppl. 5):S450-455). Mỗi lớp đơn được cấy vào 1mL môi trường nuôi cấy tế bào không chứa chất kháng sinh với độ bội nhiễm là 10 vi khuẩn trong mỗi tế bào biểu mô. Sau giai đoạn ủ trong 3 giờ ở nhiệt độ 37°C với CO<sub>2</sub> 5%, các lớp đơn này được rửa 3 lần bằng PBS. Môi trường nuôi cấy tế bào mới chứa gentamixin 100µg/mL (Sigma, St. Louis, MO) được bổ sung trong 1 giờ để tiêu diệt vi khuẩn ngoại bào trước khi làm tan các lớp đơn này bằng Triton X-100 1% (Sigma) trong nước đã được khử ion. Nồng độ Triton X-100 này không ảnh hưởng đến khả năng sống sót của vi khuẩn trong ít nhất 30 phút. Các mẫu này được pha loãng và được ria cấy lên trên các đĩa thạch Mueller–Hinton để xác định số lượng đơn vị hình thành khuẩn lạc. Tất cả các kết quả về khả năng xâm nhập của *E. coli* với dòng tế bào Intestine-407 được biểu hiện ở dạng tỷ lệ phần trăm vi khuẩn nội bào so

với nguyên liệu cấy ban đầu, được tính là 100%. Tất cả các thử nghiệm đều được tiến hành ít nhất 3 lần trong các thí nghiệm riêng rẽ.

#### Nhận diện các protein capsit chính

Các protein virion được thu nhận bằng cách đun sôi 60 $\mu$ L hỗn dịch chứa 10<sup>11</sup>pfu/mL mỗi thể thực khuẩn trong 10 phút. 20 $\mu$ L hỗn dịch này được chạy trên gel polyacrylamit 4–12% đúc sẵn. Gel này được nhuộm màu xanh Coomassie và các vạch chính được cắt ra, được phân giải bằng trypsin và được phân tích bằng kỹ thuật khối phổ tại cơ sở vi giải trình tự của Viện Pasteur.

Khối lượng peptit thu được được so sánh với thông tin trong cơ sở dữ liệu về protein, cho phép nhận diện protein đã biết gần nhất, tức là wV8 đối với P1 đến P6 và RB69 đối với P8 và JS98 đối với CLB\_P2 (xem tài liệu A. Villegas et al, Virology Journal 2009, 6:41 về đặc trưng của wV8 và S. Zuber et al., Journal of Bacteriology 2007, 189:22, 8206 để biết nội dung mô tả đặc điểm của RB69 và JS 98).

Căn trình tự protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 với các peptit thu được từ khối phổ của protein capsit chính của các thể thực khuẩn P1 đến P6:

wV8 : MLTNSEKSRFFLADLTGEVQSIPNTYGYISNLGLFRSAPITQTTFMDLTDWDVSLDDAVDRDSRKA

P1 : FFLADLTGEVQSIPNTYGYISNLGLFR

P2 : SRFFLADLTGEVQSIPNTYGYISNLGLFRSAPITQTTFMDLTDWDVSLDDAVDR

P3 :

P4 :

P5 :

P6 :

wV8 : TSAPERVRQISFPMMYFKEVESITPDEIQGVRQPGTANELTTEAVVRACKLMKIRTKFDITREFLEMQ

P1 : QISFPMMYFKEVESITPDEIQGVRQPGTANELTTEAVVR TKFDITREFLEMQ

P2 : QISFPMMYFKEVESITPDEIQGVRQPGTANELTTEAVVR TKFDITREFLEMQ

P3 : QISFPMMYFKEVESITPDEIQGVRQPGTANELTTEAVVR TKFDITREFLEMQ

P4 : QISFPMMYFKEVESITPDEIQGVRQPGTANELTTEAVVR TKFDITREFLEMQ

P5 : QISFPMMYFKEVESITPDEIQGVRQPGTANELTTEAVVR TKFDITREFLEMQ

P6 : QISFPMMYFKEVESITPDEIQGVRQPGTANELTTEAVVR TKFDITREFLEMQ

wV8 : ALKGKVVDARGTLYADLYKQFDVEKKTIVYFDLDNPNADIDAAIEELRMHMEDEAKTGTVINGEEIHVV  
 P1 : ALK GTLYADLYK KTVYFDLDNPNADIDASIEELR TGTVINGEEIHVV  
 P2 : ALK GTLYADLYK TGTVINGEEIHVV  
 P3 : ALK GTLYADLYK TVYFDLDNPNADIDASIEELR TGTVINGEEIHVV  
 P4 : ALK GTLYADLYK TGTVINGEEIHVV  
 P5 : ALK GTLYADLYK TIYFDLDNPNADIDASIEELR TGTVINGEEIHVV  
 P6 : ALK GTLYADLYKQFDVEK TIYFDLDNPNADIDASIEELR TGTVINGEEIHVV  
 wV8 : VDRLFFSKLVKHPKIRDAYLAQQOTPLAWQQITGSLRTGGTDGVQAHMNTFYYGGVKFVQYNGKFKDKR  
 P1 : VDR IRDAYLAQQOTPLAWQQITGSLR FVQYNGK  
 P2 : VDRLFFSK IRDAYLAQQOTPLAWQQITGSLRTGGTDGVQAHMNTFYYGGVKFVQYNGK  
 P3 : VDR DAYLAQQOTPLAWQQITGSLR FVQYNGK  
 P4 : VDR DAYLAQQOTPLAWQQITGSLR FVQYNGK  
 P5 : VDR DAYLAQQOTPLAWQQITGSLRTGGADGVQAHMNTFYYGGVKFVQYNGK  
 P6 : DAYLAQQOTPLAWQQITGSLRTGGADGVQAHMNTFYYGGVK  
 wV8 : GKVHTLVSIDSVAAATVGVGHAFFPNVSMLEANNIFEVAYGPCPKMGYANTLGQELYVFEYEKDRDEGI  
 P1 : MGYANTLGQELYVFEYEKDR  
 P2 : MGYANTLGQELYVFEYEKDR  
 P3 :  
 P4 :  
 P5 :  
 P6 :  
 wV8 : DFEAHSYMLPYCTRPQLLDVRSQAKPD  
 P1 : PQLLDVDR  
 P2 : PQLLDVDR  
 P3 : PQLLDVDR  
 P4 : PQLLDVDR  
 P5 : PQLLDVDR  
 P6 : PQLLDVDR

**Căn trình tự protein capsit chính của thể thực khuẩn RB69 với các peptit thu được từ khối phổ của protein capsit chính của thể thực khuẩn P8:**

RB69 : MTTIKTKAQLVDKWKELLEGELPEIANSKQAIIAKIFENQEKDFEVSPEYKDEKIAQAFGSFLTEAE  
 P8 :  
 RB69 : IGGDHGYNAQNIAAGQTSQAVTQIGPAVMGMVRRRAIPNLIAFDICGVQPMNSPTGQVFALRAVYGKDP  
 P8 :

RB69 : IAAGAKEAFHPMYAPDAMFSGQGAACKFPALAASTQTKVGDIYTHFFQETGTVYLQASAQVTISSAD  
P8 : EAFHPMYAPDAMFSGQGAACK  
RB69 : DAAKLDAEIIKQMEAGALVEIAEGMATSI AELQEGFNGSTDNPWNEMGFRIDKQVIEAKSRQLKAAYS  
P8 : AAYS  
RB69 : IELAQDLRAVHGMDADAELSGILATEIMLEINREVVDWINYSAQVGKSGMTNIVGSKAGVFDFQDPID  
P8 : IELAQDLR EVVDWINYSAQVGK AGVFDFQDPID  
RB69 : IRGARWAGESFKALLFQIDKEAVEIARQTGRGEGNFIIASRNVVNLASVDTGISYAAQGLASGFNTD  
P8 : IR WAGESFK QTGRGEGNFIIASR  
RB69 : TTKSVFAGVLGGKYRVYIDQYAKQDYFTVG YKGANEMDAGIYYAPYVALTPLRGSDPKNFQPVMGFKT  
P8 : SVFAGVLGGKYRVYIDQYAKQDYFTVG YKGANEMDAGIYYAPYVALTPLR NFQPVMGFKT  
RB69 : RYGIGVNPFAESSLQAPGARIQSGMPSILNSLGKNAYFRRVYVKGI  
P8 : RYGIGVNPFAESSLQAPGARIQSGMPSILNSLGK

**Căn trình tự protein capsit chính của thể thực khuẩn JS98 với các peptit thu được từ khối phổ của protein capsit chính của thể thực khuẩn CLB\_P2.**

JS98: MKKNALVQKSALLENEALPEIVGASKQAIIAKIFENQEQDILTAPEYRDEKISEAFGSFLTEAEI  
CLB\_P2:

JS98: GGDHGYDATNIAAGQTS GAVTQIGPAVMGMVRRRAIPHLIAFDICGVQPLNNPTGQVFALRAVYGKD  
CLB\_P2: AVYGKD

JS98: PIAAGAKEAFHPMYAPNAMFSGQGAETFEALAASKVLEV GKIYSHFFEATGSAHFQAVEAVTVDA  
CLB\_P2: PIAAGAK

JS98: GATDAAKLDAAVTALVEAGQLAEIAEGMATSI AELQEGFNGSTDNPWNEMGFRIDKQVIEAKSRQL  
CLB\_P2:

JS98: KASYSIELAQDLRAVHGMDADAELSGILATEIMLEINREVIDWINYSAQVGKSGMTNTVGAKAGVF  
CLB\_P2: ASYSIELAQDLR EVIDWINYSAQVGK AGVF

JS98: DFQDPIDIRGARWAGESFKALLFQIDKEAAE IARQTGRGAGNFIIASRNVVNLAAVDTSVSYAAQ  
CLB\_P2: DFQDPIDIR WAGESFKALLFQIDKEAAE IAR GAGNFIIASR

JS98: GLGQG FNVDTTKAVFAGVLGGKYRVYIDQYARSDYFTIGYKGSNEMDAGIYYAPYVALTPLRGSDP  
CLB\_P2: AVFAGVLGGKYRVYIDQYAR GSNEMDAGIYYAPYVALTPLR

JS98: KNFQPVMGFKTRYGIGINPFADPAAQAPTKRIQNGMPDIVNSLGLNGYFRRVYVKGI

CLB\_P2: NFQPVMGFKTRYGIGINPFADPAAQAPTKRIQNGMPDIVNSLGLNGYFR

### Ví dụ 1

#### Phân lập các chủng AIEC

Một trăm sáu mươi sáu (166) chủng *Escherichia coli* (*E. coli*) bám dính-xâm nhập, bao gồm chủng *E. coli* LF82 (Bảng 1), được phân lập như sau: các chủng AIEC được phân lập từ phân tươi của bệnh nhân mắc bệnh CD, các thành viên trong gia đình của họ và các đối tượng đối chứng. Phân được pha loãng trong các dịch pha loãng mười lần lên tới  $10^{-9}$ . Mỗi dịch pha loãng được ria cấy trong các môi trường khác nhau. Sau khi ủ, các khuẩn lạc được cấy chuyển, được nhận diện và các chủng được thử nghiệm về khả năng xâm nhập.

Nói một cách chi tiết, ngay sau khi được bài tiết ra, phân tươi được cho vào vật chứa vô trùng. Môi trường khí được làm kỵ khí bằng cách bổ sung Anaerocult® đã được làm ấm. Các mẫu được xử lý vào ngày lấy mẫu. Khoảng 1g phân được đưa vào 9mL dung dịch Ringer cường độ  $\frac{1}{4}$  đã được xystein hóa trong các ống đã được cân trước; các ống này được cân lại sau khi cho mẫu vào để xác định khối lượng chính xác của nó (dịch pha loãng mười lần thứ nhất). Tám dịch pha loãng mười lần khác nữa được tạo ra và 0,1mL mỗi dịch pha loãng được ria cấy trên môi trường không chọn lọc và chọn lọc khác nhau được ủ trong các điều kiện thích hợp: thạch máu Columbia (CS) và thạch CSH được ủ trong một tuần trong điều kiện kỵ khí, môi trường MRS được ủ trong 48 giờ trong môi trường khí được làm giàu  $\text{CO}_2$ , thạch McConkey và thạch Cetrimide được ủ trong 48 giờ trong không khí. Tất cả các lần ủ được thực hiện ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$ . Sau khi ủ, các khuẩn lạc được đếm, cấy chuyển và nhận diện dựa trên tiêu chí về kiểu hình đã được thiết lập.

Đối tượng đối chứng được chọn theo bệnh nhân mắc bệnh CD sao cho đối tượng đối chứng này có cùng giới tính và độ tuổi với bệnh nhân mắc bệnh CD và có quy mô gia đình tương tự như bệnh nhân mắc bệnh CD (để xem xét sự thay đổi hệ vi sinh vật trong gia đình).

Quy trình này được phê chuẩn bởi Ủy ban đạo đức khu vực vào năm 2000. Các bệnh nhân được theo dõi bằng sổ đăng ký EPIMAD, được thành lập theo thỏa thuận

giữa Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) và Institut National de Veille Sanitaire (InVS) và cũng được hỗ trợ bởi François Aupetit Association, Lion's Club of Northwestern France, Ferring Laboratories, Société Nationale Française de Gastroentérologie và Lille University Hospital.

Bảng 1 – Các chủng AIEC

| Số                                          | Tham khảo | Xâm nhập I-407 Trung bình (%) | Xâm nhập I-407 SEM (%) | Môi trường nuôi cấy <sup>1</sup> | Pha loãng | Mức độ <i>E. coli</i> (logUFC/g) <sup>2</sup> | Tổng số lượng đếm được (logUFC/g) <sup>3</sup> |
|---------------------------------------------|-----------|-------------------------------|------------------------|----------------------------------|-----------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|
|                                             | LF82      | 1,29                          | 0,8                    | McC                              | -4        | 5,7                                           | 5,9                                            |
| AIEC được phân lập từ bệnh nhân mắc bệnh CD |           |                               |                        |                                  |           |                                               |                                                |
| 06259                                       | C4-1      | 2,050                         | 0,500                  | McC                              | -5        | 5,87                                          | 10,52                                          |
| 06254                                       | C34-12    | 2,163                         | 0,738                  | Cet                              | -2        | 2,91                                          | 10,14                                          |
| 06256                                       | C34-2     | 0,550                         | 0,170                  | McC                              | -7        | 7,91                                          | 10,14                                          |
| 06072                                       | C39-1     | 0,2075                        | 0,147                  | McC                              | -6        | 7,02                                          | 9,93                                           |
| 06073                                       | C39-2     | 0,1374                        | 0,097                  | McC                              | -6        | 7,02                                          | 9,93                                           |
| 06075                                       | C39-4     | 0,2334                        | 0,165                  | McC                              | -5        | 6,02                                          | 9,93                                           |
| 06076                                       | C39-7     | 0,5900                        | 0,417                  | Cet                              | -2        | 3,02                                          | 9,93                                           |
| 06087                                       | C42-1     | 0,1095                        | 0,055                  | McC                              | -5        | 5,82                                          | 9,58                                           |
| 06088                                       | C42-2     | 0,1954                        | 0,098                  | McC                              | -5        | 5,82                                          | 9,58                                           |
| 06089                                       | C42-3     | 0,1930                        | 0,097                  | Cet                              | -3        | 3,82                                          | 9,58                                           |
| 06398                                       | C76-10    | 0,131                         | 0,036                  | CS ana                           | -5        | 6,09                                          | 9,99                                           |
| 06011                                       | C84-2     | 0,2580                        | 0,129                  | McC                              | -6        | 6,96                                          | 9,23                                           |
| 06023                                       | C97-1     | 0,1173                        | 0,068                  | McC                              | -7        | 8,14                                          | 10,03                                          |
| 06024                                       | C97-2     | 0,1303                        | 0,075                  | McC                              | -6        | 7,14                                          | 10,03                                          |
| 06026                                       | C98-1     | 0,1439                        | 0,072                  | McC                              | -6        | 7,2                                           | 9,34                                           |
| 06027                                       | C98-2     | 0,1122                        | 0,065                  | McC                              | -6        | 7,2                                           | 9,34                                           |
| 06028                                       | C98-4     | 0,2310                        | 0,133                  | Cet                              | -2        | 3,20                                          | 9,34                                           |
| 06029                                       | C99-1     | 1,0657                        | 0,615                  | McC                              | -6        | 6,99                                          | 10,17                                          |
| 06030                                       | C99-2     | 0,1613                        | 0,081                  | McC                              | -6        | 6,99                                          | 10,17                                          |
| 06031                                       | C99-3     | 0,2330                        | 0,135                  | McC                              | -5        | 5,99                                          | 10,17                                          |
| 06033                                       | C99-9     | 0,4667                        | 0,269                  | Cet                              | -2        | 2,99                                          | 10,17                                          |
| 06150                                       | C187-13   | 0,6675                        | 0,472                  | CS ana                           | -7        | 7,93                                          | 9,97                                           |
| 06151                                       | C187-14   | 1,0350                        | 0,732                  | CS ana                           | -7        | 7,93                                          | 9,97                                           |
| 06152                                       | C187-15   | 0,4375                        | 0,253                  | CS ana                           | -7        | 7,93                                          | 9,97                                           |
| 06166                                       | C190-1    | 0,2251                        | 0,130                  | McC                              | -8        | 9,28                                          | 10,98                                          |
| 06167                                       | C190-2    | 0,1247                        | 0,072                  | McC                              | -8        | 9,28                                          | 10,98                                          |
| 06168                                       | C190-3    | 0,1688                        | 0,097                  | McC                              | -7        | 8,28                                          | 10,98                                          |
| 06169                                       | C190-4    | 0,1373                        | 0,079                  | McC                              | -6        | 7,28                                          | 10,98                                          |
| 06170                                       | C190-6    | 0,7065                        | 0,408                  | Cet                              | -3        | 4,28                                          | 10,98                                          |
| 06171                                       | C190-8    | 0,5827                        | 0,336                  | Cet                              | -2        | 3,28                                          | 10,98                                          |
| 06172                                       | C190-7    | 0,5385                        | 0,311                  | Cet                              | -2        | 3,28                                          | 10,98                                          |
| 06173                                       | C190-12   | 0,5182                        | 0,299                  | CS ana                           | -9        | 10,28                                         | 10,98                                          |
| 06280                                       | C203-7    | 0,185                         | 0,087                  | Cet                              | -3        | 3,96                                          | 9,94                                           |

| Số    | Tham khảo | Xâm nhập I-407 Trung bình (%) | Xâm nhập I-407 SEM (%) | Môi trường nuôi cấy <sup>1</sup> | Pha loãng | Mức độ <i>E. coli</i> (logUFC/g) <sup>2</sup> | Tổng số lượng đếm được (logUFC/g) <sup>3</sup> |
|-------|-----------|-------------------------------|------------------------|----------------------------------|-----------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 06281 | C203-9    | 0,393                         | 0,023                  | Cet                              | -2        | 2,96                                          | 9,94                                           |
| 06283 | C204-4    | 0,253                         | 0,092                  | McC                              | -6        | 7,00                                          | 9,78                                           |
| 06271 | C205-2    | 0,153                         | 0,052                  | McC                              | -6        | 6,93                                          | 9,97                                           |
| 06278 | C205-9    | 0,160                         | 0,005                  | Cet                              | -2        | 2,93                                          | 9,97                                           |
| 06351 | C215-8    | 0,548                         | 0,397                  | Cet                              | -5        | 5,93                                          | 9,91                                           |
| 06352 | C215-9    | 0,262                         | 0,143                  | Cet                              | -5        | 5,93                                          | 9,91                                           |
| 06353 | C215-12   | 1,960                         | 1,340                  | Cet                              | -3        | 3,93                                          | 9,91                                           |
| 06354 | C215-13   | 1,339                         | 1,281                  | Cet                              | -3        | 3,93                                          | 9,91                                           |
| 06356 | C215-10   | 2,260                         | 1,540                  | Cet                              | -3        | 3,93                                          | 9,91                                           |
| 06357 | C215-11   | 2,195                         | 1,355                  | Cet                              | -3        | 3,93                                          | 9,91                                           |
| 06358 | C215-1    | 1,110                         | 0,590                  | McC                              | -6        | 7,93                                          | 9,91                                           |
| 06359 | C215-2    | 1,523                         | 0,928                  | McC                              | -6        | 7,93                                          | 9,91                                           |
| 06360 | C215-3    | 0,165                         | 0,064                  | McC                              | -4        | 4,93                                          | 9,91                                           |
| 06361 | C215-4    | 0,315                         | 0,135                  | McC                              | -3        | 3,93                                          | 9,91                                           |
| 06362 | C215-5    | 0,980                         | 0,720                  | McC                              | -3        | 3,93                                          | 9,91                                           |
| 07074 | C43-1     | 1,5825                        | 1,3675                 | McC                              | -6        | 7,26                                          | 9,66                                           |
| 07075 | C44-1     | 0,1822                        | 0,0755                 | McC                              | -5        | 6,01                                          | 9,91                                           |
| 07076 | C44-2     | 0,5950                        | 0,3350                 | McC                              | -5        | 6,01                                          | 9,91                                           |
| 07077 | C44-3     | 0,1432                        | 0,0486                 | McC                              | -4        | 5,01                                          | 9,91                                           |
| 07078 | C44-4     | 0,3086                        | 0,1764                 | McC                              | -4        | 5,01                                          | 9,91                                           |
| 07081 | C44-9     | 0,5525                        | 0,2675                 | Cet                              | -2        | 3,01                                          | 9,91                                           |
| 07082 | C45-1     | 0,4675                        | 0,0925                 | McC                              | -5        | 5,94                                          | 9,46                                           |
| 07086 | C45-9     | 0,2110                        | 0,0842                 | Cet                              | -2        | 2,94                                          | 9,46                                           |
| 07093 | C50-2     | 1,3125                        | 0,9375                 | McC                              | -5        | 5,99                                          | 7,69                                           |
| 07035 | C66-2     | 0,6475                        | 0,3125                 | McC                              | -7        | 8,01                                          | 9,53                                           |
| 07045 | C71-1     | 0,2079                        | 0,1226                 | McC                              | -5        | 5,95                                          | 10,58                                          |
| 07046 | C71-2     | 0,2030                        | 0,0719                 | McC                              | -4        | 4,95                                          | 10,58                                          |
| 07048 | C71-5     | 0,2388                        | 0,1382                 | Cet                              | -2        | 2,95                                          | 10,58                                          |
| 07051 | C100-11A  | 0,6325                        | 0,3425                 | MRS                              | -4        | 5,07                                          | 10,47                                          |
| 07003 | C112-4    | 0,2513                        | 0,0861                 | McC                              | -5        | 6,14                                          | 10,88                                          |
| 07006 | C112-10   | 0,8913                        | 0,1863                 | Cet                              | -2        | 3,14                                          | 10,88                                          |
| 07022 | C121-8    | 0,1903                        | 0,0448                 | Cet                              | -5        | 6,14                                          | 10,88                                          |
| 07101 | C55-1     | 0,678                         | 0,022                  | McC                              | -6        | 6,95                                          | 10,38                                          |
| 07103 | C55-3     | 9,175                         | 2,775                  | McC                              | -5        | 5,95                                          | 10,38                                          |
| 07107 | C55-8A    | 4,425                         | 0,075                  | Cet                              | -2        | 2,95                                          | 10,38                                          |
| 07111 | C60-1     | 0,232                         | 0,028                  | McC                              | -6        | 6,84                                          | 8,20                                           |
| 07113 | C60-3     | 0,340                         | 0,105                  | McC                              | -4        | 4,84                                          | 8,20                                           |
| 07126 | C231-1    | 0,323                         | 0,097                  | McC                              | -7        | 7,94                                          | 10,62                                          |
| 07127 | C231-2    | 0,141                         | 0,030                  | McC                              | -6        | 6,94                                          | 10,62                                          |
| 07128 | C231-5    | 0,365                         | 0,095                  | Cet                              | -3        | 3,94                                          | 10,62                                          |
| 07134 | C233-1    | 0,645                         | 0,090                  | McC                              | -3        | 3,98                                          | 6,18                                           |
| 07135 | C233-3    | 1,510                         | 0,390                  | McC                              | -2        | 2,98                                          | 6,18                                           |
| 07136 | C233-2    | 2,090                         | 0,260                  | McC                              | -3        | 3,98                                          | 6,18                                           |

| Số                                                                        | Tham khảo | Xâm nhập I-407 Trung bình (%) | Xâm nhập I-407 SEM (%) | Môi trường nuôi cấy <sup>1</sup> | Pha loãng | Mức độ <i>E. coli</i> (logUFC/g) <sup>2</sup> | Tổng số lượng đếm được (logUFC/g) <sup>3</sup> |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------|------------------------|----------------------------------|-----------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 07137                                                                     | C233-11   | 1,108                         | 0,168                  | CSH                              | -3        | 3,98                                          | 6,18                                           |
| AIEC được phân lập từ thành viên trong gia đình của bệnh nhân mắc bệnh CD |           |                               |                        |                                  |           |                                               |                                                |
| 06066                                                                     | C22-9     | 0,2710                        | 0,192                  | CS ana                           | -7        | 7,94                                          | 10,12                                          |
| 06381                                                                     | C33-5     | 0,465                         | 0,185                  | Cet                              | -2        | 2,90                                          | 9,46                                           |
| 06258                                                                     | C35-5     | 0,873                         | 0,428                  | McC                              | -6        | 7,64                                          | 10,14                                          |
| 06086                                                                     | C41-7     | 0,1242                        | 0,072                  | Cet                              | -2        | 2,91                                          | 10,14                                          |
| 06384                                                                     | C47-2     | 0,180                         | 0,010                  | McC                              | -6        | 7,07                                          | 9,62                                           |
| 06386                                                                     | C47-4     | 0,121                         | 0,047                  | McC                              | -5        | 6,07                                          | 9,62                                           |
| 06097                                                                     | C64-2     | 1,4550                        | 1,029                  | McC                              | -5        | 6,03                                          | 9,80                                           |
| 06099                                                                     | C64-5     | 0,1175                        | 0,068                  | Cet                              | -2        | 3,03                                          | 9,80                                           |
| 06100                                                                     | C64-6     | 1,1225                        | 0,794                  | Cet                              | -2        | 3,03                                          | 9,8                                            |
| 06006                                                                     | C81-1     | 0,2850                        | 0,202                  | McC                              | -5        | 5,96                                          | 9,64                                           |
| 06007                                                                     | C81-2     | 0,3200                        | 0,226                  | McC                              | -5        | 5,96                                          | 9,64                                           |
| 06016                                                                     | C85-1     | 0,7540                        | 0,435                  | McC                              | -7        | 8,01                                          | 10,16                                          |
| 06019                                                                     | C85-5     | 1,4775                        | 1,045                  | Cet                              | -2        | 3,01                                          | 10,16                                          |
| 06394                                                                     | C87-7     | 0,130                         | 0,030                  | MRS                              | -2        | 3,03                                          | 9,42                                           |
| 06020                                                                     | C92-1     | 0,1253                        | 0,072                  | McC                              | -5        | 6,09                                          | 9,64                                           |
| 06021                                                                     | C92-2     | 0,1678                        | 0,097                  | McC                              | -4        | 5,09                                          | 9,64                                           |
| 06022                                                                     | C92-4     | 0,1229                        | 0,071                  | McC                              | -2        | 3,09                                          | 9,64                                           |
| 06396                                                                     | C95-1     | 4,975                         | 2,575                  | McC                              | -6        | 7,1                                           | 9,75                                           |
| 06037                                                                     | C102-1    | 0,6767                        | 0,391                  | McC                              | -6        | 6,90                                          | 8,55                                           |
| 06040                                                                     | C102-7    | 0,2342                        | 0,135                  | CS ana                           | -6        | 6,9                                           | 8,55                                           |
| 06080                                                                     | C107-2    | 0,5050                        | 0,357                  | McC                              | -6        | 7,1                                           | 9,55                                           |
| 06042                                                                     | C107-3    | 0,1900                        | 0,110                  | McC                              | -6        | 7,1                                           | 9,55                                           |
| 06043                                                                     | C107-5    | 1,7600                        | 1,245                  | McC                              | -6        | 7,1                                           | 9,55                                           |
| 06045                                                                     | C107-10   | 0,1975                        | 0,140                  | Cet                              | -2        | 3,1                                           | 9,55                                           |
| 06046                                                                     | C108-2    | 0,3925                        | 0,278                  | McC                              | -6        | 7,12                                          | 10,54                                          |
| 06049                                                                     | C108-10   | 0,2425                        | 0,171                  | CS ana                           | -7        | 8,12                                          | 10,54                                          |
| 06057                                                                     | C133-1    | 0,2475                        | 0,175                  | McC                              | -6        | 6,98                                          | 10,49                                          |
| 06101                                                                     | C133-4    | 0,1809                        | 0,090                  | Cet                              | -2        | 2,98                                          | 10,49                                          |
| 06160                                                                     | C189-2    | 1,3483                        | 0,778                  | McC                              | -6        | 7,07                                          | 10,19                                          |
| 06164                                                                     | C189-16B  | 0,3295                        | 0,190                  | CSH                              | -8        | 8,07                                          | 10,19                                          |
| 06176                                                                     | C191-4    | 0,3975                        | 0,281                  | McC                              | -5        | 5,96                                          | 10,34                                          |
| 06177                                                                     | C191-5    | 0,3185                        | 0,225                  | McC                              | -5        | 5,96                                          | 10,34                                          |
| 06293                                                                     | C207-6    | 0,175                         | 0,111                  | Cet                              | -2        | 2,93                                          | 10,13                                          |
| 06295                                                                     | C208-6    | 0,116                         | 0,047                  | Cet                              | -2        | 2,91                                          | 10,57                                          |
| 06301                                                                     | C211-1    | 0,285                         | 0,242                  | McC                              | -2        | 2,87                                          | 10,07                                          |
| 06329                                                                     | C218-2    | 0,649                         | 0,439                  | McC                              | -6        | 6,88                                          | 10,06                                          |
| 06338                                                                     | C218-13   | 0,208                         | 0,047                  | Cet                              | -5        | 5,88                                          | 10,06                                          |
| 06341                                                                     | C218-16   | 0,304                         | 0,218                  | Cet                              | -4        | 4,88                                          | 10,06                                          |
| 07064                                                                     | C225-1    | 0,1280                        | 0,0058                 | McC                              | -4        | 4,90                                          | 10,10                                          |
| 07065                                                                     | C225-2    | 0,8354                        | 0,7146                 | McC                              | -4        | 4,90                                          | 10,10                                          |
| 07066                                                                     | C225-5    | 0,9200                        | 0,4150                 | McC                              | -6        | 6,87                                          | 9,49                                           |

| Số                                            | Tham khảo | Xâm nhập I-407 Trung bình (%) | Xâm nhập I-407 SEM (%) | Môi trường nuôi cấy <sup>1</sup> | Pha loãng | Mức độ <i>E. coli</i> (logUFC/g) <sup>2</sup> | Tổng số lượng đếm được (logUFC/g) <sup>3</sup> |
|-----------------------------------------------|-----------|-------------------------------|------------------------|----------------------------------|-----------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 07067                                         | C225-6    | 1,0792                        | 0,5977                 | McC                              | -5        | 5,87                                          | 9,49                                           |
| 07068                                         | C226-1    | 0,1193                        | 0,0334                 | McC                              | -5        | 6,06                                          | 10,58                                          |
| 07073                                         | C227-4    | 0,2164                        | 0,1568                 | Cet                              | -2        | 2,88                                          | 10,06                                          |
| 07120                                         | C228-2    | 0,228                         | 0,013                  | McC                              | -2        | 3,17                                          | 9,72                                           |
| 07121                                         | C229-1    | 0,126                         | 0,012                  | McC                              | -5        | 6,06                                          | 9,50                                           |
| 07122                                         | C229-2    | 0,117                         | 0,034                  | McC                              | -4        | 5,06                                          | 9,50                                           |
| 07123                                         | C229-7    | 0,190                         | 0,045                  | Cet                              | -5        | 6,06                                          | 9,50                                           |
| 07131                                         | C232-5    | 0,190                         | 0,122                  | Cet                              | -2        | 2,98                                          | 9,60                                           |
| 07138                                         | C235-1    | 0,658                         | 0,193                  | McC                              | -5        | 6,02                                          | 9,42                                           |
| AIEC được phân lập từ các đối tượng đối chứng |           |                               |                        |                                  |           |                                               |                                                |
| 06235                                         | C174-6    | 2,833                         | 2,468                  | Cet                              | -2        | 3,05                                          | 10,59                                          |
| 06242                                         | C177-1    | 0,251                         | 0,175                  | McC                              | -6        | 6,99                                          | 9,95                                           |
| 06103                                         | C177-13   | 0,1461                        | 0,073                  | CS ana                           | -7        | 7,99                                          | 9,95                                           |
| 06105                                         | C177-2    | 0,1571                        | 0,079                  | McC                              | -5        | 5,99                                          | 9,95                                           |
| 06106                                         | C178-23   | 0,4527                        | 0,261                  | CSH                              | -5        | 6,03                                          | 10,24                                          |
| 06108                                         | C179-7    | 0,1103                        | 0,064                  | Cet                              | -2        | 3,07                                          | 10,53                                          |
| 06142                                         | C181-5    | 1,1525                        | 0,815                  | Cet                              | -3        | 4,01                                          | 9,96                                           |
| 06143                                         | C183-12   | 0,2117                        | 0,122                  | CSH                              | -7        | 8,2                                           | 9,95                                           |
| 06121                                         | C183-2    | 0,1867                        | 0,108                  | McC                              | -4        | 5,2                                           | 9,95                                           |
| 06122                                         | C183-5    | 1,1025                        | 0,780                  | Cet                              | -2        | 3,20                                          | 9,95                                           |
| 06145                                         | C184-17   | 0,1095                        | 0,077                  | CSH                              | -5        | 6,09                                          | 9,64                                           |
| 06146                                         | C185-22   | 0,3933                        | 0,227                  | CSH                              | -5        | 5,88                                          | 9,88                                           |
| 06126                                         | C185-1    | 0,6050                        | 0,428                  | McC                              | -4        | 4,88                                          | 9,88                                           |
| 06135                                         | C185-2    | 0,4500                        | 0,318                  | McC                              | -5        | 5,88                                          | 9,88                                           |
| 06136                                         | C185-3    | 0,4875                        | 0,345                  | McC                              | -2        | 2,88                                          | 9,88                                           |
| 06137                                         | C185-6    | 0,3125                        | 0,221                  | Cet                              | -2        | 2,88                                          | 9,88                                           |
| 06127                                         | C186-1    | 0,1063                        | 0,053                  | McC                              | -6        | 6,86                                          | 10,04                                          |
| 06129                                         | C186-4    | 0,4700                        | 0,332                  | Cet                              | -3        | 3,86                                          | 10,04                                          |
| 06158                                         | C188-15   | 0,1052                        | 0,061                  | CS ana                           | -6        | 6,94                                          | 9,60                                           |
| 06196                                         | C192-11   | 0,508                         | 0,279                  | Cet                              | -2        | 2,92                                          | 9,44                                           |
| 06197                                         | C195-1    | 0,206                         | 0,157                  | McC                              | -5        | 5,95                                          | 9,72                                           |
| 06198                                         | C195-2    | 1,806                         | 1,363                  | McC                              | -4        | 4,95                                          | 9,72                                           |
| 06200                                         | C195-6    | 2,498                         | 1,482                  | Cet                              | -2        | 2,95                                          | 9,72                                           |
| 06201                                         | C196-1    | 0,218                         | 0,105                  | McC                              | -7        | 7,87                                          | 9,61                                           |
| 06204                                         | C196-4    | 0,307                         | 0,163                  | McC                              | -5        | 5,87                                          | 9,61                                           |
| 06212                                         | C197-1    | 3,133                         | 1,438                  | McC                              | -6        | 6,86                                          | 10,32                                          |
| 06213                                         | C197-2    | 0,445                         | 0,042                  | McC                              | -6        | 6,86                                          | 10,32                                          |
| 06216                                         | C197-6    | 0,886                         | 0,782                  | Cet                              | -2        | 2,86                                          | 10,32                                          |
| 06217                                         | C198-1    | 0,143                         | 0,112                  | McC                              | -6        | 7,07                                          | 10,03                                          |
| 06218                                         | C198-2    | 0,113                         | 0,096                  | McC                              | -6        | 7,07                                          | 10,03                                          |
| 06221                                         | C199-3    | 5,367                         | 3,132                  | McC                              | -4        | 5,06                                          | 9,79                                           |
| 06222                                         | C199-4    | 1,353                         | 0,942                  | McC                              | -3        | 4,06                                          | 9,79                                           |
| 06223                                         | C199-5    | 2,980                         | 2,122                  | McC                              | -3        | 4,06                                          | 9,79                                           |

| Số    | Tham khảo | Xâm nhập I-407 Trung bình (%) | Xâm nhập I-407 SEM (%) | Môi trường nuôi cấy <sup>1</sup> | Pha loãng | Mức độ <i>E. coli</i> (logUFC/g) <sup>2</sup> | Tổng số lượng đếm được (logUFC/g) <sup>3</sup> |
|-------|-----------|-------------------------------|------------------------|----------------------------------|-----------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 06224 | C199-6    | 5,398                         | 2,837                  | McC                              | -3        | 4,06                                          | 9,79                                           |
| 06225 | C200-1    | 0,538                         | 0,277                  | McC                              | -3        | 4,06                                          | 9,79                                           |
| 07032 | C222-1    | 0,1038                        | 0,0783                 | McC                              | -6        | 7,14                                          | 10,88                                          |
| 07033 | C222-2    | 1,2425                        | 0,6575                 | McC                              | -6        | 7,14                                          | 10,88                                          |
| 07125 | C230-1    | 0,300                         | 0,055                  | McC                              | -5        | 6,0                                           | 10,2                                           |

<sup>1</sup> McC = thạch McConkey (bioMérieux)

Cet = thạch Cetrimide (bioMérieux)

CS ana = thạch máu Columbia kỵ khí

MRS = thạch Man Rogosa Sharp (Oxoid)

CSH = thạch Columbia SH

<sup>2</sup> "Mức độ *E. coli*" chỉ số lượng chủng AIEC trong phân.

<sup>3</sup> "Tổng số lượng đếm được" chỉ tất cả các loài vi khuẩn trong phân.

Môi trường nuôi cấy CS ana có thành phần nêu dưới đây (trong mỗi lít môi trường):

- 39g nền thạch máu Columbia (Oxoid)
- 5g glucoza
- 0,3g xystein clohydrat
- 5g thạch
- pH=7,0 ± 0,2

Hỗn hợp được khử trùng trong 15 phút ở nhiệt độ 121°C. Ngay trước khi ria cấy, máu ngựa 5% được bổ sung.

Môi trường nuôi cấy CSH có thành phần nêu dưới đây (trong mỗi lít môi trường):

- 39g nền thạch máu Columbia (Oxoid)
- 3g xystein clohydrat
- pH=6,8 ± 0,2

Hỗn hợp được khử trùng trong 15 phút ở nhiệt độ 121°C. Ngay trước khi ria cấy, 2mL dung dịch amoni xitrat vô trùng (0,25g/10mL nước) được bổ sung. Sau khi ủ, vi khuẩn sử dụng xystein (và giải phóng sulfua) tạo ra các khuẩn lạc màu đen trong môi trường này.

## Ví dụ 2

### Phân lập thể thực khuẩn

Thể thực khuẩn được phân lập từ nước thải như sau: nước thải được lọc ở 0,2µm và được trộn với thể tích ngang bằng của môi trường 2X Luria-Bertani (LB). Hỗn hợp này được cấy giống cấy chứa chủng LF82 mới và được ủ trên thiết bị lắc ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Cloroform (1/10 thể tích) được bổ sung vào bình và được đặt trên thiết bị lắc trong một giờ. Môi trường này được ly tâm với tốc độ là 10.000g trong 10 phút. 1mL dịch nổi bề mặt được thu lại và 1/10 thể tích cloroform được bổ sung vào. Sau khi trộn sơ bộ bằng thiết bị trộn xoáy, ống Eppendorf được ly tâm với tốc độ là 7500g trong 5 phút. Để xác định xem liệu các thể thực khuẩn có mặt trong phần chiết này hay không, một giọt (10µL) dịch nổi bề mặt được đặt lên đĩa thạch LB và được để khô. Bằng cách sử dụng dây bạch kim, đĩa này được cấy vạch từ giọt này đến phần còn lại của đĩa để phân lập các thể thực khuẩn riêng rẽ. 1mL giống cấy chứa chủng LF82 đang sinh trưởng được đặt lên để phủ toàn bộ đĩa; phần dư được loại bỏ và đĩa này được ủ ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Một hoặc hai mảng được thu lại và được tạo huyền phù lại trong 200µL đệm SM (TrisHCl 10mM pH7, NaCl 200mM, gelatin 0,03%). 20µL cloroform được bổ sung trong từng ống và các ống được trộn sơ bộ bằng thiết bị trộn xoáy và được ly tâm với tốc độ là 7500g trong 5 phút. 10µL dịch nổi bề mặt được đặt lên đĩa LB và được để khô và quy trình nêu trên được lặp lại ít nhất ba lần. Khi phần lớn các mảng đã được phân lập trở nên đồng nhất, 10µL mảng đã được tạo huyền phù lại cuối cùng được bổ sung vào 1mL giống cấy chứa chủng LF82 đang sinh trưởng với OD=0,1 ở 600nm. Ống giống cấy này được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 2 đến 4 giờ cho đến khi xảy ra sự tan bào. Sau khi bổ sung 1/10 thể tích cloroform, giống cấy này được chuyển sang ống Eppendorf, được ly tâm với tốc độ là 7500g trong 5 phút và được làm lạnh đến nhiệt độ 4°C, nhờ đó thu được nguyên liệu gốc sơ cấp. Một vài dịch pha loãng của nguyên liệu gốc này được giữ ở nhiệt độ 4°C và được

sử dụng để gây nhiễm một thể tích giống cấy lớn hơn để tạo ra lượng thể thực khuẩn lớn hơn. Thu được bảy (7) thể thực khuẩn như sau:

- vB\_EcoM\_LF82\_P1 (được gọi ở trên và ở dưới đây là P1) được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4694;
- vB\_EcoM\_LF82\_P2 (được gọi ở trên và ở dưới đây là P2) được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4695;
- vB\_EcoM\_LF82\_P3 (được gọi ở trên và ở dưới đây là P3) được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4696;
- vB\_EcoM\_LF82\_P4 (được gọi ở trên và ở dưới đây là P4) được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4697;
- vB\_EcoM\_LF82\_P5 (được gọi ở trên và ở dưới đây là P5) được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4698;
- vB\_EcoM\_LF82\_P6 (được gọi ở trên và ở dưới đây là P6) được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4699; và
- vB\_EcoM\_LF82\_P8 (được gọi ở trên và ở dưới đây là P8) được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4700.

CLB\_P2, được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4675, và việc phân lập nó được mô tả chi tiết trong tài liệu Maura et al. *Environmental Microbiology* (2012) 14(8), 1844–1854.

Các thể thực khuẩn P1 đến P6 thuộc họ thể thực khuẩn wV8.

P8 thuộc họ thể thực khuẩn RB69.

CLB\_P2 thuộc họ thể thực khuẩn JS98.

Việc phân loại vào họ thể thực khuẩn wV8, RB69 và JS98 được thực hiện dựa trên trình tự của protein capsit chính.

### Ví dụ 3

Thử nghiệm in vitro về khả năng gây nhiễm của các thể thực khuẩn ở các chủng AIEC

Thử nghiệm mảng được tiến hành bằng cách cho các dịch pha loãng theo dãy của dung dịch thể thực khuẩn (từ không được pha loãng đến pha loãng với hệ số pha loãng là  $10^{-8}$ ) tiếp xúc với đĩa Petri có bề mặt được phủ bằng một vi khuẩn. Sau khi ủ qua đêm ở nhiệt độ  $37^{\circ}\text{C}$ , đếm các mảng. Khi vi khuẩn được thử nghiệm là vật chủ vi khuẩn (vật chủ tham chiếu) được sử dụng để phân lập các thể thực khuẩn, thì thử nghiệm mảng được cho là mang lại hiệu quả 100%. Khi vi khuẩn được thử nghiệm không phải là vật chủ ban đầu, thì các kết quả được thể hiện bằng cách so sánh với vật chủ tham chiếu. Kết quả lớn hơn 80% (+++) có nghĩa là vi khuẩn này là vật chủ có hiệu quả cao so với vật chủ tham chiếu, trong khi kết quả nằm trong khoảng từ 0,1 đến 80% (++) có nghĩa là vi khuẩn là vật chủ có hiệu quả, và kết quả thấp hơn 0,1% (+) nhưng cao hơn 0 có nghĩa là vi khuẩn là vật chủ có hiệu quả vừa phải, và cuối cùng, 0 (-) có nghĩa là vi khuẩn này kháng hoàn toàn.

### Kết quả

Bảng 2 thể hiện kết quả về phổ vật chủ của 8 thể thực khuẩn (được phân lập/được nhận diện trong Ví dụ 2) trên 38 chủng (trong số 166 chủng được phân lập trong Ví dụ 1, Bảng 1)

Bảng 2. Các chủng được thử nghiệm và hiệu quả hữu hiệu của việc ria cấy (EOP) thu được đối với mỗi thể thực khuẩn

| Chủng vi khuẩn | Thể thực khuẩn |     |     |     |     |     |     |        |
|----------------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------|
|                | P1             | P2  | P3  | P4  | P5  | P6  | P8  | CLB_P2 |
| LF82           | +++            | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++    |
| 06023          | -              | -   | -   | -   | -   | -   | -   | ++     |
| 06030          | -              | -   | -   | -   | -   | -   | +   | +++    |
| 06033          | ++             | ++  | ++  | ++  | ++  | ++  | +   | +++    |
| 06066          | -              | -   | -   | -   | -   | -   | +++ | -      |
| 06072          | -              | -   | -   | -   | -   | -   | +   | ++     |
| 06073          | -              | -   | -   | -   | -   | -   | +   | +++    |
| 06075          | +++            | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +   | ++     |
| 06088          | ++             | ++  | ++  | ++  | ++  | ++  | -   | -      |

|       |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 06089 | ++  | ++  | ++  | ++  | ++  | ++  | -   | -   |
| 06122 | ++  | ++  | ++  | ++  | ++  | ++  | -   | -   |
| 06150 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   |
| 06351 | ++  | ++  | ++  | ++  | ++  | ++  | -   | ++  |
| 06353 | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   |
| 06354 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 06356 | ++  | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   |
| 06357 | +   | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   |
| 06358 | ++  | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   |
| 06359 | ++  | +   | +   | +   | +   | +   | -   | -   |
| 06361 | +   | ++  | +   | +   | +   | +   | +   | -   |
| 06362 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 07045 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 07046 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | ++  |
| 07048 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 07051 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 07075 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 07076 | ++  | +++ | ++  | +   | +   | +   | +++ | ++  |
| 07077 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 07078 | ++  | +++ | +   | +   | +   | +   | +   | ++  |
| 07081 | ++  | +++ | ++  | +   | +   | ++  | +++ | ++  |
| 07082 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++  |
| 07107 | +++ | ++  | +++ | ++  | +++ | +++ | -   | +++ |
| 07126 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | -   | ++  |
| 07127 | +++ | ++  | +++ | +++ | ++  | ++  | -   | ++  |
| 07128 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | ++  |
| 07134 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 07135 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | ++  |
| 07136 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 07137 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | ++  | -   |

Bảng 3. Số chủng bị gây nhiễm bởi thể thực khuẩn:

| Hiệu lực | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P8 | CLB_P2 |
|----------|----|----|----|----|----|----|----|--------|
| +        | 3  | 5  | 6  | 9  | 9  | 8  | 8  | 0      |
| ++       | 10 | 8  | 8  | 6  | 6  | 7  | 1  | 13     |
| +++      | 5  | 6  | 5  | 4  | 4  | 4  | 4  | 5      |
| Tổng/38  | 18 | 19 | 19 | 19 | 19 | 19 | 13 | 18     |

Các con số nêu trên chỉ số lượng chủng bị gây nhiễm bởi một thể thực khuẩn

## Ví dụ 4

Sự sao chép in vivo của các thể thực khuẩn trong ruột của chuột nhắt

Sự sao chép in vivo của các thể thực khuẩn trong ruột của chuột nhắt được đánh giá như sau:

Trước tiên, chủng LF82 được thiết kế để mang hai gen kháng kháng sinh lần lượt mang lại khả năng kháng với Streptomycin và Kanamycin. Chủng vi khuẩn mới này được đặt tên là LF82SK và các tính chất xâm nhập của nó được xác nhận là tương tự với chủng LF82 gốc.

Ba (3) nhóm, mỗi nhóm bao gồm hai (2) con chuột nhắt:

Nhóm 1: chuột nhắt không bị xâm chiếm + thể thực khuẩn

Nhóm 2: Chuột nhắt bị xâm chiếm bởi LF82SK

Nhóm 3: Chuột nhắt bị xâm chiếm bởi LF82SK + thể thực khuẩn

Streptomycin (5g/L) được bổ sung vào nước uống của tất cả các con chuột nhắt 3 ngày trước ngày 0 và được duy trì trong suốt thời gian thí nghiệm.

Vào ngày 0, LF82SK được cung cấp cho nhóm 2 và 3 để cho phép chủng này xâm chiếm ruột của chuột nhắt.

Vào ngày 4, 200µL hỗn hợp chứa các thể thực khuẩn P2 + P6 được cung cấp cho nhóm 1 và 3 (dung dịch nuôi bằng ống  $10^8$ pfu/mL) một lần vào buổi sáng và một lần vào buổi chiều. Các thể thực khuẩn P2+P6 cũng được bổ sung vào nước uống ( $10^8$ pfu/mL). Vào buổi sáng của ngày 5, chuột nhắt được cho chết để đánh giá số lượng vi khuẩn và thể thực khuẩn trong ruột hồi và trong phân.

Kết quả:

Vi khuẩn (*E. coli*):

Nhóm 1: không có vi khuẩn;

Nhóm 2: trong ruột hồi –  $10^6$ cfu/g cơ quan; trong phân –  $10^8$ cfu/cơ quan;

Nhóm 3: trong ruột hồi và phân: tất cả các vi khuẩn đều bị làm tan bởi thể thực khuẩn.

Thể thực khuẩn:

Nhóm 1: trong ruột hồi –  $10^6$  pfu/g cơ quan; trong phân –  $10^7$  pfu/cơ quan;

Nhóm 2: không có thể thực khuẩn

Nhóm 3: trong ruột hồi –  $10^6$  pfu/g cơ quan; trong phân –  $10^{10}$  pfu/cơ quan;

Trong phân, nhóm 3 có lượng thể thực khuẩn nhiều gấp 100 lần so với nhóm 1, thể hiện sự nhân lên của thể thực khuẩn in vivo.

#### Ví dụ 5

Sự sao chép in vivo của các thể thực khuẩn trong ruột của chuột nhắt

Sự sao chép in vivo của các thể thực khuẩn trong ruột của chuột nhắt được đánh giá như sau:

12 con chuột nhắt được chia thành ba (3) nhóm, mỗi nhóm có bốn (4) con chuột nhắt:

Nhóm 1: chuột nhắt không bị xâm chiếm + thể thực khuẩn

Nhóm 2: Chuột nhắt bị xâm chiếm bởi LF82SK

Nhóm 3: Chuột nhắt bị xâm chiếm bởi LF82SK + thể thực khuẩn

Streptomycin (5g/L) được bổ sung vào nước uống của tất cả các con chuột nhắt 3 ngày trước ngày 0 và được duy trì trong suốt thời gian thí nghiệm.

Vào ngày 0, LF82SK được cung cấp cho chuột nhắt của nhóm 2 và 3 để cho phép chủng này xâm chiếm ruột của chuột nhắt.

Vào ngày 4, các thể thực khuẩn (hỗn hợp chứa P2+P6+P8 với nồng độ là  $10^8$  pfu/mL mỗi thể thực khuẩn) được bổ sung vào nước uống của nhóm 1 và 3.

Vào ngày 5, chuột nhắt bị giết để đánh giá số lượng vi khuẩn và thể thực khuẩn trong ruột hồi và trong phân. 100 $\mu$ L sản phẩm đồng nhất ruột hồi từ ba nhóm được lấy để chiết toàn bộ ADN bằng cách sử dụng kit tinh chế ADN mô Maxwell® 16 Tissue DNA của Promega.

Kết quả:

Vi khuẩn (*E. coli*):

Nhóm 1: không có vi khuẩn;

Nhóm 2: trong ruột hồi –  $3,2 \cdot 10^6$  cfu/g cơ quan; trong phân –  $1,2 \cdot 10^9$  cfu/g phân;

Nhóm 3: trong ruột hồi và phân: tất cả các vi khuẩn đều được làm tan bởi thể thực khuẩn.

Thể thực khuẩn:

Nhóm 1: trong ruột hồi –  $1,4 \cdot 10^6$  pfu/g cơ quan; trong phân –  $5,2 \cdot 10^6$  pfu/g phân;

Nhóm 2: không có thể thực khuẩn

Nhóm 3: trong ruột hồi –  $2,6 \cdot 10^6$  pfu/g cơ quan; trong phân –  $1,0 \cdot 10^9$  pfu/g phân;

Trong phân, nhóm 3 có lượng thể thực khuẩn nhiều gấp 200 lần so với nhóm 1, thể hiện sự nhân lên của thể thực khuẩn in vivo.

ADN được chiết từ các đoạn ruột hồi được sử dụng để chạy PCR định lượng bằng cách sử dụng hai bộ mồi. Một bộ mồi (SEQ ID NO: 30-31) có vai trò khuếch đại ADN từ "tất cả các vi khuẩn" có mặt trong mẫu trong khi bộ thứ hai (SEQ ID NO: 32-33) được sử dụng để khuếch đại một cách cụ thể ADN từ vi khuẩn "*E. coli*". Sau khi chuẩn hóa, các kết quả được thể hiện dưới dạng tỷ lệ của *E. coli* so với tất cả các vi khuẩn.

Nhóm 1: khuếch đại qPCR thành công với tất cả các đoạn mồi vi khuẩn nhưng không thành công với đoạn mồi *E. coli*. Tỷ lệ này không thể tính được.

Nhóm 2: khuếch đại qPCR thành công với cả hai bộ mồi. Tỷ lệ trung bình là 0,6 (60% tổng số vi khuẩn là vi khuẩn *E. coli*)

Nhóm 3: khuếch đại qPCR thành công với cả hai bộ mồi. Tỷ lệ trung bình là 0,1 (10% tổng số vi khuẩn là vi khuẩn *E. coli*). Lưu ý rằng một con chuột nhất thể hiện tỷ lệ là 0,4 trong khi ba con còn lại thể hiện các trị số thấp hơn nhiều (0,06; 0,0002; 0,002).

Kết quả là, các thể thực khuẩn có thể làm giảm mức độ xâm chiếm ruột hồi của vi khuẩn LF82 đi ít nhất một bậc độ lớn ở ba trong số bốn con chuột nhất.

## Ví dụ 6

Thử nghiệm in vivo về khả năng gây nhiễm của các thể thực khuẩn

Hai hỗn hợp chứa các thể thực khuẩn được chọn để thử nghiệm ở chuột nhắt kiêu đại (WT: wild-type) và ở chuột nhắt CEACAM6 bị nhiễm chủng LF82 *E. coli* được phân lập từ bệnh nhân mắc bệnh CD.

Ở cả chuột nhắt WT và ở chuột nhắt CEACAM6 bị nhiễm chủng LF82 *E. coli* được phân lập từ bệnh nhân mắc bệnh CD, các thể thực khuẩn được cung cấp cho chuột nhắt bằng ống qua đường miệng trong CMC. Dạng cung cấp này có nhiều ưu điểm: biết được lượng thể thực khuẩn được cung cấp và trung hòa độ axit trong dạ dày tức thì. Thể thực khuẩn được cung cấp cho chuột nhắt hằng ngày trong suốt thời gian nghiên cứu.

- Các con chuột nhắt bị giết vào 5 ngày sau khi được cung cấp LF82.
- Tiêu chí chính: lượng LF82 trong ruột hồi và hệ sinh vật bám dính ruột kết của chuột nhắt.
- Tiêu chí phụ:
  - Đánh giá khối lượng
  - Độ tương đồng của phân.
  - Sự có mặt của máu trong phân (macro và bio)
- Hệ sinh vật trong khoang (hệ sinh vật thông thường + LF82 + thể thực khuẩn)
  - Tại thời điểm cho chết: xét nghiệm vĩ mô và mô học, hệ sinh vật bám dính trong ruột kết và ruột hồi + LF82 + thể thực khuẩn,
  - Tại thời điểm cho chết: xét nghiệm vĩ mô và mô học, hệ sinh vật bám dính trong ruột kết và ruột hồi + LF82 + thể thực khuẩn,

Các thông số sinh học của bệnh viêm được theo dõi, và sự hoán vị thể thực khuẩn trong các hạch bạch huyết màng treo ruột (MLN: mesenteric lymph node), gan và lá lách được tìm kiếm.

Các yếu tố chỉ thị viêm (MPO, các xytokin tiền viêm IL-6, IL-12 và xytokin kháng viêm IL-10) được theo dõi. Sự hoán vị thể thực khuẩn và AIEC trong MLN, gan và lá lách được tìm kiếm.

Sự tiếp tục thải bỏ thể thực khuẩn xảy ra trong phân của chuột nhắt nhận hỗn hợp thể thực khuẩn mà không có chủng LF82.

#### Ví dụ 7

Thử nghiệm in vivo về hỗn hợp chứa các thể thực khuẩn đối với chủng LF82

Sự sao chép in vivo của các thể thực khuẩn (hỗn hợp chứa P2+P6+P8+CLB\_P2) trong ruột của chuột nhắt được đánh giá như sau:

20 con chuột nhắt được chia thành hai (2) nhóm, mỗi nhóm mười (10) con chuột nhắt:

Nhóm 1: Chuột nhắt bị xâm chiếm bởi LF82SK

Nhóm 2: Chuột nhắt bị xâm chiếm bởi LF82SK + thể thực khuẩn

Streptomycin (5g/L) được bổ sung vào nước uống của tất cả các con chuột nhắt 3 ngày trước ngày 0 và được duy trì trong suốt thời gian thí nghiệm.

Vào ngày 0, LF82SK được cung cấp cho chuột nhắt của hai nhóm để cho phép chủng này xâm chiếm ruột của chuột nhắt.

Vào ngày 3, các thể thực khuẩn (hỗn hợp chứa P2+P6+P8+CLB\_P2 với nồng độ là  $10^8$  pfu/mL mỗi thể thực khuẩn) được cung cấp cho chuột nhắt của nhóm 2 bằng ống.

Vào ngày 4 và 7, 5, chuột nhắt của mỗi nhóm bị giết để đánh giá số lượng vi khuẩn và thể thực khuẩn trong ruột hồi, trong ruột kết và trong phân. 100 $\mu$ L sản phẩm đồng nhất ruột hồi và ruột kết từ hai nhóm được lấy để chiết toàn bộ ADN bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế ADN mô Maxwell® 16 Tissue DNA của Promega.

Kết quả:

Mức độ LF82 trong phân:

Vào ngày 4 và 7, mức độ LF82 là:

trong nhóm 1:  $7 \times 10^9$ ;  $1 \times 10^9$  cfu/g

trong nhóm 2:  $8 \cdot 10^7$ ;  $5 \cdot 10^8$  cfu/g

Mức độ thể thực khuẩn trong phân:

Vào ngày 4 và 7, mức độ thể thực khuẩn là:

trong nhóm 1: không có

trong nhóm 2:  $5 \cdot 10^9$ ;  $6 \cdot 10^9$  pfu/g

Với sự có mặt của hỗn hợp thể thực khuẩn, mức độ LF82 trong phân thấp hơn một cách đáng kể so với khi chúng vắng mặt, thể hiện rằng hỗn hợp thể thực khuẩn có khả năng gây nhiễm LF82 bên trong ruột của chuột nhắt.

Mức độ LF82 trong cơ quan:

Vào ngày 4, mức độ LF82 là:

trong ruột hồi của nhóm 1: 100% vi khuẩn là E. coli (LF82)

trong ruột hồi của nhóm 2: 20% vi khuẩn là E. coli (LF82)

trong ruột kết của nhóm 1: 40% vi khuẩn là E. coli (LF82)

trong ruột kết của nhóm 2: 2% vi khuẩn là E. coli (LF82)

Vào ngày 7, mức độ LF82 là:

trong ruột hồi của nhóm 1: 100% vi khuẩn là E. coli (LF82)

trong ruột hồi của nhóm 2: 50% vi khuẩn là E. coli (LF82)

trong ruột kết của nhóm 1: 25% vi khuẩn là E. coli (LF82)

trong ruột kết của nhóm 2: 10% vi khuẩn là E. coli (LF82)

Mức độ thể thực khuẩn trong các cơ quan:

Vào ngày 4, mức độ thể thực khuẩn là:

trong ruột hồi của nhóm 1: không có

trong ruột hồi của nhóm 2:  $7 \cdot 10^8$  pfu/g

trong ruột kết của nhóm 1: không có

trong ruột kết của nhóm 2:  $5 \cdot 10^{10}$  pfu/g

Vào ngày 7, mức độ LF82 là:

trong ruột hồi của nhóm 1: không có

trong ruột hồi của nhóm 2:  $7 \cdot 10^8$  pfu/g

trong ruột kết của nhóm 1: không có

trong ruột kết của nhóm 4:  $2 \cdot 10^8$  pfu/g

Vào ngày 2 và 5, mức độ LF82 được làm giảm ở cả ruột hồi và ruột kết trong nhóm được điều trị bằng thể thực khuẩn. Điều này thể hiện rằng thể thực khuẩn gây nhiễm LF82 trong các đoạn ruột và không chỉ trong phân. Đồng thời, mức độ thể thực khuẩn vào ngày 7 vẫn ở mức cao như vào ngày 2, thể hiện rằng thể thực khuẩn có thể tồn tại một vài ngày trong ruột sau lần cung cấp duy nhất ban đầu.

#### Ví dụ 8

Thử nghiệm in vivo về khả năng gây nhiễm của các thể thực khuẩn

Thử nghiệm in vivo về khả năng gây nhiễm của các thể thực khuẩn (hỗn hợp chứa P2+P6+P8) ở chuột nhắt CEACAM6 bị nhiễm LF82SK được đánh giá như sau:

48 con chuột nhắt được chia thành ba (4) nhóm như sau:

Nhóm 1: chuột nhắt không bị xâm chiếm (8 chuột nhắt)

Nhóm 2: chuột nhắt không bị xâm chiếm + thể thực khuẩn (12 chuột nhắt)

Nhóm 3: Chuột nhắt bị xâm chiếm bởi LF82SK (16 chuột nhắt)

Nhóm 4: Chuột nhắt bị xâm chiếm bởi LF82SK + thể thực khuẩn (12 chuột nhắt)

DSS (dextran sulfat) 0,25% được cho vào nước uống 3 ngày trước ngày 0 và được duy trì trong suốt thời gian thí nghiệm.

Streptomycin (5mg) được cung cấp bằng ống qua đường miệng cho tất cả các con chuột nhắt 1 ngày trước ngày 0.

Vào ngày 0, LF82SK được cung cấp cho chuột nhắt của nhóm 3 và 4 để cho phép chủng này xâm chiếm ruột của chuột nhắt.

Vào ngày 1, thể thực khuẩn (hỗn hợp chứa P2+P6+P8 với nồng độ là  $10^7$  pfu/mL mỗi thể thực khuẩn) được cung cấp một lần cho mỗi con chuột nhắt của nhóm 2 và 4 bằng ống qua đường miệng trong CMC. Dạng cung cấp này có nhiều ưu điểm:

biết được lượng thể thực khuẩn được cung cấp và trung hòa độ axit trong dạ dày tức thì.

Vào ngày 1, 4, chuột nhất từ nhóm 3 bị giết để đánh giá số lượng vi khuẩn trong ruột hồi, trong ruột kết và trong phân trước khi cung cấp thể thực khuẩn.

Vào ngày 2, lần lượt 4, 6, 6 và 6 con chuột nhất từ nhóm 1, 2, 3 và 4 bị giết để đánh giá số lượng vi khuẩn và thể thực khuẩn trong ruột hồi, trong ruột kết và trong phân.

Vào ngày 5, lần lượt 4, 6, 6 và 6 con chuột nhất từ nhóm 1, 2, 3 và 4 bị giết để đánh giá số lượng vi khuẩn và thể thực khuẩn trong ruột hồi, trong ruột kết và trong phân.

100 $\mu$ L sản phẩm đồng nhất ruột hồi, ruột kết và phân từ bốn nhóm được lấy để chiết toàn bộ ADN bằng cách sử dụng bộ kit tinh chế ADN mô Maxwell® 16 Tissue DNA của Promega.

Khối lượng, độ tương đồng của phân và sự có mặt của máu trong phân được quan sát hằng ngày.

ADN được chiết từ các đoạn ruột hồi được sử dụng để chạy PCR định lượng bằng cách sử dụng một bộ đoạn mồi (SEQ ID NO: 44-45) để khuếch đại gen đặc hiệu (pMT1) từ LF82. Các kết quả được thể hiện dưới dạng số lượng bản sao của gen này trong mỗi gam mô.

LF82 pMT1 F (SEQ ID NO:44)

CCATTCATGCAGCAGCTCTTT

LF82 pMT1 R (SEQ ID NO:45)

ATCGGACAACATTAGCGGTGT

Kết quả:

Các trị số là các trị số trung bình thu được đối với mỗi nhóm chuột nhất.

Trong nhóm 1, cả LF82 và thể thực khuẩn đều không phát hiện được trong suốt thời gian thí nghiệm.

Mức độ LF82 trong phân:

Vào ngày 1: Mức độ LF82 trong nhóm 3 và 4 lần lượt là  $5 \times 10^9$  và  $6 \times 10^9$  cfu/g.

Vào ngày 2, 3 và 5 mức độ LF82 là:

trong nhóm 3:  $3 \cdot 10^9$ ;  $5 \cdot 10^8$ ;  $5 \cdot 10^7$  cfu/g

trong nhóm 4:  $5 \cdot 10^5$ ;  $5 \cdot 10^5$ ;  $5 \cdot 10^3$  cfu/g

Mức độ thể thực khuẩn trong phân:

Vào ngày 2, 3 và 5, mức độ thể thực khuẩn là:

trong nhóm 2:  $5 \cdot 10^5$  pfu/g; không phát hiện được; không phát hiện được

trong nhóm 4:  $1 \cdot 10^9$ ;  $1 \cdot 10^7$ ;  $5 \cdot 10^6$  pfu/g

Với sự có mặt của thể thực khuẩn, mức độ LF82 trong phân thấp hơn một cách đáng kể so với khi chúng không có mặt. Đồng thời, mức độ thể thực khuẩn cao hơn một cách đáng kể ở chuột nhất bị xâm chiếm bởi LF82 so với ở chuột nhất không bị xâm chiếm bởi LF82. Cả hai dữ liệu đều xác nhận rằng thể thực khuẩn có khả năng gây nhiễm LF82 trong ruột.

Mức độ LF82 trong các cơ quan:

Vào ngày 2, mức độ LF82 là:

trong ruột hồi của nhóm 3:  $2 \cdot 10^6$  bản sao của pMT1/g

trong ruột hồi của nhóm 4:  $8 \cdot 10^4$  bản sao của pMT1/g

trong ruột kết của nhóm 3:  $2 \cdot 10^7$  bản sao của pMT1/g

trong ruột kết của nhóm 4:  $1 \cdot 10^5$  bản sao của pMT1/g

Vào ngày 5, mức độ LF82 là:

trong ruột hồi của nhóm 3:  $5 \cdot 10^4$  bản sao của pMT1/g

trong ruột hồi của nhóm 4:  $8 \cdot 10^4$  bản sao của pMT1/g

trong ruột kết của nhóm 3:  $6 \cdot 10^6$  bản sao của pMT1/g

trong ruột kết của nhóm 4:  $2 \cdot 10^5$  bản sao của pMT1/g

Mức độ thể thực khuẩn trong các cơ quan:

Vào ngày 2, mức độ thể thực khuẩn là:

trong ruột hồi của nhóm 2: không phát hiện được

trong ruột hồi của nhóm 4:  $8 \cdot 10^5$  pfu/g

trong ruột kết của nhóm 2:  $5 \cdot 10^4$  pfu/g

trong ruột kết của nhóm 4:  $5 \cdot 10^6$  pfu/g

Vào ngày 5, mức độ LF82 là:

trong ruột hồi của nhóm 2: không phát hiện được

trong ruột hồi của nhóm 4: không phát hiện được

trong ruột kết của nhóm 2: không phát hiện được

trong ruột kết của nhóm 4:  $2 \cdot 10^4$  pfu/g

Vào ngày 2, mức độ LF82 được làm giảm ở cả ruột hồi và ruột kết trong nhóm được điều trị bằng thể thực khuẩn. Điều này thể hiện rằng thể thực khuẩn bị nhiễm LF82 trong các đoạn ruột và không chỉ trong phân. Đồng thời, mức độ thể thực khuẩn cao hơn một cách đáng kể ở chuột nhất bị xâm chiếm bởi LF82 so với ở chuột nhất không bị xâm chiếm bởi LF82.

Vào ngày 5, mức độ LF82 trong ruột hồi là quá nhỏ để thấy được sự khác nhau giữa hai nhóm trong khi trong các mẫu ruột kết thì mức độ LF82 vẫn được làm giảm trong nhóm nhận thể thực khuẩn so với các nhóm không nhận. Đồng thời, các tác giả sáng chế chỉ có thể phát hiện được thể thực khuẩn trong ruột kết của chuột nhất bị xâm chiếm bởi LF82. Điều này thể hiện rằng tác dụng của thể thực khuẩn trong việc làm giảm LF82 có thể kéo dài một vài ngày sau lần cung cấp ban đầu.

Mặc dù quan sát thấy mức độ xâm chiếm cao của LF82 trong thí nghiệm này, nhưng không quan sát thấy dấu hiệu của bệnh viêm ruột kết trong bất kỳ nhóm nào trong số các nhóm này.

Các phương án

Sáng chế đề xuất một cách cụ thể các phương án nêu dưới đây:

1. Dược phẩm chứa:

(i) ít nhất một chủng thể thực khuẩn có khả năng tạo ra sự nhiễm gây tan ở chủng *Escherichia coli* bám dính-xâm nhập; và

(ii) chất mang dược dụng;

để sử dụng trong điều trị bệnh viêm ruột.

2. Dược phẩm theo phương án 1, trong đó chủng *Escherichia coli* bám dính-xâm nhập có mặt trong một hoặc nhiều phần ruột (nhỏ và lớn) của đối tượng.
3. Dược phẩm theo phương án 1, trong đó chủng *Escherichia coli* bám dính-xâm nhập là LF82, 07081, 07082, 07076 hoặc 06075.
4. Dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 3, trong đó bệnh viêm ruột là bệnh Crohn hoặc bệnh viêm loét đại tràng hoặc sự tái phát của các tổn thương ruột hồi sau phẫu thuật, ví dụ phẫu thuật loại bỏ ít nhất một phần ruột non ở bệnh nhân mắc bệnh CD.
5. Dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 4, trong đó dược phẩm này chứa ít nhất một trong số các chủng thể thực khuẩn P1 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4694 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn P1 này, chủng thể thực khuẩn P2 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4695 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn P2 này, chủng thể thực khuẩn P3 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4696 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn P3 này, chủng thể thực khuẩn P4 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4697 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn P4 này, chủng thể thực khuẩn P5 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4698 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn P5 này, chủng thể thực khuẩn P6 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4699 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và

cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn P6 này, chủng thể thực khuẩn P8 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4700 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn P8 này và chủng thể thực khuẩn CLB\_P2 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4675 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn CLB\_P2 này.

6. Dược phẩm theo phương án bất kỳ trong số các phương án từ 1 đến 5, trong đó dược phẩm này là để sử dụng qua đường miệng.

7. Chủng thể thực khuẩn P1 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4694 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

8. Chủng thể thực khuẩn P2 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4695 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

9. Chủng thể thực khuẩn P3 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4696 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

10. Chủng thể thực khuẩn P4 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4697 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

11. Chủng thể thực khuẩn P5 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4698 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

12. Chủng thể thực khuẩn P6 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4699 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

13. Chủng thể thực khuẩn P8 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4700 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan, tốt hơn là cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

### 1. Dược phẩm chứa:

(i) ít nhất một chủng thể thực khuẩn có khả năng tạo ra sự nhiễm gây tan ở chủng *Escherichia coli* bám dính-xâm nhập; và

(ii) chất mang dược dụng;

để sử dụng trong điều trị bệnh viêm ruột,

trong đó dược phẩm này chứa ít nhất một trong số chủng thể thực khuẩn P1 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4694 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn P1 này, chủng thể thực khuẩn P2 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4695 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn P2 này, chủng thể thực khuẩn P3 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4696 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn P3 này, chủng thể thực khuẩn P4 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4697 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn P4 này, chủng thể thực khuẩn P5 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4698 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn P5 này, chủng thể thực khuẩn P6 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4699 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn P6 này, và chủng thể thực khuẩn P8 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4700 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn P8 này.

2. Chủng thể thực khuẩn P1 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4694 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.
3. Chủng thể thực khuẩn P2 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4695 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.
4. Chủng thể thực khuẩn P3 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4696 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.
5. Chủng thể thực khuẩn P4 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4697 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.
6. Chủng thể thực khuẩn P5 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4698 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.
7. Chủng thể thực khuẩn P6 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4699 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.
8. Chủng thể thực khuẩn P8 được nộp lưu tại Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia của Pháp tại Viện Pasteur với số nộp lưu là CNCM I-4700 hoặc biến thể của chúng, trong đó biến thể này có cùng hoạt tính gây tan và cùng các đặc tính kiểu hình giống như chủng thể thực khuẩn này.

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

&lt;110&gt; Ferring B.V.

Institut Pasteur

&lt;120&gt; Chứng thể thực khuẩn và dược phẩm chứa chứng thể thực khuẩn này dùng để điều trị bệnh viêm ruột

&lt;130&gt; HE 171 371

&lt;150&gt; EP 13305568.1

&lt;151&gt; 2013-04-30

&lt;160&gt; 45

&lt;170&gt; BISSAP 1.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 368

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Thể thực khuẩn wV8

&lt;400&gt; 1

```

Met Leu Thr Asn Ser Glu Lys Ser Arg Phe Phe Leu Ala Asp Leu Thr
1      5      10      15
Gly Glu Val Gln Ser Ile Pro Asn Thr Tyr Gly Tyr Ile Ser Asn Leu
20      25      30
Gly Leu Phe Arg Ser Ala Pro Ile Thr Gln Thr Thr Phe Leu Met Asp
35      40      45
Leu Thr Asp Trp Asp Val Ser Leu Leu Asp Ala Val Asp Arg Asp Ser
50      55      60
Arg Lys Ala Glu Thr Ser Ala Pro Glu Arg Val Arg Gln Ile Ser Phe
65      70      75      80
Pro Met Met Tyr Phe Lys Glu Val Glu Ser Ile Thr Pro Asp Glu Ile
85      90      95
Gln Gly Val Arg Gln Pro Gly Thr Ala Asn Glu Leu Thr Thr Glu Ala
100     105     110
Val Val Arg Ala Lys Lys Leu Met Lys Ile Arg Thr Lys Phe Asp Ile
115     120     125
Thr Arg Glu Phe Leu Phe Met Gln Ala Leu Lys Gly Lys Val Val Asp
130     135     140
Ala Arg Gly Thr Leu Tyr Ala Asp Leu Tyr Lys Gln Phe Asp Val Glu
145     150     155     160
Lys Lys Thr Val Tyr Phe Asp Leu Asp Asn Pro Asn Ala Asp Ile Asp
165     170     175
Ala Ala Ile Glu Glu Leu Arg Met His Met Glu Asp Glu Ala Lys Thr
180     185     190
Gly Thr Val Ile Asn Gly Glu Glu Ile His Val Val Val Asp Arg Leu
195     200     205
Phe Phe Ser Lys Leu Val Lys His Pro Lys Ile Arg Asp Ala Tyr Leu
210     215     220
Ala Gln Gln Thr Pro Leu Ala Trp Gln Gln Ile Thr Gly Ser Leu Arg
225     230     235     240
Thr Gly Gly Thr Asp Gly Val Gln Ala His Met Asn Thr Phe Tyr Tyr

```

```

                245                250                255
Gly Gly Val Lys Phe Val Gln Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Asp Lys Arg
                260                265                270
Gly Lys Val His Thr Leu Val Ser Ile Asp Ser Val Ala Ala Thr Val
                275                280                285
Gly Val Gly His Ala Phe Pro Asn Val Ser Met Leu Gly Glu Ala Asn
                290                295                300
Asn Ile Phe Glu Val Ala Tyr Gly Pro Cys Pro Lys Met Gly Tyr Ala
305                310                315                320
Asn Thr Leu Gly Gln Glu Leu Tyr Val Phe Glu Tyr Glu Lys Asp Arg
                325                330                335
Asp Glu Gly Ile Asp Phe Glu Ala His Ser Tyr Met Leu Pro Tyr Cys
                340                345                350
Thr Arg Pro Gln Leu Leu Val Asp Val Arg Ser Asp Ala Lys Pro Asp
                355                360                365

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P1 sắp hàng với vị trí 10-36  
của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID NO: 1)

&lt;400&gt; 2

```

Phe Phe Leu Ala Asp Leu Thr Gly Glu Val Gln Ser Ile Pro Asn Thr
1                5                10                15
Tyr Gly Tyr Ile Ser Asn Leu Gly Leu Phe Arg
                20                25

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 55

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P2 sắp hàng với vị trí 8-62  
của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID NO: 1)

&lt;400&gt; 3

```

Ser Arg Phe Phe Leu Ala Asp Leu Thr Gly Glu Val Gln Ser Ile Pro
1                5                10                15
Asn Thr Tyr Gly Tyr Ile Ser Asn Leu Gly Leu Phe Arg Ser Ala Pro
                20                25                30
Ile Thr Gln Thr Thr Phe Leu Met Asp Leu Thr Asp Trp Asp Val Ser
                35                40                45
Leu Leu Asp Ala Val Asp Arg
                50                55

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P1-P6 sắp hàng với vị trí  
77-115 của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID  
NO: 1)

<400> 4

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ile | Ser | Phe | Pro | Met | Met | Tyr | Phe | Lys | Glu | Val | Glu | Ser | Ile | Thr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Pro | Asp | Glu | Ile | Gln | Gly | Val | Arg | Gln | Pro | Gly | Thr | Ala | Asn | Glu | Leu |
|     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Thr | Thr | Glu | Ala | Val | Val | Arg |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     | 35  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P1-P6 sắp hàng với vị trí  
124-139 của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID  
NO: 1)

<400> 5

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Lys | Phe | Asp | Ile | Thr | Arg | Glu | Phe | Leu | Phe | Met | Gln | Ala | Leu | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P1-P5 sắp hàng với vị trí  
147-155 của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID  
NO: 1)

<400> 6

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Thr | Leu | Tyr | Ala | Asp | Leu | Tyr | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P6 sắp hàng với vị trí  
147-161 của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID  
NO: 1)

<400> 7

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Thr | Leu | Tyr | Ala | Asp | Leu | Tyr | Lys | Gln | Phe | Asp | Val | Glu | Lys |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

1 5 10 15

<210> 8  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P1 sắp hàng với vị trí  
 162-183 của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID  
 NO: 1)

<400> 8  
 Lys Thr Val Tyr Phe Asp Leu Asp Asn Pro Asn Ala Asp Ile Asp Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Ile Glu Glu Leu Arg  
 20

<210> 9  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P3 sắp hàng với vị trí  
 163-183 của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID  
 NO: 1)

<400> 9  
 Thr Val Tyr Phe Asp Leu Asp Asn Pro Asn Ala Asp Ile Asp Ala Ser  
 1 5 10 15  
 Ile Glu Glu Leu Arg  
 20

<210> 10  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P5-P6 sắp hàng với vị trí  
 163-183 của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID  
 NO: 1)

<400> 10  
 Thr Ile Tyr Phe Asp Leu Asp Asn Pro Asn Ala Asp Ile Asp Ala Ser  
 1 5 10 15  
 Ile Glu Glu Leu Arg  
 20

<210> 11  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P1 và P3-P6 sắp hàng với vị trí 192-207 của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID NO: 1)

<400> 11

Thr Gly Thr Val Ile Asn Gly Glu Glu Ile His Val Val Val Asp Arg  
1 5 10 15

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P2 sắp hàng với vị trí 192-212 của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID NO: 1)

<400> 12

Thr Gly Thr Val Ile Asn Gly Glu Glu Ile His Val Val Val Asp Arg  
1 5 10 15  
Leu Phe Phe Ser Lys  
20

<210> 13

<211> 22

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P1 sắp hàng với vị trí 219-240 của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID NO: 1)

<400> 13

Ile Arg Asp Ala Tyr Leu Ala Gln Gln Thr Pro Leu Ala Trp Gln Gln  
1 5 10 15  
Ile Thr Gly Ser Leu Arg  
20

<210> 14

<211> 49

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P2 sắp hàng với vị trí 219-267 của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID NO: 1)

<400> 14

Ile Arg Asp Ala Tyr Leu Ala Gln Gln Thr Pro Leu Ala Trp Gln Gln

```

1           5           10           15
Ile Thr Gly Ser Leu Arg Thr Gly Gly Thr Asp Gly Val Gln Ala His
                20                25                30
Met Asn Thr Phe Tyr Tyr Gly Gly Val Lys Phe Val Gln Tyr Asn Gly
                35                40                45
Lys

```

<210> 15

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P3-P4 sắp hàng với vị trí  
221-240 của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID  
NO: 1)

<400> 15

```

Asp Ala Tyr Leu Ala Gln Gln Thr Pro Leu Ala Trp Gln Gln Ile Thr
1           5           10           15
Gly Ser Leu Arg
                20

```

<210> 16

<211> 47

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P5 sắp hàng với vị trí  
221-267 của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID  
NO: 1)

<400> 16

```

Asp Ala Tyr Leu Ala Gln Gln Thr Pro Leu Ala Trp Gln Gln Ile Thr
1           5           10           15
Gly Ser Leu Arg Thr Gly Gly Ala Asp Gly Val Gln Ala His Met Asn
                20                25                30
Thr Phe Tyr Tyr Gly Gly Val Lys Phe Val Gln Tyr Asn Gly Lys
                35                40                45

```

<210> 17

<211> 40

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P6 sắp hàng với vị trí  
221-260 của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID  
NO: 1)

<400> 17

```

Asp Ala Tyr Leu Ala Gln Gln Thr Pro Leu Ala Trp Gln Gln Ile Thr

```

1 5 10 15  
Gly Ser Leu Arg Thr Gly Gly Ala Asp Gly Val Gln Ala His Met Asn  
20 25 30  
Thr Phe Tyr Tyr Gly Gly Val Lys  
35 40

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

### <213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$ 

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P1, P3 và P4 sắp hàng với vị trí 261-267 của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID NO: 1)

<400> 18

Phe Val Gln Tyr Asn Gly Lys  
1 5

<210> 19

<211> 20

&lt;212&gt; PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$ 

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P1-P2 sắp hàng với vị trí 317-336 của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID NO: 1)

<400> 19

Met Gly Tyr Ala Asn Thr Leu Gly Gln Glu Leu Tyr Val Phe Glu Tyr  
1 5 10 15  
Glu Lys Asp Arg  
20

<210> 20

<211> 8

&lt;212&gt; PRT

<213> Trình tự nhân tạo

 $\langle 220 \rangle$ 

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P1-P6 sắp hàng với vị trí 355-362 của protein capsit chính của thể thực khuẩn wV8 (SEQ ID NO: 1)

<400> 20

Pro Gln Leu Leu Val Asp Val Arg  
1 5

$\langle 210 \rangle$  21

<211> 522

<212> PRT

<213> Thẻ thực khuẩn RB69

&lt;400&gt; 21

```

Met Thr Thr Ile Lys Thr Lys Ala Gln Leu Val Asp Lys Trp Lys Glu
1      5      10      15
Leu Leu Glu Gly Glu Gly Leu Pro Glu Ile Ala Asn Ser Lys Gln Ala
20      25      30
Ile Ile Ala Lys Ile Phe Glu Asn Gln Glu Lys Asp Phe Glu Val Ser
35      40      45
Pro Glu Tyr Lys Asp Glu Lys Ile Ala Gln Ala Phe Gly Ser Phe Leu
50      55      60
Thr Glu Ala Glu Ile Gly Gly Asp His Gly Tyr Asn Ala Gln Asn Ile
65      70      75      80
Ala Ala Gly Gln Thr Ser Gly Ala Val Thr Gln Ile Gly Pro Ala Val
85      90      95
Met Gly Met Val Arg Arg Ala Ile Pro Asn Leu Ile Ala Phe Asp Ile
100      105      110
Cys Gly Val Gln Pro Met Asn Ser Pro Thr Gly Gln Val Phe Ala Leu
115      120      125
Arg Ala Val Tyr Gly Lys Asp Pro Ile Ala Ala Gly Ala Lys Glu Ala
130      135      140
Phe His Pro Met Tyr Ala Pro Asp Ala Met Phe Ser Gly Gln Gly Ala
145      150      155      160
Ala Lys Lys Phe Pro Ala Leu Ala Ala Ser Thr Gln Thr Lys Val Gly
165      170      175
Asp Ile Tyr Thr His Phe Phe Gln Glu Thr Gly Thr Val Tyr Leu Gln
180      185      190
Ala Ser Ala Gln Val Thr Ile Ser Ser Ser Ala Asp Asp Ala Ala Lys
195      200      205
Leu Asp Ala Glu Ile Ile Lys Gln Met Glu Ala Gly Ala Leu Val Glu
210      215      220
Ile Ala Glu Gly Met Ala Thr Ser Ile Ala Glu Leu Gln Glu Gly Phe
225      230      235      240
Asn Gly Ser Thr Asp Asn Pro Trp Asn Glu Met Gly Phe Arg Ile Asp
245      250      255
Lys Gln Val Ile Glu Ala Lys Ser Arg Gln Leu Lys Ala Ala Tyr Ser
260      265      270
Ile Glu Leu Ala Gln Asp Leu Arg Ala Val His Gly Met Asp Ala Asp
275      280      285
Ala Glu Leu Ser Gly Ile Leu Ala Thr Glu Ile Met Leu Glu Ile Asn
290      295      300
Arg Glu Val Val Asp Trp Ile Asn Tyr Ser Ala Gln Val Gly Lys Ser
305      310      315      320
Gly Met Thr Asn Ile Val Gly Ser Lys Ala Gly Val Phe Asp Phe Gln
325      330      335
Asp Pro Ile Asp Ile Arg Gly Ala Arg Trp Ala Gly Glu Ser Phe Lys
340      345      350
Ala Leu Leu Phe Gln Ile Asp Lys Glu Ala Val Glu Ile Ala Arg Gln
355      360      365
Thr Gly Arg Gly Glu Gly Asn Phe Ile Ile Ala Ser Arg Asn Val Val
370      375      380
Asn Val Leu Ala Ser Val Asp Thr Gly Ile Ser Tyr Ala Ala Gln Gly
385      390      395      400
Leu Ala Ser Gly Phe Asn Thr Asp Thr Thr Lys Ser Val Phe Ala Gly
405      410      415

```

Val Leu Gly Gly Lys Tyr Arg Val Tyr Ile Asp Gln Tyr Ala Lys Gln  
 420 425 430  
 Asp Tyr Phe Thr Val Gly Tyr Lys Gly Ala Asn Glu Met Asp Ala Gly  
 435 440 445  
 Ile Tyr Tyr Ala Pro Tyr Val Ala Leu Thr Pro Leu Arg Gly Ser Asp  
 450 455 460  
 Pro Lys Asn Phe Gln Pro Val Met Gly Phe Lys Thr Arg Tyr Gly Ile  
 465 470 475 480  
 Gly Val Asn Pro Phe Ala Glu Ser Ser Leu Gln Ala Pro Gly Ala Arg  
 485 490 495  
 Ile Gln Ser Gly Met Pro Ser Ile Leu Asn Ser Leu Gly Lys Asn Ala  
 500 505 510  
 Tyr Phe Arg Arg Val Tyr Val Lys Gly Ile  
 515 520

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P8 sắp hàng với vị trí  
 143-162 của protein capsit chính của thể thực khuẩn RB69 (SEQ ID  
 NO: 21)

<400> 22

Glu Ala Phe His Pro Met Tyr Ala Pro Asp Ala Met Phe Ser Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Gly Ala Ala Lys  
 20

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P8 sắp hàng với vị trí  
 269-280 của protein capsit chính của thể thực khuẩn RB69 (SEQ ID  
 NO: 21)

<400> 23

Ala Ala Tyr Ser Ile Glu Leu Ala Gln Asp Leu Arg  
 1 5 10

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P8 sắp hàng với vị trí  
 306-319 của protein capsit chính của thể thực khuẩn RB69 (SEQ ID  
 NO: 21)

<400> 24

Glu Val Val Asp Trp Ile Asn Tyr Ser Ala Gln Val Gly Lys  
1 5 10

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P8 sắp hàng với vị trí  
330-342 của protein capsit chính của thể thực khuẩn RB69 (SEQ ID  
NO: 21)

<400> 25

Ala Gly Val Phe Asp Phe Gln Asp Pro Ile Asp Ile Arg  
1 5 10

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P8 sắp hàng với vị trí  
346-352 của protein capsit chính của thể thực khuẩn RB69 (SEQ ID  
NO: 21)

<400> 26

Trp Ala Gly Glu Ser Phe Lys  
1 5

<210> 27

<211> 14

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P8 sắp hàng với vị trí  
368-381 của protein capsit chính của thể thực khuẩn RB69 (SEQ ID  
NO: 21)

<400> 27

Gln Thr Gly Arg Gly Glu Gly Asn Phe Ile Ile Ala Ser Arg  
1 5 10

<210> 28

<211> 50

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P8 sắp hàng với vị trí

412-461 của protein capsit chính của thể thực khuẩn RB69 (SEQ ID NO: 21)

<400> 28

```
Ser Val Phe Ala Gly Val Leu Gly Gly Lys Tyr Arg Val Tyr Ile Asp
1          5          10          15
Gln Tyr Ala Lys Gln Asp Tyr Phe Thr Val Gly Tyr Lys Gly Ala Asn
          20          25          30
Glu Met Asp Ala Gly Ile Tyr Tyr Ala Pro Tyr Val Ala Leu Thr Pro
          35          40          45
Leu Arg
          50
```

<210> 29

<211> 44

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn P8 sắp hàng với vị trí  
467-510 của protein capsit chính của thể thực khuẩn RB69 (SEQ ID  
NO: 21)

<400> 29

```
Asn Phe Gln Pro Val Met Gly Phe Lys Thr Arg Tyr Gly Ile Gly Val
1          5          10          15
Asn Pro Phe Ala Glu Ser Ser Leu Gln Ala Pro Gly Ala Arg Ile Gln
          20          25          30
Ser Gly Met Pro Ser Ile Leu Asn Ser Leu Gly Lys
          35          40
```

<210> 30

<211> 18

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi xuôi gen 16S của tất cả các vi khuẩn

<400> 30

cggatgaatac gttcccg

18

<210> 31

<211> 22

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn mỗi ngược gen 16S của tất cả các vi khuẩn

<400> 31

tacggctacc ttgttacgac tt

22

<210> 32  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Đoạn mỗi xuôi gen 16S của E. coli

<400> 32  
 catgccgcgt gtatgaagaa

20

<210> 33  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Đoạn mỗi ngược gen 16S của E. coli

<400> 33  
 cgggtaacgt caatgagcaa a

21

<210> 34  
 <211> 519  
 <212> PRT  
 <213> Thể thực khuẩn JS98

<400> 34

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Lys | Lys | Asn | Ala | Leu | Val | Gln | Lys | Trp | Ser | Ala | Leu | Leu | Glu | Asn |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Glu | Ala | Leu | Pro | Glu | Ile | Val | Gly | Ala | Ser | Lys | Gln | Ala | Ile | Ile | Ala |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Lys | Ile | Phe | Glu | Asn | Gln | Glu | Gln | Asp | Ile | Leu | Thr | Ala | Pro | Glu | Tyr |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Arg | Asp | Glu | Lys | Ile | Ser | Glu | Ala | Phe | Gly | Ser | Phe | Leu | Thr | Glu | Ala |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Glu | Ile | Gly | Gly | Asp | His | Gly | Tyr | Asp | Ala | Thr | Asn | Ile | Ala | Ala | Gly |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |
| Gln | Thr | Ser | Gly | Ala | Val | Thr | Gln | Ile | Gly | Pro | Ala | Val | Met | Gly | Met |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Val | Arg | Arg | Ala | Ile | Pro | His | Leu | Ile | Ala | Phe | Asp | Ile | Cys | Gly | Val |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |
| Gln | Pro | Leu | Asn | Asn | Pro | Thr | Gly | Gln | Val | Phe | Ala | Leu | Arg | Ala | Val |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |
| Tyr | Gly | Lys | Asp | Pro | Ile | Ala | Ala | Gly | Ala | Lys | Glu | Ala | Phe | His | Pro |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Met | Tyr | Ala | Pro | Asn | Ala | Met | Phe | Ser | Gly | Gln | Gly | Ala | Ala | Glu | Thr |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |
| Phe | Glu | Ala | Leu | Ala | Ala | Ser | Lys | Val | Leu | Glu | Val | Gly | Lys | Ile | Tyr |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Ser | His | Phe | Phe | Glu | Ala | Thr | Gly | Ser | Ala | His | Phe | Gln | Ala | Val | Glu |

```

      180      185      190
Ala Val Thr Val Asp Ala Gly Ala Thr Asp Ala Ala Lys Leu Asp Ala
      195      200      205
Ala Val Thr Ala Leu Val Glu Ala Gly Gln Leu Ala Glu Ile Ala Glu
      210      215      220
Gly Met Ala Thr Ser Ile Ala Glu Leu Gln Glu Gly Phe Asn Gly Ser
225      230      235      240
Thr Asp Asn Pro Trp Asn Glu Met Gly Phe Arg Ile Asp Lys Gln Val
      245      250      255
Ile Glu Ala Lys Ser Arg Gln Leu Lys Ala Ser Tyr Ser Ile Glu Leu
      260      265      270
Ala Gln Asp Leu Arg Ala Val His Gly Met Asp Ala Asp Ala Glu Leu
      275      280      285
Ser Gly Ile Leu Ala Thr Glu Ile Met Leu Glu Ile Asn Arg Glu Val
      290      295      300
Ile Asp Trp Ile Asn Tyr Ser Ala Gln Val Gly Lys Ser Gly Met Thr
305      310      315      320
Asn Thr Val Gly Ala Lys Ala Gly Val Phe Asp Phe Gln Asp Pro Ile
      325      330      335
Asp Ile Arg Gly Ala Arg Trp Ala Gly Glu Ser Phe Lys Ala Leu Leu
      340      345      350
Phe Gln Ile Asp Lys Glu Ala Ala Glu Ile Ala Arg Gln Thr Gly Arg
      355      360      365
Gly Ala Gly Asn Phe Ile Ile Ala Ser Arg Asn Val Val Asn Val Leu
      370      375      380
Ala Ala Val Asp Thr Ser Val Ser Tyr Ala Ala Gln Gly Leu Gly Gln
385      390      395      400
Gly Phe Asn Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Phe Ala Gly Val Leu Gly
      405      410      415
Gly Lys Tyr Arg Val Tyr Ile Asp Gln Tyr Ala Arg Ser Asp Tyr Phe
      420      425      430
Thr Ile Gly Tyr Lys Gly Ser Asn Glu Met Asp Ala Gly Ile Tyr Tyr
      435      440      445
Ala Pro Tyr Val Ala Leu Thr Pro Leu Arg Gly Ser Asp Pro Lys Asn
      450      455      460
Phe Gln Pro Val Met Gly Phe Lys Thr Arg Tyr Gly Ile Gly Ile Asn
465      470      475      480
Pro Phe Ala Asp Pro Ala Ala Gln Ala Pro Thr Lys Arg Ile Gln Asn
      485      490      495
Gly Met Pro Asp Ile Val Asn Ser Leu Gly Leu Asn Gly Tyr Phe Arg
      500      505      510
Arg Val Tyr Val Lys Gly Ile
      515

```

<210> 35

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn CLB\_P2 sắp hàng với vị trí  
127-139 của protein capsit chính của thể thực khuẩn JS98 (SEQ ID  
NO: 34)

&lt;400&gt; 35

Ala Val Tyr Gly Lys Asp Pro Ile Ala Ala Gly Ala Lys  
 1 5 10

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn CLB\_P2 sắp hàng với vị trí  
 266-277 của protein capsit chính của thể thực khuẩn JS98 (SEQ ID  
 NO: 34)

&lt;400&gt; 36

Ala Ser Tyr Ser Ile Glu Leu Ala Gln Asp Leu Arg  
 1 5 10

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn CLB\_P2 sắp hàng với vị trí  
 303-316 của protein capsit chính của thể thực khuẩn JS98 (SEQ ID  
 NO: 34)

&lt;400&gt; 37

Glu Val Ile Asp Trp Ile Asn Tyr Ser Ala Gln Val Gly Lys  
 1 5 10

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn CLB\_P2 sắp hàng với vị trí  
 327-339 của protein capsit chính của thể thực khuẩn JS98 (SEQ ID  
 NO: 34)

&lt;400&gt; 38

Ala Gly Val Phe Asp Phe Gln Asp Pro Ile Asp Ile Arg  
 1 5 10

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn CLB\_P2 sắp hàng với vị trí  
 343-364 của protein capsit chính của thể thực khuẩn JS98 (SEQ ID

NO: 34)

&lt;400&gt; 39

Trp Ala Gly Glu Ser Phe Lys Ala Leu Leu Phe Gln Ile Asp Lys Glu  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Glu Ile Ala Arg  
 20

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn CLB\_P2 sắp hàng với vị trí  
 369-378 của protein capsit chính của thể thực khuẩn JS98 (SEQ ID  
 NO: 34)

&lt;400&gt; 40

Gly Ala Gly Asn Phe Ile Ile Ala Ser Arg  
 1 5 10

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn CLB\_P2 sắp hàng với vị trí  
 409-428 của protein capsit chính của thể thực khuẩn JS98 (SEQ ID  
 NO: 34)

&lt;400&gt; 41

Ala Val Phe Ala Gly Val Leu Gly Gly Lys Tyr Arg Val Tyr Ile Asp  
 1 5 10 15  
 Gln Tyr Ala Arg  
 20

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

<223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn CLB\_P2 sắp hàng với vị trí  
 438-458 của protein capsit chính của thể thực khuẩn JS98 (SEQ ID  
 NO: 34)

&lt;400&gt; 42

Gly Ser Asn Glu Met Asp Ala Gly Ile Tyr Tyr Ala Pro Tyr Val Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Thr Pro Leu Arg  
 20

<210> 43  
 <211> 49  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Peptit từ chủng thể thực khuẩn CLB\_P2 sắp hàng với vị trí  
 464-512 của protein capsit chính của thể thực khuẩn JS98 (SEQ ID  
 NO: 34)

<400> 43  
 Asn Phe Gln Pro Val Met Gly Phe Lys Thr Arg Tyr Gly Ile Gly Ile  
 1 5 10 15  
 Asn Pro Phe Ala Asp Pro Ala Ala Gln Ala Pro Thr Lys Arg Ile Gln  
 20 25 30  
 Asn Gly Met Pro Asp Ile Val Asn Ser Leu Gly Leu Asn Gly Tyr Phe  
 35 40 45  
 Arg

<210> 44  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mồi xuôi để khuếch đại gen đặc hiệu (pMT1) từ LF82

<400> 44  
 ccattcatgc agcagctctt t 21

<210> 45  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> đoạn mồi ngược để khuếch đại gen đặc hiệu (pMT1) từ LF82

<400> 45  
 atcggacaac attagcggtg t 21