



(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)



1-0030090

(51)⁷ A01N 55/02; A61K 33/24; A01P 1/00; (13) B
A61K 31/095; A01N 25/34; A01N 59/02

(21) 1-2013-01298

(22) 11/08/2011

(86) PCT/US2011/047490 11/08/2011

(87) WO/2012/021754 16/02/2012

(30) 61/373,188 12/08/2010 US; PCT/US2011/023549 03/02/2011 US

(45) 25/11/2021 404

(43) 25/10/2013 307A

(73) MICROBION CORPORATION (US)

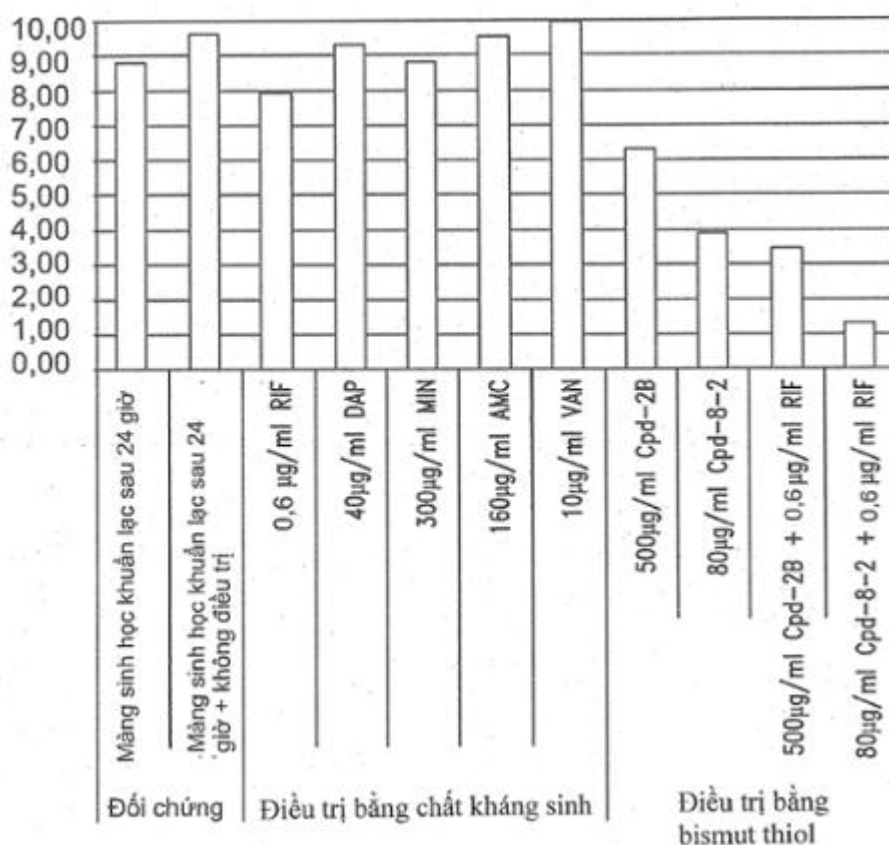
910 Technology Boulevard, Suite G, Bozeman, Montana 59718, USA

(72) BAKER, Brett, Hugh, James (US).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP BẢO VỆ THỰC VẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP KHẮC PHỤC TÍNH KHÁNG CHẤT KHÁNG SINH Ở THỰC VẬT

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp bảo vệ thực vật chống lại tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus. Phương pháp này bao gồm bước cho thực vật tiếp xúc với lượng hữu hiệu chế phẩm bismuth-thiol (BT). Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp khắc phục tính kháng chất kháng sinh ở thực vật.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm và các phương pháp xử lý tình trạng nhiễm vi sinh vật. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến phương pháp xử lý cải tiến để kiểm soát tình trạng nhiễm vi sinh vật trong nông nghiệp, công nghiệp, sản xuất, lâm sàng, chăm sóc sức khỏe cá nhân, và các trường hợp khác, phương pháp này bao gồm xử lý màng sinh học của vi khuẩn và các tình trạng khác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các chuỗi phức hợp tế bào phối hợp và các tương tác phân tử mà nhìn chung là góp phần vào việc đáp ứng và chống lại sự nhiễm vi sinh vật và/hoặc chữa lành hoặc bảo toàn mô thực vật và động vật (bao gồm con người), có thể bị đảo ngược theo hướng bất lợi bởi nhiều nhân tố bên ngoài khác nhau, chẳng hạn như các hiện tượng nhiễm trùng cơ hội và nhiễm trùng bệnh viện (ví dụ, các phác đồ lâm sàng có thể làm tăng nguy cơ nhiễm trùng), việc áp dụng các chất kháng sinh khu trú hoặc toàn thân (có thể ảnh hưởng đến sự tăng trưởng, sự di trú hoặc các chức năng khác của tế bào và còn có thể chọn lọc các vi sinh vật kháng kháng sinh), và/hoặc các yếu tố khác.

Đáng tiếc là, các chất kháng sinh được dùng khu trú hoặc toàn thân không hiệu quả cho việc điều trị nhiều chứng nhiễm khuẩn mạn tính, và thường không được sử dụng trừ trường hợp xảy ra nhiễm khuẩn do vi khuẩn cấp tính. Các phương án hiện nay bao gồm dùng hoặc áp dụng các chất kháng sinh nhưng các phương án điều trị này có thể đẩy mạnh sự phát triển của các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh và/hoặc có thể không có hiệu quả chống lại các màng sinh học của vi khuẩn. Do đó, việc sử dụng các chất sát trùng đang ngày càng trở nên đặc biệt quan trọng trong trường hợp vi khuẩn kháng thuốc (ví dụ, *Staphylococcus aureus* kháng methicillin hoặc MRSA). Nhiều chất sát trùng đang được sử dụng rộng rãi, tuy nhiên các quần thể hoặc các tiểu quần thể vi khuẩn được chứng minh là có thể không đáp ứng với những chất này, hoặc với bất kỳ

cách xử lý hiện có khác. Ngoài ra, một số các chất sát trùng có thể gây độc hại đối với tế bào chủ ở nồng độ cần thiết để có hiệu quả kháng sự nhiễm khuẩn được xác minh, và do đó các chất sát trùng này là không thích hợp để dùng. Vấn đề này có thể là đặc biệt cấp thiết trong trường hợp cố gắng làm sạch các nhiễm khuẩn từ các bề mặt tự nhiên, bao gồm các chi tiết bề mặt trên các loài thực vật quan trọng trong thương mại và/hoặc nông nghiệp như nhiều loài thực vật gieo trồng, và còn bao gồm các bề mặt biểu mô bên trong, như trong đường hô hấp (ví dụ, khí đạo, đường mũi họng và đường thanh quản, khí quản, phổi, phế quản, tiểu phế quản, phế nang, v.v.) hoặc đường tiêu hóa (ví dụ, miệng, thực quản, dạ dày, ruột non, trực tràng, hậu môn, v.v.), hoặc các bề mặt biểu mô khác.

Vấn đề đặc biệt là các bệnh nhiễm trùng bao gồm các màng sinh học của vi khuẩn. Đây là tổ chức vi khuẩn được phát hiện tương đối gần đây do các vi khuẩn tự do, đơn bào ("phù du") tập hợp lại bằng cách dính bám gian bào thành các tập hợp đa bào, có trật tự (các màng sinh học) có các sự khác biệt rõ rệt về đặc tính, biểu hiện gen, và tính nhạy với các tác nhân ngoài môi trường bao gồm các chất kháng sinh. Các màng sinh học có thể triển khai các cơ chế phòng thủ không được phát hiện thấy ở vi khuẩn phù du, các cơ chế này có thể bảo vệ tập hợp màng sinh học chống lại các chất kháng sinh và các đáp ứng miễn dịch của vật chủ. Các màng sinh học đã được thiết lập có thể ngăn chặn quy trình làm lành mô.

Các vi sinh vật tập nhiễm thông thường mà là cơ sở cho sự nhiễm dai dẳng và có khả năng gây hại bao gồm *S. aureus*, bao gồm MRSA (*Staphylococcus aureus* kháng methixilin), *Enterococci*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Streptococci*, và *Acinetobacter baumannii*. Một vài trong số các sinh vật này có khả năng sống sót trên các bề mặt lâm sàng không dinh dưỡng trong vài tháng. *S. aureus*, đã được chứng minh là có thể sống sót trong bốn tuần trên kính khô, và từ ba đến sáu tháng trên máu khô và sợi bông (Domenico et al., 1999 *Infect. Immun.* 67:664-669). Cả *E. coli* và *P. aeruginosa* đều đã được chứng minh là có thể sống sót lâu hơn *S. aureus* trên máu khô và sợi bông (*ibid*).

Các màng sinh học của vi khuẩn có liên quan đến sự gia tăng đáng kể khả năng kháng đối với cả các chất diệt khuẩn và các chất kháng sinh. Hình thái màng

sinh học thu được khi vi khuẩn và/hoặc nấm gắn kết với các bề mặt. Sự gắn kết này khởi động quá trình phiên mã biến đổi của gen, dẫn đến sự tiết chất nền polysacarit đàn hồi rõ rệt và khó xuyên qua, bảo vệ vi sinh vật. Ngoài sức kháng cự khá lớn đối với các chất kháng sinh, các màng sinh học còn có sức kháng cự rất lớn đối với hệ miễn dịch của động vật có vú. Rất khó để tiết trừ các màng sinh học khi chúng được xác lập, do đó việc ngăn chặn sự tạo thành màng sinh học là yếu tố ưu tiên rất quan trọng trên lâm sàng. Nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng các vết thương hở có thể nhanh chóng bị nhiễm các màng sinh học. Các màng sinh học của vi khuẩn này được cho là làm trì hoãn sự làm lành vết thương, và rất có khả năng là liên quan đến sự nhiễm trùng vết thương nghiêm trọng.

Việc giữ gìn da có chức năng, nguyên vẹn và các mô biểu mô khác (ví dụ, các bề mặt biểu mô vô mạch thông thường mà tạo thành các lớp chắn giữa sinh vật và môi trường bên ngoài của nó, như các bề mặt được phát hiện ở da và cả ở các lớp lót của đường hô hấp và tiêu hóa, các mô tuyến, v.v.) là có ý nghĩa đối với sức khỏe và sự sống của con người và các động vật khác.

Các chất sát trùng dựa trên cơ sở Bismut Thiol- (BT)

Một số các sản phẩm tự nhiên (ví dụ, các chất kháng sinh) và các hóa chất tổng hợp có tính kháng vi sinh vật, và cụ thể là kháng vi khuẩn, đã biết trong lĩnh vực này và đã được mô tả ít nhất một phần bằng các cấu trúc hóa học và bằng các tác dụng kháng vi sinh vật, như khả năng diệt vi sinh vật (các tác dụng “diệt” như các tính chất diệt khuẩn), khả năng làm ngừng hoặc làm suy yếu sự phát triển của vi sinh vật (các tác dụng “tĩnh” như các tính chất kìm vi khuẩn), hoặc khả năng tác động vào các chức năng của vi sinh vật như xâm chiếm hoặc đầu độc vị trí, sự tiết exopolysacarit của vi khuẩn và/hoặc chuyển hóa từ tập hợp phù du thành tập hợp màng sinh học hoặc mở rộng sự tạo thành màng sinh học. Các chất kháng sinh, chất diệt khuẩn, chất sát trùng và các chất tương tự (bao gồm bismut-thiol hoặc các hợp chất BT) được bàn luận, ví dụ, trong U.S. 6,582,719, bao gồm các yếu tố mà ảnh hưởng đến sự chọn lựa và sử dụng các chế phẩm này, bao gồm, ví dụ, khả năng diệt vi khuẩn hoặc kìm vi khuẩn, nồng độ hữu hiệu, và nguy cơ hoặc độc tính đối với các mô của vật chủ.

Bismut, kim loại nhóm V, là nguyên tố mà (giống như bạc) có các tính chất kháng vi sinh vật. Bản thân bismut có thể không hữu dụng về mặt điều trị và có thể có các tính chất không thích hợp nhất định, và do đó có thể được dùng thông thường bằng cách phân phát cùng với chất tạo phức, chất mang, và/hoặc chất dẫn khác, ví dụ thông thường nhất về các loại này là Pepto Bismol®, trong đó bismut được kết hợp (tạo chelat) với subsalixylat. Nghiên cứu trước đây đã xác định được là sự kết hợp giữa hợp chất chứa thiol- (-SH, sulfhydryl) nhất định như etan dithiol với bismut, tạo ra hợp chất bismut thiol (BT) điển hình, làm cải thiện khả năng kháng vi sinh vật của bismut, so với các dạng bào chế bismut khác có trên thị trường. Có nhiều hợp chất thiol có thể được sử dụng để tạo ra các BT (được đề cập, ví dụ, trong Domenico et al., 2001 *Antimicrob. Agent. Chemother.* 45(5):1417-1421, Domenico et al., 1997 *Antimicrob. Agent. Chemother.* 41(8):1697-1703, và trong U.S. RE37,793, U.S. 6,248,371, U.S. 6,086,921, và U.S. 6,380,248; xem thêm, ví dụ, U.S. 6,582,719) và một vài trong các số các dạng bào chế này có khả năng ức chế sự tạo thành màng sinh học.

Các hợp chất BT đã được chứng minh là có hoạt tính kháng MRSA (*S. aureus* kháng methixilin), MRSE (*S. epidermidis* kháng methixilin), *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *P. aeruginosa* kháng thuốc, *E. coli* sinh độc tố ruột, *E. coli* gây xuất huyết ruột, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, và *Shigella Flexneri* (Domenico et al., 1997 *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:1697-1703). Cũng có bằng chứng về hoạt tính kháng virus cự bào, virus herpes typ 1 (HSV-1) và HSV-2, và nấm men và nấm, như *Candida albicans*. Vai trò của BT cũng đã được chứng minh trong việc làm giảm khả năng gây bệnh của vi khuẩn, ức chế hoặc diệt phổ rộng các vi sinh vật kháng chất kháng sinh (gram dương và gram âm), ngăn ngừa sự tạo thành màng sinh học, ngăn ngừa sốc nhiễm trùng, điều trị sự nhiễm trùng, và làm gia tăng tính nhạy cảm của vi khuẩn đối với các chất kháng sinh mà trước đó chúng có tính kháng (xem, ví dụ, Domenico et al., 2001 *Agents Chemother.* 45:1417-1421; Domenico et al., 2000 *Infect. Med.* 17:123-127; Domenico et al., 2003 *Res. Adv. In*

Antimicrob. Agents & Chemother. 3:79-85; Domenico et al., 1997 *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(8):1697-1703; Domenico et al., 1999 *Infect. Immun.* 67:664-669; Huang et al. 1999 *J Antimicrob. Chemother.* 44:601-605; Veloira et al., 2003 *J Antimicrob. Chemother.* 52:915-919; Wu et al., 2002 *Am J Respir Cell Mol Biol.* 26:731-738).

Mặc dù tính khả dụng của các hợp chất BT là tốt trong hàng thập kỷ qua nhưng sự lựa chọn hữu hiệu các hợp chất BT thích hợp đối với các chỉ định bệnh nhiễm trùng cụ thể vẫn là mục tiêu khó nắm giữ, khi mà đặc tính của BT cụ thể đối với vi sinh vật cụ thể là không thể đoán trước, khi mà hoạt tính đồng vận của BT cụ thể và chất kháng sinh cụ thể đối với vi sinh vật cụ thể là không thể đoán trước, khi mà tác dụng của BT *in vitro* không thể luôn đoán trước được tác dụng của BT *in vivo*, và khi mà tác dụng của BT đối với tập hợp sinh vật phù du (đơn bào) là không thể đoán trước tác dụng của BT đối với cộng đồng các vi sinh vật nói chung, như các vi khuẩn được thiết lập thành màng sinh học. Ngoài ra, đối với một số hợp chất BT, hạn chế về độ tan, khả năng thâm vào mô, độ sinh khả dụng, khả năng phân phối sinh học và các yếu tố tương tự có thể cản trở khả năng đem lại tác dụng lâm sàng một cách an toàn và hiệu quả. Sáng chế hướng đến các nhu cầu này và cung cấp các ưu điểm liên quan khác.

Khả năng bảo vệ thực vật và các nông sản

Trong lĩnh vực nông nghiệp và thực vật học, cần có các chế phẩm làm giảm các màng sinh học và các bệnh ở thực vật, và các phương pháp sử dụng các chế phẩm này đối với, ví dụ, hạt giống, thực vật, trái cây và hoa, đất trồng, và đối với bộ phận hoa, cây, trái cây, lá, thân cây và các phần thực vật khác.

Trong nông nghiệp, mỗi năm có hàng tỷ đô la thất thu đối với cây trồng do sự tạo thành các màng sinh học. Vấn đề về bệnh loét và các bệnh có liên quan đến màng sinh học ở thực vật là đã được biết rõ mặc dù đã có rất nhiều nghiên cứu hướng đến vấn đề này. Các bệnh ở thực vật cũng tác động đến các ngành công nghiệp có liên quan đến sự vận chuyển và bảo quản trái cây, rau, hoa và cây, và các

sản phẩm thực vật khác, vì các cơ chế bảo vệ thông thường được áp dụng cho các thực vật sống nguyên vẹn không được vận dụng cho sản phẩm thu hoạch.

Do đó, mong muốn đối với ngành nông nghiệp là giảm sự phát triển của vi sinh vật trên các bề mặt của lá, thân, quả và hoa tại chỗ, nơi vận chuyển qua hoặc nơi buôn bán trong khi vẫn duy trì tuân theo các quy định đối với môi trường. Đồng thời, mong muốn là cho phép dòng nước trong cảnh hoa, thực vật và cây vẫn duy trì tính chất trang, tính nguyên vẹn và chất lượng của mô thực vật để gia tăng các đặc tính mong muốn của các sản phẩm này.

Các sinh vật mà gây ra bệnh nhiễm ở thực vật bao gồm nấm, vi khuẩn, virus, động vật nguyên sinh, giun tròn và các thực vật ký sinh. Côn trùng và các loài gây hại khác cũng ảnh hưởng đến sức khỏe thực vật bằng cách tiêu thụ mô thực vật, và bằng cách khiến cho mô thực vật tiếp xúc với các vi sinh vật.

Các màng sinh học xảy ra khi vi khuẩn liên kết với bề mặt, thường trong môi trường nước như trong điều kiện sống dưới nước hoặc trong các giọt nước hoặc các điều kiện độ ẩm cao khác, và sau khi liên kết các dạng tiền màng sinh học bắt đầu tiết ra chất dính, chất này sau đó có thể liên kết với nhiều chất liệu khác bao gồm kim loại, chất dẻo, mảnh ghép và mô y tế. Các màng sinh học này có thể gây ra nhiều vấn đề, bao gồm sự thoái biến của các chất liệu và sự tắc ống, trong môi trường công nghiệp và nông nghiệp, và sự nhiễm trùng các mô xung quanh nếu diễn ra trong môi trường y tế. Lĩnh vực y tế là đặc biệt dễ mắc phải các vấn đề do sự tạo thành màng sinh học gây ra; các thiết bị y tế được cấy ghép, các ống thông (đường tiêu, ven, thẩm tách, tim) và các vết thương chậm lành là dễ dàng bị thâm nhập bởi vi khuẩn có trong các màng sinh học. Trong nông nghiệp, các màng sinh học có thể gây ra chứng viêm vú, bệnh Pierce, mục rìa ở khoai tây, các bệnh tàn rụi cây trồng và các bệnh loét ở nhiều loại thực vật. Các màng sinh học còn làm giảm chất lượng và thời gian bảo quản sản phẩm của cảnh hoa và cây.

Nhiều bệnh thực vật là do vi khuẩn tạo màng sinh học trong đất gây ra. Hầu hết các vi sinh vật trong môi trường tự nhiên tồn tại ở dạng các khối kết tụ đa bào thường được gọi là các màng sinh học. Các tế bào bám vào bề mặt và vào nhau qua

chất nền phức tạp bao gồm nhiều chất polyme ngoại bào (extracellular polymeric substance: EPS) bao gồm các exopolysacarit, các protein và các ADN. Vi khuẩn liên kết với thực vật tương tác với các bề mặt mô vật chủ trong quá trình phát sinh bệnh và trong quá trình cộng sinh, và trong các mối quan hệ hội sinh. Các quan sát vi khuẩn kết hợp với thực vật phát hiện được các cấu trúc kiểu màng sinh học thay đổi từ cụm tế bào nhỏ đến các màng sinh học rộng lớn. Các tính chất bề mặt của mô thực vật, chất dinh dưỡng và tính sẵn có của nước, và các xu hướng của vi khuẩn xâm chiếm có ảnh hưởng mạnh mẽ đến cấu trúc màng sinh học thu được (Ramey et al., 2004 *Curr Opinion Microbiol.* 7:602–9).

Môi trường trên cạn chứa các tập hợp vi sinh vật phong phú và khác nhau có thể cạnh tranh và thay đổi các tài nguyên chung. Trong môi trường phức tạp và cạnh tranh này, thực vật cung cấp các ốc đảo bảo vệ chứa các mô giàu chất dinh dưỡng. Vi khuẩn xâm chiếm thực vật trên lá, rễ, hạt và hệ mạch bên trong của chúng. Mỗi loại mô có các tính chất hóa học và vật lý duy nhất mà là cơ hội và thử thách cho các loài vi sinh vật xâm chiếm. Các màng sinh học có thể tạo ra, khi kết hợp hoặc ở các giai đoạn sau, khả năng đáng kể liên kết hoặc điều chỉnh tương tác thực vật–vi sinh vật. Tính phức tạp theo thời gian và không gian gia tăng vì nhiều vi sinh vật biến đổi tích cực môi trường thực vật bị xâm chiếm.

Vi khuẩn kết hợp bề mặt có tác động đáng kể trong nông nghiệp. Ở các nước phát triển, tổn thất do bệnh ở thực vật đạt đến 25% năng suất thu hoạch, mức tổn thất còn cao hơn rất nhiều ở các nước đang phát triển. Tập hợp biểu sinh tạo thành bề chứa và nguồn nhiễm tương lai, và có thể được phát hiện trên các thực vật chủ và thực vật không phải là chủ. *Xylophylus ampelinus*, tác nhân gây bệnh vi khuẩn của cây nho, tạo thành các màng sinh học dày trong hệ mạch của loài thực vật này (Grail & Manceau 2003). *Xylella fastidiosa* là tác nhân gây ra bệnh Pierce ở cây nho. *X. fastidiosa* có khả năng tạo thành các màng sinh học trong các mạch mô mọng của nhiều loại cây có giá trị kinh tế. Cơ chế gây bệnh phần lớn là do sự bít các mạch mô mọng bằng sự kết tụ của *X. fastidiosa* và sự tạo thành màng sinh học. Việc phong bế mạch được cho là yếu tố chính góp phần phát triển bệnh, nhựa mô mọng cung cấp môi trường tự nhiên tạo điều kiện thuận lợi cho độc lực của bệnh Pierce

trên cây nho và bệnh úa vàng loang lỗ trên họ cây cam (Zaini et al., 2009 *FEMS Microbiol LETT.* 295:129-34).

Một trong số các tác nhân gây bệnh cho thực vật có liên quan nhiều nhất, *Pseudomonas syringae*, gây ra bệnh đốm nâu trên cây đậu. Nó xâm chiếm bề mặt lá rải rác thành các nhóm nhỏ đơn độc (dưới mười tế bào), trong khi các tập hợp lớn hơn (trên 1000 tế bào) phát triển chủ yếu gần túm lông hoặc gân lá với nguồn dinh dưỡng lớn hơn. Các khối kết tụ lớn sống sót trong khô hạn tốt hơn các tế bào đơn độc. *P. syringae* sống sót dưới dạng thực vật biểu sinh (tức là, loài xâm chiếm các phần trên không của thực vật) nếu chúng không gây ra các bệnh nhiễm cho các mô thực vật chủ (Monier et al. *PNAS* 2003;100:15977-82).

Pseudomonas putida có thể nhanh chóng đáp ứng với sự có mặt của dịch rỉ của rễ cây trong đất, hội tụ ở các vị trí xâm chiếm rễ và tạo các màng sinh học ổn định (Espinosa-Urgel et al. *Microbiol* 2002;148:341-3).

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (Xcc) gây ra bệnh thối đen trên cây họ cải, chúng đi vào hệ mạch qua các vị trí bị tổn thương ở rễ. Sự độc hại bao gồm các enzym ngoại bào thoái biến và gồm exopolysaccharit xanthan, điều này là cần thiết cho tính độc hại (Dow et al. *PNAS* 2003;100:10995-1000).

Xanthomonas smithii subsp. *citri* chịu trách nhiệm cho bệnh loét họ cây cam. Bệnh này đã được phát hiện ở hầu hết các lục địa trên thế giới ngoại trừ châu Âu. Tác nhân gây bệnh đã được tiết trừ ở nhiều nước. *Xanthomonas smithii* tạo thành các vết loét trên quả, lá và nhánh con của họ cây cam. Mưa gió có thể làm vi khuẩn lan rộng đến 15km từ nguồn bệnh để gây nhiễm cây họ cam qua khí không hoặc các vết thương (Sosnowski, et al. *Plant Pathol* 2009;58:621-35).

Pantoea stewartii subsp. *stewartii* gây ra bệnh héo Stewart ở cây ngô và được truyền bệnh bởi bọ cánh cứng trên cây ngô. Vi khuẩn sinh sống chủ yếu trong mô thực vật chủ và sinh ra lượng lớn exopolysaccharit (von Bodman et al. *PNAS* 1998;95:7687-92).

Ralstonia solanacearum là tác nhân gây bệnh trong đất, nó gây ra bệnh chết héo ở nhiều loài thực vật. Sự độc hại tùy thuộc vào EPS và các enzym làm phân hủy thành tế bào được giám sát bằng mạng lưới điều hòa phức tạp (Kang et al. *Mol Microbiol* 2002; 46:427-37).

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* là vi khuẩn gram dương gây bệnh ở cây, nó gây ra bệnh mục rìa ở khoai tây. Marques và các đồng tác giả đã phát hiện thấy các khối kết tụ vi khuẩn lớn, được bọc trong chất nền gắn với các mạch mô mộc (Marques et al. *Phytopathol* 2003;93:S57).

Erwinia chrysanthemi tạo màng sinh học gây ra bệnh thối nhũn qua việc nhanh chóng làm thâm ướt mô thực vật. Sự tạo ra các enzym pectic có thể được điều hòa dò tìm mật độ tới hạn (quorum-sensing: QS), và do đó việc không có khả năng tạo thành các khối kết tụ vi khuẩn có thể ngăn ngừa sự tiết enzym pectinolytic. *Erwinia amylovora*, tác nhân gây bệnh ở thực vật có liên quan, gây nhiễm khoảng 75 loại thực vật khác nhau, tất cả số này đều thuộc họ hoa hồng Rosaceae. Các vật chủ cho chủng vi khuẩn này bao gồm cây táo, cây lê, cây mâm xôi, cây bê ri, cây táo dại, cây táo gai (*Pyracantha*), cây đào gai, cây mộc qua Nhật Bản hay cây mộc qua thơm, cây thanh lương trà, cây lê, cây mộc qua, cây mâm xôi, và cây mơ trên châu. Cây táo, cây lê và cây mộc qua được trồng là các loại cây bị ảnh hưởng nghiêm trọng nhất. Năm 2000, ở Michigan, chỉ với bệnh thối lê, táo đã làm chết khoảng 220.000 cây với tổng thiệt hại là 42 triệu đô la. Thiệt hại hàng năm đối với bệnh thối lê, táo và chi phí để kiểm soát bệnh này ở Mỹ được ước tính trên 100 triệu đô la (Norelli et al. *Plant Dis* 2003;87:26-32).

E. amylovora có hai exopolysaccharit, amylovoran và levan, điều này gây ra triệu chứng héo thối lê, táo đặc trưng ở thực vật chủ (Koczan et al. *Phytopathol* 2009;99:1237-44). Ngoài ra, các gen khác, và các protein mã hóa chúng, đã được đặc trưng như là các yếu tố độc hại của *E. amylovora* mà mã hóa các enzym tạo điều kiện thuận lợi cho sự chuyển hóa sorbitol, hoạt tính thủy phân protein và thu sắt (Oh & Beer. *FEMS Microbiology Lett* 2005;253:185–192).

Bất kỳ phần nào của thực vật bị tấn công bởi tác nhân vi sinh vật gây bệnh cho thực vật như tác nhân tạo thành màng sinh học thì tác động thường là làm yếu hoặc giết chết thực vật. Bằng sự nhiễm lên lá, tác nhân gây bệnh tác động đến khả năng tạo ra thức ăn cho thực vật (ví dụ, qua sự quang hợp). Một số tác nhân gây bệnh ở thực vật làm phong bế các mạch vận chuyển nhựa trong thân cây để cung cấp cho lá, và nếu các tác nhân gây bệnh này tấn công rễ thì sự hấp thu nước và chất dinh dưỡng bị giảm hoặc ngừng lại hoàn toàn. Sự phong bế hệ mạch thực vật thường có liên quan đến vi khuẩn tạo màng sinh học, chúng làm cản trở dòng nước và chất dinh dưỡng, cả ở thực vật đang phát triển, ở trong đất và ở các phần thực vật được cắt trong bình nước.

Nếu thực vật bị tấn công bởi một trong số các vi sinh vật này thì tổn thương mắc phải sẽ tạo cơ hội cho sự xâm lấn của các vi sinh vật khác vào mô thực vật và đây là sự tấn công kết hợp rút cục làm tổn thương và hủy hoại thực vật. Thực vật bị áp lực từ môi trường như khô hạn hoặc nghèo dinh dưỡng là đặc biệt dễ bị vi sinh vật tấn công.

Đôi khi “sự nhiễm” vi sinh vật là cộng sinh, trong đó cả hai sinh vật đều có lợi. Ví dụ về vấn đề này là vi khuẩn cố định đạm đã được biết rõ (*Rhizobium*), vi khuẩn này cư trú trong các nốt trên rễ cây họ đậu- cây này cung cấp thức ăn và sự bảo vệ trong khi vi khuẩn này lấy nitơ từ không khí và chuyển hóa nó thành dạng mà cây này dùng được. Ví dụ khác, *Mycorrhizae* là một loài nấm có mối quan hệ cộng sinh với rễ cây. Với sự cộng sinh qua lại có lợi này, việc bảo quản hoặc bảo vệ thực vật chống lại các tác nhân vi sinh vật gây bệnh có hại có thể áp dụng một cách thuận lợi các chất kháng vi sinh vật mà không phá vỡ mối quan hệ cộng sinh này nếu cần.

Nấm hoại sinh là yếu tố cần thiết trong việc phá vỡ vật chất hữu cơ chết để tạo ra mùn cần thiết cho cấu trúc đất tốt. Chúng không có chất diệp lục và do đó không thể sử dụng ánh sáng để tạo năng lượng (ví dụ, qua quá trình quang hợp); thay vào đó chúng nhận năng lượng bằng cách phá vỡ vật chất thực vật và động vật còn sống hoặc đã chết. Chúng cũng có thể sống cộng sinh với các loài thực vật nhất định, ví dụ, *micorrhizae* ở rễ của cây lá kim, chúng không thể sống mà không có

loại nấm này để lấy chất dinh dưỡng. Việc sử dụng rộng rãi các hóa chất để kiểm soát các tác nhân gây bệnh có hại cho thực vật có thể làm hại đến sự cân bằng của các loài nấm có lợi này, và đi ngược lại các nguyên tắc của cơ quan quản lý.

Tuy nhiên, có nhiều loài nấm không tốt khác, chúng tấn công thực vật sống và làm yếu hoặc tiêu diệt thực vật. Các loài vi sinh vật gây bệnh ở thực vật, virus này có thể sinh sống trong các tế bào của các mô thực vật và do đó thường không thể xử lý được bằng cách dùng hóa chất cục bộ, do vậy thực vật bị nhiễm sẽ bị phá hủy. Hiện không có các chất kháng sinh được phát triển một cách cụ thể để xử lý cho thực vật (mặc dù một số chất kháng sinh đã được phát triển với mục đích khác đã được phát hiện là có ứng dụng cho thực vật), do đó một số loài thực vật có giá trị kinh tế có thể bị tổn thương bởi sự tấn công của vi khuẩn gây bệnh. Ví dụ, bệnh thối lùn, táo ở một số lớn loài thực vật thuộc họ hoa hồng Rosaceae đã được chứng minh là không thể xử lý. Ngược lại, nhiều loài nấm có hại có thể được diệt trừ bằng cách sử dụng hóa chất cục bộ mà không làm hại đến thực vật chủ, vì môi trường phát triển của loại nấm này là khác, ví dụ, số nấm gây bệnh không mong muốn có xu hướng phát triển trên bề mặt thực vật và không ở trong mô thực vật, sử dụng các cấu trúc không giống rễ để chiết chất dinh dưỡng.

Vì việc diệt trừ các tác nhân gây bệnh ở thực vật thường là khó khăn hoặc không thể nên một số chiến lược bảo vệ thực vật chống lại các tác nhân vi sinh vật gây hại tuân theo triết lý "phòng hơn là chữa". Bằng cách thực hiện vệ sinh tốt khi nhân giống và trồng thực vật, nhiều bệnh ở thực vật do vi sinh vật có thể được phòng ngừa bằng cách ngăn chặn cơ hội nhiễm vi sinh vật. Thông thường, một lượng khá nhỏ chất trừ sâu hoặc chất diệt vi sinh vật có thể là hữu hiệu nếu các chất này được sử dụng để phòng ngừa thay vì để phản ứng lại sự nhiễm bệnh mắc phải.

Thực vật cũng dễ mắc bệnh hơn nếu chúng không được phát triển trong các điều kiện tối ưu hoặc cận tối ưu, ví dụ, bản thân do chất lượng đất kém (ví dụ, thiếu chất dinh dưỡng) hoặc kết hợp với sự hạn hán hoặc mưa nhiều hoặc lũ lụt. Ví dụ, điều kiện quá ẩm ướt có thể thúc đẩy nấm gây bệnh và/hoặc vi khuẩn phát triển. Ví dụ, sự dò tìm mật độ tới hạn ở *P. syringae*, được tác động bằng sự có sẵn nước trên bề mặt lá (Dulla & Lindow. *PNAS* 2008;105:3-082-7). Tất nhiên không phải toàn

bộ các bệnh ở thực vật có thể được phòng ngừa bằng cách vệ sinh trong nông nghiệp tốt, vì một số bệnh ở thực vật bị truyền bệnh bởi côn trùng và các bệnh khác là do gió mang đến. Ví dụ, giông rệp vùng và các loài côn trùng hút nhựa khác là các vật truyền virus chính. Các bào tử nấm gây bệnh được mang đi trong không khí, trong giọt nước mưa và nước bắn.

Màng sinh học trên hạt và mầm

Vi khuẩn bám lên hạt giống là quy trình ảnh hưởng mạnh mẽ đến sự xâm chiếm vùng rễ. Các nhà cung cấp hạt giống thường cân nhắc phủ lên kho hạt các màng sinh học vi sinh vật để cấy ghép vùng rễ phát triển. Ngược lại, các màng sinh học trên hạt và mầm được sử dụng cho người thường là nguồn phổ biến gây nhiễm đường tiêu hóa. *P. putida* bám một cách hiệu quả vào hạt và sau đó sẽ xâm chiếm vùng rễ. Tập hợp xạ khuẩn không gây bệnh sống trong mô được phát hiện trong các mô lúa mỳ có nguồn gốc từ sự xâm chiếm xạ khuẩn vào bên trong của các hạt đã được khử trùng bề mặt. Tập hợp vi khuẩn cố định đạm có ích sống trong mô của hạt có thể giúp đảm bảo sự xâm chiếm vào vùng rễ tương lai. Các nghiên cứu khác về sự xâm chiếm hạt đã báo cáo về vi khuẩn hình que và cầu khuẩn có trong EPS trong các vi ảnh điện tử quét của các hạt và mầm cỏ linh lăng. Các màng sinh học có sự kháng cự rất tốt đối với việc rửa và các phép xử lý chống vi khuẩn thông thường khác đối với hạt và mầm. Fett et al. đã phát hiện ra rằng cả tập hợp *Escherichia coli* O157:H7 và tập hợp *Salmonella* trên mầm cỏ linh lăng đều cần các phép xử lý mạnh hơn việc rửa đơn giản bằng nước để giảm số lượng vi sinh vật bám vào, và việc loại bỏ hoàn toàn chúng là điều không bao giờ đạt được. Vi khuẩn sống sót có khả năng sinh sống trong các màng sinh học (Ramey et al. *Curr Opin Microbiol* 2004;7:602–9).

Cành cây và cành hoa

Các tác nhân gây bệnh trong mạch sống trong mô mộc hoặc libe của thực vật chủ và thường phụ thuộc vào các vật truyền là côn trùng hoặc vết thương để gieo rắc bệnh. Cành cây và cành hoa là loại tương tự vết thương đặc biệt dễ bị nhiễm vào mạch. Vi khuẩn tạo màng sinh học đi vào và bịt kín hệ mạch ở bề mặt cắt, và

cản trở dòng nước, chất khoáng và chất dinh dưỡng. Các chất bảo quản cành hoa được pha loãng trong bình nước thường chứa salixylate hoặc aspirin để giảm sự tạo thành màng sinh học (Domenico et al., *J Antimicrob Chemo* 1991;28:801-10; Salo et al., *Infection* 1995;23:371-7), và tạo độ pH thấp để ngăn ngừa sự phát triển của vi khuẩn và phá vỡ các màng sinh học.

Chất kháng vi sinh vật dùng trong nông nghiệp

Việc tiết trừ sự xâm nhập của tác nhân gây bệnh ở thực vật là rất quan trọng để bảo vệ ngành công nghiệp thực vật, các khu vườn được quản lý và môi trường tự nhiên trên toàn thế giới. Hậu quả của tác nhân gây bệnh đang địa phương hóa có thể là rất trầm trọng, trong một số trường hợp làm tác động đến nền kinh tế quốc dân. Chiến lược hiện tại để tiết trừ tác nhân gây bệnh dựa vào các kỹ thuật để xử lý, loại bỏ và vớt bỏ các thực vật chủ bị nhiễm bệnh. Có nhiều ví dụ mà các kỹ thuật này đã thành công nhưng cũng có nhiều trường hợp là không thành công. Sự thành công dựa trên hiểu biết đúng đắn về sinh học và dịch tễ học của tác nhân gây bệnh và tương tác của nó với vật chủ. Trong các ví dụ kiểm tra khả năng xử lý tác nhân gây bệnh ở thực vật và vật chủ bị bệnh trên toàn thế giới, đặc biệt là ở Australia, nhiều kỹ thuật bao gồm đốt, chôn, tia, bón phân trộn, hun khói đất và hun khói sinh học, phơi nắng, khử trùng bằng hơi, và kiểm soát vật truyền sinh học đã được sử dụng (Sosnowski, et al. *Plant Pathol* 2009; 58:621–35).

Các chất kháng sinh cũng đã được sử dụng từ những năm 1950, để kiểm soát các bệnh do vi khuẩn nhất định đối với trái cây có giá trị cao, rau, và cây cảnh. Ngày nay, các chất kháng sinh thường dùng nhất đối với thực vật là oxytetracyclin và streptomycin. Ở Mỹ, các chất kháng sinh được dùng cho thực vật chiếm dưới 0,5% tổng số các chất kháng sinh sử dụng. Sự kháng của các tác nhân gây bệnh ở thực vật đối với oxytetracyclin là rất hiếm nhưng sự xuất hiện của các chủng kháng streptomycin *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas* spp., và *Xanthomonas campestris* đã yêu cầu việc kiểm soát một số bệnh quan trọng. Do đó, vai trò của việc sử dụng chất kháng sinh ở thực vật trong cuộc khủng hoảng kháng chất kháng sinh trong việc dùng thuốc cho người là vấn đề tranh cãi (McManus et al. *Annu Rev Phytopathol* 2002;40:443–65).

Sự xuất hiện của tác nhân gây bệnh ở thực vật kháng streptomycin (Sm^R) đã làm phức tạp hóa sự kiểm soát bệnh do vi khuẩn ở thực vật. Ví dụ, ở Mỹ, streptomycin được cho phép dùng cho cà chua và hạt tiêu để kiểm soát *X. campestris* pv. *vesicatoria*, nhưng nó hiếm khi được dùng cho mục đích này vì các chủng kháng hiện đã phổ biến. Sự kháng ở *E. amylovora*, tác nhân gây bệnh thối lè, táo, có dính liú về mặt kinh tế và chính trị rộng rãi. Vi khuẩn gây bệnh ở cây trong đó Sm^R đã được báo cáo bao gồm *Pectobacterium carotovora*, *Pseudomonas chichorii*, *Pseudomonas lachrymans*, *Pseudomonas syringae* pv. *papulans*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, và *Xanthomonas dieffenbachiae* (McManus et al. *Annu Rev Phytopathol* 2002;40:443–65). Sự xuất hiện của *E. amylovora* Sm^R đã làm tăng cường bệnh dịch thối lè, táo ở miền tây nước Mỹ và bang Michigan.

Streptomycin và oxytetracyclin đã được phân hạng độc tính thấp nhất bởi cơ quan bảo vệ môi trường Mỹ (Environmental Protection Agency: EPA), và hoạt tính gây ung thư hoặc đột biến không được thấy ở cả hai chất kháng sinh này.

Các chất kháng sinh khác cũng có trên thị trường và là thiết thực ít nhất đến mức độ nào đó. Thực vậy, việc quản lý bệnh do vi khuẩn ở hầu hết các hệ thống thu hoạch là dựa trên cơ sở kết hợp giữa khả năng kháng di truyền của vật chủ, hệ thống vệ sinh (tránh hoặc loại bỏ chất chùng), và thực tiễn trồng trọt tạo ra môi trường bất lợi cho việc phát triển bệnh. Việc kiểm soát sinh học đối với thực vật sử dụng nhiều loài vi khuẩn và nấm hiện đang là mối quan tâm. Vi khuẩn nốt rỗ được xem như là vi khuẩn cạnh tranh hữu hiệu trong vùng rễ. Các đại diện của nhiều loài vi khuẩn khác đã được đưa vào đất, hạt, rễ, thân củ hoặc các bộ phận khác của cây để cải thiện sự phát triển của cây. Các loài vi khuẩn này bao gồm *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Frankia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Thiobacillus*, và nhiều loài khác. Ví dụ, các loài *Bacillus* nhất định, có thể khiến cho nhiều loại cây có sức đề kháng toàn thân (Choudhary & Johri. *Microbiol Res* 2009;164:493—513).

Việc sử dụng các hợp chất đồng là hữu hiệu trong việc giảm tập hợp một số vi khuẩn gây bệnh ở thực vật, mặc dù một số loài đã trở nên kháng đồng (Cooksey *Annu Rev Phytopathol* 1990;28:201–14), và hầu hết cây ăn quả là nhạy với tổn

thương do đồng.

Có một số phương thuốc tự nhiên và tổng hợp cho nhiều bệnh ở thực vật. Các phương thuốc tự nhiên bao gồm dấm táo dùng cho bệnh đốm lá, bệnh nấm mốc và bệnh nấm vảy; thuốc phun soda bicacbonat dùng cho bệnh loét thực vật, bệnh cà chua úa sớm, bệnh cháy bìa lá, bệnh nấm mốc bột (bệnh phấn trắng) và thuốc diệt nấm nói chung; dầu neem; lưu huỳnh; tỏi; hydro peroxit; trà phân ủ, v.v. Một số hóa chất tổng hợp được sử dụng để ngăn ngừa hoặc xử lý bệnh ở thực vật, và ở dạng các chế phẩm tan trong nước hoặc không tan trong nước. Các thuốc diệt vi sinh vật bao gồm phenoxarsin hoặc phenarsazin, maleimit, isoindol dicarboximit, aryl alkanol được halogen hóa, các dẫn xuất của 4-thioxopyrimidin (Patent Mỹ số 6384040), các hợp chất organosilyl dị vòng và isothiazolinon. Nhiều thuốc diệt vi sinh vật được kết hợp với các dẫn xuất pyrethrin để tạo ra các hợp chất đồng vận (ví dụ, EP1468607). Các isothiazolcarboxamit nhất định có thể được sử dụng để kiểm soát các loài gây hại thực vật (ví dụ, US 6552056; WO 2001/064644).

Thừa nhận vấn đề độc hại của các thuốc diệt vi sinh vật ở dạng bột hoặc dạng tinh thể, Patent Mỹ số 29,409 đã gợi ý cách hòa tan các thuốc diệt vi sinh vật trong các dung môi lỏng, dung môi này có thể được bổ sung vào hỗn hợp chế phẩm từ đó các chế phẩm nhựa cuối cùng được tạo ra. Mặc dù sự phân tán chất lỏng có thể được sử dụng một cách an toàn thay cho các chế phẩm nhựa cuối cùng nhưng việc sử dụng bất cẩn hoặc sự thải bỏ các chất lỏng này vẫn có thể gây hại đến môi trường và sức khỏe. Cách khác, các thuốc diệt vi sinh vật cũng có thể được cho vào các nhựa nhiệt dẻo tan trong nước. Các thuốc diệt vi sinh vật có thể được bổ sung vào các chế phẩm nhựa nhiệt dẻo cứng và truyền hoạt tính diệt sinh vật của nó vào đó nhờ đó ức chế sự phát triển của vi sinh vật trên bề mặt của nó (US 5,229,124). Đây là dung dịch được trộn nóng chảy, rắn chứa chủ yếu là thuốc diệt vi sinh vật được hòa tan trong nhựa mang là copolyme của rượu vinyl và (alkylenoxy) acrylat. Mặc dù thuốc diệt vi sinh vật có thể là hóa chất có độc tính cao nhưng nồng độ của nó trong sản phẩm cuối cùng là thấp và sự giữ lại nó nhờ chế phẩm nhựa đã đảm bảo rằng thuốc diệt vi sinh vật trong sản phẩm cuối cùng không có hại đến người hoặc động vật.

Isothiazolinon thường được sử dụng làm các thuốc diệt vi sinh vật trong nông nghiệp, ví dụ, các dẫn xuất N-alkylbenzensulfonylcarbamoyl-5-cloisothiazol (ví dụ, US 5,045,555). Thuốc diệt vi sinh vật này được sử dụng rộng rãi trong, ví dụ, công nghiệp giấy, công nghiệp sợi, để sản xuất chất phủ và keo dính, trong công nghiệp sơn, xử lý kim loại, trong công nghiệp nhựa, công nghiệp gỗ, xây dựng, nông nghiệp, lâm nghiệp, nghề cá, công nghiệp thực phẩm và công nghiệp dầu mỏ cũng như trong lĩnh vực dược phẩm. Nó có tác dụng diệt vi sinh vật rất cao, và có thể được bổ sung, với lượng thích hợp, vào nước xử lý, nước tuần hoàn, và nguyên liệu thô hoặc sản phẩm. Ngoài ra, nó có thể được sử dụng để tẩy uế hoặc diệt trùng phương tiện, thực vật, trại chăn nuôi hoặc các đồ nghề cũng như hạt, cây giống và các nguyên liệu thô. Các dẫn xuất khác của isothiazolon cũng đã được biết đến (Patent Mỹ số 3,523,121 và *J. Heterocyclic Chem.*, 8, 587 (1971)). Tuy nhiên, tất cả các hợp chất dẫn xuất đã biết đều có độc tính cao đối với động vật cá, điều này hạn chế đáng kể ứng dụng của chúng.

Natri bicarbonat thông thường cũng đã được phát hiện là có các tính chất diệt nấm khi được dùng cho thực vật, nhưng thường cần phải sử dụng lại một cách thường xuyên để đạt hiệu quả.

Vai trò của sắt trong các mối quan hệ thực vật chủ-vật ký sinh đã được giải thích ở một số bệnh khác nhau như bệnh thối nhũn và bệnh thối lè, táo lùn lợt do *Erwinia chrysanthemi* và *E. amylovora* gây ra (*Expert. Annu Rev Phytopathol* 1999;37:307–34). Vì vị trí duy nhất của nó trong các hệ thống sinh học nên sắt kiểm soát các hoạt tính của tác nhân gây bệnh ở thực vật. Việc sản xuất các đại thực bào chứa sắt bởi các tác nhân gây bệnh không chỉ biểu hiện chiến lược mạnh mẽ để giành được sắt từ các mô vật chủ mà còn có tác dụng như là chất bảo vệ chống lại độc tính của sắt. Nhu cầu của vật chủ đối với sự liên kết và có thể cô lập kim loại trong quá trình phát sinh bệnh là vấn đề trung tâm khác. Các chất kháng vi sinh vật cản trở sự hấp thu sắt của vi khuẩn và sự hô hấp của tế bào có thể đóng vai trò quan trọng trong việc chống nhiễm bệnh ở thực vật.

Nhiều sản phẩm tự nhiên (ví dụ, các chất kháng sinh) và các hóa chất tổng hợp với tính chất kháng vi sinh vật, sát trùng và đặc biệt là kháng vi khuẩn, đã được

biets đến và đã được mô tả ít nhất một phần về mặt hóa học và sinh học. Các đặc tính điển hình bao gồm khả năng diệt vi sinh vật (tác dụng diệt khuẩn), khả năng làm ngừng hoặc làm suy giảm sự phát triển của vi sinh vật (tác dụng kìm vi khuẩn), hoặc khả năng cản trở các chức năng của vi sinh vật như sự xâm chiếm hoặc gây nhiễm bệnh ở một vị trí, sự bài tiết các chất chuyển hóa của vi khuẩn (một số chất này là nặng mùi), và/hoặc chuyển hóa từ tập hợp phù du thành tập hợp màng sinh học hoặc mở rộng sự tạo thành màng sinh học (tác dụng chống màng sinh học). Các chất kháng sinh, chất diệt khuẩn, chất sát trùng và các chất tương tự (chứa bismut-thiol hoặc hợp chất BT) được bàn luận trong patent Mỹ số 6,582,719, bao gồm các yếu tố tác động đến sự chọn lựa và sử dụng các chế phẩm này, bao gồm, ví dụ, khả năng diệt khuẩn, kìm vi khuẩn, hoặc khả năng chống màng sinh học, nồng độ hữu hiệu, và nguy cơ gây độc cho các mô vật chủ.

Các vi khuẩn lạc của vi khuẩn được bảo vệ trong màng sinh học thường kháng lại các chất sát trùng hoặc các chất diệt khuẩn. Các liều chất kháng sinh diệt được vi khuẩn nổi tự do cần phải được gia tăng, ví dụ, gấp 1.500 lần mới diệt được vi khuẩn trong màng sinh học. Ở nồng độ cao này, một số chất kháng vi sinh vật có thể gây độc. Ví dụ các hợp chất oxy hóa được brom hóa và clo hóa là có độc tính khá cao và ăn mòn.

Việc ngăn chặn sự thối hoa là chìa khóa đối với việc quản lý bệnh thối lê, táo. Để gây nhiễm cho hoa, *Erwinia amylovora* cần sinh sôi trên các bề mặt đầu nhụy trong pha biểu sinh. Mưa là cần thiết cho việc gây nhiễm vì nó pha loãng đường trên đế hoa đến mức thẩm thấu mà không làm ức chế *E. amylovora*. Mưa cũng quan trọng như là chất để tái phân bố vi khuẩn từ đầu nhụy đến đế hoa. Các quan sát này gợi ý rằng thời gian tối ưu để phun thuốc kháng sinh là pha biểu sinh này, và sau khi mưa nhiều (Johnson & Stockwell. *Annu Rev Phytopathol* 1998;36:227–48).

Các thực vật biểu sinh vi khuẩn khác cũng xâm chiếm nhụy hoa tại đó chúng có thể tương tác và ngăn chặn sự phát triển biểu sinh của tác nhân gây bệnh. Các chất đối kháng vi khuẩn có trên thị trường đối với *E. amylovora* (BlightBan, *Pseudomonas fluorescens* A506) có thể được chứa trong các thuốc phun chất kháng

sinh. Sự kết hợp các chất đối kháng vi khuẩn với các phương pháp hóa học ngăn chặn tập hợp các tác nhân gây bệnh và đồng thời, nạp các vi sinh vật cạnh tranh không gây bệnh vào tổ sinh thái được cung cấp bởi nhụy hoa (Johnson & Stockwell. *Annu Rev Phytopathol* 1998;36:227–48).

Pyrithion là bazơ liên hợp thu được từ 2-mercaptopyridin-N-oxit (CAS# 1121-31-9), dẫn xuất của pyridin-N-oxit. Tác dụng chống nấm của nó là ở khả năng phá vỡ sự vận chuyển qua màng bằng cách ngăn chặn bơm proton kích thích cơ chế vận chuyển. Các thử nghiệm đã gợi ý rằng nấm có khả năng vô hoạt pyrithion ở nồng độ thấp (Chandler & Segel. *Antimicrob. Agents Chemother* 1978;14:60–8). Kẽm pyrithion là phức chất phối trí của kẽm. Chất rắn không màu này được sử dụng làm chất kháng nấm và kháng khuẩn. Vì độ tan trong nước của nó là thấp (8ppm ở độ pH trung tính) nên kẽm pyrithion thích hợp để dùng trong các sản phẩm sơn ngoài trời, xi măng và các sản phẩm khác để cung cấp sự bảo vệ chống lại nấm mốc và tảo. Nó là chất diệt tảo hữu hiệu. Tuy nhiên, nó là chất không tương thích về mặt hóa học với các sản phẩm sơn mà dựa trên các chất hong khô kim loại carboxylat. Nếu được sử dụng trong các sản phẩm sơn latex chứa nước mà chứa lượng sắt cao thì cần có chất chelat hóa mà sẽ ưu tiên liên kết với các ion sắt.

Vấn đề đặc biệt trong nông nghiệp là sự nhiễm bệnh bao gồm các màng sinh học vi khuẩn, cấu tạo vi khuẩn được xác nhận tương đối gần đây mà trong đó vi khuẩn tự do, đơn bào (“phù du”) tập hợp lại bằng sự dính bám nội bào thành các cộng đồng đa bào có trật tự (các màng sinh học) có các kiểu tính chất, biểu hiện gen, và tính nhạy cảm với các tác nhân môi trường bao gồm các chất kháng sinh khác nhau rõ rệt. Các màng sinh học có thể triển khai các cơ chế phòng ngự sinh học không phát hiện thấy ở vi khuẩn phù du, các cơ chế này có thể bảo vệ cộng đồng màng sinh học chống lại chất kháng sinh và các đáp ứng miễn dịch của vật chủ. Các màng sinh học được tạo ra có thể kìm hãm sự sinh trưởng, phát triển, hoặc các quá trình làm lành vết thương ở thực vật.

Các màng sinh học vi khuẩn có sự kháng gia tăng đáng kể đối với cả chất diệt khuẩn và chất kháng sinh. Hình thái màng sinh học thu được khi vi khuẩn và/hoặc nấm liên kết với các bề mặt. Sự liên kết này khơi mào sự phiên mã gen

biến đổi, dẫn đến sự tiết chất nền polysacarit đàn hồi rõ rệt và khó xuyên thấu, bảo vệ các vi sinh vật. Các màng sinh học là rất có sức kháng cự đối với các cơ chế phòng ngự miễn dịch của thực vật, ngoài sức kháng cự rất đáng kể của chúng đối với các chất kháng sinh. Các màng sinh học là rất khó tiết trừ khi chúng được tạo ra, do đó việc ngăn ngừa sự tạo thành màng sinh học là yếu tố ưu tiên rất quan trọng trong nông nghiệp. Nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng các vết thương hở có thể trở nên nhanh chóng bị nhiễm các màng sinh học. Các màng sinh học vi sinh vật này được cho là làm suy giảm sự tăng trưởng, phát triển và/hoặc làm lành vết thương, và rất có khả năng là có liên quan đến việc tạo thành các bệnh nhiễm nghiêm trọng và thường khó trị.

Rõ ràng là cần có các chế phẩm cải tiến và các phương pháp để xử lý và ngăn ngừa sự nhiễm vi sinh vật trong và trên thực vật, bao gồm sự nhiễm vi sinh vật mà diễn ra như các màng sinh học. Các phương án nhất định được mô tả ở đây hướng đến nhu cầu này và cung cấp các ưu điểm liên quan khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Như được mô tả ở đây, và không bị giới hạn bởi giả thuyết bất kỳ, theo các phương án nhất định được mô tả lần đầu ở đây, các hợp chất bismut-thiol (BT) có thể được sử dụng làm các chất sát trùng để sử dụng trong nhiều ngành nông nghiệp, công nghiệp, sản xuất và các trường hợp khác, cũng như trong việc xử lý và ngăn ngừa các bệnh nhiễm và các tình trạng liên quan và trong việc chăm sóc sức khỏe cá nhân, trong khi còn giảm chi phí phải chịu để xử lý sự nhiễm bệnh này, bao gồm việc tiết kiệm chi phí bằng cách ngăn chặn hoặc phòng ngừa gián tiếp ít nhất một phần bằng BT.

Ngoài ra, các phương án nhất định được mô tả ở đây bao gồm các chế phẩm được dự tính để xử lý thực vật hoặc các mô thực vật (ví dụ, rễ, củ, thân, lá, cành, dây leo, thân bò, chồi, hoa hoặc một phần của nó, đầu lá xanh, quả, hạt, vỏ hạt, v.v.) và các mô động vật và/hoặc các bề mặt tự nhiên và nhân tạo mà chứa các màng sinh học vi khuẩn hoặc vi khuẩn liên quan đến sự tạo thành màng sinh học (ví dụ, vi khuẩn mà có khả năng tạo thành hoặc cách khác là thúc đẩy màng sinh

học), các chế phẩm này chứa một hoặc nhiều hợp chất BT và một hoặc nhiều hợp chất kháng sinh, như được mô tả ở đây, trong đó theo giả thuyết không giới hạn, sự phối hợp chọn lọc một cách thích hợp giữa hợp chất BT và chất kháng sinh dựa trên sáng chế cho đến nay tạo ra sự đồng vận không đoán trước được với các tác dụng kháng vi khuẩn (bao gồm chống màng sinh học) của các chế phẩm này, và/hoặc các tác dụng tăng cường không đoán trước được, để ngăn chặn, phòng ngừa và/hoặc xử lý hữu hiệu bệnh nhiễm vi sinh vật bao gồm bệnh nhiễm màng sinh học vi khuẩn.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng các chế phẩm bismut-thiol chứa các huyền phù vi hạt hữu hiệu như là đơn phân tán, và các phương pháp tổng hợp và sử dụng chúng.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến phương pháp bảo vệ thực vật chống lại tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus, bao gồm cho thực vật hoặc một phần của nó (ví dụ, toàn bộ hoặc một phần của rễ, củ, thân, lá, cành, dây leo, thân bò, chồi, hoa hoặc một phần của nó, đầu lá xanh, quả, hạt, vỏ hạt, v.v.) tiếp xúc với lượng hữu hiệu chế phẩm bismut-thiol (BT) trong điều kiện và thời gian đủ để thực hiện một hoặc nhiều yếu tố sau: (i) ngăn chặn thực vật nhiễm bệnh do tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus, (ii) ức chế sự tồn tại tế bào hoặc sự phát triển tế bào đối với hầu như toàn bộ các tế bào phù du của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus, (iii) ức chế sự tạo thành màng sinh học bởi tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus, và (iv) ức chế sự tồn tại màng sinh học hoặc sự phát triển màng sinh học của hầu như toàn bộ các tế bào tạo thành màng sinh học của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus, trong đó chế phẩm BT chứa huyền phù hầu như là đơn phân tán của các vi hạt bao gồm hợp chất BT, các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ 0,4 μ m đến 10 μ m. Theo phương án khác, tác nhân gây bệnh là vi khuẩn bao gồm các tế bào *Erwinia amylovora*. Theo phương án khác tác nhân gây bệnh là vi khuẩn được chọn từ *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris* pv *dieffenbachiae*, *Pseudomonas syringae*, *Xylella fastidiosa*; *Xylophylus ampelinus*; *Monilinia fructicola*, *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii*, *Ralstonia solanacearum*, and

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus*. Theo các phương án nhất định tác nhân gây bệnh là vi khuẩn có tính kháng chất kháng sinh. Theo các phương án nhất định tác nhân gây bệnh là vi khuẩn có tính kháng streptomycin. Theo các phương án nhất định thực vật là cây lương thực, theo các phương án nhất định nó là cây ăn quả. Theo các phương án nhất định khác cây ăn quả được chọn từ cây táo, cây lê, cây đào, cây xuân đào, cây mận, cây mơ. Theo các phương án nhất định khác, cây lương thực là cây chuối thuộc giống *Musa*. Theo các phương án nhất định khác, cây lương thực là cây được chọn từ cây thân củ, cây họ đậu, và cây ngũ cốc. Theo các phương án nhất định khác, cây thân củ được chọn từ *Solanum tuberosum* (khoai tây), và *Ipomoea batatas* (khoai lang). Theo các phương án nhất định về phương pháp nêu trên, bước tiếp xúc được thực hiện một hoặc nhiều lần. Theo các phương án nhất định khác, ít nhất một bước tiếp xúc bao gồm một trong số các công đoạn phun, ngâm, phủ và sơn thực vật. Theo các phương án nhất định khác, ít nhất một bước tiếp xúc được thực hiện ở hoa, đầu lá xanh hoặc vị trí phát triển của cây. Theo các phương án nhất định, ít nhất một bước tiếp xúc được thực hiện trong 24, 48 hoặc 72 giờ của thời kỳ nở hoa đầu tiên trên cây.

Theo các phương án nhất định của phương pháp nêu trên, chế phẩm BT chứa một hoặc nhiều hợp chất BT được chọn từ BisBAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, Bis-DTT, Bis-2-mercaptoetanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, Bis-Pyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismut-1-mercapto-2-propanol, và Bis-EDT/2-hydroxy-1-propanthiol. Theo các phương án nhất định, tác nhân gây bệnh là vi khuẩn có tính kháng chất kháng sinh.

Theo các phương án nhất định khác về phương pháp nêu trên, phương pháp này bao gồm cho thực vật tiếp xúc với chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường, đồng thời hoặc liên tiếp và theo thứ tự bất kỳ so với bước cho thực vật tiếp xúc với chế phẩm BT. Theo các phương án nhất định các chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường bao gồm chất kháng sinh that được chọn từ chất kháng sinh aminoglycosit, chất kháng sinh carbapenem, chất kháng sinh cephalosporin, chất kháng sinh floquinolon, chất kháng sinh penixilin kháng penixilinaza, và chất

kháng sinh aminopenixilin. Theo các phương án nhất định, chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường là chất kháng sinh aminoglycosit được chọn từ amikaxin, arbekaxin, gentamixin, kanamixin, neomixin, netilmixin, paromomixin, rhodostreptomycin, streptomycin, tobramixin and apramixin.

Theo các phương án nhất định khác, sáng chế đề cập đến phương pháp khắc phục tính kháng chất kháng sinh ở thực vật mà tác nhân gây bệnh ở thực vật là vi khuẩn kháng chất kháng sinh đã có mặt trên hoặc trong thực vật này, bao gồm (a) cho thực vật tiếp xúc với lượng hữu hiệu chế phẩm BT trong điều kiện trong điều kiện và thời gian đủ để thực hiện một hoặc nhiều yếu tố sau: (i) ngăn chặn thực vật nhiễm bệnh do tác nhân gây bệnh là vi khuẩn kháng chất kháng sinh, (ii) ức chế sự tồn tại tế bào hoặc sự phát triển tế bào đối với hầu như toàn bộ các tế bào phù du của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn kháng chất kháng sinh, (iii) ức chế sự tạo thành màng sinh học bởi tác nhân gây bệnh là vi khuẩn kháng chất kháng sinh, và (iv) ức chế sự tồn tại màng sinh học hoặc sự phát triển màng sinh học của hầu như toàn bộ các tế bào tạo thành màng sinh học của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn kháng chất kháng sinh, trong đó chế phẩm BT chứa huyền phù của các vi hạt hầu như là đơn phân tán chứa hợp chất BT, các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ $0,5\mu\text{m}$ đến $10\mu\text{m}$; và (b) cho thực vật này tiếp xúc với chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường, đồng thời hoặc lần lượt và theo thứ tự bất kỳ so với bước cho thực vật tiếp xúc với chế phẩm BT.

Theo các phương án nhất định về các phương pháp nêu trên, chế phẩm bismut-thiol chứa đa số các vi hạt chứa hợp chất bismut-thiol (BT), hầu như tất cả các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ $0,4\mu\text{m}$ đến $5\mu\text{m}$ và được tạo ra bằng quy trình bao gồm: (a) trộn, trong điều kiện và thời gian đủ để thu được dung dịch hầu như không có chất kết tủa rắn, (i) dung dịch nước axit chứa muối bismut với nồng độ bismut ít nhất là 50mM và không có chất hòa tan ưa nước, phân cực hoặc hữu cơ, với (ii) etanol với lượng đủ để thu được hỗn hợp chứa etanol với lượng khoảng 25% thể tích; và (b) bổ sung vào hỗn hợp thu được ở bước (a) dung dịch etanol chứa hợp chất chứa thiol để thu được dung dịch phản ứng, trong đó hợp chất chứa thiol có mặt trong dung dịch phản ứng với tỷ lệ

mol nằm trong khoảng từ 1:3 đến 3:1 tính theo bismut, trong điều kiện và thời gian đủ để tạo thành kết tủa, kết tủa này bao gồm các vi hạt chứa hợp chất BT.

Theo các phương án nhất định, muối bismut là $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$. Theo các phương án nhất định dung dịch nước axit chứa ít nhất 5%, 10%, 15%, 20%, 22% hoặc 22,5% bismut tính theo trọng lượng. Theo các phương án nhất định dung dịch nước axit chứa ít nhất 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% hoặc 5% axit nitric tính theo trọng lượng. Theo các phương án nhất định hợp chất chứa thiol bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn từ 1,2-etan dithiol, 2,3-dimercaptopropanol, pyrrithion, dithioerythritol, 3,4-dimercaptotoluen, 2,3-butandithiol, 1,3-propandithiol, 2-hydroxypropan thiol, 1-mercapto-2-propanol, dithioerythritol, axit alpha-lipoic, dithiothreitol, metanthiol (CH_3SH [m-mercaptan]), etanthiol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{SH}$ [e-mercaptan]), 1-propanthiol ($\text{C}_3\text{H}_7\text{SH}$ [n-P mercaptan]), 2-propanthiol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{SH})\text{CH}_3$ [2C₃ mercaptan]), butanthiol ($\text{C}_4\text{H}_9\text{SH}$ ([n-butyl mercaptan]), tert-butyl mercaptan ($\text{C}(\text{CH}_3)_3\text{SH}$ [t-butyl mercaptan]), pentanthiol ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{SH}$ [pentyl mercaptan]), coenzym A, lipoamit, glutathion, xystein, xystin, 2-mercaptoetanol, dithiothreitol, dithioerythritol, 2-mercaptaindol, transglutaminaza, (11-mercaptoundexyl)hexa(etylen glycol), (11-mercaptoundexyl)tetra(etylen glycol), các hạt nano vàng được tạo nhóm chức (11-mercaptoundexyl)tetra(etylen glycol), 1,1',4',1''-terphenyl-4-thiol, 1,11-undecandithiol, 1,16-hexadecandithiol, 1,2-etandithiol loại kỹ thuật, 1,3-propandithiol, 1,4-benzendimetanthiol, 1,4-butandithiol, 1,4-butandithiol diaxetat, 1,5-pentandithiol, 1,6-hexandithiol, 1,8-octandithiol, 1,9-nonandithiol, adamantanthiol, 1-butanthiol, 1-decanthiol, 1-dodecanthiol, 1-heptanthiol, 1-heptanthiol purum, 1-hexadecanthiol, 1-hexanthiol, 1-mercapto-(trietylen glycol), các hạt nano vàng được tạo nhóm chức 1-mercapto-(trietylen glycol) metyl ete, 1-mercapto-2-propanol, 1-nonanthiol, 1-octadecanthiol, 1-octanthiol, 1-octanthiol, 1-pentadecanthiol, 1-pentanthiol, 1-propanthiol, 1-tetradecanthiol, 1-tetradecanthiol purum, 1-undecanthiol, 11-(1H-pyrrol-1-yl)undecan-1-thiol, 11-amino-1-undecanthiol hydroclorua, 11-bromo-1-undecanthiol, 11-mercapto-1-undecanol, 11-mercapto-1-undecanol, axit 11-mercaptoundecanoic, axit 11-mercaptoundecanoic, 11-mercaptoundexyl trifloaxetat, axit 11-

mercaptoundexylphosphoric, axit 12-mercaptododecanoic, axit 12-mercaptododecanoic, axit 15-mercaptopentadecanoic, axit 16-mercaptohexadecanoic, axit 16-mercaptohexadecanoic, 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perflodecanthiol, 2,2'-(etylendioxy)dietanthiol, 2,3-butanedithiol, 2-butanthiol, 2-etylhexanthiol, 2-metyl-1-propanthiol, 2-metyl-2-propanthiol, 2-phenyletanthiol, 3,3,4,4,5,5,6,6,6-nonaflor-1-hexanthiol purum, 3-(dimetoxymetylsilyl)-1-propanthiol, 3-clo-1-propanthiol, 3-mercapto-1-propanol, 3-mercapto-2-butanol, 3-mercapto-*N*-nonylpropionamit, axit 3-mercaptopropionic, silicagel được tạo nhóm chức 3-mercaptopropyl, 3-metyl-1-butanthiol, 4,4'-bis(mercaptometyl)biphenyl, 4,4'-dimercaptostilben, rượu 4-(6-mercaptohexyloxy)benzyl, 4-xyano-1-butanthiol, 4-mercapto-1-butanol, 6-(feroxenyl)hexanthiol, 6-mercapto-1-hexanol, axit 6-mercaptohexanoic, 8-mercapto-1-octanol, axit 8-mercaptooctanoic, 9-mercapto-1-nonanol, biphenyl-4,4'-dithiol, butyl 3-mercaptopropionat, đồng(I) 1-butanthiolat, xyclohexanthiol, xyclopentanthiol, các hạt nano bạc được tạo nhóm chức decanthiol, các hạt nano vàng được tạo nhóm chức dodecanthiol, các hạt nano bạc được tạo nhóm chức dodecanthiol, hexa(etylen glycol)mono-11-(axetylthio)undexyl ete, axit mercaptosucxinic, metyl 3-mercaptopropionat, nanoTether BPA-HH, NanoThinksTM 18, NanoThinksTM 8, NanoThinksTM ACID11, NanoThinksTM ACID16, NanoThinksTM ALCO11, NanoThinksTM THIO8, các hạt nano vàng được tạo nhóm chức octanthiol, PEG dithiol M_n trung bình 8.000, PEG dithiol trọng lượng phân tử trung bình 1.500, PEG dithiol trọng lượng phân tử trung bình 3.400, *S*-(11-bromoundexyl)thioaxetat, *S*-(4-xyanobutyl)thioaxetat, thiophenol, trietylen glycol mono-11-mercaptoundexyl ete, trimetylolpropan tris(3-mercaptopropionat), [11-(metylcarbonylthio)undexyl]tetra(etylen glycol), *m*-carboran-9-thiol, *p*-terphenyl-4,4''-dithiol, *tert*-dodexylmercaptan, và *tert*-nonyl mercaptan.

Theo các phương án nhất định, tác nhân gây bệnh là vi khuẩn bao gồm ít nhất một trong số: (i) một hoặc nhiều vi khuẩn gram âm; (ii) một hoặc nhiều vi khuẩn gram dương; (iii) một hoặc nhiều vi khuẩn nhạy chất kháng sinh; (iv) một hoặc nhiều vi khuẩn kháng chất kháng sinh; (v) tác nhân gây bệnh là vi khuẩn được chọn từ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), MRSA (*S. aureus* kháng methixilin), *Staphylococcus epidermidis*, MRSE (*S. epidermidis* kháng methixilin),

Mycobacterium tuberculosis, *Mycobacterium avium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa* kháng thuốc, *Escherichia coli*, *E. coli* sinh độc tố ruột, *E. coli* gây xuất huyết ruột, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecalis* nhạy với methixilin, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholera*, *Shigella flexneri*, *Enterococcus* kháng vancomycin (VRE), phức hợp *Burkholderia cepacia*, *Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pneumonia* kháng penixilin, *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Mycobacterium smegmatis* và *Acinetobacter baumannii*.

Theo các phương án nhất định, phương pháp theo sáng chế bao gồm cho thực vật tiếp xúc với ít nhất một trong (i) chất kháng sinh tác dụng đồng vận và (ii) chất kháng sinh tăng cường hiệu quả kháng vi sinh vật hợp tác, đồng thời hoặc liên tiếp và theo thứ tự bất kỳ so với bước cho bề mặt tiếp xúc với chế phẩm BT. Theo các phương án nhất định khác, chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc chất kháng sinh tăng cường hiệu quả kháng vi sinh vật hợp tác bao gồm chất kháng sinh được chọn từ chất kháng sinh aminoglycosit, chất kháng sinh carbapenem, chất kháng sinh cephalosporin, chất kháng sinh floquinolon, chất kháng sinh glycopeptit, chất kháng sinh lincosamit, chất kháng sinh penixilin kháng penixilinaza, và chất kháng sinh aminopenixilin. Theo các phương án nhất định khác, chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc chất kháng sinh tăng cường hiệu quả kháng vi sinh vật hợp tác là chất kháng sinh aminoglycosit được chọn từ amikaxin, arbekaxin, gentamixin, kanamixin, neomixin, netilmixin, paromomixin, rhodostreptomixin, streptomixin, tobramixin và apramixin.

Theo các phương án nhất định khác, sáng chế đề xuất phương pháp khắc phục tính kháng chất kháng sinh ở thực vật mà tác nhân gây bệnh là vi khuẩn kháng chất kháng sinh đã có mặt ở trên hoặc trong thực vật này, bao gồm: cho thực vật tiếp xúc đồng thời hoặc liên tiếp và theo thứ tự bất kỳ với lượng hữu hiệu của (1) ít nhất một chế phẩm bismut-thiol (BT) và (2) ít nhất một chất kháng sinh có tác dụng

tăng cường hoặc tác dụng đồng vận với ít nhất một chế phẩm BT, trong điều kiện và thời gian đủ để thực hiện một hoặc nhiều yếu tố sau: (i) ngăn chặn sự nhiễm bệnh của thực vật do tác nhân gây bệnh là vi khuẩn gây ra, (ii) ức chế sự tồn tại tế bào hoặc sự phát triển tế bào đối với hầu như toàn bộ các tế bào phù du của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, (iii) ức chế sự tạo thành màng sinh học bởi tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, và (iv) ức chế sự tồn tại màng sinh học hoặc sự phát triển màng sinh học của hầu như toàn bộ các tế bào tạo thành màng sinh học của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, trong đó chế phẩm BT chứa đa số vi hạt chứa hợp chất bismut-thiol (BT), hầu như tất cả các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ $0,4\mu\text{m}$ đến $5\mu\text{m}$; và do đó khắc phục được tính kháng chất kháng sinh trên bề mặt mô biểu mô. Theo các phương án nhất định khác, tác nhân gây bệnh là vi khuẩn có tính kháng chất kháng sinh được chọn từ methixilin, vancomycin, nafixilin, gentamixin, ampixilin, cloramphenicol, doxyxycilin, tobramycin, clindamixin và gatifloxacin. Theo các phương án nhất định khác chế phẩm BT chứa một hoặc nhiều hợp chất BT được chọn từ BisBAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, Bis-DTT, Bis-2-mercaptoetanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, Bis-Pyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismut-1-mercapto-2-propanol, và Bis-EDT/2-hydroxy-1-propanthiol. Theo các phương án nhất định, chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường bao gồm chất kháng sinh được chọn từ clindamixin, gatifloxacin, chất kháng sinh aminoglycosit, chất kháng sinh carbapenem, chất kháng sinh xephalosporin, chất kháng sinh floquinolon, chất kháng sinh penixilin kháng penixilinaza, và chất kháng sinh aminopenixilin. Theo các phương án nhất định khác, chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường là chất kháng sinh aminoglycosit được chọn từ amikaxin, arbekaxin, gentamixin, kanamixin, neomixin, netilmixin, paromomixin, rhodostreptomixin, streptomixin, tobramixin và apramixin.

Theo các phương án nhất định khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm bismut-thiol, chứa đa số vi hạt chứa hợp chất bismut-thiol (BT), hầu như tất cả các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ $0,4\mu\text{m}$ đến $5\mu\text{m}$, trong

đó hợp chất BT bao gồm bismut hoặc muối bismut và hợp chất chứa thiol. Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm bismut-thiol, chứa đa số vi hạt chứa hợp chất bismut-thiol (BT), hầu như tất cả các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ $0,4\mu\text{m}$ đến $5\mu\text{m}$ và được tạo ra bằng quy trình bao gồm (a) trộn, trong điều kiện và thời gian đủ để thu được dung dịch hầu như không có chất kết tủa rắn, (i) dung dịch nước axit chứa muối bismut với nồng độ bismut ít nhất là 50mM và không có chất hòa tan ưa nước, phân cực hoặc hữu cơ, với (ii) etanol với lượng đủ để thu được hỗn hợp chứa etanol với lượng ít nhất khoảng 5%, 10%, 15%, 20%, 25% hoặc 30% theo thể tích; và (b) bổ sung vào hỗn hợp thu được ở bước (a) dung dịch etanol chứa hợp chất chứa thiol để thu được dung dịch phản ứng, trong đó hợp chất chứa thiol có mặt trong dung dịch phản ứng với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:3 đến 3:1 tính theo bismut, trong điều kiện và thời gian đủ để tạo thành kết tủa, kết tủa này bao gồm các vi hạt chứa hợp chất BT. Theo các phương án nhất định muối bismut là $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$. Theo các phương án nhất định dung dịch nước axit chứa với lượng ít nhất 5%, 10%, 15%, 20%, 22% hoặc 22,5% tính theo trọng lượng. Theo các phương án nhất định dung dịch nước axit chứa axit nitric với lượng ít nhất 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% hoặc 5% tính theo trọng lượng. Theo các phương án nhất định hợp chất chứa thiol bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn từ 1,2-etan dithiol, 2,3-dimercaptopropanol, pyrrithion, dithioerythritol, 3,4-dimercaptotoluen, 2,3-butandithiol, 1,3-propandithiol, 2-hydroxypropan thiol, 1-mercapto-2-propanol, dithioerythritol, axit alpha-lipoic và dithiothreitol.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất được phẩm bismut-thiol chứa đa số vi hạt chứa hợp chất bismut-thiol (BT), hầu như tất cả các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ $0,4\mu\text{m}$ đến $5\mu\text{m}$, phương pháp này bao gồm bước (a) trộn, trong điều kiện và thời gian đủ để thu được dung dịch hầu như không có chất kết tủa rắn, (i) dung dịch nước axit chứa muối bismut với nồng độ bismut ít nhất là 50mM và không có chất hòa tan ưa nước, phân cực hoặc hữu cơ, với (ii) etanol với lượng đủ để thu được hỗn hợp chứa etanol với lượng ít nhất khoảng 5%, 10%, 15%, 20%, 25% hoặc 30% theo thể tích;

và (b) bổ sung vào hỗn hợp thu được ở bước (a) dung dịch etanol chứa hợp chất chứa thiol để thu được dung dịch phản ứng, trong đó hợp chất chứa thiol có mặt trong dung dịch phản ứng với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:3 đến 3:1 tính theo bismut, trong điều kiện và thời gian đủ để tạo thành kết tủa, kết tủa này bao gồm các vi hạt chứa hợp chất BT. Theo các phương án nhất định, phương pháp này còn bao gồm thu hồi kết tủa để loại bỏ tạp chất. Theo các phương án nhất định, muối bismut là $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$. Theo các phương án nhất định, dung dịch nước axit chứa bismut với lượng ít nhất là 5%, 10%, 15%, 20%, 22% hoặc 22,5% tính theo trọng lượng. Theo các phương án nhất định, dung dịch nước axit chứa axit nitric ít nhất là 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% hoặc 5% tính theo trọng lượng. Theo các phương án nhất định, hợp chất chứa thiol bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm 1,2-etan dithiol, 2,3-dimercaptopropanol, pyrithion, dithioerythritol, 3,4-dimercaptotoluen, 2,3-butandithiol, 1,3-propandithiol, 2-hydroxypropan thiol, 1-mercapto-2-propanol, dithioerythritol, dithiothreitol, axit alpha-lipoic, metanthiol (CH_3SH [m-mercaptan]), etanthiol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{SH}$ [e-mercaptan]), 1-propanthiol ($\text{C}_3\text{H}_7\text{SH}$ [n-P mercaptan]), 2-propanthiol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{SH})\text{CH}_3$ [2C₃ mercaptan]), butanthiol ($\text{C}_4\text{H}_9\text{SH}$ ([n-butyl mercaptan]), tert-butyl mercaptan ($\text{C}(\text{CH}_3)_3\text{SH}$ [t-butyl mercaptan]), các pentanthiol ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{SH}$ [pentyl mercaptan]), coenzym A, lipoamit, glutathion, xystein, xystin, 2-mercaptoetanol, dithiothreitol, dithioerythritol, 2-mercaptaindol, transglutaminaza, (11-mercaptoundexyl)hexa-(etylen glycol), (11-mercaptoundexyl)tetra(etylen glycol), các hạt nano vàng được tạo nhóm chức (11-mercaptoundexyl)tetra(etylen glycol), 1,1',4',1''-terphenyl-4-thiol, 1,11-undecandithiol, 1,16-hexadecandithiol, 1,2-etandithiol loại kỹ thuật, 1,3-propandithiol, 1,4-benzendimetanthiol, 1,4-butandithiol, 1,4-butandithiol diacetat, 1,5-pentandithiol, 1,6-hexandithiol, 1,8-octandithiol, 1,9-nonandithiol, adamantanthiol, 1-butanthiol, 1-decanthiol, 1-dodecanthiol, 1-heptanthiol, 1-heptanthiol purum, 1-hexadecanthiol, 1-hexanthiol, 1-mercapto-(trietylen glycol), các hạt nano vàng được tạo nhóm chức 1-mercapto-(trietylen glycol) metyl ete, 1-mercapto-2-propanol, 1-nonanthiol, 1-octadecanthiol, 1-octanthiol, 1-octanthiol, 1-pentadecanthiol, 1-pentanthiol, 1-propanthiol, 1-tetradecanthiol, 1-tetradecanthiol purum, 1-undecanthiol, 11-(1H-

pyrol-1-yl)undecan-1-thiol, 11-amino-1-undecanthiol hydroclorua, 11-bromo-1-undecanthiol, 11-mercapto-1-undecanol, 11-mercapto-1-undecanol, axit 11-mercaptoundecanoic, axit 11-mercaptoundecanoic, 11-mercaptoundexyl trifloaxetat, axit 11-mercaptoundexyl-phosphoric, axit 12-mercaptododecanoic, axit 12-mercaptododecanoic, axit 15-mercaptopentadecanoic, axit 16-mercaptohexadecanoic, axit 16-mercaptohexa-decanoic, 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perflodecanthiol, 2,2'-(etylendioxy)dietanthiol, 2,3-butandithiol, 2-butanthiol, 2-ethylhexanthiol, 2-metyl-1-propanthiol, 2-metyl-2-propanthiol, 2-phenyletanthiol, 3,3,4,4,5,5,6,6,6-nonaflor-1-hexanthiol purum, 3-(dimetoxymetylsilyl)-1-propanthiol, 3-clo-1-propanthiol, 3-mercapto-1-propanol, 3-mercapto-2-butanol, 3-mercapto-*N*-nonylpropionamit, axit 3-mercaptopropionic, silicagel được tạo nhóm chức 3-mercaptopropyl, 3-metyl-1-butanthiol, 4,4'-bis(mercaptometyl)biphenyl, 4,4'-dimercaptostilben, rượu 4-(6-mercaptohexyloxy)-benzyl, 4-xyano-1-butanthiol, 4-mercapto-1-butanol, 6-(feroxenyl)hexanthiol, 6-mercapto-1-hexanol, axit 6-mercaptohexanoic, 8-mercapto-1-octanol, axit 8-mercaptooctanoic, 9-mercapto-1-nonanol, biphenyl-4,4'-dithiol, butyl 3-mercaptopropionat, đồng(I) 1-butanthiolat, xyclohexanthiol, xyclopentanthiol, các hạt nano bạc được tạo nhóm chức decanthiol, các hạt nano vàng được tạo nhóm chức dodecanthiol, các hạt nano bạc được tạo nhóm chức dodecanthiol, hexa(etylen glycol)mono-11-(axetylthio)undexyl ete, axit mercaptosucxinic, metyl 3-mercaptopropionat, nanoTether BPA-HH, NanoThinks™ 18, NanoThinks™ 8, NanoThinks™ ACID11, NanoThinks™ ACID16, NanoThinks™ ALCO11, NanoThinks™ THIO8, các hạt nano vàng được tạo nhóm chức octanthiol, PEG dithiol có trọng lượng phân tử trung bình M_n 8.000, PEG dithiol có trọng lượng phân tử trung bình 1.500, PEG dithiol có trọng lượng phân tử trung bình 3.400, *S*-(11-bromoundexyl)thioaxetat, *S*-(4-xyanobutyl)thioaxetat, thiophenol, trietylen glycol mono-11-mercaptoundexyl ete, trimetylolpropan tris(3-mercaptopropionat), [11-(metylcarbonylthio)undexyl]tetra(etylen glycol), *m*-carboran-9-thiol, *p*-terphenyl-4,4''-dithiol, *tert*-dodexylmercaptan, *tert*-nonyl mercaptan.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp bảo vệ bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo, bao gồm bề mặt mô sinh học như bề mặt thực vật (ví dụ, toàn bộ

hoặc một phần của bề mặt rễ, củ, thân, lá, cành, dây leo, thân bò, chồi, hoa hoặc một phần của nó, đầu lá xanh, quả, hạt, vỏ hạt, v.v.) hoặc bề mặt mô biểu mô, chống lại một hoặc nhiều tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, tác nhân gây bệnh là nấm và tác nhân gây bệnh là virus, bao gồm cho bề mặt mô biểu mô tiếp xúc với lượng hữu hiệu của chế phẩm BT trong điều kiện và thời gian đủ để thực hiện một hoặc nhiều yếu tố sau (i) ngăn chặn sự nhiễm bệnh lên bề mặt do tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus gây ra, (ii) ức chế sự tồn tại tế bào hoặc sự phát triển tế bào đối với hầu như toàn bộ các tế bào phù du của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus, (iii) ức chế sự tạo thành màng sinh học bởi tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus, và (iv) ức chế sự tồn tại màng sinh học hoặc sự phát triển màng sinh học của hầu như toàn bộ các tế bào tạo thành màng sinh học của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus, trong đó chế phẩm BT chứa đa số vi hạt chứa hợp chất bismut-thiol (BT), hầu như tất cả các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ 0,4 μ m đến 5 μ m. Theo các phương án nhất định tác nhân gây bệnh là vi khuẩn chứa ít nhất là một trong số (i) một hoặc nhiều vi khuẩn gram âm; (ii) một hoặc nhiều vi khuẩn gram dương; (iii) một hoặc nhiều vi khuẩn nhạy chất kháng sinh; (iv) một hoặc nhiều vi khuẩn kháng chất kháng sinh; (v) tác nhân gây bệnh là vi khuẩn được chọn từ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), MRSA (*S. aureus* kháng methixilin), *Staphylococcus epidermidis*, MRSE (*S. epidermidis* kháng methixilin), *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa* kháng thuốc, *Escherichia coli*, *E. coli* sinh độc tố ruột, *E. coli* gây xuất huyết ruột, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecalis* nhạy với methixilin, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholera*, *Shigella flexneri*, *Enterococcus* kháng vancomycin (VRE), phức hợp *Burkholderia cepacia*, *Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, cầu khuẩn ruột kháng vancomycin, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* kháng penixilin, *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Mycobacterium smegmatis* và *Acinetobacter baumannii*. Theo các phương án nhất định, tác nhân gây bệnh là vi khuẩn có tính kháng chất

kháng sinh. Theo các phương án nhất định, tác nhân gây bệnh là vi khuẩn có tính kháng chất kháng sinh được chọn từ methixilin, vancomyxin, nafcilin, gentamixin, ampixilin, cloramphenicol, doxyxyclin và tobramycin.

Theo các phương án nhất định, bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo bao gồm bề mặt xoang miệng, thiết bị chỉnh hình, chất liệu gốm, chất dẻo, polyme, cao su, kim loại để sản xuất, bề mặt sơn, cấu trúc hàng hải bao gồm vỏ tàu, bánh lái, chân vịt, neo, hầm hàng, kết dẫn, âu tàu, ụ cạn, cầu tàu, cọc nổi, vách ngăn, hoặc bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo khác.

Theo các phương án nhất định, bề mặt này bao gồm bề mặt mô biểu mô bao gồm mô được chọn từ biểu bì, chân bì, đường hô hấp, đường tiêu hóa và các lớp lót tuyến.

Theo các phương án nhất định, bước tiếp xúc được thực hiện một hoặc nhiều lần. Theo các phương án nhất định, ít nhất là một bước tiếp xúc bao gồm một trong số các công đoạn phun, làm ướt, ngâm và sơn lên bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo. Theo các phương án nhất định, ít nhất là một bước tiếp xúc bao gồm một trong số các công đoạn hít, tiêu hóa và làm ướt qua đường miệng. Theo các phương án nhất định, ít nhất một bước tiếp xúc bao gồm bằng cách dùng được chọn từ khu trú, trong màng bụng, qua đường miệng, trong tĩnh mạch, trong động mạch, qua da, dưới lưỡi, dưới da, trong cơ, qua miệng, trong mũi, bằng cách hít, trong mắt, trong tâm nhĩ, trong tâm thất, dưới da, trong mô mỡ, trong khớp và trong vỏ. Theo các phương án nhất định chế phẩm BT chứa một hoặc nhiều hợp chất BT được chọn từ nhóm bao gồm BisBAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, Bis-DTT, Bis-2-mercaptoetanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, Bis-Pyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismut-1-mercapto-2-propanol, và Bis-EDT/2-hydroxy-1-propanthiol.

Theo các phương án nhất định tác nhân gây bệnh là vi khuẩn có tính kháng chất kháng sinh. Theo các phương án nhất định khác, phương pháp nêu trên còn bao gồm cho bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo tiếp xúc với chất kháng sinh tác dụng đồng vận và/hoặc với chất kháng sinh tác dụng tăng cường, đồng thời hoặc liên tiếp

và theo thứ tự bất kỳ so với bước cho bề mặt tiếp xúc với chế phẩm BT. Theo các phương án nhất định, chất kháng sinh tác dụng đồng vận và/hoặc tăng cường bao gồm chất kháng sinh được chọn từ chất kháng sinh aminoglycosit, chất kháng sinh carbapenem, chất kháng sinh cephalosporin, chất kháng sinh floquinolon, chất kháng sinh glycopeptit, chất kháng sinh lincosamit, chất kháng sinh penixilin kháng penixilinaza, và chất kháng sinh aminopenixilin. Theo các phương án nhất định, chất kháng sinh tác dụng đồng vận và/hoặc tăng cường là chất kháng sinh aminoglycosit được chọn từ amikaxin, arbekaxin, gentamixin, kanamixin, neomixin, netilmixin, paromomixin, rhodostreptomixin, streptomixin, tobramixin và apramixin.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp khắc phụ tính kháng chất kháng sinh (ví dụ, đối với tác nhân gây bệnh là vi khuẩn kháng ít nhất là một tác dụng kháng vi khuẩn của ít nhất một chất kháng sinh đã biết là có tác dụng kháng vi khuẩn chống vi khuẩn của các loài vi khuẩn giống nhau, làm cho tác nhân gây bệnh này nhạy với chất kháng sinh) trên bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo trong đó tác nhân gây bệnh là vi khuẩn kháng chất kháng sinh có mặt, bao gồm bước cho bề mặt này tiếp xúc đồng thời hoặc liên tiếp và theo thứ tự bất kỳ với lượng hữu hiệu của (1) ít nhất một chế phẩm bismut-thiol (BT) và (2) ít nhất là một chất kháng sinh mà được tăng cường tác dụng bằng, và/hoặc có khả năng tác dụng đồng vận với ít nhất là một chế phẩm BT, trong điều kiện và thời gian đủ để thực hiện một hoặc nhiều yếu tố sau: (i) ngăn chặn sự nhiễm bệnh lên bề mặt bởi tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, (ii) ức chế sự tồn tại tế bào hoặc sự phát triển tế bào đối với hầu như toàn bộ các tế bào phù du của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, (iii) ức chế sự tạo thành màng sinh học bởi tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, và (iv) ức chế sự tồn tại màng sinh học hoặc sự phát triển màng sinh học của hầu như toàn bộ các tế bào tạo thành màng sinh học của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, trong đó chế phẩm BT chứa đa số vi hạt chứa hợp chất bismut-thiol (BT), hầu như tất cả các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ $0,4\mu\text{m}$ đến $5\mu\text{m}$; và nhờ đó khắc phục tính kháng chất kháng sinh trên bề mặt mô biểu mô. Theo các phương án nhất định tác nhân gây bệnh là vi khuẩn bao gồm ít nhất là một trong số: (i) một hoặc nhiều vi khuẩn gram âm; (ii) một hoặc nhiều vi khuẩn gram dương; (iii) một

hoặc nhiều vi khuẩn nhạy chất kháng sinh; (iv) một hoặc nhiều vi khuẩn kháng chất kháng sinh; (v) tác nhân gây bệnh là vi khuẩn được chọn từ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), MRSA (*S. aureus* kháng methixilin), *Staphylococcus epidermidis*, MRSE (*S. epidermidis* kháng methixilin), *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa* kháng thuốc, *Escherichia coli*, *E. coli* sinh độc tố ruột, *E. coli* gây xuất huyết ruột, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecalis* nhạy với methixilin, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholera*, *Shigella flexneri*, *Enterococcus* kháng vancomycin (VRE), phức hợp *Burkholderia cepacia*, *Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, cầu khuẩn ruột kháng vancomycin, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* kháng penixilin, *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Mycobacterium smegmatis* và *Acinetobacter baumannii*.

Theo các phương án nhất định tác nhân gây bệnh là vi khuẩn có tính kháng chất kháng sinh được chọn từ methixilin, vancomycin, nafcilin, gentamixin, ampicilin, cloramphenicol, doxyxyclin, tobramixin, clindamixin và gatifloxacin.

Theo các phương án nhất định bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo bao gồm bề mặt xoang miệng, thiết bị chỉnh hình, chất liệu gốm, nhựa, polyme, cao su, kim loại để sản xuất, bề mặt sơn, cấu trúc hàng hải bao gồm vỏ tàu, bánh lái, chân vịt, neo, hầm hàng, kết dẫn, âu tàu, ụ cạn, cầu tàu, cọc nổi, vách ngăn, hoặc bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo khác.

Theo các phương án nhất định, bề mặt này bao gồm mô được chọn từ nhóm bao gồm biểu bì, chân bì, đường hô hấp, đường tiêu hóa và các lớp lót tuyến. Theo các phương án nhất định, bước tiếp xúc được thực hiện một hoặc nhiều lần. Theo các phương án nhất định, ít nhất là một bước tiếp xúc bao gồm một trong số các công đoạn phun, làm ướt, ngâm và sơn bề mặt này. Theo các phương án nhất định khác, ít nhất là một bước tiếp xúc bao gồm một trong số các công đoạn hít, tiêu hóa và làm ướt qua đường miệng. Theo các phương án nhất định, ít nhất là một bước

tiếp xúc bao gồm dùng bằng cách thức được chọn từ khu trú, trong màng bụng, qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa, trong tĩnh mạch, trong động mạch, qua da, dưới lưỡi, dưới da, trong cơ, qua miệng, trong mũi, bằng cách hít, trong mắt, trong tâm nhĩ, trong tâm thất, dưới da, trong mô mỡ, trong khớp và trong vỏ. Theo các phương án nhất định chế phẩm BT chứa một hoặc nhiều hợp chất BT được chọn từ BisBAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, Bis-DTT, Bis-2-mercaptoetanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, Bis-Pyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismut-1-mercapto-2-propanol, và Bis-EDT/2-hydroxy-1-propanthiol. Theo các phương án nhất định, chất kháng sinh tác dụng đồng vận và/hoặc tăng cường bao gồm chất kháng sinh được chọn từ clindamixin, gatifloxacin, chất kháng sinh aminoglycosit, chất kháng sinh carbapenem, chất kháng sinh cephalosporin, chất kháng sinh floquinolon, chất kháng sinh glycopeptit, chất kháng sinh lincosamit, chất kháng sinh penixilin kháng penixilinaza, và chất kháng sinh aminopenixilin. Theo các phương án nhất định, chất kháng sinh tác dụng đồng vận và/hoặc tăng cường là chất kháng sinh aminoglycosit được chọn từ amikaxin, arbekaxin, gentamixin, kanamixin, neomycin, netilmixin, paromomycin, rhodostreptomycin, streptomycin, tobramycin và apramycin.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm chất sát trùng, chứa (a) ít nhất là một hợp chất BT; (b) ít nhất là một hợp chất kháng sinh mà được tăng cường tác dụng bằng và/hoặc có khả năng tác dụng đồng vận với hợp chất BT; và (c) tá dược hoặc chất mang dược dụng, bao gồm chất mang để dùng khu trú. Theo các phương án nhất định, hợp chất BT được chọn từ BisBAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, Bis-DTT, Bis-2-mercaptoetanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, Bis-Pyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismut-1-mercapto-2-propanol, và Bis-EDT/2-hydroxy-1-propanthiol. Theo các phương án nhất định, chế phẩm BT chứa đa số vi hạt chứa hợp chất bismut-thiol (BT), hầu như tất cả các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ $0,4\mu\text{m}$ đến $5\mu\text{m}$. Theo các phương án nhất định, hợp chất BT được chọn từ BisEDT và BisBAL. Theo các phương án nhất định, hợp chất kháng sinh bao gồm chất kháng sinh được chọn từ methixilin, vancomycin,

nafticilin, gentamixin, ampicilin, cloramphenicol, doxyxyclin, tobramixin, clindamixin, gatifloxacin và chất kháng sinh aminoglycosit. Theo các phương án nhất định chất kháng sinh aminoglycosit được chọn từ amikaxin, arbekaxin, gentamixin, kanamixin, neomixin, netilmixin, paromomixin, rhodostreptomixin, streptomixin, tobramixin và apramixin. Theo các phương án nhất định, chất kháng sinh aminoglycosit là amikaxin.

Theo các phương án nhất định khác, sáng chế đề cập đến phương pháp xử lý bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo mà là nền hoặc chứa màng sinh học vi khuẩn, bao gồm (a) xác định sự nhiễm vi khuẩn trên hoặc trong bề mặt là chứa một trong số (i) vi khuẩn gram dương, (ii) vi khuẩn gram âm, và (iii) cả (i) và (ii); (b) cấp chế phẩm chứa một hoặc nhiều chế phẩm bismut thiol (BT) đến bề mặt, trong đó (i) nếu sự nhiễm vi khuẩn bao gồm vi khuẩn gram dương thì chế phẩm chứa lượng hữu hiệu trong điều trị của ít nhất là một hợp chất BT và ít nhất là một chất kháng sinh là rifamixin, (ii) nếu sự nhiễm vi khuẩn bao gồm vi khuẩn gram âm, thì chế phẩm chứa lượng hữu hiệu trong điều trị của ít nhất là một hợp chất BT và amikaxin, (iii) nếu sự nhiễm vi khuẩn bao gồm cả vi khuẩn gram dương và vi khuẩn gram âm, thì chế phẩm chứa lượng hữu hiệu trong điều trị của một hoặc nhiều hợp chất BT, rifamixin và amikaxin, và nhờ đó xử lý bề mặt.

Theo các phương án nhất định màng sinh học gồm một hoặc nhiều vi khuẩn kháng chất kháng sinh. Theo các phương án nhất định việc xử lý bề mặt bao gồm ít nhất là một trong các bước: (i) tiết trừ màng sinh học vi khuẩn, (ii) giảm màng sinh học vi khuẩn, và (iii) làm suy yếu sự phát triển của màng sinh học vi khuẩn. Theo các phương án nhất định chế phẩm BT chứa đa số vi hạt chứa hợp chất bismut-thiol (BT), hầu như tất cả các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ 0,4 μ m đến 5 μ m.

Các phương án này và các phương án khác của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng dựa trên phần mô tả chi tiết sáng chế và các hình vẽ kèm theo đây. Tất cả các patent Mỹ, các công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ, các patent và các đơn yêu cầu cấp patent của các nước khác và các công bố non-patent liên quan đến phần mô tả này

và/hoặc được liệt kê ở đây, bao gồm các patent Mỹ số RE37,793, 6,248,371, 6,086,921, và 6,380,248, được đính kèm theo đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện số lượng sống sót (log CFU; (colony forming units-số đơn vị tạo thành khuẩn lạc) của các màng sinh học khuẩn lạc *Pseudomonas aeruginosa* phát triển trong 24 giờ trên thạch đậu nành tryptic 10% (tryptic soy agar: TSA) ở 37°C, sau đó được xử lý theo chỉ định trong 18 giờ. Xử lý chất kháng sinh được chỉ định là TOB, tobramycin 10X MIC; AMK, amikacin 100X MIC; IPM, imipenem 10X MIC; CEF, cefepime 10X MIC; CIP, ciprofloxacin 100X MIC; Cpd 2B, hợp chất 2B (Bis-BAL, 1:1,5). (MIC: nồng độ ức chế tối thiểu (minimum inhibitory concentration), ví dụ, nồng độ thấp nhất ngăn chặn sự phát triển của vi khuẩn).

Fig.2 thể hiện số lượng sống sót (log CFU) của các màng sinh học khuẩn lạc *Staphylococcus aureus* phát triển trong 24 giờ trên thạch đậu nành tryptic 10%, sau đó là việc xử lý theo chỉ định. Việc xử lý chất kháng sinh được chỉ định là Rifampicin, RIF 100X MIC; daptomycin, DAP 320X MIC; minocycline, MIN 100X MIC; ampicillin, AMC 10X MIC; vancomycin, VAN 10X MIC; Cpd 2B, hợp chất 2B (Bis-BAL, 1:1,5), Cpd 8-2, hợp chất 8-2 (Bis-Pyr/BDT (1:1/0,5)).

Fig.3 thể hiện mức đóng kín vết xước theo thời gian tế bào sừng tiếp xúc với các màng sinh học. (*): khác nhau đáng kể so với đối chứng ($P < 0,001$).

Fig.4A và 4B thể hiện mức cận ức chế của BisEDT làm nghịch đảo tính kháng chất kháng sinh đối với một số chất kháng sinh. Các tác dụng của các chất kháng sinh cùng và không cùng với BisEDT (0,05µg/ml) đối với đám MRSA (*S. aureus* kháng methicillin) được thể hiện. Panen A thể hiện đĩa được nhúng một mình chất kháng sinh, và panen B thể hiện đĩa được kết hợp với BisEDT (BE). [GM= gentamicin, CZ= cefazolin, FEP= cefepime, IPM= imipenem, SAM= ampicillin/ sulbactam, LVX= levofloxacin.

Fig.5 thể hiện tác dụng của BisEDT và các chất kháng sinh đối với sự tạo thành màng sinh học. *S. epidermidis* phát triển trong TSB + 2% glucoza trong đĩa

polystyren trong 48 giờ ở 37°C. Gatifloxacin (GF), clindamycin (CM), minoxycyclin (MC), gentamixin (GM), vancomycin (VM), cefazolin (CZ), nafcillin (NC), và rifampicin (RP). Kết quả được biểu hiện dưới dạng mức thay đổi trung bình trong BPC (trong các bước pha loãng 2 lần từng bậc) ở 0,25 μ M BisEDT (n=3).

Fig.6 thể hiện tác dụng của BisEDT và các chất kháng sinh đối với sự phát triển của *S. epidermidis* phát triển trong TSB cộng với 2% glucoza trong 48 giờ ở 37°C. Kết quả được biểu hiện dưới dạng mức thay đổi trung bình đối với MIC (các bước pha loãng) với sự gia tăng BisEDT (n=3). Xem chú giải ở Fig.5 đối với các chất kháng sinh.

Fig.7 là sơ đồ khối thể hiện các mức vi khuẩn *S. aureus* trung bình được phát hiện trên mẫu xương và mẫu phần cứng từ các chỗ gãy hở trong mô hình chuột *in vivo* sau khi xử lý bằng ba chế phẩm BT, Bis-EDT, MB-11 và MB-8-2 cùng hoặc không cùng với việc xử lý chất kháng sinh Cefazolin. Sai số chuẩn của giá trị trung bình được thể hiện trên các thanh sai số. Các con chuột được làm chết êm ái sớm không được loại ra khỏi phép phân tích, tuy nhiên các mẫu từ một con chuột trong nhóm 2 đã được loại ra do sự nhiễm tạp chéo.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các phương án cụ thể theo sáng chế được mô tả ở đây là dựa trên sự phát hiện một cách bất ngờ rằng các hợp chất bismut-thiol (BT) nhất định như được mô tả ở đây (tốt hơn là bao gồm các vi hạt BT có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ 0,4 μ m đến 5 μ m), mà không phải là các hợp chất BT nhất định khác (ngay cả khi được tạo ra dưới dạng các vi hạt), có hoạt tính sát trùng, kháng khuẩn và/hoặc chống màng sinh học đặc biệt là vi khuẩn, bao gồm các vi khuẩn gây ra các bệnh nhiễm đáng kể trên lâm sàng như các bệnh nhiễm mà có thể bao gồm các màng sinh học vi khuẩn.

Điều bất ngờ là không phải tất cả các hợp chất BT có tác dụng kháng như nhau đối với vi khuẩn theo mô hình có thể dự đoán, trái lại chúng có khả năng khác nhau tùy thuộc vào các loài vi khuẩn đích. Cụ thể là như được mô tả ở đây, các hợp

chất BT nhất định (tốt hơn là bao gồm các vi hạt BT có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ $0,4\mu\text{m}$ đến $5\mu\text{m}$) được phát hiện là có khả năng kháng vi khuẩn gram âm cao hơn, trong khi các hợp chất BT khác (tốt hơn là bao gồm các vi hạt BT có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ $0,4\mu\text{m}$ đến $5\mu\text{m}$) được phát hiện là có khả năng kháng vi khuẩn gram dương tốt hơn, theo cách thức mà, theo giả thuyết không giới hạn, có thể là lần đầu tiên có đủ khả năng tạo ra các chiến lược liên quan về mặt lâm sàng để quản lý sự nhiễm vi khuẩn, bao gồm sự nhiễm màng sinh học vi khuẩn.

Ngoài ra, như được mô tả chi tiết hơn dưới đây, các phương án nhất định của sáng chế được mô tả ở đây đề cập đến các ưu điểm bất ngờ của các chế phẩm bismut-thiol (BT) sản xuất để chứa đa số vi hạt BT hầu như là đơn phân tán về kích cỡ hạt (ví dụ, có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ $0,4\mu\text{m}$ đến $5\mu\text{m}$). Theo các phương án nhất định, vi hạt BT không được tạo ra dưới dạng thành phần của túi mỡ hoặc liposom như liposom phosphocholin-cholesterol đa phiên hoặc túi liposom đa phiên hoặc đơn phiên khác.

Cũng được mô tả ở đây đối với các phương án nhất định, đã phát hiện được rằng hiệu quả kháng khuẩn và chống màng sinh học của các chất kháng sinh nhất định, trong đó các chất kháng sinh này trước đó đã được phát hiện là không có tác dụng chữa trị đối với các bệnh nhiễm khuẩn, có thể được gia tăng đáng kể (ví dụ, được gia tăng có ý nghĩa về mặt thống kê) bằng cách xử lý sự nhiễm (ví dụ, bằng cách dùng trực tiếp lên trên hoặc trong vị trí bị nhiễm như bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo) bằng một hoặc nhiều các chất kháng sinh này phối hợp, đồng thời hoặc liên tiếp và theo thứ tự bất kỳ, với hợp chất BT chọn lọc. Theo cách thức mà không thể đoán trước đối với phân bố cục này, các hợp chất BT nhất định có thể được kết hợp với các chất kháng sinh nhất định để tạo ra sự kết hợp tác dụng đồng vận hoặc tăng cường như được mô tả ở đây đối với hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc chống màng sinh học chống lại các loài hoặc các chủng vi khuẩn nhất định. Bản chất không dự đoán được của các kết hợp này, như được mô tả chi tiết dưới đây, được chứng minh bằng các quan sát là mặc dù các kết hợp BT/chất kháng sinh nhất định tác dụng đồng vận hoặc tăng cường chống lại các vi khuẩn nhất định, nhưng các kết

hợp BT/chất kháng sinh nhất định khác lại không có hoạt tính kháng khuẩn và/hoặc chống màng sinh học tác dụng đồng vận hoặc tăng cường như vậy.

Theo các phương án này và các phương án liên quan, chất kháng sinh và hợp chất BT có thể được dùng đồng thời hoặc liên tiếp và theo thứ tự bất kỳ, và cần chú ý là các kết hợp tác dụng đồng vận hoặc tăng cường đặc biệt của một hoặc nhiều chất kháng sinh và một hoặc nhiều hợp chất BT như được mô tả ở đây để xử lý bệnh nhiễm cụ thể (ví dụ, màng sinh học được tạo thành bởi vi khuẩn gram âm hoặc vi khuẩn gram dương) không có các hoạt tính có thể dự đoán (ví dụ, chỉ có tác dụng thêm vào) mà thay vào đó là tác dụng theo cách đồng vận hoặc tăng cường bất ngờ (ví dụ, tác dụng thêm vào nêu trên), như chức năng của chất kháng sinh chọn lọc, hợp chất BT chọn lọc và vi khuẩn đích được xác định một cách cụ thể.

Ví dụ, bằng cách minh họa và không giới hạn, được mô tả ở đây về rất nhiều bề mặt tự nhiên và/hoặc nhân tạo có khả năng hoặc thực tế đã bị nhiễm vi sinh vật, và về các chế phẩm BT vi hạt hữu như là đơn phân tán cải tiến, một trong hai hoặc cả hai hợp chất kháng sinh cụ thể và hợp chất BT cụ thể có thể có tác dụng kháng khuẩn giới hạn nếu được dùng một mình chống lại các loài hoặc chủng vi khuẩn cụ thể, nhưng sự kết hợp của cả hai hợp chất kháng sinh và hợp chất BT này lại có tác dụng kháng khuẩn hữu hiệu chống lại các loài hoặc chủng vi khuẩn đó, tác dụng này lớn hơn về độ lớn (với ý nghĩa thống kê) so với tổng tác dụng đơn giản của mỗi hợp chất khi được sử dụng một mình, và do đó được cho là, theo giả thuyết không giới hạn, phản ánh tác dụng đồng vận của chất kháng sinh-BT (ví dụ, $FICI \leq 0,5$) hoặc tác dụng tăng cường (ví dụ, $0,5 < FICI \leq 1,0$) của BT đối với hiệu lực của chất kháng sinh và/hoặc của chất kháng sinh đối với hiệu lực của BT. Do đó, không phải tất cả các hợp chất BT đều có thể có tác dụng đồng vận với, hoặc tác dụng tăng cường đối với, tất cả các chất kháng sinh, và không phải tất cả các chất kháng sinh đều có thể tác dụng đồng vận với, hoặc tác dụng tăng cường đối với, tất cả các hợp chất BT, do đó tác dụng đồng vận của chất kháng sinh-BT và tác dụng tăng cường của BT-chất kháng sinh thường không thể dự đoán. Thay vào đó, và theo các phương án nhất định như được mô tả ở đây, các kết hợp cụ thể của chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường và các hợp chất BT có tác dụng kháng khuẩn

hữu hiệu chống lại các vi khuẩn cụ thể, bao gồm các vi khuẩn trong các môi trường cụ thể như các bề mặt tự nhiên và/hoặc nhân tạo nêu trên, và còn có, trong các trường hợp nhất định, tác dụng kháng khuẩn chống lại các màng sinh học được tạo thành từ các vi khuẩn cụ thể nói trên.

Nghĩa là, các chất kháng sinh tác dụng đồng vận với BT như được mô tả ở đây, bao gồm chất kháng sinh có khả năng tác dụng đồng vận ($FICI \leq 0,5$) với ít nhất là một chế phẩm BT chứa ít nhất là một hợp chất BT như được mô tả ở đây, trong đó tác dụng đồng vận này biểu thị như là tác dụng có thể phát hiện được, tác dụng này lớn hơn (*tức là*, với ý nghĩa thống kê so với điều kiện đối chứng thích hợp) về độ lớn so với tác dụng mà có thể được phát hiện nếu chỉ có mặt chất kháng sinh nhưng không có mặt hợp chất BT, và/hoặc nếu chỉ có mặt hợp chất BT mà không có mặt chất kháng sinh. Tương tự, các kết hợp BT-chất kháng sinh nhất định có tác dụng tăng cường ($0,5 < FICI \leq 1,0$), trong đó tác dụng tăng cường này biểu thị tác dụng có thể phát hiện được, tác dụng này lớn hơn (*tức là*, với ý nghĩa thống kê so với điều kiện đối chứng thích hợp) về độ lớn so với tác dụng mà có thể phát hiện được nếu chỉ có mặt chất kháng sinh mà không có mặt hợp chất BT và/hoặc nếu chỉ có mặt hợp chất BT mà không có mặt chất kháng sinh.

Ví dụ về tác dụng có thể phát hiện được này, theo các phương án nhất định, có thể bao gồm (i) ngăn chặn sự nhiễm bởi tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, (ii) ức chế sự tồn tại tế bào hoặc sự phát triển tế bào đối với hầu như toàn bộ các tế bào phù du của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, (iii) ức chế sự tạo thành màng sinh học bởi tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, và (iv) ức chế sự tồn tại màng sinh học hoặc sự phát triển màng sinh học của hầu như toàn bộ các tế bào tạo thành màng sinh học của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nhưng sáng chế không được dự tính là chỉ giới hạn ở đó mà theo các phương án được dự tính khác, tác dụng đồng vận của chất kháng sinh-BT có thể biểu thị dưới dạng một hoặc nhiều tác dụng có thể phát hiện được mà có thể bao gồm tác dụng thay đổi (*ví dụ*, gia tăng hoặc làm giảm có ý nghĩa thống kê) của một hoặc nhiều thông số có ý nghĩa trên lâm sàng, ví dụ, mức độ kháng hoặc độ nhạy của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn đối với một hoặc nhiều chất kháng sinh hoặc các dược chất hoặc các hóa chất khác, mức độ kháng hoặc độ

nhạy của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn đối với một hoặc nhiều điều kiện hóa học, vật lý hoặc cơ học (ví dụ, độ pH, cường độ ion, nhiệt độ, áp suất), và/hoặc mức độ kháng hoặc độ nhạy của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn đối với một hoặc nhiều tác nhân sinh học (ví dụ, virus, vi khuẩn khác, polynucleotit có hoạt tính sinh học, immunocyte hoặc sản phẩm immunocyte như kháng thể, xytokin, chemokin, enzym bao gồm các enzym thoái biến, protein phá vỡ màng, gốc tự do như các chất oxy phản ứng, v.v.).

Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ là các tiêu chuẩn này và nhiều tiêu chuẩn khác mà qua đó tác dụng của các chất cụ thể đối với cấu trúc, chức năng và/hoặc hoạt tính của tập hợp vi khuẩn có thể được xác định (ví dụ, Coico et al. (Eds.), *Current Protocols in Microbiology*, 2008, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ; Schwalbe et al., *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, 2007, CRC Press, Boca Raton, FL), nhằm mục đích xác định tác dụng đồng vận hoặc tăng cường của chất kháng sinh-BT mà, theo sáng chế, có được khi tác dụng đồng vận hoặc tăng cường của kết hợp chất kháng sinh-BT vượt quá tổng các tác dụng đơn thuần quan sát được khi vắng mặt một thành phần trong kết hợp này.

Ví dụ, theo các phương án nhất định, tác dụng đồng vận có thể được xác định bằng cách xác định tác dụng kháng khuẩn như tác dụng được mô tả ở đây sử dụng các nồng độ của các chất ứng cử khác nhau (ví dụ, BT và chất kháng sinh riêng rẽ và kết hợp) để tính chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn (fractional inhibitory concentration index: FICI) và chỉ số nồng độ diệt khuẩn phân đoạn (fractional bactericidal concentration index: FBCI), theo Eliopoulos et al. (Eliopoulos and Moellering, (1996) *Antimicrobial combinations. In Antibiotics in Laboratory Medicine* (Lorian, V., Ed.), pp. 330–96, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA). Tác dụng đồng vận có thể được định nghĩa là chỉ số FICI hoặc FBCI $\leq 0,5$, và tác dụng đối kháng là >4 , (ví dụ, Odds, FC (2003) Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:1). Tác dụng đồng vận cũng có thể được định nghĩa theo quy ước là giảm nồng độ chất kháng sinh bằng hoặc trên bốn lần, hoặc cách khác, sử dụng nồng độ ức chế phân đoạn (fractional inhibitory concentration: FIC) như được mô tả, ví dụ, bởi

Hollander et al. (1998 *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:744). Theo các phương án nhất định, tác dụng đồng vận có thể được định nghĩa như là tác dụng có được từ sự kết hợp của hai dược chất (ví dụ, chất kháng sinh và chế phẩm BT) trong đó tác dụng của kết hợp này lớn hơn (ví dụ, có ý nghĩa thống kê) so với tác dụng có được nếu nồng độ của dược chất thứ hai được thay thế bằng dược chất thứ nhất.

Do đó, như được mô tả ở đây và theo các phương án được ưu tiên nhất định, kết hợp của BT và chất kháng sinh sẽ được hiểu là có tác dụng đồng vận nếu trị số FICI nhỏ hơn hoặc bằng 0,5. (Odds, 2003). Theo các phương án được ưu tiên nhất định khác và theo giả thuyết không giới hạn, các kết hợp BT-chất kháng sinh nhất định có thể có trị số FICI nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1,0 biểu thị khả năng cao đối với tác dụng đồng vận này, và trị số này có thể được quan sát sử dụng các nồng độ không tối ưu của ít nhất là một hợp chất BT và ít nhất là một chất kháng sinh có hiệu lực kháng vi sinh vật hợp tác tăng cường đơn phương hoặc qua lại. Tác dụng này cũng có thể được đề cập ở đây như là hoạt tính của chất kháng sinh “tăng cường” hoặc hoạt tính của BT “tăng cường”.

Hoạt tính chất kháng sinh và/hoặc BT tăng cường có thể được phát hiện theo các phương án nhất định nếu có mặt của (i) ít nhất là một BT ở nồng độ nhỏ hơn (có ý nghĩa thống kê) so với nồng độ ức chế tối thiểu đặc trưng (characteristic minimum inhibitory concentration: MIC) của BT đó đối với vi sinh vật đích nhất định (ví dụ, loài hoặc chủng vi khuẩn nhất định), và (ii) ít nhất là một chất kháng ở nồng độ nhỏ hơn (có ý nghĩa thống kê) so với IC_{50} đặc trưng (IC_{50} : nồng độ ức chế sự phát triển của 50% tập hợp vi sinh vật; ví dụ, Soothill et al., 1992 *J Antimicrob Chemother* 29(2):137) và/hoặc nhỏ hơn nồng độ ngăn ngừa màng sinh học (biofilm-prevention concentration: BPC) của chất kháng sinh đó đối với vi sinh vật đích nhất định, làm tăng cường (có ý nghĩa thống kê) hiệu lực kháng vi sinh vật của kết hợp BT-chất kháng sinh so với hiệu lực kháng vi sinh vật thấy được nếu một trong hai chất kháng vi sinh vật này (ví dụ, BT hoặc chất kháng sinh) được sử dụng ở nồng độ tương tự nhưng không có mặt chất kháng vi sinh vật còn lại (ví dụ, chất kháng sinh hoặc BT). Theo các phương án được ưu tiên, hoạt tính của chất kháng

sinh và/hoặc BT “tăng cường” có được nếu trị số FICI nhỏ hơn hoặc bằng 1,0 và lớn hơn 0,5.

Như sẽ được chuyên gia trong lĩnh vực này hiểu rõ dựa trên phần mô tả này, theo các phương án nhất định hoạt tính của chất kháng sinh và/hoặc BT đồng vận hoặc tăng cường có thể được xác định theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, như bằng cách sử dụng các mô hình dựa trên cơ sở phép cộng Loewe (ví dụ, chỉ số FIC, mô hình Greco), hoặc các mô hình dựa trên cơ sở tính độc lập Bliss (ví dụ, các mô hình phi tham số và bán tham số) hoặc các phương pháp khác được mô tả ở đây và đã biết trong lĩnh vực này (ví dụ, Meletiadis *et al.*, 2005 *Medical Mycology* 43:133-152). Các phương pháp minh họa xác định hoạt tính của chất kháng sinh và/hoặc BT đồng vận hoặc tăng cường được mô tả, ví dụ, trong Meletiadis *et al.*, 2005 *Medical Mycology* 43:133-152 và các tài liệu được viện dẫn trong đó (xem thêm, Meletiadis *et al.*, 2002 *Rev Med Microbiol* 13:101-117; White *et al.*, 1996 *Antimicrob Agents Chemother* 40:1914-1918; Mouton *et al.*, 1999 *Antimicrob Agents Chemother* 43:2473-2478).

Các phương án nhất định khác dự tính các kết hợp cụ thể của một hoặc nhiều chất kháng sinh và một hoặc nhiều hợp chất BT như được mô tả ở đây mà có tác dụng đồng vận hoặc tăng cường *in vivo* để xử lý sự nhiễm cụ thể (ví dụ, màng sinh học được tạo thành bởi vi khuẩn gram âm hoặc gram dương), ngay cả khi (các) hợp chất BT và (các) chất kháng sinh không có các hoạt tính có thể dự đoán (ví dụ, chỉ có tác dụng bổ sung) *in vivo* nhưng có tác dụng đồng vận hoặc tăng cường bất ngờ (ví dụ, có tác dụng trên mức bổ sung; hoặc đem lại tác dụng, khi hai hoặc nhiều chất này có mặt trong kết hợp, lớn hơn (ví dụ, có ý nghĩa thống kê) so với tác dụng có được nếu nồng độ của chất thứ hai được thay thế bằng chất thứ nhất), nhờ chức năng của chất kháng sinh chọn lọc, hợp chất BT chọn lọc và một hoặc nhiều loài vi khuẩn đích được xác định một cách cụ thể mà liên quan đến sự nhiễm này. Do đó, cần hiểu rõ là, theo các phương án này và các phương án liên quan, trong các trường hợp *in vivo* nhất định, trị số FICI hoặc FBCI (mà được xác định *in vitro*) có thể không dễ dàng có được, nhưng các tác dụng đồng vận hoặc tăng cường của BT-

chất kháng sinh vẫn có thể được xác định theo cách có được bằng chỉ số có thể xác định được đối với sự nhiễm.

Ví dụ, theo một phương án, như trong mô hình vết thương hở *in vivo*, *Rattus norvegicus* mất xương đùi như được mô tả ở ví dụ 11, sự giảm số lượng vi khuẩn có ý nghĩa thống kê được quan sát sau khi xử lý bằng kết hợp BT-chất kháng sinh so với việc xử lý chỉ bằng chất kháng sinh hoặc hợp chất BT, là dấu hiệu biểu thị tác dụng đồng vận hoặc tăng cường. Ý nghĩa thống kê có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp đã được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ. Theo các phương án nhất định khác, sự giảm quan sát được trong mô hình này hoặc các mô hình *in vivo* khác khoảng ít nhất là 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, hoặc 50% số lượng vi khuẩn quan sát được ở vết thương sau khi xử lý bằng kết hợp BT-chất kháng sinh so với việc điều trị chỉ bằng chất kháng sinh hoặc hợp chất BT được xem như là dấu hiệu biểu thị tác dụng đồng vận hoặc tăng cường.

Dấu hiệu biểu thị đại diện khác của sự nhiễm *in vivo* có thể được xác định theo các phương pháp được thiết lập đã được phát triển để định lượng mức độ nặng của sự nhiễm, như rất nhiều hệ đánh giá vết thương đã được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ (xem, ví dụ, hệ đánh giá được nêu trong European Wound Management Association (EWMA), Position Document: *Identifying criteria for wound infection*. London: MEP Ltd, 2005). Các hệ đánh giá vết thương minh họa mà có thể được dùng để đánh giá hoạt tính đồng vận hoặc tăng cường của các kết hợp BT-chất kháng sinh như được mô tả ở đây bao gồm ASEPSIS (Wilson AP, *J Hosp Infect* 1995; 29(2): 81-86; Wilson et al., *Lancet* 1986; 1: 311-13), the Southampton Wound Assessment Scale (Bailey IS, Karran SE, Toyn K, et al. *BMJ* 1992; 304: 469-71). Xem thêm, Horan TC, Gaynes P, Martone WJ, et al. ,1992 *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992; 13: 606-08. Ngoài ra, các dấu hiệu biểu thị về lâm sàng đã được công nhận về sự làm vết thương đã được chuyên gia trong lĩnh vực này biết đến cũng có thể được xác định với sự có mặt hoặc không có mặt của các hợp chất BT và/hoặc các chất kháng sinh, như kích cỡ vết thương, độ sâu vết thương, tình trạng mô hạt, sự nhiễm, v.v. Do đó, và dựa trên phần mô tả này, chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ dễ dàng hiểu rõ là có nhiều phương pháp để xác

định liệu rằng sự kết hợp chế phẩm BT–chất kháng sinh có làm thay đổi sự lành vết thương (ví dụ, làm tăng hoặc giảm có ý nghĩa thống kê so với các đối chứng thích hợp) *in vivo*.

Do đó, các phương án này và các phương án liên quan đề cập đến rất nhiều phương pháp xử lý các bề mặt tự nhiên và nhân tạo bị nhiễm như các bề mặt ủng hộ sự tạo thành hoặc chứa các màng sinh học vi khuẩn, bằng lượng hữu hiệu (ví dụ, theo các phương án nhất định lượng hữu hiệu trong điều trị) của chế phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất BT và, tùy ý, một hoặc nhiều hợp chất kháng sinh, như một hoặc nhiều chất kháng sinh có tác dụng đồng vận, hoặc một hoặc nhiều chất kháng sinh có tác dụng tăng cường, như được mô tả ở đây. Cần hiểu rõ là dựa trên phần mô tả này, các chất kháng sinh nhất định hiện được dự tính để sử dụng trong việc xử lý các kiểu nhiễm nhất định, trong đó các chất kháng sinh này trước đó đã được chuyên gia trong lĩnh vực này xem như là không có hiệu quả chống lại sự nhiễm kiểu này.

Do đó, các phương án nhất định đề cập đến các chế phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất BT để sử dụng làm các chất sát trùng. Chất sát trùng là chất diệt hoặc ngăn chặn sự phát triển của các vi sinh vật, và có thể thường được sử dụng cho mô sống, phân với biệt nhóm chất diệt khuẩn thường được dùng cho các đối tượng vô tri (Goodman and Gilman's "*The Pharmacological Basis of Therapeutics*", Seventh Edition, Gilman et al., editors, 1985, Macmillan Publishing Co., (hereafter, Goodman and Gilman") pp. 959-960). Các ví dụ thông thường về các chất sát trùng là rượu etylic và cồn iot. Các chất diệt vi sinh vật bao gồm các chất sát trùng mà diệt vi sinh vật như các tác nhân gây bệnh là vi sinh vật.

Các phương án nhất định được mô tả ở đây có thể đề cập đến các chế phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất BT và một hoặc nhiều hợp chất kháng sinh (ví dụ, chất kháng sinh tác dụng đồng vận và/hoặc chất kháng sinh tác dụng tăng cường nêu trên). Các chất kháng sinh được biết trong lĩnh vực này và thường bao gồm được chất được làm từ hợp chất được tạo ra bởi một loài vi sinh vật để diệt loài vi sinh vật khác, hoặc là sản phẩm tổng hợp có cấu trúc hóa học và cơ chế tác dụng giống hoặc tương tự, ví dụ, được chất mà phá hủy các vi sinh vật trong hoặc trên cơ

thể của sinh vật sống, bao gồm được chất được dùng khu trú. Trong số các phương án được mô tả ở đây là các phương án trong đó chất kháng sinh có thể thuộc một trong số các nhóm sau: aminoglycosit, carbapenem, cephalosporin, floquinolon, chất kháng sinh glycopeptit, lincosamit (ví dụ, clindamycin), penicilin kháng penicilinaza, và aminopenicilin. Do đó, các chất kháng sinh có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, oxacillin, Piperacillin, cefuroxim, cefotaxim, cefepime, imipenem, aztreonam, streptomycin, tobramycin, tetracyclin, minocyclin, ciprofloxacin, levofloxacin, erythromycin, linezolid, phosphomycin, capreomycin, isoniazid, ansamycin, carbacephem, monobactam, nitrofurantoin, penicilin, quinolon, sulfonamid, Clofazimine, Dapsone, Capreomycin, Cycloserine, Ethambutol, Ethionamide, Isoniazid, Pyrazinamide, Rifampicin, Rifampin, Rifabutin, Rifapentine, Streptomycin, Arsphenamine, Chloramphenicol, Fosfomycin, Fusidic acid, Linezolid, Metronidazole, Mupirocin, Platensimycin, Quinupristin, Dalfopristin, Rifaximin, Thiamphenicol, Tinidazole, aminoglycosit, beta-lactam, penicilin, cephalosporin, carbapenem, fluroquinolon, ketolid, lincosamid, macrolid, oxazolidinon, streptogramin, sulphonamid, tetracyclin, glycyxycyclin, methixilin, vancomycin, nafcillin, gentamicin, ampicillin, chloramphenicol, doxycyclin, tobramycin, amikacin, arbekacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, netilmicin, paromomycin, rhodostreptomycin, streptomycin, tobramycin, apramycin, clindamycin, gatifloxacin, aminopenicilin, và các dược chất khác đã biết trong lĩnh vực này. Tóm tắt về các chất kháng sinh này và các chất kháng sinh hữu dụng trên lâm sàng khác là có sẵn và đã được chuyên gia trong lĩnh vực này biết đến (ví dụ, Washington University School of Medicine, *The Washington Manual of Medical Therapeutics* (32nd Ed.), 2007 Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA; Hauser, AL, *Antibiotic Basics for Clinicians*, 2007 Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA).

Nhóm chất kháng sinh điển hình để sử dụng với một hoặc nhiều hợp chất BT trong các phương án nhất định được mô tả ở đây là nhóm chất kháng sinh aminoglycosit, nhóm này được đề cập trong Edson RS, Terrell CL. *The aminoglycosides*. *Mayo Clin Proc*. 1999 May; 74(5):519-28. Nhóm các chất kháng sinh này ức chế sự phát triển vi khuẩn bằng cách làm suy yếu khả năng tổng hợp

protein của vi khuẩn, qua việc liên kết và làm vô hoạt các phân đơn vị ribosom của vi khuẩn. Ngoài tính chất kìm vi khuẩn này, aminoglycosit còn có tác dụng diệt vi khuẩn bằng cách phá vỡ thành tế bào của vi khuẩn gram âm.

Các chất kháng sinh aminoglycosit bao gồm gentamixin, amikaxin, streptomycin, và các chất khác, và thường được đánh giá là hữu ích để xử lý vi khuẩn gram âm, mycobacteria và các tác nhân gây bệnh là vi sinh vật khác, mặc dù các trường hợp có các chủng kháng đã được báo cáo. Các aminoglycosit không được hấp thụ qua đường tiêu hóa và do đó thường không được đánh giá là có thể dùng làm chế phẩm dùng qua đường miệng. Ví dụ, amikaxin mặc dù thường có tác dụng chống lại các chủng vi khuẩn kháng gentamixin, nhưng thường được dùng trong tĩnh mạch hoặc trong bắp, điều này có thể gây đau đớn cho bệnh nhân. Ngoài ra, độc tính của chất kháng sinh aminoglycosit như amikaxin có thể làm hại thận và/hoặc làm ảnh hưởng đến khả năng nghe.

Ngoại trừ các tính chất này, các phương án nhất định được mô tả ở đây dự tính việc dùng qua đường miệng kết hợp BT/chất kháng sinh tác dụng đồng vận (ví dụ, trong đó chất kháng sinh không cần chỉ giới hạn ở aminoglycosit), ví dụ, để điều trị bề mặt mô biểu mô tại một hoặc nhiều vị trí dọc khoang miệng, đường tiêu hóa/ống tiêu hóa. Theo các phương án nhất định khác, sáng chế cũng dự tính là có thể sử dụng các chế phẩm hoặc các phương pháp ở đây làm các chất diệt khuẩn, sáng chế đề cập đến các chế phẩm diệt, hoặc ngăn chặn sự phát triển của các vi sinh vật trên bề mặt ngoài của đối tượng vô tri.

Cũng trong bản mô tả này, hợp chất BT có thể là chế phẩm chứa bismut hoặc muối bismut và hợp chất chứa thiol (ví dụ, -SH, hoặc sulfhydryl), bao gồm các hợp chất được mô tả trong (bao gồm các phương pháp bào chế chúng) Domenico et al., 1997 *Antimicrob. Agent. Chemother.* 41(8):1697-1703, Domenico et al., 2001 *Antimicrob. Agent. Chemother.* 45(5):1417-1421, và trong các patent Mỹ số RE37,793, 6,248,371, 6,086,921, và 6,380,248; xem thêm, ví dụ, patent Mỹ số 6,582,719. Tuy nhiên, các phương án nhất định không chỉ giới hạn ở đây và có thể còn dự tính các hợp chất BT khác chứa bismut hoặc muối bismut và hợp chất chứa thiol. Hợp chất chứa thiol này có thể chứa một, hai, ba, bốn, năm, sáu hoặc nhiều

nhóm thiol (ví dụ, -SH). Trong các phương án được ưu tiên, hợp chất BT chứa bismut kết hợp với hợp chất chứa thiol qua liên kết ion và/hoặc ở dạng phức chất phối trí, trong khi theo một số phương án khác, bismut có thể được kết hợp với hợp chất chứa thiol qua liên kết cộng hóa trị như có thể được phát hiện trong hợp chất hữu cơ kim loại. Tuy nhiên, các phương án được dự tính nhất định chỉ loại trừ hợp chất BT là hợp chất hữu cơ kim loại như hợp chất trong đó bismut được phát hiện trong liên kết cộng hóa trị với gốc hữu cơ.

Các hợp chất BT đại diện được thể hiện trong Bảng 1:

Bảng 1

Các hợp chất BT đại diện *

1)	CPD 1B-1 Bis-EDT (1:1) $\text{BiC}_2\text{H}_4\text{S}_2$
2)	CPD 1B-2 Bis-EDT (1:1,5) $\text{BiC}_3\text{H}_6\text{S}_3$
3)	CPD 1B-3 Bis-EDT (1:1,5) $\text{BiC}_3\text{H}_6\text{S}_3$
4)	CPD 1C Bis-EDT (1:1,5) $\text{BiC}_3\text{H}_6\text{S}_3$
5)	CPD 2A Bis-Bal (1:1) $\text{BiC}_3\text{H}_6\text{S}_2\text{O}$
6)	CPD 2B Bis-Bal (1:1,5) $\text{BiC}_{4,5}\text{H}_9\text{O}_{1,5}\text{S}_3$
7)	CPD 3A Bis-Pyr (1:1,5) $\text{BiC}_{7,5}\text{H}_6\text{N}_{1,5}\text{O}_{1,5}\text{S}_{1,5}$
8)	CPD 3B Bis-Pyr (1:3) $\text{BiC}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_3$
9)	CPD 4 Bis-Ery (1:1,5) $\text{BiC}_6\text{H}_{12}\text{O}_3\text{S}_3$
10)	CPD 5 Bis-Tol (1:1,5) $\text{BiC}_{10,5}\text{H}_9\text{S}_3$
11)	CPD 6 Bis-BDT (1:1,5) $\text{BiC}_6\text{H}_{12}\text{S}_3$
12)	CPD 7 Bis-PDT (1:1,5) $\text{BiC}_{4,5}\text{H}_9\text{S}_3$

13)	CPD 8-1 Bis-Pyr/BDT (1:1/1)
14)	CPD 8-2 Bis-Pyr/BDT (1:1/0,5)
15)	CPD 9 Bis-2hydroxy, propane thiol (1:3)
16)	CPD 10 Bis-Pyr/Bal (1:1/0,5)
17)	CPD 11 Bis-Pyr/EDT (1:1/0,5)
18)	CPD 12 Bis-Pyr/Tol (1:1/0,5)
19)	CPD 13 Bis-Pyr/PDT (1:1/0,5)
20)	CPD 14 Bis-Pyr/Ery (1:1/0,5)
21)	CPD 15 Bis-EDT/2hydroxy, propan thiol (1:1/1)

* Thể hiện tỷ lệ nguyên tử so với nguyên tử bismut đơn, để so sánh, dựa trên tỷ lệ hợp thức của các chất phản ứng được sử dụng và xu hướng tạo thành các phức chất hóa trị ba với các hợp chất chứa lưu huỳnh đã biết của bismut. Tỷ lệ nguyên tử như được thể hiện có thể không phải là công thức phân tử chính xác đối với tất cả các loại trong các phép điều chế nhất định. Số trong dấu ngoặc đơn là tỷ lệ của bismut với một (hoặc nhiều) hợp chất thiol. (ví dụ Bi:thiol1/thiol2) “CPD”.

Các hợp chất BT để sử dụng trong các phương án nhất định được mô tả ở đây có thể được điều chế theo các quy trình đã có (ví dụ, các patent Mỹ số RE37,793, 6,248,371, 6,086,921, và 6,380,248; Domenico et al., 1997 *Antimicrob. Agent. Chemother.* 41(8):1697-1703, Domenico et al., 2001 *Antimicrob. Agent. Chemother.* 45(5):1417-1421) và theo các phương án nhất định khác các hợp chất BT cũng có thể được điều chế theo các phương pháp được mô tả ở đây. Các phương án được ưu tiên nhất định đề cập đến các phương pháp tổng hợp để điều chế các hợp chất BT, và cụ thể là để tạo ra các hợp chất BT ở dạng vi hạt hầu như là đơn phân tán, trong đó dung dịch nước bismut có tính axit chứa bismut hòa tan ở

nhồng độ ít nhất là 50mM, ít nhất là 100mM, ít nhất là 150mM, ít nhất là 200mM, ít nhất là 250mM, ít nhất là 300mM, ít nhất là 350mM, ít nhất là 400mM, ít nhất là 500mM, ít nhất là 600mM, ít nhất là 700mM, ít nhất là 800mM, ít nhất là 900mM hoặc ít nhất là 1M và không có chất làm hòa tan ưa nước, phân cực hoặc hữu cơ được trộn với etanol để thu được dung dịch etanol thứ nhất, dung dịch này được cho phản ứng với dung dịch etanol thứ hai chứa hợp chất chứa thiol để thu được dung dịch phản ứng, trong đó hợp chất chứa thiol có mặt trong dung dịch phản ứng với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:3 đến 3:1 tính theo bismut, trong điều kiện và thời gian đủ để tạo thành kết tủa, kết tủa này bao gồm các vi hạt chứa hợp chất BT (như các điều kiện về nồng độ, nồng độ dung môi, nhiệt độ, độ pH, điều kiện trộn và/hoặc áp suất, v.v., như được mô tả ở đây và được chuyên gia trong lĩnh vực này hiểu rõ dựa trên phần mô tả này).

Do đó, các BT đại diện bao gồm hợp chất 1B-1, Bis-EDT (bismut-1,2-ethan dithiol, các chất phản ứng với tỷ lệ 1:1); hợp chất 1B-2, Bis-EDT (1:1,5); hợp chất 1B-3, Bis-EDT (1:1,5); hợp chất 1C, Bis-EDT (dạng điều chế Bi tan, 1:1,5); hợp chất 2A, Bis-Bal (bismut-British anti-Lewisite (bismut-dimercaprol, bismut-2,3-dimercaptopropanol), 1:1); hợp chất 2B, Bis-Bal (1:1,5); hợp chất 3A Bis-Pyr (bismut-pyrithion, 1:1,5); hợp chất 3B Bis-Pyr (1:3); hợp chất 4, Bis-Ery (bismut-dithioerythritol, 1:1,5); hợp chất 5, Bis-Tol (bismut-3,4-dimercaptotoluen, 1:1,5); hợp chất 6, Bis-BDT (bismut-2,3-butandithiol, 1:1,5); hợp chất 7, Bis-PDT (bismut-1,3-propandithiol, 1:1,5); hợp chất 8-1 Bis-Pyr/BDT (1:1/1); hợp chất 8-2, Bis-Pyr/BDT (1:1/0,5); hợp chất 9, Bis-2-hydroxy, propan thiol (bismut-1-mercapto-2-propanol, 1:3); hợp chất 10, Bis-Pyr/Bal (1:1/0,5); hợp chất 11, Bis-Pyr/EDT (1:1/0,5); hợp chất 12 Bis-Pyr/Tol (1:1/0,5); hợp chất 13, Bis-Pyr/PDT (1:1/0,5); hợp chất 14 Bis-Pyr/Ery (1:1/0,5); hợp chất 15, Bis-EDT/2-hydroxy, propan thiol (1:1/1) (xem, ví dụ, Bảng 1).

Không giới hạn bởi giả thuyết bất kỳ, phương pháp theo sáng chế để điều chế hợp chất BT mà trong các phương án nhất định có thể bao gồm việc điều chế hoặc thu dung dịch lỏng dạng nước có tính axit chứa bismut như dung dịch axit nitric trong nước chứa bismut nitrat, được cho là có thể tạo ra một cách mong muốn

các chế phẩm chứa các hợp chất BT trong đó các chế phẩm này có một hoặc nhiều tính chất mong muốn, bao gồm dễ sản xuất ở quy mô lớn, độ tinh khiết, độ đồng đều và tính nhất quán của sản phẩm cao (bao gồm tính đồng đều về kích cỡ hạt), hoặc các tính chất khác hữu ích để điều chế và/hoặc sử dụng các chế phẩm dùng khu trú theo sáng chế.

Theo các phương án cụ thể, đã phát hiện được là các chế phẩm BT, được điều chế theo các phương pháp lần đầu tiên được mô tả ở đây, có độ đồng nhất cao về hình thức của chúng như là huyền phù hầu như là đơn phân tán của các vi hạt có đường kính trung bình thể tích (VMD) theo các phương án được ưu tiên nhất định là nằm trong khoảng từ 0,4 μ m đến 5 μ m. Số đo kích cỡ hạt có thể được đề cập như là đường kính trung bình thể tích (volumetric mean diameter: VMD), đường kính trung bình khối lượng (mass median diameter: MMD), hoặc đường kính khí động trung bình khối lượng (mass median aerodynamic diameter: MMAD). Các phép đo này có thể được thực hiện, ví dụ, bằng cách va chạm (MMD và MMAD) hoặc bằng cách dùng tia laze (VMD). Đối với các hạt lỏng, VMD, MMD và MMAD có thể là giống nhau nếu điều kiện môi trường được duy trì, ví dụ, độ ẩm tiêu chuẩn. Tuy nhiên nếu độ ẩm không được duy trì thì việc xác định MMD và MMAD sẽ nhỏ hơn VMD do sự tách nước trong phép đo dùng máy va chạm. Trong bản mô tả này, các phép đo VMD, MMD và MMAD được xem như là được thực hiện trong các điều kiện chuẩn sao cho số đo VMD, MMD và MMAD là tương thích với nhau. Tương tự, kích cỡ hạt bột khô theo MMD, và MMAD cũng được xem như là tương thích với nhau.

Như được mô tả ở đây, các phương án được ưu tiên đề cập đến huyền phù hầu như là đơn phân tán của các vi hạt chứa BT. Sự tạo ra kích cỡ hạt BT xác định với độ lệch chuẩn hình học (geometric standard deviation: GSD) giới hạn có thể, ví dụ, tối ưu hóa sự lắng BT, tối ưu hóa khả năng đến được các vị trí đích mong muốn trong hoặc trên bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo, và/hoặc tối ưu hóa khả năng dung nạp của đối tượng dùng các vi hạt BT này. GSD hẹp hạn chế số hạt ngoài khoảng kích cỡ VMD hoặc MMAD mong muốn.

Theo một phương án, huyền phù dạng lỏng hoặc dạng sol khí của các vi hạt chứa một hoặc nhiều hợp chất BT theo sáng chế được tạo ra có VMD nằm trong khoảng từ 0,5micron đến 5micron. Theo phương án khác, huyền phù dạng lỏng hoặc dạng sol khí này có VMD hoặc MMAD nằm trong khoảng từ 0,7micron đến 4,0micron. Theo phương án khác, huyền phù dạng lỏng hoặc dạng sol khí này có VMD hoặc MMAD nằm trong khoảng từ 1,0micron đến 3,0micron. Theo các phương án được ưu tiên nhất định khác, huyền phù dạng lỏng được tạo ra chứa một hoặc nhiều hạt hợp chất BT có VMD nằm trong khoảng từ 0,1 đến 5,0micron, hoặc nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 hoặc 0,9micron đến 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 hoặc khoảng 8,0micron, hạt này chứa hợp chất BT được điều chế theo sáng chế.

Do đó, theo các phương án được ưu tiên nhất định, dạng điều chế BT được mô tả lần đầu ở đây là “hầu như” đơn phân tán, ví dụ, chế phẩm BT chứa hợp chất BT ở dạng vi hạt trong đó “hầu như” tất cả các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích (VMD) nằm trong khoảng cụ thể (ví dụ, từ khoảng 0,4 μ m đến 5 μ m), bao gồm các chế phẩm trong đó ít nhất là 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, hoặc 94%, tốt hơn là ít nhất là 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều hơn các hạt có VMD nằm trong khoảng kích cỡ nêu trên.

Các tính chất này và các tính chất liên quan của các chế phẩm BT được điều chế theo các phương pháp tổng hợp được mô tả ở đây có các ưu điểm chưa từng thấy so với các BT đã được mô tả, bao gồm chi phí sản xuất thấp và dễ sản xuất, và độ đồng đều trong chế phẩm có thể cho phép mô tả chế phẩm theo cách mà tạo điều kiện thuận lợi cho yêu cầu điều chỉnh theo một hoặc nhiều tiêu chuẩn dược lý, bào chế và tiêu chuẩn mỹ phẩm.

Ngoài ra hoặc cách khác, các vi hạt BT hầu như là đơn phân tán được mô tả ở đây có thể được sản xuất một cách thuận tiện mà không cần bước micron hóa, tức là, không cần bước nghiền tốn chi phí và lao động hoặc bước xử lý lỏng siêu tới hạn hoặc thiết bị và quy trình khác mà thường được dùng để tạo ra các vi hạt (ví dụ, Martin et al. 2008 *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60(3):339; Moribe et al., 2008 *Adv. Drug*

Deliv. Rev. 60(3):328; Cape et al., 2008 *Pharm. Res.* 25(9):1967; Rasenack et al. 2004 *Pharm. Dev. Technol.* 9(1):1-13). Ở đây, các phương án theo sáng chế có tác dụng có lợi của các dạng điều chế vi hạt hầu như là đồng đều, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các tính chất hòa tan hầu như đồng đều và gia tăng, tính thích hợp đối với các dạng sử dụng mong muốn như dạng sử dụng qua đường miệng, hít hoặc dạng dùng khu trú cho vết thương ngoài da/da, tính sinh khả dụng gia tăng và các tính chất có lợi khác.

Huyền phù vi hạt hợp chất BT có thể được dùng ở dạng các chế phẩm nước, như các huyền phù hoặc các dung dịch trong nước cũng như các dung môi hữu cơ bao gồm các chất đẩy hydrocarbon được halogen hóa, như các bột khô, hoặc ở các dạng khác như được mô tả chi tiết dưới đây, bao gồm các dạng điều chế chứa các chất làm ẩm, các chất hoạt động bề mặt, dầu khoáng hoặc các thành phần khác hoặc các chất phụ gia mà chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ, ví dụ, để duy trì các vi hạt riêng rẽ trong huyền phù. Các chế phẩm nước có thể được sol khí hóa bằng cách sử dụng ống phun lỏng, ví dụ, phun thủy lực hoặc phun siêu âm. Các hệ thống trên cơ sở chất đẩy có thể sử dụng các ống định lượng được tạo áp thích hợp. Bột khô có thể sử dụng các dụng cụ phân tán bột khô, dụng cụ này có khả năng phân tán các vi hạt chứa BT một cách hữu hiệu. Kích cỡ hạt và sự phân bố mong muốn có thể thu được bằng cách chọn dụng cụ thích hợp.

Như được lưu ý trên đây, theo các phương án nhất định, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp để sản xuất chế phẩm bismut-thiol (BT) chứa đa số các vi hạt chứa hợp chất BT, hầu như tất cả các vi hạt này đều có đường kính trung bình thể tích (VMD) nằm trong khoảng từ 0,1 đến 8micron, và theo các phương án được ưu tiên nhất định, nằm trong khoảng từ 0,4micron đến 5micron.

Theo các thuật ngữ chung, phương pháp này bao gồm các bước (a) trộn, trong điều kiện và thời gian đủ để thu được dung dịch hầu như không có chất kết tủa rắn, (i) dung dịch nước axit chứa muối bismut với nồng độ bismut ít nhất là 50mM và không có chất hòa tan ưa nước, phân cực hoặc hữu cơ, với (ii) ethanol với lượng đủ để thu được hỗn hợp chứa ethanol với lượng ít nhất là khoảng 5%, 10%, 15%, 20%, 25% hoặc 30%, và tốt hơn là khoảng 25% theo thể tích; và (b) bổ sung

vào hỗn hợp thu được ở bước (a) dung dịch etanol chứa hợp chất chứa thiol để thu được dung dịch phản ứng, trong đó hợp chất chứa thiol có mặt trong dung dịch phản ứng với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:3 đến 3:1 tính theo bismut, trong điều kiện và thời gian đủ để tạo thành kết tủa chứa hợp chất BT.

Theo các phương án được ưu tiên nhất định, muối bismut salt có thể là $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, nhưng cần hiểu rõ theo sáng chế là bismut cũng có thể được tạo ra ở các dạng khác. Theo các phương án nhất định nồng độ bismut trong dung dịch nước axit có thể ít nhất là 100mM, ít nhất là 150mM, ít nhất là 200mM, ít nhất là 250mM, ít nhất là 300mM, ít nhất là 350mM, ít nhất là 400mM, ít nhất là 500mM, ít nhất là 600mM, ít nhất là 700mM, ít nhất là 800mM, ít nhất là 900mM hoặc ít nhất là 1M. Theo các phương án nhất định, dung dịch nước axit chứa bismut với lượng ít nhất là 5%, 10%, 15%, 20%, 22% hoặc 22,5% tính theo trọng lượng. Theo các phương án nhất định, dung dịch nước axit này có thể chứa axit nitric với lượng ít nhất là 5% hoặc cao hơn, tính theo trọng lượng, và theo các phương án nhất định khác, dung dịch nước axit này có thể chứa axit nitric với lượng ít nhất là 0,5%, ít nhất là 1%, ít nhất là 1,5%, ít nhất là 2%, ít nhất là 2,5%, ít nhất là 3%, ít nhất là 3,5%, ít nhất là 4%, ít nhất là 4,5% hoặc ít nhất là 5%, tính theo trọng lượng.

Hợp chất chứa thiol có thể là hợp chất chứa thiol bất kỳ như được mô tả ở đây, và theo các phương án nhất định có thể bao gồm một hoặc nhiều hợp chất trong số các hợp chất 1,2-etan dithiol, 2,3-dimercaptopropanol, pyrithion, dithioerythritol, 3,4-dimercaptotoluen, 2,3-butandithiol, 1,3-propandithiol, 2-hydroxypropan thiol, 1-mercapto-2-propanol, dithioerythritol và dithiothreitol. Các hợp chất chứa thiol đại diện khác bao gồm axit alpha-lipoic, metanthiol (CH_3SH [m-mercaptan]), etanthiol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{SH}$ [e-mercaptan]), 1-propanthiol ($\text{C}_3\text{H}_7\text{SH}$ [n-Pmercaptan]), 2-Propanthiol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{SH})\text{CH}_3$ [2C₃mercaptan]), butanthiol ($\text{C}_4\text{H}_9\text{SH}$ [n-butylmercaptan]), tert-butyl mercaptan ($\text{C}(\text{CH}_3)_3\text{SH}$ [t-butylmercaptan]), pentanthiol ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{SH}$ [pentylmercaptan]), coenzym A, lipoamit, glutathion, xystein, xystin, 2-mercaptoetanol, dithiothreitol, dithioerythritol, 2-mercaptoindol, transglutaminaza và hợp chất thiol bất kỳ trong số các hợp chất thiol sau đây của Sigma-Aldrich (St. Louis, MO): (11-

mercaptoundexyl)hexa(etylen glycol), (11-mercaptoundexyl)tetra(etylen glycol), các hạt nano vàng được tạo nhóm chức (11-mercaptoundexyl)tetra(etylen glycol), 1,1',4',1''-terphenyl-4-thiol, 1,11-undecandithiol, 1,16-hexadecandithiol, 1,2-etandithiol loại kỹ thuật, 1,3-propandithiol, 1,4-benzendimetanthiol, 1,4-butandithiol, 1,4-butandithiol diaxetat, 1,5-pentandithiol, 1,6-hexandithiol, 1,8-octandithiol, 1,9-nonandithiol, adamantanthiol, 1-butanthiol, 1-decanthiol, 1-dodecanthiol, 1-heptanthiol, 1-heptanthiol purum, 1-hexadecanthiol, 1-hexanthiol, 1-mercapto-(trietylen glycol), các hạt nano vàng được tạo nhóm chức 1-mercapto-(trietylen glycol) metyl ete, 1-mercapto-2-propanol, 1-nonanthiol, 1-octadecanthiol, 1-octanthiol, 1-octanthiol, 1-pentadecanthiol, 1-pentanthiol, 1-propanthiol, 1-tetradecanthiol, 1-tetradecanthiol purum, 1-undecanthiol, 11-(1*H*-pyrrol-1-yl)undecan-1-thiol, 11-amino-1-undecanthiol hydroclorua, 11-bromo-1-undecanthiol, 11-mercapto-1-undecanol, 11-mercapto-1-undecanol, axit 11-mercaptoundecanoic, axit 11-mercaptoundecanoic, 11-mercaptoundexyl trifloaxetat, axit 11-mercaptoundexylphosphoric, axit 12-mercaptododecanoic, axit 12-mercaptododecanoic, axit 15-mercaptopentadecanoic, axit 16-mercaptohexadecanoic, axit 16-mercaptohexadecanoic, 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perflodecanthiol, 2,2'-(etylendioxy)dietanthiol, 2,3-butandithiol, 2-butanthiol, 2-ethylhexanthiol, 2-metyl-1-propanthiol, 2-metyl-2-propanthiol, 2-phenyletanthiol, 3,3,4,4,5,5,6,6,6-nonaflor-1-hexanethiol purum, 3-(dimetoxymetylsilyl)-1-propanthiol, 3-clo-1-propanthiol, 3-mercapto-1-propanol, 3-mercapto-2-butanol, 3-mercapto-*N*-nonylpropionamit, axit 3-mercaptopropionic, silicagel được tạo nhóm chức 3-mercaptopropyl, 3-metyl-1-butanthiol, 4,4'-bis(mercaptometyl)-biphenyl, 4,4'-dimercaptostilben, rượu 4-(6-mercaptohexyloxy)benzyl, 4-xyano-1-butanthiol, 4-mercapto-1-butanol, 6-(feroxenyl)hexanthiol, 6-mercapto-1-hexanol, axit 6-mercaptohexanoic, 8-mercapto-1-octanol, axit 8-mercaptooctanoic, 9-mercapto-1-nonanol, biphenyl-4,4'-dithiol, butyl 3-mercaptopropionat, đồng(I) 1-butanthiolat, xyclohexanthiol, xyclopentanthiol, các hạt nano bạc được tạo nhóm chức decanthiol, các hạt nano vàng được tạo nhóm chức dodecanthiol, các vi hạt bạc được tạo nhóm chức dodecanthiol, hexa(etylen glycol)mono-11-(axetylthio)undexyl ete, axit mercaptosuccinic, metyl 3-mercaptopropionat,

nanoTether BPA-HH, NanoThinks™ 18, NanoThinks™ 8, NanoThinks™ ACID11, NanoThinks™ ACID16, NanoThinks™ ALCO11, NanoThinks™ THIO8, các hạt nano vàng được tạo nhóm chức octanthiol, PEG dithiol có trọng lượng phân tử trung bình là 8.000, PEG dithiol có trọng lượng phân tử trung bình là 1.500, PEG dithiol có trọng lượng phân tử trung bình là 3.400, *S*-(11-bromoundexyl)thioaxetat, *S*-(4-xyanobutyl)thioaxetat, thiophenol, trietylen glycol mono-11-mercaptoundexyl ete, trimetylolpropan tris(3-mercaptopropionat), [11-(metylcarbonylthio)undexyl]-tetra(etylen glycol), *m*-carboran-9-thiol, *p*-terphenyl-4,4''-dithiol, *tert*-dodexylmercaptan, và *tert*-nonyl mercaptan.

Các điều kiện phản ứng đại diện bao gồm nhiệt độ, độ pH, thời gian phản ứng, và việc sử dụng cánh khuấy hoặc máy lắc để hòa tan các chất tan và các quy trình để thu gom và rửa kết tủa được mô tả ở đây và sử dụng các kỹ thuật được biết đến nói chung trong lĩnh vực này.

Không giống như các phương pháp được mô tả trước đây để sản xuất các hợp chất BT, theo phương pháp theo sáng chế để điều chế BT, các sản phẩm BT được tạo ra ở dạng các huyền phù vi hạn có hầu như tất cả các vi hạt có VMD nằm trong khoảng từ 0,4 đến 5micron theo các phương án được ưu tiên nhất định, và thường nằm trong khoảng từ 0,1micron đến 8micron theo các phương án nhất định khác. Hơn nữa không giống như các phương pháp trước đây, theo các phương án của sáng chế, bismut được tạo ra trong dung dịch nước axit chứa muối bismut ở nồng độ ít nhất là nằm trong khoảng từ 50mM đến 1M, và axit nitric với lượng ít nhất là khoảng từ 0,5% đến 5% (trọng lượng/trọng lượng), và tốt hơn là dưới 5% (trọng lượng/trọng lượng), và không chứa chất làm hòa tan ưa nước, phân cực hoặc hữu cơ.

Phương pháp theo sáng chế có ưu điểm bất ngờ so với các phương pháp nói chung đã được chấp nhận trong lĩnh vực này ở chỗ là bismut không tan trong nước ở nồng độ 50μM (ví dụ, U.S. RE37793), bismut không ổn định trong nước (ví dụ, Kuvshinova et al., 2009 *Russ. J Inorg. Chem* 54(11):1816), và bismut không ổn định thậm chí trong dung dịch axit nitric trừ khi có mặt chất làm hòa tan ưa nước, phân cực hoặc hữu cơ. Ví dụ, trong tất cả các mô tả cuối cùng về các phương pháp

điều chế BT (ví dụ, Domenico et al., 1997 *Antimicrob. Agents. Chemother.* 41:1697; patent Mỹ số 6,380,248; RE37793; 6,248,371), cần phải có chất làm hòa tan ưa nước propylen glycol để hòa tan bismut nitrat, và nồng độ bismut của các dung dịch được điều chế cho phản ứng với thiol là dưới 15mM, nhờ đó hạn chế các phương thức sản xuất có sẵn đối với các hợp chất BT.

Ngược lại, theo sáng chế, không cần chất làm hòa tan ưa nước, phân cực hoặc hữu cơ để hòa tan bismut mà vẫn đạt được nồng độ cao một cách bất ngờ. Các chất làm hòa tan ưa nước, phân cực hoặc hữu cơ bao gồm propylen glycol (PG) và etylen glycol (EG) và có thể còn bao gồm một số lớn các chất làm tăng độ tan đã biết, bao gồm các dung môi phân cực như dioxan và dimetylsulfoxit (DMSO), các polyol (bao gồm, ví dụ, PG và EG và còn bao gồm polyetylen glycol (PEG), polypropylenglycol (PPG), pentaerythritol và các chất khác), các rượu nhiều lần như glyxerol và manitol, và các chất khác. Các chất hữu cơ có thể trộn lẫn với nước có độ phân cực cao khác bao gồm dimetylsulfoxit (DMSO), dimetylformamit (DMF) và NMP (N-metyl-2-pyrrolidon).

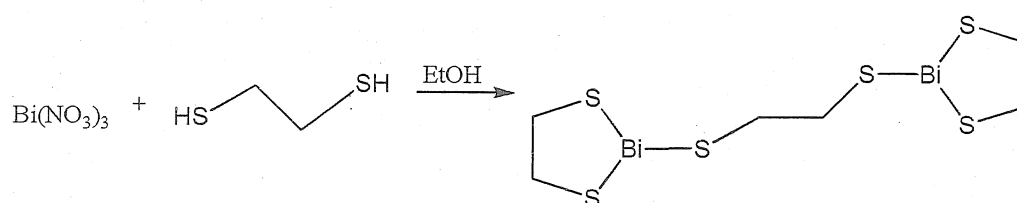
Do đó, chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng các dung môi, bao gồm các dung môi thường được dùng làm chất làm hòa tan ưa nước, phân cực hoặc hữu cơ nêu trên, có thể được chọn, ví dụ, dựa trên cơ sở trị số phân hạng độ phân cực/khả năng phân cực của dung môi (solvent polarity/ polarizability: SPP) sử dụng hệ thống của Catalan *et al.* (ví dụ, 1995 *Liebigs Ann.* 241; xem thêm Catalan, 2001 *In: Handbook of Solvents*, Wypych (Ed.), Andrew Publ., NY, và các tài liệu viện dẫn trong đó), theo đó, ví dụ, nước có trị số SPP là 0,962, toluen có trị số SPP là 0,655, và 2-propanol có trị số SPP là 0,848. Các phương pháp để xác định trị số SPP của dung môi dựa trên cơ sở các phép đo bức xạ tử ngoại của cặp đầu dò/đồng cấu 2-N,N-dimetyl-7-nitrofloren/ 2-flo-7-nitrofloren đã được mô tả (Catalan *et al.*, 1995).

Các dung môi có trị số SPP mong muốn (các dung môi một thành phần tinh khiết hoặc các hỗn hợp dung môi của hai, ba, bốn hoặc nhiều dung môi; đối với khả năng pha trộn dung môi, xem, ví dụ, Godfrey 1972 *Chem. Technol.* 2:359) dựa trên các tính chất hòa tan của chế phẩm BT cụ thể có thể được xác định một cách dễ

dàng bởi chuyên gia trọng lĩnh vực này xét trên phần bộc lộ này, mặc dù như lưu ý trên đây, theo các phương án được ưu tiên nhất định đề cập đến các bước của phương pháp tổng hợp theo sáng chế, không cần chất làm hòa tan ưa nước, phân cực hoặc hữu cơ để hòa tan bismut.

Các thông số độ tan cũng có thể bao gồm thông số tương tác C, thông số độ tan Hildebrand d, hoặc các thông số độ tan một phần (Hansen): δ_p , δ_h và δ_d , lần lượt mô tả độ phân cực của dung môi, khả năng liên kết hydro và khả năng tương tác lực phân tán. Theo các phương án nhất định, trị số cao nhất đối với thông số độ tan mô tả dung môi hoặc hệ đồng dung môi trong đó muối bismut chứa bismut sẽ hòa tan có thể tạo ra hạn chế đối với dung dịch nước chứa muối bismut, ví dụ, theo phương pháp theo sáng chế để điều chế chế phẩm BT vi hạt. Ví dụ, các trị số δ_h cao hơn sẽ có khả năng liên kết hydro cao hơn và do đó sẽ có ái lực đối với các phân tử dung môi như nước lớn hơn. Do đó, trị số δ_h cao tối đa quan sát được trong dung môi có thể được ưu tiên trong các trường hợp cần có môi trường ưa nước hơn.

Bằng cách ví dụ không giới hạn, BisEDT có cấu trúc được thể hiện sau đây trong công thức I có thể được điều chế theo sơ đồ phản ứng sau:



(I)

Ngắn gọn là, và ở dạng ví dụ minh họa không giới hạn, bổ sung từ từ 0,331L (khoảng 0,575mol) dung dịch bismut có tính axit trong nước như dung dịch $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ (ví dụ, $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ 43% (trọng lượng/trọng lượng), axit nitric 5% (trọng lượng/trọng lượng), nước 52% (trọng lượng/trọng lượng), có bán trên thị trường của Shepherd Chemical Co., Cincinnati, OH) vào lượng dư (11,4L) dung dịch HNO_3 5% ở nhiệt độ phòng cùng với việc khuấy, sau đó bổ sung từ từ ethanol tuyệt đối (4L). Dung dịch ethanol (1,56L) của hợp chất thiol như 1,2-ethanedithiol [$\sim 0,55\text{M}$] có thể được điều chế riêng biệt bằng cách bổ sung 72,19mL (0,863mol)

1,2-ethanedithiol vào 1,5L ethanol tuyệt đối sử dụng ống tiêm 60mL, và sau đó khuấy trong năm phút. 1,2-ethanedithiol (CAS 540-63-6) và các hợp chất thiol khác có bán trên thị trường của, ví dụ, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. Sau đó dung dịch ethanol của hợp chất thiol hợp chất có thể được bổ sung từ từ vào dung dịch nước $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 / \text{HNO}_3$ đồng thời khuấy qua đêm để tạo thành dung dịch phản ứng. Hợp chất chứa thiol có thể có mặt trong dung dịch phản ứng, theo các phương án được ưu tiên nhất định, ở tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:3 đến 3:1 tính theo bismut. Sản phẩm được tạo thành được để lắng thành kết tủa chứa các vi hạt như được mô tả trên đây, các vi hạt này sau đó được thu gom bằng cách lọc và rửa lần lượt bằng ethanol, nước và axeton để thu được BisEDT ở dạng chất rắn dạng bột vô định hình màu vàng. Sản phẩm thô này có thể được tái hòa tan trong ethanol tuyệt đối cùng với việc khuấy, sau đó lọc và rửa lần lượt bằng ethanol vài lần sau đó bằng axeton vài lần. Bột được rửa có thể được nghiền trong dung dịch NaOH 1M (500mL), lọc và rửa lần lượt bằng nước, ethanol và axeton để thu được các vi hạt BisEDT tinh khiết.

Theo giả thuyết không giới hạn, bismut ức chế khả năng sản xuất cơ chất polyme ngoại bào (extracellular polymeric substances: EPS) của vi khuẩn như các exopolysaccharit của vi khuẩn, và việc ức chế này dẫn đến sự tạo thành màng sinh học bị suy giảm. Vi khuẩn được cho là sử dụng EPS giống như keo để dính kết màng sinh học. Tùy thuộc vào bản chất của sự nhiễm, sự tạo thành màng sinh học và sự tạo ra EPS có thể góp phần vào khả năng gây bệnh của vi khuẩn như sự can thiệp vào quá trình làm lành vết thương. Tuy nhiên, chỉ mình bismut là không có tác dụng điều trị như là chất can thiệp vào, và thay vào đó nó thường được dùng dưới dạng một phần của phức hợp như BT. Các bismut-thiol (BT) là họ chế phẩm chứa các hợp chất thu được từ quá trình chelat hóa giữa bismut và hợp chất thiol, và cải thiện rất tốt hiệu quả điều trị kháng vi sinh vật của bismut. BT có tác dụng chống nhiễm, chống màng sinh học, và điều biến miễn dịch rõ rệt. Các bismut thiol có hiệu quả chống lại phổ rộng các vi sinh vật, và thường không bị tác động bởi sự kháng chất kháng sinh. BT ngăn ngừa sự tạo thành màng sinh học ở nồng độ khá thấp (dưới nồng độ ức chế), ngăn ngừa nhiều đặc tính gây bệnh của các tác nhân gây bệnh ở vết thương nói chung ở nồng độ dưới nồng độ ức chế, có thể ngăn ngừa

sốc nhiễm khuẩn ở các mô hình động vật, và có thể có tác dụng đồng vận với nhiều chất kháng sinh.

Như được mô tả ở đây, tác dụng đồng vận trong các tác dụng kháng khuẩn của một hoặc nhiều BT cụ thể khi kết hợp với một hoặc nhiều hợp chất kháng sinh cụ thể là không dễ đoán trước dựa trên cơ sở các profin tác dụng của chất kháng sinh và BT riêng rẽ chống lại vi khuẩn cụ thể, nhưng bất ngờ là tác dụng này có thể do sự chọn lọc các kết hợp BT-chất kháng sinh cụ thể đối với tập hợp vi khuẩn cụ thể, bao gồm việc xác định liệu vi khuẩn gram âm hoặc vi khuẩn gram dương (hoặc cả hai) có mặt hay không. Ví dụ, như được mô tả ở đây, các chất kháng sinh mà có tác dụng đồng vận với các BT nhất định có thể bao gồm một hoặc nhiều chất trong số amikacin, ampicillin, aztreonam, cefazolin, cefepime, chloramphenicol, ciprofloxacin, clindamycin (hoặc các chất kháng sinh lincosamit khác), daptomycin (Cubicin®), doxyxylin, gatifloxacin, gentamicin, imipenim, levofloxacin, linezolid (Zyvox®), minoxycilin, nafcillin, paromomycin, rifampin, sulphamethoxazol, tetracyclin, tobramycin và vancomycin. Các nghiên cứu in vitro đã thể hiện là, ví dụ, MRSA là kém hoặc không mẫn cảm với từng chất gentamicin, cefazolin, cefepime, sulphamethoxazol, imipenim hoặc levofloxacin, nhưng có độ nhạy rõ rệt với chất bất kỳ trong số các chất kháng sinh này nếu nó được tiếp xúc với chất kháng sinh với sự có mặt của hợp chất BT BisEDT. Do đó các phương án nhất định theo sáng chế đề cập một cách tuyệt đối đến các chế phẩm và/hoặc các phương pháp trong đó có chứa kết hợp của hợp chất BT và một hoặc nhiều chất kháng sinh được chọn từ amikacin, ampicillin, cefazolin, cefepime, chloramphenicol, ciprofloxacin, clindamycin (hoặc chất kháng sinh lincosamit khác), daptomycin (Cubicin®), doxyxylin, gatifloxacin, gentamicin, imipenim, levofloxacin, linezolid (Zyvox®), minoxycilin, nafcillin, paromomycin, rifampin, sulphamethoxazol, tobramycin và vancomycin, trong khi các phương án nhất định khác đề cập đến các chế phẩm và/hoặc các phương pháp trong đó có chứa kết hợp của hợp chất BT và một hoặc nhiều chất kháng sinh mà được loại trừ một cách tuyệt đối một hoặc nhiều chất kháng sinh được chọn từ amikacin, ampicillin, cefazolin, cefepime, chloramphenicol, ciprofloxacin, clindamycin (hoặc các lincosamit khác), daptomycin (Cubicin®), doxyxylin, gatifloxacin, gentamicin,

imipenim, levofloxacin, linezolid (Zyvox®), minoxycilin, nafcilin, paromomycin, rifampin, sulphamethoxazol, tobramycin và vancomycin. Trong trường hợp này cần lưu ý là gentamixin và tobramycin thuộc nhóm chất kháng sinh aminoglycosit. Cũng được loại trừ một cách tuyệt đối khỏi các phương án được dự tính nhất định là các chế phẩm và phương pháp nhất định được mô tả trong Domenico et al., 2001 *Agents Chemother.* 45:1417-1421; Domenico et al., 2000 *Infect. Med.* 17:123-127; Domenico et al., 2003 *Res. Adv. In Antimicrob. Agents & Chemother.* 3:79-85; Domenico et al., 1997 *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(8):1697-1703; Domenico et al., 1999 *Infect. Immun.* 67:664-669; Huang et al. 1999 *J Antimicrob. Chemother.* 44:601-605; Veloir et al., 2003 *J Antimicrob. Chemother.* 52:915-919; Wu et al., 2002 *Am J Respir Cell Mol Biol.* 26:731-738; Halwani et al., 2008 *Int. J Pharmaceut.* 358:278; Halwani et al., 2009 *Int. J. Pharmaceut.* 373:141-146; trong đó cần lưu ý là không công bố nào trong số các công bố này chỉ ra hoặc gợi ý đến các chế phẩm BT vi hạt đơn phân tán theo sáng chế.

Do đó và như được mô tả ở đây, theo các phương án được ưu tiên nhất định, sáng chế đề xuất các chế phẩm và phương pháp để xử lý thực vật, động vật hoặc con người, hoặc đối tượng sản xuất, bằng chế phẩm chứa vi hạt BT theo sáng chế và tùy ý và theo các phương án nhất định khác, còn chứa chất kháng sinh có tác dụng đồng vận và/hoặc tăng cường. Chuyên gia trong lĩnh vực này dựa trên phần mô tả này sẽ hiểu rõ đối tượng hoặc trường hợp thuộc nông nghiệp, lâm sàng, thương mại, công nghiệp, sản xuất, trong gia đình cần việc xử lý này, tiêu chuẩn được thiết lập trong lĩnh vực y tế, bao gồm, không kể những yếu tố khác, ví dụ, các bệnh do phẫu thuật, phẫu thuật trong quân đội, các bệnh ngoài da, chấn thương, các bệnh lão khoa, các bệnh tim mạch, các bệnh chuyển hóa (ví dụ, tiểu đường, béo phì, v.v.), bệnh nhiễm và bệnh viêm (bao gồm các lớp lót biểu mô của đường hô hấp hoặc đường tiêu hóa, hoặc các bề mặt mô biểu mô khác như các mô tuyến), và các chuyên ngành và các phân ngành y tế có liên quan khác.

Các chế phẩm được ưu tiên để xử lý sự nhiễm vi sinh vật trên hoặc trong bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo để sử dụng theo các phương án của sáng chế có thể bao gồm, theo các phương án nhất định, các chế phẩm chứa các hợp chất bismut-thiol

(BT) như được mô tả ở đây, và các chế phẩm này còn chứa các hợp chất khác đã biết trong lĩnh vực này như một hoặc nhiều hợp chất kháng sinh như được mô tả ở đây. Các hợp chất BT và các phương pháp điều chế chúng được mô tả ở đây và còn được mô tả, ví dụ, trong Domenico et al. (1997 *Antimicrob. Agent. Chemother.* 41(8):1697-1703; 2001 *Antimicrob. Agent. Chemother.* 45(5):1417-1421) và trong các patent Mỹ số RE37,793, 6,248,371, 6,086,921, và 6,380,248. Như cũng được lưu ý trên đây, các hợp chất BT được ưu tiên nhất định là các hợp chất mà chứa bismut hoặc muối bismut được liên kết ion với, hoặc trong phức hợp phối trí với, hợp chất chứa thiol, như chế phẩm chứa bismut được tạo chelat với hợp chất chứa thiol, và các hợp chất BT được ưu tiên nhất định khác là các hợp chất mà chứa bismut hoặc muối bismut liên kết cộng hóa trị với hợp chất chứa thiol. Cũng được ưu tiên là các chế phẩm BT vi hạt hầu như là đơn phân tán như được mô tả ở đây. Từ các nỗ lực để xử lý sự nhiễm vi khuẩn hoặc từ các mô tả trước đây trong các trường hợp khác về các hợp chất bất kỳ mô tả lần đầu ở đây là có ứng dụng trong các chế phẩm và các phương pháp thúc đẩy việc xử lý được mô tả ở đây đối với các bề mặt tự nhiên và/hoặc nhân tạo không thể dự đoán được là các phương pháp theo sáng chế sử dụng các hợp chất này sẽ có các tác dụng có lợi được mô tả ở đây.

Theo các phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất các phương pháp xử lý bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo, bao gồm việc cấp cho bề mặt này ít nhất là một hợp chất BT vi hạt như được mô tả ở đây. Theo các phương án nhất định, phương pháp này còn bao gồm việc cấp, đồng thời hoặc liên tiếp và theo thứ tự bất kỳ, ít nhất là một hợp chất kháng sinh, chất kháng sinh này trong các phương án được ưu tiên nhất định có thể là chất kháng sinh tác dụng đồng vận như được mô tả ở đây, và chất kháng sinh này trong các phương án được ưu tiên nhất định khác có thể là chất kháng sinh tác dụng tăng cường như được mô tả ở đây. Hợp chất kháng sinh này có thể là chất kháng sinh aminoglycosit, chất kháng sinh carbapenem, chất kháng sinh cephalosporin, chất kháng sinh floquinolon, chất kháng sinh glycopeptit, chất kháng sinh lincosamit, chất kháng sinh penixilin kháng penixilinaza, hoặc chất kháng sinh aminopenixilin. Các chất kháng sinh hữu dụng trên lâm sàng được bàn luận đầu đó trong đây và còn được mô tả trong, ví dụ, Washington University School of Medicine, *The Washington Manual of Medical Therapeutics* (32nd Ed.),

2007 Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA; và trong Hauser, AL, *Antibiotic Basics for Clinicians*, 2007 Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.

Như được mô tả ở đây, các phương án nhất định xuất phát từ khám phá không thể đoán trước được là đối với sự nhiễm khuẩn bao gồm vi khuẩn gram dương, chế phẩm hữu hiệu trong điều trị được ưu tiên có thể chứa hợp chất BT (ví dụ, BisEDT, bismut:1,2-etandithiol; BisPyr, bismut:pyrithion; BisEDT/Pyr, bismut:1,2-etandithiol/pyrithion) và rifamycin, hoặc hợp chất BT và daptomycin (Cubicin®, Cubist Pharmaceuticals, Lexington, MA), hoặc hợp chất BT và linezolid (Zyvox®, Pfizer, Inc., NY, NY), hoặc hợp chất BT (ví dụ, BisEDT, bismut:1,2-etandithiol; BisPyr, bismut:pyrithion; BisEDT/Pyr, bismut:1,2-etandithiol/pyrithion) và một hoặc nhiều chất trong số ampicillin, cefazolin, cefepime, cloramphenicol, clindamycin (hoặc chất kháng sinh lincosamit khác), daptomycin (Cubicin®), doxyxyclin, gatifloxacin, gentamixin, imipenim, levofloxacin, linezolid (Zyvox®), nafcilin, paromomycin, rifampin, sulphamethoxazol, tobramycin và vancomycin.

Cũng được mô tả ở đây, các phương án nhất định xuất phát từ khám phá không đoán trước được là đối với sự nhiễm khuẩn bao gồm vi khuẩn gram âm, chế phẩm hữu hiệu trong điều trị được ưu tiên có thể chứa hợp chất BT và amikacin. Các phương án liên quan nhất định đề cập đến việc xử lý sự nhiễm bao gồm vi khuẩn gram âm bằng hợp chất BT và chất kháng sinh khác, như chất kháng sinh aminoglycosit khác, chất kháng sinh này, theo các phương án nhất định, không phải là gentamixin hoặc tobramycin. Do đó và xét trên các phương án này, các phương án liên quan khác đề cập đến việc xác định một hoặc nhiều tập hợp vi khuẩn hoặc pho tập hợp vi khuẩn trên hoặc trong bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo bằng tiêu chuẩn đã được biết rõ về vi khuẩn gram âm hoặc gram dương, theo phương pháp mà chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ, và bước chọn lọc (các) hợp chất kháng sinh thích hợp để đưa vào chế phẩm để dùng cho các phương pháp theo sáng chế.

Các chế phẩm và các phương pháp theo sáng chế có thể có ứng dụng trong việc xử lý các vi sinh vật (ví dụ, vi khuẩn, virus, nấm men, nấm mốc và các loài

nấm khác, các vi sinh vật ký sinh, v.v.) trong rất nhiều trường hợp, thường bằng cách phết hoặc cấp các hợp chất theo sáng chế (ví dụ, một hoặc nhiều vi hạt BT một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất kháng sinh tác dụng đồng vận và/hoặc tác dụng tăng cường như được mô tả ở đây) vào vị trí vi sinh vật như vị trí vi sinh vật có mặt trên hoặc trong bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo. Các bề mặt tự nhiên này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các bề mặt trên thực vật (ví dụ, toàn bộ hoặc một phần bề mặt của rễ, củ, thân, lá, cành, dây leo, thân bò, chồi, hoa hoặc một phần của nó, quả, hạt, vỏ hạt, v.v.), các mô của động vật có vú (ví dụ, biểu mô bao gồm da, da đầu, lớp lót đường tiêu hóa, khoang miệng, v.v.; nội mô, tế bào và các màng mô như màng bụng, màng ngoài tim, màng phổi, màng xương, màng não, màng bao cơ, v.v.; giác mạc, củng mạc, màng nhầy, v.v.; và các mô của động vật có vú khác như cơ, tim, phổi, thận, gan, lách, túi mật, tụy, bàng quang, dây thần kinh, răng, xương, khớp, gân, dây chằng, v.v.) và có thể còn bao gồm vị trí bất kỳ trên đối tượng sản xuất mà có thể phát hiện sự có mặt của vi sinh vật (ví dụ, tường nhà thương mại, nhà ở, công nghiệp, giáo dục, chăm sóc sức khỏe và các tường nhà cơ quan khác, cửa sổ, sàn, hầm, gác mái, tầng hầm, hàng rào, mái nhà, trần nhà, thiết bị chiếu sáng và thiết bị kỹ thuật vệ sinh, lỗ thông hơi, ống dẫn, cáp điện, khóa cửa, công tắc, các hệ thống vệ sinh, ống dẫn nước, bể chứa, đường nước, các thiết bị y tế và nha khoa, các dụng cụ cấy, các thiết bị, thiết bị y tế, v.v.; các đồ vật kim loại, thủy tinh, nhựa, gỗ, cao su và giấy; phương tiện vận chuyển bao gồm các công ten nơ tàu biển, xe ô tô, phương tiện đường sắt, tàu, thuyền (ví dụ, vỏ ngoài, bánh lái, mỏ neo và/hoặc các bề mặt truyền động, khoang chứa hàng bên trong và kết dẫn và các bề mặt bên trong khác), xà lan và các phương tiện hàng hải khác bao gồm bến tàu, tấm ngăn, cầu tàu v.v.).

Các chất kháng vi sinh vật vi hạt được mô tả ở đây có thể được dùng để ngăn chặn sự phát triển vi sinh vật, giảm sự phá hoại của vi sinh vật, xử lý các sản phẩm bao gồm các bề mặt tự nhiên và/hoặc nhân tạo để cải thiện sự kháng của sản phẩm đối với sự phá hoại của vi sinh vật, giảm màng sinh học, ngăn chặn sự chuyển hóa vi khuẩn thành màng sinh học, ngăn ngừa hoặc ức chế sự nhiễm vi sinh vật, ngăn ngừa sự hỏng, và và các ứng dụng khác được mô tả ở đây. Các chất này cũng hữu dụng cho một số mục đích kháng virus, bao gồm ngăn chặn hoặc ức chế sự nhiễm

virut họ herpes như virut cự bào, virut herpes Typ 1, và virut herpes Typ 2, và/hoặc sự nhiễm các virut khác. Về vấn đề này, các chất này là hữu ích để ngăn chặn hoặc ức chế sự nhiễm virut do nhiều loại virut, như, các virut ARN sợi đơn, các virut AND sợi đơn, virut sacom Rous (RSV), virut viêm gan A, virut viêm gan B (HBV), virut viêm gan C (HCV), virut cúm, virut tây sông Nil (WNV), virut Epstein-Barr (EBV), virut gây viêm não ngựa miền đông (eastern equine encephalitis virus: EEEV), virut gây bệnh hô hấp cấp (SARS), virut làm suy giảm miễn dịch của người (HIV), virut gây bệnh u nhú ở người (HPV), và virut gây bệnh u bạch huyết tế bào T ở người (HTLV), và cả các virut đã biết là gây bệnh cho thực vật (ví dụ, virut làm xoắn lá khoai tây; virut khoai tây A, M, S, X, hoặc Y; virut héo đốm hại cà chua; virut làm xoắn lá nho 3; virut đậu mùa ở mận; virut đốm lá diếp; virut gây bệnh đốm dưa lê (pepino mosaic virus); virut gây bệnh đốm đại ở cây hồ tiêu (pepper mild mottle virus); virut gây bệnh đốm cà chua (tomato mosaic virus); virut gây bệnh đốm thuốc lá (tobacco mosaic virus); virut gây bệnh đốm Calibrachoa (Calibrachoa mottle virus); virut gây bệnh đốm hoại tử cây bóng nước (Impatiens necrotic spot virus); v.v.).

Ứng dụng được lý bên trong và bên ngoài của chất kháng vi sinh vật được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, việc xử lý hoặc ngăn chặn sự nhiễm khuẩn, bệnh lao, sự nhiễm nấm như sự nhiễm nấm men và nấm mốc (ví dụ, *Candida* (ví dụ, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, và *C. dubliniensis*) hoặc *Cryptococcus* hoặc loài nấm khác), sự nhiễm *Helicobacter pylori*, và bệnh loét tiêu hóa. Theo một phương án, chất này được dùng ở mức liều thường không gây chết vi khuẩn nhưng vẫn đủ để giảm các lớp phủ polysacarit bảo vệ kháng lại đáp ứng miễn dịch tự nhiên. Do đó kỹ thuật này được cho là hỗ trợ sự triệt trừ bệnh nhiễm khuẩn gián tiếp qua hệ miễn dịch mà không gây hại đến các vi sinh vật cộng sinh ở người (ví dụ, hệ vi khuẩn đường ruột thông thường, v.v.) với mức độ tương đương với các chất kháng sinh. Bằng cách minh họa và không giới hạn, các phương án được dự tính nhất định được mô tả sau đây.

Bismut-Thiol vi hạt để phủ và xử lý đường ống nước.

Theo một phương án, các phương pháp theo sáng chế để ngăn ngừa và/hoặc giám sát (tức là làm chậm, làm trì hoãn, ức chế) sự phát triển màng sinh học, phá vỡ màng sinh học, hoặc giảm lượng màng sinh học trên bề mặt trong hoặc ngoài của đường ống nước (như đường ống nước được dùng bởi các nha sĩ, nhân viên vệ sinh nha khoa, và các chuyên gia chăm sóc miệng khác), hoặc phương tiện phân phối nước khác bao gồm ống, vòi, nguồn nước, đầu vòi hoa sen, hoặc dụng cụ hoặc thiết bị bất kỳ khác (ví dụ, các thiết bị nha khoa bao gồm máy khoan nha khoa tốc độ cao, ống tiêm không khí-nước, và thiết bị hoặc dụng cụ làm sạch (ví dụ, Cavitron®)) mà tiếp xúc hoặc phân phối nước dùng cho người hoặc động vật. Các phương pháp này có thể còn hữu dụng để ngăn ngừa, giảm, ức chế, loại trừ, hoặc xóa bỏ sự phát triển và phân chia của vi khuẩn, nấm, và/hoặc động vật nguyên sinh trong thiết bị phân phối nước hoặc đường ống nước. Các phương pháp này bao gồm phết, dội, kết hợp, hoặc dính vi hạt hợp chất BT lên bề mặt của đường ống nước hoặc thiết bị phân phối nước.

Màng sinh học là các cộng đồng vi mô bao gồm chủ yếu là vi khuẩn và nấm có trong tự nhiên. Các vi sinh vật này tạo thành lớp mỏng trên bề mặt, bao gồm các hệ thống phân phối nước nha khoa và các thiết bị phân phối nước khác, như đầu vòi hoa sen, vòi và ống. Nước được dùng làm chất giải nhiệt và chất rửa trong các quy trình nha khoa có thể bị nhiễm nặng vi sinh vật (xem, ví dụ, Environmental Protection Agency web site at epa.gov/safewater/mcl/html). Các vi sinh vật gây bệnh hoặc các tác nhân gây bệnh cơ hội đã được phát hiện trong nước của các dụng cụ và đường ống nước nha khoa bao gồm Actinomyces, Bacteroides, Bacillus, Cryptosporidium, *E. coli*, Flavobacterium, Klebsiella, Legionella, Moraxella, Mycobacterium, Peptostreptococcus, Pseudomonas, Staphylococcus, Streptococcus, và Veillonella. Ngoài ra, do sự tạo thành màng sinh học, Legionella spp. và động vật nguyên sinh có thể sinh sôi nảy nở trong đường ống nước hoặc thiết bị phân phối nước. Vi khuẩn từ màng sinh học và các vi sinh vật khác có trong đường ống nước hoặc thiết bị phân phối nước liên tục được giải phóng khi nước chảy qua đường ống hoặc thiết bị này. Bệnh nhân và nhân viên lâm sàng bị tiếp xúc với các vi sinh vật có trong các giọt nước rất nhỏ hoặc trong hạt sương mịn phun ra từ đường dẫn nước hoặc thiết bị phân phối nước.

Để sử dụng và tiêu thụ nước trong lĩnh vực nha khoa, Trung tâm kiểm soát bệnh tật đã khuyến nghị rằng số lượng vi khuẩn trong nước được dùng làm chất giải nhiệt/chất rửa trong các quy trình nha khoa không phẫu thuật nên có nồng độ vi sinh vật dị dưỡng ưa khí (heterotrophic plate count: HPC) ≤ 500 CFU/ml. Hiệp hội nha khoa Mỹ (American Dental Association: ADA) đã đề xuất tiêu chuẩn nghiêm ngặt hơn, khuyến nghị rằng nước được dùng trong việc xử lý nha khoa chứa lượng vi khuẩn ≤ 200 CFU/ml. Các số đo được lấy để duy trì nồng độ vi khuẩn thấp trong các hệ thống nước nha khoa bao gồm việc sử dụng các chất kháng vi sinh vật (xem, ví dụ, McDowell et al., *J. Am. Dent. Assoc.* 135:799-805 (2004)); các chất diệt khuẩn trên cơ sở hydro peroxit (xem, ví dụ, Linger et al., *J. Am. Dent. Assoc.* 132:1287-91 (2001)); rửa dội thông thường các đường ống nước trước và sau khi dùng; bảo dưỡng các đường ống nước và các hệ thống phân phối nước; sử dụng các hệ thống lọc; sử dụng hóa chất làm các chất diệt khuẩn (ví dụ, các chất tẩy loãng 1:10, glutaraldehyt, etyl dùng trong lĩnh vực thực phẩm, rượu, các sản phẩm trên cơ sở clohexidin); tiệt trừ bằng nhiệt; ion hóa đồng-bạc; clo dioxit; tia tử ngoại; ozon; các kết hợp chất diệt khuẩn (ví dụ, Adec® ICX (Adex, Newburg, OR): natri percarbonat, bạc nitrat, và các chất hoạt động bề mặt cation và chất xúc tác ion bạc).

Các chất kháng vi sinh vật khác có thể được dùng để ngăn ngừa và/hoặc kiểm soát (tức là làm chậm, làm trì hoãn, ức chế) sự phát triển của màng sinh học, phá vỡ màng sinh học, hoặc giảm lượng màng sinh học trên bề mặt trong hoặc ngoài của đường ống nước hoặc thiết bị phân phối nước bao gồm các hợp chất BT vi hạt (hoặc các chế phẩm chứa ít nhất là một hợp chất BT vi hạt) theo sáng chế. Các hợp chất BT vi hạt có thể được đưa vào các đường ống nước, các hệ thống dẫn nước, và thiết bị phân phối nước bằng tay hoặc tự động dưới dạng gel, thuốc phun, bột nhão, dịch lỏng hoặc bột hoặc các dạng khác đã được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ. Theo các phương án cụ thể, hợp chất BT vi hạt, ở dạng bột hoặc dạng lỏng được trộn với ít nhất là một hoặc nhiều thành phần bổ sung, các thành phần này có thể bao gồm ít nhất là một thành phần có hoạt tính sinh học bổ sung và/hoặc tá dược không có hoạt tính sinh học, để tạo thành sản phẩm, sản phẩm này được phân phối hoặc tiêm định kỳ vào đường ống nước, thiết bị phân phối nước, hoặc hệ thống dẫn nước. Các chế phẩm có thể được sản xuất bởi chuyên gia trong lĩnh vực

này bằng cách sử dụng một số phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, có thể sử dụng hợp chất BT vi hạt với lượng có tác dụng kháng vi sinh vật kết hợp với DMSO. Bằng cách sử dụng thông thường, nồng độ hợp chất BT vi hạt đủ để ngăn ngừa sự tạo thành màng sinh học là mong muốn. Tuy nhiên, theo các phương án khác, nồng độ hợp chất BT vi hạt có thể là cao hơn để giảm, loại bỏ, phá vỡ, hoặc loại trừ sự tồn tại của màng sinh học trong đường ống nước, thiết bị phân phối nước, hoặc hệ thống dẫn nước.

Hợp chất BT vi hạt cũng có thể được bào chế để giải phóng từ từ ra khỏi chế phẩm được dùng cho đường ống nước, thiết bị phân phối nước, hoặc hệ thống dẫn nước chứa hợp chất BT vi hạt này. Hợp chất BT vi hạt cũng có thể được kết hợp vào chất phủ, chất này có thể được phủ lên, cố định vào, dính vào, hoặc theo cách thức nào đó để cho tiếp xúc với bề mặt trong của đường ống nước, thiết bị phân phối nước hoặc hệ thống dẫn nước. Chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt có thể là gel (ví dụ, hydrogel, thiome, aerogel, hoặc organogel) hoặc ở dạng lỏng. Organogel có thể bao gồm dung môi hữu cơ, axit lipoic, dầu thực vật hoặc dầu khoáng. Chế phẩm giải phóng chậm có thể phân phối lượng có tác dụng kháng vi sinh vật của hợp chất BT vi hạt trong 1, 2, 3, 4, 5, 6, hoặc 7 ngày (một tuần) hoặc trong 2, 3, 4, 5, 6, 7 tuần, hoặc 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 tháng.

Hợp chất BT vi hạt (hoặc chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt) có thể được kết hợp với ít nhất là một chất kháng vi sinh vật khác (tức là, chất kháng vi sinh vật thứ hai, thứ ba, thứ tư v.v.) mà khi được dùng kết hợp với chất kháng vi sinh vật tác dụng tăng cường hoặc tác dụng đồng vận sẽ có tác dụng như được mô tả ở đây. Ví dụ, tác dụng kháng vi sinh vật tăng cường có thể được quan sát thấy khi hợp chất BT vi hạt được dùng đồng thời với chất kháng vi sinh vật mà tạo chelat với sắt. Hợp chất BT vi hạt có thể được kết hợp với ít nhất là một chất oxy hóa, thuốc diệt vi sinh vật, hoặc chất diệt khuẩn. Hợp chất BT vi hạt được điều chế với thiol kỵ nước (ví dụ, thioclophenol) có thể được dùng và hợp chất này có thể có khả năng lớn hơn so với các hợp chất BT ít kỵ nước hơn trong việc dính bám vào bề mặt của đường ống nước và thiết bị phân phối nước và hệ thống dẫn nước. Các hợp chất BT

có điện tích thực âm, như các hợp chất có tỷ lệ mol 1:2 (bismut:thiol) cũng có các tính chất bám dính tốt.

Hợp chất BT vi hạt (và các chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt) có thể được kết hợp với natri hydrocacbonat hoặc hợp chất hoặc chất kiềm khác. Do các tính chất hóa học và vật lý của natri hydrocacbonat nên nó có khoảng ứng dụng rộng rãi, bao gồm làm sạch, khử mùi, và tạo đệm. Natri hydrocacbonat trung hòa các mùi về mặt hóa học thay vì che giấu hoặc hấp thụ chúng. Natri hydrocacbonat có thể được kết hợp với hợp chất BT vi hạt ở dạng hỗn hợp của các bột, hoặc được hòa tan hoặc được tạo huyền phù trong bột, thuốc phun, gel, bột nhào, hoặc dịch lỏng được mô tả ở đây. Theo các phương án khác, hợp chất BT vi hạt có thể được kết hợp với các chất bicacbonat hoặc cacbonat của kim loại kiềm khác (ví dụ, kali bicarbonat hoặc canxi cacbonat) mà giúp duy trì độ pH kiềm mong muốn và cũng có tính chất làm sạch và khử mùi.

Ví dụ khác, hợp chất BT vi hạt (hoặc chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt) có thể được kết hợp với một hoặc nhiều chất sau. Chất kháng vi sinh vật: ví dụ, clohexidin; chiết xuất cỏ rễ máu (sanguinarine); metronidazol; các hợp chất amoni bậc bốn (như xetylpyridini clorua); các điguanua (ví dụ, clohexidin digluconat, hexetidin, octenidin, alexidin); các hợp chất bisphenolic được halogen hóa (ví dụ, 2,2' metylenbis-(4-clo-6-bromophenol) hoặc các hợp chất phenolic kháng vi sinh vật khác; các alkylhydroxybenzoat; các peptit cation kháng vi sinh vật; các aminoglycosit; các quinolon; các lincosamit; các penixilin; các xephalosporin, các macrolit; các tetracyclin; các chất kháng sinh khác đã biết trong lĩnh vực này; tinh dầu *Coleus forskohlii*; các chất kháng vi sinh vật trên cơ sở bạc hoặc keo bạc; các chất kháng vi sinh vật trên cơ sở thiếc hoặc đồng; dầu Manuka; oregano; cỏ xạ hương; hương thảo; hoặc các chiết xuất thảo mộc khác; và chiết xuất hạt bưởi. Các chất chống sâu răng: ví dụ, natri và thiếc (II) florua, aminflorua, natri monoflophosphat, natri trimetaphosphat, kẽm xitrat hoặc các chất kẽm khác, và casein. Chất đệm: ví dụ, ure, canxi lactat, canxi glyxerophosphat, và stronti polyacrylat. Vitamin: ví dụ, Vitamin A, C và E. Chiết xuất thực vật. Chất chống sỏi thận: ví dụ, pyrophosphat kim loại kiềm, các polyme chứa hypophosphit, các

phosphonat hữu cơ và các phosphoxitrat v.v. Các phân tử sinh học: ví dụ, các chất diệt khuẩn. Các chất bảo quản. Các chất cản quang. Các chất điều chỉnh độ pH. Các chất tạo ngọt. Các chất hoạt động bề mặt: ví dụ, các chất hoạt động bề mặt anion, không ion, cation, và ion lưỡng tính hoặc lưỡng tính, các saponin từ nguyên liệu thực vật (xem, *ví dụ*, Patent Mỹ số 6,485,711). Các nguyên liệu mài mòn hạt: ví dụ, silic oxit, nhôm oxit, canxi carbonat, dicanxi phosphat, canxi pyrophosphat, hydroxyapatit, trimetaphosphat, hexametaphosphat không tan, các nguyên liệu mài mòn hạt kết tụ, đá phấn, đá phấn tự nhiên nghiền mịn và v.v.. Chất làm ẩm: ví dụ, glyxerol, sorbitol, propylenglycol, xylitol, lactitol v.v. Các chất kết dính và các chất làm đặc: ví dụ, natri carboxy metyl xenluloza, hydroxyetyl xenluloza (Natrosol®), gôm xanthan, gôm arabic, polyme tổng hợp (*ví dụ*, polyme polyacrylat và carboxyvinyl như Carbopol®). Các hợp chất polyme mà làm tăng sự phân phối các thành phần hoạt tính như các chất kháng vi sinh vật. Các chất đệm và các muối để tạo đệm độ pH và lực ion của chế phẩm chăm sóc miệng. Các chất tẩy trắng: ví dụ, các hợp chất peroxy (*ví dụ*, kali peroxydiphosphat). Các hệ sủi bọt: ví dụ, các hệ natri bicarbonat/axit xitric.

Theo phương án khác, hợp chất BT vi hạt theo sáng chế (hoặc chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt) có thể được kết hợp với ít nhất là một hoặc nhiều chất chống màng sinh học để kiểm soát sự phát triển của màng sinh học, phá vỡ màng sinh học, hoặc giảm lượng màng sinh học. Như được hiểu trong lĩnh vực này, việc dò tìm mật độ tới hạn giữa các loài (interspecies quorum sensing) có liên quan đến sự tạo thành màng sinh học. Các chất nhất định mà làm gia tăng con đường phụ thuộc LuxS hoặc tín hiệu dò tìm mật độ tới hạn giữa các loài (*xem*, *ví dụ*, patent Mỹ số 7,427,408) góp phần vào việc kiểm soát sự phát triển và/hoặc tăng sinh của màng sinh học. Các chất đại diện bao gồm, ví dụ, các hợp chất phong bế N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserin lacton (OdDHL) và các chất tương tự N-butyryl-L-homoserin lacton (BHL), kết hợp hoặc riêng rẽ (*xem*, *ví dụ*, patent Mỹ số 6,455,031). Các chế phẩm vệ sinh miệng chứa hợp chất BT vi hạt và ít nhất là một chất chống màng sinh học có thể được phân phối cục bộ để phá vỡ và ức chế màng sinh học vi khuẩn và để điều trị bệnh nha chu (*xem*, *ví dụ*, patent Mỹ số 6,726,898).

Hiệu lực của hợp chất BT vi hạt khi làm chất chống màng sinh học có thể được gia tăng bằng cách gia nhiệt đường ống nước, thiết bị phân phối nước, hoặc hệ thống dẫn nước mà trong đó đã bổ sung hợp chất BT vi hạt bằng cách gia nhiệt đường ống, thiết bị, hoặc hệ thống này. Theo các phương án nhất định, đường ống, thiết bị, hoặc hệ thống được gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 7°C đến khoảng 60°C hoặc nằm trong khoảng từ 37°C đến khoảng 100°C. Theo các phương án khác, đường ống, thiết bị, hoặc hệ thống này được gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 45°C đến 50°C; đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 50°C đến 55°C; từ 55°C đến 60°C; từ 60°C đến 70°C; từ 70°C đến 80°C; từ 80°C đến 90°C; hoặc từ 90°C đến 100°C. Theo các phương án cụ thể, đường ống, thiết bị hoặc hệ thống này được gia nhiệt đến khoảng 37°C. Theo phương án cụ thể khác, đường ống, thiết bị, hoặc hệ thống này được gia nhiệt đến khoảng 55°C. Như được hiểu bởi chuyên gia trong lĩnh vực này, khoảng thời gian mà đường ống, thiết bị, hoặc hệ thống này được gia nhiệt có thể thay đổi tùy thuộc vào nhiệt độ được dùng. Ví dụ, để đạt được hiệu quả kháng vi sinh vật như nhau so với thời gian cần thiết khi gia nhiệt ở nhiệt độ cao hơn, thời gian cần thiết sẽ dài hơn nếu đường ống, thiết bị, hoặc hệ thống này được gia nhiệt ở nhiệt độ thấp hơn. Việc xác định thời gian thích hợp để phơi đường ống, thiết bị, hoặc hệ thống này ở mỗi nhiệt độ có thể dễ dàng được thực hiện bởi chuyên gia trong lĩnh vực này.

Hợp chất BT vi hạt (hoặc chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt) có thể được sử dụng kết hợp với phương thức khác để giảm hoặc ngăn ngừa sự phát triển của màng sinh học. Ví dụ, các hợp chất BT vi hạt có thể được kết hợp với các chất oxy hóa, các hợp chất khử cặn, các chất phá vỡ màng sinh học, hoặc các hệ dội rửa được mô tả ở đây và được dùng trong lĩnh vực này.

Các chế phẩm chứa Bismut-Thiol vi hạt và sử dụng đối với sự phục hồi nha khoa.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến các chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt và hỗn hợp răng (dental amalgam) và hợp chất BT vi hạt và phức răng (dental composite) để sử dụng để ngăn chặn và/hoặc điều trị bệnh sâu răng. Hiện nay, việc xử lý đối với tổn thương sâu răng chỉ là phục hồi răng bằng cách thay thế

chất liệu trợ có tác dụng ngăn chặn sự hư hại thêm. Hồn hồng răng và phức răng là thường được dùng nhất để hồi phục răng bị bệnh sâu răng.

Sự sâu răng phía ngoài tái phát là yếu tố góp phần quan trọng vào sự suy giảm khả năng hồi phục, đặc biệt là khi các phức răng được sử dụng để hồi phục. Sự có mặt của vi khuẩn tại bề mặt tiếp xúc giữa vật liệu composit và mô răng có thể là yếu tố quan trọng làm suy giảm khả năng hồi phục (xem, ví dụ, Hansel et al, *J. Dent. Res.* 77:60-67 (1998)). Theo một nghiên cứu ở Bồ Đào Nha (Casa Pia Study, 1986-1989), 1.748 trường hợp sau hồi phục được nghiên cứu và 177 (10,1%) trong số đó bị hư hỏng trong quá trình nghiên cứu. Sự sâu răng phía ngoài tái phát là lý do chính đối với sự hư hỏng này trong cả hai trường hợp là hồi phục bằng hồn hồng răng và hồi phục bằng phức răng, mức hư hỏng lần lượt chiếm khoảng 66% (32/48) và 88% (113/129) (xem Bernardo et al. *JADA* 2007;138:775-83). Độ co trùng hợp là độ co mà xảy ra trong quá trình lưu hóa composit, là có liên quan như là lý do chủ yếu đối với sự rò rỉ bên ngoài sau phẫu thuật (xem, ví dụ, Estefan et al., *Gen. Dent.* 2003;51:506-509).

Sự kết hợp các chất và các hợp chất kháng vi sinh vật vào vật liệu phục hồi, như hệ liên kết răng (dentin bonding systems: DBS), đã được thử nhưng chỉ thành công ở mức hạn chế. Sự phát triển các composit và hồn hồng và các vật liệu hồi phục khác mà có tính chất kháng vi sinh vật có thể góp phần ngăn chặn bệnh sâu răng thứ phát (xem, ví dụ, Imazato, *Dent. Materials* 19:449 (2003)). Các phương án theo sáng chế dự tính sự thay thế chất kháng vi sinh vật để bảo chế chế phẩm hồi phục, được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật, bằng các hợp chất BT vi hạt được mô tả ở đây để tạo ra các ưu điểm được bộc lộ ở đây, bao gồm giới hạn hoạt tính kháng vi sinh vật, độ tan và độ sinh khả dụng, tác dụng chống màng sinh học, tính không độc, tăng cường hiệu lực chất kháng sinh, và các tính chất khác như được mô tả ở đây.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm được đề cập chứa hợp chất BT vi hạt và phức răng. Phức răng thường chứa chất nền nhựa có thể trùng hợp chứa chất độn gốm. Hợp chất BT vi hạt có thể được kết hợp với phức răng bất kỳ trong số các phức răng đã biết trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng các phương pháp được

thực hiện trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, O'Brien, *Dental Materials and Their Selection* (Chicago: Quintessence Publishing Co.) (2002); Powers et al., *Dental Materials: Properties and Manipulation* (New York: Mosby) (2007); Roeters et al., *J. Dent.* 32:371-77 (1998)).

Theo các phương án khác, chế phẩm được đề cập chứa hợp chất BT vi hạt và hỗn hồng. Hỗn hồng là hợp kim của thủy ngân với một hoặc nhiều kim loại khác. Hầu hết các hỗn hồng răng đều được gọi là các hỗn hồng bạc vì bạc là thành phần chính phản ứng với thủy ngân. Động lực của các phản ứng giữa thủy ngân và bạc là không thích hợp cho sử dụng trên lâm sàng, do đó bạc được tạo ra ở dạng hợp kim với các nguyên tố khác. Hợp kim này thường được đề cập như là hợp kim hỗn hồng răng hoặc, tóm lại, các hợp kim được biết như là 'các hợp kim cho hỗn hồng răng' (xem, ví dụ, International Standards Organization Standard ISO 1559, *Dental Materials – Alloys for Dental amalgam* (1995)). Một số loại hợp kim hỗn hồng răng đã được biết, và tất cả bao gồm thiếc và hầu hết có một chút đồng và, một lượng kẽm ít hơn. Bản thân một số hợp kim hỗn hồng răng chứa lượng nhỏ thủy ngân để thúc đẩy phản ứng hỗn hồng hóa. Hợp kim hỗn hồng răng thường sẽ chứa bạc với lượng từ 67% đến 74%, thiếc với lượng từ 25% đến 28%, và tối đa 6% đồng, 2% kẽm và 3% thủy ngân. Các hợp kim hỗn hồng loại phân tán chứa khoảng 70% bạc, 16% thiếc và 13% đồng. Nhóm hợp kim hỗn hồng khác có thể chứa tối đa 30% đồng, đây được biết như là hợp kim hỗn hồng hàm lượng đồng cao. Các hợp kim hỗn hồng được trộn với thủy ngân trước khi thực hiện trên lâm sàng với tỷ lệ trọng lượng 1:1. Do đó hàm lượng thủy ngân của chế phẩm hỗn hồng răng cuối cùng xấp xỉ 50% tính theo trọng lượng. Trong các hợp kim hỗn hồng răng thông thường, tỷ lệ bạc:thiếc dẫn đến cấu trúc tinh thể mà về cơ bản là hợp chất liên kim Ag_3Sn , được gọi là pha gama (γ). Phần trăm chính xác của pha này kiểm soát động lực của phản ứng hỗn hồng và nhiều tính chất của cấu trúc hỗn hồng thu được. Đối với các hợp kim phân tán đồng cao hơn, vi cấu trúc thường là hỗn hợp của pha gama với pha bạc-đồng σ -tecti. Các chất khác có trong hợp kim hỗn hồng dưới dạng khác nhau, mặc dù chúng thường được sản xuất sẵn sàng dưới dạng các hạt mịn, có hình cầu hoặc hình không đều, với kích cỡ hạt khoảng 25-35micron. (xem. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR),

European Commission: Directorate-General, Health & Consumer Protection, 6/5/2008 tại Internet site: ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_016.pdf.)

Hợp chất BT vi hạt cũng có thể được sử dụng để phòng ngừa hoặc điều trị bệnh sâu răng và/hoặc bệnh viêm (tức là, giảm khả năng xuất hiện hoặc tái phát bệnh sâu răng và/hoặc bệnh viêm) bằng cách cho hợp chất BT vi hạt tiếp xúc với bề mặt của răng, hỗn hống, hoặc compozit. Chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt có thể là chế phẩm nhót dính bám được phủ lên bề mặt của răng và/hoặc lợi hoặc màng niêm mạc miệng, có thể ở dạng bất kỳ mà dính bám đến mức độ nào đó với bề mặt hoặc phân phối lượng hữu hiệu trong điều trị của các thành phần hoạt tính đến bề mặt mong muốn. Hợp chất BT vi hạt can cũng có thể được bào chế để giải phóng từ từ ra khỏi chế phẩm được phết lên răng. Ví dụ, chế phẩm này có thể là ở dạng gel (ví dụ, hydrogel, thiomers, aerogel, hoặc organogel) hoặc dạng lỏng. Organogel có thể chứa dung môi hữu cơ, axit lipoic, dầu thực vật, hoặc dầu khoáng. Chế phẩm phủ dạng gel hoặc dạng lỏng này có thể được phủ phía trong hoặc phía ngoài hỗn hống hoặc compozit hoặc chế phẩm hồi phục khác. Chế phẩm giải phóng chậm có thể phân phát lượng hữu hiệu trong điều trị của hợp chất BT vi hạt trong 1, 2, 3, 4, 5, 6, hoặc 7 ngày (một tuần) hoặc trong 2, 3, 4, 5, 6, 7 tuần, hoặc 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 tháng. Các chế phẩm này có thể được bào chế bởi chuyên gia trong lĩnh vực này bằng các sử dụng một số phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Các chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt mà hữu dụng để phục hồi răng có thể chứa xi măng thủy tinh (glass ionomer cements); giomer (được tạo ra bằng cách cho thủy tinh chứa florua phản ứng với polyaxit lỏng); compomer (nhựa dimetacrylat có thể trùng hợp và các hạt chất độn thủy tinh có thể lọc lấy nước-ion). Compomer có thể còn chứa florua.

Các chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt mà được phủ lên bề mặt cả răng, hỗn hống, hoặc compozit có thể còn chứa một hoặc nhiều chất có hoạt tính bề mặt khác mà làm tăng cường hiệu quả kháng vi sinh vật. Chất kháng vi sinh vật điển hình để sử dụng trong các chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt này bao gồm, ví dụ, clohexidin, chiết xuất cỏ rễ máu, metronidazol, các hợp chất amoni bậc bốn, như

xetylpyridini clorua; các điguanua, như clohexidin digluconat, hexetidín, octenidin, alexidin; và các hợp chất bisphenolic được halogen hóa, như 2,2' metylenbis-(4-clo-6-bromophenol), hoặc các hợp chất phenolic kháng khuẩn khác, alkylhydroxybenzoat, các peptit kháng vi sinh vật có tính cation, các aminoglycosit, các quinolon, các lincosamit, penixilin, xephalosporin, macrolit, tetraacyclín, và các chất kháng sinh khác, taurolidin hoặc taurultam, A-dec ICX, tinh dầu *Coleus forskohlii*, các chất kháng vi sinh vật trên cơ sở bạc hoặc keo bạc, các chất kháng vi sinh vật trên cơ sở thiếc hoặc đồng, các chất oxy hóa clo hoặc brom, dầu Manuka, oregano, các chiết xuất cỏ xạ hương, hương thảo hoặc các thảo mộc khác, và chiết xuất hạt bưởi; các chất chống viêm hoặc chống oxy hóa như ibuprofen, flurbiprofen, aspirin, indomethaxin, chiết xuất lô hội, nghệ, lá ô liu, đinh hương, panthenol, retinol, các axit béo omega-3, axit gamma-linolenic (GLA), trà xanh, gừng, hạt nho, v.v.

Các chế phẩm này cũng có thể còn chứa một hoặc nhiều chất mang dược dụng, như tinh bột, sucroza, nước hoặc hệ nước/rượu, DMSO, v.v. Các chế phẩm này cũng có thể chứa chất hoạt động bề mặt, như các chất hoạt động bề mặt anion, không ion, cation và lưỡng tính, hoặc có thể chứa các saponin từ các nguyên liệu thực vật (xem, ví dụ, Patent Mỹ số. 6,485,711). Các chất đệm và muối để đệm độ pH và lực ion của chế phẩm để dùng qua đường miệng cũng có thể được chứa trong chế phẩm này. Các thành phần tùy ý khác có thể được chứa là các chất tẩy như các hợp chất peroxy; kali peroxydiphosphat; các hệ sủi bọt như các hệ natri bicarbonat/axit xitric, v.v.

Các chế phẩm chứa Bismut-Thiol vi hạt và sử dụng để vệ sinh răng miệng và để điều trị bệnh viêm và bệnh nhiễm khuẩn răng miệng.

Theo phương án khác, các chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt được bào chế để dùng qua đường miệng và có thể được dùng trong phương pháp phòng ngừa hoặc giảm sự phát triển vi sinh vật trong miệng và để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh nhiễm vi sinh vật và bệnh viêm trong khoang miệng. Do đó, các chế phẩm này là hữu dụng để phòng ngừa hoặc điều trị (tức là, làm giảm hoặc ức chế sự phát triển của, giảm khả năng xuất hiện hoặc tái phát của) cao răng, thối mồm, bệnh nha

chu, viêm lợi, và các bệnh nhiễm ở miệng khác. Các chế phẩm dùng qua đường miệng chứa hợp chất BT vi hạt cũng có thể hữu dụng để điều trị và/hoặc kiểm soát (tức là, làm chậm, làm trì hoãn, ức chế) sự phát triển của màng sinh học, phá vỡ màng sinh học, hoặc giảm lượng màng sinh học có mặt trên bề mặt miệng, đặc biệt là răng hoặc lợi.

Thực phẩm dẹt răng, vệ sinh răng miệng kém và sức khỏe răng miệng kém, và việc làm sạch hàm răng không thích hợp có thể thúc đẩy sự phát triển của vi sinh vật giữa kẽ răng, xung quanh lợi, và trên lưỡi. Sự phát triển liên tục của vi sinh vật và sự có mặt của bệnh sâu răng có thể dẫn đến bệnh thối mồm, cao răng (tức là, màng sinh học được tạo thành bằng cách xâm chiếm của các vi sinh vật), bệnh viêm lợi, và bệnh viêm. Nếu không chăm sóc răng miệng một cách hợp lý (ví dụ, chải răng, dùng chỉ nha khoa), có thể dẫn đến các bệnh viêm trầm trọng hơn, như bệnh nha chu và các bệnh viêm hàm.

Vệ sinh răng miệng tốt là yếu tố quan trọng không chỉ đối với sức khỏe răng miệng, mà còn để ngăn chặn một số tình trạng bệnh mãn tính. Việc kiểm soát sự phát triển của vi khuẩn trong miệng có thể làm giảm nguy cơ bệnh tim, giữ trí nhớ, và giảm nguy cơ bị bệnh nhiễm và bệnh viêm ở các bộ phận khác trong cơ thể. Người bị tiểu đường có nguy cơ cao mắc phải các vấn đề về lợi nghiêm trọng, và việc giảm nguy cơ bị bệnh viêm lợi bằng cách giữ gìn sức khỏe răng miệng tốt có thể giúp kiểm soát đường huyết. Phụ nữ mang thai có thể bị bệnh viêm lợi, và một số nghiên cứu đã chỉ ra mối quan hệ giữa bệnh nướu ở phụ nữ mang thai và sự sinh non, trọng lượng thấp ở trẻ sơ sinh.

Vi khuẩn là tác nhân gây bệnh chính đối với bệnh nha chu. Trên 500 chủng vi khuẩn có thể được phát hiện ở bệnh cao răng (Kroes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14547-52 (1999)). Vi khuẩn đã tiến hóa để sống sót trong môi trường bề mặt răng, biểu mô nướu, và khoang miệng như các màng sinh học, điều này góp phần làm việc điều trị bệnh viêm nha chu thêm khó khăn. Các chất diệt khuẩn cũng như các chất kháng sinh mà thường được dùng để điều trị các bệnh nhiễm này thường không diệt được tất cả các sinh vật gây hại. Việc sử dụng chất mà không có hiệu quả chống lại các loài vi khuẩn nhất định có thể dẫn đến sự tăng sinh các loài

vi khuẩn kháng thuốc. Hơn nữa, các chất này có thể dẫn đến các tác dụng phụ không mong muốn, như các phản ứng dị ứng, viêm và làm biến màu men răng.

Màng vi khuẩn bám trên răng là màng sinh học bám chặt vào bề mặt răng, các phần phục hồi răng, và răng giả. Giải pháp chủ yếu để kiểm soát các màng sinh học trong miệng là qua việc làm sạch cơ học (tức là, chải răng, dùng chỉ nha khoa, v.v.). Trong vòng hai ngày đầu tiên sau khi không làm sạch, bề mặt răng bị xâm chiếm phần lớn bởi các cầu khuẩn gram dương ngẫu nhiên, đây chủ yếu là loài liên cầu khuẩn. Vi khuẩn này tiết ra lớp nhớt ngoại bào giúp vi khuẩn neo bám vào bề mặt và tạo sự bảo vệ cho vi khuẩn bám này. Sự tạo thành của các cụm vi khuẩn bắt đầu khi bề mặt của răng được bao phủ bởi vi khuẩn bám vào. Màng sinh học phát triển chủ yếu qua sự phân chia tế bào của vi khuẩn bám, thay vì qua sự bám vào của vi khuẩn mới. Thời gian tăng gấp đôi số lượng vi khuẩn tạo thành màng bám là rất nhanh trong pha phát triển sớm và chậm hơn trong pha màng sinh học hoàn thiện hơn.

Sự đông tụ diễn ra khi các vi khuẩn xâm chiếm sau đó bám vào các vi khuẩn đã bám lên lớp màng mỏng. Kết quả của sự đông tụ này là sự tạo thành chuỗi phức hợp của các vi khuẩn khác nhau liên kết với nhau. Sau vài ngày sự tạo thành màng bám không bị phá, bờ rìa nướu trở nên bị viêm và sưng lên. Sự viêm có thể dẫn đến sự tạo ra khe nướu sâu. Màng sinh học kéo dài vào vùng dưới nướu và phát triển trong môi trường được bảo vệ này, dẫn đến sự tạo thành màng sinh học hoàn thiện bám dưới nướu. Sự viêm nướu không xảy ra cho đến khi màng sinh học thay đổi từ màng sinh học chứa phần lớn là vi khuẩn gram dương sang màng sinh học chứa vi khuẩn kỵ khí gram âm. Các cụm vi khuẩn dưới nướu, bao gồm chủ yếu là vi khuẩn kỵ khí gram âm, được thiết lập trong khe nướu giữa 3 đến 12 tuần sau khi bắt đầu tạo thành màng bám trên nướu. Hầu hết các loài vi khuẩn hiện được nghi ngờ là tác nhân gây bệnh nha chu đều là vi khuẩn kỵ khí, gram âm.

Các cụm vi khuẩn được bảo vệ trong màng sinh học thường kháng lại các chất kháng sinh (được dùng toàn thân), các chất sát trùng hoặc chất diệt khuẩn (được dùng khu trú), và các phản ứng phòng ngự miễn dịch. Liều chất kháng sinh diệt vi khuẩn tự do, ví dụ, cần được gia tăng lên tới 1.500 lần để diệt vi khuẩn màng

sinh học. Ở nồng độ cao này, các chất kháng vi sinh vật này có xu hướng là độc hại đối với bệnh nhân (xem, ví dụ, Coghlan 1996, *New Scientist* 2045:32-6; Elder et al., 1995, *Eye* 9:102-9).

Việc loại bỏ tự nhiên thường xuyên và siêng năng các mảng bám màng sinh học vi khuẩn là cách thức hữu hiệu nhất để loại trừ và kiểm soát mảng bám. Tuy nhiên, mảng bám dưới nướu trong các ổ không thể chạm tới bằng bàn chải, chỉ nha khoa, hoặc nước súc miệng. Do đó, việc mở ổ nha chu thường xuyên đối với các bề mặt răng dưới nướu bởi nhân viên vệ sinh răng hoặc bác sỹ nha khoa là yếu tố cần thiết để ngăn chặn và điều trị bệnh viêm nha chu.

Theo các phương án nhất định, hợp chất BT vi hạt có thể được kết hợp với các chế phẩm vệ sinh miệng và kết hợp lên (như là chất phủ) hoặc vào các dụng cụ như, nhưng không chỉ giới hạn ở, kem đánh răng, nước súc miệng, gel dùng cho miệng, bột đánh răng, thuốc phun dùng cho miệng (bao gồm thuốc phun được phân tán bằng ống hít qua miệng), màng ăn được, kẹo cao su, huyền phù dùng cho miệng, chất lỏng làm sạch răng giả, chất lỏng bảo quản răng giả, và chỉ nha khoa, các dụng cụ mà có thể được dùng thường xuyên. Hợp chất BT vi hạt có thể được đưa vào các chế phẩm vệ sinh miệng và lên các dụng cụ được dùng chủ yếu bởi các chuyên gia chăm sóc răng miệng, bao gồm, ví dụ, chất lỏng xử lý florua, chất lỏng làm sạch, chế phẩm đánh bóng, nước súc miệng, chỉ nha khoa, và dụng cụ làm sạch. Các phương án theo sáng chế dự tính sự thay thế các chất kháng vi sinh vật được bào chế trong các chế phẩm vệ sinh miệng và/hoặc phủ lên các dụng cụ, mà đã được mô tả trong lĩnh vực này, bằng hợp chất BT vi hạt theo sáng chế để tạo ra các ưu điểm như được bộc lộ ở đây, bao gồm khoảng hoạt tính kháng vi sinh vật, độ tan và độ sinh khả dụng, tác dụng chống màng sinh học, không độc, tăng cường hiệu quả kháng sinh, và các tính chất khác như được mô tả ở đây.

Hợp chất BT vi hạt cũng có thể được dùng để điều trị bệnh sâu răng và/hoặc bệnh viêm (tức là, lần lượt giảm khả năng xảy ra hoặc tái phát bệnh sâu răng và/hoặc viêm) bằng cách cho hợp chất BT vi hạt tiếp xúc với bề mặt của răng. Chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt có thể là chế phẩm nhót dính được phết lên bề mặt của răng và/hoặc lợi hoặc màng niêm mạc miệng, có thể ở dạng bất kỳ bám với

mức độ nào đó lên bề mặt hoặc ở dạng phân phối lượng hữu hiệu về mặt dược lý của thành phần hoạt tính lên bề mặt mong muốn. Hợp chất BT vi hạt cũng có thể được bào chế để giải phóng từ từ ra khỏi chế phẩm phết lên răng. Ví dụ, chế phẩm này có thể là gel (ví dụ, a hydrogel, thiomers, aerogel, hoặc organogel) hoặc dạng lỏng. Organogel có thể chứa dung môi hữu cơ, axit lipoic, dầu thực vật, hoặc dầu khoáng. Các chế phẩm phủ dạng gel hoặc lỏng này có thể được phết lên phía trong hoặc phía ngoài của hỗn hống hoặc compozit hoặc chế phẩm hồi phục khác. Chế phẩm giải phóng chậm có thể phân phối lượng hữu hiệu về mặt dược lý của hợp chất BT vi hạt trong 1, 2, 3, 4, 5, 6, hoặc 7 ngày (một tuần) hoặc trong 2, 3, 4, 5, 6, 7 tuần, hoặc 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 tháng. Các chế phẩm này có thể được bào chế bởi chuyên gia trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng một số phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Theo các phương án nhất định khác, và như được mô tả ở đây, chế phẩm kháng vi sinh vật được tạo ra để dùng cho miệng chứa hợp chất BT vi hạt và một hoặc nhiều chất hoặc hợp chất kháng vi sinh vật bổ sung. Đặc biệt hữu dụng là các chế phẩm chứa chất kháng vi sinh vật thứ hai mà khi được dùng kết hợp sẽ có tác dụng kháng vi sinh vật tăng cường hoặc tác dụng kháng vi sinh vật đồng vận, như được mô tả ở đây. Ví dụ, tác dụng kháng vi sinh vật tăng cường có thể được quan sát thấy khi hợp chất BT vi hạt được dùng cùng với chất kháng vi sinh vật mà tạo chelat với sắt. Theo các phương án cụ thể khác, hợp chất BT vi hạt được bào chế với chất, hợp chất chống viêm, phân tử nhỏ hoặc đại phân tử (như peptit hoặc polypeptit).

Hợp chất BT vi hạt bất kỳ trong số các hợp chất BT vi hạt theo sáng chế có thể được bào chế để dùng cho miệng. Theo các phương án nhất định, hợp chất BT vi hạt được điều chế với các thiol kỵ nước (ví dụ, thioclophenol) có thể được dùng và chất này có thể có khả năng lớn hơn so với các hợp chất BT ít kỵ nước hơn trong việc bám vào răng và mô miệng. Các hợp chất BT có điện tích âm thực, như các hợp chất có tỷ lệ mol 1:2 (bismut:thiol) cũng có thể có tính chất bám dính tốt.

Các chế phẩm vệ sinh miệng chứa hợp chất BT vi hạt có thể còn chứa một hoặc nhiều hoạt chất và/hoặc một hoặc nhiều tá dược hoặc chất mang thích hợp với

miệng. Theo một phương án, chế phẩm vệ sinh miệng có thể còn chứa natri hydrocacbonat hoặc chất hoặc hợp chất kiềm khác. Vì các tính chất hóa học và vật lý của natri hydrocacbonat nên nó có khoảng ứng dụng rộng bao gồm làm sạch, khử mùi và tạo đệm. Natri hydrocacbonat trung hòa các mùi về mặt hóa học thay vì che giấu hoặc hấp thụ chúng. Natri hydrocacbonat có thể được kết hợp với hợp chất BT vi hạt ở dạng hỗn hợp bột hoặc được hòa tan hoặc được tạo huyền phù trong dạng bất kỳ trong số các dạng bột đánh răng, gel, bột nhào, và chất lỏng được mô tả ở đây. Theo các phương án khác, hợp chất BT vi hạt có thể được kết hợp với các chất bicarbonat hoặc carbonat của kim loại kiềm khác (ví dụ, kali bicarbonat hoặc canxi carbonat) để giúp duy trì độ pH kiềm mong muốn và có các tính chất làm sạch và khử mùi.

Chế phẩm vệ sinh miệng chứa hợp chất BT vi hạt có thể còn chứa một hoặc nhiều thành phần sau. Chất kháng vi sinh vật: ví dụ, clohexidin; chiết xuất cỏ rễ máu; metronidazol; các hợp chất amoni bậc bốn (như xetylpyridini clorua); các điguanua (ví dụ, clohexidin digluconat, hexetidín, octenidin, alexidin); các hợp chất bisphenolic được halogen hóa (ví dụ, 2,2' metylenbis-(4-clo-6-bromophenol) hoặc các hợp chất phenolic kháng khuẩn khác; alkylhydroxybenzoat; các peptit có tính cation kháng vi sinh vật; các aminoglycosit; quinolon; lincosamit; penixilin; xephalosporin, macrolit; tetraacyclin; các chất kháng sinh khác đã biết trong lĩnh vực này; tinh dầu *Coleus forskohlii*; các chất kháng vi sinh vật trên cơ sở bạc hoặc keo bạc; các chất kháng vi sinh vật trên cơ sở thiếc hoặc đồng; dầu Manuka; các chiết xuất oregano; cỏ xạ hương; hương thảo; hoặc các thảo mộc khác; và chiết xuất hạt bưởi. Các chất chống viêm hoặc chống oxy hóa: ví dụ, ibuprofen, flurbiprofen, aspirin, indomethaxin, chiết xuất lô hội, nghệ, lá ô liu, đinh hương, panthenol, retinol, axit béo omega-3, axit gama-linolenic (GLA), trà xanh, gừng, hạt nho, v.v. Các chất chống sâu răng: ví dụ, natri- và thiếc florua, aminflorua, natri monoflophosphat, natri trimetaphosphat, kẽm xitrat hoặc các chất kẽm khác và casein. Chất đệm: ví dụ, ure, canxi lactat, canxi glyxerophosphat, và stronti polyacrylat. Các vitamin: ví dụ, Vitamins A, C và E. Các chiết xuất thực vật. Các chất gây tê: ví dụ, kali xitrat, kali clorua, kali tartrat, kali bicarbonat, kali oxalat, kali nitrat, và các muối stronti. Các chất chống sỏi thận: ví dụ, pyrophosphat của

kim loại kiềm, các polyme chứa hypophosphit, các phosphonat hữu cơ và các phosphoxitrat v.v. Các phân tử sinh học: ví dụ, các chất diệt khuẩn, thể thực khuẩn, các kháng thể, các enzym, v.v. Các hương liệu: ví dụ, dầu bạc hà và dầu bạc hà lục, cây thì là, quế, v.v. Các nguyên liệu protein: ví dụ, collagen. Các chất bảo quản. Các chất cản quang. Các chất màu. Các chất điều chỉnh độ pH. Các chất làm ngọt. Các chất mang dược dụng: ví dụ, tinh bột, sucroza, nước hoặc hệ nước/rượu v.v. Các chất hoạt động bề mặt: ví dụ, các chất hoạt động bề mặt anion, không ion, cation hoặc lưỡng tính, saponin từ nguyên liệu thực vật (xem, *ví dụ*, Patent Mỹ số 6,485,711). Các chất liệu mài mòn hạt: ví dụ, silic oxit, nhôm oxit, canxi carbonat, dicanxi phosphat, canxi pyrophosphat, hydroxyapatit, trimetaphosphat, hexametaphosphat không tan, các chất liệu mài mòn hạt kết tụ, đá phấn, đá phấn tự nhiên nghiền mịn và v.v.. Các chất làm ẩm: ví dụ, glyxerol, sorbitol, propylenglycol, xylitol, lactitol v.v. Các chất kết dính và các chất làm đặc: ví dụ, natri carboxy metyl xenluloza, hydroxyetyl xenluloza (Natrosol®), gôm xanthan, gôm arabic, các polyme tổng hợp (*ví dụ*, các polyacrylat và các polyme carboxyvinyl như Carbopol®). Các hợp chất polyme mà làm gia tăng khả năng phân phối các thành phần hoạt tính như các chất kháng vi sinh vật. Các chất đệm và muối để đệm độ pH và lực ion của chế phẩm chăm sóc miệng. Các chất tẩy trắng: ví dụ, các hợp chất peroxy (*ví dụ*, kali peroxydiphosphat). Các hệ sủi bọt: ví dụ, hệ natri bicarbonat/axit xitric. Các hệ thay đổi màu. Theo phương án cụ thể, chất mài mòn là silic oxit hoặc đá phấn tự nhiên nghiền mịn.

Các chế phẩm vệ sinh miệng chứa hợp chất BT vi hạt được bào chế để dùng làm kem đánh răng có thể còn chứa chất làm ẩm (ví dụ, glyxerol hoặc sorbitol), chất có hoạt tính bề mặt, chất kết dính, và/hoặc chất tạo hương. Kem đánh răng này có thể còn chứa chất làm ngọt, chất làm trắng, chất bảo quản, và chất kháng vi sinh vật. Độ pH của kem đánh răng và các chế phẩm khác để dùng cho miệng thường là nằm trong khoảng từ 5,5 đến 8,5. Theo các phương án nhất định, các chế phẩm vệ sinh miệng, bao gồm kem đánh răng, có độ pH nằm trong khoảng từ 7 đến 7,5, từ 7,5 đến 8, từ 8 đến 8,5, hoặc từ 8,5 đến 9, điều này có thể gia tăng hoạt tính kháng vi sinh vật của hợp chất BT vi hạt. Các chế phẩm kem đánh răng được mô tả ở đây có thể chứa một hoặc nhiều chất trong số đá phấn, dicanxi phosphat dihydrat,

sorbitol, nước, nhôm oxit hydrat hóa, silic oxit kết tủa, natri lauryl sulfat, natri carboxymetyl xenluloza, chất tạo hương, sorbitan monooleat, natri sacarin, tetranatri pyrophosphat, metyl paraben, propyl paraben. Một hoặc nhiều chất màu, ví dụ, FD&C Blue, có thể được dùng nếu cần. Các thành phần thích hợp khác mà có thể được chứa trong chế phẩm kem đánh răng đã được mô tả trong lĩnh vực này, ví dụ, trong patent Mỹ số 5,560,517.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm vệ sinh miệng là thuốc xịt miệng và chứa hợp chất BT vi hạt, chất đệm kiềm (ví dụ, kali bicarbonat), rượu, chất làm ngọt, và hệ tạo hương. Hệ tạo hương có thể còn chứa một hoặc nhiều chất sau: chất tạo hương, chất làm ẩm, chất hoạt động bề mặt, chất làm ngọt, và chất màu (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6,579,513). Các chất hoạt động bề mặt được mô tả ở đây và đã biết trong lĩnh vực này để sử dụng trong các chế phẩm vệ sinh miệng có thể là chất hoạt động bề mặt anion, không ion, hoặc lưỡng tính.

Theo phương án khác, chế phẩm vệ sinh miệng chứa BT vi hạt có thể được kết hợp với các thành phần hoạt tính bổ sung như taurolidin và taurultam, các chất này đã được mô tả trong lĩnh vực này và hữu dụng để chứa trong kem đánh răng, gel dùng cho răng, nước súc miệng để điều trị các bệnh nhiễm nghiêm trọng (xem, ví dụ, đơn yêu cầu cấp patent Anh số GB 1557163, patent Mỹ số 6,488,912). Như được mô tả ở đây, BT vi hạt cũng có thể được kết hợp với một hoặc nhiều chất kháng vi sinh vật bổ sung mà khi được kết hợp với BT vi hạt, kết hợp thu được sẽ có tác dụng bổ sung hoặc tác dụng đồng vận.

Theo phương án cụ thể khác, chế phẩm vệ sinh miệng theo sáng chế có thể còn chứa ít nhất là một hoặc nhiều chất chống màng sinh học để kiểm soát sự phát triển của màng sinh học, phá vỡ màng sinh học, hoặc giảm số lượng màng sinh học. Như được hiểu trong lĩnh vực này, việc dò tìm mật độ tới hạn giữa các loài có liên quan đến sự tạo thành màng sinh học. Các chất nhất định làm gia tăng quá trình phụ thuộc LuxS hoặc tín hiệu dò tìm mật độ tới hạn giữa các loài (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 7,427,408) góp phần vào việc kiểm soát sự phát triển và/hoặc tăng sinh của màng sinh học. Các chất đại diện bao gồm, ví dụ, các hợp chất phong bế N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserin lacton (OdDHL) và các chất tương tự N-

butyryl-L-homoserin lacton (BHL), ở dạng kết hợp hoặc riêng rẽ (xem, *ví dụ*, Patent Mỹ số 6455031). Chế phẩm vệ sinh miệng chứa hợp chất BT vi hạt và ít nhất là một chất chống màng sinh học có thể được phân phối khu trú để phá vỡ và ức chế màng sinh học vi khuẩn và để điều trị bệnh nha chu (xem, *ví dụ*, Patent Mỹ số 6,726,898).

Chế phẩm vệ sinh miệng theo sáng chế có thể chứa lượng hợp chất BT vi hạt đủ để tác dụng kháng vi sinh vật đáng kể trong thời gian cần thiết đối với việc chải răng, súc miệng hoặc dùng chỉ nha khoa thông thường. Như được mô tả ở đây hợp chất BT vi hạt có thể được giữ lại trên bề mặt miệng (như răng, hỗn hồng, compozit, màng niêm mạc, lợi). Hợp chất BT vi hạt được giữ lại trên răng và lợi sau khi hoàn thành việc đánh răng, súc miệng, dùng chỉ nha khoa, *ví dụ*, có thể tiếp tục cung cấp tác dụng chống màng sinh học và chống viêm kéo dài.

Theo các phương án khác, hợp chất BT vi hạt được giải phóng từ từ ra khỏi các polyme nhót dính hoặc các chất khác mà góp phần vào việc giữ lại hợp chất BT vi hạt trên bề mặt niêm mạc, bề mặt răng, và bề mặt hồi phục. Các hợp chất BT vi hạt có thể được bổ sung vào chế phẩm dạng nước ổn định, nhót, nhót dính, chế phẩm này cũng có thể được dùng để ngăn chặn và điều trị các bệnh loét, viêm, và/hoặc các rối loạn ăn mòn của màng nhầy và/hoặc được sử dụng để phân phối hợp chất có hoạt tính về mặt được lý đến bề mặt màng nhầy để điều trị khu trú hoặc để chuyển đến hệ tuần hoàn toàn thân (xem, *ví dụ*, Patent Mỹ số 7,547,433).

Theo phương án khác, các chế phẩm vệ sinh miệng chứa hợp chất BT vi hạt còn chứa dầu ô liu, dầu này có thể làm gia tăng sự loại bỏ mảng bám. Việc sử dụng dầu ô liu trong sản phẩm được dự tính để vệ sinh miệng, như kem đánh răng, nước súc miệng, thuốc phun, thuốc hít cho miệng, hoặc kẹo cao su, có thể góp phần loại trừ hoặc làm giảm mảng bám vi khuẩn và/hoặc để loại trừ hoặc làm giảm số lượng vi khuẩn có trong khoang miệng, nhờ đó đạt được sự giảm về tỷ lệ xuất hiện các bệnh nha khoa (*ví dụ*, bệnh sâu răng, bệnh nha chu) và chứng thối mồm (xem, *ví dụ*, Patent Mỹ số 7,074,391).

Theo các phương án khác, chế phẩm vệ sinh miệng chứa hợp chất BT vi hạt có thể còn chứa chế phẩm diệt khuẩn niêm mạc để dùng khu trú trong miệng. Chế phẩm vệ sinh miệng có thể còn chứa huyền phù nước hữu dụng để làm sạch lưỡi và cổ họng (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6,861,049). Theo phương án khác nữa, chế phẩm vệ sinh miệng chứa hợp chất BT vi hạt có thể còn chứa ít nhất là một chất chiết xuất bạc hà mà được dùng để phòng ngừa (*tức là*, làm giảm khả năng xuất hiện) sự tạo thành của ổ (răng sâu) hoặc giảm số lượng ổ. Một chiết xuất bạc hà, có tên là CaviStat® (Ortek Therapeutics, Inc., Roslyn Heights, NY), chứa arginin và canxi, giúp trung hòa độ pH axit và thúc đẩy sự bám dính của canxi vào bề mặt men răng. Do đó việc đưa chiết xuất bạc hà vào chế phẩm vệ sinh miệng chứa hợp chất BT vi hạt có thể làm gia tăng độ pH và gia tăng sự bám dính của hợp chất BT vi hạt vào bề mặt miệng.

Chế phẩm bám dính chứa Bismut-Thiol vi hạt được bào chế để dùng trong lĩnh vực nha khoa và chỉnh hình.

Theo phương án khác, chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt được bào chế để dùng trong phương pháp phòng ngừa hoặc làm giảm sự phát triển của vi sinh vật trên bộ phận giả khớp hoặc xương hoặc trên mô và cấu trúc xương liền kề với bộ phận giả khớp hoặc xương. Theo phương án cụ thể, các phương pháp được đề cập sử dụng các chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt để phòng ngừa và/hoặc điều trị bệnh nhiễm vi sinh vật và bệnh viêm do quá trình chỉnh hình (*ví dụ*, phẫu thuật chỉnh hình, liệu pháp chỉnh hình, tạo hình khớp (bao gồm tạo hình khớp hai bước), liệu pháp chỉnh hình răng mặt). Theo các phương án nhất định, chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt và xi măng sinh học, và theo các phương án nhất định khác, chứa hợp chất BT vi hạt và xi măng xương răng. Do đó, các chế phẩm này là hữu dụng để phòng ngừa và/hoặc điều trị (*tức là*, giảm hoặc ức chế sự phát triển, giảm khả năng xuất hiện hoặc tái phát) bệnh nhiễm vi sinh vật đối với cấu trúc xương và cấu trúc nâng đỡ (*tức là*, xương, khớp, cơ, dây chằng, gân) như viêm xương tủy. Các chế phẩm được mô tả ở đây chứa hợp chất BT vi hạt và xi măng sinh học hoặc xi măng xương răng có thể còn hữu dụng để phòng ngừa và/hoặc kiểm soát (*tức là*, làm chậm, làm trì hoãn, ức chế) sự phát triển của màng sinh học, phá vỡ màng sinh

học, hoặc giảm số lượng màng sinh học có mặt ở khớp và hoặc trên bề mặt, như bề mặt của khớp, xương, dây chằng, gân, hoặc răng hoặc khớp, xương (một phần hoặc toàn bộ), dây chằng, gân, hoặc răng thay thế.

Xi măng như được mô tả ở đây và được biết trong lĩnh vực này là chất kết dính để liên kết các chất liệu với nhau và có khả năng hóa rắn. Chất này có khả năng liên kết các mô với nhau hoặc có khả năng liên kết các chi tiết giả hoặc nhân tạo (ví dụ, khớp, xương hoặc răng giả) với mô liền kề. Xi măng sinh học bao gồm, ví dụ, polymetyl metacrylat (PMMA), magie phosphat, và canxi phosphat. Các dạng của canxi phosphat được dùng làm “xương thay thế” để điều trị các vết nứt và gãy ở xương, các vết nứt và gãy này có thể không hàn gắn đủ nhanh và/hoặc đủ thích hợp mà không có vật liệu cấy ghép. Các chế phẩm chứa xi măng sinh học (ví dụ, canxi phosphat) và hợp chất BT vi hạt cũng có thể được dùng để điều trị các khuyết tật xẹp xương bằng cách tạo tính nguyên vẹn về mặt cơ học cho xương xẹp. Xi măng có thể được tái hấp thu hoặc có thể được duy trì tại vị trí cấy ghép.

Theo các phương án cụ thể, chế phẩm theo sáng chế hữu dụng làm xi măng sinh học chứa hợp chất BT hoặc hợp chất BT vi hạt và dạng bào chế canxi phosphat hoặc magie phosphat là thích hợp để sử dụng làm xi măng sinh học. Dạng bào chế canxi phosphat hoặc magie sulfat cũng có thể được gọi ở đây lần lượt là xi măng sinh học chứa canxi phosphat hoặc bone cemen canxi phosphat hoặc xi măng sinh học chứa magie phosphat hoặc xi măng sinh học magie phosphat. Canxi phosphat có thể có trong chế phẩm ở dạng bất kỳ trong một số dạng đã biết và được dùng trong lĩnh vực này và bao gồm, ví dụ không giới hạn, hydroxyapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$); brushit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); monetit (CaHPO_4); hydroxyapatit thiếu canxi (CDHA, $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5\text{HPO}_4\text{OH}$); xi măng canxi sulfat/phosphat (CSPC) (xem, ví dụ, Hu et al., *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2009 October 13, e-publication ahead of print). Magie phosphat được sử dụng trong lĩnh vực này còn được gọi là xi măng struvit ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (xem, ví dụ, Grosshardt et al., *Tissue Eng. Part A*, 2010 Jul 30, e-pub ahead of print; xem thêm, ví dụ, Bohner et al., *J. Pharm. Sci.* 86:565-72; (1997); Fulmer et al., 3:299-305 (1992); Lobenhoffer et al., *J. Orthopaedic Trauma* 16:143-49 (2002); Lee et al., *J. Craniofac. Surg.* 21:1084-88

(2010)). Theo phương án cụ thể, chế phẩm theo sáng chế chứa hợp chất BT vi hạt và xi măng sinh học chứa canxi phosphat chứa canxi sulfat/phosphat (CSPC) ở dạng canxi phosphat (*xem, ví dụ, Hu et al., J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2009 October 13, e-publication ahead of print). Theo các phương án nhất định khác, các chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt và xi măng canxi phosphat hoặc magie phosphat có thể còn chứa chitosan (biopolyme từ các tế bào loài giáp xác); ít nhất là một hoặc nhiều chất kháng sinh hoặc chất kháng vi sinh vật; và/hoặc ít nhất là một hoặc nhiều chất chống viêm.

Xi măng sinh học đã được sử dụng trong lĩnh vực này để giải phóng thuốc và dược chất. Theo các phương án cụ thể nhất định, xi măng canxi phosphat có thể ở dạng, ít nhất là một phần, trung thể hydroxyapatit bao lấy dược chất (như chất kháng vi sinh vật) dùng để chữa bệnh (*xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6,730,324*). Các xi măng mà chứa trung thể này là hữu dụng để giải phóng chậm dược chất chứa trong trung thể. Sáng chế dự tính các chế phẩm chứa các trung thể canxi phosphat chứa hợp chất BT vi hạt này.

Ngoài ra sáng chế cũng đề cập đến các chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt và xi măng sinh học PMMA. Xi măng sinh học PMMA có thể được bào chế với hợp chất BT vi hạt theo các phương pháp được mô tả trong lĩnh vực này để bào chế PMMA với các chất khác có hoạt tính kháng vi sinh vật (*xem, ví dụ, đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP1649874*).

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt và xi măng xương răng (*tức là, chất kết dính nha khoa*), chế phẩm này có thể được dùng để ức chế, phòng ngừa, hoặc điều trị bệnh nhiễm vi sinh vật của răng hoặc lợi. Xi măng xương răng có thể chứa hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất hoặc chế phẩm sau: kẽm phosphat, ionome thủy tinh, alpha-tricanxi phosphat (α -TCP), alkyl metacrylat (*xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6,071,528*); bismut oxit (*xem, ví dụ, Bueno et al., Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 107:e65-69 (2009)); và kết tụ trioxit kim loại (mineral trioxide aggregate:MTA) (*xem, ví dụ, Hwang et al., Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 107:e96-102 (2009)).

Các phương án theo sáng chế dự tính sự thay thế các chất kháng vi sinh vật được bào chế với xi măng xương răng hoặc xi măng sinh học, mà đã được mô tả trong lĩnh vực này, bằng hợp chất BT vi hạt theo sáng chế để tạo ra các ưu điểm như được bộc lộ ở đây, bao gồm khoảng hoạt tính kháng vi sinh vật, độ tan và độ sinh khả dụng, tác dụng chống màng sinh học, tính không độc, tăng cường hiệu quả kháng sinh và các tính chất khác như được mô tả ở đây. Bone và xi măng xương răng có thể được bào chế với hợp chất BT vi hạt và một hoặc nhiều chất kháng sinh bổ sung theo các phương pháp được mô tả trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0205838; Alt et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:4-84-88 (2004); Bohner et al., *supra*; Bueno et al., *supra*; Chuard et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:625-32 (1993); *J. Orthopaed. Res.* 27:1008-15 (2009); De Lalla, *J. Chemother.* 13:48-53 (2001); Domenico et al., *Peptides* 25:2047-53 (2004); Widmer et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 35:741-46 (1991)).

Lượng hợp chất BT được sử dụng trong chế phẩm chứa BT vi hạt chứa xi măng sinh học hoặc xi măng xương răng có thể nằm trong khoảng từ 10 đến 500 μ g BT/g xi măng tương ứng. Hợp chất BT vi hạt, một mình hoặc kết hợp với ít nhất là một chất kháng sinh bổ sung, tạo ra các ưu điểm như được mô tả ở đây so với các chất kháng sinh hiện được dùng trong xi măng sinh học và xi măng xương răng. Các chế phẩm theo sáng chế chứa hợp chất BT vi hạt và xi măng sinh học (ví dụ, canxi phosphat) hoặc xi măng xương răng có thể còn chứa một hoặc nhiều chất hoặc hợp chất kháng vi sinh vật bổ sung. Đặc biệt hữu dụng là chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt và chất kháng vi sinh vật thứ hai mà khi được dùng kết hợp sẽ có tác dụng kháng vi sinh vật đồng vận hoặc tăng cường, như được mô tả ở đây. Bằng cách ví dụ bổ sung, tác dụng kháng vi sinh vật tăng cường có thể được quan sát thấy khi hợp chất BT vi hạt được dùng cùng với chất kháng vi sinh vật mà tạo chelat với sắt. Các phương án cụ thể khác, hợp chất BT vi hạt được bào chế với chất, hợp chất, phân tử nhỏ, hoặc phân tử lớn chống viêm (như peptit hoặc polypeptit).

Các chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt và xi măng sinh học như được mô tả ở đây cũng có thể được sử dụng để phủ phần cứng (ví dụ, ốc, đĩa, đinh kẹp, đinh ghim, và dây, v.v.) được sử dụng để gắn, làm ổn định, hoặc cố định chỗ gãy xương, chỗ gắn xương, chỗ đục xương, hoặc chỗ thay khớp. Các chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt và xi măng xương răng như được mô tả ở đây có thể được sử dụng để phủ tủy răng, vỏ răng, lớp lót, răng, hoặc làm chế phẩm phục hồi hoặc nhồi nha khoa trong răng, hoặc chế phẩm tương tự. Các chế phẩm này có thể được bào chế thành chất phủ để có thể phết lên, cố định lên, bám dính lên, hoặc theo một số cách là cho tiếp xúc với bề mặt của phần cứng liên quan đến xương và/hoặc khớp. Theo các phương án cụ thể, chất phủ chứa hợp chất BT vi hạt và xi măng sinh học canxi phosphat hoặc magie phosphat. Hợp chất BT vi hạt và canxi phosphat hoặc magie phosphat được bào chế cùng với nhau để phết lên phần cứng xương theo các phương pháp được thực hiện trong lĩnh vực này. Ví dụ, chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt và xi măng sinh học (ví dụ, xi măng sinh học canxi phosphat hoặc magie phosphat) có thể ở dạng lỏng, gel, bột nhão hoặc thuốc phun (ví dụ, thuốc phun nhiệt bao gồm thuốc phun plasma) để phết lên phần cứng. Chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt và xi măng sinh học có thể ở dạng gel (ví dụ, hydrogel, thiomers, aerogel, hoặc organogel) hoặc dạng lỏng. Organogel có thể chứa dung môi hữu cơ, axit lipoic, dầu thực vật, hoặc dầu khoáng. Chế phẩm giải phóng chậm có thể phân phối lượng có hiệu quả kháng vi sinh vật của hợp chất BT vi hạt trong 1, 2, 3, 4, 5, 6, hoặc 7 ngày (1 tuần) hoặc trong 2, 3, 4, 5, 6, 7 tuần, hoặc 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 tháng. Tốc độ giải phóng có thể được kiểm soát, ít nhất là một phần, theo tính chất xốp của xi măng (xem, ví dụ, Bohnert et al., *supra*).

Chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt và xi măng sinh học hoặc xi măng xương răng có thể được kết hợp với ít nhất là một chất kháng vi sinh vật khác (tức là, chất kháng vi sinh vật thứ hai, thứ ba, thứ tư, v.v.) mà khi được dùng kết hợp sẽ có tác dụng kháng vi sinh vật đồng vận hoặc tăng cường (tức là, lớn hơn tác dụng phụ thêm). Ví dụ, tác dụng kháng vi sinh vật tăng cường có thể được quan sát thấy khi hợp chất BT vi hạt được dùng đồng thời với chất kháng vi sinh vật mà tạo chelat với sắt. Theo các phương án cụ thể, chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt và xi măng sinh học hoặc xi măng xương răng có thể được kết hợp với ít nhất là một chất

kháng vi sinh vật khác và/hoặc chất chống viêm được chọn từ: Chất kháng vi sinh vật: ví dụ, clohexidin; chiết xuất cỏ rễ máu; metronidazol; các hợp chất amoni bậc bốn (như xetylpyridini clorua); các điguanua (ví dụ, clohexidin digluconat, hexetidín, octenidin, alexidin); các hợp chất bisphenolic được halogen hóa (ví dụ, 2,2' metylenbis-(4-clo-6-bromophenol) hoặc các hợp chất phenolic kháng khuẩn khác; alkylhydroxybenzoat; các peptit có tính cation kháng vi sinh vật; aminoglycosit; quinolon; lincosamit; penixilin; xephalosporin, macrolit; tetraacyclin; các chất kháng sinh khác đã biết trong lĩnh vực này; tinh dầu *Coleus forskohlii*; các chất kháng vi sinh vật trên cơ sở bạc hoặc keo bạc; các chất kháng vi sinh vật trên cơ sở thiếc hoặc đồng; dầu Manuka; các chiết xuất oregano; cỏ xạ hương; hương thảo; hoặc các thảo mộc khác; và chiết xuất hạt bưởi. Các chất chống viêm hoặc chống oxy hóa: ví dụ, ibuprofen, flurbiprofen, aspirin, indomethaxin, chiết xuất lô hội, nghệ, lá ô liu, đình hương, panthenol, retinol, các axit béo omega-3, axit gamma-linolenic (GLA), trà xanh, gừng, hạt nho, v.v. Theo các phương án cụ thể, chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt và xi măng sinh học hoặc xi măng xương răng có thể còn chứa chất kháng sinh được chọn từ clindamixin, vancomixin, daptomixin, cefazolin, gentamixin, tobramixin, metronidazol, cefaclor, ciprofloxacin, hoặc các chất kháng vi sinh vật khác như các hợp chất amoni bậc bốn (ví dụ, benzalkoni clorua, xetyl pyridini clorua), zeolit kháng vi sinh vật, hydroxit của kim loại kiềm, hoặc oxit của kim loại kiềm thổ. Chế phẩm này có thể tùy ý chứa một hoặc nhiều chất mang được dùng (tức là, tá dược), chất hoạt động bề mặt, chất đệm, chất pha loãng, và muối và các chất tẩy trắng, được mô tả ở đây. Các chất kháng vi sinh vật có thể được bào chế với xi măng xương răng và xi măng sinh học như được mô tả ở đây và trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Akashi et al., *Biomaterials* 22:2713- 17 (2001); Patent Mỹ số 6,071,528; Alt et al., *supra*).

Các mô hình động vật gây nhiễm vật lạ có thể được sử dụng để mô tả hoạt tính kháng vi sinh vật của chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt và xi măng xương răng hoặc xi măng sinh học (xem, ví dụ, Chuard et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993;37:625–32). Hiệu quả in vivo của các chất kháng sinh trong các mô hình này tương quan với khả năng của các chất kháng vi sinh vật trong việc diệt các vi sinh vật pha tĩnh và các vi sinh vật bám vào vật liệu đưa vào bên ngoài (xem,

ví dụ, Widmer et al. *J. Infect. Dis.* 1990;162:96–102; Widmer et al. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:741–6; xem thêm, ví dụ, Karchmer. *Clin. Infect. Dis.* 1998;27:714–6).

Bằng cách ví dụ không giới hạn và chỉ nhằm mục đích minh họa, xi măng sinh học có thể chứa hợp chất BT vi hạt trong copolyme metyl methacrylat styren (2/2) 75%, polymethylmetacrylat 15% (để giúp đỡ cho chế phẩm), và bari sulfat 10% (để chắn tia bức xạ), và từ 10 đến 500µg hợp chất BT vi hạt/g bột xi măng (tức là, 0,001 – 0,05% trọng lượng/trọng lượng). Theo các phương án cụ thể khác, ít nhất là một chất kháng vi sinh vật bổ sung có thể được thêm vào.

Chế phẩm chứa Bismut-Thiol vi hạt được bào chế với sơn và chế phẩm sơn phủ.

Các phương án nhất định khác dự tính việc kết hợp các hợp chất BT vi hạt được mô tả ở đây vào sơn hoặc lên sơn làm chế phẩm sơn phủ để làm giảm vết bẩn sinh học và ngăn ngừa và/hoặc kiểm soát (tức là, làm chậm, trì hoãn, ức chế) sự phát triển của màng sinh học, phá vỡ màng sinh học, hoặc giảm lượng màng sinh học có trên bề mặt được sơn. Các chế phẩm theo sáng chế chứa hợp chất BT vi hạt có thể được bào chế với sơn hoặc chế phẩm sơn phủ mà được dùng cho đối tượng bất kỳ trong số rất nhiều đối tượng sản xuất, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở, thiết bị y tế, thiết bị chỉnh hình, thiết bị nha khoa, thiết bị công nghiệp, thiết bị điện tử, tường, sàn, trần, mái, cọc, bến tàu, cầu tàu, ống dẫn, đường ống và các kết cấu đường ống (ví dụ, lưới lấy nước vào, tháp giải nhiệt), các bộ trao đổi nhiệt, bể nước, và vải dệt, và các bề mặt khác, như các bề mặt có trong và trên xe cộ thuộc tất cả các loại, bao gồm xe ô tô, tàu hỏa, máy bay, và các thiết bị dưới nước như tàu, thuyền, tàu ngầm và các thiết bị dưới nước khác.

Theo phương án cụ thể, chế phẩm và phương pháp theo sáng chế là hữu dụng để ngăn ngừa và/hoặc làm giảm vết bẩn sinh học hoặc màng sinh học mà tạo thành trên đối tượng sản xuất tiếp xúc với nước. Sự tạo thành màng sinh học trên bề mặt trong môi trường biển được cho là yếu tố quan trọng góp phần vào sự xâm chiếm và tuyền thêu của một số cộng đồng loài không xương sống không cuống

trên các cấu trúc trên biển (xem, ví dụ, Siboni et al., *FEMS Microbiol Lett* 2007;274:24-9). Các tương tác sau đó của các sinh vật vĩ mô một vùng với các màng vi sinh vật này trong vài ngày hoặc vài tuần sẽ dẫn đến sự gắn kết và phát triển của các loài không xương sống và tảo, các loài này chịu trách nhiệm cho hầu hết trở ngại thủy động lực đi kèm với vết bẩn sinh học (xem, ví dụ, Schultz, *Biofouling* 2007;23:331-41). Các màng sinh học cũ trên bề mặt hỗ trợ sự gắn kết ấu trùng hàu, bất kể loại lớp nền (xem, ví dụ, Hunga et al., *J Exptl Marine Biol Ecol* 2008;361:36-41). Các màng sinh học cũng làm gia tăng đáng kể lực bám dính trong lớp hải tiêu *Phallusia nigra*, giun ống nhiều tơ *Hydroides elegans*, và hàu *Balanus amphitrite* tại một hoặc nhiều giai đoạn phát triển (xem, ví dụ, Zardus et al., *Biol Bull* 2008;214:91-8). Các màng sinh học cũng có thể làm gia tăng sự gắn kết của con trai Zebra (*Dreissena polymorpha*) với một số bề mặt nhân tạo (xem, ví dụ, Kavouras & Maki. *Inverteb Biol* 2005;122:138-51), điều này đã dẫn đến thất thoát hàng triệu đến hàng tỷ đô la và tổn chi phí cho hải sản, năng lượng, và các ngành công nghiệp sản xuất và tổn chi phí cho các thiết bị xử lý nước và nước thải và gây hư hại đáng kể cho hệ sinh thái mà con trai nuôi.

Trong môi trường biển, nước lợ, và nước ngọt, các sinh vật tập hợp, lắng đọng, gắn kết, và phát triển trên các cấu trúc và thiết bị chìm dưới nước. Các sinh vật này bao gồm tảo, nấm và các vi sinh vật khác, và các động vật thủy sinh, như loài có vỏ, loài thủy tức, loài hai vỏ, sinh vật chỉ thị (bryozoan), giun nhiều tơ, bọt biển, và hàu. Sự có mặt của các sinh vật này, được biết như là “vết bẩn” của cấu trúc, có thể gây hại, ví dụ, bằng cách thêm trọng lượng cho cấu trúc này và/hoặc làm vướng thủy động lực của nó do đó làm giảm hiệu suất vận hành của nó, gia tăng độ nhạy với ăn mòn, và làm thoái hóa hoặc làm gãy cấu trúc này.

Các sơn và chế phẩm phủ nhất định được dùng cho đến nay để ngăn ngừa hoặc làm giảm sự tạo thành vết bẩn sinh học và màng sinh học chứa các thành phần độc hại mà trong khi ức chế sự tạo thành vết bẩn sinh học và màng sinh học có thể còn gây hại đến hệ động thực vật mong muốn và có lợi. desired và beneficial flora và fauna. Các bioxit và hóa chất độc đại diện bao gồm đồng và các hợp chất chứa đồng (ví dụ, đồng oxit), thủy ngân, asen, tributyl thiếc oxit (TBT), các hợp chất

thiêu hữu cơ (*tức là*, thiêu liên kết với một hoặc nhiều nhóm cacbon), hexio hai phần bisphenol-A-(các hợp chất epichlorhydrin epoxy, các nhựa glycidyl ete epoxy hai chức, glycidyl ete epoxy, và bari metaborat epoxy).

Các hợp chất BT vi hạt theo sáng chế cung cấp phương án không độc và có nhiều ưu điểm như được mô tả ở đây, bao gồm khoảng hoạt tính kháng vi sinh vật, độ tan và độ sinh khả dụng, tác dụng chống màng sinh học, tăng cường hiệu quả kháng sinh, và các tính chất khác như được mô tả ở đây. Hợp chất BT vi hạt có thể thay thế cho các chất kháng vi sinh vật khác trong sơn và các chế phẩm sơn phủ và có thể được đưa vào các sơn và chế phẩm sơn phủ này bằng cách kết hợp hợp chất BT vi hạt và phương pháp được mô tả ở đây, với các quy trình đã biết để sản xuất sơn và chế phẩm sơn phủ chứa chất diệt sinh vật (*xem, ví dụ, các patent Mỹ số 4,596,724; 4,410,642; 4,788,302; 5,470,586; 6,162,487; 5,384,176; các công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2007/125703 và 2009/0197003; Gerhart et al., J. Chem. Ecol. 14:1905-17 (1988); Sears et al., J. Chem. Ecol. 16:791-99 (1990); Ganguli et al., Smart Mater. Struct. 18:104027 (2009); Cao et al., ACS Applied Materials Interfaces 1:494 (2009); Kumar et al., Nature Materials 7:236-41 (2008)). Các sơn mà hợp chất BT vi hạt có thể được đưa vào bao gồm sơn epoxy, silicon, hoặc acrylic. Theo các phương án cụ thể hơn, hợp chất BT vi hạt có thể được đưa vào sơn được sản xuất để sử dụng trong môi trường biển và tiếp xúc với nước biển và các sơn này bao gồm, ví dụ, sơn dựa trên cơ sở nhựa alkyd, sơn dựa trên cơ sở Bitumen, sơn dựa trên cơ sở Gilsonite, sơn dựa trên cơ sở cao su được clo hóa, và sơn dựa trên cơ sở nhựa epoxy.*

Các chất kháng vi sinh vật có thể được giải phóng theo cách thức được kiểm soát bằng cách đưa các chất này vào chế phẩm sơn phủ. Các phương pháp làm gia tăng tốc độ giải phóng thuốc ra khỏi các vật liệu compozit đã được biết đến trong lĩnh vực này. Vật liệu compozit có thể bao gồm chất nền polyme có thể hấp thu sinh học tự nhiên hoặc tổng hợp và pha hạt thuốc được phân tán trong đó (*xem, ví dụ, các patent Mỹ số 7,419,681 và 5,028,664; xem thêm, ví dụ, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2009/0043388*). Ví dụ, chế phẩm sơn phủ rửa giải thuốc có thể chứa ít

nhất là một hợp chất BT vi hạt được phân tán trong các chất kết dính có hoạt tính về mặt sinh học, được cải biến.

Hợp chất BT vi hạt cũng có thể được sản xuất để giải phóng từ từ ra khỏi chế phẩm chứa the hợp chất BT vi hạt được dùng cho bề mặt được sơn. Hợp chất BT vi hạt cũng có thể được đưa vào chế phẩm phủ (ví dụ, chế phẩm phủ epoxy), chế phẩm này có thể được phết lên, cố định vào, bám dính vào, hoặc theo một số cách là cho tiếp xúc với bề mặt của cấu trúc được sơn hoặc đối tượng sản xuất. Hợp chất BT vi hạt có thể được giải phóng từ từ ra khỏi các chế phẩm này. Chế phẩm giải phóng chậm chứa hợp chất BT vi hạt có thể ở dạng gel (ví dụ, hydrogel, thiomers, aerogel, hoặc organogel) hoặc dạng lỏng. Organogel có thể chứa dung môi hữu cơ, axit lipoic, dầu thực vật, hoặc dầu khoáng. Chế phẩm giải phóng chậm có thể phân phối lượng có hiệu quả kháng vi sinh vật của hợp chất BT vi hạt trong 1, 2, 3, 4, 5, 6, hoặc 7 ngày (1 tuần) hoặc trong 2, 3, 4, 5, 6, 7 tuần, hoặc 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 tháng.

Các chế phẩm phủ khác được dùng trong lĩnh vực này và chứa hợp chất BT vi hạt theo sáng chế có thể chứa các polysacarit bao gồm chất nền polysacarit được liên kết ngang có thể nghịch đảo với các cation kim loại đa hóa trị (xem, ví dụ, Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2009/0202610); các ống nano titan oxit; các bề mặt có cấu trúc nano; nanoceria được phủ dextran tương thích sinh học với các tính chất chống oxy hóa phụ thuộc độ pH; các polyme khối polysulfon; và các chế phẩm phủ có thể thoái biến sinh học khác (xem thêm, ví dụ, Patent Mỹ số 6,162,487). Các chế phẩm phủ khác được dự tính ở đây là các chế phẩm phủ chứa hợp chất BT vi hạt với chất sát trùng chống bẩn và chống ăn mòn được dùng trong công nghiệp, và bao gồm, ví dụ, flopolyme sáp Carnauba, Xylan®, PTFE, và vật liệu moly.

Nồng độ hợp chất BT vi hạt (tính theo trọng lượng) trong sơn hoặc chế phẩm sơn phủ có thể, ví dụ, thay đổi từ rất nhỏ khoảng 0,001% đến 0,1%, tùy thuộc vào mục đích sử dụng và tính chất mong muốn của sơn hoặc chế phẩm sơn phủ này. Hợp chất BT vi hạt (hoặc chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt) được đưa vào sơn hoặc chế phẩm sơn phủ có thể được kết hợp với ít nhất là một chất kháng vi sinh

vật khác (*tức là*, chất kháng vi sinh vật thứ hai, thứ ba, thứ tư, v.v.) mà khi được dùng kết hợp sẽ có tác dụng kháng vi sinh vật đồng vận hoặc tăng cường như được mô tả ở đây. Ví dụ không giới hạn, chất kháng vi sinh vật có thể được chứa trong chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt bao gồm clohexidin; chiết xuất cỏ rễ máu; metronidazol; các hợp chất amoni bậc bốn (như xetylpyridini clorua); các điguanua (*ví dụ*, clohexidin digluconat, hexetidin, octenidin, alexidin); các hợp chất bisphenolic được halogen hóa (*ví dụ*, 2,2' metylenbis-(4-clo-6-bromophenol) hoặc các hợp chất phenolic kháng khuẩn khác; alkylhydroxybenzoat; các peptit có tính cation kháng vi sinh vật; aminoglycosit; quinolon; lincosamit; penixilin; xephalosporin, macrolit; tetraacyclin; các chất kháng sinh khác đã biết trong lĩnh vực này; tinh dầu *Coleus forskohlii*; các chất kháng vi sinh vật trên cơ sở bạc hoặc keo bạc; các chất kháng vi sinh vật trên cơ sở thiếc hoặc đồng; dầu Manuka; các chiết xuất oregano; cỏ xạ hương; hương thảo; hoặc các thảo mộc khác; và chiết xuất hạt bưởi. Chế phẩm này có thể tùy ý còn chứa chất hoạt động bề mặt, chất pha loãng hoặc chất mang, chất đệm, và/hoặc chất tẩy trắng đã nêu trên đây.

Chế phẩm chứa Bismut-Thiol vi hạt được sản xuất với hợp chất xi măng hoặc bê tông.

Các phương án nhất định khác dự tính việc đưa hợp chất BT vi hạt theo sáng chế vào xi măng công nghiệp và vào trong hoặc trên bê tông, vữa, và vữa lỏng, bao gồm chế phẩm phủ bê tông, vữa, và vữa lỏng để ngăn ngừa và/hoặc kiểm soát (*tức là*, làm chậm, trì hoãn, ức chế) sự phát triển của màng sinh học, phá vỡ màng sinh học, hoặc giảm số lượng màng sinh học có trên bề mặt bê tông. Các vi sinh vật phát triển trên và trong các cấu trúc bê tông làm giảm thời gian sử dụng của sản phẩm và có thể có hại tới sức khỏe của động vật và con người mà tiếp xúc với các vi sinh vật có mặt trên bề mặt bê tông (*xem, ví dụ, Idachaba et al., Waste Manag. Res. 19:284-91 (2001); Idachaba et al., J. Hazard. Mater. 90:279-95 (2002); Tazaki, Canadian Mineralogist 30:431-34 (1992)*)).

Như được sử dụng ở đây và trong lĩnh vực này, xi măng đề cập đến chất bột khô (thường là đá vôi mà có thể còn chứa các chất bổ sung) được sử dụng để gắn kết các vật liệu kết tụ của bê tông. Xi măng đại diện được mô tả trong lĩnh vực này

được gọi là xi măng Portland thông thường, xi măng Portland lò cao, xi măng xây, xi măng xi vôi, và xi măng canxi aluminat. Khi bổ sung nước và/hoặc chất phụ gia, hỗn hợp xi măng được gọi là bê tông, đặc biệt nếu các chất kết tụ đã được bổ sung. Bê tông là vật liệu hỗn hợp bao gồm chất kết tụ (ví dụ, sỏi và cát), xi măng, và nước. Xi măng được dùng trong lĩnh vực xây dựng được đặc trưng là chịu nước hoặc không chịu nước. Xi măng chịu nước thường được dùng để xây dựng các tòa nhà bằng gạch trong khí hậu ẩm ướt; dùng cho các công trình xây dựng cảng và các công trình tương tự mà tiếp xúc với nước biển; và dùng để phát triển bê tông cường độ cao.

Các chế phẩm theo sáng chế chứa các hợp chất BT vi hạt có thể được dùng để phủ hoặc có thể được trộn với xi măng được sử dụng cho các cấu trúc bê tông bao gồm, ví dụ, cầu, tòa nhà, đường ống, đường cao tốc, đường hầm, chỗ đỗ xe, giàn khoan dầu ngoài biển, cầu tàu, tường đập ngăn nước, đường ống và hệ thống nước, sàn, mặt bếp, vỉa hè, đường lái xe vào nhà, bến chắt hàng, các cấu trúc sân trượt pa tanh, và các cấu trúc xử lý rác thải phóng xạ. Các hợp chất BT vi hạt theo sáng chế có thể được đưa vào xi măng như được mô tả trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 7,507,281). Tính kiềm của xi măng hoặc bê tông có thể còn làm tăng cường tác dụng kháng vi sinh vật của hợp chất BT vi hạt.

Xi măng cũng có thể bị suy biến bởi sự axit hóa của vi khuẩn, như *Thiobacillus thiooxidans*. Ví dụ không giới hạn chỉ nhằm mục đích minh họa và không giới hạn, hợp chất bismut thiol, BisEDT (nhưng không phải là hợp chất BT vi hạt theo sáng chế), đã được chứng minh là làm chậm sự phát triển của *T. thiooxidans* trong bê tông được dùng cho hệ thống xử lý rác và chất thải hạt nhân. Khoảng kháng khuẩn hữu hiệu của BisEDT trong bê tông được chứng minh là 10-500 µg/g, hoặc 0,001-0,05%. Mức BisEDT cao hơn cản trở cường độ bê tông. Các hợp chất khác, như BisPYR, có thể là hữu dụng để ức chế sự làm bản và sự phát triển của màng sinh học do nấm mốc và tảo. Các phương án theo sáng chế dự tính sự thay thế các hợp chất bismut thiol và các chất kháng vi sinh vật khác bằng hợp chất BT vi hạt theo sáng chế để tạo ra các ưu điểm được mô tả ở đây, bao gồm khoảng hoạt tính kháng vi sinh vật, độ tan và độ sinh khả dụng, tác dụng chống

màng sinh học, tính không độc, tăng cường hiệu quả kháng sinh và các tính chất khác như được mô tả ở đây.

Hợp chất BT vi hạt có thể được đưa vào bề mặt bê tông bằng tay hoặc tự động ở dạng gel, chế phẩm phun, bột nhão, dạng lỏng, hoặc dạng bột hoặc các dạng khác mà chuyên gia trong lĩnh vực này đã biết. Theo các phương án cụ thể, hợp chất BT vi hạt, ở dạng bột hoặc dạng lỏng được trộn với ít nhất là một hoặc nhiều thành phần bổ sung, các thành phần này có thể bao gồm ít nhất là một thành phần hoạt tính về mặt sinh học bổ sung và/hoặc tá dược không có hoạt tính về mặt sinh học, để tạo ra sản phẩm, sản phẩm này được phân phối hoặc tiêm định kỳ vào trong hoặc trên cấu trúc bê tông (*tức là*, trên bề mặt của cấu trúc bê tông mà tiếp xúc, đặc biệt là bề mặt tiếp xúc với nước). Các chế phẩm có thể được sản xuất bởi chuyên gia trong lĩnh vực này bằng cách sử dụng một số phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, hợp chất BT vi hạt với lượng hữu hiệu kháng vi sinh vật kết hợp với DMSO có thể được sử dụng (*ví dụ*, 1mg/ml hợp chất BT vi hạt trong DMSO). Với việc sử dụng thông thường, lượng hợp chất BT vi hạt đủ để ngăn ngừa sự tạo thành màng sinh học là mong muốn. Tuy nhiên, theo các phương án khác, lượng hợp chất BT vi hạt có thể cao hơn để làm giảm, loại bỏ, phá vỡ, hoặc loại trừ sự tồn tại của màng sinh học trên bề mặt bê tông.

Hợp chất BT vi hạt cũng có thể được điều chế để giải phóng chậm ra khỏi chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt được dùng cho bề mặt cấu trúc bê tông. Hợp chất BT vi hạt cũng có thể được đưa vào chế phẩm phủ (*ví dụ*, chế phẩm phủ epoxy), chế phẩm này có thể được phết lên, cố định lên, dính bám lên, hoặc theo một số cách thức là cho tiếp xúc với bề mặt của cấu trúc bê tông. Hợp chất BT vi hạt có thể được giải phóng chậm ra khỏi các chế phẩm này. Chế phẩm giải phóng chậm chứa hợp chất BT vi hạt có thể ở dạng gel (*ví dụ*, hydrogel, thiomer, aerogel, hoặc organogel) hoặc dạng lỏng. Organogel có thể chứa dung môi hữu cơ, axit lipoic, dầu thực vật, hoặc dầu khoáng. Chế phẩm giải phóng chậm có thể phân phối lượng có hiệu quả kháng vi sinh vật của hợp chất BT vi hạt trong 1, 2, 3, 4, 5, 6, hoặc 7 ngày (1 tuần) hoặc trong 2, 3, 4, 5, 6, 7 tuần, hoặc 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 tháng.

Hợp chất BT vi hạt (hoặc chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt) có thể được kết hợp với ít nhất là một chất kháng vi sinh vật khác (*tức là*, chất kháng vi sinh vật thứ hai, thứ ba, thứ tư, v.v.) mà khi được dùng kết hợp sẽ có tác dụng kháng vi sinh vật đồng vận hoặc tăng cường như được mô tả ở đây. Ví dụ, tác dụng kháng vi sinh vật đồng vận hoặc tăng cường có thể được quan sát thấy khi hợp chất BT vi hạt được dùng đồng thời với chất kháng vi sinh vật mà tạo chelat với sắt. Hợp chất BT vi hạt theo sáng chế có thể được kết hợp với ít nhất là một chất kháng vi sinh vật khác, bao gồm chất diệt nấm hoặc chất diệt tảo. Ví dụ không giới hạn, các chất kháng vi sinh vật có thể có trong chế phẩm chứa hợp chất BT vi hạt bao gồm clohexidin; chiết xuất cỏ rễ máu; metronidazol; các hợp chất amoni bậc bốn (như xetylpyridini clorua); các điguanua (*ví dụ*, clohexidin digluconat, hexetidin, octenidin, alexidin); các hợp chất bisphenolic được halogen hóa (*ví dụ*, 2,2' metylenbis-(4-clo-6-bromophenol) hoặc các hợp chất phenolic kháng khuẩn khác; alkylhydroxybenzoat; các peptit có tính cation kháng vi sinh vật; aminoglycosit; quinolon; lincosamit; penixilin; xephalosporin, macrolit; tetraxyclin; các chất kháng sinh khác đã biết trong lĩnh vực này; tinh dầu *Coleus forskohlii*; các chất kháng vi sinh vật trên cơ sở bạc hoặc keo bạc; các chất kháng vi sinh vật trên cơ sở thiếc hoặc đồng; dầu Manuka; các chiết xuất oregano; cỏ xạ hương; hương thảo; hoặc các thảo mộc khác; và chiết xuất hạt bưởi. Các chế phẩm này có thể tùy ý còn chứa chất hoạt động bề mặt, chất pha loãng hoặc chất mang, chất đệm, và/hoặc chất tẩy trắng, các chất này đã được nêu trên đây.

Hợp chất BT vi hạt được điều chế với các thiol kỵ nước (*ví dụ*, thioclophenol) có thể được sử dụng và có thể có khả năng lớn hơn so với các hợp chất BT kém kỵ nước hơn trong việc dính bám vào bề mặt bê tông, đặc biệt là các bề mặt tiếp xúc với nước. Hợp chất BT có điện tích thực âm, như các hợp chất có tỷ lệ mol 1:2 (bismut:thiol) cũng có thể có tính chất dính bám tốt.

BT vi hạt trong các sản phẩm cao su, silicon và chất dẻo.

Các phương án nhất định dự tính sự kết hợp hợp chất BT vi hạt theo sáng chế vào trong hoặc trên bề mặt nhân tạo bao gồm chế phẩm phủ cao su và/hoặc cao su tự nhiên và tổng hợp, bao gồm silicon và chế phẩm phủ silicon, để khử màng

sinh học và vết bản sinh học trên bề mặt cao su này, ví dụ, trong các thiết bị y tế (ví dụ, ống thông, stent, ống thông Foley và các ống thông tiết niệu khác, ống đặt dạ dày, ống cấp thức ăn, v.v.), các thiết bị chỉnh hình, các thiết bị nha khoa, các thiết bị công nghiệp, các thiết bị điện tử, các bề mặt như các bề mặt có trong và trên xe cộ thuộc tất cả các loại, bao gồm xe hơi, lớp xe, cửa và cửa sổ, ống vòi, dây an toàn, chiếu thảm, sàn và bộ giảm chấn (bộ chống rung lắc), tàu hỏa, máy bay, tàu, thuyền, tàu ngầm, cọc, ống, đường ống, vật liệu làm ống và vải dệt, các phụ kiện ống/nước, các đồ gia dụng, các vật liệu làm sàn, các sản phẩm giày dép, thiết bị thể thao, điện thoại di động, thiết bị và chi tiết máy tính mà dùng chất độn hữu cơ, các sản phẩm dùng ngoài trời bao gồm ván mái, mái hiên, vải dầu, màng lợp mái, và lớp lót bể bơi, và còn bao gồm các sản phẩm và hệ thống khử trùng dùng cho việc bảo quản thực phẩm và đồ uống, sản xuất dược phẩm, và khử trùng nước và hóa chất.

Hợp chất BT vi hạt theo sáng chế có thể được đưa vào các sản phẩm này và các sản phẩm cao su tự nhiên và nhân tạo khác bằng cách kết hợp chế phẩm BT và phương pháp theo sáng chế, với các quy trình sản xuất đã biết để sản xuất các loại sản phẩm này. Ví dụ không giới hạn để minh họa và không giới hạn, các BT (mà không phải là các BT vi hạt theo sáng chế) đã được đưa vào các thanh polyuretan được phủ hydrogel và các mô ghép Dacron (Domenico et al. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1417-1421; Domenico et al., *Peptides* 2004;25:2047-53). Công bố đơn quốc tế số WO/2002/077095 và đơn yêu cầu cấp patent Nhật số 1997-342076 đã mô tả các chế phẩm cao su thô được lưu hóa sơ bộ và/hoặc được lưu hóa chứa hợp chất trên cơ sở bạc để tạo ra các tính chất kháng vi sinh vật; các patent Mỹ số 6,448,306, 6,555,599, 6,638,993, 6,848,871, 6,852,782, 6,943,205, và 7,060,739 đã chỉ ra việc sử dụng các chất kháng vi sinh vật trên cơ sở bạc trong chất nền cao su. Chế phẩm silicon rửa giải được chất có thể chứa chất kháng vi sinh vật được phân tán trong các chất kết dính có hoạt tính sinh học, được cải biến mà được dùng cho các thiết bị y tế hoặc các bề mặt khác mà không sử dụng các chất mang polyme trơ (công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2009/0043388).

Dầu silicon thường có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 2.000 đến 30.000 với độ nhớt nằm trong khoảng từ 20 đến 1.000 xentistok. Cao su silicon thường có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 40.000 đến 100.000 với độ nhớt nằm trong khoảng từ 10 đến 1.000 stok. Silicon được dùng trong nhiều loại chất liệu mà thường là đối tượng bị nhiễm bẩn vi sinh vật. Các chất liệu này bao gồm chất chống thấm, chất bít kín, chất bôi trơn, dầu, chất phun, cao su, ống vôi và mô cấy. Các chế phẩm chống bẩn trên cơ sở silicon và các chế phẩm phủ kháng vi sinh vật khác đã được mô tả nhưng có các nhược điểm là hiệu quả kém, tính bền kém, tính tương thích sinh học kém, mất hoạt tính kháng vi sinh vật, thời gian sử dụng ngắn, chi phí nguyên liệu cao và các vấn đề khác (ví dụ, Schultz *J Fluids Eng* 2004;126:1039-47; patent Mỹ số 4,025,693; Yan & Li. *Ophthalmologica* 2008;222:245-8; patent Mỹ số 6,221,498; patent Mỹ số 7,381,751; đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số EP0506113; Sawada et al. *JPRAS* 1990;43:78-82; Tiller et al. *Surface Coatings International Part B: Coatings Transactions* 2005;88:1-82; Juhni & Newby *Proceedings Annual Meeting Adhesion Society* 2005;28:179-181; Ozdamar et al. *Retina* 1999;19:122-6; Piccirillo et al. *J Mater Chem* 2009;19:6167; US Pub. 2009/0215924; Bayston et al. *Biomaterials* 2009;30:3167-73; Gottenbos et al. *Biomaterials* 2002;23:1417-23; Millsap et al. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2001;79:337-43). Mặc dù các công bố này đã mô tả các phương pháp để đưa các chất kháng vi sinh vật vào sản phẩm cao su sản xuất, nhưng không có sản phẩm hoặc quy trình nào mô tả các ưu điểm được mô tả ở đây đối với các BT vi hạt theo sáng chế.

Do đó, các phương án theo sáng chế dự tính việc thay thế các BT vi hạt theo sáng chế trong các sản phẩm và quy trình này và các quy trình và các sản phẩm cao su tương tự (bao gồm silicon), cũng như trong các phương pháp sản xuất polyme và chất dẻo như các phương pháp được mô tả dưới đây. Trong mỗi trường hợp trong số các các hợp này và các trường hợp sản xuất đã biết khác, các BT vi hạt theo sáng chế có thể được kết hợp dựa trên phần mô tả ở đây, thay cho các chất kháng vi sinh vật khác, để tạo ra các ưu điểm theo sáng chế đối với các hợp chất BT vi hạt, bao gồm khoảng hoạt tính kháng vi sinh vật, độ tan và độ sinh khả dụng, tác dụng

chống màng sinh học, tính không độc, tăng cường hiệu quả kháng sinh và các tính chất khác như được mô tả ở đây.

Các hợp chất BT cũng có thể được đưa, ví dụ, ở nồng độ thấp không cản trở đến quy trình sản xuất cao su, vào các sản phẩm để khử các màng sinh học và ngăn ngừa sự làm bám trong hoặc trên các sản phẩm silicon. Nồng độ BT vi hạt (tính theo trọng lượng) trong silicon có thể, ví dụ, thay đổi từ rất nhỏ khoảng 0,0001% đến khoảng 0,1%, tùy theo mục đích sử dụng và tính chất của sản phẩm cao su silicon. Tương tự, các BT vi hạt theo sáng chế có thể được kết hợp ở dạng các chế phẩm phủ trên silicon, hoặc trong gel hoặc dầu silicon, để ngăn ngừa hoặc xử lý màng sinh học trên bề mặt silicon trong khoảng thời gian dài. Các van cổng tiêm cao su silicon được mô tả trong WO/2008/064173, các van này rỉ dầu silicon một cách định kỳ, sao cho sự xuất hiện của dịch rò rỉ BT vi hạt theo sáng chế với lượng kháng vi sinh vật hữu hiệu có khả năng chống màng sinh học và/hoặc chống vết bẩn trên đối tượng sản xuất chứa các van này hoặc các dụng cụ cao su silicon được cấu tạo tương tự. Dầu ăn mòn xuyên qua bề mặt bất kỳ trong vùng lân cận van, tạo ra nguồn bảo vệ có thể hồi phục trong khoảng thời gian dài. Cấu hình này có thể, ví dụ, được xây dựng trong bề mặt dưới của vỏ tàu, hoặc trong các bề mặt khác tiếp xúc với nước hoặc với ẩm.

Để gia tăng sự duy trì của BT trên bề mặt cao su, các BT vi hạt theo sáng chế có thể được chọn để có tính kỵ nước cao hơn nhờ các gốc thiol cụ thể, ví dụ bằng cách sử dụng thiol kỵ nước (ví dụ, thioclophenol), gốc này có thể gia tăng tính chất bám dính, và/hoặc bằng cách sử dụng BT mà được điều chế để có điện tích thực âm (ví dụ, tỷ lệ mol bismut:thiol là 1:2) BT này có thể có tính chất bám dính gia tăng. Các vật liệu silicon có thể, ví dụ, được sản xuất với sự có mặt của BT vi hạt theo sáng chế với nồng độ thích hợp ở nhiệt độ 100°C hoặc thấp hơn. Vật liệu ăn mòn sinh học cũng có thể được sản xuất để cho phép giải phóng từ từ các BT này ở nồng độ cản trở sự tạo thành màng sinh học, ví dụ, khoảng 1-2ppm. Theo các phương án khác, cao su và/hoặc các thành phần chất dẻo được dự tính là được chế tạo từ các vật liệu mà rửa giải chậm hợp chất BT vi hạt và chúng có thể được thay thế đều đặn

để ngăn ngừa vết bẩn sinh học trong các hệ thống công nghiệp hoặc các thiết bị y tế.

Theo các phương án nhất định khác, và theo cách tương tự với cách được mô tả trên đây cho chế phẩm và phương pháp liên quan đến sự kết hợp BT vào sản phẩm cao su (bao gồm silicon), hợp chất BT vi hạt theo sáng chế có thể còn được kết hợp vào các sản phẩm này và các sản phẩm chất dẻo và polyme khác bằng cách kết hợp chế phẩm BT và phương pháp theo sáng chế, với các quy trình sản xuất đã biết để sản xuất các loại sản phẩm này.

Ví dụ không giới hạn về việc sử dụng cho các sản phẩm chất dẻo chứa BT vi hạt này bao gồm các chất dẻo và các sản phẩm phủ chất dẻo trong các thiết bị y tế, thiết bị chỉnh hình, thiết bị nha khoa, thiết bị công nghiệp, thiết bị điện tử, tường, sàn, trần, mái và các bề mặt khác, như các bề mặt có trong và trên xe cộ thuộc tất cả các loại, bao gồm xe hơi, tàu hỏa, máy bay, tàu, thuyền, tàu ngầm, cọc, ống, đường ống, và vải dệt, đầu phun, các sản phẩm chăm sóc tóc, các phụ kiện ống/nước, các đồ gia dụng, các vật liệu làm sàn, các sản phẩm giày dép, thiết bị thể thao, điện thoại di động, thiết bị và chi tiết máy tính mà dùng chất dẻo hữu cơ, các sản phẩm dùng ngoài trời bao gồm ván mái, mái hiên, vải dầu, màng lợp mái, và lớp lót bề mặt, và các sản phẩm khác dùng cho việc bảo quản thực phẩm và đồ uống, khử trùng nước, hóa chất và dược phẩm.

Các vật liệu chất dẻo hiện đại đã được sử dụng từ những năm 1930. Các chất dẻo thường được sản xuất từ polyme và, luôn có chất phụ gia. Các polyme điển hình bao gồm: nhựa tổng hợp, styren, polyolefin, polyamits, flopolyme, vinyl, acrylic, polyuretan, polyme có nguồn gốc xenluloza, imit, axetal, polycarbonat, và polysulfphon. Để cải thiện các đặc tính vật lý của polyme, các chất phụ gia như các chất làm dẻo thường được sử dụng, các chất này đóng vai trò là nguồn dinh dưỡng của các vi sinh vật. Ví dụ về các chất làm dẻo hiện đại này bao gồm phtalat, adipat, và các este khác. Các chất làm dẻo này và các chất làm dẻo khác có thể đặc biệt dễ mắc vi khuẩn và nấm, đặc biệt là các vùng có độ ẩm cao, dẫn đến sự phát triển của vi sinh vật bề mặt và sự phát triển của bào tử, các chất này có thể dẫn đến một hoặc nhiều bệnh nhiễm ở người và động vật, các phản ứng dị ứng, các mùi khó chịu, sự

nhuộm màu, sự hóa giòn của chất dẻo, sự hư hỏng sản phẩm sớm và các hậu quả không mong muốn khác.

Việc cải biến các sản phẩm chất dẻo trong hoặc sau quy trình sản xuất bằng cách đưa vào các chất chống bắn và các chất phủ khác vi sinh vật khác đã được mô tả, nhưng thường có nhược điểm là kém hiệu quả, kém bền, tính tương thích sinh học kém, mất hoạt tính kháng vi sinh vật, thời gian sử dụng ngắn, chi phí vật liệu cao và các vấn đề khác (ví dụ, các patent Mỹ số 3,624,062; 4,086,297; 4,663,077; 3,755,224; 3,890,270; 6,495,613; 4,348,308; 5,654,330; 5,281,677; 6,120,790; 5,906,825; 7,419,681; 5,028,664; 6,162,487; Markarian, *Plastics, Additives và Compounding* 2009, 11:18-22; EP 927 222 B1; JP 08-157641; CN 1528470 A; Masatoshi et al. 2006;51:18-23; Các công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2008/0071229, 2009/0202610 và 2009/0043388); không tài liệu nào trong số này đề cập đến các ưu điểm được mô tả ở đây đối với các BT vi hạt theo sáng chế. Tuy nhiên, chuyên gia trong lĩnh vực này thường biết là việc kết hợp chất kháng vi sinh vật vào sản phẩm chất dẻo sẽ theo kế hoạch như (a) hấp thụ chất lên bề mặt polyme (một cách bị động hoặc thông qua các chất hoạt động bề mặt); (b) đưa vào polyme chất phủ kháng vi sinh vật, chất phủ này được phết lên bề mặt của khuôn; (c) đưa vào pha khối vật liệu nền polyme; (d) liên kết cộng hóa trị chất này với bề mặt polyme; và/hoặc (e) trộn chất kháng vi sinh vật với thành phần tạo polyme (ví dụ, polyuretan) trước khi thực hiện phản ứng trùng hợp, để tạo ra polyme sản phẩm.

Ví dụ, BT vi hạt theo sáng chế có thể được đưa vào các hệ này và các hệ tương tự bằng tay hoặc tự động, ở dạng gel, chất phun, chất lỏng hoặc bột. Theo một phương án, ví dụ, BT vi hạt ở dạng bột hoặc lỏng được trộn với các thành phần để sản xuất chất dẻo, bao gồm các thành phần hoạt tính (ví dụ, các tiền chất polyme, các chất xúc tác, các chất khơi mào phản ứng, các chất liên kết ngang, v.v.) và các chất phụ trợ (ví dụ, các dung môi mang, các chất dỡ khuôn, thuốc nhuộm hoặc chất màu, chất làm dẻo, v.v.), có trong hỗn hợp sản xuất, được thêm một cách định kỳ vào hệ thống sản xuất. Ví dụ, 1mg/ml dung dịch hoặc huyền phù BT vi hạt trong DMSO có thể được thêm một cách định kỳ vào dung dịch phản ứng

tạo thành polyme, hoặc được phun vào các phần làm việc của hệ thống khuôn, để đạt được nồng độ chống màng sinh học mong muốn trong sản phẩm cuối cùng.

Do đó, các phương án này và các phương án nhất định được mô tả ở đây dự tính việc đưa vào trong các sản phẩm và các quy trình này các chế phẩm BT vi hạt theo sáng chế, các chế phẩm này có thể chứa một hoặc nhiều BT vi hạt, và chế phẩm này có thể tùy ý còn chứa chất kháng sinh như chất kháng sinh có tác dụng đồng vận hoặc tăng cường như được mô tả ở đây.

Ví dụ không giới hạn về vi khuẩn kháng mà các chế phẩm và phương pháp được mô tả ở đây có thể có ứng dụng có lợi theo các phương án nhất định như được mô tả ở đây, bao gồm *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), MRSA (*S. aureus* kháng methixilin), *Staphylococcus epidermidis*, MRSE (*S. epidermidis* kháng methixilin), *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Pseudomonas aeruginosa*, kháng thuốc *P. aeruginosa*, *Escherichia coli*, *E. coli* sinh độc tố ruột, *E. coli* gây xuất huyết ruột, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecalis* nhạy với methixilin, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholera*, *Shigella flexneri*, *Enterococcus* kháng vancomycin (VRE), phức hợp *Burkholderia cepacia*, *Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, cầu khuẩn ruột nhạy với vancomycin và kháng vancomycin (ví dụ, *E. faecalis*, *E. faecium*), tụ cầu khuẩn nhạy với methixilin và kháng methixilin (ví dụ, *S. aureus*, *S. epidermidis*) và *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus anthracis*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus pneumonia*, kháng penicilin *Streptococcus pneumonia*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Mycobacterium smegmatis* và *E. cloacae*.

Thực tiễn các phương án nhất định theo sáng chế sẽ sử dụng, trừ khi được quy định cụ thể trong trường hợp ngược lại, các phương pháp thông thường đối với ngành vi trùng học, sinh học phân tử, hóa sinh, sinh học tế bào, virus học và kỹ

thuật miễn dịch học mà nằm trong lĩnh vực này, và tài liệu viện dẫn đến một số lĩnh vực này được đề cập sau đây nhằm mục đích minh họa. Các kỹ thuật này được giải thích đầy đủ trong tài liệu kỹ thuật. Xem, ví dụ, Sambrook, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); *Transcription and Translation* (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); *Animal Cell Culture* (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984).

Trừ khi có quy định khác, trong toàn bộ phần mô tả và yêu cầu bảo hộ, từ “bao gồm” được hiểu theo nghĩa mở nghĩa là “bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở”.

Việc viện dẫn trong toàn bộ phần mô tả này đến “một phương án” hoặc “một khía cạnh” có nghĩa là dấu hiệu, cấu trúc hoặc đặc tính cụ thể được mô tả liên quan đến phương án này được đưa vào trong ít nhất là một phương án của sáng chế. Do đó, sự xuất hiện của cụm từ “theo một phương án” trong các đoạn khác nhau trong phần mô tả này là không nhất thiết đều viện dẫn đến phương án như nhau. Hơn nữa, các dấu hiệu, cấu trúc, hoặc đặc tính cụ thể có thể được kết hợp theo cách thích hợp bất kỳ trong một hoặc nhiều phương án.

Như được lưu ý trên đây, các phương án nhất định theo sáng chế đề cập đến chế phẩm nông nghiệp, công nghiệp, sản xuất và các chế phẩm khác chứa hợp chất BT theo sáng chế (ví dụ, BisEDT và/hoặc BisBAL), các chế phẩm này có thể, theo các phương án nhất định khác, chứa một hoặc nhiều hợp chất kháng sinh như được mô tả ở đây, ví dụ, amikaxin, ampixilin, cefazolin, cefepime, cloramphenicol, ciprofloxacin, clindamixin (hoặc chất kháng sinh lincosamit khác), daptomixin (Cubicin®), doxyxycilin, gatifloxacin, gentamixin, imipenim, levofloxacin, linezolid (Zyvox®), minoxycilin, nafcilin, paromomixin, rifampin, sulphametoxazol, tobramixin và vancomixin; hoặc chất kháng sinh carbapenem, chất kháng sinh xephalosporin, chất kháng sinh floquinolon, chất kháng sinh glycopeptit, chất kháng sinh lincosamit, chất kháng sinh penixilin kháng

penixilinaza, và/hoặc chất kháng sinh aminopenixilin, và/hoặc chất kháng sinh aminoglycosit như amikaxin, arbekaxin, gentamixin, kanamixin, neomixin, netilmixin, paromomixin, rhodostreptomixin, streptomixin, tobramixin hoặc apramixin, và/hoặc chất kháng sinh lipopeptit như daptomixin (Cubicin®), hoặc chất kháng sinh oxazolidinon như linezolid (Zyvox®). Các chế phẩm này và các chế phẩm liên quan có thể chứa hợp chất BT (và tùy ý một hoặc nhiều chất kháng sinh) trong chất mang, tá dược hoặc chất pha loãng thích hợp và với lượng hữu hiệu, như được mô tả ở đây, khi được dùng cho thực vật hoặc động vật hoặc được dùng cho bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo, như thực vật, động vật hoặc đối tượng sản xuất trong hoặc trên đó có sự nhiễm vi khuẩn có thể liên quan đến màng sinh học (ví dụ, trong đó có mặt vi khuẩn có khả năng thúc đẩy sự tạo thành màng sinh học nhưng màng sinh học chưa được phát hiện) hoặc có sự nhiễm khuẩn như màng sinh học hoặc có sự xuất hiện của vi khuẩn khác.

Việc sử dụng hoặc kết hợp các hợp chất BT theo sáng chế, hoặc các muối của chúng, ở dạng tinh khiết hoặc trong chế phẩm nông nghiệp, sản xuất hoặc chế phẩm công nghiệp thích hợp khác, có thể được thực hiện qua cách thức dùng hoặc kết hợp được chấp nhận bất kỳ đối với các chất để đáp ứng các ứng dụng tương tự. Việc áp dụng, kết hợp hoặc sử dụng chế phẩm bao gồm, theo các phương án được ưu tiên, cho chế phẩm tiếp xúc trực tiếp với đối tượng thực vật hoặc động vật hoặc đối tượng sản xuất được xử lý, việc tiếp xúc này có thể là tại một hoặc nhiều vị trí bề mặt được phân bố cục bộ hoặc rộng rãi và việc tiếp xúc này có thể thường là đề cập đến việc cho chế phẩm dùng khu trú tiếp xúc với các vị trí nhiễm cấp hoặc mãn tính (ví dụ, vị trí vết thương trên bề mặt thực vật) được bao quanh bởi các mô nguyên vẹn nhưng không phải bị hạn chế; ví dụ, các phương án nhất định dự tính việc áp dụng và sử dụng khu trú chế phẩm dùng khu trú theo sáng chế cho bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo bị tổn thương, bị mài mòn hoặc bị hư hại.

Các chế phẩm (ví dụ, các chế phẩm nông nghiệp) có thể được sản xuất bằng cách kết hợp hợp chất BT được mô tả (ví dụ, chứa hợp chất được mô tả trong U.S. RE37,793, U.S. 6,248,371, U.S. 6,086,921, và/hoặc U.S. 6,380,248 và/hoặc được sản xuất theo phần mô tả sáng chế như các huyền phù BT vi hạt được mô tả ở đây),

và theo các phương án liên quan nhất định như được mô tả ở đây bằng cách kết hợp một hoặc nhiều các chất kháng sinh mong muốn (ví dụ, chất kháng sinh aminoglycosit như amikaxin) riêng rẽ hoặc cùng với hợp chất BT, với chất dẫn, chất phân tán, chất mang, chất pha loãng, hoặc tá dược thích hợp để sử dụng trong việc bào chế chế phẩm và có thể thay đổi tùy thuộc vào mục đích sử dụng, và có thể được bào chế thành các sản phẩm ở dạng rắn, bán rắn, gel, kem, keo, huyền phù hoặc lỏng hoặc các dạng dùng khu trú khác, như bột, hạt, thuốc mỡ, dung dịch, nước rửa, gel, bột nhão, vữa, sơn, keo dán sinh học, huyền phù trung thể, và thuốc phun sol khí.

Các chế phẩm theo các phương án này và các phương án liên quan được bào chế để cho phép các thành phần hoạt tính chứa trong đó, và theo các phương án được đặc biệt ưu tiên, hợp chất BT theo sáng chế một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất kháng sinh mong muốn (ví dụ, chất kháng sinh carbapenem, chất kháng sinh xephalosporin, chất kháng sinh floquinolon, chất kháng sinh glycopeptit, chất kháng sinh lincosamit, chất kháng sinh penixilin kháng penixilinaza, và chất kháng sinh aminopenixilin, hoặc chất kháng sinh aminoglycosit như amikaxin, hoặc rifamycin) mà có thể dùng đồng thời hoặc liên tiếp và theo thứ tự bất kỳ, có tính sinh khả dụng khi dùng chế phẩm chứa hợp chất BT và/hoặc chất kháng sinh này cho vị trí mong muốn và tùy ý cho bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo xung quanh đó của đối tượng thực vật hoặc động vật (bao gồm người) hoặc đối tượng sản xuất. Các phương án nhất định theo sáng chế dự tính việc sử dụng và/hoặc kết hợp hợp chất BT và chất kháng sinh vào đối tượng hoặc sản phẩm, bao gồm việc sử dụng mà có thể là đồng thời hoặc liên tiếp và theo thứ tự bất kỳ, nhưng sáng chế không được dự tính là chỉ giới hạn ở đây và các phương án khác chỉ dự tính cách dùng hợp chất BT khác so với cách dùng chất kháng sinh. Theo đó, chất kháng sinh có thể được dùng bằng cách dùng bất kỳ như được mô tả ở đây, trong khi hợp chất BT có thể được dùng bằng cách mà độc lập với cách dùng chất kháng sinh.

Các chế phẩm được mô tả ở đây phân phối lượng hữu hiệu chất sát trùng (và tùy ý chất kháng sinh) đến vị trí mong muốn, như vị trí nhiễm hoặc vị trí mà mong muốn được ngăn chặn sự nhiễm hoặc sự tạo thành màng sinh học.

Như được lưu ý trên đây, chế phẩm theo sáng chế có thể ở dạng bất kỳ trong số rất nhiều dạng, và bao gồm, ví dụ, dạng lỏng, huyền phù, vữa, kem, sản phẩm rửa, dung dịch, sản phẩm phun, gel, thuốc mỡ, bột nhão, v.v. và/hoặc có thể được bào chế để chứa các liposom, mixen, và/hoặc trung thể. Xem, *ví dụ*, Patent Mỹ số 7,205,003. Ví dụ, kem đã được biết rõ trong lĩnh vực dược phẩm và mỹ phẩm là chất lỏng nhót hoặc nhũ tương bán rắn, dầu trong nước hoặc nước trong dầu. Chất nền kem là có thể rửa trong nước và chứa pha dầu, chất nhũ hóa, và pha nước. Pha dầu, còn được gọi là pha "nội", thường bao gồm mỡ khoáng và rượu béo như rượu xetyl hoặc stearyl. Pha nước thường, mặc dù không cần thiết, chiếm thể tích nhiều hơn pha dầu, và thường chứa chất làm ẩm. Chất nhũ hóa trong chế phẩm kem thường là chất hoạt động bề mặt không ion, anion, cation hoặc lưỡng tính.

Dung dịch là hỗn hợp đồng nhất được bào chế bằng cách hòa tan một hoặc nhiều hóa chất (chất tan) trong chất lỏng sao cho các phân tử của chất hòa tan được phân tán trong các phân tử dung môi. Dung dịch này có thể chứa các hóa chất khác để tạo đệm, làm ổn định hoặc bảo quản chất tan. Ví dụ thông thường về dung môi được sử dụng để bào chế dung dịch là etanol, nước, propylen glycol hoặc tá dược lỏng bất kỳ khác.

Gel là hệ kiểu huyền phù bán rắn. Các gel một pha chứa các đại phân tử hữu cơ được phân phối hầu như đồng đều trong chất mang lỏng, gel này thường chứa nước, nhưng tốt hơn là còn chứa rượu, và tùy ý dầu. "Đại phân tử hữu cơ", *tức là* chất tạo gel, được ưu tiên có thể là các polyme liên kết ngang về mặt hóa học như các polyme axit acrylic liên kết ngang, ví dụ, họ polyme "carbomer", *ví dụ*, carboxypolyalkylen, mà có thể mua được trên thị trường dưới nhãn hiệu Carbopol®. Theo các phương án nhất định, các đại phân tử hữu cơ được ưu tiên có thể là các polyme ưa nước như polyetylen oxit, copolyme polyoxyetylen-polyoxypropylen và rượu polyvinyl; các polyme trên cơ sở xenluloza như hydroxypropyl xenluloza, hydroxyetyl xenluloza, hydroxypropyl metylxenluloza,

hydroxypropyl methylxenluloza phtalat, và methyl xenluloza; các gôm như gôm tragacanth và gôm xanthan; natri alginat; và gelatin. Để bào chế gel đồng nhất, các chất làm phân tán như rượu hoặc glyxerin có thể được bổ sung, hoặc các chất tạo gel có thể được phân tán bằng cách nghiền, trộn hoặc khuấy cơ học, hoặc kết hợp các cách này.

Các thuốc mỡ, cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực này, là các chế phẩm bán rắn thường dựa trên cơ sở mỡ khoáng hoặc các dẫn xuất dầu mỡ khác. Chất nền thuốc mỡ đặc biệt được sử dụng, như được chuyên gia trong lĩnh vực này biết rõ, là chất nền mà cung cấp một số tính chất mong muốn, *ví dụ*, làm mềm hoặc tính chất tương tự. Giống như các chất mang hoặc các chất dẫn khác, chất nền thuốc mỡ nên trơ, ổn định, không gây kích ứng, và không gây nhạy cảm. Như được mô tả trong Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995), các trang 1399-1404, chất nền thuốc mỡ được chia thành bốn nhóm: chất nền có dầu; chất nền có thể nhũ hóa; chất nền nhũ tương; và chất nền tan trong nước. Chất nền có dầu bao gồm, *ví dụ*, dầu thực vật, mỡ động vật, các hydrocarbon thu được từ dầu mỡ. Chất nền thuốc mỡ có thể nhũ hóa, còn được biết như là chất nền thuốc mỡ hấp thụ, chứa lượng nhỏ hoặc không chứa nước và bao gồm, *ví dụ*, hydroxystearin sulfat, lanolin khan, và mỡ khoáng ưa nước. Chất nền thuốc mỡ nhũ tương là nhũ tương nước trong dầu (W/O) hoặc nhũ tương dầu trong nước (O/W), và bao gồm, *ví dụ*, rượu xetyl, glyxeryl monostearat, lanolin, và axit stearic. Chất nền thuốc mỡ tan trong nước được ưu tiên được điều chế từ các polyetylen glycol có trọng lượng phân tử khác nhau (*xem, ví dụ, Remington, Id.*).

Bột nhão là dạng liều bán rắn trong đó hoạt chất được tạo huyền phù trong chất nền thích hợp. Tùy thuộc vào bản chất của chất nền, bột nhão được chia thành bột nhão béo hoặc bột nhão được làm từ gel nước một pha. Chất nền trong bột nhão béo thường là mỡ khoáng hoặc mỡ khoáng ưa nước hoặc chất tương tự. Bột nhão làm từ gel nước một pha thường kết hợp carboxymethylxenluloza hoặc chất tương tự làm chất nền.

Các chế phẩm cũng có thể được bào chế với các liposom, mixen, và trung thể. Các liposom là các túi siêu nhỏ có một (đơn lá) hoặc nhiều (đa lá) thành lipid

bao gồm lớp lipit kép, và, trong trường hợp này, có thể bao nang và/hoặc được hấp thụ vào các bề mặt màng lipit của chúng một hoặc nhiều thành phần của chế phẩm theo sáng chế, như chất sát trùng, hoặc chất mang hoặc tá dược nhất định. Các chế phẩm liposom ở đây bao gồm các chế phẩm cation (có điện tích dương), anion (có điện tích âm), và chế phẩm trung tính. Các liposom cation là đã có trên thị trường. Ví dụ, liposom N[1-2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triethylamoni (DOTMA) có trên thị trường dưới nhãn hiệu Lipofectin® (GIBCO BRL, Grand Island, N.Y.). Tương tự, các liposom anion và trung tính cũng có trên thị trường, *ví dụ*, của Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), hoặc có thể dễ dàng điều chế bằng cách sử dụng các nguyên liệu có bán trên thị trường. Các nguyên liệu này bao gồm phosphatidyl cholin, cholesterol, phosphatidyl etanolamin, dioleoylphosphatidyl cholin (DOPC), dioleoylphosphatidyl glyxerol (DOPG), và dioleoylphosphatidyl etanolamin (DOPE), v.v.. Các nguyên liệu này cũng có thể được trộn với DOTMA theo tỷ lệ thích hợp. Các phương pháp để điều chế liposom sử dụng các nguyên liệu này là đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Mixen đã được biết trong lĩnh vực này là bao gồm các phân tử chất hoạt động bề mặt được sắp xếp sao cho các đầu nhóm phân cực của chúng tạo thành vỏ cầu bên ngoài, trong khi các chuỗi hydrocarbon kỵ nước được hướng vào tâm của cầu này, tạo thành nhân. Các mixen tạo thành trong dung dịch nước chứa chất hoạt động bề mặt với nồng độ đủ cao sao cho thu được các mixen một cách tự nhiên. Các chất hoạt động bề mặt hữu dụng để tạo thành các mixen bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kali laurat, natri octan sulfonat, natri decan sulfonat, natri dodecan sulfonat, natri lauryl sulfat, docusat natri, dexyltrimethylamoni bromua, dodexyltrimethylamoni bromua, tetradexyltrimethylamoni bromua, tetradexyltrimethylamoni clorua, dodexylamoni clorua, polyoxyl-8 dodexyl ete, polyoxyl-12 dodexyl ete, nonoxynol 10, và nonoxynol 30.

Tương tự, các trung thể có thể được đưa vào các chế phẩm dùng khu trú theo sáng chế. Giống như các liposom và mixen, các trung thể về cơ bản là bao nang một hoặc nhiều thành phần của chế phẩm theo sáng chế. Chúng thường, nhưng không nhất thiết, được tạo thành từ các lipit, tốt hơn là các lipit có điện tích như các

phospholipit. Việc điều chế các trung thể dựa trên lipid là đã được biết rõ trong lĩnh vực này.

Các chất phụ gia khác, đã được biết rõ đối với chuyên gia trong lĩnh vực này, cũng có thể được chứa trong các chế phẩm theo sáng chế. Ví dụ, các dung môi, chứa lượng rượu tương đối nhỏ, có thể được sử dụng để làm hòa tan các thành phần nhất định trong chế phẩm. Ví dụ về các chất tăng cường thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các ete như dietylen glycol monoetyl ete (có bán trên thị trường như Transcutol®) và dietylen glycol monometyl ete; các chất hoạt động bề mặt như natri laurat, natri lauryl sulfat, xetyltrimetylamonium bromua, benzalkonium clorua, Poloxamer® (231, 182, 184), Tween® (20, 40, 60, 80), và lecithin (U.S. Pat. No. 4,783,450); các rượu như etanol, propanol, octanol, rượu benzylic, v.v.; polyetylen glycol và este của nó như polyetylen glycol monolaurat (PEGML; xem, ví dụ, U.S. Pat. No. 4,568,343); amit và các hợp chất khác như ure, dimetylaxetamid (DMA), dimetylformamid (DMF), 2-pyrrolidon, 1-metyl-2-pyrrolidon, etanolamin, dietanolamin, và trietanolamin; terpen; alkanon; và các axit hữu cơ, đặc biệt là axit citric và axit succinic. Azone® và sulfoxit như DMSO và C₁₀MSO cũng có thể được sử dụng nhưng kém ưu tiên hơn.

Các chất tăng cường khả năng thẩm thấu nhất định có thể bao gồm các chất đồng tăng cường ưa béo còn được gọi là chất tăng cường "làm dẻo", tức là, các chất tăng cường có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng từ 150 đến 1000Da, độ tan trong nước nhỏ hơn khoảng 1% trọng lượng, tốt hơn là nhỏ hơn khoảng 0,5% trọng lượng, và tốt nhất là nhỏ hơn khoảng 0,2% trọng lượng. Thông số độ tan Hildebrand của các chất tăng cường làm dẻo là nằm trong khoảng từ 2,5 đến 10, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 10. Các chất tăng cường ưa béo được ưu tiên là các este béo, các rượu béo, và các ete béo. Ví dụ và các este của axit béo cụ thể và được ưu tiên nhất bao gồm methyl laurat, etyl oleat, propylen glycol monolaurat, propylen glyxerol dilaurat, glyxerol monolaurat, glyxerol monooleat, isopropyl n-decanoat, và octyldodexyl myristat. Các rượu béo bao gồm, ví dụ, rượu stearyl và rượu oleyl, mặc dù các ete béo bao gồm các hợp chất trong đó diol hoặc triol, tốt hơn là C₂-C₄ alkan diol hoặc triol, được thế bằng một hoặc hai nhóm thế ete béo.

Các chất tăng cường khả năng thẩm thấu bổ sung sẽ được chuyên gia trong lĩnh vực về phân phối thuốc khu trú biết rõ, và/hoặc được mô tả trong tài liệu kỹ thuật liên quan. Xem, *ví dụ*, Percutaneous Penetration Enhancers, eds. Smith et al. (CRC Press, Boca Raton, FL, 1995).

Các chất phụ gia khác có thể được chứa trong các chế phẩm dùng khu trú theo các phương án của sáng chế, ngoài các chất được xác định trên đây. Các chất này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất chống oxy hóa, chất làm se, hương liệu, chất bảo quản, chất làm mềm, chất màu, chất nhuộm, các chất làm ẩm, chất đẩy, và chất chống nắng, cũng như các loại chất liệu khác mà sự có mặt của chúng có thể là mong muốn về mặt thẩm mỹ, về mặt y tế hoặc về mặt khác. Ví dụ điển hình về các chất phụ gia tùy ý để đưa vào trong chế phẩm theo các phương án nhất định của sáng chế là như sau: các chất bảo quản như sorbat; các dung môi như isopropanol và propylen glycol; chất làm se như menthol và etanol; chất làm mềm như polyalkylen metyl glucosit; các chất làm ẩm như glyxerin; các chất nhũ hóa như glyxerol stearat, PEG-100 stearat, polyglyxeryl-3 hydroxylauryl ete, và polysorbat 60; sorbitol và các rượu polyhydroxy như polyetylen glycol; chất chống nắng như octyl metoxyl xinamat (có bán trên thị trường dưới nhãn hiệu Parsol MCX) và butyl metoxy benzoylmetan (có bán trên thị trường dưới nhãn hiệu Parsol 1789); chất chống oxy hóa như axit ascorbic (vitamin C), α -tocopherol (Vitamin E), β -tocopherol, γ -tocopherol, δ -tocopherol, ϵ -tocopherol, ζ_1 -tocopherol, ζ_2 -tocopherol, η -tocopherol, và retinol (vitamin A); các tinh dầu, các xeromit, các axit béo tinh khiết, các dầu khoáng, các chất làm ẩm và các chất hoạt động bề mặt khác như các chuỗi polyme ưa nước PLURONIC® của BASF (Mt. Olive, NJ), các dầu thực vật (*ví dụ*, dầu đậu nành, dầu cọ, phần chiết lỏng của bơ hạt mỡ, dầu hạt hướng dương), các dầu động vật (*ví dụ*, perhydrosqualen), các dầu khoáng, các dầu tổng hợp, các dầu silicon hoặc sáp (*ví dụ*, xyclomethicon và dimethicon), các dầu được flo hóa (thường là perflopolyete), các rượu béo (*ví dụ*, rượu xetyl), và sáp (*ví dụ*, sáp ong, sáp cacnauba, và sáp parafin); chất cải thiện làn da; và chất làm đặc và chất cải thiện cấu trúc như đất sét làm trương nở và các carboxypolyalkylen liên kết ngang mà có thể mua được trên thị trường dưới nhãn hiệu Carbopol®.

Các chất phụ gia khác bao gồm các chất như, ví dụ, các axit pyrolidin carboxylic và các axit amin; các chất kháng vi sinh vật hữu cơ như 2,4,4'-triclo-2-hydroxy diphenyl ete (triclosan) và axit benzoic; các chất chống viêm như axit axetylsalixylic và axit glyxyrrhêtinic; các chất chống tiết bã nhờn như axit retinoic; chất gây giãn mạch như axit nicotinic; các chất ức chế sự tạo melamin như axit kojic; và các hỗn hợp của chúng. Các chất hoạt tính khác có thể được chứa trong chế phẩm theo sáng chế, ví dụ, α -hydroxyaxit, α -ketoaxit, hydroxyaxit polyme, chất dưỡng ẩm, collagen, chiết xuất marin, và các chất chống oxy hóa như axit ascorbic (vitamin C), α -tocopherol (Vitamin E) hoặc các tocopherol khác như các chất nêu trên, và retinol (vitamin A), và/hoặc các muối, este, amit hoặc các dẫn xuất thích hợp khác của chúng. Các chất bổ sung bao gồm các chất có khả năng cải thiện sự cung cấp oxy trong mô sống, như được mô tả, ví dụ, trong WO 94/00098 và WO 94/00109. Các chất chống nắng cũng có thể được đưa vào.

Các chế phẩm theo các phương án nhất định của sáng chế cũng có thể chứa các chất phụ gia thông thường như chất chấn sáng, chất tạo mùi thơm, chất màu, chất tạo gel, chất làm đặc, chất làm ổn định, chất hoạt động bề mặt, và các chất tương tự. Các chất khác cũng có thể được bổ sung, như chất kháng vi sinh vật, để ngăn ngừa sự hư hỏng trong quá trình bảo quản, *tức là*, để ức chế sự phát triển của vi sinh vật như nấm men và nấm mốc. Các chất kháng vi sinh vật thích hợp thường được chọn từ metyl và propyl este của axit *p*-hydroxybenzoic (ví dụ, metyl và propyl paraben), natri benzoat, axit sorbic, imidure, và các hỗn hợp của chúng.

Các chế phẩm dùng khu trú cũng có thể chứa, ngoài hợp chất BT, (ví dụ, các vi hạt hầu như đồng đều theo sáng chế, và tùy ý kết hợp với một hoặc nhiều chất kháng sinh tác dụng đồng vận như được mô tả ở đây), một lượng hữu hiệu của một hoặc nhiều hoạt chất bổ sung thích hợp cho cách dùng hoặc cách kết hợp cụ thể.

Chất mang được dụng cũng có thể được đưa vào chế phẩm dùng khu trú theo các phương án nhất định của sáng chế và có thể là chất mang bất kỳ thường dùng trong lĩnh vực này. Ví dụ bao gồm nước, rượu thấp, rượu cao, mật, rượu polyhydric, monosacarit, disacarit, polysacarit, rượu đường như, ví dụ, glycol (2-

cacbon), glyxerol (3-cacbon), erythritol và threitol (4-cacbon), arabitol, xylitol và ribitol (5-cacbon), manitol, sorbitol, dulcitol và iditol (6-cacbon), isomaltol, maltitol, lactitol và polyglycitol, các dầu hydrocarbon, mỡ và dầu, sáp, axit béo, dầu silicon, chất hoạt động bề mặt không ion, chất hoạt động bề mặt ion, chất hoạt động bề mặt silicon, và hỗn hợp trên nền nước và hỗn hợp trên nền nhũ tương của các chất mang này.

Các phương án về chế phẩm dùng khu trú theo sáng chế có thể được áp dụng đều đặn cho bề mặt tự nhiên (ví dụ, thực vật hoặc động vật bao gồm người) hoặc nhân tạo (ví dụ, đối tượng sản xuất) bất kỳ cần việc xử lý với tần xuất và lượng cần thiết để đạt được kết quả mong muốn. Tần xuất xử lý tùy thuộc vào bản chất của việc áp dụng, khả năng của các hoạt chất (ví dụ, hợp chất BT và tùy ý một hoặc nhiều hoạt chất bổ sung, như chất kháng sinh, ví dụ, amikaxin hoặc chất kháng sinh khác) trong phương án cụ thể, hiệu lực của chất dẫn được dùng để phân phối hoạt chất, và khả năng chế phẩm bị loại bỏ bởi các yếu tố môi trường (ví dụ, tiếp xúc vật lý với các vật liệu hoặc đối tượng khác, kết tủa, gió, nhiệt độ).

Nồng độ điển hình của các hoạt chất như hợp chất BT trong các chế phẩm theo sáng chế tính theo tổng trọng lượng của chế phẩm có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,001 đến 30% trọng lượng, nằm trong khoảng từ 0,01 đến 5,0%, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2,0%. Ví dụ đại diện, chế phẩm theo các phương án của sáng chế có thể được dùng cho bề mặt tự nhiên hoặc nhân tạo với tỷ lệ bằng từ khoảng 1,0mg/cm² đến 20,0mg/cm². Ví dụ đại diện về các chế phẩm dùng khu trú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sol khí, rượu, chất nền khan, dung dịch nước, kem, nhũ tương (bao gồm nhũ tương nước trong dầu hoặc dầu trong nước), mỡ, bột, gel, dung dịch rượu-nước, liposom, thuốc rửa, vi nhũ tương, thuốc mỡ, dầu, dung môi hữu cơ, polyol, polyme, bột, muối, dẫn xuất silicon, và sáp. Chế phẩm này có thể chứa, ví dụ, chất tạo chelat, chất tạo điều kiện, chất làm mềm, tá dược, chất làm ẩm, chất bảo vệ, chất làm đặc, hoặc chất hấp thụ UV. Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng các chế phẩm khác ngoài các chế phẩm được liệt kê trên đây có thể được dùng trong các phương án theo sáng chế.

Các chất tạo chelat có thể tùy ý được chứa trong các chế phẩm nhất định, và có thể được chọn từ hóa chất tự nhiên hoặc tổng hợp bất kỳ mà có khả năng liên kết các kim loại cation hóa trị hai như Ca^{2+} , Mn^{2+} , hoặc Mg^{2+} . Ví dụ về các chất tạo chelat bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở EDTA, dinatri EDTA, EGTA, axit xitric, và axit dicarboxylic.

Các chất tạo điều kiện cũng có thể tùy ý được đưa vào các chế phẩm nhất định. Ví dụ về các chất tạo điều kiện bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, axetyl xystein, N-axetyl dihydrosphingosin, copolyme acrylat/beheryl acrylat/dimethicon acrylat, adenosin, adenosin xyclic phosphat, adenosin phosphat, adenosin triphosphat, alanin, albumen, chiết xuất táo, alantoin và các dẫn xuất của nó, các chiết xuất cây lô hội *aloe barbadensis*, nhôm PCA, amyloglucosidaza, arbutin, arginin, azulen, bromelain, bột nước sữa, butylen glycol, cafein, canxi gluconat, capsaixin, carboxystein, carnosin, beta-caroten, casein, catalaza, xephalin, xeramit, chiết xuất hoa dương cam cúc (*chamomilla recutita*), cholecalciferol, cholesteryl este, coco-betain, coenzym A, tinh bột ngô cải biến, crystallins, xycloetoxymethicon, xystein ADN, xytochrom C, darutosit, dextran sulfat, dimethicon copolyol, dimetylsilanol hyaluronat, ADN, elastin, axit amin elastin, yếu tố phát triển biểu bì, ergocalciferol, ergosterol, etylhexyl PCA, fibronectin, axit folic, gelatin, gliadin, beta-glucan, glucoza, glyxin, glycogen, glycolipit, glycoprotein, glycosaminoglycan, glycosphingolipit, horseradish peroxidaza, protein hydro hóa, protein thủy phân, dầu jojoba, keratin, keratin axit ami, và kinetin, lactoferrin, lanosterol, lauryl PCA, lexithin, axit linoleic, axit linolenic, lipaza, lysin, lysozym, chiết xuất malt, maltodextrin, melanin, methionin, muối khoáng, niacin, niacinamit, oat axit amin, oryzanol, protein thủy phân palmitoyl, pancreatin, papain, PEG, pepsin, phospholipit, phytosterol, enzym nhau thai, lipid nhau thai, pyridoxal 5-phosphat, quercetin, resorcinol axetat, riboflavin, RNA, chiết xuất dịch thủy phân *saccharomyces*, axit amin tơ (silk amino acids), sphingolipit, stearamidopropyl betain, stearyl palmitat, tocopherol, tocopheryl axetat, tocopheryl linoleat, ubiquinon, dầu hạt nho *vitis vinifera* (grape), axit amin của lúa mỳ, gồm xanthan, và kẽm gluconat. Các chất tạo điều kiện khác ngoài các chất nêu trên có

thể được kết hợp với chế phẩm theo sáng chế như có thể được hiểu rõ bởi chuyên gia trong lĩnh vực này.

Theo các phương án nhất định, chế phẩm theo sáng chế cũng có thể tùy ý chứa một hoặc nhiều chất làm mềm, ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, lanolin được axetyl hóa, rượu lanolin được axetyl hóa, polyme liên kết ngang acrylat/ C_{10-30} alkyl acrylat, copolyme acrylat, alanin, chiết xuất tảo, gel hoặc chiết xuất lô hội *aloe barbadensis*, chiết xuất cây thực quỳ (*althea officinalis*), nhôm tinh bột octenylsuccinat, nhôm stearat, dầu kernel apricot (*prunus armeniaca*), arginin, arginin aspartat, chiết xuất cây kim sa (*arnica montana*), axit ascorbic, ascorbyl palmitat, axit aspartic, dầu quả bơ (*persea gratissima*), bari sulfat, sphingolipit rào chắn, rượu butylic, sáp ong, rượu behenyl, beta-sitosterol, BHT, chiết xuất vỏ cây bu lô (*betula alba*), chiết xuất cây lưu ly (*borago officinalis*), 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol, chiết xuất butcherbroom (*ruscus aculeatus*), butylen glycol, chiết xuất cúc susi (*calendula officinalis*), dầu cúc susi (*calendula officinalis*), sáp candelilla (*euphorbia cerifera*), dầu canola, caprylic/capric triglycerit, dầu cây bạch đậu khấu (*elettaria cardamomum*), sáp cacauba (*copernicia cerifera*), carrageenan (*chondrus crispus*), dầu cà rốt (*daucus carota sativa*), dầu cây thầu dầu (*ricinus communis*), xeromit, ceresin, cetareth-5, cetareth-12, cetareth-20, cetearyl octanoat, ceteth-20, ceteth-24, xetyl axetat, xetyl octanoat, xetyl palmitat, dầu hoa cúc (*anthemis nobilis*), cholesterol, cholesterol este, cholesteryl hydroxystearat, axit xitric, dầu clary (*salvia sclarea*), bơ ca cao (*theobroma cacao*), coco-caprylat/caprat, dầu dừa (*cocos nucifera*), collagen, collagen axit amin, dầu ngô (*zea mays*), axit béo, dexyl oleat, dextrin, diazolidinyl ure, dimethicon copolyol, dimethiconol, dioctyl adipat, dioctyl succinat, dipentaerythrityl hexacaprylat/hexacaprat, DMDM hydantoin, DNA, erythritol, etoxydiglycol, etyl linoleat, dầu khuynh diệp (*eucalyptus globulus*), dầu hoa anh thảo (*oenothera biennis*), các axit béo, tructoza, gelatin, dầu cây mỏ hạc Mỹ (*geranium maculatum*), glucosamin, glucoza glutamat, axit glutamic, glycereth-26, glyxerin, glyxerol, glyxeryl distearat, glyxeryl hydroxystearat, glyxeryl laurat, glyxeryl linoleat, glyxeryl myristat, glyxeryl oleat, glyxeryl stearat, glyxeryl stearat SE, glyxin, glycol stearat, glycol stearat SE, glycosaminoglycan, dầu hạt nho (*vitis vinifera*), dầu hạt hazel (*corylus americana*),

dầu hạt hazel (*corylus avellana*), hexylen glycol, mật, axit hyaluronic, dầu cây rum lai (*carthamus tinctorius*), dầu thầu dầu được hydro hóa, coco-glyxerit được hydro hóa, dầu dừa được hydro hóa, lanolin được hydro hóa, lexithin được hydro hóa, glyxerit cọ được hydro hóa, dầu hạt cọ được hydro hóa, dầu đậu nành được hydro hóa, glyxerit mỡ được hydro hóa, dầu thực vật được hydro hóa, collagen thủy phân, elastin thủy phân, glycosaminoglycan thủy phân, keratin thủy phân, protein đậu nành thủy phân, lanolin được hydroxyl hóa, hydroxyprolin, imidazolidinyl ure, iodopropynyl butylcarbammat, isoxetyl stearat, isoxetyl stearoyl stearat, isodexyl oleat, isopropyl isostearat, isopropyl lanolat, isopropyl myristat, isopropyl palmitat, isopropyl stearat, isostearamit DEA, axit isostearic, isostearyl lactat, isostearyl neopentanoat, dầu hoa nhài (*jasminum officinale*), dầu jojoba (*buxus chinensis*), táo bẹ, dầu hạt kukui (*aleurites moluccana*), lactamit MEA, laneth-16, laneth-10 axetat, lanolin, axit lanolin, rượu lanolin, dầu lanolin, sáp lanolin, dầu oải hương (*lavandula angustifolia*), lexithin, dầu chanh (*citrus medica limonum*), axit linoleic, axit linolenic, dầu hạt macadamia ternifolia, magie stearat, magie sulfat, maltitol, dầu hoa cúc (*chamomilla recutita*), metyl glucoza sesquistearat, metylsilanol PCA, sáp vi tinh thể, dầu khoáng, dầu mink, dầu mortierella, myristyl lactat, myristyl myristat, myristyl propionat, neopentyl glycol dicaprylat/dicaprat, octyldodecanol, octyldodexyl myristat, octyldodexyl stearoyl stearat, octyl hydroxystearat, octyl palmitat, octyl salixylat, octyl stearat, axit oleic, dầu ô liu (*olea europaea*), dầu cam (*citrus aurantium dulcis*), dầu cọ (*elaeis guineensis*), axit palmitic, pantethin, panthenol, panthenyl etyl ete, parafin, PCA, dầu quả đào (*prunus persica*), dầu lạc (*arachis hypogaea*), PEG-8 C12 18 este, PEG-15 cocamin, PEG-150 distearat, PEG-60 glyxeryl isostearat, PEG-5 glyxeryl stearat, PEG-30 glyxeryl stearat, dầu thầu dầu được hydro hóa PEG-7, dầu thầu dầu được hydro hóa PEG-40, dầu thầu dầu được hydro hóa PEG-60, PEG-20 metyl glucoza sesquistearat, PEG-40 sorbitan peroleat, PEG-5 sterol đậu nành, PEG-10 sterol đậu nành, PEG-2 stearat, PEG-8 stearat, PEG-20 stearat, PEG-32 stearat, PEG-40 stearat, PEG-50 stearat, PEG-100 stearat, PEG-150 stearat, pentadecalacton, dầu bạc hà (*mentha piperita*), mỡ khoáng, phospholipit, phân ngưng đường polyamino, polyglyxeryl-3 diisostearat, polyquaternium-24, polysorbat 20, polysorbat 40, polysorbat 60,

polysorbat 80, polysorbat 85, kali myristat, kali palmitat, kali sorbat, kali stearat, propylen glycol, propylen glycol dicaprylat/dicaprat, propylen glycol dioctanoat, propylen glycol dipelargonat, propylen glycol laurat, propylen glycol stearat, propylen glycol stearat SE, PVP, pyridoxin dipalmitat, quaternium-15, quaternium-18 hectorit, quaternium-22, retinol, retinyl palmitat, dầu cám gạo (*oryza sativa*), RNA, dầu hương thảo (*rosmarinus officinalis*), dầu hoa hồng, dầu cây rum (*carthamus tinctorius*), dầu cây ngải đắng (*salvia officinalis*), axit salixylic, dầu gỗ đàn hương (*santalum album*), serin, protein huyết thanh, dầu vừng (*sesamum indicum*), bơ hạt mỡ (*butyrospermum parkii*), bột tơ, natri chondroitin sulfat, natri DNA, natri hyaluronat, natri lactat, natri palmitat, natri PCA, natri polyglutamat, natri stearat, collagen hòa tan, axit sorbic, sorbitan laurat, sorbitan oleat, sorbitan palmitat, sorbitan sesquioleat, sorbitan stearat, sorbitol, dầu đậu nành (*glycine soja*), sphingolipit, squalan, squalen, stearamit MEA-stearat, axit stearic, stearoxy dimethicon, stearoxytrimethylsilan, rượu stearyl, stearyl glycyrrhetinat, stearyl heptanoat, stearyl stearat, dầu hạt hướng dương (*helianthus annuus*), dầu hạnh nhân (*prunus amygdalus dulcis*), sáp ong tổng hợp, tocopherol, tocopheryl axetat, tocopheryl linoleat, tribehenin, tridexyl neopentanoat, tridexyl stearat, trietanolamin, tristearin, ure, dầu vegetable, nước, sáp, dầu mầm lúa mì (*triticum vulgare*), và dầu ngọc lan tây (*cananga odorata*).

Các chất hoạt động bề mặt có thể cũng mong muốn được chứa trong các chế phẩm nhất định được dự tính ở đây, và có thể được chọn từ các chất hoạt động bề mặt tự nhiên hoặc tổng hợp bất kỳ thích hợp để sử dụng trong các mỹ phẩm, như các chất hoạt động bề mặt cation, anion, lưỡng tính, hoặc không ion, hoặc các hỗn hợp của chúng. (Xem Rosen, M., "Surfactants and Interfacial Phenomena," Second Edition, John Wiley & Sons, New York, 1988, Chapter 1, trang 4 31). Ví dụ về các chất hoạt động cation có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, DMDAO hoặc các amin oxit khác, các amin bậc một mạch dài, các diamin và polyamin và các muối của chúng, các muối amoni bậc bốn, các amin mạch dài được polyoxyetylen hóa, và các amin mạch dài được polyoxyetylen hóa được tạo bậc bốn. Ví dụ về các chất hoạt động bề mặt anion có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, SDS; các muối của các axit carboxylic (ví dụ, xà phòng); các muối của các axit sulfonic, các

muối của axit sulfuric, các este của axit phosphoric và polyphosphoric; alkylphosphat; monoalkyl phosphat (MAP); và các muối của các axit perfluorocarboxylic. Ví dụ về các chất hoạt động bề mặt lưỡng tính có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cocoamidopropyl hydroxysultain (CAPHS) và các chất khác mà nhạy với độ pH và cần sự quan tâm đặc biệt trong việc điều chỉnh độ pH của chế phẩm (tức là, axit alkylaminopropionic, imidazolin carboxylat, và betain) hoặc các chất mà không nhạy với độ pH (ví dụ, sulfobetain, sultain). Ví dụ về các chất hoạt động bề mặt không ion có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, alkylphenol etoxylat, rượu etoxylat, polyoxypropylen glycol được polyoxyetylen hóa, mercaptan được polyoxyetylen hóa, este của axit carboxylic mạch dài, alkonolamit, axetylenic glycol bậc ba, silicon được polyoxyetylen hóa, N-alkylpyrrolidon, và alkylpolyglycosidaza. Các chất làm ẩm, dầu khoáng hoặc các chất hoạt động bề mặt khác như chất tẩy không ion hoặc các chất như một hoặc nhiều chất thuộc họ PLURONICS® (BASF, Mt. Olive, NJ) cũng có thể được đưa vào, ví dụ và theo giả thuyết không giới hạn, để ngăn cản sự kết tụ của các vi hạt BT trong huyền phù vi hạt. Kết hợp bất kỳ của các chất hoạt động bề mặt này cũng được chấp nhận. Các phương án nhất định có thể bao gồm ít nhất là một chất hoạt động bề mặt anion và một chất hoạt động bề mặt cation, hoặc ít nhất là một chất hoạt động bề mặt cation và một chất hoạt động bề mặt lưỡng tính mà tương thích với nhau, tức là không tạo thành phức chất kết tủa khi trộn lẫn.

Ví dụ về các chất làm đặc mà có thể cũng có mặt trong các chế phẩm dùng khu trú nhất định theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, copolyme acrylamit, agaroza, amylopectin, bentonit, canxi alginat, canxi carboxymetyl xenluloza, carbomer, carboxymetyl chitin, gồm xenluloza, dextrin, gelatin, mỡ động vật được hydro hóa, hydroxyetylxenluloza, hydroxypropylxenluloza, tinh bột hydroxypropyl, magie alginat, metylxenluloza, xenluloza vi tinh thể, pectin, PEG, axit polyacrylic, axit polymetacrylic, rượu polyvinyl, PPG, copolyme natri acrylat, natri carrageenan, gồm xanthan, và beta-glucan của nấm men. Các chất làm đặc ngoài các chất nêu trên cũng có thể được sử dụng trong các phương án của sáng chế.

Theo các phương án nhất định được dự tính ở đây, chế phẩm BT có thể chứa một hoặc nhiều chất chống nắng hoặc chất hấp thụ UV. Nếu các tính chất hấp thụ tia tử ngoại (UVA và UVB) là mong muốn, thì các chất này có thể bao gồm, ví dụ, benzophenon, benzophenon-1, benzophenon-2, benzophenon-3, benzophenon-4, benzophenon-5, benzophenon-6, benzophenon-7, benzophenon-8, benzophenon-9, benzophenon-10, benzophenon-11, benzophenon-12, benzyl salixylat, butyl PABA, xinamat este, xinoxat, DEA-metoxyxinamat, diisopropyl metyl xinamat, etyl dihydroxypropyl PABA, etyl diisopropylxinamat, etyl metoxyxinamat, etyl PABA, etyl urocanat, glyxeryl octanoat dimetoxyxinamat, glyxeryl PABA, glycol salixylat, homosalat, isoamyl p-metoxyxinamat, oxit của titan, kẽm, ziriconi, silic, mangan, và xeri, PABA, PABA este, Parsol 1789, và isopropylbenzyl salixylat, và các hỗn hợp của chúng. Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ hiểu rõ rằng chất chống nắng và chất hấp thụ UV hoặc chất bảo vệ ngoài các chất nêu trên có thể được sử dụng theo các phương án nhất định của sáng chế.

Chế phẩm BT theo sáng chế thường hữu hiệu ở độ pH nằm trong khoảng từ 2,5 đến 10,0. Tốt hơn là, độ pH của chế phẩm này là bằng hoặc khoảng bằng độ pH trong khoảng sau: từ 5,5 đến 8,5, từ 5 đến 10, từ 5 đến 9, từ 5 đến 8, từ 3 đến 10, từ 3 đến 9, từ 3 đến 8, và từ 3 đến 8,5. Tốt nhất là, độ pH là từ 7 đến 8. Chuyên gia trong lĩnh vực này có thể bổ sung thành phần điều chỉnh độ pH thích hợp vào chế phẩm theo sáng chế để điều chỉnh độ pH đến khoảng được chấp nhận. “Khoảng” pH cụ thể được hiểu bởi chuyên gia trong lĩnh vực này là bao gồm các chế phẩm trong đó tại thời điểm nhất định độ pH thực tế đo được có thể nhỏ hơn hoặc cao hơn trị số pH cụ thể với chênh lệch không lớn hơn 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 hoặc 0,1 độ pH, trong đó thấy rằng quá trình tạo chế phẩm và điều kiện bảo quản có thể dẫn đến sự thay đổi độ pH so với trị số ban đầu.

Kem, thuốc rửa, gel, thuốc mỡ, bột nhão hoặc các dạng tương tự có thể được phết lên bề mặt bị tác động và nhẹ nhàng xoa bóp. Dung dịch có thể được sử dụng theo cách tương tự, nhưng thông thường hơn là được sử dụng với ống nhỏ giọt, miếng gạc, hoặc các vật dụng tương tự, và được dùng một cách cẩn thận lên bề mặt bị nhiễm. Chế độ dùng sẽ tùy thuộc vào một số yếu tố mà có thể dễ dàng xác định

được, như độ nặng của bệnh nhiễm và tính đáp ứng của nó đối với việc điều trị ban đầu. Chuyên gia trong lĩnh vực này có thể dễ dàng xác định được lượng tối ưu của chế phẩm được dùng, cách dùng và tốc độ nhắc lại. Nói chung, dự tính rằng chế phẩm theo các phương án này và các phương án liên quan của sáng chế sẽ được dùng từ một hoặc hai hoặc nhiều lần mỗi tuần đến một, hai, ba, bốn hoặc nhiều lần mỗi ngày.

Như được bàn luận trên đây, các chế phẩm BT hữu dụng theo sáng chế cũng có thể chứa chất mang được chấp nhận, bao gồm chất pha loãng hoặc tá dược thích hợp bất kỳ, bao gồm chất bất kỳ mà bản thân nó không gây hại đến đối tượng (*ví dụ*, thực vật hoặc động vật bao gồm người) hoặc đối tượng sản xuất nhận chế phẩm này, và có thể dùng được mà không gây độc hại. Các chất mang được chấp nhận có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất lỏng, như nước, nước muối, glyxerol và etanol, và các chất tương tự, và có thể còn bao gồm các chất tăng cường độ nhớt (*ví dụ*, nhựa balsam fir) hoặc chất tạo màng như coloidion hoặc dung dịch nitroxenluloza. Phần bàn luận kỹ về các chất mang, chất pha loãng dược dụng và các tá dược khác có trong REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. current edition).

Chế phẩm BT có thể bao gồm chất liên kết với hợp chất BT và do đó tham dự vào quá trình phân phối nó đến hoặc giữ lại nó ở vị trí mong muốn trên đối tượng hoặc đối tượng sản xuất. Các chất thích hợp có thể tác động với khả năng này bao gồm các chất clathrat như xyclodextrin; các chất khác có thể bao gồm protein hoặc liposom.

Các chế phẩm BT được cấp, sử dụng hoặc kết hợp với lượng hữu hiệu, lượng này sẽ thay đổi tùy thuộc vào một số yếu tố bao gồm bản chất của vị trí phân phối (nếu liên quan), hoạt tính của hợp chất BT cụ thể được áp dụng (bao gồm việc đưa vào hoặc vắng mặt trong chế phẩm chứa chất kháng sinh, như chất kháng sinh aminoglycosit, *ví dụ*, amikaxin); độ ổn định chuyển hóa và thời gian tác dụng của hợp chất; tình trạng của đối tượng (thực vật hoặc động vật, bao gồm người) hoặc đối tượng sản xuất; cách thức và thời gian dùng; tốc độ thất thoát của hợp chất BT trong trường hợp hoạt tính thông thường ở đối tượng; và các yếu tố khác. Nói

chung, liều hàng ngày hữu hiệu trong điều trị là (đối với động vật có vú có thể trọng 70kg) từ khoảng 0,001mg/kg (*tức là*, 0,07mg) đến khoảng 100mg/kg (*tức là*, 7,0g); tốt hơn là liều hữu hiệu trong điều trị là (đối với động vật có vú có thể trọng 70kg) từ khoảng 0,01mg/kg (*tức là*, 7mg) đến khoảng 50mg/kg (*tức là*, 3,5g); tốt hơn nữa là liều hữu hiệu trong điều trị là (đối với động vật có vú có thể trọng 70kg) từ khoảng 1mg/kg (*tức là*, 70mg) đến khoảng 25mg/kg (*tức là*, 1,75g). Liều hữu hiệu đối với thực vật có thể được cho là thấp hơn khoảng 10, 20, 50 hoặc 75% hoặc hơn nữa.

Khoảng liều hữu hiệu theo sáng chế không được dự tính là khoảng liều được ưu tiên và giới hạn. Tuy nhiên, liều được ưu tiên nhất sẽ được xác định cho từng đối tượng, như được hiểu và có thể xác định được bởi chuyên gia trong lĩnh vực này (xem, *ví dụ*, Berkow et al., eds., The Merck Manual, 16th edition, Merck và Co., Rahway, N.J., 1992; Goodman et al., eds., Goodman và Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th edition, Pergamon Press, Inc., Elmsford, N.Y., (2001); Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3rd edition, ADIS Press, Ltd., Williams và Wilkins, Baltimore, MD. (1987); Ebadi, Pharmacology, Little, Brown và Co., Boston, (1985); Osolci al., eds., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990); Katzung, Basic and Clinical Pharmacology, Appleton và Lange, Norwalk, CT (1992)).

Tổng liều cần thiết đối với mỗi khóa điều trị có thể được dùng bằng cách dùng các đa liều hoặc liều đơn trong khóa điều trị nếu muốn. Các phương án được ưu tiên nhất định dự tính việc dùng một lần chế phẩm BT cho một ngày, một tuần, cho mười ngày, cho 14 ngày, hoặc cho khoảng thời gian lâu hơn. Thông thường, và theo các phương án cụ thể, việc điều trị có thể được bắt đầu với các liều lượng nhỏ hơn, các liều này chứa lượng hợp chất nhỏ hơn liều hợp chất tối ưu. Sau đó, liều lượng này được gia tăng bằng các lượng gia nhỏ cho đến khi đạt được tác dụng tối ưu trong trường hợp đó.

Bismut-Thiol để bảo vệ thực vật và các sản phẩm nông nghiệp

Các phương án theo sáng chế nhất định đề cập đến các chế phẩm và các phương pháp để bảo vệ thực vật và hoa khỏi sự nhiễm vi sinh vật và sự phát hoại bao gồm màng sinh học, để giảm sự tàn rụi và gia tăng thời hạn sử dụng sản phẩm.

Theo các phương án nhất định, bao gồm các phương án được tổng hợp trên đây, sáng chế đề xuất phương pháp bảo vệ thực vật chống lại tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus, bao gồm cho thực vật tiếp xúc với lượng hữu hiệu của chế phẩm BT trong điều kiện và thời gian đủ để thực hiện một hoặc nhiều yếu tố sau (i) ngăn chặn sự nhiễm tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus vào thực vật, (ii) ức chế sự tồn tại tế bào hoặc sự phát triển tế bào đối với hầu như toàn bộ các tế bào phù du của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus, (iii) ức chế sự tạo thành màng sinh học bởi tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus, và (iv) ức chế sự tồn tại màng sinh học hoặc sự phát triển màng sinh học của hầu như toàn bộ các tế bào tạo thành màng sinh học của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus, trong đó chế phẩm BT chứa huyền phù của các vi hạt hầu như là đơn phân tán chứa hợp chất BT, các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ 0,5µm đến 10µm.

Theo các phương án nhất định tác nhân gây bệnh là vi khuẩn bao gồm các tế bào *Erwinia amylovora* và theo các phương án nhất định tác nhân gây bệnh là vi khuẩn được chọn từ *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris* pv *dieffenbachiae*, *Pseudomonas syringae*, *Xylella fastidiosa*, *Xylophylus ampelinus*, *Monilinia fructicola*, *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii*, *Ralstonia solanacearum*, và *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Theo các phương án nhất định tác nhân gây bệnh là vi khuẩn có tính kháng chất kháng sinh và theo các phương án nhất định khác tác nhân gây bệnh là vi khuẩn có tính kháng streptomycin. Theo các phương án nhất định thực vật là cây lương thực, cây này theo các phương án nhất định khác là cây ăn quả mà theo các phương án nhất định khác được chọn từ cây táo, cây lê, cây đào, cây xuân đào, cây mận, và cây mơ. Theo các phương án nhất định cây lương thực là cây chuối thuộc giống *Musa*. Theo các phương án nhất định

khác cây lương thực là cây được chọn từ cây thân củ, cây họ đậu, và cây ngũ cốc. Theo các phương án nhất định khác cây thân củ được chọn từ *Solanum tuberosum* (khoai tây), và *Ipomoea batatas* (khoai lang).

Theo các phương án nhất định bước tiếp xúc được thực hiện một hoặc nhiều lần. Theo các phương án nhất định ít nhất là một bước tiếp xúc bao gồm một trong số các công đoạn phun, ngâm, phủ và sơn lên thực vật. Theo các phương án nhất định ít nhất là một bước tiếp xúc được thực hiện ở hoa, đầu lá xanh hoặc vị trí phát triển của thực vật, hoặc trên, tại hoặc trong các phần khác của thực vật như rễ, củ, thân, lá, cành, dây leo, thân bò, chồi, hoa hoặc một phần của nó, đầu lá xanh, quả, hạt, vỏ hạt, hoặc các phần tương tự. Theo các phương án nhất định ít nhất là một bước tiếp xúc được thực hiện trong 24, 48 hoặc 72 giờ của thời kỳ nở hoa đầu tiên trên thực vật. Theo các phương án nhất định chế phẩm BT chứa một hoặc nhiều hợp chất BT được chọn từ BisBAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, Bis-DTT, Bis-2-mercaptoetanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, Bis-Pyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismut-1-mercapto-2-propanol, và Bis-EDT/2-hydroxy-1-propanthiol. Theo các phương án nhất định tác nhân gây bệnh là vi khuẩn có tính kháng chất kháng sinh.

Theo các phương án nhất định của các phương pháp nêu trên, phương pháp này còn bao gồm cho thực vật này tiếp xúc với chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường, đồng thời hoặc lần lượt và theo thứ tự bất kỳ so với bước cho thực vật tiếp xúc với chế phẩm BT. Theo các phương án nhất định khác chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường bao gồm chất kháng sinh được chọn từ chất kháng sinh aminoglycosit, chất kháng sinh carbapenem, chất kháng sinh xephalosporin, chất kháng sinh floquinolon, chất kháng sinh penixilin kháng penixilinaza, và chất kháng sinh aminopenixilin. Theo các phương án nhất định chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường là chất kháng sinh aminoglycosit được chọn từ amikaxin, arbekaxin, gentamixin, kanamixin, neomixin, netilmixin, paromomixin, rhodostreptomixin, streptomixin, tobramixin và apramixin.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp khắc phục tính kháng chất kháng sinh ở thực vật trong hoặc trên đó có mặt tác nhân gây bệnh thực vật là vi khuẩn kháng chất kháng sinh, bao gồm (a) cho thực vật tiếp xúc với lượng hữu hiệu của chế phẩm BT trong điều kiện và thời gian đủ để thực hiện một hoặc nhiều yếu tố sau (i) ngăn chặn thực vật nhiễm bệnh do tác nhân gây bệnh là vi khuẩn kháng chất kháng sinh, (ii) ức chế sự tồn tại tế bào hoặc sự phát triển tế bào đối với hầu như toàn bộ các tế bào phù du của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn kháng chất kháng sinh, (iii) ức chế sự tạo thành màng sinh học bởi tác nhân gây bệnh là vi khuẩn kháng chất kháng sinh, và (iv) ức chế sự tồn tại màng sinh học hoặc sự phát triển màng sinh học của hầu như toàn bộ các tế bào tạo thành màng sinh học của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn kháng chất kháng sinh, trong đó chế phẩm BT chứa huyền phù của các vi hạt hầu như là đơn phân tán chứa hợp chất BT, các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ $0,5\mu\text{m}$ đến $10\mu\text{m}$; và (b) cho thực vật này tiếp xúc với chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường, đồng thời hoặc lần lượt và theo thứ tự bất kỳ so với bước cho thực vật tiếp xúc với chế phẩm BT.

Chất sát trùng trên cơ sở Bismut Thiol-(BT)

Như được lưu ý trên đây, một số sản phẩm tự nhiên (ví dụ, các chất kháng sinh) và hóa chất tổng hợp có tính chất kháng vi sinh vật (ví dụ, kháng khuẩn, kháng virus, kháng nấm), và đặc biệt là tính chất kháng khuẩn, đã được biết đến trong lĩnh vực này và ít nhất là được mô tả một phần bằng các cấu trúc hóa học và bằng tác dụng kháng vi sinh vật, như khả năng diệt vi sinh vật (tác dụng “diệt” như tính chất diệt vi khuẩn), khả năng làm ngừng hoặc làm suy yếu sự phát triển của vi sinh vật (tác dụng “tĩnh” như tính chất kìm vi khuẩn), hoặc khả năng cản trở chức năng của vi sinh vật như chức năng xâm chiếm hoặc gây nhiễm vào vị trí, chức năng tiết exopolysaccharit của vi khuẩn và/hoặc chức năng chuyển hóa từ cộng đồng phù du thành cộng đồng màng sinh học hoặc mở rộng sự tạo thành màng sinh học. Các chất kháng sinh, chất diệt khuẩn, chất sát trùng và các chất tương tự (chứa bismut-thiol hoặc hợp chất BT) được bàn luận trên đây và, ví dụ, trong U.S. 6,582,719, bao gồm các yếu tố mà ảnh hưởng đến sự chọn lựa và sử dụng các chế

phẩm này, *ví dụ*, khả năng diệt vi khuẩn hoặc kìm vi khuẩn, nồng độ hữu hiệu, và nguy cơ độc hại đối với mô vật chủ.

Bismut thiol (BT), và các hợp chất thiol liên quan chứa kim loại nhóm V khác (*ví dụ*, asen, antimon) thay thế cho bismut, được bàn luận trên đây. Sáng chế cũng đề cập đến các chế phẩm và phương pháp hướng đến các chế phẩm BT vi hạt thuận lợi, các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ 0,5µm đến 10µm. Do đó các phương án đại diện nhất định gắn liền với việc sử dụng chất kháng vi sinh vật theo sáng chế, bao gồm chất chống màng sinh học, để xử lý hoặc phòng ngừa sự nhiễm và màng sinh học ở thực vật, các chất này thường có trong các chế phẩm chứa một hoặc nhiều bismut thiol vi hạt với nồng độ nằm trong khoảng từ 0,0001% đến 0,001% tính theo trọng lượng, tốt hơn là ở dạng kiềm. Các chế phẩm này có thể chứa các BT và một hoặc nhiều chất mang hoặc tá dược, và/hoặc có thể còn chứa các thành phần khác như các chất diệt vi sinh vật tương hợp khác, các chất này, theo các phương án được ưu tiên nhất định, bao gồm các chất kháng sinh có tác dụng đồng vận hoặc **tăng cường** như được mô tả ở đây.

Cây trồng mục tiêu được bảo vệ trong các phương án được dự tính nhất định nhưng không giới hạn bao gồm, *ví dụ*, các loài thực vật sau: ngũ cốc (*ví dụ*, lúa mỳ, lúa mạch, lúa mạch đen, yến mạch, lúa nước, lúa miến và các cây trồng có liên quan), củ cải đường (*ví dụ*, củ cải đường và củ cải đường dùng cho chăn nuôi), táo, quả hạch và quả mềm (*ví dụ*, táo, lê, mận, đào, quả hạnh, quả anh đào, quả dâu tây, quả mâm xôi), cây họ đậu, (*ví dụ*, đậu, đậu lăng, đậu Hà Lan, đậu nành), cây có dầu (*ví dụ*, hạt cải dầu, mù tạc, cây anh túc, cây ô liu, cây hoa hướng dương, cây dừa, cây dầu thầu dầu, hạt ca cao, lạc), loài dưa (*ví dụ*, dưa chuột, bí ngô, dưa hấu), cây lấy sợi (*ví dụ*, cây bông, cây lanh, cây gai dầu, cây đay), họ cam chanh (*ví dụ*, cam, chanh, bưởi, quýt), rau (*ví dụ*, rau bina, rau diếp, măng tây, cải bắp, cà rốt, hành, cà chua, khoai tây, ớt Hưng), cây họ long não (*ví dụ*, cây lê tàu, quế, long não), và các thực vật khác như ngô, thuốc lá, quả hạch, cà phê, mía, trà, cây nho, cây hublông, cây chuối và các loài cao su khác, cũng như các loài cây trang trí (kiểu hoa cúc) bao gồm các cây hoa và các cành hoa được thu hoạch từ chúng. Các phương án nhất định dự tính việc kéo dài thời hạn sử dụng sản phẩm (*ví dụ*, kéo dài thời gian

trong đó đối tượng hữu dụng về mặt thương mại, dinh dưỡng và/hoặc thẩm mỹ, có ý nghĩa thống kê so với nhóm đối chứng không được tiếp xúc với BT vi hạt theo sáng chế) thu hoạch được cây trồng mục tiêu như cảnh hoa hoặc thực phẩm thu được từ cây trồng mục tiêu (ví dụ, quả, rau, hạt, v.v.) bằng cách cho cây trồng tiếp xúc với chế phẩm chứa một hoặc nhiều hợp chất BT vi hạt theo sáng chế.

Nồng độ hữu hiệu của các BT vi hạt theo sáng chế, để sử dụng trong các phương án này và các phương án liên quan, sẽ tùy thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm việc lựa chọn BT, độ pH, nhiệt độ, tỷ lệ mol của các thành phần BT, và các vi sinh vật cần xử lý. Tính hữu hiệu cũng tùy thuộc vào mục đích của việc áp dụng cụ thể là để phòng ngừa sự nhiễm hoặc xử lý sự nhiễm đang tồn tại (ví dụ, màng sinh học). Liều phòng ngừa sẽ đủ trong hầu hết trường hợp. Nồng độ kéo dài hữu hiệu của BT có khả năng là xung quanh MIC của sinh vật kháng nhất. Nồng độ này có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 2 µg/ml, nhưng có thể lên đến 8 µg/ml hoặc cao hơn, tùy thuộc vào hợp chất BT vi hạt cụ thể. Theo một phương án đại diện, BisPyrithion (BisPyr) vi hạt được tạo ra với tỷ lệ mol 5:1 (bismut:pyrithion) để áp dụng cho thực vật. Theo phương án khác, bismut thiol kép ở dạng vi hạt, BisPyr/Ery (Bis-pyrithion/dithioerythritol) có thể được tạo ra ở dạng chất kháng vi sinh vật phổ rộng. Theo phương án khác, BT vi hạt có thể được kết hợp với các chất kháng sinh cụ thể như được mô tả ở đây, tốt hơn là chất kháng sinh có tác dụng đồng vận hoặc tác dụng tăng cường, để cung cấp sự bảo vệ hiệu lực và tiềm năng chống lại sự nhiễm vi sinh vật đối với thực vật và cảnh hoa/cây. Dựa trên tác dụng đồng vận quan sát được giữa BisEDT và gentamixin, kết hợp BT-chất kháng sinh là được ưu tiên theo các phương án nhất định đối với việc áp dụng trong nông nghiệp.

Theo các phương án khác, việc bổ sung vào chế phẩm BT vi hạt natri hydrocacbonat (natri bicarbonat) hoặc chất kiềm khác (ví dụ, kali bicarbonat, canxi carbonat) có thể bổ sung hoặc tăng cường tác dụng kháng vi sinh vật của BT. Các thành phần khác trong các chế phẩm BT vi hạt để sử dụng trong nông nghiệp có thể bao gồm các chất có hoạt tính bề mặt và các chất kháng vi sinh vật khác, ví dụ, clohexidin, chiết xuất cỏ rế máu, metronidazol, các hợp chất amoni bậc bốn,

như xetylpyridini clorua; các điguanua, như clohexidin digluconat, hexetidin, octenidin, alexidin; và các hợp chất bisphenolic được halogen hóa, như 2,2' metylenbis-(4-chloro-6-bromophenol), hoặc các hợp chất phenolic kháng khuẩn khác, alkylhydroxybenzoat, các peptit có tính cation kháng vi sinh vật, aminoglycosit, quinolon, lincosamit, penixilin, xephalosporin, macrolit, tetraxyclin, và các chất kháng sinh khác, taurolidin hoặc taurultam, A-dec ICX, tinh dầu *Coleus forskohlii*, các chất kháng vi sinh vật trên cơ sở bạc hoặc keo bạc, các chất kháng vi sinh vật trên cơ sở thiếc hoặc đồng, các chất oxy hóa clo hoặc brom, dầu Manuka, chiết xuất oregano, cỏ xạ hương, hương thảo hoặc các thảo mộc khác, chiết xuất hạt bưởi; các chất chống viêm hoặc chống oxy hóa như ibuprofen, flurbiprofen, aspirin, indomethaxin, chiết xuất lô hội, nghệ, lá ô liu, đinh hương, panthenol, retinol, axit béo omega-3, axit gama-linolenic (GLA), trà xanh, gừng, hạt nho, v.v.; các chất mang được dùng, ví dụ, tinh bột, sucroza, nước hoặc hệ nước/rượu, DMSO, v.v.; các chất hoạt động bề mặt, như các chất hoạt động bề mặt anion, không ion, cation hoặc lưỡng tính, hoặc saponin từ nguyên liệu thực vật (ví dụ, Patent Mỹ số 6,485,711); các chất đệm và muối; và các thành phần tùy ý khác mà có thể được chứa trong đó, ví dụ, các chất tẩy trắng như các hợp chất peroxy, kali peroxydiphosphat, các hệ sủi bọt như hệ natri bicarbonat/axit xitric, và v.v..

Các chế phẩm BT vi hạt để dùng trong nông nghiệp và dùng cho thực vật có thể, theo các phương án nhất định, cũng được kết hợp với các thành phần này và các thành phần tùy ý khác mà tạo ra tác dụng thêm, tác dụng tăng cường hoặc tác dụng đồng vận như được mô tả ở đây, hoặc được kết hợp vào dạng liposom hoặc dạng hạt nano để tăng cường hoạt tính và khả năng phân phối. Các phương án nhất định chỉ ngoại trừ các chế phẩm BT vi hạt mà chứa các liposom như phospholipit (ví dụ, phosphocholin) và/hoặc các liposom chứa cholesterol, trong khi các phương án nhất định khác không bị giới hạn như vậy và có thể bao gồm các liposom này và các liposom khác. Các chế phẩm BT vi hạt đặc biệt cũng có thể được sản xuất để chứa các chất mang, các tá dược hoặc các chất phụ gia khác để gia tăng tính bám dính của chế phẩm này vào bề mặt (ví dụ, glucoza, tinh bột, axit xitric, các dầu mang, các chất nhũ hóa, các chất phân tán, các chất hoạt động bề mặt, và các chất tương tự, v.v.).

Theo các phương án được dự tính khác, các chế phẩm BT vi hạt để sử dụng làm chất chống màng sinh học trên thực vật hoặc cây trồng nông nghiệp có thể được kết hợp với các chất khác để kiểm soát sự phát triển của màng sinh học. Đã biết rằng, ví dụ, việc dò tìm mật độ tới hạn giữa các loài có liên quan đến sự tạo thành màng sinh học. Các chất nhất định mà làm gia tăng quá trình phụ thuộc LuxS hoặc tín hiệu dò tìm mật độ tới hạn giữa các loài (ví dụ, các patent Mỹ số 7,427,408 và 6,455,031) giúp kiểm soát các màng sinh học, như các hợp chất phong bế N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserin lacton (OdDHL) và/hoặc các chất tương tự N-butyryl-L-homoserin lacton (BHL). Các chất chống màng sinh học này được kết hợp với các BT vi hạt theo sáng chế có thể được phân phối dưới dạng thuốc phun lá để ức chế sự phát triển của màng sinh học vi khuẩn hoặc để xử lý các màng sinh học đã được tạo thành trước đó. Theo phương án khác, các chất chống màng sinh học này được chứa trong vi hạt có thể phân hủy về mặt sinh học để kiểm soát sự giải phóng, và/hoặc ở dạng liposom với các chất kháng vi sinh vật khác.

Do đó, BT vi hạt theo sáng chế có thể, theo các phương án nhất định, được sử dụng với các kỹ thuật có sẵn khác để cải thiện tác dụng chống màng sinh học. Các BT vi hạt theo sáng chế có thể tác dụng đồng vận hoặc tăng cường hoạt tính kháng các tác nhân gây bệnh cho thực vật nhất định của các chất kháng sinh streptomycin và/hoặc gentamixin. Streptomycin không diệt vi khuẩn mà ức chế sự nhân bội của chúng và do đó giảm tỷ lệ nhụy hoa bị vi khuẩn xâm chiếm, nhờ đó giảm sự nhân bội sau đó của vi khuẩn trong các lỗ tiết mật hoa (nectarthode). (Xem, ví dụ, Domenico et al. *J Antimicrob Chemo* 1991;28:801-10; Domenico et al. *Research Advances in Antimicrob Agents Chemother* 2003;3:79-85). Các ưu điểm khác có thể đạt được qua việc sử dụng chất hỗ trợ thuốc phun loại hoạt hóa (ví dụ, Regulaid™), chất này cải thiện khả năng bao phủ và xâm nhập của streptomycin đủ để cho phép lượng chất kháng sinh này được giảm xuống để sử dụng an toàn.

Các BT vi hạt theo sáng chế có thể được kết hợp với thành phần hoạt tính bất kỳ hiện đang được sử dụng để chống lại các vi khuẩn gây bệnh cho thực vật và nông nghiệp, bao gồm các chất có hoạt tính chống màng sinh học, như các chất oxy

hóa, các chất tạo chelat (ví dụ, các chất tạo chelat sắt), các chất diệt vi sinh vật và các chất diệt khuẩn. Các kết hợp được ưu tiên có thể có tác dụng chống màng sinh học bổ sung, hoặc có thể có tác dụng chống màng sinh học tăng cường hoặc đồng vận theo sáng chế. Các phương án nhất định dự tính các chế phẩm BT vi hạt được sản xuất để có tính kỵ nước để tăng cường sự giữ lại BT trên bề mặt, ví dụ bằng cách sử dụng các thiol kỵ nước (ví dụ, thioclophenol) làm gia tăng tính chất bám dính. Các BT có điện tích thực âm (ví dụ, tỷ lệ mol bismut:thiol là 1:2) cũng có thể có tính chất bám dính gia tăng.

Huyền phù vi hạt hợp chất BT có thể được dùng ở dạng chế phẩm chứa nước, huyền phù hoặc dung dịch trong dung môi hữu cơ bao gồm chất đẩy hydrocarbon được halogen hóa, dầu huyền phù, hoặc ở dạng bột khô. Các chế phẩm chứa nước có thể được sol khí hóa bằng các ống phun chất lỏng bằng cách sử dụng phương pháp phun mù thủy lực hoặc phun mù siêu âm. Các hệ dựa trên cơ sở chất đẩy có thể sử dụng các dụng cụ phân tán cao áp thích hợp. Bột khô có thể sử dụng dụng cụ phân tán bột khô, dụng cụ này có thể phân tán các vi hạt chứa BT một cách hữu hiệu. Sự phân phối và kích cỡ hạt mong muốn có thể đạt được bằng cách chọn lựa dụng cụ thích hợp.

Qua phần mô tả này, trừ phi có quy định khác, từ “bao gồm” sẽ được hiểu là để chỉ sự bao gồm bước hoặc yếu tố đã nêu hoặc nhóm các bước hoặc các yếu tố này nhưng không loại trừ bước hoặc yếu tố bất kỳ khác hoặc nhóm các yếu tố hoặc các bước khác. Từ “chứa” có nghĩa là bao gồm, và được giới hạn ở, từ “bao gồm”. Do đó, cụm từ “bao gồm” chỉ rằng các yếu tố được liệt kê là cần thiết hoặc bắt buộc, và không thể có mặt các yếu tố khác. Cụm từ “về cơ bản là chứa” có nghĩa là bao gồm các yếu tố bất kỳ được liệt kê sau cụm từ này, và được giới hạn ở các yếu tố khác mà không cản trở hoặc góp phần vào hoạt tính hoặc tác dụng được nêu trong phần mô tả cho các yếu tố được liệt kê. Do đó, cụm từ “về cơ bản là chứa” có nghĩa là các yếu tố được liệt kê là cần thiết hoặc bắt buộc, nhưng không cần thiết phải có yếu tố nào khác và có thể hoặc không thể có mặt tùy thuộc vào việc chúng có tác động đến hoạt tính hoặc tác dụng của các yếu tố được liệt kê hay không.

Trong phần mô tả này và yêu cầu bảo hộ kèm theo, dạng số ít “một” bao gồm cả việc viện dẫn đến số nhiều trừ khi nội dung quy định rõ theo cách khác. Như được sử dụng ở đây, theo các phương án cụ thể, thuật ngữ “khoảng” hoặc “xấp xỉ” khi đứng trước một trị số biểu thị trị số này cộng hoặc trừ đi khoảng 5%, 6%, 7%, 8% hoặc 9%. Theo các phương án khác, các thuật ngữ “khoảng” hoặc “xấp xỉ” khi đứng trước một trị số biểu thị trị số này cộng hoặc trừ đi khoảng 10%, 11%, 12%, 13% hoặc 14%. Theo các phương án khác, thuật ngữ “khoảng” hoặc “xấp xỉ” khi đứng trước một trị số biểu thị trị số này cộng hoặc trừ đi khoảng 15%, 16%, 17%, 18%, 19% hoặc 20%.

Tài liệu viện dẫn: Badireddy et al., *Biotechnol Bioengineering* 2008;99:634-43; Badireddy et al., *Biomacromolecules*, 2008;9:3079-89; Bayston et al., *Biomaterials* 2009;30:3167-73. Codony et al., *J Applied Microbiol* 2003;95:288-93. Domenico et al., *J Antimicrob Chemo* 1991;28:801-810. Domenico et al., *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1697-703. Domenico et al., 1999 *Infect Immun* 67:664-669. Domenico et al., *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1417-21. Domenico et al., *Research Advances in Antimicrob Agents Chemother* 2003;3:79-85. Domenico et al., *Peptides* 2004;25:2047-53. Domenico et al., 2005 *Antibiotics for Clinicians* 9:291-297. Dufrêne, *J Bacteriol* 2004;186:3283-5. Eboigbodin et al., *Biomacromolecules* 2008;9:686-95. Feazel LM, Baumgartner LK, Peterson KL, et al. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *PNAS* 2009 (epub ahead of print). Geesey GG, Lewandowski Z, Flemming H-C (eds). Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994. Huang et al., *J Antimicrob Chemother* 1999;44:601-5; Juhni et al., *Proceedings Annual Meeting Adhesion Society* 2005;28:179-181. Omoike et al., *Biomacromolecules* 2004;5:1219-30. Ouazzani K, Bentama J. Bio-fouling in membrane processes: micro-organism/surface interactions, hydrodynamic detachment method. *Congrès* 2008;220:290-4. Ozdamar et al., *Retina* 1999;19:122-6. Piccirillo et al., *J Mater Chem* 2009;19:6167. Reunala et al., *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:397-401. Romo et al., *Environ Progress* 1999;18:107-12. Saha DC, Shahin S, Rackow EC, Astiz ME, Domenico P. 2000. Cytokine modulation by bismut-etandithiol in experimental sepsis. 10th Intl. Conf.

Inflamm. Res. Assoc., Hot Springs, VA. Sawada et al., *JPRAS* 1990;43:78-82. Schultz, *J Fluids Eng* 2004;126:1039-47. Tiller JC, Hartmann L, Scherble J. Reloadable antimicrobial coatings based on amphiphilic silicone networks. *Surface Coatings International Part B: Coatings Transactions* 2005;88:1-82. Tsuneda et al., *FEMS Microbiol Lett* 2003;223:287-92. Vu et al., *Molecules* 2009;14:2535-54. Yan et al., *Ophthalmologica* 2008;222:245-8. Yeo et al., *Water Sci Technol* 2007;55:35-42.

Các tài liệu viện dẫn bổ sung (bao gồm các tài liệu về vấn đề bảo vệ thực vật và các vấn đề liên quan): Chandler et al., *Antimicrob. Agents Chemother* 1978;14:60-8. Choudhary et al., *Microbiol Res* 2009;164:493-513. Cooksey, *Annu Rev Phytopathol* 1990;28:201-14. Dill K, McGown EL. The biochemistry of arsenic, bismut và antimony. In S. Patai (ed.), *The chemistry of organic arsenic, antimony và bismut compounds*. John Wiley & Sons, New York, 1994, pp. 695-713. Domenico et al., 1996 *J Antimicrob Chemother* 38:1031-1040. Domenico et al., 2000 *Infect Med* 17:123-127. Dow et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10995-1000. Dulla et al., *PNAS* 2008;105:3-082-7. Espinosa-Urgel et al., *Microbiol* 2002;148:341-3. Expert, *Annu Rev Phytopathol* 1999;37:307-34. Ganguli et al., *Smart Mater. Struct.* 2009;18:104027. Huang et al., *J Antimicrob Chemother* 1999;44:601-5. Hung et al., *J Exptl Marine Biol Ecol* 2008;361:36-41. Johnson et al., *Annu Rev Phytopathol* 1998;36:227-48. Kang et al., *Mol Microbiol* 2002; 46:427-37. Kavouras et al., *Inverteb Biol* 2005;122:138-51. Koczan et al., *Phytopathol* 2009;99:1237-44. Kumar et al., *Nature Materials* 2008;7:236-41. Marques et al., *Phytopathol* 2003;93:S57. McManus et al., *Annu Rev Phytopathol* 2002;40:443-65. Monier et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:15977-82. Norelli JL., Holleran HT, Johnson WC et al. Resistance of Geneva and other apple root- stocks to *Erwinia amylovora*. *Plant Dis* 87:26-32. Oh et al., *FEMS Microbiology Lett* 2005;253:185-192. Omoike et al., *Biomacromolecules* 2004;5:1219-30. Ramey et al., *Curr Opinion Microbiol* 2004;7:602-9. Salo et al., *Infection* 1995;23:371-7. Schultz et al., *Biofouling* 2007;23:331-41. Siboni et al., *FEMS Microbiol Lett* 2007;274:24-9. Sosnowski et al., *Plant Pathol* 2009;58:621-35. Tsuneda et al., *FEMS Microbiol Lett* 2003;223:287-92. von Bodman et al.,

Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95:7687-7692. Vu et al., *Molecules* 2009;14:2535-54. Zaini et al., *FEMS Microbiol LETT* 2009;295:129-34.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau được mô tả nhằm minh họa và không giới hạn phạm vi sáng chế.

VÍ DỤ 1

Điều chế các hợp chất BT

Các hợp chất BT sau được điều chế theo các phương pháp của Domenico et al. (U.S. RE37,793, U.S. 6,248,371, U.S. 6,086,921, U.S. 6,380,248) hoặc ở các dạng vi hạt theo cách thức tổng hợp được mô tả dưới đây cho BisEDT. Tỷ lệ nguyên tử được thể hiện là tính theo nguyên tử bismut đơn, để so sánh, dựa trên cơ sở các tỷ lệ hợp thức của các chất phản ứng được sử dụng và xu hướng đã biết của bismut để tạo thành các phức chất hóa trị ba với các hợp chất chứa lưu huỳnh. Số trong dấu ngoặc đơn là tỷ lệ của bismut so với một (hoặc nhiều) chất thiol (ví dụ Bi:thiol1/thiol2; xem thêm Bảng 1).

- 1) CPD 1B-1 Bis-EDT (1:1) $\text{BiC}_2\text{H}_4\text{S}_2$
- 2) CPD 1B-2 Bis-EDT (1:1,5) $\text{BiC}_3\text{H}_6\text{S}_3$
- 3) CPD 1B-3 Bis-EDT (1:1,5) $\text{BiC}_3\text{H}_6\text{S}_3$
- 4) CPD 1C Bis-EDT (chế phẩm Bi hòa tan) (1:1,5) $\text{BiC}_3\text{H}_6\text{S}_3$
- 5) CPD 2A Bis-Bal (1:1) $\text{BiC}_3\text{H}_6\text{S}_2\text{O}$
- 6) CPD 2B Bis-Bal (1:1,5) $\text{BiC}_{4,5}\text{H}_9\text{O}_{1,5}\text{S}_3$
- 7) CPD 3A Bis-Pyr (1:1,5) $\text{BiC}_{7,5}\text{H}_6\text{N}_{1,5}\text{O}_{1,5}\text{S}_{1,5}$
- 8) CPD 3B Bis-Pyr (1:3) $\text{BiC}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_3$
- 9) CPD 4 Bis-Ery (1:1,5) $\text{BiC}_6\text{H}_{12}\text{O}_3\text{S}_3$

- 10) CPD 5 Bis-Tol (1:1,5) $\text{BiC}_{10,5}\text{H}_9\text{S}_3$
- 11) CPD 6 Bis-BDT (1:1,5) $\text{BiC}_6\text{H}_{12}\text{S}_3$
- 12) CPD 7 Bis-PDT (1:1,5) $\text{BiC}_{4,5}\text{H}_9\text{S}_3$
- 13) CPD 8-1 Bis-Pyr/BDT (1:1/1)
- 14) CPD 8-2 Bis-Pyr/BDT (1:1/0,5)
- 15) CPD 9 Bis-2hydroxy, propan thiol (1:3)
- 16) CPD 10 Bis-Pyr/Bal (1:1/0,5)
- 17) CPD 11 Bis-Pyr/EDT (1:1/0,5)
- 18) CPD 12 Bis-Pyr/Tol (1:1/0,5)
- 19) CPD 13 Bis-Pyr/PDT (1:1/0,5)
- 20) CPD 14 Bis-Pyr/Ery (1:1/0,5)
- 21) CPD 15 Bis-EDT/2hydroxy, propan thiol (1:1/1)

Bismut-1,2-etandithiol vi hạt (Bis-EDT, chế phẩm bismut hòa tan) được điều chế như sau:

Bổ sung từ từ từng giọt 0,331L ($\sim 0,575\text{mol}$) dung dịch nước $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ (43% $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ (trọng lượng/trọng lượng), 5% axit nitric (trọng lượng/trọng lượng), 52% nước (trọng lượng/trọng lượng), Shepherd Chemical Co., Cincinnati, OH, sản phẩm số 2362; $\delta \sim 1,6\text{g/mL}$) đồng thời khuấy, sau đó bổ sung từ từ ethanol tuyệt đối (4L) vào lượng dư (11,4L) dung dịch nước HNO_3 5% ở nhiệt độ trong phòng trong bình polypropylen dung tích 15L. Một số kết tủa trắng được tạo thành nhưng được hòa tan bằng cách tiếp tục khuấy. Dung dịch ethanol ($\sim 1,56\text{L}$, $\sim 0,55\text{M}$) của 1,2-etandithiol (CAS 540-63-6) được điều chế riêng biệt bằng cách bổ sung 72,19mL ($0,863\text{mol}$) 1,2-etandithiol sử dụng ống tiêm dung tích 60mL vào 1,5L ethanol tuyệt đối, và sau đó khuấy trong năm phút. Sau đó chất phản ứng 1,2-etandithiol/EtOH

được bổ sung từ từ từng giọt trong năm giờ vào dung dịch nước $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 / \text{HNO}_3$, và tiếp tục khuấy qua đêm. Sản phẩm được tạo thành được để yên để kết tủa trong khoảng 15 phút, sau đó dịch lọc được loại bỏ với tốc độ 300mL/phút bằng cách sử dụng bơm nhu động. Sau đó sản phẩm này được thu gom bằng cách lọc trên giấy lọc mịn trong phễu Buchner đường kính 15cm, và rửa lần lượt bằng ba thể tích 500mL của etanol, nước USP, và axeton để thu được BisEDT (694,51g/mol) ở dạng chất rắn dạng bột vô định hình màu vàng. Sản phẩm được đặt trong bình thủy tinh màu hổ phách dung tích 500mL và làm khô bằng CaCl_2 trong môi trường độ chân không cao trong 48 giờ. Vật liệu được thu hồi (hiệu suất ~200g) tỏa ra mùi đặc trưng của thiol. Sản phẩm thô được hòa tan lại trong 750mL etanol tuyệt đối, khuấy trong 30 phút, sau đó được lọc và rửa lần lượt bằng 3 x 50mL etanol, 2 x 50mL axeton, và rửa lại bằng 500mL axeton. Bột được rửa lại này được nghiền bằng dung dịch NaOH 1M (500mL), lọc và rửa bằng 3 x 220mL nước, 2 x 50mL etanol, và 1 x 400mL axeton để tạo thành 156,74g BisEDT tinh chế. Các mẻ sau được điều chế về cơ bản là theo cùng một cách thức thu được hiệu suất khoảng 78-91%.

Sản phẩm được mô tả là có cấu trúc được thể hiện trên đây trong công thức I bằng cách phân tích các số liệu từ phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) ^1H và ^{13}C , phổ hồng ngoại (IR), phổ tử ngoại (UV), phổ khối (MS) và phép phân tích nguyên tố. Phương pháp HPLC được phát triển để xác định độ tinh khiết hóa học của BisEDT trong đó mẫu được điều chế trong DMSO (0,5mg/mL). λ_{max} được xác định bằng cách quét dung dịch BisEDT trong DMSO ở bước sóng nằm trong khoảng từ 190nm và 600nm. Việc rửa giải HPLC hệ cố định ở tốc độ 1mL/phút được thực hiện ở nhiệt độ môi trường trong pha động là axit formic 0,1% trong hỗn hợp axetonitril:nước (9:1) trên máy sắc ký Waters (Millipore Corp., Milford, MA) model 2695 với bộ dò UV giám sát ở bước sóng 265nm (λ_{max}), thể tích tiêm 2 μL , được trang bị cột phân tích đường kính trong 250X4,6mm, 5 μm , YMC Pack PVC Sil NP (Waters) và đỉnh đơn được phát hiện, phản ánh độ tinh khiết hóa học là $100 \pm 0,1\%$. Phân tích nguyên tố phù hợp với cấu trúc có công thức (I).

Vật chất hạt được làm khô được mô tả để đánh giá các tính chất về kích cỡ hạt. Ngắn gọn là các vi hạt được tái tạo huyền phù trong 2% Pluronic® F-68 (BASF, Mt. Olive, NJ) và huyền phù này được siêu âm trong 10 phút trong máy siêu âm bể nước ở điều kiện chuẩn trước khi phân tích bằng cách sử dụng máy phân tích hạt Nano-S Nanosizer/Zetasizer (model ZEN1600 (không có khả năng đo thế zeta), Malvern Instruments, Worcestershire, UK) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Từ số liệu được biên soạn của hai phép đo thấy rằng các vi hạt có sự phân bố một môi với toàn bộ trường hợp phát hiện được là có đường kính trung bình thể tích (VMD) nằm trong khoảng từ 0,6micron đến 4micron, và có VMD đỉnh khoảng 1,3micron. Ngược lại, nếu BisEDT được điều chế bằng các phương pháp trước đây (Domenico et al., 1997 *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(8):1697-1703) phần lớn hạt dị phân tán và có kích cỡ lớn hơn đáng kể, ngăn chặn việc đặc trưng hóa chúng trên cơ sở VMD.

VÍ DỤ 2

Mô hình cụm màng sinh học của sự nhiễm trùng vết thương mãn tính: ức chế bằng hợp chất BT

Vì vi khuẩn tồn tại trong vết thương mãn tính thông qua cách sống màng sinh học nên các BT được kiểm tra khả năng chống lại màng sinh học bằng tác dụng đối với sự sống sót tế bào vi khuẩn sử dụng các màng sinh học về cơ bản là được chuẩn bị theo các phương pháp được mô tả (Anderl et al., 2003 *Antimicrob Agents Chemother* 47:1251-56; Walters et al., 2003 *Antimicrob Agents Chemother* 47:317; Wentland et al., 1996 *Biotchnol. Prog.* 12:316; Zheng et al., 2002 *Antimicrob Agents Chemother* 46:900).

Ngắn gọn là, cụm màng sinh học được phát triển trên 10% thạch đậu nành trypsin trong 24 giờ, và được chuyển vào các đĩa Mueller Hinton chứa các chất điều trị. Sau khi điều trị, các màng sinh học được phân tán vào nước pepton chứa glutathion 2% trọng lượng/thể tích (trung hòa BT), và được pha loãng từng bậc trong nước pepton trước khi được chấm lên các đĩa để đếm. Hai loài vi khuẩn được phân lập từ các vết thương mãn tính được sử dụng riêng rẽ để tạo ra các cụm màng

sinh học để thử nghiệm. Chúng là *Pseudomonas aeruginosa*, chủng vi khuẩn gram âm, và *Staphylococcus aureus* kháng methixilin (MRSA), vi khuẩn gram dương.

Các cụm màng sinh học vi khuẩn được phát triển trên mặt của màng xốp mịn trên đĩa thạch về cơ bản là như được mô tả (Anderl et al., 2003 *Antimicrob Agents Chemother* 47:1251-56; Walters et al., 2003 *Antimicrob Agents Chemother* 47:317; Wentland et al., 1996 *Biotchnol. Prog.* 12:316; Zheng et al., 2002 *Antimicrob Agents Chemother* 46:900). Cụm màng sinh học này có nhiều dấu hiệu quen thuộc với các mô hình màng sinh học khác, ví dụ, chúng bao gồm các tế bào kết tụ dày đặc trong chất nền được hydrat hóa ở mức cao. Các tác giả khác cũng đã báo cáo là (Brown et al., *J Surg Res* 56:562; Millward et al, 1989 *Microbios* 58:155; Sutch et al., 1995 *J Pharm Pharmacol* 47:1094; Thrower et al., 1997 *J Med Microbiol* 46:425) đã quan sát thấy rằng vi khuẩn trong cụm màng sinh học cũng có tính nhạy kháng vi sinh vật giảm nhiều, tính nhạy này đã được định lượng trong trường hợp phức tạp hơn trong bình phản ứng màng sinh học in vitro. Cụm màng sinh học được sinh ra một cách dễ dàng và có thể sinh sản với số lượng lớn. Theo giả thuyết không giới hạn, mô hình cụm màng sinh học này có chung một số dấu hiệu về vết thương bị nhiễm trùng: vi khuẩn phát triển tại bề mặt tiếp xúc với không khí với các chất dinh dưỡng được cung cấp từ phía dưới màng sinh học và dòng chất lỏng tối thiểu. Nhiều nguồn dinh dưỡng được sử dụng để nuôi dưỡng cụm màng sinh học, bao gồm thạch máu, đây được tin là để bắt chước điều kiện dinh dưỡng in vivo.

Cụm màng sinh học được chuẩn bị bằng cách cấy 5µl vết môi trường lỏng vi khuẩn phù du vào màng lọc polycarbonat đường kính 25mm. Màng này được khử trùng trước khi cấy, bằng cách phơi trước ánh sáng tử ngoại trong 10 phút mỗi phía. Phần cấy được phát triển qua đêm trong môi trường vi khuẩn ở 37°C và được pha loãng trong môi trường sạch để có mật độ quang là 0,1 ở bước sóng 600nm trước khi lắng trên màng. Sau đó màng này được đặt lên đĩa thạch chứa môi trường phát triển. Sau đó đĩa này được bao phủ và đặt, nghịch đảo, trong tủ áp ở 37°C. Mỗi 24 giờ, màng này và cụm màng sinh học được cấy truyền, sử dụng kẹp vô trùng, sang đĩa mới. Cụm màng sinh học thường được sử dụng để thử nghiệm sau 48 giờ phát

triển, tại thời điểm này có khoảng 10^9 con vi khuẩn trên một màng. Phương pháp cụm màng sinh học được áp dụng thành công để nuôi cấy rất nhiều màng sinh học loại đơn lẻ và loại hỗn hợp.

Để đo tính nhạy cảm đối với chất kháng vi sinh vật (ví dụ, hợp chất BT bao gồm các kết hợp của các hợp chất BT; các chất kháng sinh; và các kết hợp hợp chất BT-chất kháng sinh), cụm màng sinh học được cấy truyền vào đĩa thạch được bổ sung các chất điều trị kháng vi sinh vật được thử nghiệm. Nếu khoảng thời gian phơi trước việc điều trị kháng vi sinh vật vượt quá 24 giờ thì cụm màng sinh học được chuyển sang đĩa điều trị sạch hàng ngày. Tại cuối khóa điều trị, cụm màng sinh học được đặt trong các ống chứa 10ml dung dịch đệm và xoáy trong 1-2 phút để phân tán màng sinh học. Trong một số trường hợp, cần có xử lý ngăn gọn mẫu bằng máy làm đồng nhất mô để phá vỡ các kết tụ tế bào. Sau đó, các huyền phù tế bào thu được được pha loãng từng bậc và được dàn mỏng để đếm các con vi khuẩn sống sót, các con vi khuẩn này được báo cáo như là các đơn vị tạo thành khuẩn lạc (colony forming units: CFU) trên một đơn vị diện tích. Số liệu sống sót được phân tích bằng cách sử dụng phép biến đổi $\log_{10}$.

Năm chất kháng sinh và mười ba hợp chất BT được thử nghiệm đối với mỗi loại môi trường cụm màng sinh học vi khuẩn (*Pseudomonas aeruginosa*, PA; *Staphylococcus aureus* kháng methixilin, MRSA hoặc SA). Các chất kháng vi sinh vật được thử nghiệm chống lại PA bao gồm các BT được đề cập ở đây là BisEDT và các hợp chất 2B, 4, 5, 6, 8-2, 9, 10, 11 và 15 (xem Bảng 1), và các chất kháng sinh tobramycin, amikacin, imipenim, xefazolin, và ciprofloxacin. Các chất kháng vi sinh vật được thử nghiệm chống lại SA bao gồm các BT được đề cập ở đây là BisEDT và các hợp chất 2B, 4, 5, 6, 8-2, 9, 10 và 11 (xem Bảng 1), và các chất kháng sinh rifampicin, daptomycin, minocycline, ampicillin, và vancomycin. Như đã nêu trên trong phần “Mô tả vắn tắt các hình vẽ”, các chất kháng sinh được thử nghiệm ở các nồng độ xấp xỉ 10 đến 400 lần nồng độ ức chế tối thiểu (minimum inhibitory concentration: MIC) theo các phương pháp vi sinh vật học đã có.

Bảy hợp chất BT có tác dụng đã nêu đối với sự sống sót vi khuẩn PA ở các nồng độ được thử nghiệm, và hai hợp chất BT chứng minh tác dụng đã nêu đối với

sự sống sót MRSA ở các nồng độ được thử nghiệm; kết quả điển hình thể hiện tác dụng của BT đối với sự sống sót của vi khuẩn được nêu trên Fig.1 cho BisEDT và hợp chất BT 2B (thử nghiệm chống lại PA) và trên Fig.2 cho các hợp chất BT 2B và 8-2 (thử nghiệm chống lại SA), trong cả hai trường hợp, so với tác dụng của các chất kháng sinh xác định. Như được thể hiện trên các Fig.1 và 2, sự đưa vào các hợp chất BT xác định kết hợp với các chất kháng sinh xác định cho tác dụng đồng vận nhờ đó hiệu lực làm giảm sự sống sót của vi khuẩn được tăng cường so với tác dụng kháng vi khuẩn của một mình chất kháng sinh hoặc một mình hợp chất BT. Trong thử nghiệm khả năng sống sót của PA, hợp chất 15 (Bis-EDT/2hydroxy, propan thiol (1:1/1)) ở nồng độ 80µg/mL có tác dụng (không được thể hiện) có thể so sánh được với tác dụng thu được khi sử dụng kết hợp 1600µg/mL AMK cộng với 80µg/mL BisEDT (Fig.1).

VÍ DỤ 3

Mô hình màng sinh học dòng nhỏ giọt của sự nhiễm trùng vết thương mãn tính: ức chế bằng các hợp chất BT

Các màng sinh học dòng nhỏ giọt thể hiện mô hình đáng tin cậy được chấp nhận trong lĩnh vực này để tạo thành, và kiểm tra tác dụng của các hợp chất kháng khuẩn được thử nghiệm kháng lại các màng sinh học vi khuẩn. Màng sinh học dòng nhỏ giọt được tạo ra trên các mẫu thí nghiệm (chất nền) được đặt trong kênh của thiết bị dòng nhỏ giọt. Nhiều loại vật liệu khác nhau có thể được sử dụng làm chất nền cho sự tạo thành màng sinh học vi khuẩn, bao gồm miếng kính mang vật bằng thủy tinh mờ. Môi trường lỏng dinh dưỡng đi vào khoang tế bào của thiết bị sinh học dòng nhỏ giọt bằng cách nhỏ giọt vào khoang gần bề mặt, và sau đó chảy dọc chiều dài mẫu thí nghiệm xuống góc nghiêng 10°.

Các màng sinh học được phát triển trong thiết bị sinh học dòng nhỏ giọt và được tiếp xúc với các hợp chất BT riêng rẽ hoặc kết hợp với và/hoặc tiếp xúc với các hợp chất kháng sinh riêng rẽ hoặc kết hợp với các chất kháng khuẩn khác, bao gồm các hợp chất BT, hoặc với các chất điều trị được thử nghiệm hoặc các chất điều trị thông thường khác cho các vết thương mãn tính. Do đó, các hợp chất BT

được mô tả về các tác dụng của chúng đối với màng sinh học vi khuẩn trong thiết bị dòng nhỏ giọt. Các màng sinh học trong thiết bị dòng nhỏ giọt được chuẩn bị theo các phương pháp đã biết (ví dụ, Stewart et al., 2001 *J Appl Microbiol.* 91:525; Xu et al., 1998 *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4035). Phương pháp này bao gồm nuôi cấy màng sinh học trên các mẫu thí nghiệm polystyren nghiêng trong khoang được che kín. Môi trường nuôi cấy điển hình chứa glucoza 1g/l, NH_4NO_3 0,5g/l, KCl 0,25g/l, KH_2PO_4 0,25g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25g/l, được bổ sung huyết thanh bò trưởng thành 5% thể tích/thể tích (độ pH là 6,8) để bắt chước môi trường giàu protein huyết thanh, hạn chế sắt tương tự như môi trường phát triển màng sinh học in vivo, như ở các vết thương mãn tính. Môi trường này chảy từng giọt (50ml/giờ) qua bốn mẫu thí nghiệm được chứa trong các khoang đặt song song riêng rẽ, mỗi khoang có kích thước 10cm x 1,9cm, chiều sâu 1,9cm. Thiết bị có khoang này được chế tạo từ chất dẻo polysulfon. Mỗi khoang được lắp một nắp bằng chất dẻo có thể loại bỏ được, nắp này có thể bịt chặt. Thiết bị phản ứng màng sinh học được chứa trong tủ áp ở 37°C, và môi trường nuôi cấy tế bào vi khuẩn được làm ấm bằng cách cho nó qua chậu gia nhiệt bằng nhôm được giữ trong tủ áp. Phương pháp này tái tạo kiểu hình dung nạp chất kháng sinh quan sát được trong các màng sinh học nhất định, bắt chước môi trường dịch chuyển chất lỏng thấp và gần với đặc tính bề mặt tiếp xúc không khí của vết thương mãn tính trong khi cung cấp liên tục chất dinh dưỡng, và phương pháp này là tương thích với một số phương pháp phân tích để mô tả và giám sát tác dụng của các chế độ kháng khuẩn được thử nghiệm. Thiết bị dòng nhỏ giọt này đã được ứng dụng thành công để nuôi cấy rất nhiều màng sinh học một loài hay nhiều loài kết hợp. Màng sinh học thường được phát triển từ hai đến năm ngày trước khi được áp dụng các chất kháng vi sinh vật.

Để đo tác dụng của chất chống màng sinh học đối với các màng sinh học phát triển trong thiết bị dòng nhỏ giọt, dòng chất lỏng đi qua màng sinh học được thay đổi hoặc bổ sung bằng chế phẩm điều trị mong muốn (ví dụ, một hoặc nhiều hợp chất BT và/hoặc một hoặc nhiều chất kháng sinh, hoặc các chất đối chứng, và/hoặc các chất được thử nghiệm khác). Dòng được duy trì trong khoảng thời gian điều trị cụ thể. Sau đó mẫu thử nghiệm màng sinh học được điều trị được lấy ra nhanh chóng khỏi thiết bị và màng sinh học được nạo vào cốc nhỏ chứa 10ml dung

dịch đệm. Mẫu này được xử lý nhanh chóng (thường là từ 30 giây đến 1 phút) bằng thiết bị làm đồng nhất mô để phân tán các kết tụ vi khuẩn. Huyền phù này được pha loãng từng bậc và được dàn mỏng để đếm các vi sinh vật sống sót theo các phương pháp vi sinh chuẩn.

VÍ DỤ 4

Ức chế màng sinh học ở vết thương trong quá trình hồi phục vết xước tế bào sừng: ngăn chặn màng sinh học bằng các hợp chất BT

Ví dụ này mô tả sự cải biến mô hình vết xước tế bào sừng in vitro đã có trong quá trình lành vết thương, để đạt được mô hình liên quan đến vết thương kết hợp với màng sinh học và quá trình lành vết thương, và cụ thể là liên quan đến các vết thương cấp hoặc mãn tính hoặc các vết thương chứa màng sinh học như được mô tả ở đây. Theo mô hình vết xước tế bào sừng về tác động của màng sinh học ở vết thương mãn tính, việc nuôi cấy các tế bào sừng của động vật có vú (ví dụ, người) và tập hợp màng sinh học vi khuẩn được thực hiện trong các khoang riêng biệt có tiếp xúc lỏng với nhau, để cho phép đánh giá tác động của các điều kiện mà ảnh hưởng đến các tác động này, của các thành phần hòa tan do màng sinh học sinh ra đối với các quá trình lành vết thương tế bào sừng.

Các tế bào bao quy đầu của trẻ sơ sinh được nuôi cấy dưới dạng đơn lớp trong các đĩa nhựa được xử lý, trong các đơn lớp này, “vết thương” hoặc vết xước được kiểm soát được tạo thành bằng cách cơ học (ví dụ, bằng cách phá vỡ vật chất đơn lớp như bằng cách làm xước vùng hầu như không có tế bào tuyến tính giữa các vùng của đơn lớp này bằng dụng cụ thích hợp như dao mổ, dao cạo, vật nạo tế bào, kẹp vô trùng hoặc dụng cụ khác). Các hệ mô hình đơn lớp tế bào sừng in vitro được biết là trải qua các quá trình xử lý về mặt cấu trúc và chức năng tế bào đáp lại vết thương, theo cách sao cho kích thích sự lành vết thương in vivo. Theo các phương án được bộc lộ ở đây, tác động của sự có mặt của các màng sinh học vi khuẩn đối với các quy trình này, ví dụ, đối với thời gian lành vết xước, được quan sát, và theo các phương án này và các phương án liên quan, các tác động này cũng được đánh

giá khi có mặt các chất điều trị kháng kháng vi sinh vật (ví dụ, kháng khuẩn và chống màng sinh học) được chọn.

Các đơn lớp tế bào sừng bị thương được nuôi cấy với sự có mặt của các màng sinh học được kiểm tra về các thông số hình thái học, sinh hóa, di truyền phân tử, sinh lý tế bào và các thông số khác để xác định liệu việc đưa các hợp chất BT vào có làm thay đổi (ví dụ, tăng hoặc giảm có ý nghĩa thống kê so với đối chứng thích hợp) các tác động gây hại của màng sinh học. Các vết thương đầu tiên được cho tiếp xúc chỉ với mỗi hợp chất BT, và cho tiếp xúc với kết hợp các hợp chất BT dự tính, để thử nghiệm độc tính của mỗi chất điều trị hợp chất BT trước khi đánh giá tác dụng của các chất điều trị này đối với tác động của màng sinh học đối với quá trình lành vết thương.

Theo phương án đại diện, màng sinh học ba ngày được nuôi cấy trên màng (ví dụ, màng lồng TransWell hoặc màng tương tự) được giữ trong môi trường mô nêu trên, và tiếp xúc lỏng với đơn lớp tế bào sừng đã được làm xước để khởi động quá trình lành vết thương. Màng sinh học được nuôi cấy không có vết thương mãn tính hoặc cấp tính xác thực được dự tính để sử dụng trong các phương án này và các phương án liên quan.

Do đó, hệ in vitro đã được phát triển để đánh giá tác động của thành phần màng sinh học hòa tan đối với sự di cư và tăng sinh của các tế bào sừng của người. Hệ này phân tách màng sinh học và tế bào sừng bằng cách sử dụng màng thấm tách. Các tế bào sừng được nuôi cấy từ bao quy đầu trẻ sơ sinh như được mô tả trên đây (Fleckman et al., 1997 *J Invest. Dermatol.* 109:36; Piepkorn et al., 1987 *J Invest. Dermatol.* 88:215-219) và được phát triển ở dạng đơn lớp hợp dòng trên các kính phủ. Sau đó các đơn lớp tế bào sừng có thể được làm xước để thu được “vết thương” với chiều rộng như nhau, sau đó được giám sát các quy trình hồi phục tế bào (ví dụ, Tao et al., 2007 *PLoS ONE* 2:e697; Buth et al. 2007 *Eur. J Cell Biol.* 86:747; Phan et al. 2000 *Ann. Acad. Med. Singapore* 29:27). Sau đó các vết thương nhân tạo này được đặt vào đáy của khoang hai mặt vô trùng và khoang này được lắp ráp bằng cách sử dụng kỹ thuật vô trùng. Cả hai mặt của khoang này được nạp môi trường phát triển tế bào sừng (EpiLife) cùng hoặc không cùng với các chất

kháng sinh và/hoặc các bismut-thiol. Các hệ không được cấy truyền được sử dụng làm đối chứng.

Hệ này được cấy truyền bằng vi khuẩn được phân lập từ vết thương và được ủ trong điều kiện tĩnh trong hai giờ để cho phép vi khuẩn gắn kết với bề mặt trong các khoang phía trên. Sau khoảng thời gian gắn kết, dòng môi trường lỏng được bắt đầu trong khoang phía trên để loại bỏ các tế bào không gắn kết. Sau đó dòng môi trường được tiếp tục với tốc độ sao cho tối thiểu hóa sự phát triển của các tế bào phù du trong khoang trên, bằng cách rửa sạch các tế bào không gắn kết. Sau khoảng thời gian ủ từ 6 đến 48 giờ, các hệ này (các đơn lớp tế bào sùng trên các kính phủ và màng sinh học vi khuẩn trên chất nền màng) được tháo bỏ và các kính phủ được lấy ra và phân tích. Trong các phương án liên quan, các màng sinh học trưởng thành được phát triển trên khoang trên trước khi lắp khoang này. Trong các phương án liên quan khác, việc nuôi cấy đồng thời, riêng rẽ màng sinh học và đơn lớp tế bào sùng bị xước được thực hiện với sự có mặt hoặc không có mặt của một hoặc nhiều hợp chất BT, tùy ý với có mặt hoặc không có mặt của một hoặc nhiều chất kháng sinh, để xác định tác dụng của các chất được thử nghiệm như các hợp chất BT, hoặc của kết hợp hợp chất BT-cộng-chất kháng sinh có tiềm năng tác dụng đồng vận (ví dụ, hợp chất BT theo sáng chế như BT mà được tạo ra ở dạng vi hạt, và một hoặc nhiều amikacin, ampicillin, cefazolin, cefepim, chloramphenicol, ciprofloxacin, clindamycin (chất kháng sinh lincoasamit khác), daptomycin (Cubicin®), doxycycline, gatifloxacin, gentamicin, imipenem, levofloxacin, linezolid (Zyvox®), minocycline, nafcillin, paromomycin, rifampin, sulphamethoxazole, tobramycin và vancomycin), đối với sự hồi phục tế bào sùng của vết xước, ví dụ, để xác định chất hoặc kết hợp các chất này có làm thay đổi (ví dụ, tăng hoặc giảm có ý nghĩa thống kê so với đối chứng thích hợp) ít nhất là một dấu hiệu chỉ báo sự lành vết xước, như thời gian để hồi phục vết thương hoặc các dấu hiệu chỉ báo sự hồi phục vết thương khác (ví dụ, Tao et al., 2007 *PLoS ONE* 2:e697; Buth et al. 2007 *Eur. J Cell Biol.* 86:747; Phan et al. 2000 *Ann. Acad. Med. Singapore* 29:27).

VÍ DỤ 5

Ức chế màng sinh học ở vết thương trong quá trình hồi phục vết xước tế bào sừng

Các tế bào sừng của người được phân lập được nuôi cấy trên các kính phủ và được tạo vết thương xước theo phương pháp được mô tả trong Ví dụ 4. Môi trường được làm bị thương này được duy trì trong các điều kiện nuôi cấy một mình hoặc với sự có mặt của màng sinh học được nuôi cấy đồng thời trên chất nền màng tiếp xúc lỏng với môi trường tế bào sừng. Sau đó xác định khoảng thời gian đóng kín vết xước trong đó quá trình phát triển và/hoặc di cư tế bào sừng tái thiết đơn lớp tế bào sừng ở vùng xước. Fig.3 minh họa tác động khi có sự tiếp xúc lỏng (nhưng không có sự tiếp xúc trực tiếp) của màng sinh học đối với thời gian lành vết thương của các đơn lớp tế bào sừng bị làm xước.

Do đó, theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định chất để điều trị vết thương mãn tính, bao gồm bước nuôi cấy đơn lớp tế bào được làm bị thương-xước (ví dụ, tế bào sừng hoặc nguyên bào sợi) với sự có mặt của màng sinh học vi khuẩn cùng và không cùng với sự có mặt của chất chống màng sinh học được thử nghiệm; và đánh giá dấu hiệu chỉ báo việc lành vết thương của đơn lớp tế bào được làm bị thương-xước với sự có mặt và vắng mặt của chất chống màng sinh học được thử nghiệm, trong đó chất này (ví dụ, hợp chất BT như huyền phù vi hạt BT hầu như là đơn phân tán như được mô tả ở đây, một mình hoặc ở dạng kết hợp có tác dụng đồng vận với chất kháng sinh, như một hoặc nhiều chất amikacin, ampicillin, cefazolin, cefepim, chloramphenicol, ciprofloxacin, clindamycin, daptomycin (Cubicin®), doxycycline, gatifloxacin, gentamicin, imipenem, levofloxacin, linezolid (Zyvox®), minocycline, nafcillin, paromomycin, rifampin, sulphamethoxazole, tobramycin và vancomycin) nếu thúc đẩy ít nhất là một dấu hiệu chỉ báo sự lành vết thương được xác định là chất thích hợp để điều trị vết thương cấp tính hoặc mãn tính hoặc vết thương chứa màng sinh học.

VÍ DỤ 6

Kết hợp Bismut-Thiol (BT)- chất kháng sinh có tác dụng đồng vận

Ví dụ này thể hiện ví dụ về tác dụng đồng vận được chứng minh bằng các kết hợp của một hoặc nhiều hợp chất bismut-thiol và một hoặc nhiều chất kháng sinh chống lại nhiều loài vi khuẩn và chủng vi khuẩn, bao gồm một số vi khuẩn kháng chất kháng sinh.

Vật liệu và phương pháp. Nghiên cứu tính nhạy cảm được thực hiện bằng cách pha loãng canh trường trong các đĩa nuôi cấy mô 96 lỗ (Nalge Nunc International, Denmark) theo phương thức NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard M7-A2 and Informational Supplement M100-S10*, NCCLS, Wayne, PA, USA).

Ngắn gọn là, các môi trường nuôi cấy vi khuẩn qua đêm được sử dụng để chuẩn bị huyền phù chuẩn 0,5 McFarland, huyền phù này được pha loãng tiếp với tỷ lệ 1:50 ($\sim 2 \times 10^6$ cfu/mL) trong canh trường Mueller-Hinton được điều chỉnh cation (BBL, Cockeysville, MD, USA). Các BT (được điều chế như nêu trên) và các chất kháng sinh được bổ sung với nồng độ tăng dần, giữ cho thể tích cuối cùng không đổi là 0,2mL. Các môi trường nuôi cấy được ủ trong 24 giờ ở 37°C và độ đục được đánh giá bằng cách hấp thụ ở bước sóng 630nm sử dụng máy đọc đĩa ELISA (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) được biểu thị dưới dạng nồng độ thấp nhất của dược chất ức chế sự phát triển trong 24 giờ. Số lượng vi khuẩn sống sót (cfu/mL) được xác định bằng cách gieo cấy theo chuẩn trên đĩa thạch dinh dưỡng. Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (Minimal Bactericidal Concentrations: MBC) được biểu thị dưới dạng nồng độ dược chất mà làm giảm khả năng sống sót ban đầu khoảng 99,9% ở thời điểm 24 giờ sau khi ủ.

Phương pháp bàn cờ được sử dụng để đánh giá hoạt tính của các kết hợp kháng vi sinh vật. Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn (fractional inhibitory concentration index: FICI) và chỉ số nồng độ diệt khuẩn phân đoạn (fractional bactericidal concentration index: FBCI) được tính theo Eliopoulos et al. (Eliopoulos and Moellering, (1996) *Antimicrobial combinations*. In *Antibiotics in Laboratory Medicine* (Lorian, V., Ed.), pp. 330–96, Williams and Wilkins,

Baltimore, MD, USA). Tính đồng vận được định nghĩa như là chỉ số FICI hoặc FBCI $\leq 0,5$, không có tương tác là ở mức $>0,5-4$ và có tính đối kháng là ở mức >4 (Odds, FC (2003). Synergy, antagonism, và what the chequerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:1). Tính đồng vận cũng được định nghĩa thông thường là khi nồng độ chất kháng sinh giảm trên bốn lần.

Kết quả được thể hiện trên các bảng 2-17.

BẢNG 2

S. aureus kháng nafcillin

Chủng	NAF MIC ($\mu\text{g/ml}$)	NAF/BE MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Δ	Tính đồng vận
60187-2	10,00	0,6	16,7	+
52446-3	175,00	40,0	4,4	+
M1978	140,00	50,0	2,8	-
W54793	130,00	33,3	3,9	-
S24341	210,00	65,0	3,2	-
H7544	28,33	15,0	1,9	-
H72751	145,00	43,3	3,3	-
W71630	131,67	46,7	2,8	-
X22831	178,33	75,0	2,4	-
X23660	123,33	43,3	2,8	-
O36466	191,67	93,3	2,1	

BE = $0,2\mu\text{g/ml}$ BisEDT; Các chủng vi khuẩn được mua từ phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng ở bệnh viện đại học Winthrop, Mineola, NY. Nafcillin được mua từ Sigma (St. Louis, MO).

BẢNG 3

S. aureus kháng nafcillin

Chủng	GM MIC ($\mu\text{g/ml}$)	GM/BE MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Δ	Tính đồng vận
60187-2	0,233	0,004	58,3	+
52446-3	10,667	1,500	7,1	+
M1978	32,500	4,000	8,1	+
W54793	0,250	0,080	3,1	-
S24341	0,250	0,058	4,3	+
H7544	0,383	0,093	4,1	+
H72751	0,200	0,072	2,8	-
W71630	17,667	3,800	4,6	+
X22831	-	0,085		
X23660	22,500	4,000	5,6	+
O36466	0,267	0,043	6,2	+

BE = 0,2 $\mu\text{g/ml}$ BisEDT; Các chủng vi khuẩn được mua từ phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng ở bệnh viện đại học Winthrop, Mineola, NY. Nafcillin được mua từ Sigma.

BẢNG 4

*S.aureus*Rifampin/Neomycin/Paromomycin

ATCC 25923	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MIC + BE ($\mu\text{g/ml}$)	Δ	Tính đồng vận
RIF	0,033	0,003	13,0	+
NEO	0,500	0,200	2,5	-
PARO	1,080	0,188	5,7	+
MRSA S2446-3				
RIF	2,500	2,500	1,0	-
NEO	13,400	8,500	1,6	-
PARO	335,000	183,300	1,8	-

BE = 0,2 $\mu\text{g/ml}$ BisEDT; Chủng S2446-3 được mua từ phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng ở bệnh viện đại học Winthrop, Mineola, NY. Chất kháng sinh được mua từ Sigma.

BẢNG 5

S. epidermidis – kháng GM

	chủng ATCC 35984		chủng S2400-1	
BisEDT ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$ GM)	MBC ($\mu\text{g/ml}$ GM)	MIC ($\mu\text{g/ml}$ GM)	MBC ($\mu\text{g/ml}$ GM)
0	53,3	384,0	85,3	426,7
0,005	20,0	96,0	96,0	512,0
0,01	37,3	117,3	64,0	256,0
0,02	21,3	26,7	28,0	128,0
0,04	2,0	16,0	2,0	128,0
0,08	2,0	10,7	2,0	53,3
0,16 (MIC)		3,0		10,0
0,32		2,0		4,0

GM = gentamixin; Chủng S2400-1 được mua từ phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng ở bệnh viện đại học Winthrop, Mineola, NY. Gentamixin được mua từ khoa dược của bệnh viện đại học Winthrop; tính đồng vận được bồi đậm

BẢNG 6

S.epidermidis - S2400-1Ngăn chặn màng sinh học

Chất kháng sinh	BisEDT (µg/ml)			Δ (0,05 BE)	Tính đồng vận
	0	0,05	0,1		
cefazolin	28	10	1	2,8	-
vancomyxin	3,2	0,9	0,1	3,6	-
gatifloxacin	1,6	0,1	0,1	16,0	++
rifampixin	0,03	0,04	0,04	0,7	-
nafcillin	48	64	8	0,8	-
clindamycin	1195	48	12	24,9	++++
gentamixin	555	144	12	3,9	Ranh giới
minoxyclin	0,85	0,73	0,08	1,2	-

Số liệu ở đơn vị µg/ml; Chủng S2400-1 được mua từ phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng ở bệnh viện đại học Winthrop, Mineola, NY. Chất kháng sinh được mua từ Khoa dược của bệnh viện đại học Winthrop.

BẢNG 7

S. epidermidis - S2400-1MIC

Chất kháng sinh	BisEDT (µg/ml)			Δ (0,05 BE)	Tính đồng vận
	0	0,05	0,1		
cefazolin	32	8	1	4,00	+
vancomyxin	3,2	2,3	0,3	1,40	-
gatifloxacin	1,7	0,8	0,3	2,13	-
rifampixin	0,03	0,04	0,04	0,75	-
nafcillin	171	192	68	0,89	-
clindamycin	2048	768	24	2,67	-
gentamixin	2048	320	80	6,40	+
minoxycycline	1,13	0,43	0,10	2,63	-

Số liệu ở đơn vị µg/ml; Chủng S2400-1 được mua từ phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng ở bệnh viện đại học Winthrop, Mineola, NY. Chất kháng sinh được mua từ Khoa dược của bệnh viện đại học Winthrop.

BẢNG 8

S. epidermidis - S2400-1MBC

Chất kháng sinh	BisEDT ($\mu\text{g/ml}$)		Δ (0,1 BE)	Tính đồng vận
	0,0	0,1		
cefazolin	48	10	4,80	+
vancomyxin	5,4	1,4	3,86	Ranh giới
gatifloxacin	2,8	1,4	2,00	-
rifampixin	0,03	0,07	0,43	-
nafcillin	256	128	2,00	-
clindamycin	2048	768	2,67	-
gentamixin	1536	256	6,00	+
minoxycyclin	1,20	1,20	1,00	-

Số liệu ở đơn vị $\mu\text{g/ml}$; Chủng S2400-1 được mua từ phòng thí nghiệm vi sinh lâm sàng ở bệnh viện đại học Winthrop, Mineola, NY. Chất kháng sinh được mua từ Khoa dược của bệnh viện đại học Winthrop.

BẢNG 9

S. epidermidis ATCC 35984MIC

Chất kháng sinh	BisEDT ($\mu\text{g/ml}$)		Δ	Tính đồng vận
	0,0	0,05		
Nafcillin	16,00	5,00	3,2	-
Clindamycin	2048,00	1024,00	2	-
Gentamixin	213,33	16,00	13,3	++
Minoxycyclin	0,13	0,04	3,3	-
Rifampixin	0,021	0,014	1,5	-

Số liệu ở đơn vị $\mu\text{g/ml}$; Chất kháng sinh được mua từ Khoa dược của bệnh viện đại học Winthrop, Mineola, NY.

BẢNG 10

E. coli – kháng ampicilin/cloramphenicol

Chủng	MIC AB (µg/ml)	MIC AB/BE (µg/ml AB)	Δ	Tính đồng vận	MIC BE (µg/ml)
MC4100/TN9 (CM)	220	12,7	17,4	+	0,6
MC4100/P9 (AM)	285	49	5,8	+	0,5
MC4100 (AM)	141,7	35	4,0	+	0,6

AB = chất kháng sinh; CM = cloramphenicol; AM = ampicilin; BE = BisEDT ở nồng độ 0,3µg/ml; Các chủng được mua từ phòng thí nghiệm của Dr. MJ Casadaban, Khoa di truyền học phân tử và sinh học tế bào, Đại học Chicago, Chicago, IL. Chất kháng sinh được mua từ Khoa dược của bệnh viện đại học Winthrop, Mineola, NY.

BẢNG 11

E. coli – kháng tetracyclinDoxyxycilin + BisEDT

Chủng	DOX MIC (µg/ml)	DOX/BE MIC (µg/ml DOX)	Δ	Tính đồng vận	BE MIC (µg/ml)
TET M	16,50	4,50	4,0	+	0,85
TET D	20,50	0,03	820,0	++++	0,85
TET A	15,00	10,00	1,5	-	0,40
TET B	20,13	10,33	2,0	-	0,60

DOX = doxyxycilin; BE = BisEDT ở nồng độ 0,3µg/ml; Các chủng được mua từ phòng thí nghiệm của Dr. I Chopra, Khoa vi khuẩn học, Đại học Bristol, Bristol, Anh. Chất kháng sinh được mua từ Khoa dược của bệnh viện đại học Winthrop, Mineola, NY.

BẢNG 12

P. aeruginosa – kháng tobramycinTính đồng vận BisEDT

Chủng	NN ($\mu\text{g/ml}$)	NN+BE ($\mu\text{g/ml}$ NN)	Δ	Tính đồng vận	BE MIC ($\mu\text{g/ml}$)
Xen5	0,32	0,19	1,68	-	0,9
Agr PA E	115	70	1,64	-	0,9
Agr PA I	200	73	2,74	-	1
Agr PA K	4,8	3	1,60	-	0,82
Agr PA O	130	20,5	6,34	+	0,98

Agr = kháng aminoglycosit; NN = tobramycin; PA = *Pseudomonas aeruginosa*; BE = BisEDT, 0,3 $\mu\text{g/ml}$; Các chủng được mua từ phòng thí nghiệm của Dr. K. Poole, Khoa vi sinh vật học và miễn dịch học, Đại học Queens, Ontario, CN. Tobramycin được mua từ khoa dược của bệnh viện đại học Winthrop, Mineola, NY.

BẢNG 13

B. cepaciaTính đồng vận Tobramyxin+BEMIC

Chủng	NN ($\mu\text{g/ml}$)	NN+BE ($\mu\text{g/ml}$ NN)	Δ	Tính đồng vận	BE MIC ($\mu\text{g/ml}$)
13945	200	50	4	+	2,4
25416	125	10	12,5	++	1,2
HI 2229	64	8	8	+	0,8
AU 0267	128	2	64	++++	0,8
AU 0259	1024	256	4	+	1,6
HI 2255	64	8	8	+	1,6
AU 0273	512	32	16	++	1,6
HI 2253	64	16	4	+	1,6
HI 2147	512	8	64	++++	1,6

NN = Tobramyxin; BE = BisEDT, 0,4 $\mu\text{g/ml}$; Các chủng được mua từ phòng thí nghiệm của Dr. J.J. LiPuma, Khoa nhi và các bệnh truyền nhiễm, Đại học Michigan, Ann Arbor, MI; còn cả Veloir et al. 2003, Tobramyxin được mua từ khoa dược của bệnh viện đại học Winthrop, Mineola, NY.

BẢNG 14

*B. cepacia*Tính đồng vận Tobramyxin+BEMBC

Chủng	NN ($\mu\text{g/ml}$)	NN+BE ($\mu\text{g/ml}$ NN)	Δ	Tính đồng vận	BE MIC ($\mu\text{g/ml}$)
HI 2249	256	8	32	++	3,2
HI 2229	128	32	4	+	6,4
AU 0267	256	32	8	+	6,4
AU 0259	1024	1024	1	-	12,8
HI 2255	128	32	4	+	12,8
HI 2711	512	8	64	++++	6,4
AU 0284	1024	64	16	++	0,8
AU 0273	512	32	16	++	1,6
HI 2253	128	64	2	-	3,2
HI 2147	512	128	4	+	6,4

NN = Tobramyxin; BE = BisEDT, 0,4 $\mu\text{g/ml}$; Các chủng được mua từ phòng thí nghiệm của Dr. J.J. LiPuma, Khoa nhi và các bệnh truyền nhiễm, Đại học Michigan, Ann Arbor, MI; còn cả Veloir et al. 2003, Tobramyxin được mua từ khoa dược của bệnh viện đại học Winthrop, Mineola, NY.

BẢNG 15

Các chủng kháng tobramycinMIC

Chủng	NN ($\mu\text{g/ml}$)	NN+BE ($\mu\text{g/ml}$ NN)	Δ	Tính đồng vận	Lipo-BE-NN ($\mu\text{g/ml}$ NN)
M13637	512	32	16	++	0,25
M13642R	128	64	2	-	0,25
PA-48913	1024	256	4	+	0,25
PA-48912-2	64	8	8	+	0,25
PA-10145	1	4	0,25	-	0,25
SA-29213	2	1	2	-	0,25

NN = Tobramycin; BE = BisEDT, 0,8 $\mu\text{g/ml}$; Lipo-BE-NN = liposom BE-NN; Các chủng được mua từ phòng thí nghiệm của Dr. A. Omri, Khoa hóa và hóa sinh, Đại học Laurentian, Ontario, CN; (chủng M là *B. cepacia* dạng nhầy; PA=*P. aeruginosa*; SA=*S. aureus*). Tobramycin được mua từ khoa dược của bệnh viện đại học Winthrop, Mineola, NY.

BẢNG 16

Các chủng kháng tobramycinMBC

Chủng	NN ($\mu\text{g/ml}$)	NN+BE ($\mu\text{g/ml}$ NN)	Δ	Tính đồng vận	Lipo-BE- NN ($\mu\text{g/ml}$ NN)
M13637	1024	64	16	++	8
M13642R	256	128	2	-	16
PA-48913	4096	512	8	+	4
PA-48912-2	128	32	4	+	0,5
PA-10145	1	8	0,125	-	4
SA-29213	2	1	2	-	0,25

NN = Tobramycin; BE = BisEDT, 0,8 $\mu\text{g/ml}$; Lipo-BE-NN = liposom BE-NN; Các chủng được mua từ phòng thí nghiệm của Dr. A. Omri, Khoa hóa và sinh

hóa, Đại học Laurentian, Ontario, CN; (chủng M là *B. cepacia* dạng nhầy; PA=*P. aeruginosa*; SA=*S. aureus*). Tobramycin được mua từ khoa dược của bệnh viện đại học Winthrop, Mineola, NY.

BẢNG 17

Tính đồng vận BisEDT-Pyrrhion

NaPYR ($\mu\text{g/ml}$)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 ($\mu\text{g/ml BE}$)	<i>E. coli</i> ATCC 25922 ($\mu\text{g/ml BE}$)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 ($\mu\text{g/ml BE}$)
0	0,25	0,1	0,25
0,025		0,1	0,125
0,05		0,025	0,063
0,1	0,125	0,0125	0,063
0,2	0,125	0,0125	0,031
0,4		0,00625	0
0,8	0,125	0,00625	
1,6 (MIC)	0,063	0,00625	
3,2	0,063	0	
6,4	0,063		
12,8	0		

BE = BisEDT; NaPYR = natri pyrrhion; Hóa chất được mua từ Sigma-Aldrich; tính đồng vận được bồi đậm. Các chủng vi khuẩn nêu trên được mua từ American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA).

VÍ DỤ 7

Tác dụng của bismut-thiol (BT) và chất kháng sinh so sánh đối với các vi khuẩn gram dương và gram âm bao gồm các chủng vi khuẩn kháng chất kháng sinh

Trong ví dụ này, hoạt tính *in vitro* của BisEDT và các chất so sánh được đánh giá đối với nhiều chủng phân lập trên lâm sàng của vi khuẩn gram dương và gram âm mà gây ra sự nhiễm trùng da và mô mềm.

Vật liệu và phương pháp. Các hợp chất thử nghiệm và khoảng nồng độ thử nghiệm là như sau: BisEDT (Domenico et al., 1997; Domenico et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(5):1417-1421, và Ví dụ 1), 16-0,015 μ g/mL; linezolid (ChemPacifica Inc., #35710), 64-0,06 μ g/mL; Daptomycin (Cubist Pharmaceuticals #MCB2007), 32-0,03 μ g/mL và 16-0,015 μ g/mL; vancomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, # V2002), 64-0,06 μ g/mL; ceftazidime, (Sigma #C3809), 64-0,06 μ g/mL và 32-0,03 μ g/mL; imipenem (United States Pharmacopeia, NJ, #1337809) 16-0,015 μ g/mL và 8-0,008 μ g/mL; ciprofloxacin (United States Pharmacopeia, # IOC265), 32-0,03 μ g/mL và 4-0,004 μ g/mL; gentamixin (Sigma #G3632) 32-0,03 μ g/mL và 16-0,015 μ g/mL. Tất cả các đối tượng thử nghiệm, ngoại trừ gentamixin, được hòa tan trong DMSO; gentamixin được hòa tan trong nước. Các dung dịch gốc được chuẩn bị ở nồng độ cao nhất 40 lần trong đĩa thử nghiệm. Nồng độ cuối cùng của DMSO trong hệ thử nghiệm là 2,5%.

Sinh vật. Các sinh vật thử nghiệm được mua từ các phòng thí nghiệm lâm sàng như: CHP, Clarian Health Partners, Indianapolis, IN; UCLA, University of California Los Angeles Medical Center, Los Angeles, CA; GR Micro, London, UK; PHRI TB Center, Public Health Research Institute Tuberculosis Center, New York, NY; ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA; Mt Sinai Hosp., Mount Sinai Hospital, New York, NY; UCSF, University of California San Francisco General Hospital, San Francisco, CA; Bronson Hospital, Bronson Methodist Hospital, Kalamazoo, MI; các vi sinh vật phân lập kiểm tra chất lượng được mua từ American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Các sinh vật được cấy vạch để phân lập trên môi trường thạch thích hợp đối với mỗi sinh vật. Các khuẩn lạc được ngoáy bằng tăm bông từ các đĩa phân lập và cho vào huyền phù trong canh trường thích hợp chứa chất bảo vệ cryo. Các huyền phù được phân chia vào các lọ lạnh sâu và được giữ ở -80°C. Các chữ viết tắt là: BisEDT, bismut-1,2-etandithiol; LZD, linezolid; DAP, daptomycin; VA, vancomycin; CAZ, ceftazidime; IPM, imipenem; CIP, ciprofloxacin; GM, gentamixin; MSSA, *Staphylococcus aureus* nhạy với methixilin; CLSI QC, Chung kiểm tra chất lượng của Clinical and Laboratory Standards Institute (Clinical and Laboratory Standards Institute quality control Strain); MRSA, *Staphylococcus aureus* kháng methixilin;

CA-MRSA, *Staphylococcus aureus* kháng methixilin mắc phải trên cộng đồng; MSSE, *Staphylococcus epidermidis* nhạy với methixilin; MRSE, *Staphylococcus epidermidis* kháng methixilin; VSE, *Enterococcus* nhạy với vancomycin.

Thế phân lập được cấy vạch từ các lọ lạnh băng vào môi trường thích hợp: thạch đậu nành trypsinaza (Becton-Dickinson, Sparks, MD) đối với hầu hết các sinh vật hoặc thạch đậu nành trypsinaza cộng với 5% máu cừu (Cleveland Scientific, Bath, OH) để dùng cho liên cầu khuẩn. Các đĩa được ủ qua đêm ở 35°C. Các sinh vật kiểm tra chất lượng được đưa vào. Môi trường được sử dụng cho thử nghiệm MIC là canh trường Mueller Hinton II (MHB II- Becton Dickinson, # 212322) cho hầu hết các sinh vật. MHB II được bổ sung 2% máu ngựa đã được phân giải (Cleveland Scientific Lot # H13913) để thích hợp với sự phát triển của *Streptococcus pyogenes* và *Streptococcus agalactiae*. Các môi trường được chuẩn bị với trọng lượng 102,5% trọng lượng thông thường để bù đắp phản pha loãng sinh ra bằng cách bổ sung bổ sung 5µL dung dịch được chất vào mỗi lỗ của bảng vi pha loãng. Ngoài ra, đối với các thử nghiệm với daptomycin, môi trường được bổ sung thêm 25mg/L Ca²⁺.

Phương pháp thử nghiệm MIC tuân theo quy trình được mô tả bởi Clinical and Laboratory Standards Institute (Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Seventh Edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A7 [ISBN 1-56238-587-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006) và sử dụng các máy xử lý chất lỏng tự động để thực hiện việc pha loãng từng bậc và truyền chất lỏng. Máy xử lý chất lỏng tự động bao gồm Multidrop 384 (LabSystems, Helsinki, Finland), Biomek 2000 và Multimek 96 (Beckman Coulter, Fullerton CA). Các lỗ của các cột 2-12 của các đĩa vi pha loãng 96 lỗ chuẩn (Falcon 3918) được nạp 150µL DMSO hoặc nước cho gentamixin trên Multidrop 384. Các dược chất (300µL) được phân phối vào cột 1 của hàng thích hợp trong các đĩa này. Các đĩa này sẽ trở thành đĩa mẹ từ đó các đĩa thử nghiệm (đĩa con) được chuẩn bị. Biomek 2000 hoàn thiện việc truyền từng bậc

qua cột 11 trong các đĩa mẹ. Các lỗ của cột 12 không chứa được chất và là các lỗ đối chứng sự phát triển của sinh vật trong đĩa mẹ. Các đĩa mẹ được nạp 185 μ L môi trường thử nghiệm thích hợp (nêu trên) bằng cách sử dụng Multidrop 384. Các đĩa mẹ được chuẩn bị bằng dụng cụ Multimek 96, dụng cụ này truyền 5 μ L dung dịch được chất từ mỗi lỗ của đĩa mẹ cho mỗi lỗ tương ứng của đĩa con trong một bước.

Dịch cấy truyền được chuẩn hóa của mỗi sinh vật được chuẩn bị theo các phương pháp CLSI (ISBN 1-56238-587-9, nêu trên). Các huyền phù được chuẩn bị trong MHB để bằng với độ đục của dịch chuẩn 0,5 McFarland. Các huyền phù này được pha loãng theo tỷ lệ 1:9 trong canh trường thích hợp với sinh vật. Dịch cấy truyền đối với mỗi sinh vật được phân phối vào các bộ phận chứa vô trùng được phân chia theo chiều dài (Beckman Coulter), và Biomek 2000 được sử dụng để cấy truyền các đĩa. Các đĩa con được đặt trên bề mặt làm việc Biomek 2000, được nghịch đảo sao cho sự cấy truyền diễn ra từ nồng độ được chất thấp đến nồng độ được chất cao. Biomek 2000 chuyển 10 μ L dịch cấy truyền đã được chuẩn hóa vào mỗi ống. Điều này thu được nồng độ tế bào cuối cùng trong các đĩa con xấp xỉ 5×10^5 đơn vị tạo thành khuẩn lạc/mL. Do đó, các lỗ của các đĩa con cuối cùng chứa 185 μ L canh trường, 5 μ L dung dịch được chất, và 10 μ L dịch cấy truyền vi khuẩn. Các đĩa được xếp thành chồng 3, đậy bằng nắp trên đĩa trên cùng, đặt trong các túi chất dẻo, và ủ ở 35°C trong khoảng 18 giờ cho hầu hết dịch phân lập. Các đĩa *Streptococcus* được đọc sau 20 giờ ủ. Các vi đĩa được nhìn từ phía đáy bằng cách sử dụng dụng cụ quan sát đĩa. Đối với mỗi môi trường thử nghiệm, đĩa đối chứng độ tan không được cấy truyền được quan sát dấu hiệu kết tủa được chất. MIC được đọc và ghi lại dưới dạng nồng độ thấp nhất của được chất mà ức chế sự phát triển thấy được bằng mắt của sinh vật.

Kết quả. Tất cả các được chất được mua đều hòa tan ở tất cả các nồng độ thử nghiệm trong các canh trường. BisEDT biểu thị dấu hiệu kết tủa ở nồng độ 32 μ g/mL, nhưng việc đọc MIC không bị ảnh hưởng vì nồng độ ức chế đối với tất cả các sinh vật được thử nghiệm là dưới nồng độ đó. Trong mỗi ngày thử nghiệm, các chủng kiểm tra chất lượng thích hợp được đưa vào trong các thử nghiệm MIC. Các trị số MIC thu được đối với các chủng này được so sánh với các khoảng kiểm

tra chất lượng được công bố (Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement*. CLSI document M100-S18 [ISBN 1-56238-653-0]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2008) đối với mỗi chất, nếu thích hợp.

Vào mỗi ngày thử nghiệm, các chủng kiểm tra chất lượng thích hợp được đưa vào trong các thử nghiệm MIC. Các trị số MIC thu được đối với các chủng này được so sánh với các khoảng kiểm tra chất lượng đã được công bố (Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement*. CLSI document M100-S18 [ISBN 1-56238-653-0]) đối với mỗi chất, nếu thích hợp. Trong số 141 trị số đối với các chủng kiểm tra chất lượng, trong đó các khoảng kiểm tra chất lượng được công bố, 140(99,3%) là nằm trong khoảng xác định. Một trường hợp ngoại lệ là imipenem đối với *S. aureus* 29213, trường hợp này thu được một trị số trên một lần thử nghiệm ($\leq 0,008\mu\text{g/mL}$), trị số này là trị số pha loãng dưới khoảng kiểm tra chất lượng được công bố. Tất cả các kết quả kiểm tra chất lượng khác trong lần thử nghiệm đó đều nằm trong khoảng kiểm tra chất lượng theo lý thuyết.

BisEDT chứng minh hoạt tính tiềm năng chống lại cả *Staphylococcus aureus* nhạy với methixilin (MSSA), *S. aureus* kháng methixilin (MRSA), và MRSA mắc phải trên cộng đồng (CA-MRSA), ức chế tất cả các chủng được thử nghiệm ở nồng độ $1\mu\text{g/mL}$ hoặc nhỏ hơn với trị số MIC₉₀ là $0,5\mu\text{g/mL}$ đối với tất cả ba nhóm sinh vật. BisEDT thể hiện hoạt tính lớn hơn hoạt tính của linezolid và vancomycin và tương đương với hoạt tính của daptomycin. Imipenem có hiệu lực hơn so với BisEDT đối với MSSA (MIC₉₀ = $0,03\mu\text{g/mL}$). Tuy nhiên, MRSA và CAMRSA lại kháng imipenem trong khi BisEDT chứng minh hoạt tính tương đương với hoạt tính được thể hiện đối với MSSA. BisEDT có hoạt tính khá cao đối với *Staphylococcus epidermidis* nhạy với methixilin và kháng methixilin (MSSE và MRSE), với trị số MIC₉₀ lần lượt là 0,12 và $0,25\mu\text{g/mL}$. BisEDT có hoạt tính đối với MSSE cao hơn so với các chất khác được thử nghiệm ngoại trừ imipenem. BisEDT là chất có hoạt tính cao nhất được thử nghiệm đối với MRSE.

BisEDT chứng minh hoạt tính tương đương với hoạt tính của daptomycin, vancomycin, và imipenem đối với *Enterococcus faecalis* nhạy với vancomycin (VSEfc) với trị số MIC90 là 2µg/mL. Đáng kể là, BisEDT là chất có hoạt tính cao nhất được thử nghiệm đối với *Enterococcus faecalis* kháng vancomycin (VREfc) với trị số MIC90 là 1µg/mL.

BisEDT có hoạt tính khá cao đối với *Enterococcus faecium* nhạy với vancomycin (VSEfm) với trị số MIC90 là 2µg/mL; hoạt tính của nó là tương đương với hoặc bằng với hoạt tính của daptomycin và khi pha loãng thì cao hơn hoạt tính của vancomycin. BisEDT và linezolid là các chất có hoạt tính cao nhất được thử nghiệm đối với *Enterococcus faecium* kháng vancomycin (VREfm), mỗi chất này chứng minh trị số MIC90 là 2µg/mL. Hoạt tính của BisEDT đối với *Streptococcus pyogenes* (trị số MIC90 là 0,5µg/mL) là tương đương với hoạt tính của vancomycin, lớn hơn hoạt tính của linezolid, và nhỏ hơn một chút so với hoạt tính của daptomycin và ceftazidime. Hợp chất ức chế tất cả các chủng được thử nghiệm ở nồng độ 0,5µg/mL hoặc nhỏ hơn. Trong các thử nghiệm này, các loài mà kém nhạy nhất đối với BisEDT là *Streptococcus agalactiae* trong đó trị số MIC90 quan sát được là 16µg/mL. BisEDT kém hoạt tính hơn so với tất cả các chất được thử nghiệm khác ngoại trừ gentamixin.

Hoạt tính của BisEDT và các chất so sánh đối với vi khuẩn gram âm trong thử nghiệm chứng minh hiệu lực BisEDT đối với *Acinetobacter baumannii* (trị số MIC90 là 2µg/mL) làm cho BisEDT là hợp chất được thử nghiệm có hoạt tính cao nhất. Các trị số MIC của các chất so sánh đối với một số lượng đáng kể thể phân lập thử nghiệm dẫn đến các trị số MIC90 ngoài thang đo đối với các chất này. BisEDT là chất ức chế hiệu lực đối với *Escherichia coli*, ức chế tất cả các chủng ở nồng độ 2µg/mL hoặc nhỏ hơn (MIC90 = 2µg/mL). Hợp chất này kém hoạt tính hơn imipenem, nhưng có hoạt tính cao hơn ceftazidime, ciprofloxacin, và gentamixin. BisEDT cũng chứng minh hoạt tính chống lại *Klebsiella pneumoniae* với trị số MIC90 là 8µg/mL, hoạt tính này là tương đương với hoạt tính của imipenem. Các trị số MIC90 tương đối cao của imipenem, ceftazidime, ciprofloxacin, và gentamixin chứng minh rằng nhóm sinh vật được thử nghiệm là

nhóm sinh vật kháng chất kháng sinh cao. BisEDT là hợp chất được thử nghiệm có hoạt tính cao nhất đối với *Pseudomonas aeruginosa* với trị số MIC₉₀ là 4 µg/mL. Nhóm thể phân lập thử nghiệm này có mức độ kháng cao đối với các chất so sánh.

Tóm lại, BisEDT chứng minh phổ hiệu lực rộng đối với nhiều thể phân lập lâm sàng biểu hiện nhiều loài, bao gồm các loài thường gây ra các bệnh nhiễm trên da và cấu trúc da cấp tính và mãn tính ở người. Hoạt tính của BisEDT và các chất so sánh chính được đánh giá đối với 723 thể phân lập lâm sàng của vi khuẩn gram dương và gram âm. Hợp chất BT chứng minh phổ hoạt tính rộng, và đối với một số sinh vật được thử nghiệm trong thử nghiệm này, BisEDT là hợp chất được thử nghiệm có hoạt tính kháng khuẩn cao nhất. BisEDT có hoạt tính cao nhất đối với MSSA, MRSA, CA-MRSA, MSSE, MRSE, và *S. pyogenes*, trong đó trị số MIC₉₀ là 0,5 µg/mL hoặc nhỏ hơn. Hoạt tính có hiệu lực cũng được chứng minh đối với VSEfc, VREfc, VSEfm, VREfm, *A. baumannii*, *E. coli*, và *P. aeruginosa* trong đó trị số MIC₉₀ là nằm trong khoảng từ 1 đến 4 µg/mL. Các trị số MIC₉₀ được quan sát là MIC₉₀ = 8 µg/mL đối với *K. pneumoniae*, và MIC₉₀ = 16 µg/mL đối với *S. agalactiae*.

VÍ DỤ 8

Tác dụng đồng vận và tăng cường của BT vi hạt-chất kháng sinh

Ví dụ này thể hiện rằng bismut thiol vi hạt (BT) làm tăng hoạt tính của chất kháng sinh qua các tương tác đồng vận và/hoặc tăng cường.

Yếu tố làm phức tạp chính trong việc điều trị các bệnh nhiễm là tính chất kháng nổi bật của vi khuẩn đối với các chất kháng sinh. Tính kháng methixilin của *S. epidermidis* (MRSE) và *S. aureus* (MRSA) thực tế đã phản ánh tính kháng nhiều được chất, làm cho rất khó để tiết trừ các tác nhân gây bệnh này. Tuy nhiên, không có tụ cầu khuẩn nào trong số hàng trăm chủng được thử nghiệm thể hiện tính kháng đối với BT. Hơn nữa, các BT ở nồng độ cận ức chế (subMIC) cũng làm giảm tính kháng đối với một số chất kháng sinh quan trọng.

Staphylococcus aureus. Biểu hiện bằng đồ thị của tác dụng tái nhạy hóa chất kháng sinh của subMIC bismut etandithiol (BisEDT) đối với MRSA được cung cấp (Fig.4) thể hiện tác dụng của chất kháng sinh được tăng cường đối với một số nhóm chất kháng sinh, bao gồm gentamixin, cefazolin, cefepime, imipenim, sulphamethoxazol, và levofloxacin. Do đó, BisEDT tăng cường một cách không đặc hiệu hoạt tính của hầu hết tất cả các chất kháng sinh.

Các nghiên cứu về tính nhạy kháng vi sinh vật tính của canh trường pha loãng được thực hiện đối với 12 chủng MRSA sử dụng một số chất kháng sinh kết hợp với các mức subMIC của BisEDT (Bảng 18). Cả nồng độ ngăn chặn màng sinh học (BPC) và nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) đều được xác định trong môi trường nuôi cấy màng sinh học riêng (BHIG/X). MIC và BPC đối với gentamixin và cefazolin được giảm xuống bằng subMIC BisEDT (BisEDT MIC, 0,2-0,4 µg/ml), nhưng không dưới điểm ngắt đối với độ nhạy. subMIC BisEDT tăng cường độ nhạy của MRSA đối với gatifloxacin và cefepime gần điểm ngắt đối với độ nhạy. Các chủng này là đã nhạy đối với vancomyxin, nhưng được làm tăng đáng kể nhờ sự có mặt của subMIC BisEDT. Nói chung, MIC và BPC được giảm xuống khoảng 2 đến 5 lần nhờ subMIC BisEDT.

BẢNG 18

Hoạt tính kháng vi sinh vật của kết hợp BT-Chất kháng sinh đối với MRSA

Chất kháng sinh	BisEDT (µg/mL)				MIC chuẩn (µg/ml)	
	0	0,025	0,05	0,1	S	R
Gentamixin						
BPC	81±41	63±30	53±31	33±25		
MIC	81±40	60±27	58±30	48±31	≤4	≥16
Cefazolin						
BPC	109±86	76±86	76±105	34±28		
MIC	93±75	99±76	90±60	45±32	≤8	≥32
Gatifloxacin						
BPC	3,6±2,6	2,6±0,9	2,4±1,1	0,9±0,8		
MIC	3,6±2,6	4,0±2,8	4,0±2,8	2,4±1,1	≤2	≥8
Vancomyxin						
BPC	2,5±1,7	1,5±0,6	1,3±0,5	0,7±0,4		
MIC	2,5±1,7	2,5±1,7	1,5±0,6	1,3±0,5	≤4	≥32

Chất kháng sinh	BisEDT ($\mu\text{g/mL}$)				MIC chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)	
	0	0,025	0,05	0,1	S	R
Cefepime						
BPC	24 $\pm$ 37	27 $\pm$ 28	18 $\pm$ 16	5,0 $\pm$ 7,3		
MIC	45 $\pm$ 32	32 $\pm$ 28	37 $\pm$ 24	9,3 $\pm$ 6,1	≤ 8	≥ 32

12 thể phân lập lâm sàng MRSA được phát triển trong BHIG/X và được cho tiếp xúc với các dịch pha loãng từng bậc của các chất kháng sinh với sự có mặt của 0-0,1 $\mu\text{g/ml}$ BisEDT. MIC và BPC, được tính theo $\mu\text{g/ml}$, là các trị số trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn từ ít nhất là ba thử nghiệm. Cột phía tay trái liệt kê MIC chuẩn đối với độ nhạy chất kháng sinh (S) và độ kháng chất kháng sinh (R)

Thử nghiệm canh trường pha loãng của thể phân lập MRSA kháng cefepime được thể hiện trên Bảng 19. BisEDT ở nồng độ 0,1 $\mu\text{g/ml}$ làm tăng cường đáng kể hoạt tính ức chế của cefepime ở 11 trong số 12 thể phân lập. Trong các thử nghiệm cụ thể này, số liệu thể hiện tính đồng vận giữa BisEDT và cefepime ($\text{FIC} < 0,5$), với một số thể phân lập ở điểm ngắt đối với độ nhạy.

BẢNG 19

MRSA kháng Cefepime được làm nhạy bằng BisEDT

MRSA	MIC đối với Cefepime (ug/mL) trong subMIC BisEDT		
	BE	BE	BE
	0 µg/mL	0,05 µg/mL	0,1 µg/mL
Chủng số	MIC	MIC	MIC
4	256	256	16
6	256	256	32
7	128	256	32
10	128	32	16
18	256	128	8
24	256	64	8
28	256	128	8
35	256	256	8
37	128	128	8
41	128	256	8
46	256	256	256
47	32	8	8

Mười hai chủng MRSA kháng cefepime được thử nghiệm trong môi trường BHIG/X trong các đĩa polystyren về tính nhạy đối với cefepime được kết hợp với subMIC BisEDT ở 37°C trong 48 giờ.

Kết quả của các thử nghiệm kết hợp với nafcillin hoặc gentamixin được thể hiện ở Bảng 20. Khi được kết hợp với nafcillin, BisEDT (0,2µg/ml) làm giảm MIC₉₀ của nafcillin khoảng trên 4 lần đối với MRSA (FIC, 0,74). Khi được kết hợp với gentamixin, BisEDT làm giảm MIC₉₀ của gentamixin trên 10 lần đối với MRSA (FIC, 0,6). BT nghịch đảo tính kháng của tất cả bốn thể phân lập kháng gentamixin được thử nghiệm đối với nồng độ liên quan về mặt lâm sàng [Domenico et al., 2002]. MIC đối với các chất kháng vi sinh vật này được giảm xuống đáng kể, đặc biệt là đối với gentamixin. Canh trường được sử dụng trong các thử nghiệm này là canh trường đậu nành trypticase (TSB) với 2% glucoza, canh trường này thể hiện kết quả tương tự như kết quả được thấy ở canh trường Mueller-Hinton II được củng cố bằng 1% máu cừu.

BẢNG 20

MRSA: Tính đồng vận Nafcillin hoặc Gentamixin + BisEDT

Chủng	NAF MIC	NAF+BE MIC	Δ	GM MIC	GM+BE MIC	Δ
60187-2	10,00	0,60	16,67	0,23	0,00	58,33
52446-3	175,00	40,00	4,38	10,67	1,50	7,11
M1978	140,00	50,00	2,80	32,50	4,00	8,13
W54793	130,00	33,33	3,90	0,25	0,08	3,13
S24341	210,00	65,00	3,23	0,25	0,06	4,29
H7544	28,33	15,00	1,89	0,38	0,09	4,11
H72751	145,00	43,33	3,35	0,20	0,07	2,79
W71630	131,67	46,67	2,82	17,67	3,80	4,65
X22831	178,33	75,00	2,38			
X23660	123,33	43,33	2,85	22,50	4,00	5,63
O36466	191,67	93,33	2,05	0,27	0,04	6,15
		AVG Δ	4,21		AVG Δ	10,43

NAF hoặc GM tính theo $\mu\text{g/ml}$; BE ở nồng độ $0,2\mu\text{g/ml}$

Staphylococcus epidermidis. Hoạt tính của hầu hết các nhóm chất kháng sinh được tăng cường với sự có mặt của BisEDT. Đối với BPC, clindamycin và gatifloxacin thể hiện hoạt tính chống màng sinh học cao hơn đáng kể đối với *S. epidermidis* khi được kết hợp với BisEDT (Fig.5). Được nêu trong các trường hợp khác nhau, BPC đối với clindamycin, gatifloxacin và gentamixin được giảm xuống lần lượt 50 lần, 10 lần và 4 lần, với sự có mặt của subMIC BisEDT.

Chỉ thấy được sự giảm ít đối với nồng độ ngăn chặn màng sinh học (BPC) của minoxycilin, vancomycin, và cefazolin, trong khi rifampicin và nafcillin vẫn không bị ảnh hưởng ở nồng độ BisEDT là $0,05\mu\text{g/ml}$. Ở nồng độ BisEDT là $0,1\mu\text{g/ml}$ không phát hiện thấy màng sinh học bất kể loại chất kháng sinh được sử dụng, có nghĩa là không xảy ra sự đối kháng. Nồng độ BisEDT này là gần với MIC đối với *S. epidermidis* [Domenico et al., 2003] (Xem Fig.5).

Đối với khả năng ức chế sự phát triển, bảy trong tám chất kháng sinh được thử nghiệm có tác dụng tăng cường đáng kể với sự có mặt của $0,1\mu\text{g/ml}$ ($0,5\mu\text{M}$) BisEDT đối với *S. epidermidis* (Fig.6). Thay đổi MIC là rõ nhất đối với clindamycin và gentamixin, sau đó là vancomycin, cefazolin, minoxycilin,

gatifloxacin và nafcillin, còn rifampixin không bị ảnh hưởng. Trong số các chất kháng sinh này, chủng này kháng với NC, CZ, GM, CM, chỉ có tính kháng cefazolin được nghịch đảo đối với các mức liên quan trên lâm sàng bằng BisEDT.

Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) đối với hầu hết các chất kháng sinh được thử nghiệm chống lại *S. epidermidis* đều giảm nhẹ với subMIC BisEDT. Gentamixin thể hiện sự giảm MBC lớn nhất (4 đến 16 lần), sau đó là cefazolin (4 đến 5 lần), vancomycin và nafcillin (3 đến 4 lần), minoxycyclin và gatifloxacin (2 đến 3 lần), trong khi MBC của clindamycin và rifampicin vẫn giữ không bị ảnh hưởng nhiều. Clindamycin là chất kìm vi khuẩn, điều này giải thích sự thiếu hoạt tính diệt khuẩn của nó. Tính kháng cefazolin được nghịch đảo đối với MBC [Domenico et al., 2003]. Tác dụng này là tác dụng bổ sung.

Sự tăng khả năng của các kháng vi sinh vật cũng được chứng minh in vivo trong mô hình chuột nhiễm trùng mảnh ghép (Bảng 21). Các mức BisEDT thấp khoảng 0,1µg/ml cũng có thể thúc đẩy khả năng ngăn chặn màng sinh học *S. epidermidis* kháng chất kháng sinh trong 7 ngày.

Như được tổng kết trên Bảng 21, các mô cấy được nhúng 0,1µg/ml BisEDT, 10µg/ml RIP và 10µg/ml rifampin, một mình hoặc kết hợp với nhau được cấy vào dưới da của chuột. Dung dịch sinh lý (1ml) chứa các chủng MS và MR ở nồng độ 2×10^7 cfu/ml được cấy truyền lên bề mặt mảnh ghép bằng cách sử dụng ống tiêm tubeculin. Tất cả các mảnh ghép được cấy mô bên ngoài ở 7 ngày sau khi cấy ghép và được siêu âm trong 5 phút trong dung dịch nước muối vô trùng để loại bỏ vi khuẩn dính bám. Số lượng vi khuẩn tồn tại nhận được bằng cách nuôi cấy các dịch pha loãng trên các đĩa thạch máu. Giới hạn phát hiện là khoảng 10cfu/cm².

BẢNG 21

RIP, BT, và rifampin đối với *S. epidermidis* trong mô hình gây nhiễm mảnh ghép

Nhóm ^a	Dược chất liên kết mảnh ghép ^b	Số lượng vi sinh vật trên mảnh ghép (cfu/cm ²)	
-------------------	---	--	--

Nhóm ^a	Dược chất liên kết mảnh ghép ^b	Số lượng vi sinh vật trên mảnh ghép (cfu/cm ²)
Không có MSSE	-	<10
MSSE không được điều trị	-	$5,0 \times 10^7 \pm 7,7 \times 10^6$
MS1 ^c	RIP	$4,3 \times 10^2 \pm 1,2 \times 10^2$
MS2 ^c	BT	$5,8 \times 10^2 \pm 0,9 \times 10^2$
MS3 ^c	Rifampin	$5,9 \times 10^3 \pm 1,8 \times 10^3$
MS ^{cd}	RIP cộng với BT	<10
MS5 ^{cd}	RIP cộng với rifampin	$2,0 \times 10^1 \pm 0,6 \times 10^1$
MS6 ^{cd}	BT cộng với rifampin	$1,9 \times 10^1 \pm 0,4 \times 10^1$
Không có MRSE	-	<10
MRSE không được điều trị	-	$7,8 \times 10^7 \pm 2,0 \times 10^7$
MR1 ^c	RIP	$6,7 \times 10^2 \pm 2,1 \times 10^2$
MR2 ^c	BT	$6,2 \times 10^2 \pm 2,3 \times 10^2$
MR3 ^c	Rifampin	$7,6 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^4$
MR4 ^{ce}	RIP cộng với BT	<10
MR5 ^c	RIP cộng với rifampin	$4,3 \times 10^1 \pm 1,1 \times 10^1$
MR6 ^c	BT cộng với rifampin	$3,0 \times 10^1 \pm 1,1 \times 10^1$

^a Mỗi nhóm có 15 con chuột; MS: *S. epidermidis* nhạy với methixilin; MR: *S. epidermidis* kháng methixilin

^b Các phần mảnh ghép dacron nhúng thấm 0,1mg/l BT, 10mg/l RIP, 10mg/l rifampin

^c Có ý nghĩa thống kê khi được so với các nhóm đối chứng MS và MR

^d Có ý nghĩa thống kê khi được so với nhóm MS3

^e Có ý nghĩa thống kê khi được so với các nhóm MR1, MR2, và MR3

Vì khuẩn gram âm. Hoạt tính kháng *Pseudomonas aeruginosa* của tobramycin được tăng cường vài lần với subMIC BisEDT (Bảng 22). Trong các thử nghiệm này, MIC được xác định chính xác hơn dưới dạng IC₂₄.

BẢNG 22

P. aeruginosa kháng tobramycin: Tác dụng của BisEDT

Chủng	NN MIC ($\mu\text{g/ml}$)	BE MIC ($\mu\text{g/ml}$)	NN+BE MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Δ
PA Xen5	0,3	0,9	0,2	1,7
Agr PA E	115,0	0,9	70,0	1,6
Agr PA I	200,0	1,0	73,0	2,7
Agr PA K	4,8	0,86	3,0	1,6
Agr PA O	130,0	0,98	20,5	6,3

Các chủng *P. aeruginosa* kháng được nuôi cấy trong canh trường Mueller-Hinton II ở 37°C với sự có mặt của tobramycin (NN) và BisEDT (BE; 0,33 $\mu\text{g/ml}$). MIC được xác định dưới dạng nồng độ của chất kháng sinh mà ức chế sự phát triển trong 24 $\pm$ 1 giờ.

Để chống lại *Burkholderia cepacia* kháng tobramycin, 0,4 $\mu\text{g/ml}$ BisEDT đáp trả bảy trong số 10 thể phân lập nhạy với tobramycin (FIC trung bình; 0,48), và giảm MIC₉₀ khoảng 10 lần (Bảng 23). Cả MIC và MBC của tobramycin đều giảm xuống đáng kể đến các mức có thể đạt được đối với 50 thể phân lập *Burkholderia cepacia* lâm sàng với subMIC BisEDT [Veloira et al., 2003]. BisEDT và tobramycin ở dạng liposom đã chứng minh tính đồng vận cao đối với *P. aeruginosa*. (Halwani et al., 2008; Halwani et al., 2009).

BẢNG 23

Tobramyxin và BisEDT đối với *B. cepacia*

MIC đối với				
Chủng	Tobramyxin ($\mu\text{g/ml}$)	BisEDT ($\mu\text{g/ml}$)	Tobramyxin (BisEDT ở 0,4 $\mu\text{g/ml}$)	Chỉ số FIC
<i>B. multivorans</i>				
HI 2249	256	0,4	a	a
HI 2229	64	0,8	8	0,63
AU 0267	128	0,8	2	0,52
AU 0259	1024	1,6	256	0,50
HI 2255	64	1,6	8	0,38
<i>B. cenocepacia</i>				
HI 2711	256	0,4	a	a
AU 0284	512	0,4	a	a
AU 0273	512	1,6	32	0,31
HI2253	64	1,6	16	0,50
HI 2147	512	1,6	8	0,27

^a Ba chủng được ức chế bằng BisEDT ở nồng độ 0,4 $\mu\text{g/ml}$ được loại trừ ra khỏi thử nghiệm tiếp theo.

Chỉ số FIC $\leq 0,5$ biểu thị tính đồng vận: FICI $>0,5$ và $<1,0$ biểu thị tính tăng cường.

Escherichia coli kháng cloramphenicol và ampicilin được làm cho nhạy với các dược chất này bằng cách bổ sung subMIC BisEDT (Bảng 24).

BẢNG 24

E. coli kháng Cloramphenicol/Ampixilin: Tác dụng của BisEDT

Chủng	Dược chất	MIC của dược chất ($\mu\text{g/ml}$)	MIC của BE ($\mu\text{g/ml}$)	MIC của dược chất + BE ($\mu\text{g/ml}$)	Δ
MC4100/TN9	CM	220,0	0,6	12,7	17,4
MC4100/P9	AMP	285,0	0,5	49,0	5,8
MC4100	AMP	141,7	0,6	35,0	4,0

Các chủng *E.coli* kháng được nuôi cấy trong canh trường Mueller-Hinton II ở 37°C với sự có mặt của cloramphenicol (CM) hoặc ampicilin (AMP) và BisEDT một mình hoặc kết hợp với nhau (BE; 0,33 $\mu\text{g/ml}$). MIC được xác định dưới dạng nồng độ chất kháng sinh mà ức chế sự phát triển trong 24 $\pm$ 1 giờ.

Escherichia coli kháng tetracyclin được làm cho nhạy với doxyxycilin bằng cách bổ sung subMIC BisEDT (Bảng 25). Kết hợp này biểu hiện tính đồng vận đối với các chủng TET M và TET D ($\text{FIC} \leq 0,5$), với tác dụng bổ sung đối với các chủng TET A và TET B.

BẢNG 25

E. Coli kháng tetracyclin: Tác dụng của BisEDT

Chủng	DOX MIC ($\mu\text{g/ml}$)	BE MIC ($\mu\text{g/ml}$)	DOX+BE MIC ($\mu\text{g/ml}$)	Δ
TET M	$16,5 \pm 1,3$	0,85	$4,5 \pm 2,7$	4,0
TET D	$20,5 \pm 1,1$	0,85	$0,03 \pm 0,0$	820,0
TET A	$15,0 \pm 1,8$	0,40	$10,0 \pm 1,0$	1,5
TET B	$20,1 \pm 2,4$	0,60	$10,3 \pm 3,2$	2,0

Các chủng *E.coli* kháng được nuôi cấy trong canh trường Mueller-Hinton II ở 37°C với sự có mặt của doxyxycilin (DOX) và BisEDT một mình hoặc kết hợp với nhau (BE; 0,33 $\mu\text{g/ml}$). MIC được xác định dưới dạng nồng độ chất kháng sinh mà ức chế sự phát triển trong 24 ± 1 giờ.

Tài liệu tham khảo

Domenico P, R O'Leary, BA Cunha. 1992. Differential effect of bismuth and salicylate compounds on antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infec Dis* 11:170-175; Domenico P, D Parikh, BA Cunha. 1994. Bismuth modulation of antibiotic activity against gastrointestinal bacterial pathogens. *Med Microbiol Lett* 3:114-119; Domenico P, Kazzaz JA, Davis JM, Niederman MS. 2002. Cản ức chế bismuth ethanedithiol (BisEDT) sensitizes resistant *Staphylococcus aureus* to nafcillin or gentamicin. Annual Meeting, ASM, Salt Lake City, UT; Domenico P, Kazzaz JA, Davis JM. 2003. Combating antibiotic resistance with bismuth-thiols. *Research Advances in Antimicrob Agents Chemother* 3:79-85; Domenico P, E Gurzenda, A Giacometti, O Cirioni, R Ghiselli, F Orlando, M Korem, V Saba, G

Scalise, N Balaban. 2004. BisEDT and RIP act in synergy to prevent graft infections by resistant staphylococci. *Peptides* 25:2047-2053; Halwani M, Blomme S, Suntres ZE, Alipour M, Azghani AO, Kumar A, Omri A. 2008. Liposomal bismuth-ethanedithiol formulation enhances antimicrobial activity of tobramycin. *Intl J Pharmaceut* 358:278-84; Halwani M, Hebert S, Suntres ZE, Lafrenie RM, Azghani AO, Omri A. 2009. Bismuth-thiol incorporation enhances biological activities of liposomal tobramycin against bacterial biofilm and quorum sensing molecules production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Pharmaceut* 373:141-6; Veloir WG, Gurzenda EM, Domenico P, Davis JM, Kazzaz JA. 2003. Synergy of tobramycin and bismuth thiols against *Burkholderia cepacia*. *J Antimicrob Chemother* 52:915-919.

VÍ DỤ 9

Tác dụng đồng vận và tăng cường của BT vi hạt-chất kháng sinh

Ví dụ này thể hiện rằng bismut thiol BisEDT vi hạt làm tăng hoạt tính của chất kháng sinh qua các tương tác đồng vận và/hoặc tăng cường đối với các chất kháng sinh cụ thể kháng các vi sinh vật đích cụ thể. Số liệu một điểm đối với mỗi chất biểu thị kết hợp trong Bảng 26 có được về cơ bản là theo các phương pháp được sử dụng trong Ví dụ 8.

BẢNG 26

Tri số FICI đối với các kết hợp BisEDT-chất kháng sinh một điểm

Anti biotic	SA	MRSA	E	Fc	SP	PRSP	EC	EC	KP	PA	Bcep	Bmult	Abau	Msmeg
	100	773	3121	1195	5348	102	2232	1231	1380	1756	5665	2594	817	
Oxaxilin	1,28	2,28	0,92		1,03									
Piperaxilin	0,57	1,28	1,11		1,11	0,87	1,29	2,23	0,67	1,12	1,12			
Cefuroxime	1,11	4,23	1,11		1,03									
Cefotaxime	1,11	2,23	0,73	1,11	1,11	1,37	1,29	0,61	0,64	1,29	1,11	1,29		
Cefepime						0,87	0,96	1,11	0,62	1,34	0,96	0,71		
Imipenem	0,67	1,48	0,73	0,92	0,43	1,11	1,29	1,23	1,12	0,73	1,23	0,81		
Aztreonam						0,74	1,29	0,73	0,55	0,67	0,96	0,87		
Streptomycin		0,95	0,61		0,66		1,29	1,04	1,98	1,37	1,12	2,62	1,13	
Tobramycin	0,73	0,78	0,47		0,57		0,96	0,87	1,29	0,91	0,67	1,12		
Tetracyclin	0,89	1,23	0,92	1,23	0,34	0,62	0,79	1,29	1,29	1,96	1,12	1,12		
Minocyclin	1,09	1,23	1,11		0,46	1,37	1,04	1,29	0,99	2,23	1,12	1,29		
Ciprofloxacin						1,14	1,29	1,29	2,75	2,23	2,29	1,04		
Levofloxacin	1,23	1,11	1,08	0,95	0,70									
Erythromycin	1,28	0,67	0,92	0,78	1,03									
Linezolid	1,23	1,23	1,23	1,01	1,11									
Phosphomycin		0,61	1,23		1,45		1,96	1,02	1,86	1,29	1,23	1,12		
Capreomycin													0,75	
Isoniazid													0,88	

SA: *Staphylococcus aureus*; MRSA: *Staphylococcus aureus* kháng methixilin; E Fc: *Enterococcus faecalis*; SP: *Streptococcus pneumoniae*; PRSP: *Streptococcus pneumoniae* kháng penixilin; EC: *Escherichia coli*; KP: *Klebsiella pneumoniae*; PA: *Pseudomonas aeruginosa*; Bcep: *Burkholderia cepacia*; Bmult: *Burkholderia multivorans*; Abau: *Acinetobacter baumannii*; Msmeg: *Mycobacterium smegmatis*.

VÍ DỤ 10

Tác dụng đồng vận và tăng cường của BT vi hạt-chất kháng sinh

Tác dụng của các kết hợp Bis-EDT vi hạt và bốn chất tương tự Bis-EDT được điều chế như được mô tả trên đây, và các chất khác đối với các chủng vi khuẩn gram âm gây bệnh đại diện được thử nghiệm. Việc cải biến phương pháp dùng trong phòng thí nghiệm thông thường được sử dụng để xác định tính đồng vận ($FICI \leq 0,5$), tính tăng cường ($0,5 < FICI \leq 1,0$), tính đối kháng ($FICI > 4,0$) và tính không phân biệt ($1,0 < FICI \leq 4,0$) sử dụng nồng độ ức chế phân đoạn (FIC) và các chỉ số FIC (FICI) (Eliopoulos G và R Moellering. 1991. Antimicrobial combinations. In *Antibiotics in Laboratory Medicine, Third Edition*, do V Lorian biên tập. Williams và Wilkins, Baltimore, MD, trang 432-492; Odds, 2003 *J. Antimicrob. Chemother.* 52(1):1). Kỹ thuật bàn cờ được sử dụng để xác định các chỉ số FIC và được sử dụng trong thử nghiệm này.

BẢNG 27

Các thành phần thử nghiệm

Hợp chất thử nghiệm	Lô số	Dung môi	FIC Nồng độ dung dịch gốc cao nhất ($\mu\text{g/mL}$)	Khoảng nồng độ được thử nghiệm FIC ($\mu\text{g/mL}$)
Bis-EDT	MB-1B-3	DMSO	320	0,12-8
Bis-EDT (chất tương tự)	MB-2B	DMSO	320	0,12-8
Bis-EDT (chất tương tự)	MB-8-2	DMSO	320	0,12-8
Bis-EDT (chất tương tự)	MB-11	DMSO	320	0,12-8
Bis-EDT (chất tương tự)	MB-15	DMSO	320	0,12-8
Aztreonam	095K1324 (Sigma)	10% DMSO	2,560	0,06-64
Cefepime HCl	GOD116 (USP)	dH ₂ O	2,560	0,06-64
Cefotaxime	084K0674 (Sigma)	dH ₂ O	640	0,015-16
Piperaxilin	014K1362 (Sigma)	dH ₂ O	2,560	0,06-64

Các dung dịch gốc đối với tất cả các đối tượng thử nghiệm được điều chế ở mức 40 lần nồng độ đích cuối cùng trong các dung môi thích hợp. Tất cả các đối tượng thử nghiệm đều ở dạng dung dịch trong các điều kiện này. Nồng độ được chất cuối cùng trong các đĩa thử nghiệm FIC được đặt để bao trị số MIC đối với mỗi chất đối với mỗi sinh vật thử nghiệm, trừ phi chủng này kháng hoàn toàn chất thử nghiệm. Khoảng nồng độ được thử nghiệm được biểu thị trên Bảng 27. Các sinh vật thử nghiệm có nguồn gốc từ các nguồn lâm sàng, hoặc từ American Type Culture Collection. Khi mua về, thể phân lập được cấy vạch lên thạch đậu nành trypsin II (TSA). Các khuẩn lạc được thu hoạch từ các đĩa này và huyền phù tế bào được chuẩn bị trong môi trường phát triển thích hợp chứa chất bảo vệ cryo. Sau đó các phân ước được làm lạnh sâu ở -80°C . Giống vi sinh vật lạnh đông để thử nghiệm trong thử nghiệm nhất định được rã đông, cấy vạch để phân lập trên các đĩa TSA, và ủ ở 35°C . Tất cả các sinh vật được thử nghiệm trong canh trường Mueller Hinton II (Becton Dickinson, Lot No.9044411). Canh trường này được điều chế ở

mức 1,05 lần trọng lượng/thể tích thông thường để bù đắp 5% thể tích được chất trong đĩa thử nghiệm cuối cùng.

Các trị số nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) đã được xác định trước đây bằng cách sử dụng phương pháp vi pha loãng canh trường đối với vi khuẩn ưa khí (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Eighth Edition*. CLSI document M07-A8 [ISBN 1-56238-689-1]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2009.).

Các trị số FIC được xác định bằng cách sử dụng phương pháp vi pha loãng canh trường đã nêu (Sweeney et al., 2003 *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(6):1902-1906). Để chuẩn bị các đĩa thử nghiệm, các bộ xử lý chất lỏng tự động (Multidrop 384, Labsystems, Helsinki, Finland; Biomek 2000 và Multimek 96, Beckman Coulter, Fullerton CA) được sử dụng để thực hiện việc pha loãng từng bậc và truyền chất lỏng.

Các ô thích hợp của các đĩa vi pha loãng 96 lỗ chuẩn (Falcon 3918) được nạp 150 μ L dung môi thích hợp trong các cột 2-12 sử dụng dụng cụ Multidrop 384. Bổ sung 300 μ L của mỗi dung dịch được chất thứ yếu thử nghiệm vào mỗi lỗ ở cột 1 của đĩa. Các đĩa này được sử dụng để chuẩn bị “đĩa mẹ” được chất, đĩa này cung cấp các dung dịch pha loãng từng bậc được chất cho các đĩa kết hợp được chất. Biomek 2000 được sử dụng để truyền 150 μ L mỗi dung dịch được chất thứ yếu (40 lần) từ các lỗ ở cột 1 của đĩa mẹ và để tạo mười một dung dịch pha loãng 2 lần. Các đĩa mẹ chứa Bis-EDT (và các chất tương tự) được pha loãng từng bậc từ đỉnh đến đáy bằng tay, sử dụng pipet đa kênh. Hai đĩa mẹ, một cho được chất thứ yếu và một cho Bis-EDT (hoặc các chất tương tự), được kết hợp để tạo thành mẫu “bàn cờ” bằng cách truyền các thể tích như nhau (sử dụng pipet đa kênh) vào đĩa kết hợp được chất. Mỗi hàng H và cột 12 chứa các dung dịch pha loãng từng bậc của một mình một trong số các chất để xác định MIC.

“Các đĩa con” được nạp 180 μ L môi trường thử nghiệm bằng cách sử dụng Multidrop 384. Sau đó Multimek 96 được sử dụng để truyền 10 μ L dung dịch được chất từ mỗi lỗ của đĩa mẹ chứa kết hợp được chất đến mỗi lỗ tương ứng của đĩa con trong một bước. Cuối cùng, các đĩa con được cấy truyền sinh vật thử nghiệm. Dịch cấy truyền được chuẩn hóa của mỗi sinh vật được chuẩn bị theo hướng dẫn đã được công bố (CLSI, 2009). Đối với tất cả các thể phân lập, dịch cấy truyền đối với mỗi sinh vật được phân phối vào trong các dụng cụ chứa vô trùng được phân chia theo chiều dài (Beckman Coulter), và Biomek 2000 được sử dụng để cấy truyền vào đĩa. Dụng cụ này chuyển 10 μ L dịch cấy truyền được chuẩn hóa vào mỗi lỗ để thu được nồng độ tế bào cuối cùng trong đĩa con khoảng 5×10^5 đơn vị tạo thành khuẩn lạc(cfu)/mL.

Hình thức thử nghiệm dẫn đến việc tạo ra 8 x 12 ô bàn cờ trong đó mỗi hợp chất được thử nghiệm một mình (Cột 12 và Hàng H) và kết hợp với các được chất với tỷ lệ nồng độ khác nhau. Tất cả các đĩa sinh vật được xếp thành chồng 3, phủ bằng nắp trên đĩa trên cùng, đặt trong túi nhựa, và ủ ở 35°C trong khoảng 20 giờ. Sau khi ủ, các vi đĩa này được lấy khỏi tủ áp và được quan sát từ phía đáy bằng cách sử dụng dụng cụ quan sát đĩa ScienceWare. Các phiếu đọc đã được chuẩn bị được đánh dấu cho MIC của được chất 1 (hàng H), MIC của được chất 2 (cột 12) và các lỗ của mặt phân chia phát triển-không phát triển.

Chương trình Excel được sử dụng để xác định FIC theo công thức; (MIC của Hợp chất 1 trong kết hợp/MIC của Hợp chất 1 một mình) + (MIC của Hợp chất 2 trong kết hợp/MIC của Hợp chất 2 một mình). FICI đối với bàn cờ được tính từ các FIC riêng lẻ theo công thức: $(FIC_1 + FIC_2 + \dots FIC_n)/n$, trong đó n = số ô riêng lẻ trên một đĩa mà FIC được tính cho nó. Ví dụ, nếu một mình một chất thu được kết quả MIC ngoài thang đo, thì nồng độ cao nhất tiếp theo được sử dụng làm trị số MIC để tính FIC.

Bis-EDT vi hạt, bốn chất tương tự BT vi hạt, và tất cả các chất khác (và các kết hợp của các chất này) đều hòa tan ở tất cả các nồng độ thử nghiệm cuối cùng. Các trị số MIC và FICI đã được xác định được thể hiện trong Bảng dưới đây.

BẢNG 28

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-1B-3 và Piperaxilin

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ²
	Tên	MIC ¹ (µg/mL) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>P. aeruginosa</i> 1381	MB-1B-3	1	Piperaxilin	>64	0,83
<i>P. aeruginosa</i> 1384		1		8	0,96
<i>P. aeruginosa</i> 1474		1		8	0,71
<i>P. aeruginosa</i> 1479		0,5		8	1,12
<i>P. aeruginosa</i> 2566		0,5		32	1,37
<i>P. aeruginosa</i> 2568		1		8	0,71
<i>P. aeruginosa</i> 103		1		8	0,79

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 29

Tổng kết các kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-1B-3 và Aztreonam

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ²
	Tên	MIC ¹ (µg/mL) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>P. aeruginosa</i> 1381	MB-1B-3	1	Aztreonam	32	1,04
<i>P. aeruginosa</i> 1384		1		8	0,71
<i>P. aeruginosa</i> 1474		1		8	0,71
<i>P. aeruginosa</i> 1479		0,5		8	0,87
<i>P. aeruginosa</i> 2566		0,5		16	1,37
<i>P. aeruginosa</i> 2568		1		8	0,71
<i>P. aeruginosa</i> 103		1		4	1,29

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 30

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-15 và Piperaxilin

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ²
	Tên	MIC ¹ ($\mu\text{g/mL}$) một mình	Tên	MIC ($\mu\text{g/mL}$) một mình	
<i>P. aeruginosa</i> 1381	MB-15	1	Piperaxilin	>64	1,29
<i>P. aeruginosa</i> 1384		1		16	0,71
<i>P. aeruginosa</i> 1474		1		8	1,12
<i>P. aeruginosa</i> 1479		1		8	1,29
<i>P. aeruginosa</i> 2566		1		32	1,04
<i>P. aeruginosa</i> 2568		1		8	1,12
<i>P. aeruginosa</i> 103		2		8	0,73

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 31

Tổng kết các kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-15 và Aztreonam

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ²
	Tên	MIC ¹ ($\mu\text{g/mL}$) một mình	Tên	MIC ($\mu\text{g/mL}$) một mình	
<i>P. aeruginosa</i> 1381	MB-15	2	Aztreonam	32	1,11
<i>P. aeruginosa</i> 1384		1		8	0,79
<i>P. aeruginosa</i> 1474		1		8	0,71
<i>P. aeruginosa</i> 1479		2		8	0,67
<i>P. aeruginosa</i> 2566		0,5		16	1,12
<i>P. aeruginosa</i> 2568		1		8	0,79
<i>P. aeruginosa</i> 103		2		4	1,23

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 32

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-8-2 và piperaxilin

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ²
	Tên	MIC ¹ (µg/mL) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>P. aeruginosa</i> 1381	MB-8-2	2	Piperaxilin	>64	1,23
<i>P. aeruginosa</i> 1384		2		16	0,73
<i>P. aeruginosa</i> 1474		2		8	1,23
<i>P. aeruginosa</i> 1479		2		8	1,23
<i>P. aeruginosa</i> 2566		2		32	1,23
<i>P. aeruginosa</i> 2568		2		8	0,98
<i>P. aeruginosa</i> 103		4		8	1,19

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 33

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-8-2 và Aztreonam

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ²
	Tên	MIC ¹ (µg/mL)) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>P. aeruginosa</i> 1381	MB-8-2	2	Aztreonam	32	1,11
<i>P. aeruginosa</i> 1384		2		8	1,11
<i>P. aeruginosa</i> 1474		2		8	0,73
<i>P. aeruginosa</i> 1479		2		8	0,98
<i>P. aeruginosa</i> 2566		2		16	1,23
<i>P. aeruginosa</i> 2568		2		8	0,98
<i>P. aeruginosa</i> 103		4		8	1,19

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 34

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-11 và Piperaxilin

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ₂
	Tên	MIC ¹ (µg/mL) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>P. aeruginosa</i> 1381	MB-11	1	Piperaxilin	>64	1,12
<i>P. aeruginosa</i> 1384		1		16	0,71
<i>P. aeruginosa</i> 1474		1		8	1,12
<i>P. aeruginosa</i> 1479		1		8	1,29
<i>P. aeruginosa</i> 2566		0,5		32	1,12
<i>P. aeruginosa</i> 2568		1		8	1,12
<i>P. aeruginosa</i> 103		2		8	1,11

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 35

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-11 và Aztreonam

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ₂
	Tên	MIC ¹ (µg/mL) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>P. aeruginosa</i> 1381	MB-11	2	Aztreonam	32	0,92
<i>P. aeruginosa</i> 1384		1		8	0,96
<i>P. aeruginosa</i> 1474		1		8	0,71
<i>P. aeruginosa</i> 1479		1		8	0,79
<i>P. aeruginosa</i> 2566		0,5		16	1,12
<i>P. aeruginosa</i> 2568		1		8	0,96
<i>P. aeruginosa</i> 103		2		8	1,11

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 36

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-2B và Piperaxilin

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ₂
	Tên	MIC ¹ (µg/mL) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>P. aeruginosa</i> 1381	MB-2B	2	Piperaxilin	>64	1,02
<i>P. aeruginosa</i> 1384		8		16	0,79
<i>P. aeruginosa</i> 1474		8		8	0,91
<i>P. aeruginosa</i> 1479		8		8	1,08
<i>P. aeruginosa</i> 2566		8		32	1,04
<i>P. aeruginosa</i> 2568		8		8	0,97
<i>P. aeruginosa</i> 103		8		8	1,16

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 37

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-2B và Aztreonam

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ₂
	Tên	MIC ¹ (µg/mL) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>P. aeruginosa</i> 1381	MB-2B	8	Aztreonam	64	0,89
<i>P. aeruginosa</i> 1384		8		8	0,91
<i>P. aeruginosa</i> 1474		8		8	0,54
<i>P. aeruginosa</i> 1479		8		8	0,87
<i>P. aeruginosa</i> 2566		8		16	0,91
<i>P. aeruginosa</i> 2568		8		8	0,87
<i>P. aeruginosa</i> 103		8		8	1,08

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 38

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-1B-3 và Cefotaxime

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ²
	Tên	MIC ¹ (µg/mL) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>K. pneumoniae</i> 1346	MB-1B-3	2	Cefotaxime	0,06	1,23
<i>K. pneumoniae</i> 1355		1		0,06	2,29
<i>K. pneumoniae</i> 2238		1		16	1,29
<i>K. pneumoniae</i> 2541		2		0,12	1,23
<i>K. pneumoniae</i> 2546		1		0,25	1,12
<i>K. pneumoniae</i> 2549		1		0,12	0,79
<i>P. aeruginosa</i> 103		1		16	0,96

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 39

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-1B-3 và Cefepime

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ²
	Tên	MIC ¹ (µg/mL) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>P. aeruginosa</i> 1381	MB-1B-3	1	Cefepime	32	1,29
<i>P. aeruginosa</i> 1384		1		2	0,79
<i>P. aeruginosa</i> 1474		1		2	0,79
<i>P. aeruginosa</i> 1479		1		4	1,12
<i>P. aeruginosa</i> 2566		0,5		8	1,37
<i>P. aeruginosa</i> 2568		1		2	0,79
<i>P. aeruginosa</i> 103		1		2	0,71

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 40

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-15 và Cefotaxime

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ₂
	Tên	MIC ¹ (µg/mL) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>K. pneumoniae</i> 1346	MB-15	2	Cefotaxime	0,06	1,23
<i>K. pneumoniae</i> 1355		1		0,12	2,37
<i>K. pneumoniae</i> 2238		2		16	1,23
<i>K. pneumoniae</i> 2541		2		0,12	1,23
<i>K. pneumoniae</i> 2546		2		0,25	0,97
<i>K. pneumoniae</i> 2549		2		0,06	1,23
<i>P. aeruginosa</i> 103		1		16	0,96

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 41

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-15 và Cefepime

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ₂
	Tên	MIC ¹ (µg/mL) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>P. aeruginosa</i> 1381	MB-15	1	Cefepime	32	1,29
<i>P. aeruginosa</i> 1384		1		2	0,79
<i>P. aeruginosa</i> 1474		1		2	1,12
<i>P. aeruginosa</i> 1479		1		4	1,12
<i>P. aeruginosa</i> 2566		0,5		8	1,37
<i>P. aeruginosa</i> 2568		1		2	1,12
<i>P. aeruginosa</i> 103		1		1	1,12

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 42

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-8-2 và Cefotaxime

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ²
	Tên	MIC ¹ (µg/mL) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>K. pneumoniae</i> 1346	MB-8-2	0,5	Cefotaxime	0,06	1,37
<i>K. pneumoniae</i> 1355		0,5		0,06	1,37
<i>K. pneumoniae</i> 2238		0,5		16	1,37
<i>K. pneumoniae</i> 2541		1		0,12	1,12
<i>K. pneumoniae</i> 2546		1		0,25	1,29
<i>K. pneumoniae</i> 2549		1		0,06	1,12
<i>P. aeruginosa</i> 103		2		16	1,11

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 43

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-8-2 và Cefepime

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ²
	Tên	MIC ¹ (µg/mL) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>P. aeruginosa</i> 1381	MB-8-2	2	Cefepime	32	1,23
<i>P. aeruginosa</i> 1384		2		2	0,80
<i>P. aeruginosa</i> 1474		2		2	1,11
<i>P. aeruginosa</i> 1479		2		4	1,23
<i>P. aeruginosa</i> 2566		2		8	1,23
<i>P. aeruginosa</i> 2568		2		2	0,98
<i>P. aeruginosa</i> 103		2		1	1,11

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 44

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-11 và Cefotaxime

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ²
	Tên	MIC ¹ (µg/mL) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>K. pneumoniae</i> 1346	MB-11	0,5	Cefotaxime	0,06	1,37
<i>K. pneumoniae</i> 1355		0,5		0,06	1,87
<i>K. pneumoniae</i> 2238		0,5		8	1,37
<i>K. pneumoniae</i> 2541		0,5		0,25	0,73
<i>K. pneumoniae</i> 2546		0,5		0,25	1,37
<i>K. pneumoniae</i> 2549		0,5		0,06	1,37
<i>P. aeruginosa</i> 103		1		16	1,12

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 45

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-11 và Cefepime

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ²
	Tên	MIC ¹ (µg/mL) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>P. aeruginosa</i> 1381	MB-11	1	Cefepime	32	1,12
<i>P. aeruginosa</i> 1384		1		2	1,12
<i>P. aeruginosa</i> 1474		0,5		2	1,12
<i>P. aeruginosa</i> 1479		0,5		8	0,87
<i>P. aeruginosa</i> 2566		0,5		16	0,93
<i>P. aeruginosa</i> 2568		0,5		2	0,87
<i>P. aeruginosa</i> 103		1		1	0,12

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 46

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-2B và Cefotaxime

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ₂
	Tên	MIC ¹ (µg/mL) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>K. pneumoniae</i> 1346	MB-2B	4	Cefotaxime	0,06	1,19
<i>K. pneumoniae</i> 1355		4		0,06	1,19
<i>K. pneumoniae</i> 2238		4		8	1,64
<i>K. pneumoniae</i> 2541		8		0,25	0,64
<i>K. pneumoniae</i> 2546		8		0,25	1,16
<i>K. pneumoniae</i> 2549		8		0,12	0,83
<i>P. aeruginosa</i> 103		2		16	1,11

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

BẢNG 47

Tổng kết kết quả nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ ức chế phân đoạn đối với MB-2B và Cefepime

Sinh vật ¹	Hợp chất 1		Hợp chất 2		FICI ₂
	Tên	MIC ¹ (µg/mL) Một mình	Tên	MIC (µg/mL)) Một mình	
<i>P. aeruginosa</i> 1381	MB-2B	4	Cefepime	32	1,09
<i>P. aeruginosa</i> 1384		4		2	0,94
<i>P. aeruginosa</i> 1474		2		2	0,98
<i>P. aeruginosa</i> 1479		2		4	1,11
<i>P. aeruginosa</i> 2566		2		8	1,23
<i>P. aeruginosa</i> 2568		2		2	1,11
<i>P. aeruginosa</i> 103		2		2	0,61

¹MIC: Nồng độ ức chế tối thiểu

²FICI: Chỉ số nồng độ ức chế phân đoạn

VÍ DỤ 11

Tác dụng của bismut thiol đối với sự nhiễm trùng trong mô hình khuyết tật tới hạn xương đùi của chuột cống *Rattus Norvegicus*

Phương pháp chăm sóc vết gãy xương hở hiện tại là rửa, mở ổ và dùng các chất kháng sinh; phương pháp này được dự tính là để giảm số lượng vi khuẩn trong

vết thương đến điểm mà sự nhiễm trùng không diễn ra. Mặc dù có việc điều trị này, sự nhiễm trùng vẫn gây phức tạp cho tới 75% vết gãy xương ống chân hở nặng. Thú vị là, mặc dù các bệnh nhiễm trùng sớm thường được gây ra bởi vi khuẩn gram âm nhưng các bệnh nhiễm trùng muộn mà có liên quan đến các vấn đề lành vết thương và sự cắt cụt lại là do sự nhiễm trùng vi khuẩn gram dương, thường là các loài tụ cầu khuẩn (Johnson 2007).

Một trong số các lý do mà *S. aureus* kháng với việc điều trị chuẩn là khả năng tạo thành màng sinh học của chúng. Vi khuẩn trong màng sinh học có thể kháng lại các nồng độ của hợp chất kháng vi sinh vật mà sẽ diệt các sinh vật tương tự trong môi trường nuôi cấy (Costerton 1987).

Mục đích của nghiên cứu này là để xác định liệu các hợp chất BT sẽ làm giảm sự nhiễm trùng trong mô hình vết gãy hở bị nhiễm bẩn chỉ bằng một mình chúng hoặc cùng với các chất kháng sinh hay không. Mô hình khuyết tật tới hạn xương đùi của chuột bị nhiễm bẩn là mô hình được chấp nhận tốt và được sử dụng cho các thử nghiệm được mô tả trong ví dụ này. Mô hình này đề nghị mô hình được chuẩn hóa để so sánh các cách điều trị có thể có khác nhau và tác dụng của chúng đối với việc làm giảm sự nhiễm trùng và/hoặc cải thiện quá trình lành vết thương.

Các hợp chất (CPD) CPD-8-2 (bismut pyrithion/ butandithiol; Bảng 1) và CPD-11 (bismut pyrithion/ etandithiol; Bảng 1) là hai chất tương tự của BIS-Bis đã thể hiện tiềm năng đối với vi khuẩn tiết màng sinh học *in vitro*, mặc dù với phổ hoạt tính khác với Bis-EDT.

Ba chế phẩm BT này, Bis-EDT, CPD-11 và CPD-8-2 (xem Bảng 1) đã chứng minh tác dụng ức chế đối với các chủng *S. aureus in vitro* khi được sử dụng cùng và không cùng với Tobramycin và Vancomycin trong chất dẫn giọt xi măng Poly Metyl Methacrylat (PMMA). Ba chế phẩm BT vi hạt này được sản xuất ở dạng gel hydrogel hữu dụng trên lâm sàng như được mô tả ở đây. Các BT này được thử nghiệm được tạo huyền phù trong gel ở nồng độ 5mg/ml⁻¹ bằng với nồng độ mà đã được phát hiện là thích hợp để phân phát gel. Các chế phẩm gel này thích hợp với đường viền của vết thương, và không cần phải loại bỏ sau khi dùng.

Hai nhóm điều trị được sử dụng: trong nhóm thứ nhất, BT được sử dụng riêng rẽ; trong nhóm thứ hai BT được sử dụng kết hợp với chất kháng sinh dùng toàn thân (ABx).

(a) *BT riêng rẽ.*

Sáu giờ sau khi cấy truyền *S. aureus*, vết thương được mở ổ, rửa bằng nước muối và 1ml gel BT được tiêm vào trong chỗ khuyết tật.

(b) *BT với các chất kháng sinh dùng toàn thân (ABx).*

Sáu giờ sau khi cấy truyền *S. aureus*, vết thương được mở ổ, rửa bằng nước muối và 1ml gel BT được bổ sung tiêm vào trong chỗ khuyết tật. Chất kháng sinh được sử dụng là Cefazolin ở mức liều tương đương với 5mgKg^{-1} phân phối bằng cách tiêm dưới da hai lần mỗi ngày trong tổng thời gian 3 ngày sau khi bị thương. Liều thứ nhất được dùng ngay trước khi mở ổ. Số liệu trước đó gợi ý rằng liều này sẽ dẫn đến việc giảm lượng vi khuẩn từ $\approx 10^6$ xuống $\approx 10^4$ và do đó vẫn cho phép đo được tác dụng tương đối của các BT khác nhau.

(c) *Đối chứng*

Sáu giờ sau khi cấy truyền *S. aureus*, vết thương được mở ổ và rửa bằng nước muối. Con vật đối chứng cũng được điều trị bằng Cefazolin theo chế độ nêu trên.

QUY TRÌNH:

Quy trình đối với mô hình tổn thương ở chuột in vivo được thực hiện như được mô tả bởi Chen *et al.* (2002 *J. Orthop. Res.* 20:142; 2005 *J. Orthop. Res.* 23:816; 2006 *J. Bone Joint Surg. Am.* 88:1510; 2007 *J. Orthop. Trauma* 21:693). Các con chuột được gây mê và chuẩn bị cho phẫu thuật. Mặt trước bên của thân xương đùi được bóc trần bằng đường rạch 3cm. Màng xương và cơ gắn liền được lột ra khỏi xương. Tấm polyaxetyl (27 x 4 x 4mm) được đặt trên bề mặt trước bên của xương đùi. Các tấm này đã được khoan sơ để vừa với các dây Kirschner có ren đường kính 0,9mm. Đế của các tấm này được tạo ra để vừa với đường viền của thân

xương đùi. Các lỗ dẫn hướng được khoan qua cả hai vỏ của xương đùi sử dụng tấm này làm đệm và dây Kirschner có ren được lồng vào qua tấm này và xương đùi. Các chỗ lõm cách 6mm trên tấm này có vai trò hướng dẫn để loại bỏ xương. Cưa dao động nhỏ được dùng để tạo khuyết tật trong khi mô được làm lạnh bằng cách rửa liên tục để cố gắng tránh bị tổn thương do nhiệt.

Một vài nhóm, mỗi nhóm 10 con vật được cấy truyền 1×10^5 CFU *S. aureus* và được điều trị bằng BT một mình hoặc kết hợp với các chất kháng sinh 6 giờ sau khi cấy truyền như được mô tả trên đây. Các nhóm này là như sau: gel Bis-EDT; gel MB-11; gel MB-8-2; gel Bis-EDT & Abx; gel MB-11 & Abx; gel MB-8-2 & Abx; đối chứng (Abx một mình).

Các con vật được làm chết êm ái 14 ngày sau khi phẫu thuật và xương và phần cứng được gửi đi phân tích vi sinh, kết quả của phép phân tích này được thể hiện trên Fig. 7.

Dựa trên việc phân tích năng lực, 10 con vật ở mỗi nhóm sẽ được truyền năng lực 80% để phát hiện 25% khác biệt giữa nhóm điều trị và nhóm đối chứng. Đây là với độ lệch chuẩn kỳ vọng là 35% và alpha bằng 0,05.

Như được thể hiện trên Fig. 7, kết hợp với Bis-EDT, MB-11 và MB-8-2, hoạt tính của chất kháng sinh Cefazolin được tăng cường so với một mình Cefazolin hoặc hợp chất Bis bất kỳ trong việc giảm mức nhiễm *S. aureus* ở xương bị tổn thương. Cefazolin kết hợp với MB-11 và MB-8-2 thể hiện hoạt tính của chất kháng sinh được tăng cường so với một mình Cefazolin trong việc giảm mức nhiễm *S. aureus* được phát hiện trên phần cứng. Bis-EDT không thể hiện có tác động đến hoạt tính của Cefazolin về khả năng này.

VÍ DỤ 12

Hoạt tính của hợp chất chứa bismut đối với sinh vật biển

Ví dụ này mô tả hoạt tính kháng vi sinh vật của hợp chất chứa bismut. Các trị số MIC của ba hợp chất chứa bismut, bismut dimercaprol (BisBAL), bismut

dimercaptotoluen (BisTOL), và bismut etandithiol (BisEDT), đối với ba loài vi khuẩn biển khác nhau được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp thường được chuyên gia trong lĩnh vực này thực hiện. Số liệu được thể hiện trong bảng sau.

BT Hợp chất ($\mu\text{g/ml}$)	BisBAL	BisTOL	BisEDT
<i>V. alginolyticus</i>	3,1	1	0,1
<i>H. marina</i>	17,5	7,2	2,6
<i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	2	0,4	.28

VÍ DỤ 13

Tác dụng của hợp chất chứa bismut đối với đặc tính định cư của hàu

Các hợp chất, BisBAL và BisTOL được đưa vào thử nghiệm để xác định hoạt tính ức chế của mỗi hợp chất đối với đặc tính định cư của ấu trùng hàu. Các phương pháp được thực hiện theo kỹ thuật được thực hành trong lĩnh vực này. BisBAL có EC_{50} (nồng độ tại đó có mức ức chế sự định cư 50%) là 1,6ppm, và BisTOL có EC_{50} là 15,4ppm. Theo thử nghiệm khác, BisEDT được hòa tan trực tiếp trong nước biển tự nhiên hoặc đầu tiên được hòa tan trong DMSO và sau đó được hòa tan trong nước biển tự nhiên. Các trị số đo EC_{50} không khác nhau về mặt thống kê. BisEDT có trị số EC_{50} là 1,5ppm khi được hòa tan trực tiếp trong nước biển và có trị số EC_{50} bằng 2,1ppm khi đầu tiên được hòa tan trong DMSO. EC_{50} của bioxit bán trên thị trường, SEANINE 211, là 0,5ppm.

VÍ DỤ 14

Tác dụng của hợp chất chứa bismut đối với sự định cư của tảo

Tác dụng của ba hợp chất chứa bismut, bismut dimercaprol (BisBAL), bismut dimercaptotoluen (BisTOL), và bismut etandithiol (BisEDT), đối với sự định cư của tảo được xác định, đặc biệt là khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử

Enteromorpha của mỗi hợp chất. Mỗi hợp chất được thử nghiệm ở các nồng độ 0,001, 0,01, 0,1, 1,0, và 10,0 μ g/ml. BisEDT là hợp chất hữu hiệu nhất; ở nồng độ 1 μ g/ml BisEDT, sự nảy mầm của khoảng 50% số bào tử tảo được ức chế, và ở nồng độ 10 μ g/ml, sự nảy mầm của khoảng 75% số bào tử tảo được ức chế. Tới 10 μ g/ml của BisBAL và BisTOL không có tác dụng ức chế đối với sự nảy mầm của các bào tử thuộc loài tảo đặc biệt này.

VÍ DỤ 15

Tác dụng của các hợp chất chứa bismut đối với sự định cư của tảo

Tác dụng của ba hợp chất chứa bismut, bismut dimercaprol (BisBAL), bismut dimercaptotoluen (BisTOL), và bismut etandithiol (BisEDT), đối với sự phát triển của tảo cát biển được xác định theo các kỹ thuật được thực hành trong lĩnh vực này. Việc định cư của tảo cát biển (số lượng tảo cát/hố) được ức chế bằng cách tăng nồng độ của mỗi hợp chất trong số ba hợp chất này (0,001, 0,01, 0,1, 1,0, và 10,0 μ g/ml). Mỗi hợp chất thể hiện hoạt tính ức chế ở nồng độ 0,1 μ g/ml; BisEDT có hoạt tính cao nhất, thể hiện mức ức chế gần 100%. Mỗi hợp chất trong số BisTOL và BisBAL thể hiện sự định cư của tảo cát biển khoảng 30% ở nồng độ 0,1 μ g/ml.

Tài liệu viện dẫn: Costerton et al., *Ann Rev Microbiol.* 1987; 41:435-64; Domenico et al., *Antimicrob Agents and Chemother.* 2001; 45(5):1417-21; Halwani et al., *Int J Pharm.* 2008; 358:278-84; Johnson et al., *Clin Infect Dis.* 2007; 45(4):409-415. ADA Council on Scientific Affairs. Direct and indirect restorative materials. *JADA* 2003;134:463-72. Alliance for Coastal Technologies (ACT). 2004. *Biofouling Prevention Technologies for Coastal Sensors/Sensor Platforms*. University of Maryland Center of Environmental Science, Workshop Proceedings, November 2003. UMCES Technical Report Series No. TS-426-04-CBL, Solomons, MD. Athanassiadis et al., *Aust Dent J* 2007;52:S64-82. Alt et al., *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4084-88. Bayston et al., *Biomaterials* 2009;30:3167-73. Bernardo et al., *JADA* 2007;138:775-783. Beytha et al., *J Dent* 2007;35:201-206. Bohner et al., *J*

Pharm Sci 1997;86:565-72. Bruxton, *Eng News* 1908;59,525; Chem. Abs., 2:2010. Bueno et al. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:e65-9. Cao et al. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2009;1:494. Centers for Disease Control and Prevention (US). Guidelines for infection control in dental health-care settings—2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2003 52(RR-17):1–61. Chandler et al., *Antimicrob. Agents Chemother* 1978;14:60–68. Chuard et al., *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:625–32. Chatterji S. *Cement Concrete Res* 1995;25:929-32. Clifton JC 2nd. *Pediatr Clin North Am* 2007;54:237–69. Codony et al., *J Applied Microbiol* 2003;95:288-93. Crane et al., *J Orthopaed Res* 2009;27:1008-15. De Lalla, *J Chemother.* 2001;13:48-53. Depaola et al., *J Am Dent Assoc.* 2002 Sep;133(9):1199-206; quiz 1260. Dezelic et al., *Oral Health Prev Dent* 2009;7:47-53. Domenico et al., *Canadian J. Microbiol.* 31:472-78 (1985). Domenico et al., *J Antimicrob Chemo* 1991;28:801-810. Domenico et al., *Infection* 20:66-72 (1992). Domenico et al., *Infect. Immun.* 62:4495-99 (1994). Domenico et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 38:1031-40 (1996). Domenico et al., *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1697-703. Domenico et al., *Infect Immun* 67:664-669 (1999). Domenico et al., 2000. *Infect Med* 17:123-127. Domenico et al., *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1417-21. Domenico et al., *Research Advances in Antimicrob Agents Chemother* 2003;3:79-85. Domenico et al., *J Antimicrob Chemo* 1991;28:801-810; Domenico et al., *Infection* 20:66-72 (1992); Domenico et al., *Infect. Immun.* 62:4495-99 (1994); Domenico et al., *J. Antimicrob. Chemother.* 38:1031-40 (1996); Domenico et al., *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1697-703; Domenico et al., *Infect Immun* 67:664-669 (1999); Domenico et al., 2000. *Infect Med* 17:123-127; Domenico et al., *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1417-21; Domenico et al., *Research Advances in Antimicrob Agents Chemother* 2003;3:79-85; Domenico et al., *J Antimicrob Chemo* 1991;28:801-810. Domenico et al., *Peptides* 2004.;25:2047-53; Domenico et al., 2005. *Antibiotics for Clinicians* 9:291-297. Dufrêne, *J Bacteriol* 2004;186:3283-85. Estefan et al., *Gen Dent* 2003;51:506-509. Feazel

et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(38):16393-9. Epub 2009 Sep 14. Fulmer et al., *J Materials Sci: Materials Med* 1992;3:299-305. Ganguli et al., *Smart Mater. Struct.* 2009;18:104027. Geesey et al., (eds) *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1994. Gottenbos et al., *Biomaterials* 2002;23:1417-23. Hamaguchi et al., *Jap J Pharmacol* 2000;83:273-76. Hu et al., Study on injectable and degradable cement of calcium sulphate and calcium phosphate for bone repair. *J Mater Sci Mater Med* 2009 Oct 13. [Epub ahead of print]. Huang et al., *J Antimicrob Chemother* 1999;44:601-605. Hwang et al., *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo* 2009;107:e96-102. Idachaba et al., *J Hazard Mater* 2002;90:279-95. Idachaba et al., *Waste Manag Res* 2001;19:284-91. Imazato, *Dent Materials* 2003;19:449. Issa et al., *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:553-65. Juhni et al., *Proceedings Annual Meeting Adhesion Society* 2005;28:179-181. Karchmer, Editorial Response: *Clin Infect Dis* 1998;27:714-16. Kavouras et al., *Inverteb Biol* 2005;122:138-51. Kumar et al., *Nature Materials* 2008;7:236-41. Leinfelder KF. *JADA* 2000;131:1186-87. Lobenhoffer et al., *J Orthopaedic Trauma* 2002;16:143-49. Mahony et al., 1999 *Antimicrob Agents Chemother* 43:582-88. Markarian J. Antimicrobials find new healthcare applications. *Plastics, Additives and Compounding* 2009;11:18-22. Masatoshi et al., Development of antimicrobial plastics by Ag or Cu coatings sprayed via high velocity air fuel process.-Evaluation of the antimicrobial activity of Cu or Ag-sprayed plastics- *Reports of the Shizuoka Industrial Research Institute of Shizuoka Prefecture* 2006;51:18-23. McDowell et al., *J Am Dent Assoc* 2004;135:799-805. Millsap et al., *Antonie Van Leeuwenhoek* 2001;79:337-43. Omoike et al., *Biomacromolecules* 2004;5:1219-30. Ouazzani et al., *Congrès* 2008;220:290-94. Ozdamar et al., *Retina* 1999;19:122-6. Piccirillo et al., *J Mater Chem* 2009;19:6167. Pitten et al., *Eur J Clin Pharmacol* 1999;55:95-100. Reunala et al., *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004;4:397-401. Rice et al., *Public Health Rep* 2006;121:270-74. Romo et al., *Environ Progress* 1999;18:107-12. Salo et al., *Infection* 23:371-77 (1995).

Saha et al., Cytokine modulation by bismuth-ethanedithiol in experimental sepsis. 10th Intl. Conf. Inflamm. Res. Assoc., Hot Springs, VA. Sawada et al., *JPRAS* 1990;43:78-82. Schultz, *J Fluids Eng* 2004;126:1039-47. Schultz MP, *Biofouling* 2007;23:331-41. Segreti et al., *Clin Infect Dis* 1998; 27:711 – 13. Sheffer, *Am J Infect Cont* 2005;33:S20-5. Siboni et al., *FEMS Microbiol Lett* 2007;274:24-29. Sidari et al. *J Am. Water Works Assoc* 2004;96:111-19. Soncini et al., *JADA* 2007;138:763-72. Steckelberg et al., Prosthetic joint infections. In: Bisno et al., eds. Infections associated with indwelling medical devices. 2nd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994:259 – 90. Stoodley et al., *Clin Orthop Relat Res* 2005;437:31-40. Stout, *ASHRAE J* Oct 2007. Tazaki K., *Canadian Mineralogist* 1992;30:431-34. Tiller et al., *Surface Coatings International Part B: Coatings Transactions* 2005;88:1-82. Trachtenberg et al., *J Dent Res* 2009;88:276-79. Tsuneda et al., *FEMS Microbiol Lett* 2003;223:287-92. Veloir et al., 2003, *J Antimicrob Chemother* 52: 915-19. Vu et al., *Molecules* 2009;14:2535-54. Widmer et al., *J Infect Dis* 1990; 162:96-102. Widmer et al., *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:741-46. Williams et al., *Compend Contin Educ Dent*. 1996;17:691-94. Wu et al., *Am J. Respir Cell Mol. Biol.* 26:731-38 (2002). Yan H, Li *J Ophthalmologica* 2008;222:245-48. Yeo et al., *Water Sci Technol* 2007;55:35-42. Zardus et al., *Biol Bull* 2008;214:91-98. Zarrabi et al., *J Oral Sci* 2009;51:437-42. Zgonis et al., *J Foot Ankle Surg* 2004;43:97-103. Zhang et al., 2005 *Digestive Dis Sci* 50:1046-51; Patent Mỹ số 6,582,719; U.S. RE37,793 ; Patent Mỹ số 6,248,371; Patent Mỹ số 6,086,921; Patent Mỹ số 6,380,248; Patent Mỹ số 6,582,719; Patent Mỹ số 6,380,248; Patent Mỹ số 6,875,453.

Các phương án khác nhau được mô tả trên đây có thể được kết hợp với nhau để tạo ra phương án khác. Tất cả các patent Mỹ, công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ, patent nước ngoài, đơn yêu cầu cấp patent nước ngoài và các công bố non-patent được viện dẫn trong phần mô tả này được đính kèm theo đây hoàn toàn bằng cách viện dẫn. Các khía cạnh của các phương án này

có thể được cải biến, nếu cần để sử dụng các khái niệm của các patent, các đơn yêu cầu cấp patent và các công bố để tạo ra các phương án khác nữa.

Các thay đổi này và các thay đổi khác có thể được thực hiện đối với các phương án dựa theo phần mô tả chi tiết trên đây. Nói chung, trong phần yêu cầu bảo hộ sau đây, các thuật ngữ được sử dụng sẽ không được hiểu là làm giới hạn các yêu cầu bảo hộ ở các phương án cụ thể được bộc lộ trong phần mô tả và phần yêu cầu bảo hộ. Do đó, yêu cầu bảo hộ không bị giới hạn bởi phần bộc lộ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp bảo vệ thực vật chống lại tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus, bao gồm:

cho thực vật tiếp xúc với lượng hữu hiệu của chế phẩm bismut-thiol (BT) trong điều kiện và thời gian đủ để thực hiện một hoặc nhiều yếu tố sau:

(i) ngăn chặn sự nhiễm tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus lên thực vật,

(ii) ức chế sự tồn tại tế bào hoặc sự sinh trưởng tế bào đối với hầu như toàn bộ các tế bào phù du của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus,

(iii) ức chế sự tạo thành màng sinh học bởi tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus, và

(iv) ức chế sự tồn tại màng sinh học hoặc sự phát triển màng sinh học của hầu như toàn bộ các tế bào tạo thành màng sinh học của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, nấm hoặc virus,

trong đó chế phẩm BT chứa huyền phù của các vi hạt hầu như là đơn phân tán chứa hợp chất BT không được micron hóa, nghiền hoặc xử lý lỏng siêu tới hạn, các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ 0,4µm đến 10µm.

trong đó chế phẩm BT chứa một hoặc nhiều hợp chất BT được chọn từ nhóm bao gồm BisBAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, Bis-DTT, Bis-2-mercaptoetanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, Bis-Pyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismut-1-mercapto-2-propanol, và Bis-EDT/2-hydroxy-1-propanthiol.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tác nhân gây bệnh là vi khuẩn bao gồm các tế bào *Erwinia amylovora*.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tác nhân gây bệnh là vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas campestris pv dieffenbachiae*, *Pseudomonas syringae*, *Xylella fastidiosa*; *Xylophylus ampelinus*; *Monilinia fructicola*, *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii*, *Ralstonia solanacearum*, và *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tác nhân gây bệnh là vi khuẩn có tính kháng chất kháng sinh.
5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tác nhân gây bệnh là vi khuẩn có tính kháng streptomycin.
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thực vật là cây lương thực.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó cây lương thực là cây ăn quả.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó cây ăn quả được chọn từ nhóm bao gồm cây táo, cây lê, cây đào, cây xuân đào, cây mận, cây mơ.
9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó cây ăn quả được chọn từ cây xuân đào.
10. Phương pháp theo điểm 6, trong đó cây lương thực là cây chuối giống *Musa*.
11. Phương pháp theo điểm 6, trong đó cây lương thực là cây được chọn từ cây thân củ, cây họ đậu, và cây ngũ cốc.
12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó cây thân củ được chọn từ nhóm bao gồm *Solanum tuberosum* (khoai tây), và *Ipomoea batatas* (khoai lang).
13. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước tiếp xúc được thực hiện một hoặc nhiều lần.
14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó ít nhất là một bước tiếp xúc bao gồm một trong số các công đoạn phun, ngâm, phủ và sơn thực vật.
15. Phương pháp theo điểm 13, trong đó ít nhất là một bước tiếp xúc được thực hiện ở hoa, đầu lá xanh hoặc vị trí sinh trưởng của thực vật.

16. Phương pháp theo điểm 13, trong đó ít nhất là một bước tiếp xúc được thực hiện trong vòng 72 giờ của thời kỳ nở hoa đầu tiên trên thực vật.

17. Phương pháp theo điểm 13, trong đó ít nhất là một bước tiếp xúc được thực hiện trong vòng 48 giờ của thời kỳ nở hoa đầu tiên trên thực vật.

18. Phương pháp theo điểm 13, trong đó ít nhất là một bước tiếp xúc được thực hiện trong vòng 24 giờ của thời kỳ nở hoa đầu tiên trên thực vật.

19. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cho thực vật này tiếp xúc với chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường, đồng thời hoặc lần lượt và theo thứ tự bất kỳ so với bước cho thực vật tiếp xúc với chế phẩm BT, trong đó nếu chế phẩm BT chứa bismut-ethandithiol (BisEDT), thì chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường không phải là tobramycin, nafcillin, gentamycin, clindamycin, gatifloxacin, minoxycilin, vancomycin hoặc cefazolin.

20. Phương pháp theo điểm 19, trong đó chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường bao gồm chất kháng sinh được chọn từ nhóm bao gồm chất kháng sinh aminoglycosit, chất kháng sinh carbapenem, chất kháng sinh cephalosporin, chất kháng sinh floquinolon, chất kháng sinh penicilin kháng penicilinaza, và chất kháng sinh aminopenicilin.

21. Phương pháp theo điểm 20, trong đó chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường là chất kháng sinh aminoglycosit được chọn từ nhóm bao gồm amikacin, arbekacin, gentamycin, kanamycin, neomycin, netilmicin, paromomycin, rhodostreptomycin, streptomycin, tobramycin và apramycin.

22. Phương pháp khắc phục tính kháng chất kháng sinh ở thực vật trong hoặc trên đó có mặt tác nhân gây bệnh cho thực vật là vi khuẩn kháng chất kháng sinh, bao gồm:

(a) cho thực vật tiếp xúc với lượng hữu hiệu của chế phẩm BT trong điều kiện và thời gian đủ để thực hiện một hoặc nhiều yếu tố sau:

(i) ngăn chặn thực vật nhiễm bệnh do tác nhân gây bệnh là vi khuẩn kháng chất kháng sinh,

(ii) ức chế sự tồn tại tế bào hoặc sự sinh trưởng tế bào đối với hầu như toàn bộ các tế bào phù du của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn kháng chất kháng sinh,

(iii) ức chế sự tạo thành màng sinh học bởi tác nhân gây bệnh là vi khuẩn kháng chất kháng sinh, và

(iv) ức chế sự tồn tại màng sinh học hoặc sự sinh trưởng màng sinh học của hầu như toàn bộ các tế bào tạo thành màng sinh học của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn kháng chất kháng sinh,

trong đó chế phẩm BT chứa huyền phù của các vi hạt hầu như là đơn phân tán chứa hợp chất BT không được micron hóa, nghiền hoặc xử lý lỏng siêu tới hạn, các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ 0,5 μ m đến 10 μ m; và

(b) cho thực vật này tiếp xúc với chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường, đồng thời hoặc lần lượt và theo thứ tự bất kỳ so với bước cho thực vật tiếp xúc với chế phẩm BT,

trong đó chế phẩm BT chứa một hoặc nhiều hợp chất BT được chọn từ nhóm bao gồm BisBAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, Bis-DTT, Bis-2-mercaptoethanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, Bis-Pyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismut-1-mercapto-2-propanol, và Bis-EDT/2-hydroxy-1-propanthiol,

và trong đó nếu chế phẩm BT chứa bismut-ethandithiol (BisEDT), thì chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường không phải là tobramycin, nafcillin, gentamycin, clindamycin, gatifloxacin, minoxycilin, vancomycin hoặc cefazolin.

23. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-18 hoặc 20-22, trong đó chế phẩm bismut-thiol chứa đa số vi hạt chứa hợp chất bismut-thiol (BT), các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ $0,4\mu\text{m}$ đến $5\mu\text{m}$ và được tạo ra bằng quy trình bao gồm các bước:

(a) trộn, trong điều kiện và thời gian đủ để thu được dung dịch không có chất kết tủa rắn, (i) dung dịch nước axit chứa muối bismut với nồng độ bismut ít nhất là 50mM và không có chất hòa tan ưa nước, phân cực hoặc hữu cơ, với (ii) etanol với lượng đủ để thu được hỗn hợp chứa etanol với lượng khoảng 25% thể tích; và

(b) bổ sung vào hỗn hợp thu được ở bước (a) dung dịch etanol chứa hợp chất chứa thiol để thu được dung dịch phản ứng, trong đó hợp chất chứa thiol có mặt trong dung dịch phản ứng với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:3 đến 3:1 tính theo bismut, trong điều kiện và thời gian đủ để tạo thành kết tủa, kết tủa này bao gồm các vi hạt chứa hợp chất BT.

24. Phương pháp theo điểm 19, trong đó chế phẩm bismut-thiol chứa đa số vi hạt chứa hợp chất bismut-thiol (BT), các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ $0,4\mu\text{m}$ đến $5\mu\text{m}$ và được tạo ra bằng quy trình bao gồm các bước:

(a) trộn, trong điều kiện và thời gian đủ để thu được dung dịch không có chất kết tủa rắn, (i) dung dịch nước axit chứa muối bismut với nồng độ bismut ít nhất là 50mM và không có chất hòa tan ưa nước, phân cực hoặc hữu cơ, với (ii) etanol với lượng đủ để thu được hỗn hợp chứa etanol với lượng khoảng 25% thể tích; và

(b) bổ sung vào hỗn hợp thu được ở bước (a) dung dịch etanol chứa hợp chất chứa thiol để thu được dung dịch phản ứng, trong đó hợp chất chứa thiol có mặt trong dung dịch phản ứng với tỷ lệ mol nằm trong khoảng từ 1:3 đến 3:1 tính theo bismut, trong điều kiện và thời gian đủ để tạo thành kết tủa, kết tủa này bao gồm các vi hạt chứa hợp chất BT.

25. Phương pháp theo điểm 23, trong đó muối bismut là $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$.
26. Phương pháp theo điểm 24, trong đó muối bismut là $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$.
27. Phương pháp theo điểm 23, trong đó dung dịch nước axit chứa bismut với lượng ít nhất là 5%, 10%, 15%, 20%, 22% hoặc 22,5% tính theo trọng lượng.
28. Phương pháp theo điểm 24, trong đó dung dịch nước axit chứa bismut với lượng ít nhất là 5%, 10%, 15%, 20%, 22% hoặc 22,5% tính theo trọng lượng.
29. Phương pháp theo điểm 23, trong đó dung dịch nước axit chứa axit nitric với lượng ít nhất là 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% hoặc 5% tính theo trọng lượng.
30. Phương pháp theo điểm 24, trong đó dung dịch nước axit chứa axit nitric với lượng ít nhất là 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% hoặc 5% tính theo trọng lượng.
31. Phương pháp theo điểm 23, trong đó hợp chất chứa thiol bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm 1,2-etan dithiol, 2,3-dimercaptopropanol, pyrithion, dithioerythritol, 3,4-dimercaptotoluen, 2,3-butandithiol, 1,3-propandithiol, 2-hydroxypropan thiol, 1-mercapto-2-propanol, dithioerythritol, axit alpha-lipoic, dithiothreitol, metanthiol (CH_3SH [m-mercaptan]), etanthiol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{SH}$ [e-mercaptan]), 1-propanthiol ($\text{C}_3\text{H}_7\text{SH}$ [n-P mercaptan]), 2-propanthiol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{SH})\text{CH}_3$ [2C₃ mercaptan]), butanthiol ($\text{C}_4\text{H}_9\text{SH}$ ([n-butyl mercaptan]), tert-butyl mercaptan ($\text{C}(\text{CH}_3)_3\text{SH}$ [t-butyl mercaptan]), pentanthiol ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{SH}$ [pentyl mercaptan]), coenzym A, lipoamit, glutathion, xystein, xystin, 2-mercaptoetanol, dithiothreitol, dithioerythritol, 2-mercaptoindol, transglutaminaza, (11-mercaptoundexyl)hexa(etylen glycol), (11-mercaptoundexyl)tetra(etylen glycol), các hạt nano vàng được tạo nhóm chức (11-mercaptoundexyl)tetra(etylen glycol), 1,1',4',1''-terphenyl-4-thiol, 1,11-undecandithiol, 1,16-hexadecandithiol, 1,2-etandithiol loại kỹ thuật, 1,3-propandithiol, 1,4-benzendimetanthiol, 1,4-butandithiol, 1,4-butandithiol diacetat, 1,5-pentandithiol, 1,6-hexandithiol, 1,8-octandithiol, 1,9-nonandithiol, adamantanthiol, 1-butanthiol, 1-decanthiol, 1-

dodecanthiol, 1-heptanthiol, 1-heptanthiol purum, 1-hexadecanthiol, 1-hexanthiol, 1-mercapto-(trietylen glycol), các hạt nano vàng được tạo nhóm chức 1-mercapto-(trietylen glycol) metyl ete, 1-mercapto-2-propanol, 1-nonanthiol, 1-octadecanthiol, 1-octanthiol, 1-octanthiol, 1-pentadecanthiol, 1-pentanthiol, 1-propanthiol, 1-tetradecanthiol, 1-tetradecanthiol purum, 1-undecanthiol, 11-(1*H*-pyrrol-1-yl)undecan-1-thiol, 11-amino-1-undecanthiol hydroclorua, 11-bromo-1-undecanthiol, 11-mercapto-1-undecanol, 11-mercapto-1-undecanol, axit 11-mercaptoundecanoic, axit 11-mercaptoundecanoic, 11-mercaptoundexyl trifloaxetat, axit 11-mercaptoundexylphosphoric, axit 12-mercaptododecanoic, axit 12-mercaptododecanoic, axit 15-mercaptopentadecanoic, axit 16-mercaptohexadecanoic, axit 16-mercaptohexadecanoic, 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perflodecanthiol, 2,2'-(etylendioxy)dietanthiol, 2,3-butandithiol, 2-butanthiol, 2-ethylhexanthiol, 2-metyl-1-propanthiol, 2-metyl-2-propanthiol, 2-phenyletanthiol, 3,3,4,4,5,5,6,6,6-nonaflor-1-hexanthiol purum, 3-(dimetoxymetylsilyl)-1-propanthiol, 3-clo-1-propanthiol, 3-mercapto-1-propanol, 3-mercapto-2-butanol, 3-mercapto-*N*-nonylpropionamit, axit 3-mercaptopropionic, silicagel được tạo nhóm chức 3-mercaptopropyl, 3-metyl-1-butanthiol, 4,4'-bis(mercaptometyl)biphenyl, 4,4'-dimercaptostilben, rượu 4-(6-mercaptohexyloxy)benzyl, 4-xyano-1-butanthiol, 4-mercapto-1-butanol, 6-(feroxenyl)hexanthiol, 6-mercapto-1-hexanol, axit 6-mercaptohexanoic, 8-mercapto-1-octanol, axit 8-mercaptooctanoic, 9-mercapto-1-nonanol, biphenyl-4,4'-dithiol, butyl 3-mercaptopropionat, đồng(I) 1-butanthiolat, xyclohexanthiol, xyclopentanthiol, các hạt nano bạc được tạo nhóm chức decanthiol, các hạt nano vàng được tạo nhóm chức dodecanthiol, các hạt nano bạc được tạo nhóm chức dodecanthiol, hexa(etylen glycol)mono-11-(axetylthio)undexyl ete, axit mercaptosucxinic, metyl 3-mercaptopropionat, nanoTether BPA-HH, NanoThinks™ 18, NanoThinks™ 8, NanoThinks™ ACID11, NanoThinks™ ACID16, NanoThinks™ ALCO11, NanoThinks™ THIO8, các hạt nano vàng được tạo nhóm chức octanthiol, PEG dithiol có trọng lượng phân tử trung bình M_n là 8.000, PEG dithiol có trọng lượng phân tử trung bình là 1.500, PEG dithiol có trọng lượng phân tử trung bình là 3.400, *S*-(11-bromoundexyl)thioaxetat, *S*-(4-xyanobutyl)thioaxetat, thiophenol, trietylen glycol

mono-11-mercaptoundexyl ete, trimetylolpropan tris(3-mercaptopropionat), [11-(metylcarbonylthio)undexyl]tetra(etylen glycol), *m*-carboran-9-thiol, *p*-terphenyl-4,4''-dithiol, *tert*-dodexylmercaptan, và *tert*-nonyl mercaptan.

32. Phương pháp theo điểm 24, trong đó hợp chất chứa thiol bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm 1,2-etan dithiol, 2,3-dimercaptopropanol, pyrrithion, dithioerythritol, 3,4-dimercaptotoluen, 2,3-butandithiol, 1,3-propandithiol, 2-hydroxypropan thiol, 1-mercapto-2-propanol, dithioerythritol, axit alpha-lipoic, dithiothreitol, metanthiol (CH_3SH [m-mercaptan]), etanthiol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{SH}$ [e-mercaptan]), 1-propanthiol ($\text{C}_3\text{H}_7\text{SH}$ [n-P mercaptan]), 2-propanthiol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{SH})\text{CH}_3$ [2C₃ mercaptan]), butanthiol ($\text{C}_4\text{H}_9\text{SH}$ ([n-butyl mercaptan]), *tert*-butyl mercaptan ($\text{C}(\text{CH}_3)_3\text{SH}$ [t-butyl mercaptan]), pentanthiol ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{SH}$ [pentyl mercaptan]), coenzym A, lipoamit, glutathion, xystein, xystin, 2-mercaptoetanol, dithiothreitol, dithioerythritol, 2-mercaptoindol, transglutaminaza, (11-mercaptoundexyl)hexa(etylen glycol), (11-mercaptoundexyl)tetra(etylen glycol), các hạt nano vàng được tạo nhóm chức (11-mercaptoundexyl)tetra(etylen glycol), 1,1',4',1''-terphenyl-4-thiol, 1,11-undecandithiol, 1,16-hexadecandithiol, 1,2-etandithiol loại kỹ thuật, 1,3-propandithiol, 1,4-benzendimetanthiol, 1,4-butandithiol, 1,4-butandithiol diaxetat, 1,5-pentandithiol, 1,6-hexandithiol, 1,8-octandithiol, 1,9-nonandithiol, adamantanthiol, 1-butanthiol, 1-decanthiol, 1-dodecanthiol, 1-heptanthiol, 1-heptanthiol purum, 1-hexadecanthiol, 1-hexanthiol, 1-mercapto-(trietylen glycol), các hạt nano vàng được tạo nhóm chức 1-mercapto-(trietylen glycol) metyl ete, 1-mercapto-2-propanol, 1-nonanthiol, 1-octadecanthiol, 1-octanthiol, 1-octanthiol, 1-pentadecanthiol, 1-pentanthiol, 1-propanthiol, 1-tetradecanthiol, 1-tetradecanthiol purum, 1-undecanthiol, 11-(1*H*-pyrrol-1-yl)undecan-1-thiol, 11-amino-1-undecanthiol hydroclorua, 11-bromo-1-undecanthiol, 11-mercapto-1-undecanol, 11-mercapto-1-undecanol, axit 11-mercaptoundecanoic, axit 11-mercaptoundecanoic, 11-mercaptoundexyl trifloaxetat, axit 11-mercaptoundexylphosphoric, axit 12-mercaptododecanoic, axit 12-mercaptododecanoic, axit 15-mercaptopentadecanoic, axit 16-mercaptohexadecanoic, axit 16-mercaptohexadecanoic, 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-perflodecanthiol, 2,2'-(etylendioxy)dietanthiol, 2,3-butandithiol, 2-butanthiol, 2-

ethylhexanthiol, 2-metyl-1-propanthiol, 2-metyl-2-propanthiol, 2-phenyletanthiol, 3,3,4,4,5,5,6,6,6-nonaflor-1-hexanthiol purum, 3-(dimetoxymetylsilyl)-1-propanthiol, 3-clo-1-propanthiol, 3-mercapto-1-propanol, 3-mercapto-2-butanol, 3-mercapto-*N*-nonylpropionamit, axit 3-mercaptopropionic, silicagel được tạo nhóm chức 3-mercaptopropyl, 3-metyl-1-butanthiol, 4,4'-bis(mercaptometyl)biphenyl, 4,4'-dimercaptostilben, rượu 4-(6-mercaptohexyloxy)benzyl, 4-xyano-1-butanthiol, 4-mercapto-1-butanol, 6-(feroxenyl)hexanthiol, 6-mercapto-1-hexanol, axit 6-mercaptohexanoic, 8-mercapto-1-octanol, axit 8-mercaptooctanoic, 9-mercapto-1-nonanol, biphenyl-4,4'-dithiol, butyl 3-mercaptopropionat, đồng(I) 1-butanthiolat, xyclohexanthiol, xyclopentanthiol, các hạt nano bạc được tạo nhóm chức decanthiol, các hạt nano vàng được tạo nhóm chức dodecanthiol, các hạt nano bạc được tạo nhóm chức dodecanthiol, hexa(etylen glycol)mono-11-(axetylthio)undexyl ete, axit mercaptosuccinic, metyl 3-mercaptopropionat, nanoTether BPA-HH, NanoThinks™ 18, NanoThinks™ 8, NanoThinks™ ACID11, NanoThinks™ ACID16, NanoThinks™ ALCO11, NanoThinks™ THIO8, các hạt nano vàng được tạo nhóm chức octanthiol, PEG dithiol có trọng lượng phân tử trung bình M_n là 8.000, PEG dithiol có trọng lượng phân tử trung bình là 1.500, PEG dithiol có trọng lượng phân tử trung bình là 3.400, *S*-(11-bromoundexyl)thioaxetat, *S*-(4-xyanobutyl)thioaxetat, thiophenol, trietylen glycol mono-11-mercaptoundexyl ete, trimetylolpropan tris(3-mercaptopropionat), [11-(metylcarbonylthio)undexyl]tetra(etylen glycol), *m*-carboran-9-thiol, *p*-terphenyl-4,4''-dithiol, *tert*-dodexylmercaptan, và *tert*-nonyl mercaptan.

33. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-18 hoặc 20-22, trong đó tác nhân gây bệnh là vi khuẩn bao gồm ít nhất là một trong số:

- (i) một hoặc nhiều vi khuẩn gram âm;
- (ii) một hoặc nhiều vi khuẩn gram dương;
- (iii) một hoặc nhiều vi khuẩn nhạy với chất kháng sinh;
- (iv) một hoặc nhiều vi khuẩn kháng chất kháng sinh;

(v) tác nhân gây bệnh là vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), MRSA (*S. aureus* kháng methixilin), *Staphylococcus epidermidis*, MRSE (*S. epidermidis* kháng methixilin), *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa* kháng thuốc, *Escherichia coli*, *E. coli* sinh độc tố ruột, *E. coli* gây xuất huyết ruột, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecalis* nhạy với methixilin, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholera*, *Shigella flexneri*, *Enterococcus* kháng vancomycin (VRE), phức hợp *Burkholderia cepacia*, *Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* kháng penicilin, *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Mycobacterium smegmatis* và *Acinetobacter baumannii*.

34. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 19, trong đó tác nhân gây bệnh là vi khuẩn bao gồm ít nhất là một trong số:

- (i) một hoặc nhiều vi khuẩn gram âm;
- (ii) một hoặc nhiều vi khuẩn gram dương;
- (iii) một hoặc nhiều vi khuẩn nhạy với chất kháng sinh;
- (iv) một hoặc nhiều vi khuẩn kháng chất kháng sinh;

(v) tác nhân gây bệnh là vi khuẩn được chọn từ nhóm bao gồm *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), MRSA (*S. aureus* kháng methixilin), *Staphylococcus epidermidis*, MRSE (*S. epidermidis* kháng methixilin), *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa* kháng thuốc, *Escherichia coli*, *E. coli* sinh độc tố ruột, *E. coli* gây xuất huyết ruột, *Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecalis* nhạy với methixilin, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*,

Yersinia enterocolitica, *Vibrio cholera*, *Shigella flexneri*, *Enterococcus* kháng vancomycin (VRE), phức hợp *Burkholderia cepacia*, *Francisella tularensis*, *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pneumonia* kháng penixilin, *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia multivorans*, *Mycobacterium smegmatis* và *Acinetobacter baumannii*.

35. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-18 hoặc 20-22, phương pháp này bao gồm bước cho thực vật tiếp xúc với ít nhất một trong (i) chất kháng sinh tác dụng đồng vận và (ii) chất kháng sinh tăng cường hiệu quả kháng vi sinh vật hợp tác, đồng thời hoặc liên tiếp và theo thứ tự bất kỳ so với bước cho bề mặt tiếp xúc với chế phẩm BT, trong đó nếu chế phẩm BT chứa bismut-ethandithiol (BisEDT), thì chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường không phải là tobramycin, nafcillin, gentamycin, clindamycin, gatifloxacin, minoxycycline, vancomycin hoặc cefazolin.

36. Phương pháp theo điểm 19, phương pháp này bao gồm bước cho thực vật tiếp xúc với ít nhất một trong (i) chất kháng sinh tác dụng đồng vận và (ii) chất kháng sinh tăng cường hiệu quả kháng vi sinh vật hợp tác, đồng thời hoặc liên tiếp và theo thứ tự bất kỳ so với bước cho bề mặt tiếp xúc với chế phẩm BT.

37. Phương pháp theo điểm 35, trong đó chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc chất kháng sinh tăng cường hiệu quả kháng vi sinh vật hợp tác bao gồm chất kháng sinh được chọn từ nhóm bao gồm chất kháng sinh aminoglycosit, chất kháng sinh carbapenem, chất kháng sinh cephalosporin, chất kháng sinh floquinolon, chất kháng sinh glycopeptit, chất kháng sinh lincosamit, chất kháng sinh penixilin kháng penixilinaza, và chất kháng sinh aminopenixilin.

38. Phương pháp theo điểm 36, trong đó chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc chất kháng sinh tăng cường hiệu quả kháng vi sinh vật hợp tác bao gồm chất kháng sinh được chọn từ nhóm bao gồm chất kháng sinh aminoglycosit, chất kháng sinh carbapenem, chất kháng sinh cephalosporin, chất kháng sinh floquinolon, chất

kháng sinh glycopeptit, chất kháng sinh lincosamit, chất kháng sinh penixilin kháng penixilinaza, và chất kháng sinh aminopenixilin.

39. Phương pháp theo điểm 37, trong đó chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc chất kháng sinh tăng cường hiệu quả kháng vi sinh vật hợp tác là chất kháng sinh aminoglycosit được chọn từ nhóm bao gồm amikaxin, arbekaxin, gentamixin, kanamycin, neomycin, netilmixin, paromomycin, rhodostreptomycin, streptomycin, tobramycin và apramycin.

40. Phương pháp theo điểm 38, trong đó chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc chất kháng sinh tăng cường hiệu quả kháng vi sinh vật hợp tác là chất kháng sinh aminoglycosit được chọn từ nhóm bao gồm amikaxin, arbekaxin, gentamixin, kanamycin, neomycin, netilmixin, paromomycin, rhodostreptomycin, streptomycin, tobramycin và apramycin.

41. Phương pháp khắc phục tính kháng chất kháng sinh ở thực vật mà tác nhân gây bệnh là vi khuẩn kháng chất kháng sinh đã có mặt ở trên hoặc trong thực vật này, bao gồm các bước:

cho thực vật tiếp xúc đồng thời hoặc liên tiếp và theo thứ tự bất kỳ với lượng hữu hiệu của (1) ít nhất một chế phẩm bismut-thiol (BT) và (2) ít nhất là một chất kháng sinh mà có thể tăng cường hoặc tác dụng đồng vận với ít nhất là một chế phẩm BT, trong điều kiện và thời gian đủ để thực hiện một hoặc nhiều yếu tố sau:

(i) ngăn chặn sự nhiễm bệnh của thực vật do tác nhân gây bệnh là vi khuẩn gây ra,

(ii) ức chế sự tồn tại tế bào hoặc sự sinh trưởng tế bào đối với hầu như toàn bộ các tế bào phù du của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn,

(iii) ức chế sự tạo thành màng sinh học bởi tác nhân gây bệnh là vi khuẩn, và

(iv) ức chế sự tồn tại màng sinh học hoặc sự sinh trưởng màng sinh học của hầu như toàn bộ các tế bào tạo thành màng sinh học của tác nhân gây bệnh là vi khuẩn,

trong đó chế phẩm BT chứa đa số vi hạt chứa hợp chất bismut-thiol (BT), hầu như tất cả các vi hạt này có đường kính trung bình thể tích nằm trong khoảng từ 0,4 μ m đến 5 μ m; và nhờ đó khắc phục được tính kháng chất kháng sinh trên bề mặt mô biểu mô.

trong đó chế phẩm BT chứa một hoặc nhiều hợp chất BT được chọn từ nhóm bao gồm BisBAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, Bis-DTT, Bis-2-mercaptoetanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, Bis-Pyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismut-1-mercapto-2-propanol, và Bis-EDT/2-hydroxy-1-propanthiol,

và trong đó nếu chế phẩm BT chứa bismut-ethandithiol (BisEDT), thì chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường không phải là tobramycin, nafcillin, gentamycin, clindamycin, gatifloxacin, minoxycilin, vancomycin hoặc cefazolin.

42. Phương pháp theo điểm 41, trong đó tác nhân gây bệnh là vi khuẩn có tính kháng chất kháng sinh, chất kháng sinh này được chọn từ nhóm bao gồm methixilin, vancomycin, nafcilin, gentamixin, ampixilin, cloramphenicol, doxyxyclin, tobramycin, clindamixin và gatifloxacin.

43. Phương pháp theo điểm 41, trong đó chế phẩm BT chứa một hoặc nhiều hợp chất BT được chọn từ nhóm bao gồm BisBAL, BisEDT, Bis-dimercaprol, Bis-DTT, Bis-2-mercaptoetanol, Bis-DTE, Bis-Pyr, Bis-Ery, Bis-Tol, Bis-BDT, Bis-PDT, Bis-Pyr/Bal, Bis-Pyr/BDT, Bis-Pyr/EDT, Bis-Pyr/PDT, Bis-Pyr/Tol, Bis-Pyr/Ery, bismut-1-mercapto-2-propanol, và Bis-EDT/2-hydroxy-1-propanthiol.

44. Phương pháp theo điểm 43, trong đó chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường bao gồm chất kháng sinh được chọn từ nhóm bao gồm clindamixin, gatifloxacin, chất kháng sinh aminoglycosit, chất kháng sinh carbapenem, chất

kháng sinh cephalosporin, chất kháng sinh floquinolon, chất kháng sinh penixilin kháng penixilinaza, và chất kháng sinh aminopenixilin.

45. Phương pháp theo điểm 44, trong đó chất kháng sinh tác dụng đồng vận hoặc tăng cường là chất kháng sinh aminoglycosit được chọn từ nhóm bao gồm amikaxin, arbekaxin, gentamixin, kanamixin, neomixin, netilmixin, paromomixin, rhodostreptomixin, streptomixin, tobramixin và apramixin.

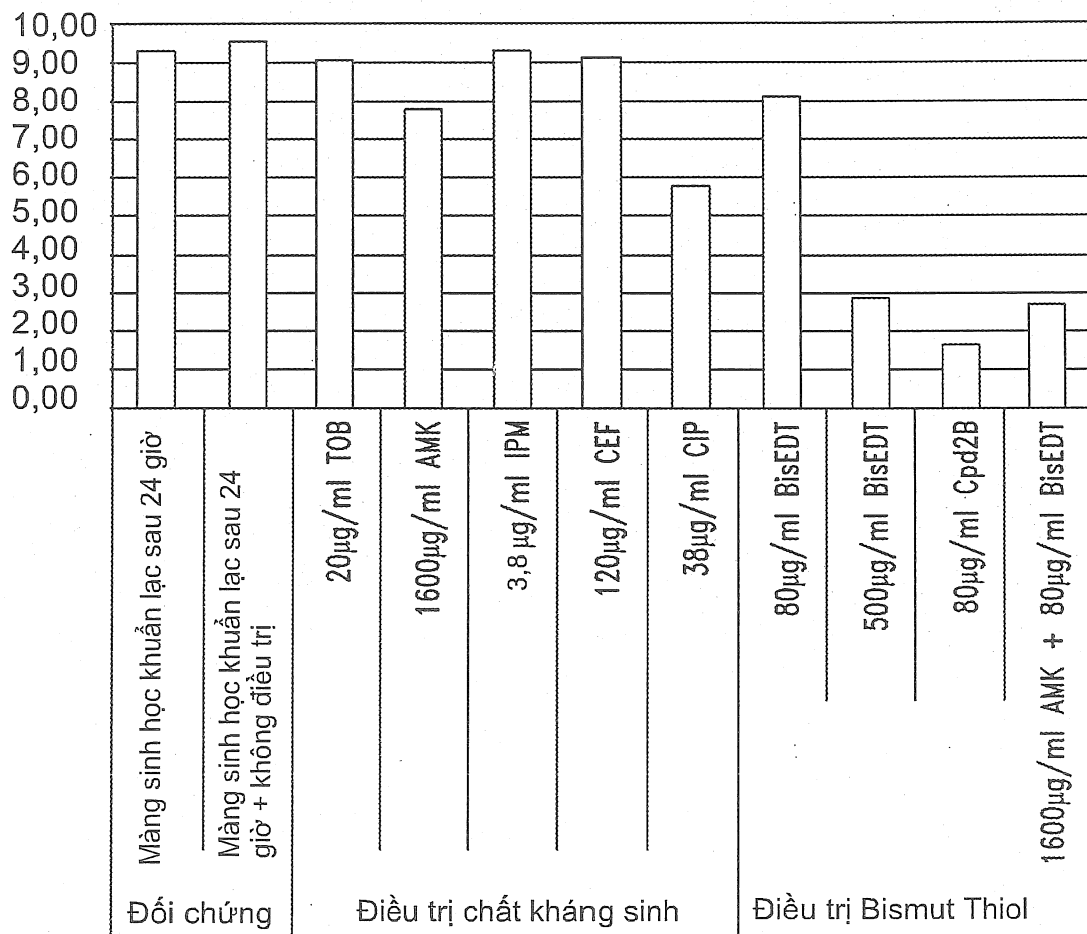


FIG. 1

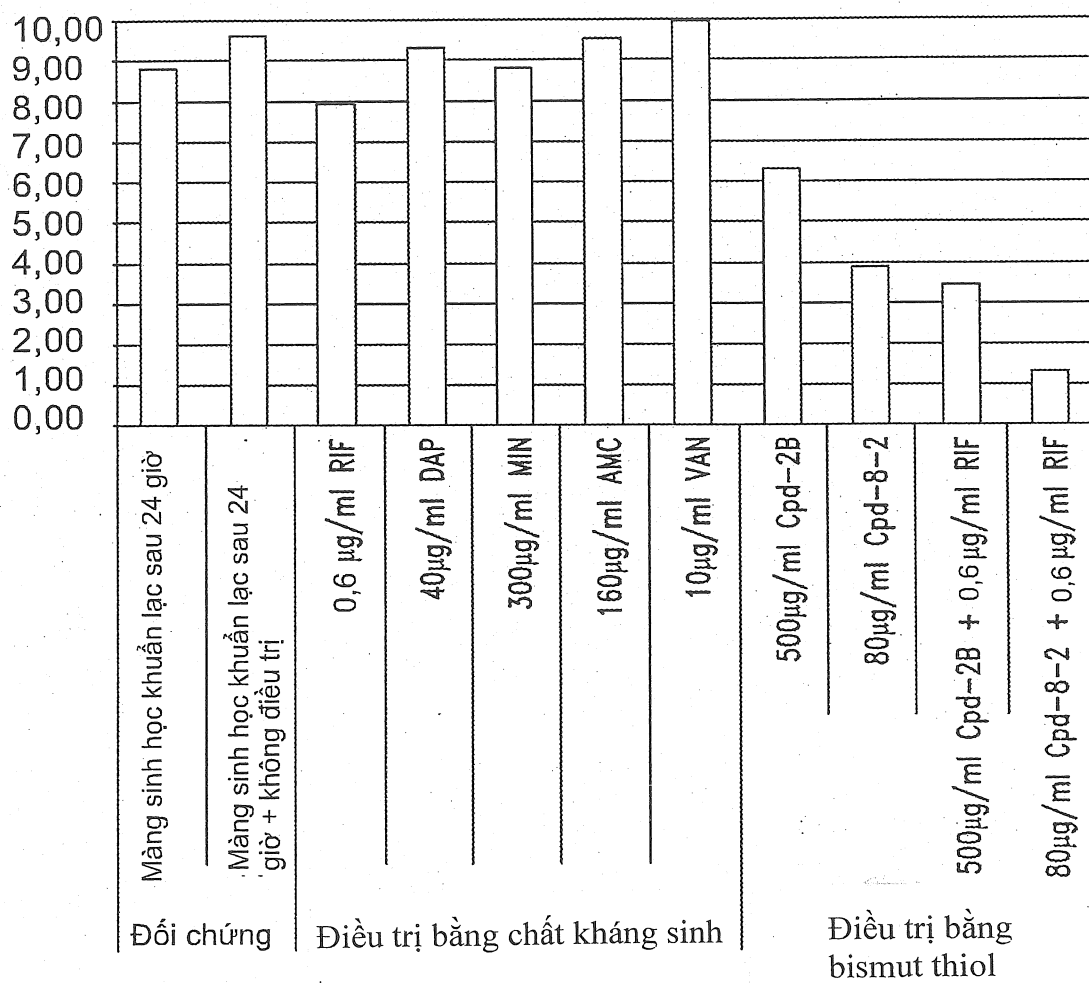


FIG. 2

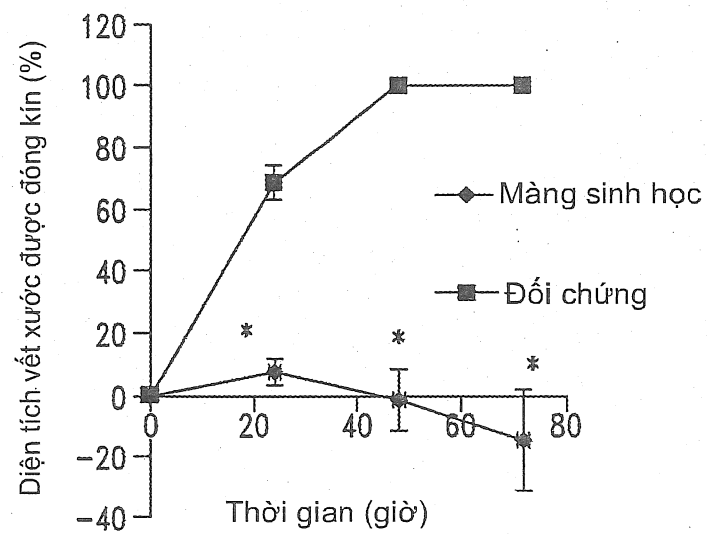


FIG. 3

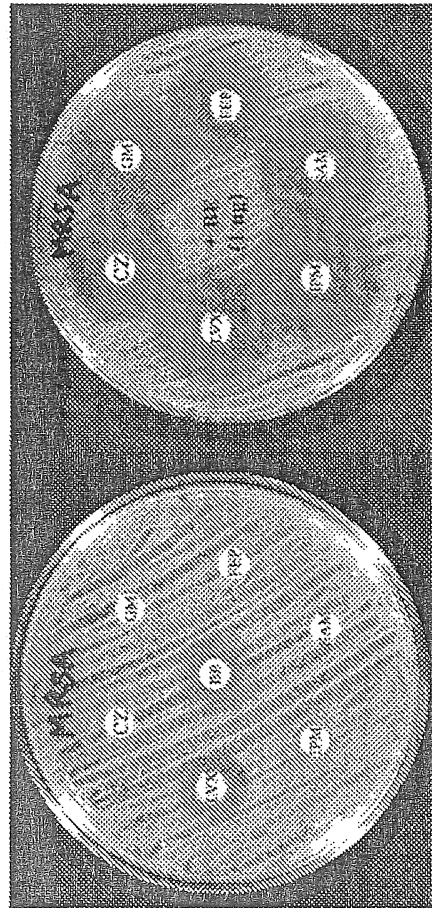
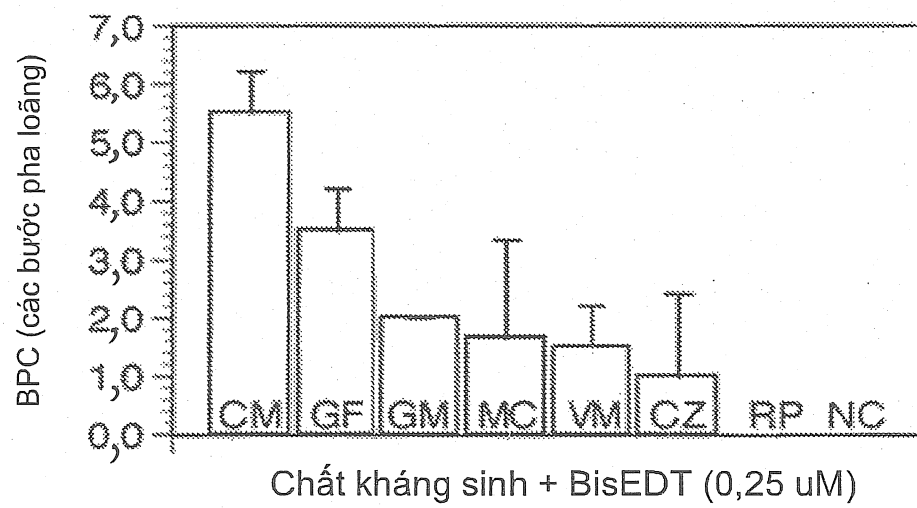


FIG. 4A

FIG. 4B

*FIG. 5*

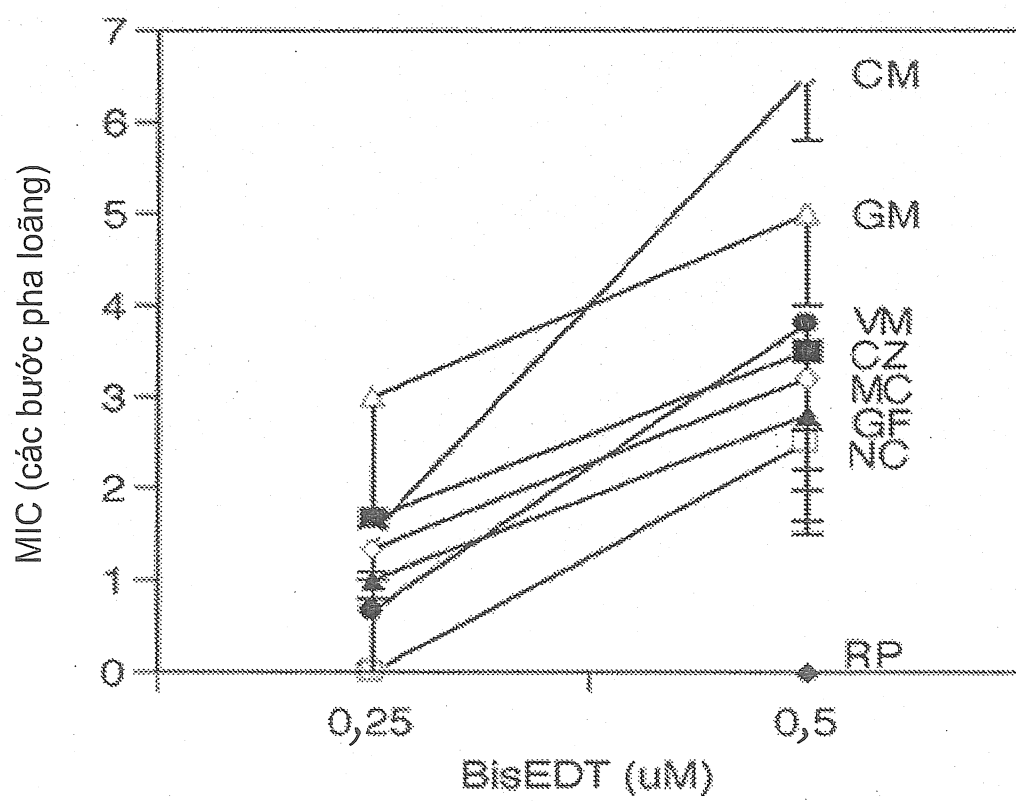


FIG. 6

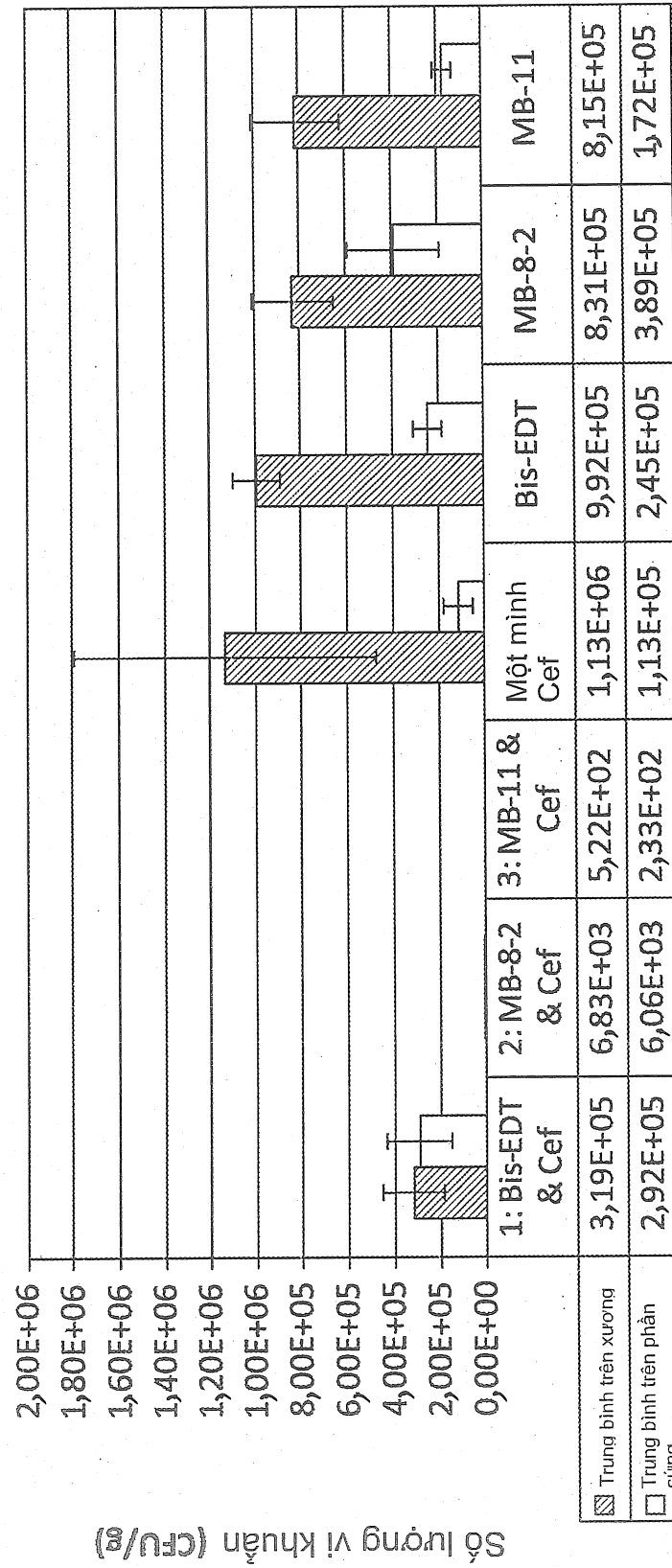


FIG. 7