



(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) 
1-0022303

(51)⁷ **C12Q 1/00, G01N 33/569, 33/535, 33/52,** (13) **B**
33/53

(21) 1-2012-00171

(22) 08.07.2010

(86) PCT/US2010/041396 08.07.2010

(87) WO2011/005982 13.01.2011

(30) 61/223,755 08.07.2009 US

(45) 25.11.2019 380

(43) 25.02.2013 299

(73) ALLTECH, INC. (US)

3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, Kentucky 40356, United States of America

(72) DAWSON, Karl, A. (US), MORAN, Colm (IE), APAJALAHTI, Juha (FI),
LAURAEUS, Marko (FI)

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

(54) **PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH SỰ BÁM DÍNH VÀ CHỐNG BÁM DÍNH CỦA VI
KHUẨN VÀO CHẤT NHÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp xác định và nhận diện sự bám dính và
chống bám dính của vi khuẩn vào chất nhày, tế bào biểu mô và các tế bào khác.

Cụ thể, sáng chế đề xuất phương pháp xác định sự bám dính và chống bám dính
của vi khuẩn vào chất nhày.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nói chung, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện, nhận diện và xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày và tế bào biểu mô. Cụ thể, sáng chế đề cập đến thử nghiệm dùng để phát hiện và nhận diện sự bám dính hoặc không bám dính của vi khuẩn vào chất nhày (tế bào biểu mô (ví dụ, có mặt trong ruột)) hoặc phần khác của động vật mà trong đó có thể có mặt vi khuẩn, và phương pháp nhận diện và xác định đặc điểm (ví dụ, công hiệu) của tác nhân điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày và tế bào biểu mô hoặc phần khác của động vật mà trong đó có thể có mặt vi khuẩn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tế bào biểu mô trong ruột non, đường hô hấp, đường tiết niệu và đường sinh sản của động vật được bao phủ bởi lớp chất nhày tương đối dày có chứa mucin, nhiều protein nhỏ gắn liền, glycoprotein, lipid và glycolipit. Tế bào biểu mô và chất nhày chứa thụ thể nhận biết protein bám dính vi khuẩn đặc hiệu. Sự bám dính hoặc sự liên kết chặt chẽ của vi khuẩn vào tế bào biểu mô có thể góp phần vào sự cư trú cũng như khả năng gây bệnh của vi khuẩn. Ngoài ra, sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày của ruột và biểu mô đường như đóng vai trò quan trọng đối với sự ổn định cá thể trong khu hệ vi khuẩn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế nhìn chung đề cập đến phương pháp phát hiện, nhận diện và xác định sự bám dính và chống bám dính của vi khuẩn vào chất nhày và tế bào (ví dụ, tế bào biểu mô). Cụ thể, sáng chế đề xuất thử nghiệm dùng để phát hiện và nhận diện sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày (ví dụ, màng niêm mạc ruột) và tế bào biểu mô, và phương pháp nhận diện tác nhân điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày và tế bào biểu mô. Thử nghiệm này là phi phóng xạ, an toàn về mặt vi sinh, đồng thời cũng ổn định, dễ vận chuyển và dễ bảo quản.

Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất bộ kit gồm thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme linked immunosorbent assay - ELISA) phi phóng xạ để thử nghiệm về sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày và/hoặc tế bào biểu mô. Bộ kit này không bị giới hạn ở các thành phần cụ thể. Theo một số phương án, bộ kit gồm nền rắn có phủ chất nhày hoặc tế bào biểu mô trên đó, mẫu chứa vi khuẩn, kháng thể sơ cấp đặc hiệu với vi khuẩn và kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện được đặc hiệu với kháng thể sơ cấp liên kết vi khuẩn. Theo một số phương án, bộ kit gồm cơ chất cho phép hiển thị kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện được. Theo một số phương án, kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện được chứa chất đánh dấu enzym. Theo một số phương án, cơ chất là hợp phần tạo ra tín hiệu so màu, đo huỳnh quang hoặc phát quang hóa học trong điều kiện có chất đánh dấu enzym. Theo một số phương án, kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện được là globulin miễn dịch kháng IgG ở lợn liên hợp với peroxidaza. Theo một số phương án, hợp phần so màu là 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin. Theo một số phương án, nền rắn là đĩa có 96 giếng. Theo một số phương án, vi khuẩn là vi khuẩn *E. coli*. Ví dụ về chất nhày bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất nhày ruột hồi cận tâm của lợn, chất nhày ruột kết xa tâm của lợn, chất nhày ruột tá của gà giò và chất nhày ruột tịt của gà giò. Ví dụ về kháng thể sơ cấp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể đa dòng liên hợp HRP đặc hiệu với typ huyết thanh kháng nguyên O và K của *E. coli*, kháng thể đa dòng đặc hiệu với typ huyết thanh kháng nguyên O và K của *E. coli*. Ví dụ về kháng thể thứ cấp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể liên hợp HRP ở thỏ kháng IgG của dê đã tinh chế ái lực, kháng thể liên hợp AP ở thỏ kháng IgG của dê đã tinh chế ái lực, kháng thể đa dòng liên hợp FITC hướng đích IgG của dê (H&L), streptavidin-phosphatase kiềm từ *Streptomyces avidinii* và streptavidin-peroxidaza từ *Streptomyces avidinii*.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp xác định sự bám dính và chống bám dính của vi khuẩn vào chất nhày và của vi khuẩn vào tế bào biểu mô. Phương pháp này không bị giới hạn ở kỹ thuật cụ thể để xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày và của vi khuẩn vào tế bào

biểu mô. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước cung cấp mẫu chứa vi khuẩn và chất nhày, và bước kết hợp mẫu chứa vi khuẩn và chất nhày này trong thử nghiệm so màu phi phóng xạ trong điều kiện sao cho xác định được sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Theo một số phương án, thử nghiệm so màu phi phóng xạ là thử nghiệm ELISA. Theo một số phương án, điều kiện bao gồm bổ sung kháng thể sơ cấp đặc hiệu với vi khuẩn liên kết chất nhày, tế bào biểu mô hoặc các tế bào khác, và bổ sung kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện được đặc hiệu với kháng thể sơ cấp liên kết vi khuẩn. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm bước bổ sung cơ chất cho phép hiển thị kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện được liên kết với kháng thể sơ cấp. Theo một số phương án, chất nhày được phủ lên đĩa vi chuẩn độ. Theo một số phương án, kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện được chứa chất đánh dấu enzym. Theo một số phương án, cơ chất là hợp phần tạo ra tín hiệu so màu, đo huỳnh quang hoặc phát quang hóa học trong điều kiện có chất đánh dấu enzym. Theo một số phương án, kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện được là globulin miễn dịch kháng IgG ở lợn liên hợp với peroxidaza. Theo một số phương án, hợp phần so màu là 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin. Theo một số phương án, vi khuẩn là vi khuẩn *E. coli*. Phương pháp này không bị giới hạn ở kháng thể sơ cấp hoặc kháng thể thứ cấp cụ thể. Theo một số phương án, ví dụ về kháng thể sơ cấp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể đa dòng liên hợp HRP đặc hiệu với typ huyết thanh kháng nguyên O và K của *E. coli* và kháng thể đa dòng đặc hiệu với typ huyết thanh kháng nguyên O và K của *E. coli*. Ví dụ về kháng thể thứ cấp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể liên hợp HRP ở thỏ kháng IgG của dê đã tinh chế ái lực, kháng thể liên hợp AP ở thỏ kháng IgG của dê đã tinh chế ái lực, kháng thể đa dòng liên hợp FITC hướng đích IgG của dê (H&L), streptavidin-phosphatase kiềm từ *Streptomyces avidinii* và streptavidin-peroxidaza từ *Streptomyces avidinii*.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất phương pháp nhận diện tác nhân điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày, bao gồm bước cung cấp mẫu chứa vi khuẩn, chất nhày và tác nhân, và bước kết hợp mẫu chứa

vi khuẩn, chất nhày và tác nhân này trong thử nghiệm so màu phi phóng xạ trong điều kiện sao cho xác định được sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Phương pháp này còn bao gồm bước so sánh sự bám dính của vi khuẩn trong điều kiện có và không có tác nhân, và bước nhận diện tác nhân là tác nhân điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày nếu sự bám dính xác định được cao hơn hoặc thấp hơn so với sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày trong điều kiện không có tác nhân. Theo một số phương án, thử nghiệm so màu phi phóng xạ là thử nghiệm ELISA. Theo một số phương án, điều kiện bao gồm bổ sung kháng thể sơ cấp đặc hiệu với vi khuẩn liên kết chất nhày. Theo một số phương án, điều kiện bao gồm bổ sung kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện được đặc hiệu với kháng thể sơ cấp liên kết vi khuẩn. Theo một số phương án, điều kiện bao gồm bổ sung cơ chất cho phép hiển thị kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện được liên kết với kháng thể sơ cấp. Theo một số phương án, chất nhày được phủ lên đĩa vi chuẩn độ. Theo một số phương án, kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện được chứa chất đánh dấu enzym. Theo một số phương án, cơ chất là hợp phần tạo ra tín hiệu so màu, đo huỳnh quang hoặc phát quang hóa học trong điều kiện có chất đánh dấu enzym. Theo một số phương án, kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện được bao gồm globulin miễn dịch kháng IgG ở lợn liên hợp với peroxidaza. Theo một số phương án, hợp phần so màu là 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin. Theo một số phương án, vi khuẩn là vi khuẩn *E. coli*. Ví dụ về kháng thể sơ cấp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể đa dòng liên hợp HRP đặc hiệu với typ huyết thanh kháng nguyên O và K của *E. coli*, kháng thể đa dòng đặc hiệu với typ huyết thanh kháng nguyên O và K của *E. coli*. Ví dụ về kháng thể thứ cấp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể liên hợp HRP ở thỏ kháng IgG của dê đã tinh chế ái lực, kháng thể liên hợp AP ở thỏ kháng IgG của dê đã tinh chế ái lực, kháng thể đa dòng liên hợp FITC hướng đích IgG của dê (H&L), streptavidin-phosphataza kiềm từ *Streptomyces avidinii* và streptavidin-peroxidaza từ *Streptomyces avidinii*. Theo một số phương án, tác nhân được chọn từ danh sách bao gồm phân tử có trong tự nhiên, phân tử thu được bằng cách tổng hợp và phân tử thu được theo cách tái

tổ hợp.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất hợp phần chứa tác nhân là tác nhân điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày, trong đó tác nhân này được nhận diện thông qua quy trình bao gồm các bước: cung cấp i) mẫu chứa vi khuẩn, ii) chất nhày, iii) tác nhân; kết hợp mẫu chứa vi khuẩn, chất nhày và tác nhân này trong thử nghiệm so màu phi phóng xạ trong điều kiện sao cho xác định được sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày; so sánh sự bám dính của vi khuẩn trong điều kiện có và không có tác nhân; và nhận diện tác nhân là tác nhân điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày nếu sự bám dính xác định được cao hơn hoặc thấp hơn so với sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày trong điều kiện không có tác nhân. Theo một số phương án, hợp phần này được đưa vào thức ăn được tạo ra để cho đối tượng được chọn từ nhóm bao gồm vật nuôi, động vật bầu bạn, cá và động vật vỏ giáp dùng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện mức độ ảnh hưởng của nồng độ chất nhày (mg protein/ml) đối với sự bám dính của *E. coli* ALI 84 và AL1446, như được xác định bằng vi khuẩn được đánh dấu phóng xạ.

Fig.2 thể hiện mức độ ảnh hưởng của các kháng thể sơ cấp đối với sự bám dính của *E. coli* AL184, như được xác định bằng máy đếm độ nháy với vi khuẩn được đánh dấu phóng xạ. Các kháng thể sơ cấp: HRP = kháng thể liên hợp HRP kháng *E. coli*; BP2022 = kháng thể không liên hợp kháng *E. coli*, Biotin = kháng thể liên hợp biotin kháng *E. coli*.

Fig.3 thể hiện mức độ ảnh hưởng của các kháng thể sơ cấp đối với sự bám dính của *E. coli* AL1446, như được xác định bằng máy đếm độ nháy với vi khuẩn được đánh dấu phóng xạ. Các kháng thể sơ cấp: HRP = kháng thể liên hợp HRP kháng *E. coli*; BP2022 = kháng thể không liên hợp kháng *E. coli*, Biotin = kháng thể liên hợp biotin kháng *E. coli*.

Fig.4 thể hiện sự hiện màu của ba cơ chất ELISA 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) khác nhau khi được ủ với vi khuẩn *E. coli* (chủng AL184 và AL1446).

Fig.5 thể hiện sự hiện màu của cơ chất ELISA p-nitrophenyl phosphat (pNPP) và 2,2'-azino-bis(axit 3etylbenzothiazolin-6-sulfonic) (AzBTS) khi được ủ với chủng *E. coli* AL184 và AL1446. E = chất tăng cường vi giếng ABTS.

Fig.6 thể hiện sự hiện màu của các cơ chất ELISA khác nhau khi được ủ trong các giếng có phủ chất nhày. Ảnh được chụp tại thời điểm 60 phút, tín hiệu yếu được quan sát thấy trong sáu giếng dương tính (màu vàng) tại thời điểm 15 phút.

Fig.7 thể hiện sự bố trí đĩa khi thử nghiệm sự liên kết không đặc hiệu của các kháng thể vào chất nhày hoặc đĩa. BP2022 = kháng thể sơ cấp kháng *E. coli*; BP2022HRP = kháng thể sơ cấp liên hợp peroxidaza kháng *E. coli*; Biotin = kháng thể sơ cấp liên hợp biotin kháng *E. coli*; HRP = kháng thể thứ cấp liên hợp peroxidaza; StrHRP = streptavidin liên hợp peroxidaza; AP = kháng thể thứ cấp liên hợp phosphataza kiềm; StrAP = kháng thể thứ cấp liên hợp streptavidin. Không có vi khuẩn nào được sử dụng trong thử nghiệm này.

Fig.8 thể hiện sự liên kết của các kháng thể vào chất nhày hoặc đĩa. Sự bố trí đĩa được mô tả trên Fig.7.

Fig.9 thể hiện thử nghiệm về sự liên kết không đặc hiệu với các kháng thể sơ cấp và thứ cấp. Các kháng thể sơ cấp: HRP = kháng thể sơ cấp liên hợp HRP, BP2022 = kháng thể sơ cấp đa dòng không liên hợp kháng *E. coli*; Biotin = kháng thể sơ cấp liên hợp biotin kháng *E. coli*. Các kháng thể thứ cấp: HRP = IgG liên hợp HRP; StrHRP = streptavidin được đánh dấu HRP. Không có vi khuẩn nào được sử dụng trong thử nghiệm này.

Fig.10 thể hiện thử nghiệm liên kết không đặc hiệu với các kháng thể sơ cấp và thứ cấp. Sự bố trí đĩa được mô tả trên Fig.9. Các kháng thể sơ cấp: HRP = kháng thể sơ cấp liên hợp HRP, BP2022 = kháng thể đa dòng không liên hợp

kháng *E. coli*; Biotin = kháng thể liên hợp biotin kháng *E. coli*. Các kháng thể thứ cấp: HRP = IgG liên hợp HRP; StrHRP = streptavidin được đánh dấu HRP.

Fig.11 thể hiện bảng mô tả điều kiện được sử dụng để tối ưu hóa độ pha loãng kháng thể và số lượng vi khuẩn/giếng. Kháng thể sơ cấp: kháng thể sơ cấp liên hợp HRP, không có kháng thể thứ cấp.

Fig.12 thể hiện dữ liệu thu được từ thử nghiệm về độ pha loãng kháng thể và số lượng vi khuẩn/giếng tối ưu. Kháng thể sơ cấp: kháng thể sơ cấp liên hợp HRP, không có kháng thể thứ cấp. Sự bố trí đĩa được thể hiện trên Fig.11.

Fig.13 thể hiện bảng mô tả điều kiện được sử dụng để tối ưu hóa độ pha loãng kháng thể và số lượng vi khuẩn/giếng. Kháng thể sơ cấp: kháng thể liên hợp biotin kháng *E. coli*, kháng thể thứ cấp: streptavidin liên hợp HRP.

Fig.14 thể hiện dữ liệu thu được từ thử nghiệm về độ pha loãng kháng thể và số lượng vi khuẩn/giếng tối ưu. Kháng thể sơ cấp: kháng thể liên hợp biotin kháng *E. coli*, kháng thể thứ cấp: streptavidin liên hợp HRP.

Fig.15 thể hiện độ hấp thụ ELISA với 10^6 - 10^8 vi khuẩn được bổ sung trong các giếng. Đường xu hướng lôgarit được thêm vào.

Fig.16 thể hiện độ hấp thụ ELISA với 0 - 10^6 vi khuẩn được bổ sung trong các giếng.

Fig.17 thể hiện A) mức độ ảnh hưởng của các nồng độ Bio-Mos khác nhau đối với sự bám dính của vi khuẩn. Mức độ ảnh hưởng này được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm của độ hấp thụ khi không bổ sung Bio-Mos; và B) mức độ ảnh hưởng của Bio-Mos đối với sự bám dính của chủng *E. coli* AL184, được xác định bằng vi khuẩn được đánh dấu phóng xạ trong máy đếm độ nhấp.

Fig.18 thể hiện dữ liệu từ các thử nghiệm về số lượng vi khuẩn/giếng nhằm phát hiện mức tối ưu cho việc phát hiện tác động làm thay đổi sự bám dính/gắn kết (ví dụ, sử dụng Bio-Mos).

Fig.19 thể hiện dữ liệu từ các thử nghiệm về số lượng vi khuẩn/giếng nhằm phát hiện mức tối ưu cho việc phát hiện tác động làm thay đổi sự bám dính/gắn kết (ví dụ, sử dụng Bio-Mos).

Fig.20 thể hiện dữ liệu liên quan tới độ pha loãng kháng thể sơ cấp để phát hiện sự khác nhau giữa các nồng độ khác nhau của Bio-Mos.

Fig.21 thể hiện mức độ ảnh hưởng của Bio-Mos trong ELISA sử dụng các loại chất nhầy khác nhau và nhiều nồng độ Bio-Mos.

Fig.22 thể hiện sự so sánh mức độ ảnh hưởng của Bio-Mos trong thử nghiệm gắn kết phóng xạ và kỹ thuật ELISA. Sai số chuẩn của giá trị trung bình giữa các mẫu lặp lại được thể hiện dưới dạng thanh sai số.

Fig.23 thể hiện sự bám dính của các vi khuẩn được làm bất hoạt theo các cách khác nhau vào đĩa có phủ chất nhầy. Sự bám dính được xác định trong điều kiện có và không có Bio-Mos. Dữ liệu về vi khuẩn được làm bất hoạt bằng UV và DMSO không được thể hiện.

Fig.24 thể hiện sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhầy trên các đĩa mới được phủ theo kỹ thuật ELISA.

Fig.25 thể hiện mức độ ảnh hưởng của nồng độ etanol trong chất lỏng bảo quản *E. coli* đối với sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhầy.

Fig.26 thể hiện sự bám dính của vi khuẩn trong điều kiện có và không có Bio-Mos vào đĩa có phủ chất nhầy được bảo quản theo các cách khác nhau.

Fig.27 thể hiện mức độ ảnh hưởng của Bio-Mos đối với sự bám dính của *E. coli* được làm bất hoạt bằng etanol vào đĩa có phủ chất nhầy được làm khô bằng không khí. Sai số chuẩn của giá trị trung bình giữa các mẫu lặp lại được thể hiện dưới dạng thanh sai số.

Fig.28 thể hiện sự biến thiên theo đĩa tuyệt đối đối với các mức thử nghiệm Bio-Mos khác nhau. Các thử nghiệm lặp lại (các giếng) của cùng mẫu được thể hiện dưới dạng các nhóm thanh.

Fig.29 thể hiện sự biến thiên theo đĩa tuyệt đối đối với các mức thử nghiệm Bio-Mos khác nhau. Bốn panen của hình vẽ này thể hiện các thử nghiệm được tiến hành vào bốn ngày khác nhau, nhưng với một mẻ *E. coli*. Các thử nghiệm lặp lại (các giếng) của cùng mẫu được thể hiện dưới dạng các nhóm thanh.

Fig.30 thể hiện sự biến thiên theo đĩa tuyệt đối đối với các mức thử nghiệm Bio-Mos khác nhau trong các panen khác nhau. Bốn nhóm cột trong mỗi panen thể hiện các thử nghiệm được tiến hành vào bốn ngày khác nhau, nhưng với một mẻ *E. coli*.

Fig.31 thể hiện sự biến thiên theo đĩa tương đối đối với các mức thử nghiệm Bio-Mos khác nhau. Các cột thể hiện giá trị trung bình của các giếng thử nghiệm lặp lại và các thanh thể hiện sai số chuẩn của giá trị trung bình. Các thử nghiệm được tiến hành vào bốn ngày khác nhau, nhưng với một mẻ *E. coli*. Hai panen thể hiện cùng dữ liệu, nhưng được thể hiện theo các cách khác nhau để nhấn mạnh sự biến thiên theo đĩa (panen phía trên) hoặc mức độ ảnh hưởng của Bio-Mos (panen phía dưới).

Fig.32 thể hiện sự biến thiên theo mẻ tương đối đối với mức độ ảnh hưởng của Bio-Mos. Các cột của panen phía trên thể hiện giá trị trung bình của các giếng thử nghiệm lặp lại và các thanh thể hiện sai số chuẩn của giá trị trung bình. Các thử nghiệm được tiến hành hoàn toàn độc lập bắt đầu từ bước chuẩn bị môi trường và chất đệm, và nuôi cấy *E. coli*. Panen phía trên thể hiện tín hiệu đo được và panen phía dưới thể hiện giá trị so với giếng đối chứng.

Fig.33 thể hiện số lượng giếng lặp lại cần để phát hiện sự khác biệt đã định giữa các chất điều trị thử nghiệm với thử nghiệm được phát triển.

Fig.34 thể hiện tín hiệu đo được đối với năm (5) mẻ chế phẩm vi khuẩn độc lập trong điều kiện có và không có Bio-Mos (2 ng/ml).

Fig.35 thể hiện tín hiệu đo được đối với năm (5) mẻ đĩa chất nhày độc lập trong điều kiện có và không có Bio-Mos (2 ng/ml).

Fig.36 thể hiện tín hiệu của thử nghiệm sau 1 và 2 tuần bảo quản.

Fig.37 thể hiện ống tiêm và đĩa được đóng kín chân không theo một phương án của sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa

Một số thuật ngữ được định nghĩa dưới đây để hiểu sáng chế dễ dàng hơn.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất nhày” dùng để chỉ chất tiết tương đối đặc được sản xuất bởi và bao phủ các phần của đường tiêu hóa (ví dụ, được sản xuất bởi và bao phủ tế bào biểu mô của ruột). Chất nhày có thể chứa một hoặc nhiều thành phần như mucin, protein, glycoprotein, lipid và glycolipit. Chất nhày cũng có thể chứa một hoặc nhiều loại thụ thể (ví dụ, thụ thể nhận biết protein bám dính đặc hiệu). Sự bám dính và/hoặc sự liên kết chặt chẽ của vi khuẩn vào chất nhày và/hoặc tế bào biểu mô (ví dụ, qua lớp chất nhày) có thể góp phần vào sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày của ruột và/hoặc biểu mô (ví dụ, do đó có vai trò trong quần thể vi khuẩn sống ở ruột). Sáng chế không bị giới hạn ở loại chất nhày cụ thể bất kỳ hoặc ở chất nhày thu được từ nguồn cụ thể bất kỳ (ví dụ, loại động vật) hoặc vị trí (ví dụ, phần của đường tiêu hóa (ví dụ, ruột hồi (ví dụ, cận tâm, xa tâm, v.v.), ruột tá, ruột tịt, ruột kết hoặc phần khác của đường tiêu hóa)).

Trong bản mô tả này, tất cả các thuật ngữ “peptit”, “polypeptit” và “protein” dùng để chỉ trình tự sơ cấp của các axit amin được nối bởi “liên kết peptit” cộng hóa trị. Nhìn chung, peptit gồm một vài axit amin, thường từ 2-50 axit amin, và ngắn hơn protein. Thuật ngữ “polypeptit” gồm peptit và protein. Theo một số phương án, peptit, polypeptit hoặc protein là tổng hợp, trong khi theo các phương án khác, peptit, polypeptit hoặc protein là tái tổ hợp hoặc có trong tự nhiên. Peptit tổng hợp là peptit được tạo ra theo cách nhân tạo *in vitro* (tức là, không được tạo ra *in vivo*).

Thuật ngữ “mẫu” và “mẫu vật” được sử dụng theo nghĩa rộng nhất của chúng và bao gồm mẫu hoặc mẫu vật thu được từ nguồn bất kỳ. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “mẫu” được sử dụng để chỉ mẫu sinh học thu được từ động vật (bao gồm người), và bao gồm dịch lỏng, chất rắn, mô và chất khí. Theo một số phương án của sáng chế, mẫu sinh học bao gồm dịch não tủy (cerebrospinal fluid - CSF), dịch thanh dịch, nước tiểu, nước bọt, máu và sản phẩm máu như huyết tương, huyết thanh và chất tương tự. Tuy nhiên, các ví dụ này không được hiểu là làm giới hạn các loại mẫu mà có thể được sử dụng theo sáng chế.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “vật chủ” và “đối tượng” dùng để chỉ động vật bất kỳ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, người và động vật không phải là người (ví dụ, chó, mèo, bò, ngựa, cừu, gia cầm, cá, loài giáp xác, v.v.) mà được nghiên cứu, phân tích, thử nghiệm, chẩn đoán hoặc điều trị. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “vật chủ”, “đối tượng” và “bệnh nhân” được sử dụng thay thế lẫn nhau, trừ khi có quy định theo cách khác.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng thể” (hoặc “các kháng thể”) dùng để chỉ globulin miễn dịch bất kỳ liên kết đặc hiệu với yếu tố quyết định kháng nguyên, và liên kết đặc hiệu với protein giống hoặc có liên quan về mặt cấu trúc với yếu tố quyết định kháng nguyên mà kích thích việc sản xuất chúng. Theo đó, kháng thể có thể hữu dụng trong các thử nghiệm dùng để phát hiện kháng nguyên mà kích thích việc sản xuất chúng. Kháng thể đơn dòng được thu nhận từ một dòng tế bào lympho B (tức là, tế bào B) đơn lẻ, và thường đồng nhất về cấu trúc và tính đặc hiệu kháng nguyên. Kháng thể đa dòng có nguồn gốc từ nhiều dòng tế bào sản xuất kháng thể khác nhau, và do đó không đồng nhất về cấu trúc và tính đặc hiệu epitope của chúng, nhưng tất cả đều nhận biết cùng một kháng nguyên. Theo một số phương án, kháng thể đơn dòng và kháng thể đa dòng được sử dụng dưới dạng chế phẩm thô, trong khi theo phương án được ưu tiên, kháng thể này được tinh chế. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể đa dòng chứa trong huyết thanh miễn dịch thô được sử dụng. Ngoài ra, dự định rằng thuật ngữ “kháng thể” bao gồm globulin miễn dịch bất kỳ (ví dụ, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, v.v.) thu được từ nguồn bất kỳ (ví dụ, người, loài gặm nhấm hai răng cửa, động vật linh trưởng không phải là người, loài gặm nhấm bốn răng cửa, dê, bò, ngựa, cừu, v.v.).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “kháng nguyên” được sử dụng để chỉ chất bất kỳ có khả năng được nhận biết bởi kháng thể. Dự định rằng thuật ngữ này bao gồm kháng nguyên và “chất sinh miễn dịch” bất kỳ (tức là, chất kích thích sự tạo thành kháng thể). Theo đó, trong phản ứng miễn dịch, kháng thể được tạo ra để đáp ứng lại sự có mặt của kháng nguyên hoặc một phần của kháng nguyên. Thuật ngữ “kháng nguyên” và “chất sinh miễn dịch” được sử dụng để chỉ đại phân tử riêng rẽ hoặc để chỉ nhóm các đại phân tử kháng

nguyên đồng thể hoặc dị thể. Dự định rằng thuật ngữ kháng nguyên và chất sinh miễn dịch bao gồm phân tử protein hoặc các phần của phân tử protein, có chứa một hoặc nhiều epitop. Trong nhiều trường hợp, kháng nguyên cũng là chất sinh miễn dịch, do đó thuật ngữ “kháng nguyên” thường được sử dụng thay thế lẫn nhau với thuật ngữ “chất sinh miễn dịch”. Theo một số phương án được ưu tiên, chất có tính sinh miễn dịch được sử dụng làm kháng nguyên trong các thử nghiệm dùng để phát hiện sự có mặt của kháng thể thích hợp trong huyết thanh của động vật được gây miễn dịch.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “mảnh kháng nguyên” và “một phần của kháng nguyên” và dạng tương tự được sử dụng để chỉ một phần của kháng nguyên. Phần hoặc mảnh kháng nguyên thường xếp loại theo kích thước, từ tỷ lệ phần trăm nhỏ của toàn bộ kháng nguyên đến tỷ lệ phần trăm lớn, nhưng không phải là 100%, của kháng nguyên. Tuy nhiên, trong các trường hợp trong đó “ít nhất một phần” của kháng nguyên được chỉ rõ, thì dự định rằng toàn bộ kháng nguyên cũng có thể có mặt (ví dụ, không dự định rằng mẫu được thử nghiệm chỉ chứa một phần của kháng nguyên). Theo một số phương án, phần và/hoặc mảnh kháng nguyên chứa “epitop” được nhận biết bởi kháng thể, trong khi theo các phương án khác, phần và/hoặc mảnh này không chứa epitop được nhận biết bởi kháng thể. Ngoài ra, theo một số phương án, phần và/hoặc mảnh kháng nguyên không có tính sinh miễn dịch, trong khi theo phương án được ưu tiên, phần và/hoặc mảnh kháng nguyên có tính sinh miễn dịch.

Thuật ngữ “yếu tố quyết định kháng nguyên” và “epitop” trong bản mô tả này dùng để chỉ phần của kháng nguyên mà tiếp xúc với vùng biến đổi của kháng thể cụ thể. Khi protein hoặc mảnh (hoặc phần) của protein được sử dụng để gây miễn dịch động vật chủ, nhiều vùng của protein này có thể kích thích việc sản xuất kháng thể liên kết đặc hiệu với vùng hoặc cấu trúc ba chiều nhất định trên protein này (các vùng và/hoặc cấu trúc này được gọi là “yếu tố quyết định kháng nguyên”). Trong một số trường hợp, yếu tố quyết định kháng nguyên cạnh tranh với kháng nguyên nguyên vẹn (tức là, “chất sinh miễn dịch” được sử dụng để gây ra đáp ứng miễn dịch) để liên kết với kháng thể.

Thuật ngữ “liên kết đặc hiệu” và “liên kết một cách đặc hiệu” khi được sử dụng để chỉ sự tương tác giữa kháng thể và kháng nguyên mô tả sự tương tác phụ thuộc vào sự có mặt của cấu trúc cụ thể (tức là, yếu tố quyết định kháng nguyên hoặc epitop) trên kháng nguyên. Nói cách khác, kháng thể nhận biết và liên kết với cấu trúc protein duy nhất đối với kháng nguyên, chứ không phải là liên kết với tất cả các protein nói chung (tức là, liên kết không đặc hiệu).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “thử nghiệm miễn dịch” dùng để chỉ thử nghiệm bất kỳ sử dụng ít nhất một kháng thể đặc hiệu để phát hiện hoặc định lượng kháng nguyên. Thử nghiệm miễn dịch bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thẩm tách Western, ELISA, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ và thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “ELISA” dùng để chỉ thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (hoặc EIA). Nhiều ứng dụng và phương pháp ELISA là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và được mô tả trong nhiều tài liệu tham khảo (xem, ví dụ, Crowther, “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)”, in *Molecular Biotechnology Handbook*, Rapley et al. (eds.), pp. 595-617, Humana Press, Inc., Totowa, N.J. (1998); Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Ausubel et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Ch. 11, John Wiley & Sons, Inc., New York (1994)). Ngoài ra, có nhiều hệ thử nghiệm ELISA có bán trên thị trường.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất chỉ thị”, “phân tử chỉ thị”, “cơ chất phát hiện” và “chất phát hiện” được sử dụng để chỉ chất cho phép phát hiện và/hoặc định lượng kháng thể liên kết với kháng nguyên. Ví dụ, theo một số phương án, chất chỉ thị là cơ chất so màu đối với enzym đã liên hợp với kháng thể. Việc bổ sung cơ chất thích hợp vào thể liên hợp kháng thể-enzym tạo ra tín hiệu so màu hoặc đo huỳnh quang (ví dụ, sau sự liên kết của kháng thể liên hợp với kháng nguyên đang quan tâm). Các chất chỉ thị khác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hợp chất phóng xạ. Định nghĩa này cũng bao gồm việc sử dụng hợp chất gốc biotin và avidin (ví dụ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, neutravidin và streptavidin) làm một phần của hệ phát hiện.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “tín hiệu” nhìn chung được sử dụng để chỉ quá trình có thể phát hiện được bất kỳ mà thể hiện rằng phản ứng đã xảy ra, ví dụ, liên kết của kháng thể với kháng nguyên. Dự định rằng tất cả các tín hiệu ở dạng hoạt tính phóng xạ, sản phẩm/chất đo huỳnh quang hoặc so màu đều được sử dụng theo sáng chế. Theo nhiều phương án của sáng chế, tín hiệu được đánh giá một cách định tính, trong khi theo các phương án khác, tín hiệu được đánh giá một cách định lượng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “nền rắn” được sử dụng để chỉ chất rắn hoặc vật liệu cố định bất kỳ mà chất phản ứng như kháng thể, kháng nguyên và các thành phần thử nghiệm khác được gắn vào đó. Ví dụ, trong kỹ thuật ELISA, các giếng của đĩa vi chuẩn độ tạo ra nền rắn. Các ví dụ khác về nền rắn bao gồm bản kính dùng cho kính hiển vi, lá kính cấy, hạt, bình nuôi cấy tế bào, cũng như nhiều nền thích hợp khác.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “lượng hữu hiệu” dùng để chỉ lượng hợp phần đủ để tạo ra kết quả có lợi hoặc mong muốn. Lượng hữu hiệu có thể được sử dụng và/hoặc kết hợp với nguyên liệu khác trong một hoặc nhiều lần sử dụng, áp dụng hoặc liều lượng và không được dự định là bị giới hạn ở chế phẩm hoặc đường dùng cụ thể.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “việc sử dụng” và “sử dụng” dùng để chỉ hành động đưa thuốc, tiền dược chất hoặc tác nhân khác, hoặc chất điều trị trị liệu (ví dụ, tác nhân được nhận diện là tác nhân điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhầy bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế) cho đối tượng (ví dụ, đối tượng hoặc tế bào, mô và cơ quan *in vivo*, *in vitro* hoặc *ex vivo*). Đường dùng tiêu biểu có thể là qua mắt (cơ quan thị giác), miệng (cơ quan vị giác), da (tại chỗ hoặc qua da), mũi (cơ quan khứu giác), phổi (xông hít), niêm mạc miệng (má), tai, trực tràng, âm đạo, bằng cách tiêm (ví dụ, trong tĩnh mạch, dưới da, trong khối u, trong màng bụng, v.v.) và đường dùng tương tự.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “việc sử dụng đồng thời” và “sử dụng đồng thời” dùng để chỉ việc sử dụng ít nhất hai tác nhân (ví dụ, tác nhân được nhận diện là tác nhân điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhầy bằng

cách sử dụng phương pháp theo sáng chế và một hoặc nhiều tác nhân khác (ví dụ, chất trị liệu được biết là điều trị rối loạn do vi khuẩn gây bệnh gây ra) cho đối tượng và/hoặc nguyên liệu (ví dụ, thức ăn (ví dụ, thức ăn động vật))). Theo một số phương án, việc sử dụng đồng thời hai hoặc nhiều tác nhân hoặc chất trị liệu là cùng lúc. Theo các phương án khác, tác nhân/chất trị liệu thứ nhất được sử dụng trước tác nhân/chất trị liệu thứ hai. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng chế phẩm và/hoặc đường dùng của các tác nhân hoặc chất trị liệu được sử dụng khác nhau có thể thay đổi. Liều thích hợp để sử dụng đồng thời có thể được xác định một cách dễ dàng bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, khi tác nhân hoặc chất trị liệu được sử dụng đồng thời, thì tác nhân hoặc chất trị liệu tương ứng này được sử dụng và/hoặc được bào chế ở liều thấp hơn so với liều thích hợp cho việc sử dụng và/hoặc bào chế chúng ở dạng riêng lẻ. Theo đó, việc sử dụng đồng thời được ưu tiên đặc biệt trong các phương án khi việc sử dụng đồng thời/bào chế đồng thời các tác nhân hoặc chất trị liệu giúp làm giảm liều cần thiết của (các) tác nhân gây hại (ví dụ, độc) tiềm ẩn, và/hoặc khi việc sử dụng đồng thời hai hoặc nhiều tác nhân giúp đối tượng nhạy với tác dụng có lợi của một trong số các tác nhân thông qua việc sử dụng đồng thời với tác nhân còn lại.

Trong bản mô tả này, “điều trị sau cur trú” hoặc “áp dụng sau” dùng để chỉ việc điều trị sau khi đã loại bỏ bệnh lây nhiễm.

Trong bản mô tả này, “áp dụng trước” và/hoặc “điều trị dự phòng” dùng để chỉ việc điều trị được sử dụng làm biện pháp phòng ngừa (ví dụ, để ngăn ngừa sự lây nhiễm và/hoặc bệnh).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh” và “tình trạng bệnh lý” được sử dụng thay thế lẫn nhau để mô tả trạng thái, dấu hiệu và/hoặc triệu chứng liên quan đến sự suy yếu bất kỳ của trạng thái bình thường của động vật sống hoặc của cơ quan hoặc mô bất kỳ của nó mà phá vỡ hoặc làm thay đổi việc thực hiện các chức năng bình thường, và có thể là một đáp ứng với các yếu tố môi trường (như tình trạng nghèo dinh dưỡng, rủi ro công nghiệp hoặc khí hậu), với tác nhân gây nhiễm bệnh cụ thể (như giun, vi khuẩn hoặc virus), với khiếm khuyết

vốn có của sinh vật (như các bất thường di truyền khác nhau, hoặc với tổ hợp của các yếu tố này và các yếu tố khác).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “mắc bệnh” dùng để chỉ đối tượng (ví dụ, động vật hoặc người) đang phải trải qua một bệnh cụ thể. Không dự định rằng sáng chế bị giới hạn ở các dấu hiệu hoặc triệu chứng hoặc bệnh cụ thể bất kỳ. Theo đó, dự định rằng sáng chế bao gồm các đối tượng đang phải trải qua loại bệnh bất kỳ (ví dụ, từ biểu hiện cận lâm sàng đến bệnh toàn phát) trong đó đối tượng thể hiện ít nhất một số chỉ thị (ví dụ, dấu hiệu và triệu chứng) liên quan đến bệnh cụ thể.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “độc” dùng để chỉ tác động bất lợi hoặc có hại bất kỳ đối với đối tượng, tế bào hoặc mô so với cùng tế bào hoặc mô trước khi sử dụng độc chất.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “thành phần thức ăn chức năng” hoặc “chất phụ gia thức ăn chức năng” dùng để chỉ chế phẩm kết hợp của hoạt chất (ví dụ, tác nhân được nhận diện là tác nhân điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày) với chất mang trợ hoặc có hoạt tính, tạo ra hợp phần đặc biệt thích hợp để sử dụng trong chẩn đoán hoặc trị liệu *in vitro*, *in vivo* hoặc *ex vivo*.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất mang” dùng để chỉ chất mang chuẩn bất kỳ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dung dịch nước muối được đệm phosphat, nước, nhũ tương (ví dụ, như nhũ tương dầu/nước hoặc nước/dầu), và các loại chất thấm ướt khác, bất kỳ và tất cả các dung môi, môi trường phân tán, chất bao, natri lauryl sulfat, chất làm chậm sự hấp thụ và đẳng trương, chất gây rã (ví dụ, tinh bột khoai tây hoặc glycolat natri tinh bột), lõi ngô, bã chung cất rượu đã được làm khô, cám lúa mỳ, nấm men (ví dụ, nấm men toàn phần đã qua sử dụng), thành phần nấm men (ví dụ, chất chiết thành tế bào nấm men), và các chất tương tự. Hợp phần cũng có thể chứa chất ổn định và chất bảo quản. Ví dụ về chất mang, chất ổn định và tá dược có thể được xem, ví dụ, trong tài liệu Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. (1975), tài liệu này được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “tiêu hóa” dùng để chỉ sự chuyển hóa thức ăn, thực phẩm hoặc các hợp chất hữu cơ khác thành dạng hấp thụ được; để có thể làm mềm, phân hủy hoặc phá vỡ bằng nhiệt và hơi ẩm hoặc tác động hóa học.

Trong bản mô tả này, “hệ tiêu hóa” dùng để chỉ hệ (bao gồm hệ dạ dày-ruột) trong đó sự tiêu hóa có thể xảy ra hoặc thật sự xảy ra.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “thức ăn” dùng để chỉ (các) nguyên liệu được tiêu thụ bởi động vật và đóng góp năng lượng và/hoặc chất dinh dưỡng cho chế độ ăn uống của động vật. Ví dụ về thức ăn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, khẩu phần hỗn hợp hoàn chỉnh (total mixed ration - TMR), (các) thức ăn cho súc vật, (các) viên, (các) chất cô, (các) sản phẩm đồng thời trộn sẵn, (các) hạt, (các) bã chung cất rượu, ri đường, (các) sợi, cỏ cho gia súc, cỏ, cỏ khô, (các) nhân hạt, lá, bột xay thô, (các) chất tan và (các) chất bổ sung.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “động vật” dùng để chỉ sinh vật thuộc giới Animalia (giới Động vật). Động vật bao gồm, nhưng không giới hạn ở, động vật chăn nuôi, động vật trang trại, động vật nuôi trong nhà, động vật cảnh, động vật nước ngọt và nước mặn và động vật hoang dã.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “muối được dụng” dùng để chỉ muối bất kỳ (ví dụ, thu được bằng phản ứng với axit hoặc bazơ) của hợp chất theo sáng chế (ví dụ, chứa thành phần thành tế bào hoặc tế bào nấm men sống theo sáng chế) mà được dung nạp về mặt sinh lý ở đối tượng đích (ví dụ, động vật có vú, người, gia cầm, bò, lợn, ngựa, cừu, dê, chó, mèo, cá, lạc đà, loài gặm nhấm hai răng cửa cũng như cá và động vật vỏ giáp, và/hoặc tế bào, mô hoặc cơ quan *in vivo* hoặc *ex vivo*). “Muối” của hợp chất theo sáng chế có thể thu được từ axit và bazơ vô cơ hoặc hữu cơ. Ví dụ về axit bao gồm, nhưng không giới hạn ở, axit clohydric, bromhydric, sulfuric, nitric, perchloric, fumaric, maleic, phosphoric, glycolic, lactic, salixylic, succinic, toluen-p-sulfonic, tartaric, acetic, xitric, metansulfonic, etansulfonic, formic, benzoic, malonic, sulfonic, naphthalen-2-sulfonic, benzensulfonic, và các axit tương tự. Các axit khác, như oxalic, mặc dù bản thân chúng không được dụng, cũng có thể được sử dụng

trong việc điều chế muối hữu ích làm sản phẩm trung gian để thu được hợp chất theo sáng chế và muối cộng axit được dụng của chúng.

Ví dụ về bazơ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, hydroxit kim loại kiềm (ví dụ, natri), hydroxit kim loại kiềm thổ (ví dụ, magie), amoniac, và hợp chất có công thức NW_4^+ , trong đó W là C_{1-4} alkyl, và các bazơ tương tự.

Ví dụ về muối bao gồm, nhưng không giới hạn ở: axetat, adipat, alginat, aspartat, benzoat, benzensulfonat, bisulfat, butyrat, xitrat, camphorat, camphorsulfonat, xyclopentanpropionat, digluconat, dodexylsulfat, etansulfonat, fumarat, flucoheptanoat, glyxerophosphat, hemisulfat, heptanoat, hexanoat, clorua, bromua, iodua, 2-hydroxyetansulfonat, lactat, maleat, metansulfonat, 2-naphtalensulfonat, nicotinat, oxalat, palmoat, pectinat, persulfat, phenylpropionat, picrat, pivalat, propionat, suxinat, tartrat, thioxyanat, tosylat, undecanoat, và các muối tương tự. Ví dụ khác về muối bao gồm anion của hợp chất theo sáng chế được kết hợp với cation thích hợp như Na^+ , NH_4^+ và NW_4^+ (trong đó W là nhóm C_{1-4} alkyl), và các muối tương tự. Để sử dụng trong trị liệu, muối của hợp chất theo sáng chế được dự định là được dụng. Tuy nhiên, muối của axit và bazơ không được dụng cũng có thể được sử dụng, ví dụ, trong việc điều chế hoặc tinh chế hợp chất được dụng.

Để sử dụng trong trị liệu và/hoặc phòng ngừa, muối của hợp chất theo sáng chế được dự định là được dụng. Tuy nhiên, muối của axit và bazơ không được dụng cũng có thể được sử dụng, ví dụ, trong việc điều chế hoặc tinh chế hợp chất được dụng.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “giống cây tế bào” dùng để chỉ giống cây tế bào *in vitro* bất kỳ. Thuật ngữ này bao gồm dòng tế bào liên tục (ví dụ, với kiểu hình bất tử), giống cây tế bào sơ cấp, dòng tế bào đã được biến nạp, dòng tế bào hữu hạn (ví dụ, tế bào không được biến nạp) và quần thể tế bào bất kỳ khác được duy trì *in vitro*.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “sinh vật có nhân điển hình” dùng để chỉ sinh vật có thể phân biệt được với “sinh vật không có nhân điển hình”. Dự định rằng thuật ngữ này bao gồm tất cả các sinh vật có các tế bào thể hiện đặc tính thông thường của sinh vật có nhân điển hình, như sự có mặt của nhân thực

được bao bọc bởi màng nhân, trong đó có nhiễm sắc thể, sự có mặt của cơ quan tế bào được bao bọc bởi màng, và các đặc tính khác thường quan sát thấy trong sinh vật có nhân điển hình. Theo đó, thuật ngữ này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sinh vật như nấm, động vật nguyên sinh và động vật (ví dụ, người).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “*in vitro*” dùng để chỉ môi trường nhân tạo và quy trình hoặc phản ứng xảy ra trong môi trường nhân tạo. Môi trường *in vitro* có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ống nghiệm và giống cấy tế bào. Thuật ngữ “*in vivo*” dùng để chỉ môi trường tự nhiên (ví dụ, động vật hoặc tế bào) và quy trình hoặc phản ứng xảy ra trong môi trường tự nhiên.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “mẫu” được sử dụng theo nghĩa rộng nhất của nó. Theo một nghĩa, thuật ngữ này bao gồm mẫu vật hoặc giống cấy thu được từ nguồn bất kỳ, cũng như mẫu sinh học và mẫu môi trường. Mẫu sinh học có thể thu được từ động vật (bao gồm người) và bao gồm dịch lỏng, chất rắn, mô và chất khí. Mẫu sinh học bao gồm sản phẩm máu, như huyết tương, huyết thanh và các dạng tương tự. Mẫu môi trường bao gồm vật liệu môi trường như vật chất bề mặt, đất, nước, tinh thể và mẫu công nghiệp. Tuy nhiên, các ví dụ này không được hiểu là làm giới hạn loại mẫu có thể áp dụng được theo sáng chế.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “bộ kit” dùng để chỉ tập hợp các nguyên vật liệu được đóng gói.

Trong bản mô tả này, “tác nhân điều biến chống bám dính” và/hoặc “tác nhân điều biến chống dính bám” dùng để chỉ tác nhân điều biến ngăn chặn sự bám dính (ví dụ, ngăn chặn hợp chất không bám dính vào diềm tua, và/hoặc ngăn chặn sự bám dính của vi khuẩn vào tế bào biểu mô nhày và/hoặc vào các loại tế bào khác).

Thử nghiệm liên kết phóng xạ đã được chứng minh là xác định được sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày của ruột, và một số chất nhất định ngăn ngừa một cách hiệu quả sự bám dính này (xem, ví dụ, Conway, et al., 1990, 58:3178-3182). Cụ thể, thử nghiệm liên kết phóng xạ đã được chứng minh là xác định được sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày của ruột còn cho thấy mức độ ảnh hưởng của Bio-Mos, mannoprotein thu được từ thành tế bào của

Saccharomyces cerevisiae, đối với việc ức chế sự bám dính của vi khuẩn. Tuy nhiên, không có sẵn phương pháp phi phóng xạ thông thường nào để phát hiện, nhận diện và xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Phương pháp và hợp phần theo sáng chế khắc phục được các hạn chế này thông qua việc đề xuất phương pháp phi phóng xạ để phát hiện, nhận diện và xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày.

Cụ thể, sáng chế đề xuất thử nghiệm miễn dịch đơn giản và chính xác để xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày và để thử nghiệm mức độ ảnh hưởng của sản phẩm mà điều biến (ví dụ, ức chế, thúc đẩy) sự bám dính. Theo một số phương án, thử nghiệm miễn dịch là thẩm tách Western. Theo một số phương án, thử nghiệm miễn dịch là thử nghiệm miễn dịch phóng xạ. Theo một số phương án, thử nghiệm miễn dịch là thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang. Theo một số phương án, thử nghiệm miễn dịch là thử nghiệm dựa trên ELISA. Phương pháp dựa trên ELISA là phương pháp thay thế hấp dẫn cho thử nghiệm phóng xạ do tính linh hoạt trong việc sử dụng các tổ hợp khác nhau của kháng thể sơ cấp và kháng thể thứ cấp và các hệ phát hiện so màu khác nhau đối với các loài vi sinh vật khác nhau. Do đó, sáng chế đề xuất phương pháp dựa trên ELISA để phát hiện và nhận diện sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày (ví dụ, màng niêm mạc ruột).

Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất thử nghiệm so màu phi phóng xạ để theo dõi và/hoặc xác định sự tương tác (ví dụ, liên kết, gắn kết, ái lực, v.v.) giữa chất nhày và tế bào vi khuẩn. Theo một số phương án, thử nghiệm phi phóng xạ nhảy ngang bằng và/hoặc nhảy hơn so với thử nghiệm phóng xạ được sử dụng để theo dõi và/hoặc xác định đặc điểm tương tự. Theo một số phương án, thử nghiệm so màu phi phóng xạ theo sáng chế được sử dụng để theo dõi và/hoặc xác định khả năng của một hoặc nhiều chất thử nghiệm trong việc làm thay đổi (ví dụ, ức chế và/hoặc tăng cường) sự tương tác của tế bào vi khuẩn (ví dụ, liên kết, gắn kết, ái lực, v.v.) với chất nhày.

Ví dụ, theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzyme (ELISA) để theo dõi và/hoặc xác

định sự tương tác (ví dụ, liên kết, gắn kết, ái lực, v.v.) giữa chất nhày và tế bào vi khuẩn (ví dụ, như được mô tả trong ví dụ 1-16). Theo một số phương án, thử nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ phòng. Theo một số phương án, thử nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ 37°C. Theo một số phương án, thử nghiệm được tối ưu hóa như được mô tả trong các ví dụ 2-15. Theo một số phương án, đĩa (ví dụ, đĩa vi chuẩn độ (ví dụ, đĩa MAXISORP (ví dụ, có 6, 12, 24, 48, 96, 128 giếng hoặc nhiều hơn))) được phủ chất nhày. Sáng chế không bị giới hạn ở loại, nguồn hoặc lượng chất nhày. Theo một số phương án, chất nhày được sử dụng là chất nhày động vật. Theo một số phương án, chất nhày thu được từ lợn, gà, bò, ngựa, chó, mèo hoặc loài động vật khác. Theo một số phương án, chất nhày thu được từ một hoặc nhiều phần của đường tiêu hóa. Ví dụ, theo một số phương án, chất nhày thu được từ ruột hồi (ví dụ, ruột hồi cận tâm, ruột hồi xa tâm, v.v.), ruột tá, ruột tịt, ruột kết và/hoặc phần khác của đường tiêu hóa. Sáng chế không bị giới hạn ở lượng chất nhày được sử dụng để phủ đĩa (ví dụ, tùy thuộc vào số lượng và/hoặc kích cỡ của các giếng trên đĩa). Theo một số phương án, chất nhày được pha loãng trong chất đệm bao phủ và sau đó được sử dụng để phủ đĩa. Theo một số phương án, chất đệm bao phủ là dung dịch chứa 1 lít nước đã được hòa tan 1,6 g Na_2CO_3 , 2,94 g NaHCO_3 , và 0,2 g Na-azit và độ pH được điều chỉnh tới 9,6, hoặc chất đệm tương tự. Theo một số phương án, chất đệm bao phủ chứa từ khoảng 0,001 - 0,2 mg protein chất nhày trong mỗi ml chất đệm bao phủ được sử dụng để phủ mỗi giếng trên đĩa, mặc dù có thể sử dụng lượng lớn hơn (ví dụ, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1,0 mg/ml hoặc lớn hơn) hoặc nhỏ hơn (ví dụ, 0,0005 mg/ml hoặc nhỏ hơn). Theo một số phương án, khoảng 300 μl huyền phù bao phủ được sử dụng để phủ mỗi giếng, mặc dù có thể sử dụng thể tích lớn hơn (ví dụ, 400 μl , 500 μl , 600 μl , 700 μl hoặc lớn hơn) hoặc nhỏ hơn (ví dụ, 200 μl , 100 μl , 50 μl , 25 μl hoặc nhỏ hơn) của dung dịch bao phủ (ví dụ, tùy thuộc vào kích cỡ của giếng, lượng tín hiệu mong muốn, hoặc các yếu tố khác (ví dụ, sự bám dính của vi khuẩn)). Ngay khi dung dịch bao phủ được bổ sung vào giếng, chất nhày được để cho phủ mỗi giếng trong một khoảng thời gian (ví dụ, khoảng 1 giờ, khoảng 2 giờ, khoảng 3 giờ, khoảng 6 giờ, khoảng 12 giờ, khoảng 24 giờ, hoặc

lâu hơn) ở nhiệt độ không đổi (ví dụ, 4°C, nhiệt độ phòng hoặc nhiệt độ ẩm hơn (ví dụ, 37°C)). Theo một số phương án, đĩa được đậy trong khi ủ (ví dụ, để ngăn ngừa sự bay hơi của dung dịch phủ). Đôi khi trong khoảng thời gian phủ, chất thử nghiệm (ví dụ, chất cần được thử nghiệm về khả năng của nó trong việc làm thay đổi (ví dụ, ức chế và/hoặc tăng cường) sự liên kết của vi khuẩn vào chất nhày) được điều chế. Chất thử nghiệm được pha loãng trong chất đệm thích hợp bất kỳ (ví dụ, nước muối được đệm phosphat (phosphate buffered saline - PBS) (ví dụ, dung dịch PBS được tạo ra bằng cách hòa tan 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,4 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,2 g KH₂PO₄ vào 1 lít nước và điều chỉnh đến độ pH = 7,4). Sáng chế không bị giới hạn ở loại chất thử nghiệm. Trên thực tế, nhiều chất thử nghiệm có thể được theo dõi và/hoặc xác định bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất được nêu trong bản mô tả này.

Sau khi quá trình phủ hoàn thành, dung dịch bao phủ được loại ra khỏi giếng (ví dụ, mà không trộn lẫn các chất có trong giếng) và mỗi giếng được rửa bằng một thể tích thích hợp (ví dụ, 100 ml, 200 ml, 300 ml, 400 ml hoặc lớn hơn) của dung dịch rửa (ví dụ, PBS).

Vi khuẩn cần được theo dõi và/hoặc xác định sự tương tác với chất nhày được chuẩn bị bằng cách thu gom vi khuẩn trong điều kiện mà không phá vỡ sự nguyên vẹn của vi khuẩn. Sáng chế không bị giới hạn ở loại vi khuẩn cụ thể bất kỳ, và cũng không bị giới hạn ở pha sinh trưởng cụ thể bất kỳ của vi khuẩn. Trên thực tế, nhiều loại vi khuẩn có thể được theo dõi và/hoặc xác định trong thử nghiệm theo sáng chế, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các loại vi khuẩn được nêu trong bản mô tả này. Ngay khi được thu gom (ví dụ, thông qua ly tâm để làm lắng kết các tế bào vi khuẩn), vi khuẩn được tái tạo huyền phù trong chất đệm (ví dụ, PBS) đến nồng độ mong muốn tùy thuộc vào số lượng vi khuẩn mong muốn trong mỗi giếng. Theo một số phương án, số lượng vi khuẩn được bổ sung trong mỗi giếng là khoảng 10⁷, mặc dù có thể bổ sung số lượng vi khuẩn lớn hơn (ví dụ, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰) hoặc nhỏ hơn (ví dụ, 10⁶, 10⁵, 10⁴) vào mỗi giếng. Sau lần rửa đĩa cuối cùng, vi khuẩn được đưa vào các giếng. Theo

một số phương án, dung dịch chất thử nghiệm được thêm vào huyền phù vi khuẩn ngay trước khi đưa vào các giếng. Lượng chất thử nghiệm và lượng tế bào có thể thay đổi như được nêu trong bản mô tả này. Ngay khi được đưa vào các giếng, vi khuẩn và/hoặc vi khuẩn cộng với chất thử nghiệm được ủ trong các giếng trong một khoảng thời gian đã định (ví dụ, 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ hoặc lâu hơn). Sau khi ủ, các giếng được rửa (ví dụ, một, hai, ba hoặc nhiều lần bằng PBS). Sau khi rửa, chất đệm phong bế (ví dụ, huyết thanh bào thai bò (fetal bovine serum - FBS), albumin huyết thanh bò (bovine serum albumin - BSA), sữa hoặc các chất phong bế thích hợp khác (ví dụ, 10% FBS được pha loãng trong PBS) được bổ sung vào mỗi giếng (ví dụ, sử dụng cùng thể tích của chất đệm phong bế mà được sử dụng để phủ các giếng với chất nhày). Dung dịch phong bế được ủ trong các giếng trong một khoảng thời gian đã định (ví dụ, khoảng 1 giờ, khoảng 2 giờ, khoảng 3 giờ hoặc lâu hơn) ở nhiệt độ không đổi (ví dụ, 4°C, nhiệt độ phòng hoặc nhiệt độ ấm hơn (ví dụ, 37°C)). Chất đệm phong bế được loại ra, và sau đó kháng thể sơ cấp (ví dụ, có ái lực đặc hiệu với vi khuẩn cần theo dõi và/hoặc xác định) được bổ sung vào các giếng. Kháng thể sơ cấp được pha loãng (ví dụ, ở tỷ lệ 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000 hoặc lớn hơn) trong chất đệm phong bế. Thể tích của kháng thể sơ cấp đã được pha loãng được bổ sung vào các giếng nằm trong khoảng từ khoảng 100 ml đến khoảng 400 ml (ví dụ, 200 ml) và được ủ trong các giếng trong một khoảng thời gian đã định (ví dụ, khoảng 1 giờ, khoảng 2 giờ, khoảng 3 giờ hoặc lâu hơn) ở nhiệt độ không đổi (ví dụ, 4°C, nhiệt độ phòng hoặc nhiệt độ ấm hơn (ví dụ, 37°C)). Sáng chế không bị giới hạn ở kháng thể sơ cấp được sử dụng. Trên thực tế, kháng thể bất kỳ có ái lực đặc hiệu với loại vi khuẩn cần theo dõi và/hoặc xác định có thể được sử dụng. Theo một số phương án, kháng thể sơ cấp là kháng thể đa dòng. Theo một số phương án, kháng thể sơ cấp là kháng thể đơn dòng. Theo một số phương án, kháng thể sơ cấp là mảnh kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể sơ cấp là kháng thể liên hợp. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể sơ cấp được liên hợp với biotin. Theo một số phương án, kháng thể sơ cấp là kháng thể đa dòng liên hợp biotin hướng đích *E. coli*. Sau khi ủ kháng thể sơ cấp, các giếng được rửa (ví dụ, một, hai, ba hoặc

nhiều lần) bằng chất đệm rửa (ví dụ, PBS). Chất đệm rửa được loại bỏ, và sau đó kháng thể thứ cấp (ví dụ, có ái lực đặc hiệu với kháng thể sơ cấp được bổ sung vào các giếng. Kháng thể thứ cấp cũng được pha loãng (ví dụ, ở tỷ lệ 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000 hoặc lớn hơn) trong chất đệm phong bế. Sáng chế không bị giới hạn ở loại kháng thể thứ cấp được sử dụng. Theo một số phương án, kháng thể thứ cấp là kháng thể đa dòng. Theo một số phương án, kháng thể thứ cấp là kháng thể đơn dòng. Theo một số phương án, kháng thể thứ cấp là mảnh kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể thứ cấp là kháng thể liên hợp. Theo một số phương án, kháng thể thứ cấp được liên hợp với streptavidin. Theo một số phương án, kháng thể thứ cấp được liên hợp với enzym (ví dụ, peroxidaza, phosphataza, v.v.). Thể tích của kháng thể thứ cấp đã được pha loãng được bổ sung vào các giếng nằm trong khoảng từ khoảng 100 ml đến khoảng 400 ml (ví dụ, 200 ml) và được ủ trong các giếng trong một khoảng thời gian đã định (ví dụ, khoảng 1 giờ, khoảng 2 giờ, khoảng 3 giờ hoặc lâu hơn) ở nhiệt độ không đổi (ví dụ, 4°C, nhiệt độ phòng hoặc nhiệt độ ấm hơn (ví dụ, 37°C)). Sau khi ủ, các giếng được rửa (ví dụ, hai, ba, bốn, năm hoặc nhiều lần) bằng chất đệm rửa (ví dụ, PBS). Sau lần rửa cuối cùng, cơ chất so màu được bổ sung vào các giếng. Sáng chế không bị giới hạn ở loại cơ chất được sử dụng. Cơ chất tiêu biểu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) (ví dụ, đối với kháng thể thứ cấp liên hợp peroxidaza), (p-nitrophenyl phosphat (pNPP) (ví dụ, đối với kháng thể liên hợp phosphat), v.v.). Màu hiện ra trong các giếng và được phát hiện và/hoặc định lượng (ví dụ, bằng quang phổ kế). Sự hiện màu có thể được làm dừng bằng cách bổ sung chất đệm axit (ví dụ, H₂SO₄ 2M) ở thời điểm bất kỳ (ví dụ, để ngăn ngừa việc tạo ra tín hiệu màu rõ rệt (ví dụ, để định lượng sự gắn kết của vi khuẩn)).

Sáng chế không bị giới hạn ở phương pháp dựa trên ELISA cụ thể để phát hiện, nhận diện và xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp trong đó 1) phủ đĩa được tạo cấu trúc để sử dụng trong thử nghiệm dựa trên ELISA bằng mẫu chất nhày, 2) đưa vi khuẩn vào đĩa có phủ chất nhày, 3) đưa kháng thể sơ cấp hướng đích vi

khuẩn vào, 4) đưa kháng thể thứ cấp hướng đích kháng thể sơ cấp vào, 5) đưa cơ chất lỏng vào, và 6) xác định sự bám dính của vi khuẩn. Theo một số phương án, bước rửa được thực hiện giữa một hoặc nhiều bước. Theo một số phương án, dung dịch phong bế được sử dụng giữa một hoặc nhiều bước. Phương pháp này không bị giới hạn ở loại hoặc kiểu cụ thể nào của mẫu chất nhày, vi khuẩn, kháng thể sơ cấp, kháng thể thứ cấp, cơ chất lỏng và/hoặc kỹ thuật xác định sự bám dính của vi khuẩn.

Phương pháp phát hiện, nhận diện và xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày không bị giới hạn ở loại vi khuẩn cụ thể. Trên thực tế, loại vi khuẩn bất kỳ có thể được sử dụng trong sáng chế. Ví dụ về vi khuẩn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes/Chlorobi*, *Chlamydiae/Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Chrysiogenetes*, *Cyanobacteria*, *Deferribacteres*, *Deinococcus-Thermus*, *Dictyoglomi*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *Tenericutes*, *Thermodesulfobacteria* và *Thermotogae*. Theo một số phương án, vi khuẩn là vi khuẩn gây bệnh như, ví dụ, *Bordetella* (ví dụ, *Bordetella pertussis*), *Borrelia* (ví dụ, *Borrelia burgdorferi*), *Brucella* (ví dụ, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*), *Campylobacter* (ví dụ, *Campylobacter jejuni*), *Chlamydia* (ví dụ, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*), *Clostridium* (ví dụ, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*), *Corynebacterium* (ví dụ, *Corynebacterium diphtheriae*), *Enterococcus* (ví dụ, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecum*), *Escherichia* (ví dụ, *Escherichia coli*), *Francisella* (ví dụ, *Francisella tularensis*), *Haemophilus* (ví dụ, *Haemophilus influenzae*), *Helicobacter* (ví dụ, *Helicobacter pylori*), *Legionella* (ví dụ, *Legionella pneumophila*), *Leptospira* (ví dụ, *Leptospira interrogans*), *Listeria* (ví dụ, *Listeria monocytogenes*), *Mycobacterium* (ví dụ, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*), *Mycoplasma* (ví dụ, *Mycoplasma pneumoniae*), *Neisseria* (ví dụ, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*), *Pseudomonas* (ví dụ, *Pseudomonas aeruginosa*), *Rickettsia* (ví

dụ, *Rickettsia rickettsii*), *Salmonella* (ví dụ, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*), *Shigella* (ví dụ, *Shigella sonnei*), *Staphylococcus* (ví dụ, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*), *Streptococcus* (ví dụ, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*), *Treponema* (ví dụ, *Treponema pallidum*), *Vibrio* (ví dụ, *Vibrio cholerae*) và *Yersinia* (ví dụ, *Yersinia pestis*). Theo một số phương án, vi khuẩn được chọn từ chủng *E. Coli* cụ thể đã biết là bám dính mạnh vào chất nhày từ lợn (ví dụ, *E. coli* ALI84 và/hoặc ALI446).

Sáng chế không bị giới hạn ở cách thức cụ thể để điều chế và/hoặc sử dụng vi khuẩn trong phương pháp dựa trên ELISA để phát hiện, nhận diện và xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Theo một số phương án, vi khuẩn được làm bất hoạt trước khi sử dụng (ví dụ, nhằm mục đích bảo quản) và được hoạt hóa trong quá trình thử nghiệm. Phương pháp này không bị giới hạn ở phương pháp cụ thể để làm bất hoạt vi khuẩn. Ví dụ về phương pháp làm bất hoạt vi khuẩn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, làm đông lạnh vi khuẩn, tạo huyền phù vi khuẩn với etanol, tạo huyền phù vi khuẩn với glutaraldehyt, tạo huyền phù vi khuẩn với formalin, chiếu xạ vi khuẩn bằng bức xạ cực tím, tạo huyền phù vi khuẩn với dimethyl sulfoxit và làm nóng vi khuẩn trước khi làm lạnh để bảo quản. Phương pháp này không bị giới hạn ở cách thức cụ thể để hoạt hóa vi khuẩn đã được làm bất hoạt nhằm mục đích thử nghiệm. Theo một số phương án, vi khuẩn được hoạt hóa (ví dụ, được thu hoạch) bằng kỹ thuật ly tâm.

Phương pháp này không bị giới hạn ở cách thức cụ thể để làm bất hoạt vi khuẩn bằng etanol. Theo một số phương án, vi khuẩn được cho sinh trưởng và được chuyển vào môi trường mới (ví dụ, 10% nguyên liệu cấy) trước khi làm bất hoạt (ví dụ, một ngày trước khi làm bất hoạt) bằng etanol. Tiếp theo, vi khuẩn được làm bất hoạt và được bảo quản bằng cách bổ sung etanol trực tiếp vào giống cấy vi khuẩn (ví dụ, đến khoảng nồng độ cuối cùng là 40% theo thể tích (ví dụ, 20% theo thể tích; 30% theo thể tích; 33% theo thể tích; 35% theo thể tích; 37% theo thể tích; 40% theo thể tích; 42% theo thể tích; 45% theo thể

tích; 50% theo thể tích; 60% theo thể tích). Theo một số phương án, vi khuẩn được làm bất hoạt bằng etanol (ví dụ, đến nồng độ cuối cùng khoảng 40% theo thể tích) được bảo quản ở nhiệt độ khoảng +4°C (ví dụ, 2°C; 3°C; 4°C; 5°C; 6°C). Theo một số phương án, vi khuẩn được làm bất hoạt bằng etanol (ví dụ, đến nồng độ cuối cùng khoảng 40% theo thể tích) (ví dụ, được bảo quản ở nhiệt độ khoảng +4°C) được hoạt hóa (ví dụ, được thu hoạch) bằng kỹ thuật ly tâm. Theo một số phương án, vi khuẩn được tạo huyền phù trong nước muối đệm phosphat (ví dụ, PBS) (ví dụ, 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,4 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,2 g KH₂PO₄, định mức đến 1000 ml MilliQ H₂O, độ pH 7,4).

Phương pháp phát hiện, nhận diện và xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày không bị giới hạn ở loại chất nhày cụ thể. Trên thực tế, loại chất nhày bất kỳ có thể được sử dụng theo sáng chế. Theo một số phương án, chất nhày được sử dụng là từ lợn (ví dụ, chất nhày ruột kết lợn) (ví dụ, chất nhày ruột lợn (ví dụ, được cạo từ ruột hồi cận tâm của lợn khoảng một năm tuổi)).

Sáng chế không bị giới hạn ở cách điều chế và/hoặc sử dụng mẫu chất nhày (ví dụ, chất nhày từ lợn) cụ thể trong phương pháp dựa trên ELISA để phát hiện, nhận diện và xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Theo một số phương án, mẫu chất nhày được tạo huyền phù với chất đệm bao phủ. Phương pháp này không bị giới hạn ở thành phần cấu tạo cụ thể của chất đệm bao phủ. Theo một số phương án, chất đệm bao phủ chứa 1,6 g Na₂CO₃ (khô), 2,94 g NaHCO₃, 0,2 g Na-azit, 11 H₂O với độ pH = 9,6 (sau khi trộn các thành phần, giá trị cuối lên đến 9,7).

Theo một số phương án, mẫu chất nhày được phủ lên đĩa (ví dụ, giếng) (ví dụ, đĩa có 96 giếng) (ví dụ, đĩa Maxisorp có 96 giếng) được tạo cấu trúc để sử dụng trong thử nghiệm dựa trên ELISA. Mẫu chất nhày không bị giới hạn ở cách thức cụ thể để phủ lên đĩa được tạo cấu trúc để sử dụng trong thử nghiệm dựa trên ELISA. Theo một số phương án, mẫu chất nhày được phủ trực tiếp lên đĩa ngay trước khi thử nghiệm. Theo một số phương án, mẫu chất nhày được phủ trước lên đĩa để cho phép bảo quản lâu dài trước khi thử nghiệm. Phương pháp này không bị giới hạn ở phương pháp cụ thể để phủ trước đĩa được tạo

cấu trúc để sử dụng trong thử nghiệm dựa trên ELISA bằng mẫu chất nhày (ví dụ, chất nhày ruột lợn). Theo một số phương án, việc phủ trước đĩa được tạo cấu trúc để sử dụng trong thử nghiệm dựa trên ELISA bằng mẫu chất nhày được thực hiện bằng cách phủ đĩa này bằng mẫu chất nhày và sau đó làm đông lạnh đĩa đã được phủ. Theo một số phương án, việc phủ trước đĩa được tạo cấu trúc để sử dụng trong thử nghiệm dựa trên ELISA bằng mẫu chất nhày được thực hiện bằng cách phủ đĩa này bằng mẫu chất nhày và sau đó làm khô đĩa đã được phủ trong không khí. Phương pháp này không bị giới hạn ở cách thức cụ thể để tái hydrat hóa mẫu chất nhày đã được phủ trước lên đĩa được tạo cấu trúc để sử dụng trong thử nghiệm dựa trên ELISA. Theo một số phương án, việc tái hydrat hoá được thực hiện bằng cách cho mẫu tiếp xúc với nước muối đệm phosphat (ví dụ, PBS) (ví dụ, 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KH_2PO_4 , định mức đến 1000 ml MilliQ H_2O , độ pH = 7,4).

Phương pháp phát hiện, nhận diện và xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày không bị giới hạn ở loại kháng thể sơ cấp cụ thể. Theo một số phương án, kháng thể sơ cấp hướng đích vi khuẩn đang được thử nghiệm về sự bám dính vào chất nhày. Theo một số phương án, kháng thể sơ cấp là kháng thể đa dòng liên hợp HRP hướng đích typ huyết thanh kháng nguyên O và K của *E. coli* (số catalô Acris BP2022HRP). Theo một số phương án, kháng thể sơ cấp là kháng thể đa dòng hướng đích typ huyết thanh kháng nguyên O và K của *E. coli* (số catalô Acris BP2022). Theo một số phương án, kháng thể sơ cấp là kháng thể đa dòng liên hợp biotin hướng đích typ huyết thanh kháng nguyên O và K của *E. coli* (số catalô Acris BP1021B).

Phương pháp phát hiện, nhận diện và xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày không bị giới hạn ở loại kháng thể thứ cấp cụ thể. Theo một số phương án, kháng thể thứ cấp được tạo cấu trúc để phát hiện sự liên kết của kháng thể sơ cấp với vi khuẩn liên kết vào chất nhày. Như vậy, theo một số phương án, kháng thể thứ cấp hướng đích kháng thể sơ cấp. Theo một số phương án, kháng thể thứ cấp là kháng thể liên hợp HRP ở thể kháng IgG của dê đã tinh chế ái lực (số catalô Acris R1317HRP). Theo một số phương án,

kháng thể thứ cấp là kháng thể liên hợp AP ở thỏ kháng IgG của dê đã tinh chế ái lực (số catalô Acris R1317AP). Theo một số phương án, kháng thể thứ cấp là kháng thể đa dòng liên hợp FITC hướng đích IgG của dê (H&L) (số catalô Acris R1317F). Theo một số phương án, kháng thể thứ cấp là streptavidin-phosphatase kiềm từ *Streptomyces avidinii* (số catalô Sigma S2890). Theo một số phương án, kháng thể thứ cấp là streptavidin-peroxidaza từ *Streptomyces avidinii* (số catalô Sigma S5512).

Theo một số phương án, kháng thể sơ cấp và kháng thể thứ cấp được pha loãng trong dung dịch phong bế. Phương pháp này không bị giới hạn ở loại dung dịch phong bế cụ thể. Theo một số phương án, dung dịch phong bế là sữa. Theo một số phương án, dung dịch phong bế là huyết thanh bào thai bò (FBS). Theo một số phương án, dung dịch phong bế là albumin huyết thanh bò (BSA).

Phương pháp phát hiện, nhận diện và xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhầy không bị giới hạn ở loại cơ chất lỏng cụ thể. Theo một số phương án, cơ chất lỏng được tạo cấu trúc để tạo điều kiện thuận lợi cho việc phát hiện sự liên kết của kháng thể sơ cấp và/hoặc kháng thể thứ cấp trong thử nghiệm 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) (số catalô Sigma T4319). Theo một số phương án, cơ chất lỏng là TMB dạng động học chậm (sau đây gọi là TMB chậm) (số catalô Sigma T0440). Theo một số phương án, cơ chất lỏng là TMB siêu nhạy (sau đây gọi là TBM super) (số catalô Sigma T4444). Theo một số phương án, cơ chất lỏng là P-nitrophenyl phosphat (số catalô Sigma N7653). Theo một số phương án, cơ chất lỏng là axit 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic) (AzBTS; số catalô Sigma A3219) + chất tăng cường vi giếng ABTS (số catalô Sigma AI227).

Phương pháp phát hiện, nhận diện và xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhầy không bị giới hạn ở kỹ thuật cụ thể để xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhầy. Theo một số phương án, sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhầy được xác định bằng mắt thường (ví dụ, sử dụng kỹ thuật làm hiện ảnh và/hoặc chụp ảnh). Theo một số phương án, sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhầy được xác định bằng thiết bị đọc đĩa ELISA. Theo một số phương án,

kỹ thuật được sử dụng để xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày giúp phát hiện, xác định và định lượng, ví dụ, độ hấp thụ, mật độ huỳnh quang, độ phát quang, độ huỳnh quang phân giải theo thời gian và/hoặc độ phân cực huỳnh quang.

Theo một số phương án, phương pháp phát hiện, nhận diện và xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày (ví dụ, phương pháp dựa trên ELISA) được sử dụng để nhận diện tác nhân điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Theo một số phương án, phương pháp phát hiện, nhận diện và/hoặc xác định sự bám dính của vi khuẩn theo sáng chế được sử dụng để tạo ra và/hoặc nhận diện hợp phần được tối ưu hóa (ví dụ, thể hệ thứ hai, thứ ba, thứ tư hoặc cao hơn) (ví dụ, thể hiện hiệu quả lớn hơn (ví dụ, trong việc ngăn ngừa sự bám dính của vi khuẩn) so với hợp phần thể hệ trước. Phương pháp này không bị giới hạn ở kỹ thuật cụ thể để nhận diện tác nhân điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày và/hoặc tế bào (ví dụ, tế bào biểu mô). Theo một số phương án, tác nhân điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày và/hoặc tế bào (ví dụ, tế bào biểu mô) tiềm năng được đưa đồng thời với mẫu vi khuẩn vào đĩa đã được phủ chất nhày và/hoặc tế bào (ví dụ, tế bào biểu mô) (ví dụ, chất nhày ruột lợn và/hoặc tế bào biểu mô), và sau đó các kháng thể sơ cấp và thứ cấp và cơ chất lỏng được đưa vào. Theo một số phương án, việc xác định hoạt tính điều biến của tác nhân được thực hiện thông qua việc so sánh sự bám dính của vi khuẩn trong điều kiện có và không có tác nhân. Ví dụ, tác nhân làm tăng sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày và/hoặc tế bào (ví dụ, tế bào biểu mô) được xác định là, ví dụ, tác nhân tạo điều kiện thuận lợi cho sự bám dính của loại vi khuẩn cụ thể vào loại chất nhày và/hoặc tế bào cụ thể (ví dụ, tế bào biểu mô). Tác nhân làm giảm sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày và/hoặc tế bào (ví dụ, tế bào biểu mô) được xác định là, ví dụ, tác nhân ức chế sự bám dính của loại vi khuẩn cụ thể vào loại chất nhày và/hoặc tế bào cụ thể (ví dụ, tế bào biểu mô). Phương pháp này không bị giới hạn ở loại hoặc kiểu tác nhân tiềm năng cụ thể. Theo một số phương án, tác nhân, ví dụ, là phân tử có trong tự nhiên, phân tử thu được bằng cách tổng hợp hoặc phân tử thu được theo cách tái tổ hợp.

Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng trước một hoặc nhiều tác nhân đã biết là điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày hoặc tế bào biểu mô làm biện pháp phòng ngừa hoặc ngăn ngừa. Ví dụ, theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng trước một hoặc nhiều tác nhân đã biết là ức chế sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Phương pháp theo sáng chế không bị giới hạn ở loại tác nhân cụ thể bất kỳ đã biết là ức chế sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày và/hoặc tế bào (ví dụ, tế bào biểu mô). Ví dụ, theo một số phương án, tác nhân đã biết là ức chế sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày là Bio-Mos (ví dụ, mannoprotein thu được từ thành tế bào của *Saccharomyces cerevisiae*), mặc dù sáng chế không bị giới hạn như vậy. Theo một số phương án, tác nhân đã biết là ức chế sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày được nhận diện bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên ELISA theo sáng chế. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng đồng thời một hoặc nhiều tác nhân đã biết là tăng cường sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Phương pháp này không bị giới hạn ở loại tác nhân cụ thể đã biết là tăng cường sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Theo một số phương án, tác nhân đã biết là tăng cường sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày được nhận diện bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên ELISA theo sáng chế.

Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng đồng thời một hoặc nhiều tác nhân đã biết là điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Ví dụ, theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng đồng thời một hoặc nhiều tác nhân đã biết là ức chế sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Phương pháp này không bị giới hạn ở loại tác nhân cụ thể đã biết là ức chế sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Theo một số phương án, tác nhân đã biết là ức chế sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày là Bio-Mos (ví dụ, mannoprotein thu được từ thành tế bào của *Saccharomyces cerevisiae*). Theo một số phương án, tác nhân đã biết là ức chế sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày được nhận diện bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên ELISA theo sáng chế. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng đồng thời một hoặc nhiều tác nhân đã biết là tăng cường sự bám

dính của vi khuẩn vào chất nhày. Phương pháp này không bị giới hạn ở loại tác nhân cụ thể đã biết là tăng cường sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Theo một số phương án, tác nhân đã biết là tăng cường sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày được nhận diện bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên ELISA theo sáng chế.

Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc hậu sử dụng một hoặc nhiều tác nhân đã biết là điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày hoặc tế bào biểu mô sau khi bệnh lây nhiễm đã được loại bỏ. Ví dụ, theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc hậu sử dụng một hoặc nhiều tác nhân đã biết là ức chế sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày và/hoặc tế bào (ví dụ, tế bào biểu mô). Phương pháp này không bị giới hạn ở loại tác nhân cụ thể đã biết là ức chế sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Theo một số phương án, tác nhân đã biết là ức chế sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày là Bio-Mos (ví dụ, mannoprotein thu được từ thành tế bào của *Saccharomyces cerevisiae*). Theo một số phương án, tác nhân đã biết là ức chế sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày được nhận diện bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên ELISA theo sáng chế. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng đồng thời một hoặc nhiều tác nhân đã biết là tăng cường sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Phương pháp này không bị giới hạn ở loại tác nhân cụ thể đã biết là tăng cường sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Theo một số phương án, tác nhân đã biết là tăng cường sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày được nhận diện bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên ELISA theo sáng chế.

Theo một số phương án, thử nghiệm theo sáng chế được sử dụng để nhận diện và/hoặc xác định hợp chất chống bám dính đối với vi khuẩn đường ruột và/hoặc đường tiết niệu (ví dụ, vi khuẩn cư trú ở bề mặt niêm mạc của đường ruột và/hoặc đường tiết niệu). Theo một số phương án, hợp chất chống bám dính được nhận diện để sử dụng trong ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh và/hoặc dấu hiệu và/hoặc triệu chứng của bệnh (ví dụ, bệnh nhiễm khuẩn *Salmonella*, bệnh viêm tử cung, v.v. (ví dụ, ở động vật (ví dụ, động vật có khả

năng sinh sản như bò sữa, lợn nái, v.v.))). Theo một số phương án, thử nghiệm theo sáng chế có thể được tiến hành ở nơi bất kỳ mà có thể sử dụng được thiết bị đọc vi đĩa, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, trong phòng thí nghiệm (ví dụ, phòng thí nghiệm thuộc trường đại học, phòng thí nghiệm tư nhân, phòng thí nghiệm công cộng hoặc loại phòng thí nghiệm khác), trong thực địa (ví dụ, tại nông trại, trang trại hoặc địa điểm của người sử dụng thử nghiệm), v.v.. Theo một số phương án, thử nghiệm và/hoặc các thành phần của thử nghiệm được bán trên thị trường và được sử dụng bởi người sử dụng cuối (ví dụ, người mua thử nghiệm) trong phòng thí nghiệm riêng của người sử dụng cuối (ví dụ, để kiểm tra hiệu quả, tính năng và/hoặc tính nhất quán của sản phẩm (ví dụ, hợp chất chống bám dính)). Theo đó, sáng chế đề xuất hợp phần và phương pháp cho phép người sử dụng thử nghiệm thực hiện việc tự xác định chất lượng của hợp chất (ví dụ, hợp chất chống bám dính) tại địa điểm của người sử dụng (ví dụ, tại vị trí sử dụng hợp chất chống bám dính (ví dụ, BIO-MOS)). Theo một số phương án, thông tin (ví dụ, hiệu quả, chất lượng, tính nhất quán, v.v.) liên quan tới hợp chất chống bám dính được tạo ra bằng cách sử dụng thử nghiệm theo sáng chế được thu gom. Theo một số phương án, thông tin được thu gom bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu (ví dụ, cơ sở dữ liệu trực tuyến) hoặc thư từ. Theo một số phương án, thông tin và/hoặc dữ liệu thu gom được liên quan tới hợp chất chống bám dính (ví dụ, hiệu quả, chất lượng, tính nhất quán, v.v.) được sử dụng trong chương trình kiểm soát chất lượng. Theo một số phương án, thông tin và/hoặc dữ liệu thu gom được liên quan tới hợp chất chống bám dính (ví dụ, hiệu quả, chất lượng, tính nhất quán, v.v.) được sử dụng bởi nhà cung cấp và/hoặc nhà sản xuất hợp chất chống bám dính để giám sát hoạt tính của hợp chất. Theo một số phương án, thông tin và/hoặc dữ liệu thu gom được liên quan tới hợp chất chống bám dính (ví dụ, hiệu quả, chất lượng, tính nhất quán, v.v.) được sử dụng với dữ liệu về sức khỏe động vật thu gom được tại địa điểm sử dụng hợp chất chống bám dính (ví dụ, để cung cấp thông tin liên quan đến hiệu năng của động vật). Theo một số phương án, dạng vật lý được ưu tiên của tác nhân được nhận diện bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên ELISA theo sáng chế (ví dụ, được nhận diện là tác nhân điều biến sự bám dính của vi

khuẩn vào chất nhày) là bột khô chảy tự do thích hợp để đưa trực tiếp vào thức ăn động vật hoặc để làm chất bổ sung trực tiếp cho động vật. Theo các phương án khác, dạng vật lý được ưu tiên của tác nhân được nhận diện bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên ELISA theo sáng chế (ví dụ, được nhận diện là tác nhân điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày) là chất lỏng hoặc bột nhão được sử dụng sau khi tạo viên hoặc thông qua nước uống.

Hợp phần theo sáng chế chứa tác nhân được nhận diện bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên ELISA theo sáng chế (ví dụ, được nhận diện là tác nhân điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày) có thể được bổ sung vào thức ăn bất kỳ có trên thị trường cho vật nuôi, động vật bầu bạn, cá và động vật vỏ giáp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, khẩu phần hỗn hợp hoàn chỉnh (TMR), (các) thức ăn cho súc vật, (các) viên, (các) chất cô, (các) sản phẩm đồng thời trộn sẵn, (các) hạt, (các) bã chung cất rượu, ri đường, (các) sợi, cò cho gia súc, cò, cò khô, (các) nhân hạt, lá, bột xay thô, (các) chất tan và (các) chất bổ sung. Hợp phần theo sáng chế chứa tác nhân được nhận diện bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên ELISA theo sáng chế (ví dụ, được nhận diện là tác nhân điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày) được kết hợp trực tiếp vào thức ăn động vật (ví dụ, thức ăn dạng viên có trên thị trường). Khi được kết hợp trực tiếp vào thức ăn động vật, hợp phần chứa tác nhân được nhận diện bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên ELISA theo sáng chế có thể được bổ sung vào thức ăn cho động vật, cá hoặc động vật vỏ giáp với lượng nằm trong khoảng từ 0,0125% đến khoảng 0,4% khối lượng của thức ăn. Theo một số phương án, hợp phần được bổ sung vào thức ăn cho động vật, cá, động vật vỏ giáp với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 0,025% đến khoảng 0,2% khối lượng của thức ăn. Theo cách khác, hợp phần theo sáng chế được cấp trực tiếp vào động vật dưới dạng chất bổ sung (ví dụ, với lượng nằm trong khoảng từ 2,5 đến khoảng 20 gam cho mỗi động vật mỗi ngày). Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu rằng lượng hợp phần được cấp sẽ thay đổi tùy thuộc loài động vật, kích thước và loại thức ăn mà hợp phần theo sáng chế được bổ sung vào đó.

Hợp phần theo sáng chế chứa tác nhân được nhận diện bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên ELISA theo sáng chế (ví dụ, được nhận diện là tác nhân điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày) có thể được cấp cho động vật bất kỳ, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, động vật nhai lại và loài ngựa. Khi được trộn với thức ăn hoặc được cấp dưới dạng chất bổ sung, hợp phần theo sáng chế chứa tác nhân được nhận diện bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên ELISA theo sáng chế (ví dụ, được nhận diện là tác nhân điều biến sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày) sẽ điều biến (ví dụ, làm tăng hoặc làm giảm, tùy thuộc vào tác nhân) sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày ở động vật này, cải thiện hiệu năng và sức khỏe và làm giảm tỷ lệ mắc bệnh.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị rối loạn do vi khuẩn gây bệnh gây ra thông qua việc sử dụng cho đối tượng tác nhân đã biết là điều biến (ví dụ, ức chế, tạo điều kiện thuận lợi) sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Theo một số phương án, tác nhân được nhận diện bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên ELISA theo sáng chế. Theo một số phương án, rối loạn được gây ra bởi *Bacillus anthracis* (ví dụ, bệnh than da, bệnh than phổi, bệnh than dạ dày-ruột), và theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng đồng thời penixilin, doxyxycyclin và/hoặc xiprofloxacin. Theo một số phương án, rối loạn được gây ra bởi *Bordetella pertussis* (ví dụ, chứng ho gà, bệnh viêm phổi thứ phát do vi khuẩn), và theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng đồng thời các chất kháng sinh phân tử macrolit (ví dụ, azithromyxin, erythromyxin, clarithromyxin). Theo một số phương án, rối loạn được gây ra bởi *Borrelia burgdorferi* (ví dụ, bệnh Lyme), và theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng đồng thời xephalosporin, amoxixilin và/hoặc doxyxycyclin. Theo một số phương án, rối loạn được gây ra bởi vi khuẩn gây bệnh *Brucella* (ví dụ, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*) (ví dụ, bệnh Brucella), và theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng đồng thời doxyxycyclin, streptomycin và/hoặc gentamycin. Theo một số phương án, rối loạn được gây ra bởi *Campylobacter jejuni* (ví dụ, bệnh viêm ruột cấp tính), và

theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng đồng thời xiprofloxacin. Theo một số phương án, rối loạn được gây ra bởi *Chlamydia pneumoniae* (ví dụ, bệnh lây nhiễm đường hô hấp mắc phải từ cộng đồng), và theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng đồng thời doxyxycyclin và/hoặc erythromyxin. Theo một số phương án, rối loạn được gây ra bởi *Chlamydia psittaci* (ví dụ, bệnh sốt vệt), và theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng đồng thời tetraxycyclin, doxyxycyclin và/hoặc erythromyxin. Theo một số phương án, rối loạn được gây ra bởi *Chlamydia trachomatis* (ví dụ, bệnh viêm niệu đạo không do lậu cầu (Nongonococcal urethritis - NGU), bệnh mắt hột, bệnh viêm màng kết thể vùi ở trẻ sơ sinh (inclusion conjunctivitis of the newborn - ICN), bệnh Nicolas-Favre (bệnh u hạt lympho sinh dục, bệnh hột xoài, LGV)), và theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc sử dụng đồng thời azithromyxin, erythromyxin, tetraxycyclin và/hoặc doxyxycyclin. Theo một số phương án, rối loạn được gây ra bởi *Clostridium botulinum* (ví dụ, chứng ngộ độc thịt), *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *clostridium tetani* (ví dụ, bệnh uốn ván), *Corynebacterium diptheriae* (ví dụ, bệnh bạch hầu), *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecum*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis* (ví dụ, bệnh Tularemia), *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila* (ví dụ, bệnh Legionnaire), *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae* (ví dụ, bệnh Hansen), *Mycobacterium tuberculosis* (ví dụ, bệnh lao), *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsii*, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholerae* và *Yersinia pestis* (ví dụ, bệnh dịch hạch).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất bộ kit được tạo cấu trúc để cho phép người sử dụng thực hiện phương pháp theo sáng chế (ví dụ, phương pháp phát hiện, nhận diện và xác định sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày). Theo một số phương án, bộ kit chứa một hoặc nhiều thành phần sau,

mẫu chất nhày, đĩa được phủ mẫu chất nhày, vi khuẩn, kháng thể sơ cấp, kháng thể thứ cấp, cơ chất lỏng, dung dịch rửa, thiết bị được tạo cấu trúc để giải nghĩa thử nghiệm dựa trên ELISA, hướng dẫn, tác nhân đã biết là làm giảm sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày (ví dụ, Bio-Mos) (ví dụ, tác nhân được nhận diện bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên ELISA theo sáng chế), tác nhân đã biết là làm tăng sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày (ví dụ, tác nhân được nhận diện bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên ELISA theo sáng chế) và chất điều trị bổ sung (ví dụ, chất kháng sinh).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ nêu dưới đây được đưa ra để chứng minh và minh họa thêm một số phương án và khía cạnh được ưu tiên của sáng chế và không được hiểu là làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1 - Nguyên liệu và phương pháp được sử dụng trong ELISA so màu so với kỹ thuật phát hiện sự bám dính của vi khuẩn vào bộ phận ruột dựa vào phóng xạ

Chủng vi khuẩn. Hai chủng *E. coli* được chọn cho kế hoạch phát triển: *E. coli* ALI84 và ALI446. Chủng nêu trước được phân lập ban đầu từ gia cầm bị bệnh và chủng nêu sau được phân lập từ lợn mắc bệnh tiêu chảy. Các chủng này được chọn vì chúng thể hiện sự bám dính vào chất nhày của lợn. Các vi khuẩn này được cho sinh trưởng trong canh trường LB và được chuyển sang môi trường mới (giống cấy:môi trường 1:10) vào ngày trước khi thử nghiệm. Số lượng vi khuẩn được ước tính theo thời gian nuôi cấy.

Kháng thể. Các kháng thể được mua từ Acris Antibodies GmbH, Đức và Sigma Aldrich, Đức. Các kháng thể sơ cấp bao gồm: kháng thể đa dòng liên hợp HRP hướng đích typ huyết thanh kháng nguyên O và K của *E. coli* (số catalô Acris BP2022HRP); kháng thể đa dòng hướng đích typ huyết thanh kháng nguyên O và K của *E. coli* (số catalô Acris BP2022); và kháng thể đa dòng liên hợp biotin hướng đích typ huyết thanh kháng nguyên O và K của *E. coli* (số catalô Acris BP1021B).

Các kháng thể thứ cấp bao gồm: kháng thể liên hợp HRP ở thỏ kháng IgG của dê đã tinh chế ái lực (số catalô Acris R1317HRP); kháng thể liên hợp AP ở thỏ kháng IgG của dê đã tinh chế ái lực (số catalô Acris R1317AP); kháng thể đa dòng liên hợp FITC hướng đích IgG của dê (H&L) (số catalô Acris R1317F); streptavidin-phosphatasa kiềm từ *Streptomyces avidinii* (số catalô Sigma S2890); streptavidin-peroxidaza từ *Streptomyces avidinii* (số catalô Sigma S5512). Cơ chất ELISA được mua dưới dạng dung dịch dùng sẵn từ Sigma-Aldrich, Đức: 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB) (số catalô Sigma T4319); TMB dạng động học chậm (sau đây gọi là TMB chậm) (số catalô Sigma T0440); TMB siêu nhạy (sau đây gọi là TMB super) (số catalô Sigma T4444); P-nitrophenyl phosphat (số catalô Sigma N7653); axit 2,2'-azino-bis(3-etylbenzothiazolin-6-sulfonic) (AzBTS; số catalô Sigma A3219) + chất tăng cường vi giếng ABTS (số catalô Sigma AI227).

Chất đệm. Ban đầu, chất đệm HEPES-Hanks (độ pH = 7,4) được sử dụng để rửa các giếng, ngoại trừ lần rửa cuối cùng trong đó PBS được sử dụng để tránh làm xáo trộn HEPES-Hanks đã được nhuộm màu đỏ trong ELISA. Theo một số phương án, PBS (nước muối được đệm phosphat, độ pH = 7,4) được sử dụng trong tất cả các bước thay cho chất đệm HEPES-Hanks.

Đĩa. Đối với thử nghiệm ELISA, các đĩa miễn dịch có 96 giếng được sử dụng (Maxisorp, Nunc, Đan mạch, sau đây được gọi là “đĩa Maxisorp”). Đối với thử nghiệm nhấp nháy, các đĩa vi chuẩn độ polyetylen terephthalat được sử dụng (đĩa mẫu PET có 96 giếng, 1450-401; Wallac Oy, Turku; được gọi ở đây là “đĩa mềm”) để sử dụng trong máy đếm độ nhấp.

Thử nghiệm liên kết/gắn kết phóng xạ thông thường được mô tả dưới đây được sử dụng làm đối chứng cho ELISA so màu.

Đánh dấu vi khuẩn bằng phóng xạ cho thử nghiệm gắn kết phóng xạ. Vi khuẩn được cho sinh trưởng qua đêm ở nhiệt độ +37°C và huyền phù vi khuẩn được pha loãng 1:10 vào mẻ LB mới và metyl-1,-2,-3H thymidin (117 I-ICi/mmol; Amersham) được bổ sung. Vi khuẩn được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ +37°C và được thu gom bằng cách ly tâm trong 5 phút ở tốc độ 3000 g. Lốp

lắng kết vi khuẩn được tái huyền phù trong chất đệm HEPES-Hanks hoặc PBS và được sử dụng trong thử nghiệm gắn kết.

Thử nghiệm gắn kết phóng xạ. 200 μ l huyền phù vi khuẩn đã được pha loãng được bổ sung trong các giếng vi chuẩn độ và các đĩa được ủ trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ $+37^{\circ}\text{C}$. Các tế bào không liên kết được loại bỏ bằng cách rửa ba lần bằng 300 μ l chất đệm HEPES-Hanks hoặc PBS. 250 μ l chất lỏng nhấp nháy được bổ sung và tính phóng xạ được đo bằng máy đếm độ nhấp.

Tách và cố định chất nhày. Các đĩa được phủ bằng các nồng độ khác nhau của chất nhày từ các động vật khác nhau. Chất nhày từ ruột hồi cận tâm của lợn 1 năm tuổi được sử dụng, trừ khi có chỉ dẫn khác. Chất nhày được cạo từ bề mặt của ruột và được rửa. Chất chiết chất nhày thô được bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng. Để phủ, nồng độ protein của chất nhày được điều chỉnh đến 0,0 - 0,2 mg/ml bằng cách sử dụng chất đệm natri cacbonat (chất đệm bao phủ, độ pH = 9,6), và nồng độ chất nhày tối ưu đối với sự bám dính của vi khuẩn được thử nghiệm. Dung dịch chất nhày được cố định trên đĩa bằng cách đưa 300 μ l hoặc 200 μ l chất nhày vào mỗi giếng 350 μ l. Sau đó, đĩa được ủ ở nhiệt độ $+4^{\circ}\text{C}$ qua đêm. Chất nhày dư được loại bỏ khỏi các giếng vi chuẩn độ bằng cách rửa hai lần bằng 300 μ l chất đệm HEPES-Hanks hoặc PBS.

Phương pháp vi ly tâm được sử dụng trong thử nghiệm sự hiện màu không đặc hiệu bởi *E. coli* với các cơ chất ELISA. Giống cấy *E. coli* mới ($\sim 10^8$ vi khuẩn/ml) được chia vào các ống vi ly tâm ($\sim 10^7$ /ống). Các ống được ly tâm trong 5 phút/3000g, và dịch nổi bề mặt được loại bỏ. Vi khuẩn được tạo huyền phù vào 700 μ l cơ chất ELISA. Độ hấp thụ của huyền phù được đọc bằng quang phổ kế ở 370, 405 và 630 nm sau năm phút và sau đó là sau mỗi 15 phút cho đến khi đủ 3 giờ.

Phương pháp FITC được sử dụng trong thử nghiệm tính đặc hiệu của kháng thể sơ cấp. Tính đặc hiệu của kháng thể sơ cấp (kháng thể đa dòng kháng *E. coli*, BP2022, tương thích với kháng thể thứ cấp liên hợp FITC) được kiểm tra bằng kính hiển vi huỳnh quang. 10^8 vi khuẩn được đưa vào mỗi ống vi ly tâm và được rửa ba lần bằng 1 ml PBS (và được ly tâm 3000g/5 phút giữa các

lần rửa). Kháng thể sơ cấp được pha loãng đến 1:100, 1:500, 1:1000 trong 1% BSA/PBS được đưa vào mỗi ống và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 45 phút. 1% BSA/PBS được sử dụng làm đối chứng âm. Vi khuẩn được rửa ba lần bằng PBS và kháng thể thứ cấp (kháng thể liên hợp FITC ở thỏ kháng IgG của dê) được đưa vào trong các dung dịch pha loãng 1:100, 1:500 và 1:1000 trong 1% BSA/PBS. Các ống được ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Vi khuẩn được rửa hai lần bằng PBS và được lọc bằng màng Whatman BLACK NUCLEPORE, kích thước lỗ 0,2 μm . Các màng lọc được rửa hai lần bằng PBS, được chuyển lên bản kính kính hiển vi và được gắn kín bằng giọt dầu ngâm. Các bản kính được giữ trong chỗ tối.

Quy trình ELISA cơ bản. Quy trình cơ bản được mô tả dưới đây, nhưng các điều kiện chính xác trong từng thử nghiệm được mô tả theo các kết quả nêu dưới đây. Từ 0 đến 10^7 vi khuẩn đã được tạo huyền phù trong chất đệm được đưa vào các giếng có phủ chất nhày. Trừ khi có chỉ dẫn khác, nồng độ chất nhày 0,1 mg/ml và 10^7 vi khuẩn/giếng được sử dụng. Trong một số thử nghiệm, Bio-Mos (Alltech, Nicholasville, KY) được bổ sung cùng với vi khuẩn đã được pha loãng trong PBS ở các nồng độ được mô tả dưới đây.

Các đĩa được ủ ở nhiệt độ +37°C hoặc nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Các đĩa này được rửa bằng chất đệm (PBS hoặc HEPES-Hanks, 300 μl), ba lần. Liên kết không đặc hiệu được ngăn chặn bằng sữa, huyết thanh bào thai bò hoặc BSA (albumin huyết thanh bò) trong PBS. Các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ +37°C hoặc nhiệt độ phòng. Chất đệm phong bế được loại bỏ và kháng thể sơ cấp được đưa vào các dung dịch pha loãng ở tỷ lệ nằm trong khoảng từ 1:200 đến 1:100.000. Kháng thể được pha loãng trong chất đệm phong bế. Các đĩa lại được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ +37°C hoặc nhiệt độ phòng và được rửa ba lần bằng PBS hoặc HEPES-Hanks. Kháng thể thứ cấp được bổ sung vào các dung dịch pha loãng ở tỷ lệ nằm trong khoảng từ 1:1000 đến 1:100.000 trong chất đệm phong bế. Các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ +37°C hoặc nhiệt độ phòng. Sau lần ủ cuối cùng, các đĩa được rửa năm lần bằng PBS (300 μl /giếng) để đảm bảo rằng tất cả các kháng thể thứ cấp tự do đều được loại bỏ hoàn toàn.

Cơ chất được bổ sung và đĩa được đọc bằng thiết bị đọc ELISA và/hoặc được chụp ảnh.

Ví dụ 2 - Nồng độ của chất nhày của ruột

Để xác định nồng độ của chất nhày trong huyền phù bao phủ, các giếng được phủ bằng các huyền phù với nồng độ chất nhày khác nhau. Nồng độ chất nhày là biến số được xác định là quan trọng đối với độ tin cậy của thử nghiệm (ví dụ, nếu nồng độ chất nhày quá thấp thì vi khuẩn có thể liên kết với đĩa thay vì chất nhày). Phương pháp cơ bản: thử nghiệm gắn kết phóng xạ (xem phần Nguyên liệu và phương pháp nêu trên). Đĩa: đĩa PET loại 96 giếng (đĩa mềm); chất nhày: ruột hồi cận tâm của lợn, 0,0-0,2 mg protein/ml chất đệm bao phủ; vi khuẩn: chủng *E. coli* ALI84 trên một đĩa, chủng *E. coli* ALI446 trên đĩa còn lại; 10^7 vi khuẩn/giếng. Chất đệm: HEPES-Hanks; phong bế: không phong bế; kháng thể sơ cấp: không có; kháng thể thứ cấp: không có; nhiệt độ ủ: +37°C. Mức độ ảnh hưởng của nồng độ chất nhày của *E. coli* ALI 84 và ALI446, được xác định theo vi khuẩn được đánh dấu phóng xạ được thể hiện trên Fig.1.

Fig.1 cho thấy rằng vi khuẩn thể hiện sự bám dính tối ưu vào các giếng không có chất nhày. Để xác nhận rằng vi khuẩn gắn vào chất nhày và không gắn vào đĩa, nồng độ chất nhày tương đối cao (0,1 mg protein/ml chất đệm bao phủ) được xác định và được chọn cho các thử nghiệm tiếp theo. Như vậy, theo một số phương án, sáng chế sử dụng nồng độ chất nhày thích hợp để phủ các giếng (ví dụ, lượng làm giảm và/hoặc loại bỏ sự liên kết của vi khuẩn vào các giếng của đĩa).

Ví dụ 3 - Phân tích tác dụng ức chế của các kháng thể sơ cấp đối với sự bám dính của vi khuẩn

Để kiểm tra xem các kháng thể sơ cấp có gây ảnh hưởng đối với sự bám dính của vi khuẩn hay không, vi khuẩn trong các giếng có phủ chất nhày được ủ với các dung dịch pha loãng kháng thể nằm trong khoảng từ không có kháng thể đến 1:200. Phương pháp cơ bản: thử nghiệm gắn kết phóng xạ (xem phần Nguyên liệu và phương pháp). Đĩa: đĩa PET loại 96 giếng (đĩa mềm); chất nhày: ruột hồi cận tâm của lợn; vi khuẩn: chủng *E. coli* ALI84 trên một đĩa,

chủng *E. coli* ALI446 trên đĩa còn lại, 10^7 vi khuẩn/giếng; chất đệm: HEPES-Hanks; phong bế: không phong bế; kháng thể sơ cấp: HRP = kháng thể liên hợp HRP kháng *E. coli*; BP2022 = kháng thể không liên hợp kháng *E. coli*, Biotin = kháng thể liên hợp biotin kháng *E. Coli*; kháng thể thứ cấp: không có kháng thể thứ cấp; nhiệt độ ủ: $+37^{\circ}\text{C}$.

Như được thể hiện trên Fig.2 và Fig.3, hai kháng thể sơ cấp đầu tiên khác nhau làm tăng cường sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày ở nồng độ thấp nhất (được pha loãng 1:20000) nhưng làm giảm sự bám dính không đáng kể ở độ pha loãng 1:200. Có thể là vùng Fc của hai kháng thể đầu tiên này ở trạng thái tự do gắn vào chất nhày, trong khi đó sự liên kết của vùng này vào chất nhày bị phong bế bởi biotin trong kháng thể thứ ba. Ở nồng độ thấp, hai kháng thể đầu tiên có thể tác động để gắn kết vi khuẩn và chất nhày (vùng Fab liên kết với vi khuẩn và vùng Fc liên kết với chất nhày). Ở nồng độ cao hơn, (độ pha loãng 1:200), sự liên kết của vi khuẩn vào chất nhày bị giảm vì kháng thể dường như phong bế các vị trí liên kết chất nhày trên bề mặt của vi khuẩn (hoặc các vị trí liên kết vi khuẩn trên chất nhày). Kháng thể liên hợp biotin có tác dụng rất nhỏ; có vẻ là tăng cường sự bám dính. Ngoài ra, trong thử nghiệm này, kháng thể sơ cấp được bổ sung cùng với vi khuẩn, nhưng trong kỹ thuật ELISA gắn kết so màu được mô tả ở đây, vi khuẩn trước tiên được ủ riêng trong 1 giờ. Như vậy, theo một số phương án, mức độ ảnh hưởng của các kháng thể đối với sự bám dính/liên kết của vi khuẩn (ví dụ, kháng thể thực sự làm tăng hoặc làm giảm sự bám dính của vi khuẩn) bị giảm và/hoặc loại bỏ khi vi khuẩn đã gắn vào chất nhày (ví dụ, trong điều kiện không có kháng thể). Ngoài ra, theo một số phương án, huyết thanh bào thai bò hoặc chất phong bế khác có thể được sử dụng để phong bế sự liên kết không đặc hiệu. Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất rằng kháng thể sơ cấp liên hợp HRP và kháng thể sơ cấp không liên hợp làm thay đổi (ví dụ, tăng cường hoặc ức chế) sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày trong thử nghiệm gắn kết phóng xạ thông thường, và thử nghiệm so màu theo sáng chế không bị thay đổi như vậy. Ngoài ra, vì tất cả các kháng thể được thử nghiệm đều có vẻ thích hợp với các phương pháp được mô tả ở đây, nên sáng chế còn đề xuất rằng thử nghiệm

liên kết/gắn kết theo sáng chế cũng thích hợp với nhiều loại kháng thể (ví dụ, kháng thể không liên hợp và kháng thể liên hợp).

Ví dụ 4 - Sự hiện màu không đặc hiệu bởi *E. coli* với các cơ chất ELISA

Khả năng tạo ra phản ứng màu không đặc hiệu với các cơ chất ELISA của hai chủng *E. coli* được chọn được thử nghiệm. Thử nghiệm được tiến hành trong ống vi ly tâm có ủ vi khuẩn với cơ chất. Phương pháp vi ly tâm (xem ví dụ 1. Nguyên liệu và phương pháp) được sử dụng.

Như được thể hiện trên Fig.4 và Fig.5, màu được tạo ra bởi vi khuẩn là rất nhỏ và tương đương với sự hiện màu của chỉ riêng cơ chất. Trong khoảng thời gian từ khoảng 5 đến 30 phút, không có cơ chất nào tạo ra phản ứng màu đáng kể. Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất rằng mỗi trong số các cơ chất ELISA được mô tả ở đây là thích hợp để sử dụng trong thử nghiệm bám dính/gắn kết theo sáng chế.

Ví dụ 5 - Sự hiện màu không đặc hiệu bởi chất nhày với các cơ chất ELISA

Năm mẫu chất nhày từ lợn một năm tuổi được kiểm tra về khả năng tạo ra phản ứng màu không đặc hiệu với các cơ chất ELISA. ELISA được tiến hành như được nêu trong phần Nguyên liệu và phương pháp trong ví dụ 1. Đĩa: đĩa mềm; chất nhày: ruột hồi cận tâm của lợn, ruột hồi ở giữa và xa tâm và ruột kết cận tâm và xa tâm; vi khuẩn: không có vi khuẩn; kháng thể: không có kháng thể; chất đệm: PBS; phong bế: 1% BSA/PBS 1 giờ; nhiệt độ ủ: +37°C; cơ chất: tất cả sáu cơ chất được thể hiện trên Fig.6.

Như được thể hiện trên Fig.6, chất nhày từ ruột hồi lợn mà không phải từ ruột kết tạo ra phản ứng màu với para-nitrophenyl phosphat (pNPP). Các cơ chất khác không phản ứng với chất nhày. Sự tạo màu của pNPP có thể là do phosphatase nội sinh có mặt trong chất nhày của ruột hồi. Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất rằng chất nhày từ ruột hồi lợn mà không phải từ ruột kết tạo ra phản ứng màu với para-nitrophenyl phosphat (pNPP). Các cơ chất khác không phản ứng với chất nhày.

Ví dụ 6 - Thử nghiệm về tính đặc hiệu của kháng thể sơ cấp

Tính đặc hiệu của kháng thể sơ cấp được kiểm tra bằng kính hiển vi huỳnh quang. Nói một cách ngắn gọn, vi khuẩn được phong bế bằng BSA, được ủ trước tiên với kháng thể sơ cấp và sau đó với kháng thể thứ cấp liên hợp FITC. Sự phát huỳnh quang được quan sát bằng mắt thường bằng kính hiển vi huỳnh quang. Phương pháp FITC được mô tả trong Nguyên liệu và phương pháp trong ví dụ 1 được sử dụng.

Tất cả các mẫu chứa kháng thể thứ cấp đều thể hiện sự phát huỳnh quang nhất định ngay cả khi không có kháng thể sơ cấp, và nồng độ của kháng thể thứ cấp tạo ra các khác biệt rõ rệt nhất giữa các mẫu. Do đó, theo một số phương án, sáng chế đề xuất rằng liên kết không đặc hiệu có thể được làm suy yếu và/hoặc được ức chế bằng cách sử dụng huyết thanh bào thai bò (FBS) và/hoặc albumin huyết thanh bò (BSA).

Ví dụ 7 - Sự liên kết không đặc hiệu của các kháng thể vào chất nhày hoặc đĩa

Để kiểm tra xem các kháng thể có liên kết không đặc hiệu với đĩa hoặc chất nhày không có vi khuẩn hay không, các kháng thể sơ cấp và thứ cấp được bổ sung vào đĩa có phủ chất nhày. Kỹ thuật ELISA được mô tả trong ví dụ 1 được sử dụng. BSA được sử dụng để phong bế sự liên kết không đặc hiệu. Đĩa: đĩa Maxisorp; chất nhày: ruột hồi cận tâm của lợn; vi khuẩn: không có vi khuẩn; phong bế: 1% BSA trong PBS; chất đệm: PBS; kháng thể sơ cấp: xem bảng 1; 200 ul của các dung dịch pha loãng khác nhau trong 1% BSA trong PBS; kháng thể thứ cấp: xem bảng 1; 200 ul của các dung dịch pha loãng khác nhau trong 1% BSA trong PBS; nhiệt độ ủ: +37°C; cơ chất: TMB (đối với kháng thể thứ cấp liên hợp HRP), pNPP (đối với kháng thể thứ cấp liên hợp AP). Fig.7 và Fig.8 lần lượt thể hiện sự bố trí đĩa để thử nghiệm sự liên kết không đặc hiệu của các kháng thể vào chất nhày hoặc đĩa, và các kết quả về sự liên kết không đặc hiệu, một cách tương ứng. Không có vi khuẩn được sử dụng trong thử nghiệm. Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất sự liên kết không đặc hiệu mạnh của các kháng thể vào chất nhày hoặc đĩa. Theo một số phương án, BSA không phải là chất phong bế thích hợp cho thử nghiệm gắn kết theo sáng chế.

Ví dụ 8 - Thử nghiệm chất phong bế để ngăn chặn sự liên kết không đặc hiệu của các kháng thể

Kháng thể thứ cấp liên kết mạnh vào chất nhày/đĩa mà không bổ sung bất kỳ vi khuẩn hoặc kháng thể sơ cấp nào (xem Fig.8). Do đó, sữa và huyết thanh bào thai bò được thử nghiệm thay cho BSA để phong bế sự liên kết không đặc hiệu. Kỹ thuật ELISA cơ bản được mô tả trong ví dụ 1 được sử dụng. Đĩa: đĩa Maxisorp; chất nhày: ruột hồi cận tâm của lợn; phong bế: 5% sữa bột không béo trong PBS hoặc 10% huyết thanh bào thai bò trong PBS trong thời gian 1 giờ ở nhiệt độ +37°C; chất đệm: PBS; kháng thể sơ cấp: xem bảng 2; 200 ul của các dung dịch pha loãng khác nhau trong chất đệm phong bế; kháng thể thứ cấp: xem bảng 2; 200 ul của các dung dịch pha loãng khác nhau trong chất đệm phong bế; kháng thể thứ cấp liên hợp streptavidin được sử dụng ở độ pha loãng là 1:1000 và 1:10000 theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nhiệt độ ủ: +37°C; cơ chất: TMB. Fig.9 thể hiện sự bố trí đĩa cho thử nghiệm. Kháng thể sơ cấp: HRP = kháng thể sơ cấp liên hợp HRP, BP2022 = kháng thể sơ cấp đa dòng không liên hợp kháng *E. coli*; Biotin = kháng thể sơ cấp liên hợp biotin kháng *E. coli*. Kháng thể thứ cấp: HRP = IgG liên hợp HRP; StrHRP = streptavidin được đánh dấu HRP. Không có vi khuẩn nào được sử dụng trong thử nghiệm này.

Như được thể hiện trên Fig.10, huyết thanh bào thai bò phong bế sự liên kết không đặc hiệu hiệu quả hơn so với sữa. Sự liên kết không đặc hiệu là tối thiểu với phức chất biotin-streptavidin và mạnh nhất với kháng thể sơ cấp BP2022. Dựa trên thử nghiệm này, 10% huyết thanh bào thai bò trong PBS được chọn để phong bế trong các thử nghiệm. Như vậy, sáng chế đề xuất rằng 10% huyết thanh bào thai bò trong PBS là chất phong bế thích hợp cho thử nghiệm gắn kết theo sáng chế.

Ví dụ 9 - Sự liên kết của vi khuẩn với đĩa có phủ chất nhày

Việc tối ưu hóa toàn bộ quy trình ELISA (bao gồm cả chất nhày và vi khuẩn) được bắt đầu bằng cách tối ưu hóa độ pha loãng kháng thể và số lượng vi khuẩn/giếng. Kỹ thuật ELISA cơ bản được mô tả trong ví dụ 1 được sử

dụng. Đĩa: đĩa Maxisorp; chất nhầy: ruột hồi cận tâm của lợn; vi khuẩn: chủng *E. coli* ALI84 và ALI446, số lượng vi khuẩn/giếng được thể hiện trên Fig.11. Chất đệm: HEPES-Hanks/PBS; phong bế: 10% huyết thanh bào thai bò trong PBS; kháng thể sơ cấp: 200 ul của các dung dịch pha loãng khác nhau trong chất đệm phong bế (Fig.11 và Fig.13); kháng thể thứ cấp: 200 ul của các dung dịch pha loãng khác nhau trong chất đệm phong bế (Fig.13); nhiệt độ ủ: +37°C; cơ chất: TMB.

Như được thể hiện trên Fig.12 và Fig.14, phức chất biotin-streptavidin đặc hiệu hơn so với kháng thể sơ cấp liên hợp HRP. Không quan sát thấy sự liên kết không đặc hiệu (xem Fig.14, đối chứng, hai hàng riêng biệt). Điều này xác nhận kết quả thu được trong ví dụ 8.

Theo đó, đã xác định được là sẽ chỉ tiếp tục với hỗn hợp biotin-streptavidin. Fig.14 cho thấy rằng độ pha loãng 1:1000 có thể tạo ra phản ứng trên số lượng vi khuẩn thậm chí nhỏ hơn, và do vậy độ pha loãng này được chọn cho các thử nghiệm bổ sung. Độ pha loãng của kháng thể sơ cấp cũng được tối ưu hóa. Fig.14 cho thấy rằng 1:10.000 là độ pha loãng kháng thể thứ cấp (streptavidin-HRP) quá nhỏ để có thể sử dụng để phát hiện số lượng vi khuẩn nhỏ (như vậy, theo một số phương án, độ pha loãng 1:1000 được sử dụng).

Tổ hợp biotin-streptavidin đặc hiệu hơn so với các kháng thể khác và được sử dụng trong các thử nghiệm tiếp theo. Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất rằng 10^7 vi khuẩn/giếng là số lượng vi khuẩn tối ưu để sử dụng trong thử nghiệm gắn kết theo sáng chế, mặc dù số lượng lớn hơn (ví dụ, nhiều hơn 10^7 vi khuẩn/giếng (ví dụ, 10^8 vi khuẩn, 10^9 vi khuẩn, 10^{10} vi khuẩn hoặc nhiều hơn)) hoặc nhỏ hơn (ví dụ, ít hơn 10^7 vi khuẩn/giếng (ví dụ, 10^6 vi khuẩn, 10^5 vi khuẩn, 10^4 vi khuẩn hoặc ít hơn)) cũng có thể được sử dụng. Độ pha loãng 1:1000 - 1:10.000 của kháng thể sơ cấp là tối ưu trong thử nghiệm này, nhưng lượng kháng thể sơ cấp có thể lớn hơn hoặc nhỏ hơn khoảng này. Theo một số phương án, lượng kháng thể sơ cấp được chọn sao cho không hạn chế phản ứng màu.

Ví dụ 10 - Độ tuyến tính của ELISA trong việc phát hiện số lượng vi khuẩn

Để đánh giá khoảng tuyến tính của kỹ thuật ELISA, ELISA được tiến hành với các số lượng vi khuẩn/giếng khác nhau. Kỹ thuật ELISA cơ bản được mô tả trong ví dụ 1 được sử dụng. Đĩa: đĩa Maxisorp; chất nhầy: ruột hồi cận tâm của lợn; vi khuẩn: chủng *E. coli* ALI84, 10^7 vi khuẩn/giếng; chất đệm: PBS; Bio-Mos: không có; phong bế: 10% huyết thanh bào thai bò; kháng thể sơ cấp: kháng thể sơ cấp liên hợp biotin, độ pha loãng 1:1000 trong chất đệm phong bế; kháng thể thứ cấp: streptavidin liên hợp HRP, độ pha loãng 1:1000 trong chất đệm phong bế; nhiệt độ ủ: $+37^{\circ}\text{C}$ đối với một đĩa, nhiệt độ phòng đối với đĩa còn lại; chất phản ứng ở nhiệt độ phòng; cơ chất: TMB.

Độ hấp thụ ở 620 nm so với số lượng vi khuẩn được vẽ đồ thị. Đối với số lượng vi khuẩn lên đến 10^6 vi khuẩn/giếng, mối quan hệ là tuyến tính (xem Fig.16), nhưng từ 10^6 đến 10^8 , đường xu hướng phù hợp gần nhất là logarit (xem Fig.15). Theo đó, sáng chế đề xuất rằng ở số lượng vi khuẩn/giếng nhất định, khả năng liên kết với vi khuẩn của chất nhầy giảm khi các vị trí liên kết trở nên bão hòa.

Như vậy, theo một số phương án, thử nghiệm theo sáng chế là tuyến tính trong một khoảng số lượng tế bào vi khuẩn/giếng (ví dụ, từ 0 đến khoảng 10^6 vi khuẩn trong mỗi giếng). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất cách tính có độ nhạy cao đối với vi khuẩn gắn vào mỗi giếng. Theo một số phương án, phương pháp theo sáng chế được chuẩn hóa (ví dụ, để đạt được kết quả so sánh có thể lặp lại).

Ví dụ 11 - Mức độ ảnh hưởng của Bio-Mos đối với sự bám dính của vi khuẩn

Để kiểm tra độ tuyến tính và độ phân giải của kỹ thuật ELISA, các nồng độ Bio-Mos khác nhau được sử dụng để phong bế sự bám dính của các tế bào vi khuẩn vào chất nhầy. Các kết quả sử dụng ELISA so màu cơ bản được mô tả trong ví dụ 1 được so sánh với các kết quả thu được bằng cách sử dụng thử nghiệm gắn kết phóng xạ cũng được mô tả trong ví dụ 1. Đĩa: đĩa Maxisorp và đĩa mềm; chất nhầy: ruột hồi cận tâm của lợn; vi khuẩn: chủng *E. coli* ALI84 và ALI446, $\sim 10^7$ vi khuẩn/giếng. Huyền phù vi khuẩn được đánh dấu phóng xạ

giống nhau được sử dụng cho cả hai đĩa để đảm bảo rằng các đĩa là giống nhau; chất đệm: HEPES-Hanks, PBS; Bio-Mos: nồng độ 0-20 g/l, được pha loãng trong PBS; phong bế (chỉ ở đĩa Maxisorp): 10% huyết thanh bào thai bò trong PBS; kháng thể sơ cấp (chỉ ở đĩa Maxisorp): kháng thể sơ cấp liên hợp biotin (1:1000 trong chất đệm phong bế); kháng thể thứ cấp (chỉ ở đĩa Maxisorp): streptavidin liên hợp HRP (1:1000 trong chất đệm phong bế); nhiệt độ ủ: +37°C; cơ chất: TMB.

Như được thể hiện trên Fig.17A và Fig.17B, thử nghiệm phóng xạ đã phát hiện thấy các khác biệt về sự bám dính của vi khuẩn khi các nồng độ Bio-Mos khác nhau được sử dụng. Sau khi thực hiện ELISA, cả hai đĩa được đo bằng máy đếm độ nhấp (5 phút/giếng). Fig.17B cho thấy rằng số đếm nhấp nhấp là thấp hơn sau khi thực hiện ELISA, cho thấy rằng vi khuẩn được rửa đi trong quá trình thực hiện ELISA. Tuy nhiên, quan sát thấy tác dụng rõ ràng của Bio-Mos.

Đặc điểm bất ngờ của kỹ thuật ELISA so màu được xác định ở chỗ nó có thể phát hiện được các khác biệt về sự gắn kết giữa các giếng không có vi khuẩn (đối chứng) và các giếng có nồng độ Bio-Mos lớn nhất (với số lượng vi khuẩn nhỏ nhất) (xem Fig.17A), trong khi đó số đếm nhấp nhấp của các giếng có nồng độ Bio-Mos lớn nhất là gần với đối chứng không có vi khuẩn (Fig.15). Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất kỹ thuật ELISA có thể phát hiện được các khác biệt về sự gắn kết/bám dính giữa các giếng có nồng độ Bio-Mos lớn nhất (với số lượng tế bào vi khuẩn nhỏ nhất) và các giếng không có vi khuẩn (đối chứng) (ví dụ, thử nghiệm so màu nhạy hơn nhiều so với thử nghiệm phóng xạ trong khoảng nồng độ này).

Ví dụ 12 - Số lượng vi khuẩn quan trọng để phát hiện tác dụng thay đổi sự gắn kết

Mục đích của thử nghiệm này là nhằm phát hiện số lượng vi khuẩn/giếng để phát hiện mức độ ảnh hưởng của Bio-Mos. Phương pháp cơ bản: ELISA (xem phần Nguyên liệu và phương pháp); đĩa: đĩa Maxisorp; chất nhạy: ruột hồi cận tâm của lợn; vi khuẩn: chủng *E. coli* ALI84 và ALI446, 0-

10^8 vi khuẩn/giếng; Bio-Mos: nồng độ 0-20 g/l được pha loãng trong PBS; chất đệm: PBS; phong bế: 10% huyết thanh bào thai bò; kháng thể sơ cấp: kháng thể sơ cấp liên hợp biotin, độ pha loãng 1:1000 trong chất đệm phong bế; kháng thể thứ cấp: streptavidin liên hợp HRP, độ pha loãng 1:1000 trong chất đệm phong bế; nhiệt độ ủ: $+37^{\circ}\text{C}$; cơ chất: TMB.

Như được thể hiện trên Fig.18-Fig.19, đã xác định được rằng, theo một số phương án, số lượng vi khuẩn/giếng cần vượt quá 10^5 để tạo ra sự khác biệt có thể phát hiện được. Có thể quan sát thấy sự khác biệt rõ ràng khi sử dụng 10^7 vi khuẩn/giếng. 10^8 vi khuẩn/giếng cũng tạo ra sự khác biệt rõ ràng, nhưng phản ứng đạt tới điểm cuối rất nhanh và do đó có thể gây ra biến thiên vì không thể bổ sung cơ chất một cách đồng thời vào tất cả các giếng. Cũng có thể là ở số lượng vi khuẩn/giếng rất cao, nồng độ kháng thể hoặc cơ chất hoặc vị trí liên kết chất nhày trở nên hạn chế. Do vậy, các thử nghiệm tiếp theo được tiến hành với $\sim 10^7$ vi khuẩn/giếng. Với cả hai chủng *E. coli*, nồng độ Bio-Mos rất thấp dường như làm tăng cường sự gắn kết của vi khuẩn vào chất nhày. Như vậy, theo một số phương án, thử nghiệm theo sáng chế đã xác định được rằng mức tương đối thấp (ví dụ, từ khoảng 0,1 đến khoảng 1,0 g/l) của tác nhân ức chế (ví dụ, Bio-Mos) loại bỏ vi khuẩn hiệu quả hơn so với lượng chất lớn hơn.

Ví dụ 13 - Phương pháp rửa cải tiến

Cho đến nay, thiết bị rửa miễn dịch Nunc được sử dụng cho bước rửa, nhưng do sự biến thiên đáng kể giữa các giếng lặp lại, đã xác định được rằng thiết bị này có thể quá mạnh đối với phương pháp này. Do vậy, phương pháp rửa khác đã được thử nghiệm để giảm thiểu sự biến thiên giữa các mẫu. Phương pháp mới này dựa trên việc lắc chất lỏng ra. Phương pháp cơ bản: ELISA (xem phần Nguyên liệu và phương pháp); đĩa: đĩa Maxisorp; chất nhày: ruột tá của gà giò; vi khuẩn: chủng *E. coli* ALI84, 10^7 vi khuẩn/giếng; chất đệm: PBS; Bio-Mos: nồng độ 0, 0,1, 1 và 10, được bổ sung cùng với vi khuẩn; phong bế: 10% huyết thanh bào thai bò; kháng thể sơ cấp: kháng thể sơ cấp liên hợp biotin, 1:1000 trong chất đệm phong bế; kháng thể thứ cấp: streptavidin liên hợp HRP, 1:1000 trong chất đệm phong bế; nhiệt độ ủ: $+37^{\circ}\text{C}$; cơ chất:

TMB. Như được thể hiện trên Fig.20, phương pháp rửa mới (“rửa lắc”) tạo ra các kết quả tốt hơn cho kỹ thuật ELISA. Các tín hiệu tổng cộng lớn hơn, và phát hiện được các khác biệt lớn hơn giữa các nồng độ Bio-Mos khác nhau. Phương pháp mới này cũng nhanh hơn và cho phép thao tác một số đĩa một cách đồng thời. Tuy nhiên, điều quan trọng là phương pháp này được tiến hành trong các điều kiện để tránh trộn lẫn các chất trong giếng. Theo đó, sáng chế đề xuất phương pháp rửa lắc mới tốt hơn so với phương pháp rửa thông thường. Trong phương pháp rửa lắc, chất đệm rửa được bổ sung bằng pipet vào giếng trước khi lắc nhẹ đĩa lộn ngược để làm rỗng giếng mà không cho phép dung dịch chuyển từ giếng này sang giếng kia. Việc này được lặp lại nhiều lần nếu cần.

Ví dụ 14 - Nồng độ của kháng thể sơ cấp

Cho đến nay, độ pha loãng 1:1000 của kháng thể sơ cấp thường được sử dụng trong thử nghiệm phóng xạ để đảm bảo rằng nồng độ kháng thể không làm giới hạn độ nhạy của ELISA. Như vậy, nếu thử nghiệm theo sáng chế được sử dụng trong môi trường quy mô lớn, độ pha loãng kháng thể có thể đóng vai trò quan trọng trong việc triển khai thử nghiệm. Độ pha loãng của kháng thể sơ cấp được thử nghiệm để xác định tính khả thi của việc triển khai thử nghiệm trên quy mô lớn. ELISA cơ bản mô tả trong ví dụ 1 được sử dụng; đĩa: đĩa Maxisorp; chất nhầy: ruột hồi cận tâm của lợn; Bio-Mos: nồng độ 0, 5 và 10 g/l, được pha loãng trong PBS; vi khuẩn: chủng *E. coli* ALI84, $\sim 10^7$ vi khuẩn/giếng; phong bế: 10% huyết thanh bào thai bò trong PBS; kháng thể sơ cấp: 200 μ l kháng thể sơ cấp liên hợp biotin (trong khoảng 1:1000-1:10.000) trong chất đệm phong bế; kháng thể thứ cấp: 200 μ l streptavidin liên hợp HRP (1:1000 trong chất đệm phong bế); nhiệt độ ủ: nhiệt độ phòng; cơ chất: TMB.

Độ pha loãng 1:1000 tạo ra sự phân giải tốt giữa các mức Bio-Mos, mặc dù độ pha loãng nhỏ hơn cũng tạo ra điều này. Như vậy, theo một số phương án, độ pha loãng 1:1000 hoặc nhỏ hơn (ví dụ, 1:900, 1:750, 1:500 hoặc nhỏ hơn) được sử dụng để tạo ra các khác biệt về sự phân giải rõ ràng trong thử nghiệm theo sáng chế. Như vậy, theo một số phương án, độ pha loãng của

kháng thể sơ cấp được chọn sao cho có khả năng làm bão hòa tất cả các vị trí liên kết trên vi khuẩn được thử nghiệm trong thử nghiệm. Theo một số phương án, nếu thử nghiệm theo sáng chế được sử dụng để phát hiện mức độ ảnh hưởng của lượng rất thấp (ví dụ, nồng độ khoảng 0,0001 g/l đến khoảng 1,0 g/l), của tác nhân ức chế gắn kết (ví dụ, Bio-Mos), thì thậm chí độ pha loãng nhỏ hơn của kháng thể sơ cấp cũng có thể được sử dụng (ví dụ, 1:750, 1:500 hoặc nhỏ hơn (ví dụ, để đảm bảo rằng nồng độ của kháng thể không làm giới hạn sự hiện màu). Theo cách khác, theo một số phương án, số lượng vi khuẩn trong mỗi giếng được làm giảm để làm tăng sự tạo màu.

Ví dụ 15 - Thử nghiệm phản ứng của thử nghiệm

Tín hiệu so màu phát triển rất nhanh trong các giếng có số lượng vi khuẩn lớn nhất. Do vậy, có thể xác định được xem liệu diện tích chất nhày nhỏ hơn (ví dụ, có khả năng liên kết ít vi khuẩn hơn (ví dụ, nhờ đó làm giảm cường độ tín hiệu)) có làm giảm cường độ tín hiệu hay không. Cũng có thể xác định được xem liệu có thể làm giảm lượng chất phản ứng bằng cách làm giảm thể tích cần để điền đầy giếng đã được phủ hay không. Các giếng có diện tích chất nhày nhỏ hơn hoạt động tốt, và giới hạn phát hiện của vi khuẩn/giếng là tương tự với các kết quả thu được trong các ví dụ trước đó. Màu phát triển chậm hơn trước đó. Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất rằng thể tích của chất nhày trong một giếng có thể nằm trong khoảng từ khoảng 200 μ l đến khoảng 300 μ l (ví dụ, tùy thuộc vào cường độ tín hiệu mong muốn). Theo một số phương án, thể tích của chất nhày có thể nhỏ hơn 200 μ l (ví dụ, 150 μ l, 100 μ l hoặc nhỏ hơn) hoặc lớn hơn 300 μ l (ví dụ, 350 μ l, 400 μ l hoặc lớn hơn). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất rằng thể tích phủ chất nhày nhỏ hơn cho phép sử dụng ít chất phản ứng hơn (ví dụ, khoảng một nửa lượng chất phản ứng là đủ cho giếng chứa 200 μ l chất nhày so với lượng yêu cầu đối với giếng chứa 300 μ l chất nhày) mà không làm mất tính năng và độ nhạy của thử nghiệm (ví dụ, tín hiệu có thể phát hiện được). Theo đó, sáng chế đề xuất phương pháp và thử nghiệm để duy trì tính năng và độ nhạy của thử nghiệm

trong khi đồng thời làm giảm chi phí có liên quan đến sự cạn kiệt chất phản ứng.

Ví dụ 16 - Nguồn chất nhày

Trong các thử nghiệm được tiến hành trước đó (ví dụ, ví dụ 1-15), chất nhày ruột hồi cận tâm của lợn được sử dụng. Để xác định xem có thể phát hiện so màu với các nguồn chất nhày khác nhau hay không, nhiều nguồn chất nhày khác nhau được thử nghiệm (ví dụ, ruột hồi cận tâm của lợn, ruột kết xa tâm của lợn, ruột tá của gà giò và ruột tịt của gà giò) trong bối cảnh thử nghiệm ELISA được mô tả trong ví dụ 1. Đĩa: đĩa Maxisorp; chất nhày: ruột hồi cận tâm và ruột kết xa tâm của lợn, ruột tá và ruột tịt của gà giò; vi khuẩn: chủng *E. coli* ALI84, 10^7 vi khuẩn/giếng; chất đệm: PBS; Bio-Mos: nồng độ 0, 0,1, 1 và 10, được bổ sung cùng với vi khuẩn; phong bế: 10% huyết thanh bào thai bò; kháng thể sơ cấp: kháng thể sơ cấp liên hợp biotin, độ pha loãng 1:1000 trong chất đệm phong bế; kháng thể thứ cấp: streptavidin liên hợp HRP, độ pha loãng 1:1000 trong chất đệm phong bế; nhiệt độ ủ: +37°C; cơ chất: TMB.

Như được thể hiện trên Fig.21, vi khuẩn thể hiện các mức độ gắn kết khác nhau (ví dụ, cường độ và/hoặc ái lực) tùy thuộc vào loại chất nhày được sử dụng. Ví dụ, vi khuẩn được thử nghiệm gần như thể hiện sự gắn kết vào chất nhày thu được từ ruột tá của gà giò và ruột tịt của gà giò lớn hơn hai lần so với vào chất nhày thu được từ ruột hồi của lợn và ruột kết của lợn. Tuy nhiên, thử nghiệm so màu là nhạy và đủ mạnh để thu được các mức độ bám dính khác nhau của vi khuẩn, cũng như khả năng của chất phong bế (ví dụ, Bio-Mos) để ức chế sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày trong khoảng nồng độ của chất phong bế. Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất thử nghiệm liên kết so màu phi phóng xạ mà có thể sử dụng nhiều loại và/hoặc nguồn chất nhày khác nhau (ví dụ, từ các động vật khác nhau và từ các phần khác nhau của đường tiêu hóa (ví dụ, ruột)).

Ví dụ 17 - Thử nghiệm phóng xạ so với thử nghiệm so màu

Thử nghiệm đặt cạnh nhau được tiến hành để so sánh nguyên liệu và phương pháp được sử dụng trong thử nghiệm so màu theo sáng chế với nguyên

liệu và phương pháp được sử dụng trong thử nghiệm phóng xạ thông thường và để đánh giá khả năng của mỗi thử nghiệm trong việc phát hiện các khác biệt về sự bám dính của vi khuẩn do Bio-Mos gây ra. Đĩa: đĩa Maxisorp và đĩa mềm; chất nhầy: ruột hồi cận tâm của lợn; Bio-Mos: 50 μ l/giếng ở các nồng độ khác nhau, được pha loãng trong PBS; vi khuẩn: $\sim 10^7$ vi khuẩn/giếng. Huyền phù vi khuẩn được đánh dấu phóng xạ giống nhau được sử dụng cho cả hai đĩa để đảm bảo rằng các đĩa này là giống nhau; phong bế (chỉ ở đĩa Maxisorp): 10% huyết thanh bào thai bò trong PBS; kháng thể sơ cấp (chỉ ở đĩa Maxisorp): 100 μ l kháng thể sơ cấp liên hợp biotin (1:1000 trong chất đệm phong bế); kháng thể thứ cấp (chỉ ở đĩa Maxisorp): streptavidin liên hợp HRP (1:1000 trong chất đệm phong bế); nhiệt độ ủ: nhiệt độ phòng; cơ chất: TMB. Sau ELISA, cả hai đĩa được điền đầy bằng chất lỏng nhấp nháy và hoạt tính phóng xạ được đo bằng máy đếm độ nhấp.

Mức độ ảnh hưởng của Bio-Mos được quan sát thấy là rất tương tự nhau bằng cách sử dụng nguyên liệu và phương pháp của cả hai thử nghiệm. Nồng độ Bio-Mos thấp dường như làm tăng cường sự gắn kết của vi khuẩn vào chất nhầy. Mặc dù cơ chế là không cần thiết để thực hiện sáng chế, và sáng chế không bị giới hạn ở cơ chế hoạt động cụ thể bất kỳ, nhưng theo một số phương án, ở nồng độ thấp nhất, Bio-Mos hoặc loại tác nhân ức chế khác tham gia vào sự tạo thành các khối kết tụ vi khuẩn. Như vậy, ngay cả khi nồng độ thấp nhất làm tăng sự gắn kết như được xác định bằng các thử nghiệm này, thì dường như là (ví dụ, trong trường hợp lumen ruột) các khối kết tụ này được rửa ra khỏi ruột một cách dễ dàng hơn. Như vậy, nồng độ thấp của Bio-Mos hoặc tác nhân ức chế khác (ví dụ, được nhận diện và/hoặc được xác định bằng phương pháp theo sáng chế được mô tả ở đây) có thể thực sự loại bỏ vi khuẩn một cách hiệu quả hơn và/hoặc hiệu quả ngang bằng với các nồng độ cao hơn.

Như được thấy trên Fig.22, ở nồng độ Bio-Mos rất thấp, độ hấp thụ của hai phương pháp khác nhau đôi chút. Xu hướng của đường ELISA đã là tương tự tại các thời điểm rất sớm (= độ hấp thụ thấp), và do đó xu hướng đi xuống từ 1,0 g/l xuống 0,1 g/l không thể là do các hạn chế về khả năng của thiết bị đọc

ELISA. Có thể là sự hiện màu có thể bị hạn chế bởi nồng độ của các kháng thể hoặc cơ chất, nhưng giả thuyết này không giải thích được xu hướng đi xuống đôi chút từ 1,0 g/l đến 0,1 g/l.

Các kết quả này và các kết quả của các ví dụ khác cho thấy rằng thu được độ hấp thụ cao nhất với 0,1 g/l hoặc 1,0 g/l. Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất rằng sự biến thiên là do các khác biệt về số lượng vi khuẩn giữa các thử nghiệm gây ra. Như vậy, theo một số phương án, để có các kết quả tương đương, có thể sử dụng cùng một huyền phù vi khuẩn hoặc chuẩn hóa phương pháp nuôi cấy để đảm bảo rằng số lượng vi khuẩn ban đầu là tương tự trong các thử nghiệm song song. Như vậy, theo một số phương án, việc làm giảm số lượng vi khuẩn/giếng có thể đảm bảo rằng nồng độ của Bio-Mos và/hoặc chất phong bế khác (ví dụ, chất thử nghiệm) là yếu tố làm giới hạn nhất, thay vì số lượng vị trí liên kết chất nhày hoặc nồng độ kháng thể hoặc cơ chất.

Ví dụ 18 - Thử nghiệm liên kết vi khuẩn phi phóng xạ

Thử nghiệm này được tiến hành trong quá trình phát triển các phương án của sáng chế nhằm tiếp tục thử nghiệm việc sử dụng ELISA so màu được tạo ra theo bản mô tả này để xác định sự gắn kết của mầm bệnh và để đánh giá mức độ thay đổi sự gắn kết của chất thử nghiệm. Như vậy, thử nghiệm này được tiến hành nhằm xác định xem thử nghiệm có thể được sử dụng để sàng lọc chất thử nghiệm mà có thể có hoặc có thể không làm thay đổi (ví dụ, ức chế) sự gắn kết của vi khuẩn vào chất nhày hay không. Tóm lại, sáng chế đề xuất cách thay thế cho việc sử dụng mầm bệnh sống, có tính phóng xạ (ví dụ, thử nghiệm theo sáng chế không cần sử dụng vi khuẩn sống hoặc có tính phóng xạ (ví dụ, sáng chế đề xuất rằng vi khuẩn được làm bất hoạt bằng etanol có thể được sử dụng trong thử nghiệm gắn kết)) và còn đề xuất đĩa có phủ chất nhày được làm khô bằng không khí. Theo đó, các phương pháp được phát triển trong quá trình phát triển các phương án của sáng chế tạo ra các lợi ích đáng kể so với các phương pháp thông thường ở chỗ, theo một số phương án, các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này không cần phải sử dụng vi khuẩn sống và/hoặc có tính

phóng xạ (ví dụ, vi khuẩn gây bệnh) và cũng không cần phải điều chỉnh mật độ vi khuẩn mỗi khi thử nghiệm được tiến hành.

Bảo quản và tính đồng đều của chế phẩm vi khuẩn. Như được nêu trong các ví dụ 9, 10 và 12, mật độ của chế phẩm vi khuẩn được sử dụng trong thử nghiệm gắn kết được nhận diện là biến số quan trọng trong phản ứng. Ở mật độ vi khuẩn thấp, tín hiệu là yếu, trong khi đó ở mật độ vi khuẩn cao, tín hiệu ở trên khoảng tuyến tính. Từ các dữ liệu này, đã xác định được rằng để đạt được độ chính xác, độ nhạy và tính tương đương của các thử nghiệm liên tiếp, mật độ vi khuẩn cố định là cần thiết. Cũng đã xác định xem có thể tạo ra được huyền phù vi khuẩn chuẩn (ví dụ, để sử dụng trong loạt thử nghiệm không xảy ra đồng thời (ví dụ, vào các ngày khác nhau, hoặc vào các tuần hoặc tháng khác nhau)) (ví dụ, để bảo quản, để sử dụng và không gây bệnh) hay không. Nhiều phương pháp làm bất hoạt và bảo quản vi khuẩn khác nhau đã được xác định và thử nghiệm, bao gồm làm bất hoạt và bảo quản bằng chất cố định hóa học (ví dụ, etanol, glutaraldehyt, formalin, DMSO), làm bất hoạt bằng cách chiếu xạ tia UV và sử dụng huyền phù vi khuẩn sống đông lạnh.

Mức độ bảo toàn đĩa có phủ chất nhày. Trong các thử nghiệm được mô tả ở trên (ví dụ, ví dụ 1-15), các đĩa có 96 giếng được phủ chất nhày mỗi khi thử nghiệm được tiến hành. Như đã nêu, quy trình này đòi hỏi phải ủ qua đêm. Theo đó, thử nghiệm được tiến hành để xác định xem quy trình mất nhiều thời gian này có thể được thay thế (ví dụ, bằng đĩa có phủ chất nhày trước, có thể bảo quản trong thời gian dài) hay không. Nhiều phương pháp được thử nghiệm, bao gồm làm đông lạnh các đĩa đã được phủ cũng như làm khô bằng không khí các đĩa này và sử dụng sau khi bảo quản trong thời gian dài (ví dụ, với các loại chất nhày khác nhau).

Phương pháp

Nuôi cấy và làm bất hoạt vi khuẩn. Vi khuẩn được cho sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C trong canh trường Luria và được chuyển vào môi trường mới (10% nguyên liệu cấy) một ngày trước khi thử nghiệm theo dự định. Các phương pháp khác nhau để làm bất hoạt hoặc bảo quản vi khuẩn được thử nghiệm:

Làm đông lạnh: Giống cấy vi khuẩn đã được cho sinh trưởng được làm đông lạnh ở nhiệt độ -20°C . Trước khi sử dụng, giống cấy này được làm tan đông ở nhiệt độ phòng. Một mẻ được làm đông lạnh với glyxerol để bảo vệ các tế bào không bị làm tổn hại trong quá trình làm đông lạnh, nhưng phương pháp này bị dừng lại do khó thu gom vi khuẩn ra khỏi glyxerol và tạo ra các kết quả không hữu dụng.

Etanol: Etanol 99% được bổ sung 1:1 vào giống cấy vi khuẩn trong canh trường Luria để tạo ra dung dịch etanol 50%. Huyền phù này được bảo quản ở nhiệt độ 4°C .

Glutaraldehyt: Glutaraldehyt được sử dụng ở nồng độ cuối cùng là 4%. Huyền phù này được bảo quản ở nhiệt độ 4°C .

Formalin: Formaldehyt được sử dụng ở nồng độ cuối cùng là 4%. Huyền phù này được bảo quản ở nhiệt độ 4°C .

UV: Giống cấy được chiếu xạ dưới đèn UV trong 30 hoặc 60 phút. Huyền phù này được bảo quản ở nhiệt độ 4°C .

Dimetyl sulfoxit: DMSO được bổ sung trong giống cấy ở nồng độ 10%. Huyền phù này được bảo quản ở nhiệt độ 4°C .

Nhiệt: Giống cấy được làm nóng ở nhiệt độ 70°C trong 30 phút và sau đó được bảo quản ở nhiệt độ 4°C .

Vi khuẩn được thu hoạch bằng cách ly tâm ngay trước khi sử dụng.

Chuẩn bị và bảo quản đĩa có phủ chất nhày. Chất nhày được cạo từ ruột của lợn con được pha loãng trong chất đệm NaCO_3 (độ pH = 9,6) để tạo ra huyền phù với 0,1-0,3 mg protein nhày/ml. 300 μl huyền phù này được đưa vào mỗi giếng trên đĩa IgA có 96 giếng. Đĩa này được ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm.

Trong quá trình làm khô bằng không khí, các đĩa được rửa hai lần bằng PBS và được làm khô trong tủ cấy dòng chảy tầng (laminar flow cabinet) qua đêm. Các đĩa được bảo quản ở nhiệt độ phòng trong túi làm bằng chất dẻo. Trước khi sử dụng, 300 μl PBS được đưa vào mỗi giếng và chất nhày được để tái hydrat hóa trong 10 phút, sau đó PBS được loại bỏ bằng cách lắc nhẹ đĩa lộn ngược.

Đối với phương pháp làm đông lạnh, các đĩa được làm đông lạnh ở nhiệt độ -20°C với huyền phù chất nhầy. Trước khi sử dụng, đĩa được làm tan đông ở nhiệt độ phòng và được rửa ba lần bằng PBS.

Các đĩa mới được rửa ba lần bằng PBS sau khi phủ chất nhầy qua đêm.

Kết quả

Bước đầu sàng lọc phương pháp bảo toàn vi khuẩn bằng cách sử dụng thử nghiệm phóng xạ. Ba phương pháp sử dụng vi khuẩn được bảo quản có vẻ là đáp ứng điều kiện so với thử nghiệm với vi khuẩn mới (xem Fig.23). Các phương pháp này là sử dụng etanol, chiếu xạ bằng UV và làm đông lạnh (các phương pháp còn lại được xác định là không thích hợp cho thử nghiệm này). Dữ liệu về vi khuẩn được làm bất hoạt bằng UV và DMSO không được thể hiện trên Fig.23 vì sử dụng các huyền phù vi khuẩn khác nhau. Việc làm bất hoạt bằng DMSO ức chế mạnh sự bám dính của vi khuẩn, trong khi đó việc chiếu xạ vi khuẩn thử nghiệm bằng UV tạo ra các kết quả bám dính tương đối tốt.

Ngoài sự bám dính tuyệt đối, khả năng của phương pháp trong việc phát hiện tác dụng ức chế sự gắn kết của chất thử nghiệm cũng được xác định. Các kết quả đối với các phương pháp bảo toàn vi khuẩn khác ngoài DMSO và chiếu xạ bằng UV được thể hiện trên Fig.23. Bất kể phương pháp được chọn là gì, thì thử nghiệm này vẫn có thể cho thấy rằng Bio-Mos ức chế được sự bám dính của *E. coli*.

Thử nghiệm ELISA với các phương pháp bảo toàn vi khuẩn được chọn. Dựa trên các kết quả này, ba phương pháp làm bất hoạt vi khuẩn được thử nghiệm trong hệ phát hiện vi khuẩn ELISA. Mặc dù sáng chế không bị giới hạn ở cơ chế tác động bất kỳ và việc hiểu rõ cơ chế tác động là không cần thiết để thực hiện sáng chế, nhưng có thể là việc cố định vi khuẩn bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp nêu trên sẽ làm thay đổi các đặc tính kháng nguyên của vi khuẩn, do đó dẫn đến sự thất bại của các phương pháp dựa trên kháng thể để phát hiện vi khuẩn đã được điều biến. Tuy nhiên, kỹ thuật ELISA có vẻ hoạt động đối với chế phẩm vi khuẩn được thử nghiệm. Trong số các phương pháp làm bất hoạt vi khuẩn, phương pháp làm bất hoạt bằng UV và làm

đông lạnh là tốt hơn so với phương pháp bảo toàn bằng etanol, xét theo hiệu quả bám dính vi khuẩn tuyệt đối, như được thể hiện trên Fig.24. Tuy nhiên, các phương pháp này có nhược điểm lớn khi xét đến thực tiễn sử dụng: huyền phù vi khuẩn được làm bất hoạt bằng UV chỉ ổn định khi chưa được mở, nhưng dễ bị làm hỏng bởi vi khuẩn khác khi tiếp xúc với vi khuẩn xung quanh. Mặt khác, vi khuẩn được làm đông lạnh vẫn còn sống và có thể bắt đầu sinh trưởng hoặc có hoạt tính trao đổi chất sau khi làm tan đông. Điều này sẽ gây ảnh hưởng đến độ chính xác và khả năng lặp lại của thử nghiệm. Ngoài ra, các vấn đề về độ an toàn cần phải được xem xét khi thực hiện với vi khuẩn sống.

Tối ưu hóa nồng độ etanol trong huyền phù vi khuẩn. Mặc dù có vẻ là phương pháp bảo toàn vi khuẩn bằng etanol là không lý tưởng, nhưng các tác giả sáng chế vẫn quyết định tiếp tục cố gắng phát triển phương pháp này vì các lợi ích khác mà phương pháp này mang lại. Ban đầu, etanol ở nồng độ 50% được sử dụng dựa trên khả năng tiêu diệt vi khuẩn của nó. Tuy nhiên, các nồng độ rượu khác cũng được thử nghiệm để xác định mức độ ảnh hưởng của nồng độ rượu đối với sự bám dính của vi khuẩn. Đã xác định được rằng nồng độ etanol gây ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả bám dính của vi khuẩn. Mặc dù sáng chế không bị giới hạn ở cơ chế tác động bất kỳ và việc hiểu rõ cơ chế tác động là không cần thiết để thực hiện sáng chế, nhưng theo một số phương án, sáng chế bộc lộ rằng etanol tách hoặc phá hủy tua vi khuẩn cần thiết cho sự liên kết, hoặc làm thay đổi các tính chất kháng nguyên khác của vi khuẩn. Etanol ở nồng độ 40% có vẻ là tốt hơn đáng kể so với etanol ở nồng độ 50% khi xét đến hiệu quả bám dính. Xu hướng không tuyến tính đáng ngạc nhiên được thể hiện trên Fig.25 được quan sát thấy lặp đi lặp lại nhiều lần.

Bảo toàn đĩa có phủ chất nhày. Khả năng của vi khuẩn trong việc bám dính trên đĩa có phủ chất nhày được bảo toàn bằng cách làm khô bằng không khí và làm đông lạnh được kiểm tra bằng cách so sánh chúng với các đĩa mới được phủ. Trong các thử nghiệm với vi khuẩn được đánh dấu bằng phóng xạ, đĩa được làm khô bằng không khí là tương đương với đĩa mới được phủ, trong khi đó đĩa được làm đông lạnh tạo ra số đếm cao hơn một chút. Mỗi phương

pháp được thử nghiệm bằng cách sử dụng kỹ thuật ELISA phi phóng xạ theo sáng chế.

Như được thể hiện trên Fig.26, các đĩa được làm khô bằng không khí tạo ra tín hiệu yếu hơn so với các đĩa mới được phủ và được bảo quản đông lạnh. Tuy nhiên, mức độ ảnh hưởng của Bio-Mos đối với sự bám dính của vi khuẩn là rõ ràng với tất cả các phương pháp được sử dụng. Theo đó, sáng chế đề xuất phương pháp sử dụng đĩa có phủ chất nhày được tạo ra và được bảo quản trước đó (ví dụ, đĩa được làm khô bằng không khí hoặc được bảo quản đông lạnh).

Thời gian tái hydrat hóa của đĩa đã được làm khô. Khoảng thời gian từ 1 phút đến 12 giờ được thử nghiệm để tái hydrat hóa các đĩa được làm khô bằng không khí trước khi tiến hành thử nghiệm. Đã xác định được rằng thời gian tái hydrat hóa không gây ảnh hưởng lớn đến các kết quả của thử nghiệm, nhưng để thu được các kết quả tương đương, thời gian tái hydrat hóa cố định (ví dụ, 10 phút) được sử dụng cho tất cả các thử nghiệm tiếp theo.

Nồng độ chất nhày trong giếng. Nồng độ chất nhày trong các giếng đã được thử nghiệm trước đó, nhưng các tác giả sáng chế vẫn quyết định thử nghiệm xem sự bám dính của vi khuẩn có thể được tăng cường với nồng độ chất nhày cao hơn hay không. Ba mức của chất nhày trong chất đệm bao phủ được thử nghiệm; các mức này lần lượt tương ứng với 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml và 0,3 mg/ml protein. Sự bám dính của vi khuẩn cải thiện rõ ràng khi nồng độ chất nhày tăng lên, 0,3 mg protein/ml tạo ra sự bám dính cao nhất.

Phát hiện thay đổi về sự bám dính của vi khuẩn bằng cách sử dụng chất thử nghiệm (ví dụ, Bio-Mos). Dựa trên thử nghiệm ELISA và thử nghiệm nhấp nháy sơ bộ, vi khuẩn được làm bất hoạt bằng etanol và các đĩa được làm khô bằng không khí được sử dụng để kiểm tra mức độ ảnh hưởng của chất thử nghiệm (ví dụ, Bio-Mos) và khả năng của nó trong việc làm thay đổi sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày. Dữ liệu thu được cho thấy rằng đường cong thu được rất tương tự với đường cong thu được khi thực hiện ELISA với vi khuẩn và đĩa mới.

Khả năng áp dụng với các loại chất nhày khác. ELISA (sử dụng đĩa được bảo quản và vi khuẩn được làm bất hoạt bằng EtOH) được thử nghiệm

với các loại chất nhày khác. ELISA tạo ra dữ liệu hữu dụng bằng cách sử dụng nhiều loại chất nhày bao gồm ruột hồi cận tâm của lợn, ruột kết xa tâm của lợn, ruột tá của gà giò và ruột tịt của gà giò. Sáng chế bộc lộ rằng ELISA sử dụng đĩa được bảo quản và vi khuẩn được làm bất hoạt bằng EtOH và được bảo quản tạo ra dữ liệu hữu dụng, và tác dụng của khả năng phong bế sự gắn kết/bám dính của vi khuẩn của chất thử nghiệm (ví dụ, Bio-Mos) là tương tự, bất kể nguồn chất nhày là gì. Theo đó, sáng chế đề xuất hợp phần (ví dụ, vi khuẩn được làm bất hoạt bằng etanol và đĩa có phủ chất nhày được làm khô bằng không khí) và phương pháp (ví dụ, ELISA phi phóng xạ) hữu dụng để theo dõi và xác định sự gắn kết/bám dính của tế bào vi khuẩn vào chất nhày mà dễ sử dụng, an toàn, và nguyên liệu dễ bảo quản và vận chuyển.

Xác định đặc điểm khác của thử nghiệm liên kết vi khuẩn phi phóng xạ. Thử nghiệm được tiến hành trong quá trình phát triển sáng chế để xác định xem thử nghiệm phi phóng xạ được đề xuất trong bản mô tả này có đáng tin cậy, có thể lặp lại được và sự biến thiên có được làm giảm đến mức tối thiểu hay không. Sự biến thiên giữa các mẻ vi khuẩn và đĩa khác nhau được thử nghiệm và khả năng lặp lại của thử nghiệm được xác định (ví dụ, bằng cách tiến hành vào các ngày khác nhau (sự biến thiên giữa các đĩa) và theo dõi sự biến thiên trong đĩa của các mẫu lặp lại).

Phương pháp

Nuôi cấy và làm bất hoạt vi khuẩn. Vi khuẩn được cho sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C trong canh trường Luria và được chuyển vào môi trường mới (10% nguyên liệu cấy) một ngày trước khi làm bất hoạt bằng etanol. Vi khuẩn được làm bất hoạt và được bảo quản bằng cách bổ sung etanol trực tiếp vào giống cấy đã được cho sinh trưởng qua đêm đến nồng độ cuối cùng là 40% theo thể tích. Huyền phù được bảo quản ở nhiệt độ 4°C và được thu hoạch bằng cách ly tâm ngay trước khi sử dụng. Lớp lắng kết được tạo huyền phù trong thể tích ban đầu của canh trường Luria để thu được huyền phù với khoảng 10^8 vi khuẩn/ml.

Tạo và bảo toàn đĩa có phủ chất nhày. Chất nhày được cạo từ ruột non của lợn con được pha loãng trong chất đệm NaCO_3 (độ pH = 9,6) để tạo ra

huyền phù với 0,3 mg protein chất nhày/ml. 300 μ l huyền phù này được đưa vào mỗi giếng trên đĩa IgA loại 96 giếng. Đĩa được ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau đó, các đĩa được rửa hai lần bằng PBS và được làm khô trong tủ cấy dòng chảy tầng (laminar flow cabinet) qua đêm và được bảo quản ở nhiệt độ phòng trong túi làm bằng chất dẻo. Trước khi sử dụng, 300 μ l PBS được đưa vào mỗi giếng, và chất nhày được để tái hydrat hóa trong 10 phút, sau đó PBS được loại bỏ bằng cách lắc nhẹ đĩa lộn ngược.

Kỹ thuật ELISA. Đĩa đã được phủ chất nhày và được làm khô bằng không khí được để tái hydrat hóa trong 10 phút với PBS trước khi bổ sung 100 μ l huyền phù vi khuẩn và 100 μ l huyền phù Bio-Mos trong PBS hoặc 100 μ l PBS tinh khiết. Các mẫu chất điều trị được chỉ định một cách ngẫu nhiên vào các giếng để tránh sai số hệ thống. Đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, được bảo vệ khỏi ánh sáng và sự bay hơi. Sau khi ủ, đĩa được rửa ba lần bằng PBS, và chất đệm phong bế (10% huyết thanh bào thai bò) được bổ sung. Đĩa được ủ như nêu trên và được làm rỗng. Kháng thể sơ cấp được bổ sung, đĩa được ủ và được rửa như nêu trên. Kháng thể thứ cấp được bổ sung, và đĩa được ủ và được rửa như nêu trên. Cuối cùng, cơ chất TMB được bổ sung vào các giếng, và màu sắc được để hiện màu trong 15-30 phút. Phản ứng được dừng lại bằng axit sulfuric, và độ hấp thụ được đo ở 450 nm.

Phân tích thống kê. Các hệ số biến thiên (CV - coefficient of variation) được ước lượng đối với các giá trị được chia tỷ lệ sao cho giá trị trung bình của các mẫu 0 (zero) đối với mỗi đĩa là 100%. Sau đó, ước lượng các hệ số biến thiên trong đĩa và giữa đĩa được tính toán đối với các giá trị đã được chia tỷ lệ mức 1 và 2 này bằng cách sử dụng MSE của ANOVA một chiều đối với giữa các chất điều trị và trong cùng chất điều trị làm ước lượng phương sai. Sự ước lượng này được tiến hành riêng rẽ đối với các mức Bio-Mos khác nhau. Phân tích lực mẫu (power analysis) được thực hiện để cung cấp ước lượng về số lượng lần lặp lại cần để phát hiện được sự khác biệt giữa hai chất điều trị. Mức rủi ro $\alpha=0,05$ và năng lực = 0,8 hoặc 0,9 được sử dụng.

Kết quả

Biến thiên xác định được từ các mẫu lặp lại được phân tích trong cùng một đĩa. Đối với mục đích đánh giá sản phẩm, điều quan trọng là khi thực hiện một số lần lặp lại trong cùng một đĩa, thì thử nghiệm phải có khả năng lặp lại được, và theo đó tạo ra thử nghiệm đáng tin cậy, giới hạn phát hiện của nó là đã biết và được xem là đủ cho ứng dụng thực tiễn của thử nghiệm. Đối với mục đích này, thử nghiệm được thực hiện trong đĩa có phủ chất nhày đồng nhất, và với một mẻ chế phẩm vi khuẩn. Fig.28 cho thấy rằng có sự biến thiên theo đĩa nhất định, nhưng tác dụng ức chế sự bám dính của Bio-Mos được bổ sung là rõ ràng và lặp lại. Sự so sánh với các giếng đối chứng cho thấy rằng các mức 1 mg/ml và 2 mg/ml của Bio-Mos khác với đối chứng với giá trị $p < 0,0001$. Tuy nhiên, hai mức Bio-Mos này không khác nhau, như được thể hiện trên Fig.28. Các hệ số biến thiên được tính toán riêng rẽ đối với mỗi chất điều trị.

Biến thiên xác định được từ bốn đĩa chất nhày khác nhau

Đối với mục đích đánh giá sản phẩm, điều quan trọng là thử nghiệm phải có khả năng lặp lại được. Để xác định xem thử nghiệm có khả năng lặp lại được (ví dụ, ở các thời điểm khác nhau, sử dụng cùng chất phản ứng) hay không, thử nghiệm trong đó dữ liệu được thể hiện trên Fig.28 được lặp lại 4 lần vào bốn ngày khác nhau. Mỗi nhóm thử nghiệm được tiến hành vào các ngày và đĩa chất nhày khác nhau, nhưng với một chế phẩm vi khuẩn. Các kết quả được minh họa trong bốn panen được thể hiện trên Fig.29. Sự biến thiên trung bình trong các đĩa khác nhau là 14%, 14% và 13% đối với các đĩa 1, 2 và 3, một cách tương ứng, và cao đến 22% đối với đĩa 4. Bảng 1 dưới đây thể hiện CV tính toán được cho mỗi thử nghiệm trong mỗi đĩa. Dường như có xu hướng rằng CV thấp hơn đối với các giếng đối chứng so với các giếng chứa Bio-Mos. CV trung bình tính toán được từ tất cả bốn đĩa thử nghiệm và tất cả các chất điều trị đều là 16% (bảng 1).

Bảng 1

	CV đo được từ các lần thử nghiệm lặp lại nêu trên				
Thử nghiệm	Đĩa 1	Đĩa 2	Đĩa 3	Đĩa 4	Trung bình
Không có Bio-Mos	1%	8%	8%	23%	1%
Bio-Mos 1 mg/ml	13%	12%	15%	24%	16%
Bio-Mos 2 mg/ml	19%	23%	14%	21%	19%

Tất cả	14%	14%	13%	22%	16%
--------	-----	-----	-----	-----	-----

Sự khác biệt về tín hiệu tuyệt đối đo được từ bốn đĩa chất nhày khác nhau. Fig.30 thể hiện dữ liệu trên Fig.29, nhưng được sắp xếp theo cách khác nhau để nhấn mạnh độ lớn của tín hiệu tuyệt đối trong các thử nghiệm khác nhau. Các đĩa được thao tác một cách tương tự nhưng độc lập với nhau. Các mẫu được chỉ định ngẫu nhiên vào các giếng để tránh sai số hệ thống do các yếu tố như vị trí giếng. Đáng chú ý là mức tuyệt đối của tín hiệu thay đổi theo ngày, mặc dù đã cố gắng lặp lại từng bước của thử nghiệm một cách chính xác theo cùng một cách. Mặc dù sáng chế không bị giới hạn ở cơ chế tác động bất kỳ và việc hiểu rõ cơ chế tác động là không cần thiết để thực hiện sáng chế, nhưng theo một số phương án, sự biến thiên là do một hoặc nhiều bước bao gồm: 1. Liên kết của chất nhày, 2. Rửa giếng, 3. Liên kết của vi khuẩn, 4. Rửa vi khuẩn tự do, 5. Liên kết của kháng thể sơ cấp, 6. Rửa, 7. Liên kết của kháng thể thứ cấp, 8. Phản ứng hiện màu. Tuy nhiên, sáng chế đề xuất rằng mặc dù có sự biến thiên nhất định về sự hiện màu, nhưng sự biến thiên này là có giới hạn và không ngăn cản việc tạo ra dữ liệu hữu dụng (ví dụ, về khả năng của một hoặc nhiều chất thử nghiệm trong việc làm thay đổi (ví dụ, ức chế) liên kết của vi khuẩn vào chất nhày).

So sánh sự biến thiên theo đĩa khi sử dụng tín hiệu tương đối. Nếu và khi chất điều trị đối chứng liên quan có mặt trong cùng một đĩa như sản phẩm cần thử nghiệm, thì sự biến thiên tín hiệu theo đĩa không phải là vấn đề. Toàn bộ các tín hiệu đều được chuyển thành giá trị tương đối bằng cách gán giá trị bằng 1 cho giá trị trung bình của tất cả các giếng chứa đối chứng, và gán các giá trị đã được chuẩn hóa theo đó cho các giếng chứa hợp chất thử nghiệm. Các kết quả đã được chuẩn hóa được thể hiện trên Fig.31. Khi có mặt dưới dạng tín hiệu tương đối, quan sát thấy rằng biên độ phát hiện được của mức độ ảnh hưởng của Bio-Mos là gần giống nhau trong tất cả các đĩa.

Sự biến thiên giữa các mẻ vi khuẩn. Để thử nghiệm sự biến thiên giữa các mẻ vi khuẩn và các đĩa, các giống cấy vi khuẩn được cho sinh trưởng một cách độc lập được tạo ra, và các đĩa có phủ chất nhày được tạo ra một cách độc

lập cũng được tạo ra. Các mẻ được tạo ra hoàn toàn độc lập, sử dụng các mẻ khác nhau của PBS, canh trường Luria và cho sinh trưởng mỗi giống cấy từ hạt dự trữ mới đã được làm đông lạnh. Thử nghiệm ELISA tương tự được tiến hành với mỗi trong số các đĩa và giống cấy độc lập. Các kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trên Fig.32.

Như được thể hiện trên Fig.32, mức tuyệt đối của tín hiệu thay đổi theo thử nghiệm, nhưng khi được so sánh với tín hiệu của các thử nghiệm đối chứng, thì các nghiên cứu hoàn toàn độc lập tạo ra dữ liệu gần như là mô tả được mức độ ảnh hưởng tương tự của Bio-Mos đối với sự gắn kết (xem Fig.32)

Phân tích lực mẫu. Nhờ sử dụng dữ liệu thử nghiệm, có thể ước lượng được số lần lặp lại cần để đạt được năng lực phát hiện mong muốn. Năng lực phát hiện có nghĩa là sự khác biệt tính theo % giữa các đáp ứng của hai hợp chất thử nghiệm hoặc chất điều trị mà tạo ra sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với nhau. Fig.33 và bảng 2 dưới đây thể hiện mối quan hệ giữa năng lực phát hiện và số lần lặp lại.

Sáng chế đề xuất rằng khi các mẻ chất thử nghiệm được so sánh, chỉ cần 5 lần lặp lại (hoặc ít hơn) là đủ để có thể nói rằng hai chất (hoặc các dịch pha loãng của chúng) là khác nhau khi sản phẩm A, ví dụ, ức chế sự bám dính là 50%, trong khi sản phẩm B ức chế sự bám dính là 66%, thì 5 lần lặp lại là đủ.

Bảng 2. Ví dụ về năng lực phát hiện

Số lần lặp lại	Sự khác biệt phát hiện được
5	31%
10	22%
15	18%

Dựa trên năng lực 80% ở mức rủi ro 5%

Ví dụ 19 - Tạo chế phẩm vi khuẩn có chức năng ổn định và đĩa có phủ chất nhày

Thử nghiệm được tiến hành trong quá trình phát triển các phương án của sáng chế nhằm cố gắng tạo ra huyền phù vi khuẩn có các đặc điểm sau: tua vi khuẩn có mặt và/hoặc được giữ lại trên vi khuẩn đã chuẩn bị có khả năng điều tiết sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày, trong đó tua vi khuẩn này có số lượng lớn và

cấu trúc nguyên vẹn, cho phép vi khuẩn liên kết với và/hoặc bám dính vào chất nhày với ái lực cao; kháng nguyên bề mặt vi khuẩn giữ được đặc tính miễn dịch của chúng, nhờ đó cho phép sự liên kết hiệu quả của các kháng thể sơ cấp được sử dụng trong ELISA và tiêu diệt và/hoặc làm bất hoạt vi khuẩn theo cách sao cho không làm biến đổi sự liên kết của kháng thể; và/hoặc chế phẩm vi khuẩn được tiến hành theo cách sao cho tạo ra chế phẩm có thời hạn sử dụng dài và cho phép sử dụng ngay và đơn giản trong ELISA.

Các cải biên của thử nghiệm liên kết vi khuẩn phi phóng xạ bao gồm chế phẩm nguyên liệu cấy vi khuẩn nêu trong ví dụ 18 được tiến hành. Thử nghiệm được tiến hành bằng cách sử dụng quy trình tiêu diệt kép ít mạnh hơn và nhẹ nhàng hơn (ví dụ, để bảo toàn tua viền và/hoặc kháng nguyên bề mặt vi khuẩn (ví dụ, để liên kết với kháng thể)). Như được nêu dưới đây, quy trình làm khô lạnh tạo điều kiện thuận lợi cho việc bảo quản nguyên liệu cấy trong thời gian dài. Ví dụ, theo một số phương án, quy trình làm khô lạnh cho phép tạo ra ống tiêm dùng một lần chứa đúng số lượng vi khuẩn chính xác (ví dụ, để sử dụng với đĩa có phủ chất nhày trong thử nghiệm (ví dụ, để sử dụng trong bộ kit)). Các phương pháp và hợp phần mới này làm giảm đáng kể sai số tiềm ẩn liên quan đến phần việc của kỹ thuật viên (ví dụ, trong việc phải xác định kích cỡ nguyên liệu cấy chính xác), làm giảm nguy cơ nhiễm tạp nguyên liệu cấy và làm giảm đến mức tối thiểu sự phá hủy chế phẩm vi khuẩn theo thời gian. Ống tiêm đã được làm khô lạnh ổn định ở nhiệt độ phòng và có thể vận chuyển được (ví dụ, toàn cầu) mà không có nguy cơ bị mất chức năng.

Phương pháp chuẩn bị vi khuẩn. Vi khuẩn (ví dụ, chủng *E. coli* F4+ (trước đây là K88)) được cho sinh trưởng ở nhiệt độ 37°C trong canh trường Luria Bertani. Các giống cấy được thu hoạch bằng cách ly tâm, được tái tạo huyền phù trong dung dịch nước muối và được đếm ngay bằng cách đếm bằng kính hiển vi. Huyền phù vi khuẩn bị tiêu diệt bằng cách làm nóng ở nhiệt độ 65°C trong 45 phút, sau đó chiếu xạ bằng UV trong 45 phút. Sau đó, các mẻ vi khuẩn được chia vào ống tiêm, mỗi ống tiêm chứa 1×10^9 tế bào vi khuẩn và được làm đông lạnh ở nhiệt độ -80°C. Sau 24 giờ làm đông lạnh, ống tiêm được làm khô lạnh và được bịt kín. Ống tiêm được bảo quản ở nhiệt độ +4°C.

E. coli còn sống trong ống tiêm được xác định bằng hai phương pháp khác nhau, là phương pháp đếm đĩa trực tiếp và phương pháp sử dụng số có xác suất lớn nhất (MPN: most probable number). Các dịch pha loãng theo dãy 10 lần được điều chế năm lần lặp lại từ mỗi trong số các mẻ vi khuẩn đối với phương pháp đếm đĩa trực tiếp. Môi trường được sử dụng là Luria Berthan giàu dinh dưỡng không chọn lọc. Các khuẩn lạc được đếm sau 2 ngày ủ ở nhiệt độ 37°C. Phương pháp MPN được thực hiện bằng cách pha loãng theo dãy lượng chứa trong ống tiêm một cách trực tiếp trong canh trường giàu dinh dưỡng không chọn lọc. Phương pháp MPN được thực hiện ba lần lặp lại (MPN 3 bảng). Sự sinh trưởng trong ống MPN đầu tiên được ghi lại sau 2 ngày ở nhiệt độ 37°C, và sau đó lại được ghi sau 2 tuần. Trong phương pháp MPN, toàn bộ lượng trong ống tiêm chứa vi khuẩn ($\sim 10^9$ tế bào) được tạo huyền phù trong ống thứ nhất được pha loãng ít nhất. Theo đó, phương pháp MPN đề xuất rằng cần phát hiện được vi khuẩn còn sống đơn lẻ. Trong phương pháp đếm đĩa, lượng trong ống tiêm được tạo huyền phù trong 10 ml chất pha loãng, trong số đó 0,1 ml được phết lên đĩa. Theo đó, không có sự sinh trưởng biểu thị rằng ống tiêm chứa ít hơn 100 tế bào *E. coli* còn sống. Năm mẻ khác nhau của chế phẩm vi khuẩn (ống tiêm) được kiểm tra về khả năng sống sót. Các kết quả từ cả hai phương pháp kiểm tra, là phương pháp đếm đĩa trực tiếp và phương pháp đếm MPN, đều cho thấy rằng không có dấu hiệu về khả năng sống sót. Theo đó, sáng chế đề xuất phương pháp tiêu diệt kép mới mà tạo ra chế phẩm vi khuẩn nhất quán và có khả năng lặp lại cao (ví dụ, như được xác định trong thử nghiệm bám dính vào chất nhày (xem, ví dụ, Fig.34)).

Tạo và làm ổn định đĩa có phủ chất nhày. Thử nghiệm được tiến hành trong quá trình phát triển sáng chế để tạo ra đĩa có phủ chất nhày có các đặc tính sau: lớp phủ chất nhày có chất lượng đồng đều giữa các giếng của mỗi đĩa và giữa các đĩa khác nhau; các đĩa chất nhày được làm ổn định theo cách sao cho không phá hủy vi khuẩn và/hoặc các đặc tính liên kết của chất nhày được phủ trên đĩa (ví dụ, sao cho bảo toàn được các tính chất bề mặt của chất nhày tham gia vào việc liên kết với vi khuẩn); và/hoặc đĩa có phủ chất nhày ổn định (ví dụ, ở nhiệt độ phòng hoặc mát hơn) trong khoảng thời gian dài (ví dụ, ngày,

tuần, tháng, năm hoặc lâu hơn) mà có thể sẵn sàng để sử dụng (ví dụ, trong ELISA).

Các đĩa vi chuẩn độ được phủ chất nhày. Chất nhày được thu từ các con lợn mới được mổ bằng cách cạo niêm mạc từ ruột non xa tâm (ruột hồi). Chất nhày được rửa và được làm sạch bằng cách ly tâm như được nêu trong ví dụ 18. Protein chất nhày được định lượng bằng cách sử dụng bộ kit Bicinchoninic Acid Protein Assay từ SIGMA (B9643). Các đĩa Nunc MaxiSorb (loại 96 giếng) được phủ dung dịch đệm-chất nhày chứa 0,1 mg protein chất nhày/ml chất đệm bao phủ. Các mẻ đĩa vi chuẩn độ được tạo ra độc lập vào các ngày khác nhau và được bảo quản ở nhiệt độ +4°C cho đến ngày thử nghiệm. Thử nghiệm về sự bám dính của vi khuẩn, có và không có Bio-Mos, được thực hiện trong các đĩa này để kiểm tra sự biến thiên theo đĩa. Giá trị ức chế trung bình giữa các đĩa là 81,9%, trong đó các mẻ riêng lẻ sai lệch trung bình 1,5% so với giá trị này (xem, ví dụ, Fig.35).

Các thử nghiệm bổ sung được tiến hành trong quá trình phát triển sáng chế để nghiên cứu độ ổn định của các đĩa chất nhày khi được bảo quản trong dung dịch đệm-chất nhày trong 1 và 2 tuần trong gói hàn kín chân không ở nhiệt độ 4°C. Sau hai tuần bảo quản, các đĩa chất nhày được kiểm tra để xác định xem chúng có thể được sử dụng trong thử nghiệm về sự bám dính với chế phẩm vi khuẩn hay không. Các kết quả được thể hiện trên Fig.36. Tín hiệu tuyệt đối trong thử nghiệm thể hiện sự giảm nhẹ về cường độ. Tuy nhiên, trong các nghiên cứu trước đó, quan sát thấy sự biến thiên về cường độ liên quan đến sự biến thiên theo đĩa, và có thể không có gì phải làm với việc bảo quản đĩa. Việc sử dụng sản phẩm chống bám dính, Bio-Mos, đã chứng tỏ rằng quan sát thấy sự ức chế xấp xỉ 80%. Theo đó, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra đĩa có phủ chất nhày và đĩa có phủ chất nhày có thể được bảo quản và được sử dụng ở thời điểm sau đó (ví dụ, cho thử nghiệm về sự bám dính). Ví dụ, theo một số phương án, sáng chế đề xuất đĩa có phủ chất nhày và/hoặc chế phẩm vi khuẩn (ví dụ, được bảo quản trong ống tiêm), có thể được bảo quản riêng biệt hoặc cùng với nhau (ví dụ, trong gói hàn kín chân không (xem, ví dụ, Fig.37)), có thể có bán trên thị trường để mua và/hoặc sử dụng (ví dụ, trong thử nghiệm

về sự bám dính).

Tất cả các tài liệu công bố và patent được đề cập trong phần mô tả trên đây được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Các cải biên và biến đổi khác của hợp phân và phương pháp được mô tả theo sáng chế sẽ được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật mà không tách rời khỏi phạm vi và tinh thần của sáng chế. Mặc dù sáng chế được mô tả về các phương án được ưu tiên cụ thể, nhưng cần phải hiểu rằng sáng chế được đề cập đến trong yêu cầu bảo hộ không bị giới hạn ở các phương án cụ thể này. Trên thực tế, dự định rằng các cải biên khác của các cách thức thực hiện sáng chế được mô tả mà được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật liên quan đều thuộc phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp xác định sự bám dính và chống bám dính của vi khuẩn vào chất nhày, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:
 - a) cung cấp
 - i) mẫu chứa vi khuẩn; và
 - ii) chất nhày đã được phân lập;
 - b) kết hợp mẫu chứa vi khuẩn và chất nhày; và
 - c) xác định, bằng cách sử dụng thử nghiệm so màu phi phóng xạ, ít nhất một dấu hiệu trong số sự chống bám dính và bám dính đặc hiệu của vi khuẩn vào chất nhày này.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thử nghiệm so màu phi phóng xạ là thử nghiệm ELISA.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bước xác định bao gồm việc bổ sung kháng thể sơ cấp đặc hiệu với vi khuẩn liên kết chất nhày.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó bước xác định bao gồm việc bổ sung kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện được đặc hiệu với kháng thể sơ cấp liên kết vi khuẩn.
5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó bước xác định bao gồm việc bổ sung cơ chất cho phép hiển thị kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện được liên kết với kháng thể sơ cấp.
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất nhày được phủ lên đĩa vi chuẩn độ.
7. Phương pháp theo điểm 5, trong đó kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện được chứa chất đánh dấu enzym.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó cơ chất là hợp phần tạo ra tín hiệu so màu, đo huỳnh quang hoặc phát quang hóa học trong điều kiện có chất đánh dấu enzym.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó kháng thể thứ cấp được đánh dấu có thể phát hiện được bao gồm globulin miễn dịch kháng IgG ở lợn liên hợp với peroxidaza.
10. Phương pháp theo điểm 8, trong đó hợp phần so màu là 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin.
11. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn là vi khuẩn *E. coli*.
12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất nhày được chọn từ nhóm bao gồm chất nhày ruột hồi cận tâm của lợn, chất nhày ruột kết xa tâm của lợn, chất nhày ruột tá của gà giò và chất nhày ruột tịt của gà giò.
13. Phương pháp theo điểm 3, trong đó kháng thể sơ cấp là kháng thể đa dòng liên hợp HRP đặc hiệu với typ huyết thanh kháng nguyên O và K của *E. coli*.
14. Phương pháp theo điểm 3, trong đó kháng thể sơ cấp là kháng thể đa dòng đặc hiệu với typ huyết thanh kháng nguyên O và K của *E. coli*.
15. Phương pháp theo điểm 4, trong đó kháng thể thứ cấp là kháng thể liên hợp HRP ở thỏ kháng IgG của dê đã tinh chế ái lực.
16. Phương pháp theo điểm 4, trong đó kháng thể thứ cấp là kháng thể liên hợp AP ở thỏ kháng IgG của dê đã tinh chế ái lực.
17. Phương pháp theo điểm 4, trong đó kháng thể thứ cấp là kháng thể đa dòng liên hợp FITC hướng đích IgG của dê.
18. Phương pháp theo điểm 4, trong đó kháng thể thứ cấp là streptavidin-phosphataza kiềm từ *Streptomyces avidinii*.
19. Phương pháp theo điểm 4, trong đó kháng thể thứ cấp là streptavidin-peroxidaza từ *Streptomyces avidinii*.
20. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước cung cấp iii) tác nhân được cho là làm thay đổi sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày.
21. Phương pháp theo điểm 20, trong sự bám dính của vi khuẩn vào chất nhày được xác định trong điều kiện có và không có tác nhân.

22. Phương pháp theo điểm 6, trong đó huyền phù chất nhày chứa protein nhày với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 0,3 mg/ml được sử dụng để phủ đĩa vi chuẩn độ.
23. Phương pháp theo điểm 6, trong đó huyền phù chất nhày chứa protein nhày với lượng là 0,1 mg/ml được sử dụng để phủ đĩa vi chuẩn độ.
24. Phương pháp theo điểm 1, trong đó vi khuẩn được làm bất hoạt bằng cách sử dụng phương pháp được chọn từ nhóm bao gồm bất hoạt bằng etanol, chiếu xạ UV, bất hoạt bằng nhiệt, đông lạnh và tổ hợp của các phương pháp này.

FIG.1

Ảnh hưởng của nồng độ chất nhày đối với sự bám dính của vi khuẩn

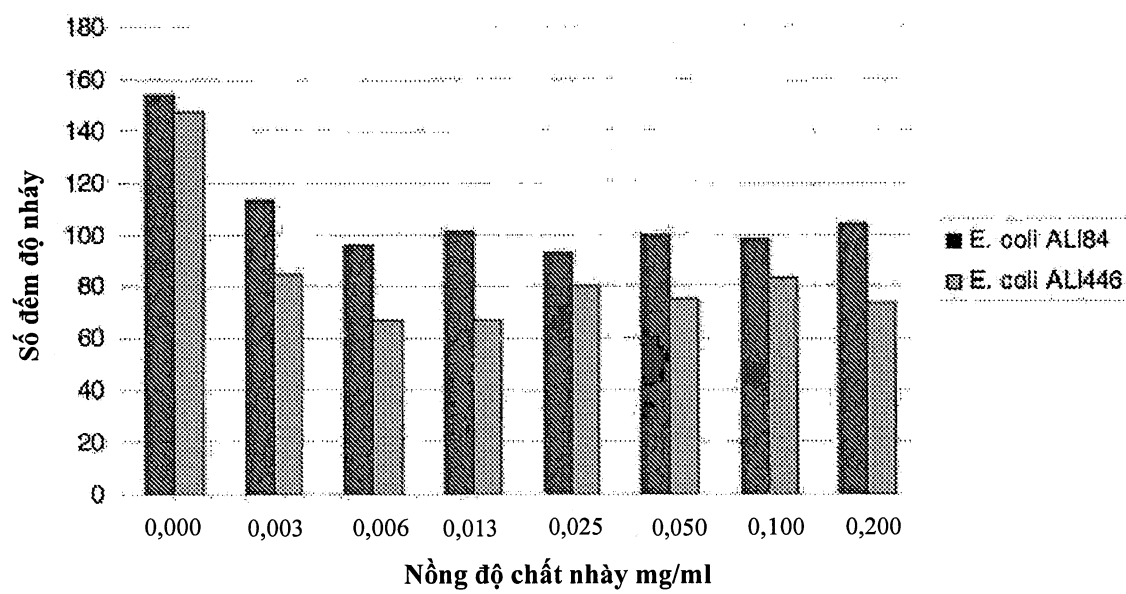


FIG.2

Ảnh hưởng của kháng thể sơ cấp đối với sự bám dính của *E. coli* ALI84

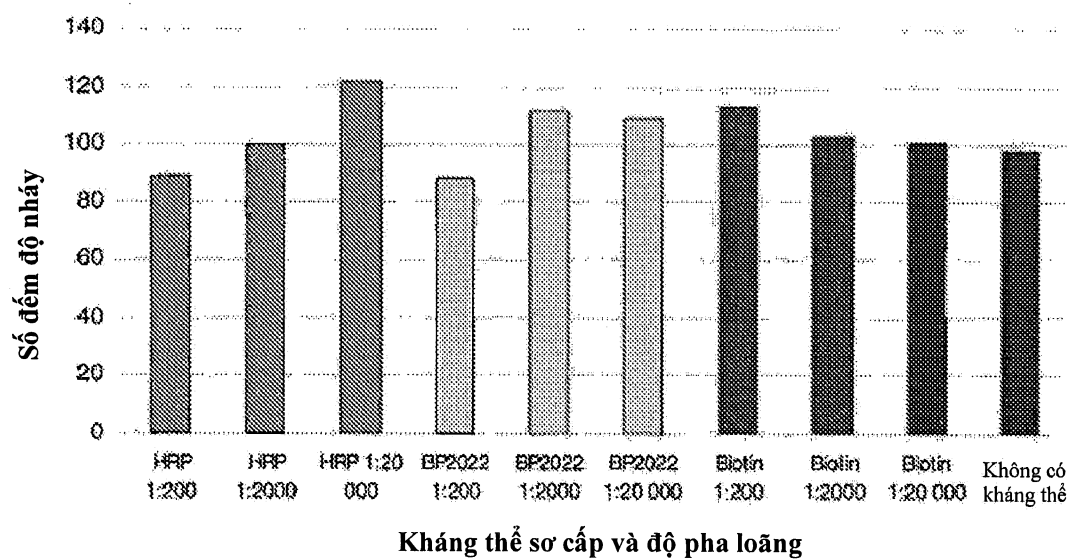


FIG.3

Ảnh hưởng của kháng thể sơ cấp đối với sự bám dính của *E. coli* ALI446

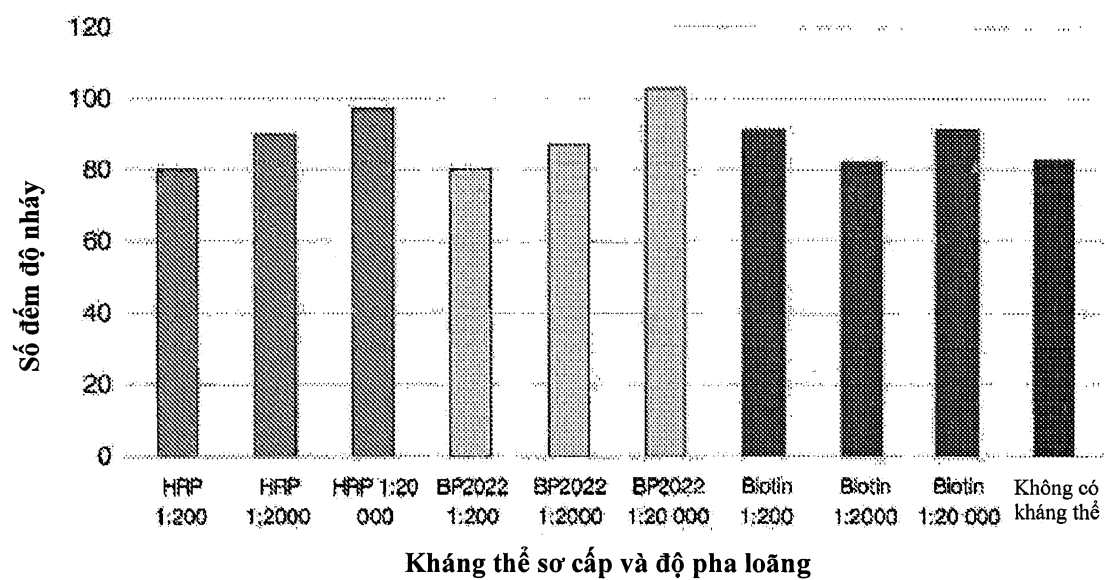


FIG.4

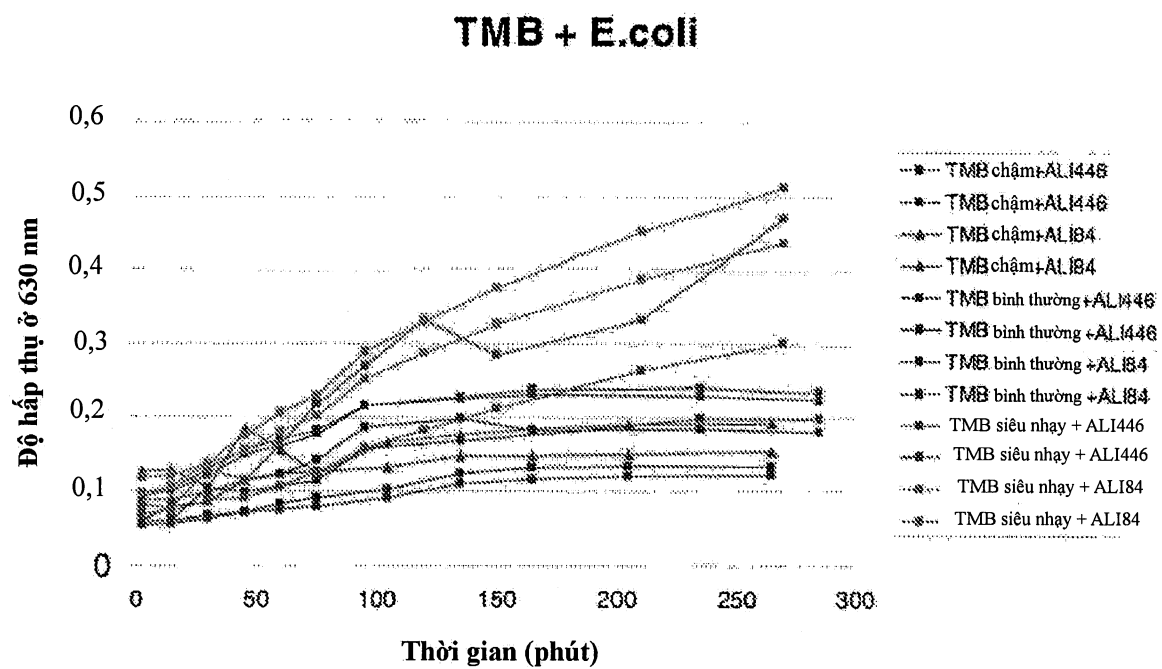


FIG.5

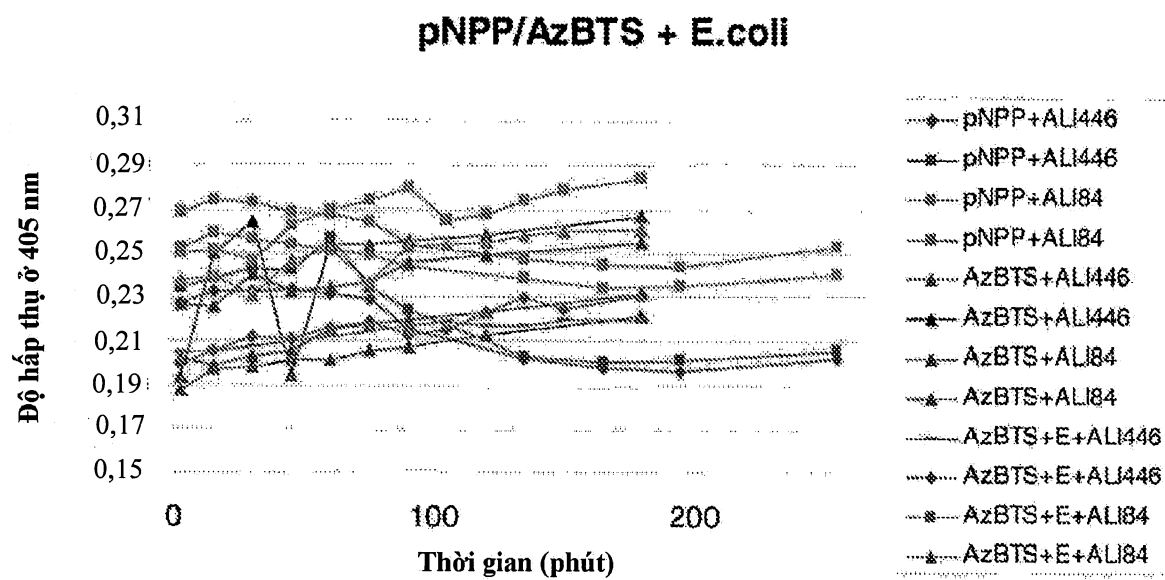


FIG.6

TMB chậm	TMB	TMB siêu nhạy	pHPP	AzHTS	AzHTS+L	TMB chậm	TMB	TMB siêu nhạy	pHPP	AzHTS	AzHTS+L	
												Ruột hồi cận tâm
												Ruột hồi ở giữa
												Ruột hồi xa tâm
												Ruột kết cận tâm
												Ruột kết xa tâm

FIG.7

Kháng thể sơ cấp (bên phải)	BP2022HRP			BP2022			Biotin			Không có kháng thể sơ cấp			
Kháng thể thứ cấp (bên dưới)	1:2000	1:10 000	1:100 000	1:2000	1:10 000	1:100 000	1:2000	1:10 000	1:100 000				
HRP1:1000/ StrHRP1:100	Kháng thể sơ cấp liên hợp HRP, không có kháng thể thứ cấp			BP2022, kháng thể thứ cấp liên hợp HRP			Kháng thể sơ cấp liên hợp biotin, kháng thể thứ cấp liên hợp StrHRP			Không có kháng thể sơ cấp, kháng thể thứ cấp liên hợp HRP		Không có kháng thể sơ cấp, kháng thể thứ cấp liên hợp StrHRP	
HRP1:10000/ StrHRP1:1000													
HRP1:100000/ StrHRP1:10000													
AP1:1000/ StrAP1:100	Không có kháng thể, chỉ có BSA + cơ chất (TMB)			BP2022, kháng thể thứ cấp liên hợp AP			Kháng thể sơ cấp liên hợp biotin, kháng thể thứ cấp liên hợp StrAP			Không có kháng thể sơ cấp, kháng thể thứ cấp liên hợp AP		Không có kháng thể sơ cấp, kháng thể thứ cấp liên hợp StrAP	
AP1:100000/ StrAP1:1000	Không có kháng thể, chỉ có BSA + cơ chất (pNPP)												
P1:100000/ StrAP1:10000	Trống												

FIG.8

		Kháng thể sơ cấp liên hợp HRP			Kháng thể sơ cấp BP2022			Kháng thể sơ cấp liên hợp biotin			Không có kháng thể sơ cấp			Đối chứng (không có kháng thể)	Kháng thể thứ cấp liên hợp HRP (bình thường hoặc streptavidin)	
															Kháng thể thứ cấp liên hợp AP (bình thường hoặc streptavidin)	

FIG.9

	HRP			BP2022			Biotin			Không có kháng thể sơ cấp	
	1:1000	1:10 000	1:100 000	1:1000	1:10 000	1:100 000	1:1000	1:10 000	1:100 000		
HRP1:10000 /StrHRP1:1000	Chỉ có kháng thể sơ cấp liên hợp HRP trong sữa			Kháng thể sơ cấp + kháng thể thứ cấp trong sữa			Kháng thể sơ cấp + kháng thể thứ cấp trong sữa			Không có kháng thể sơ cấp, kháng thể thứ cấp liên hợp HRP trong sữa	Không có kháng thể sơ cấp, kháng thể thứ cấp liên hợp Str-HRP trong sữa
HRP1:100000 /StrHRP1:10000											
HRP1:10000 /StrHRP1:1000	Chỉ có kháng thể sơ cấp liên hợp HRP trong huyết thanh bào thai bò 10%			Kháng thể sơ cấp + kháng thể thứ cấp trong huyết thanh bào thai bò 10%			Kháng thể sơ cấp + kháng thể thứ cấp trong huyết thanh bào thai bò 10%			Không có kháng thể sơ cấp, kháng thể thứ cấp liên hợp HRP trong huyết thanh bào thai bò 10%	Không có kháng thể sơ cấp, kháng thể thứ cấp liên hợp Str-HRP trong huyết thanh bào thai bò 10%
HRP1:100000 /StrHRP1:10000											
Trống										Chỉ có sữa và cơ chất	
										Chỉ có huyết thanh và cơ chất	

FIG.10

	Kháng thể sơ cấp liên hợp HRP			Kháng thể sơ cấp BP2022			Kháng thể sơ cấp liên hợp biotin			Kháng thể sơ cấp kháng thể thứ cấp liên hợp HRP	Kháng thể thứ cấp liên hợp Su-HRP	
	1:1000	1:10 000	1:100 000	1:1000	1:10 000	1:100 000	1:1000	1:10 000	1:100 000			
HRP 1:10000 /Su.HRP 1:1000												bị phong bề bằng sữa
HRP 1:100000 /Su.HRP 1:10 000												
HRP 1:10000 /Su.HRP 1:1000												bị phong bề bằng huyết thanh
HRP 1:100000 /Su.HRP 1:10 000												

FIG.11

Vi khuẩn/giống	ALI84						ALI446					
	1:1000		1:10000		1:100 000		1:1000		1:10000		1:100 000	
10^7												
10^6												
10^5												
10^4												
10^3												
0												

FIG.12

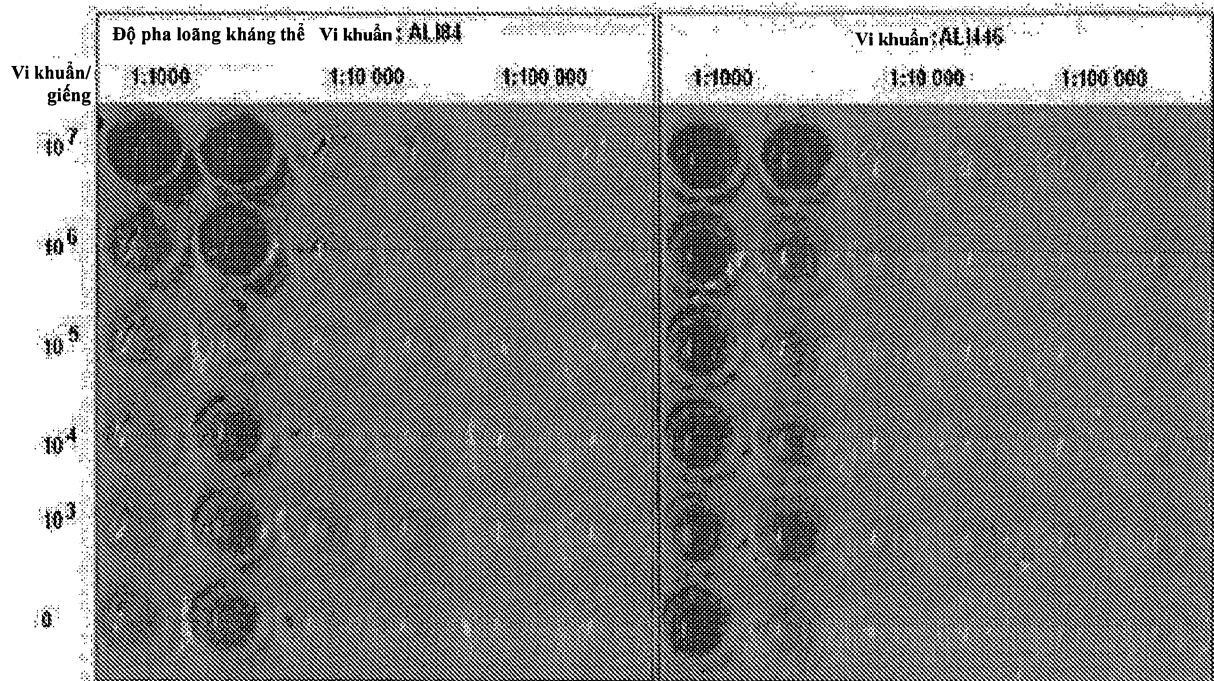


FIG.13

Vi khuẩn/giếng	Độ pha loãng kháng thể thử cấp	chủng <i>E. coli</i> AL184						chủng <i>E. coli</i> AL1446											
		Độ pha loãng kháng thể sơ cấp																	
		1:1000			1:10000			1:100 000			1:1000			1:10000			1:100 000		
10 ⁷	1:1000																		
	1:10 000																		
10 ⁶	1:1000																		
	1:10 000																		
10 ⁵	1:1000																		
	1:10 000																		
10 ⁴	1:1000	AL184, không có kháng thể sơ cấp						AL1446, không có kháng thể sơ cấp						Không có vi khuẩn, không có kháng thể sơ cấp					
10 ³	1:10 000	AL184, không có kháng thể sơ cấp						AL1446, không có kháng thể sơ cấp						Không có vi khuẩn, không có kháng thể sơ cấp					

FIG.14

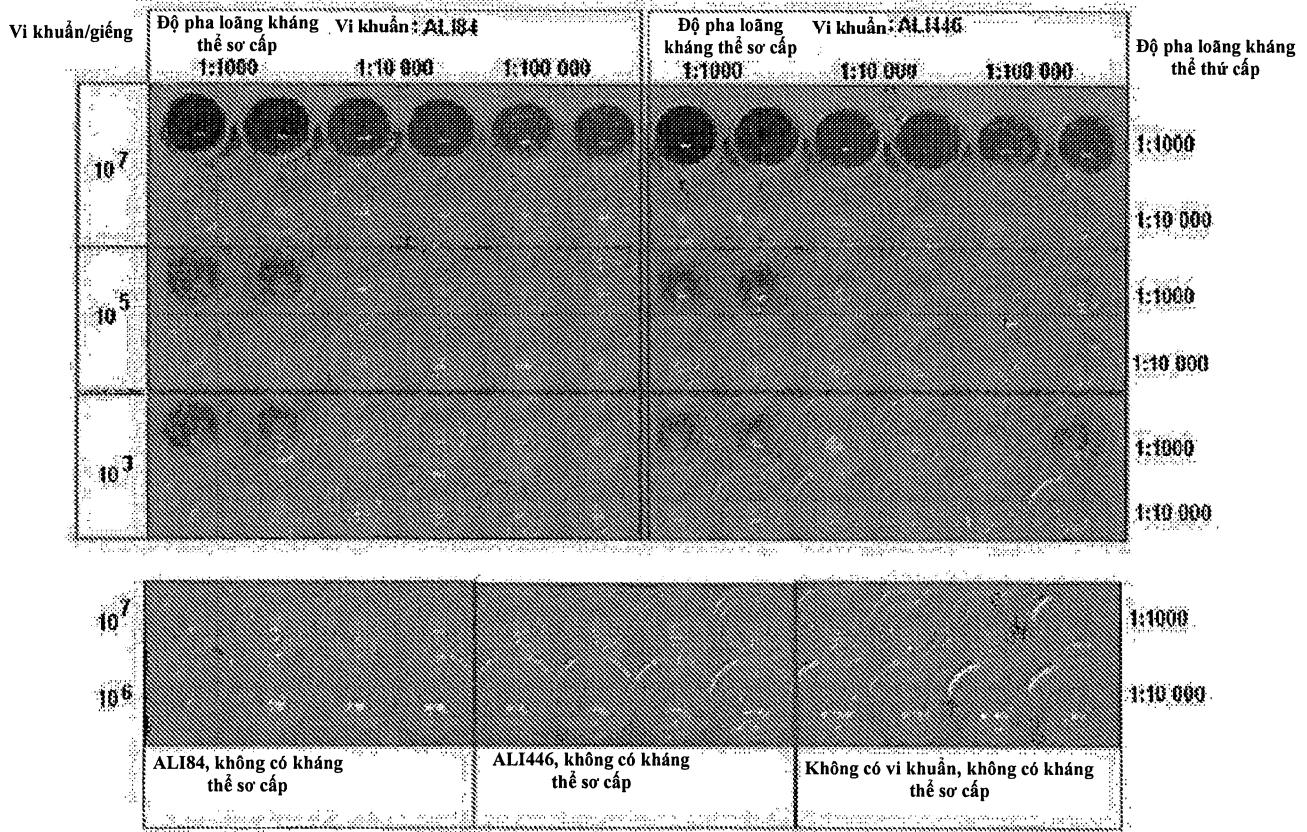


FIG.15

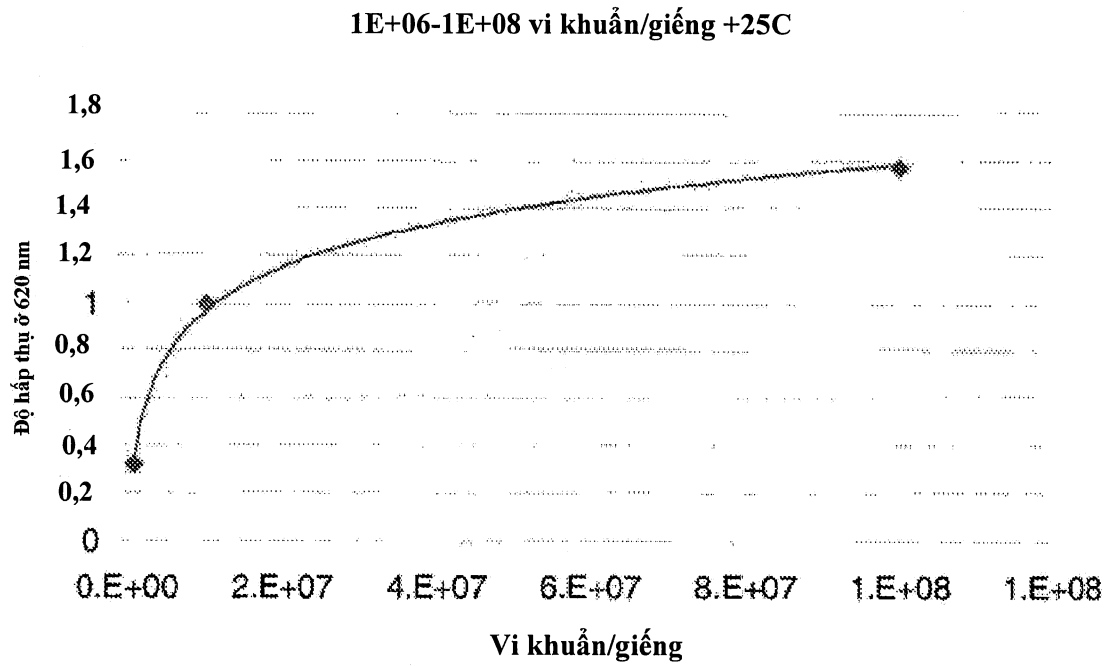


FIG.16

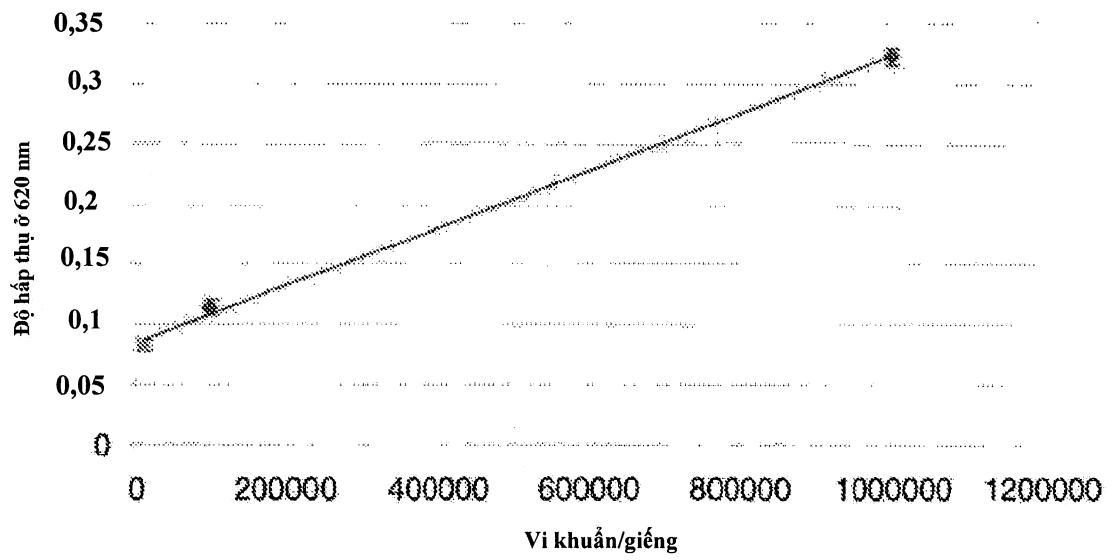
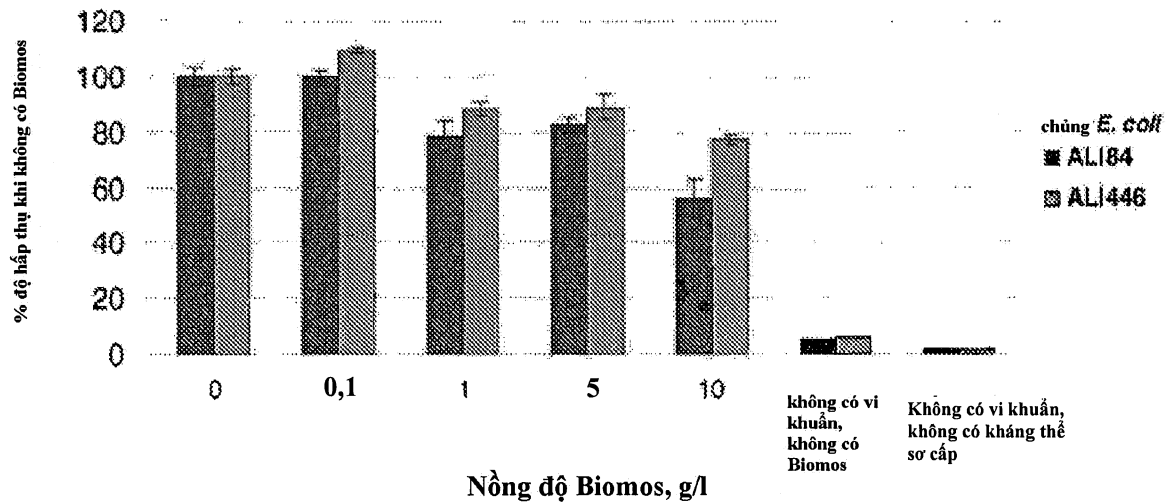


FIG.17

A

Ảnh hưởng của Biomós trong ELISA



B

Thử nghiệm gắn kết phóng xạ trước và sau ELISA

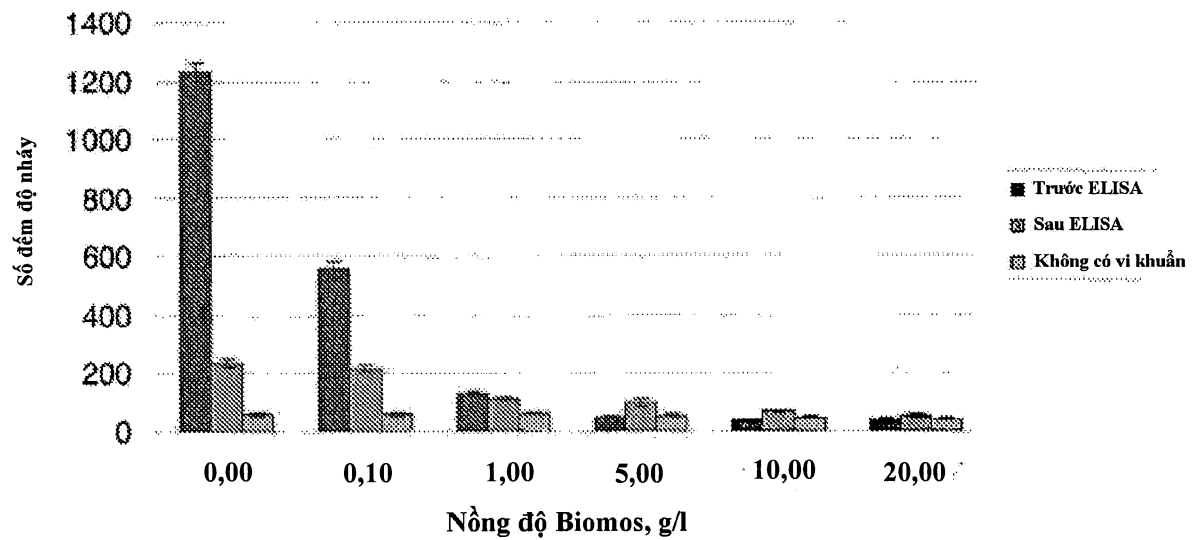


FIG.18

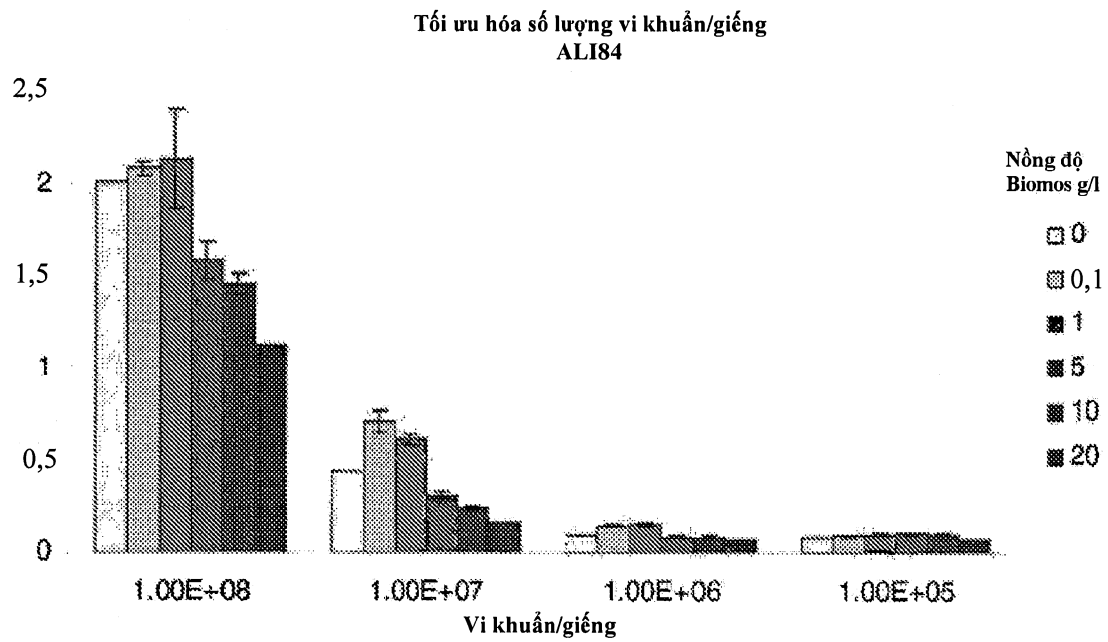


FIG.19

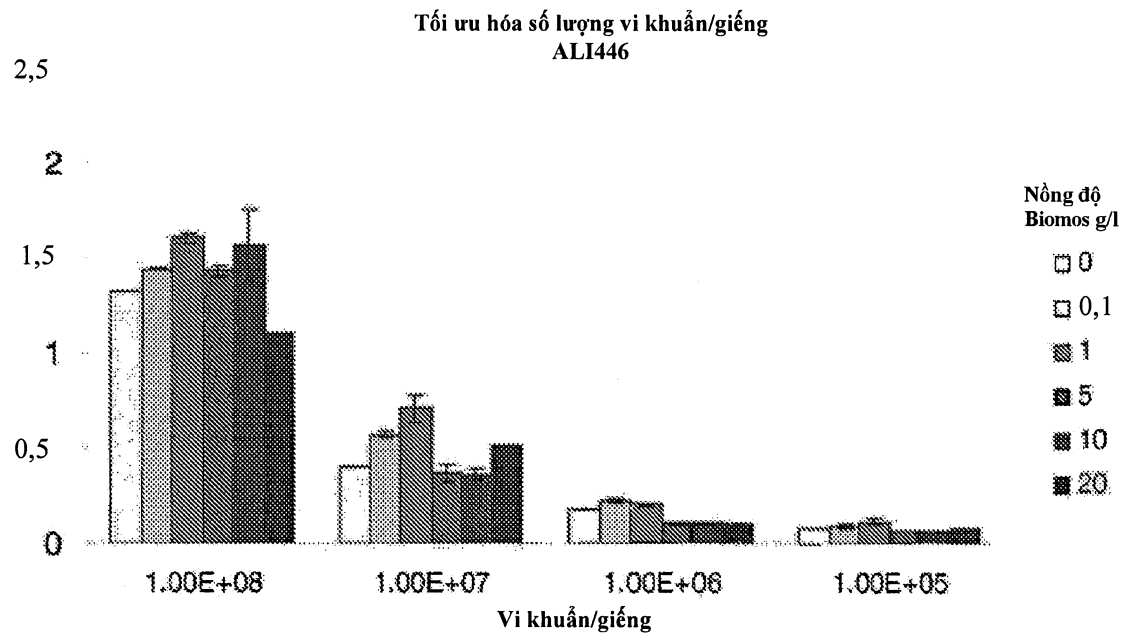


FIG.20

Tối ưu hóa nồng độ kháng thể sơ cấp

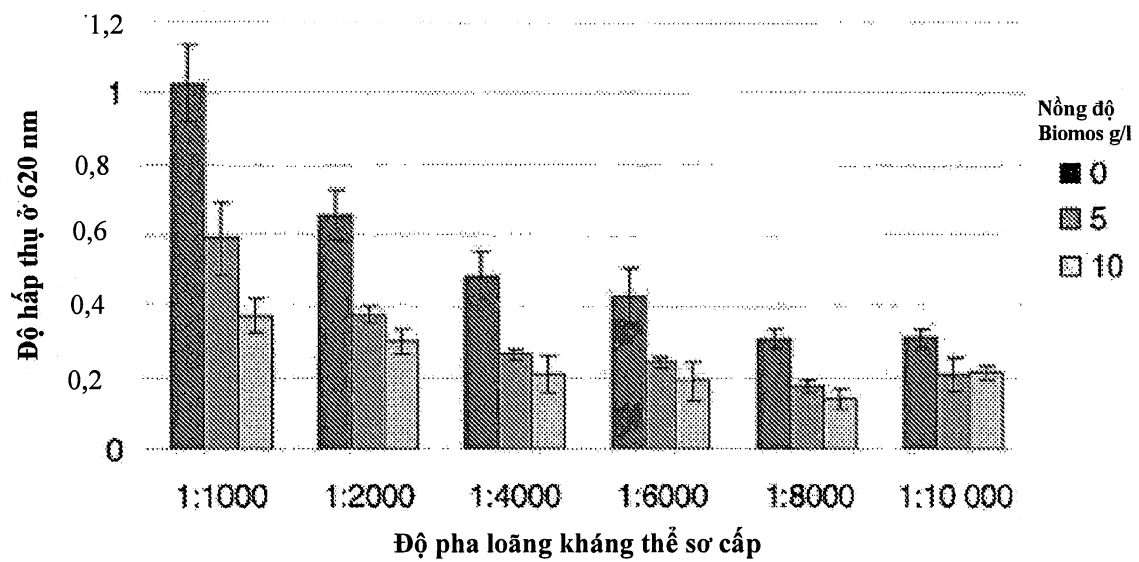


FIG.21

Ảnh hưởng của Biomós với các loại chất nhầy khác nhau

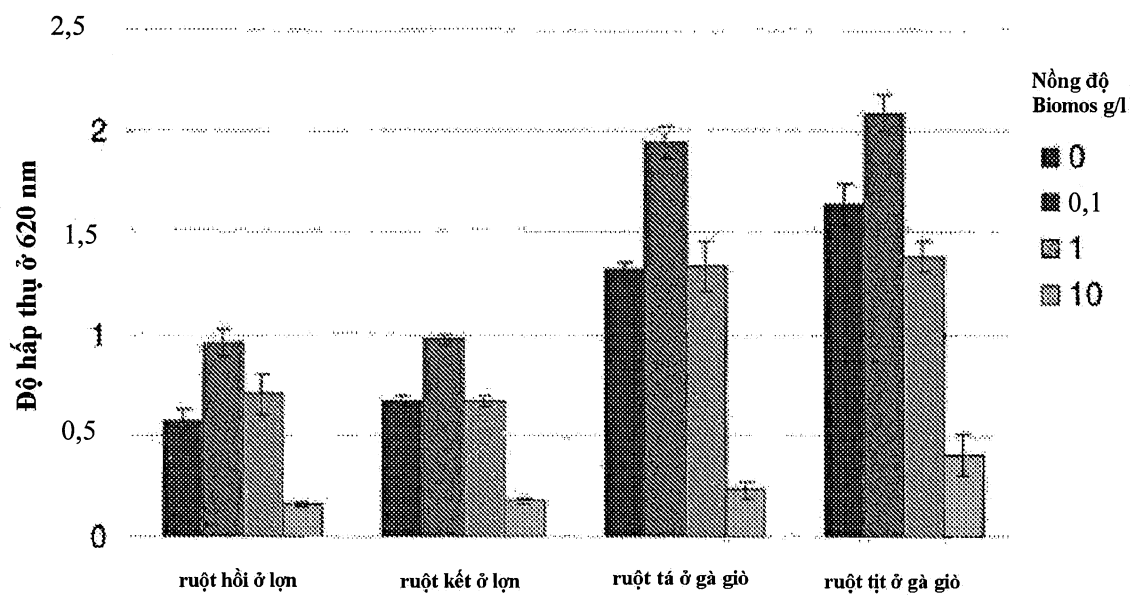


FIG.22

Ảnh hưởng của Biomass trong thử nghiệm ELISA/thử nghiệm nhấp nháy

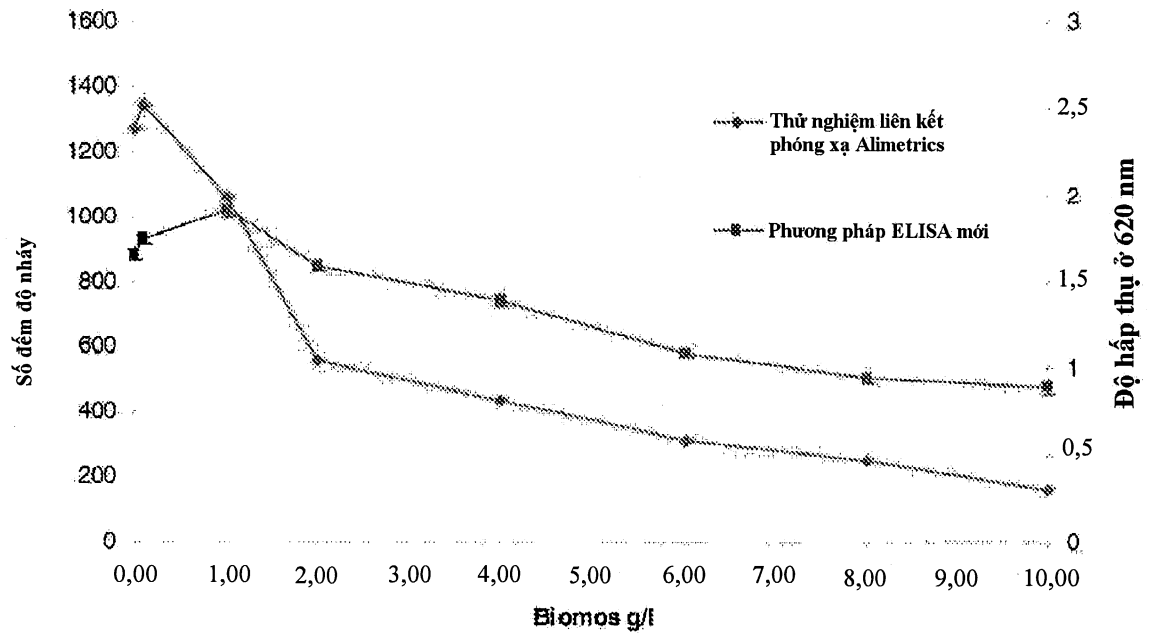


FIG.23

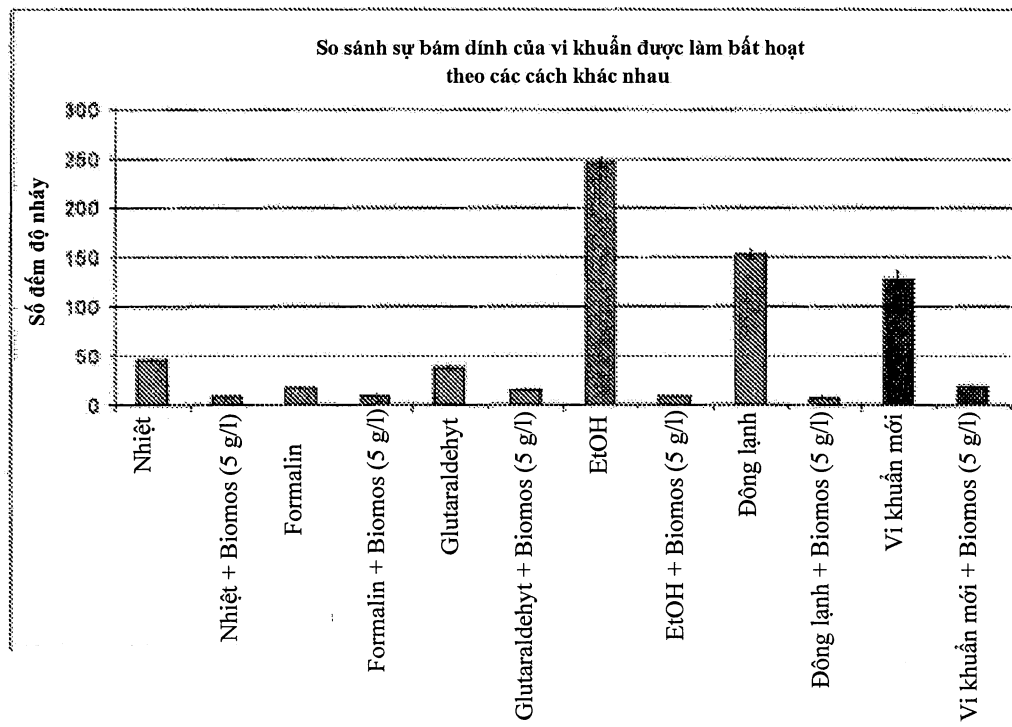


FIG.24

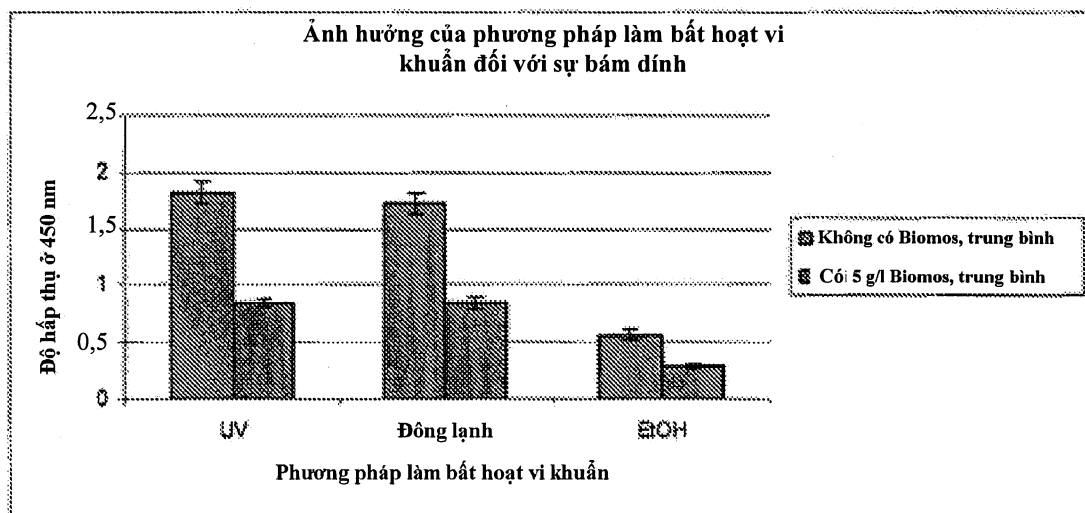


FIG.25

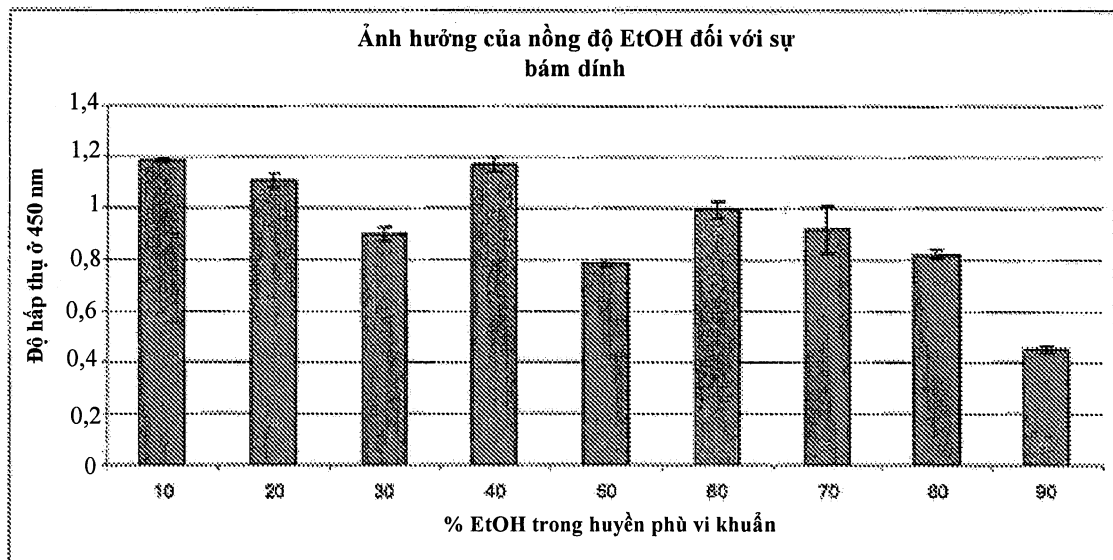


FIG.26

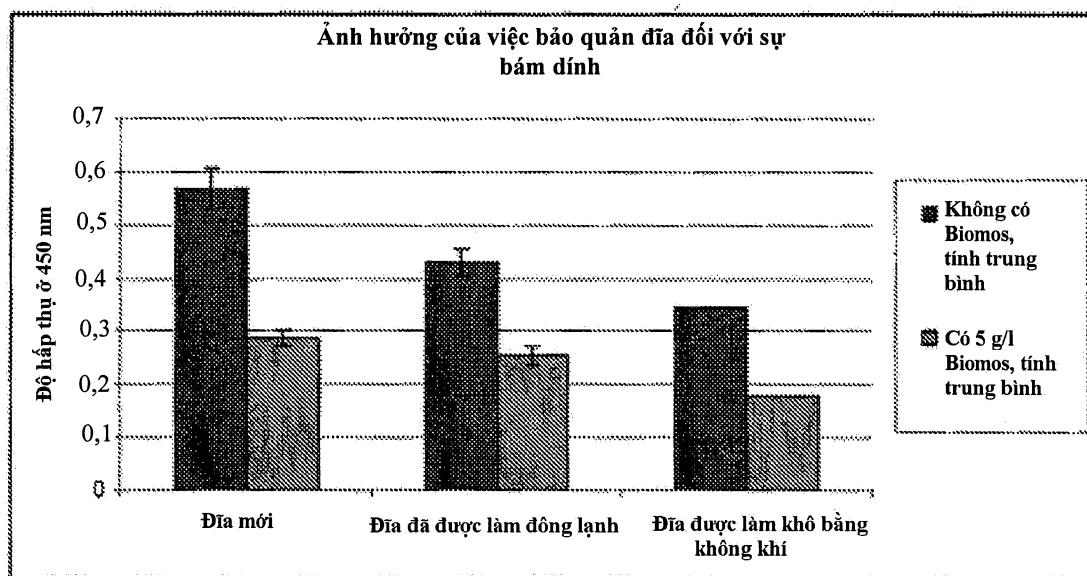


FIG.27

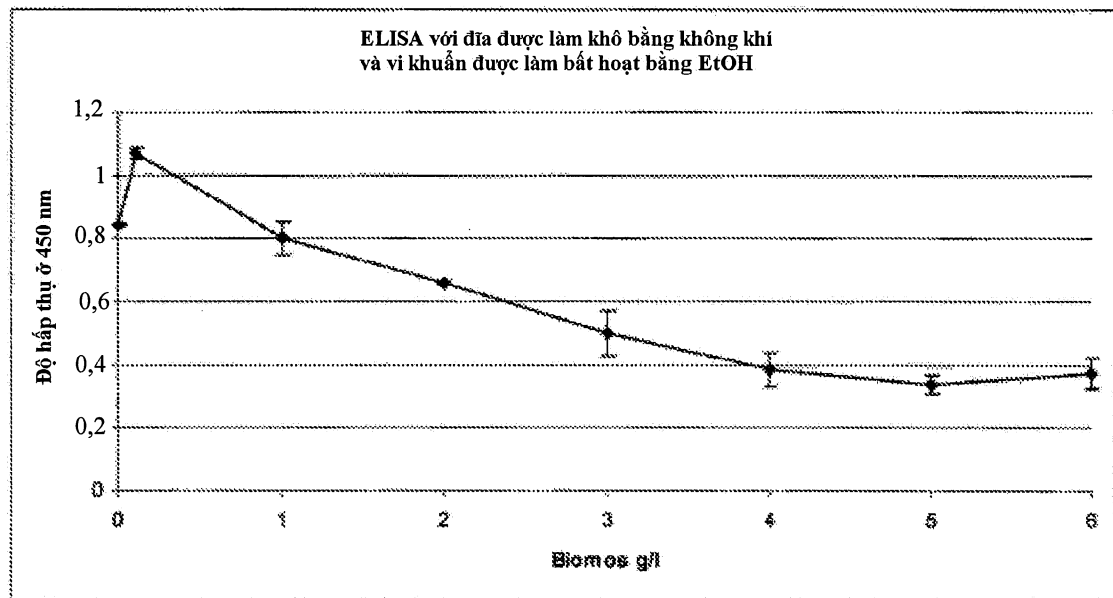


FIG.28

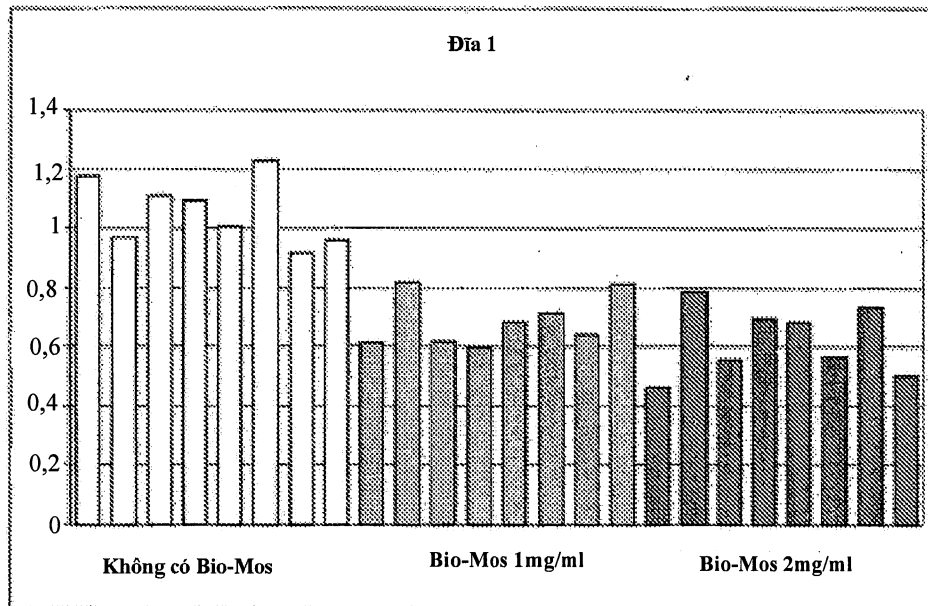


FIG.29

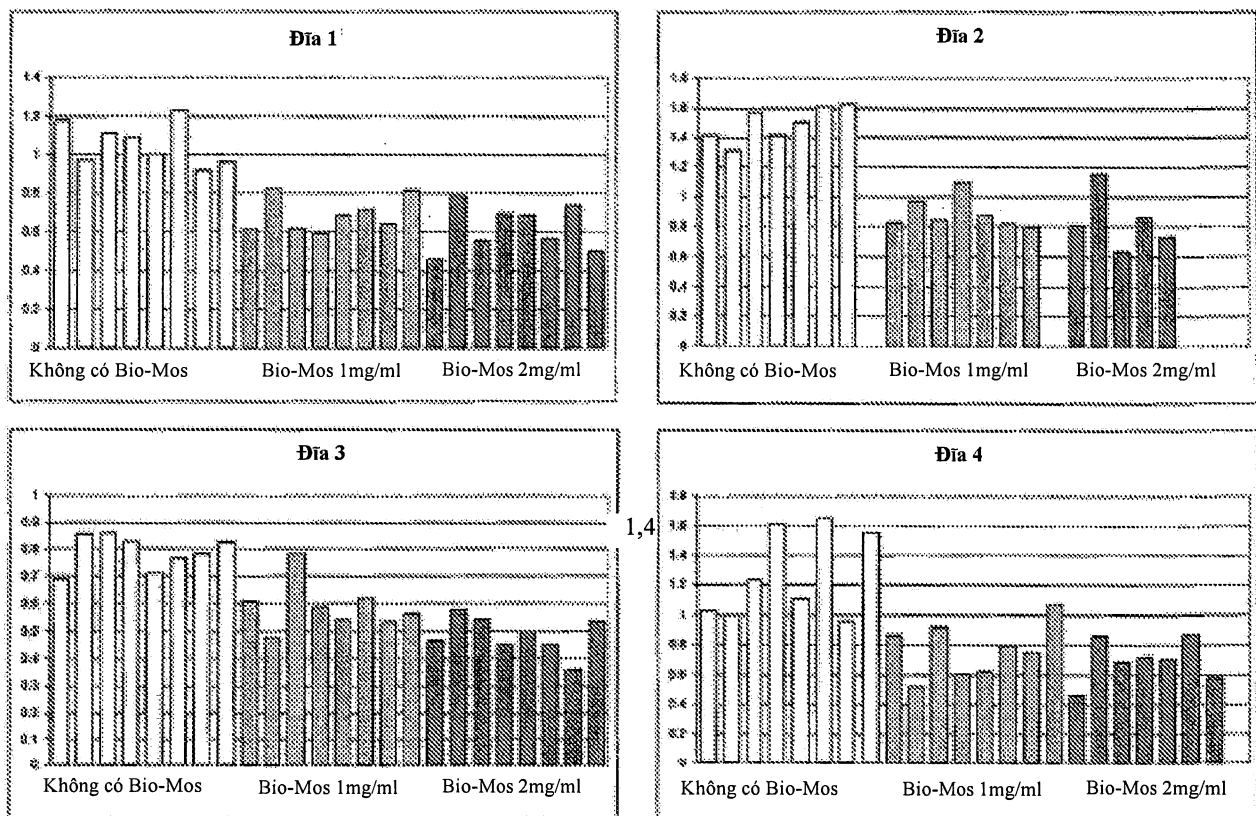


FIG.30

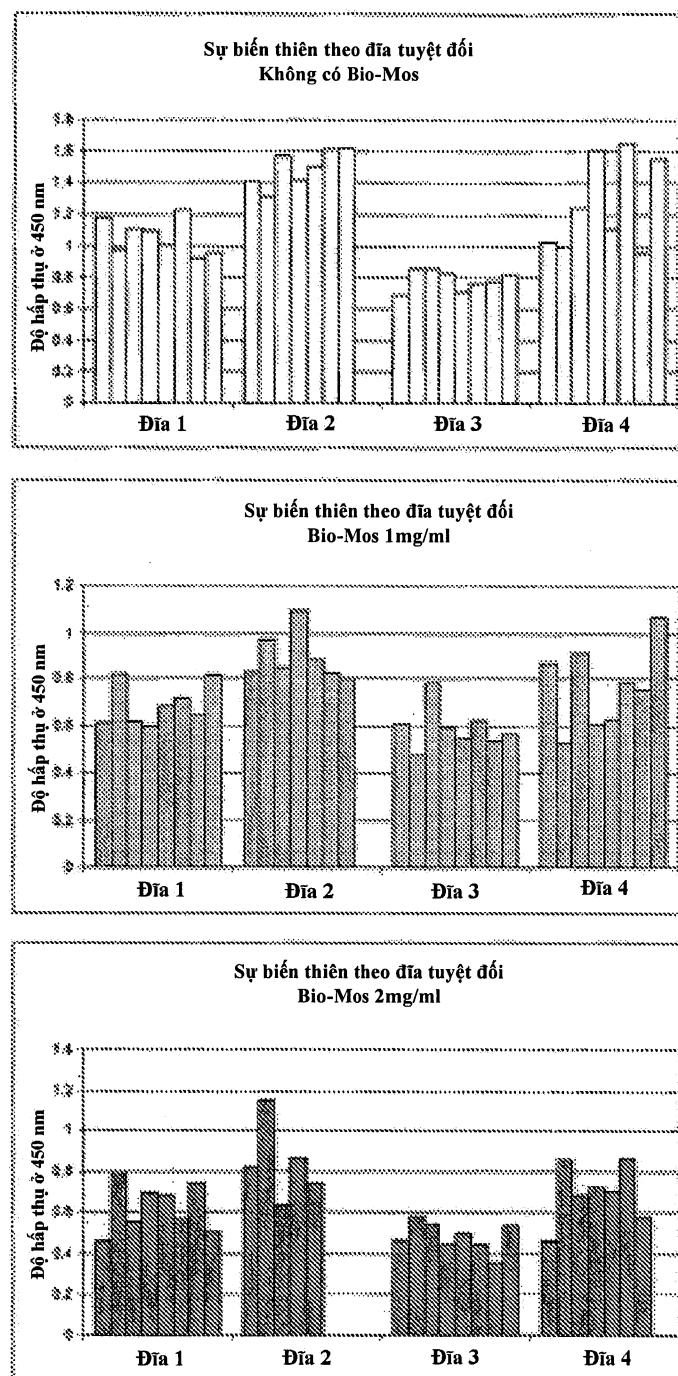


FIG.31

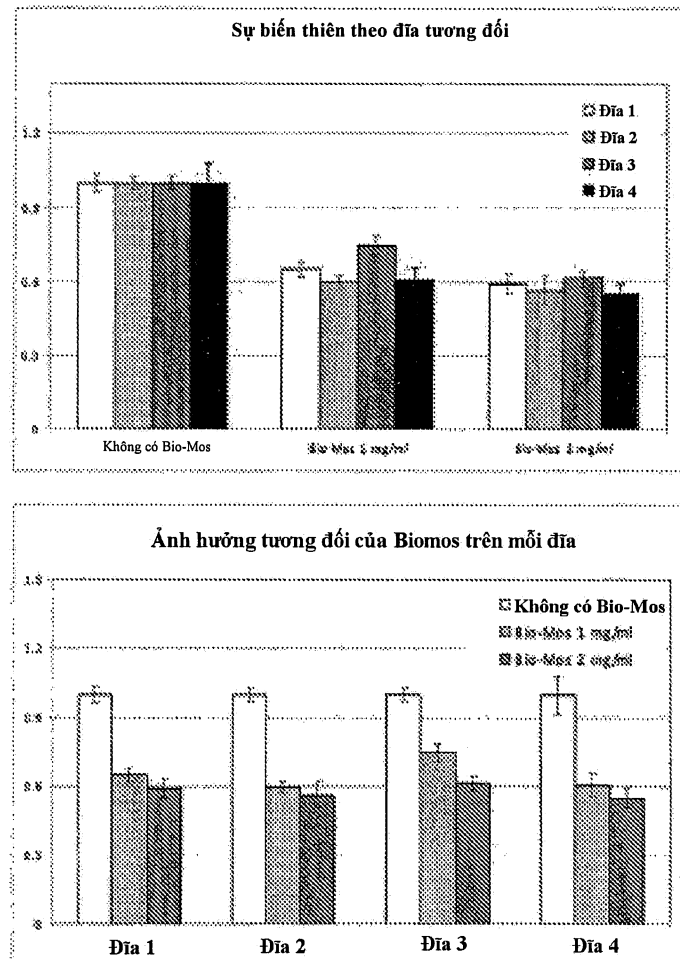


FIG.32

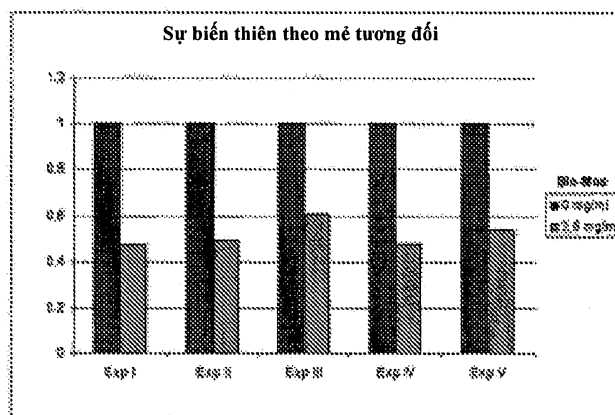
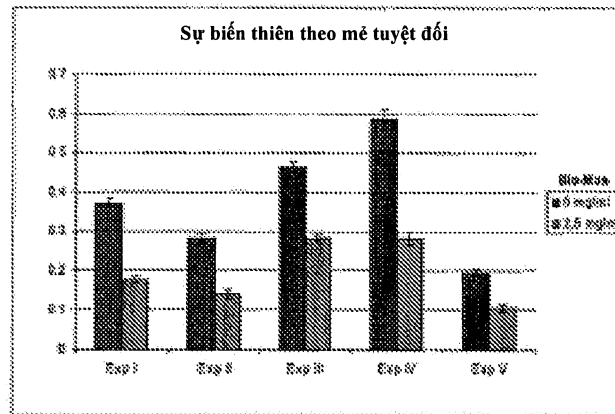


FIG.33

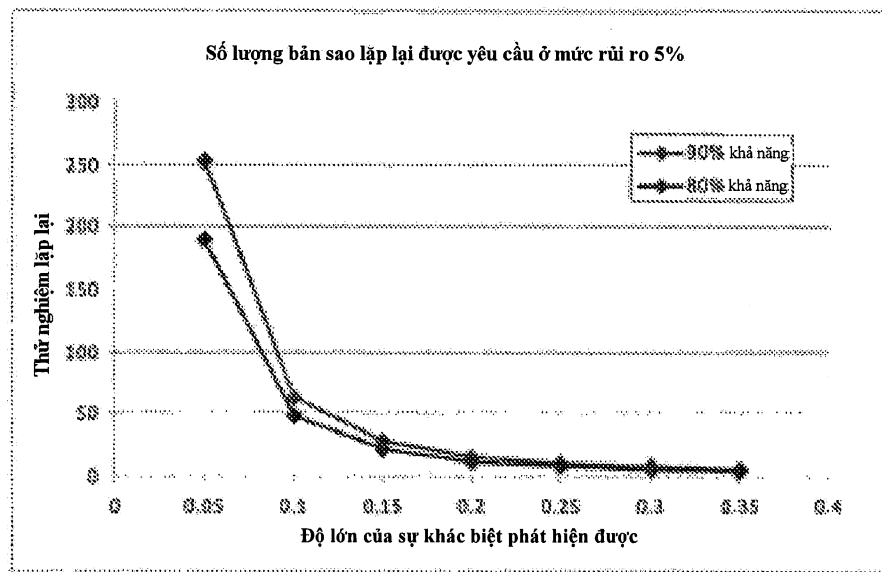


FIG.34

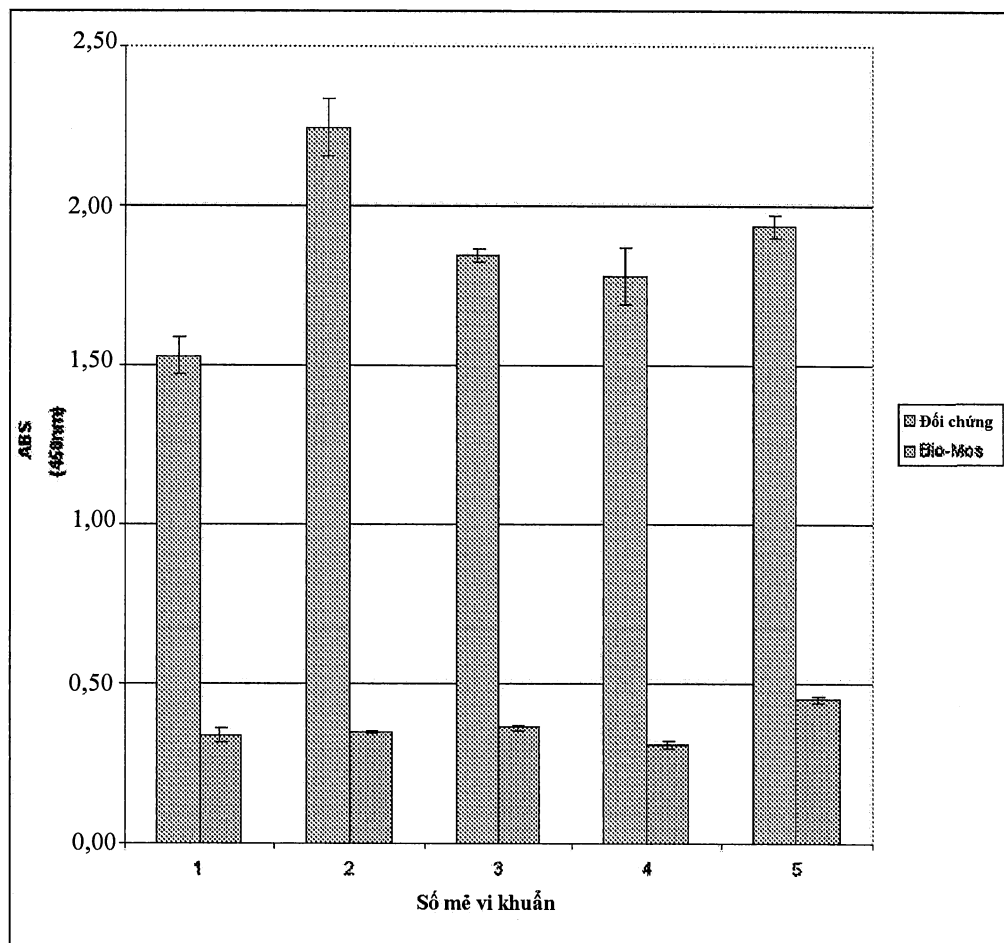


FIG.35

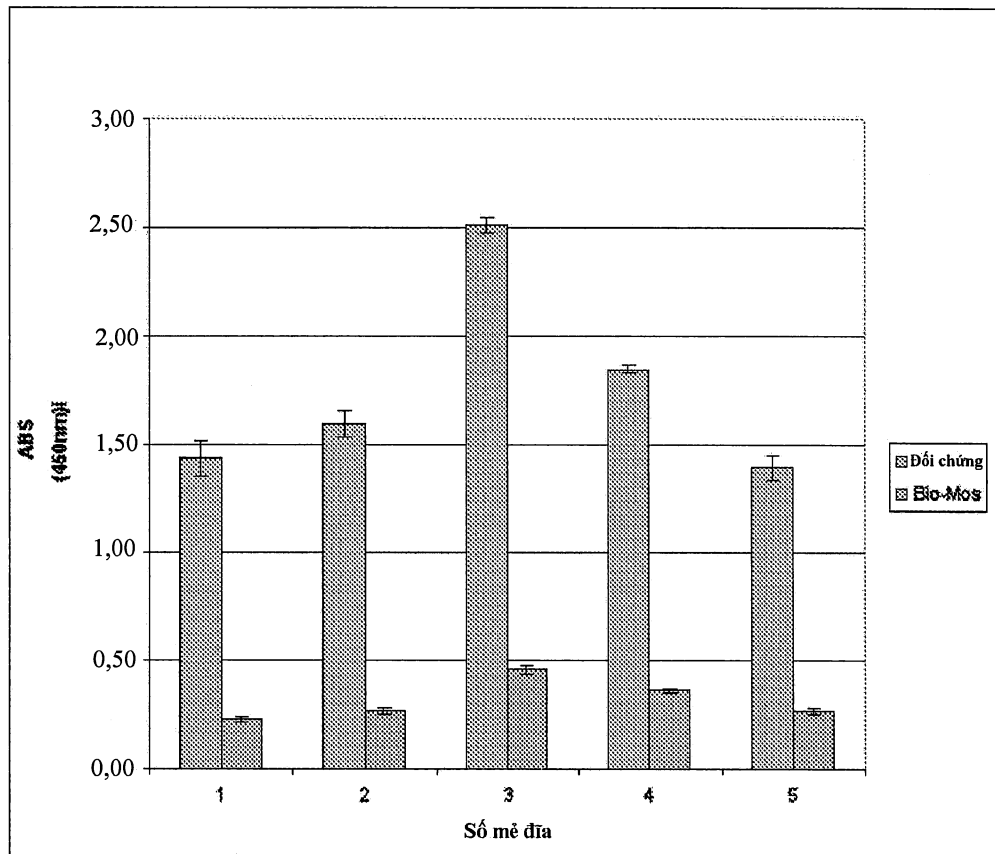


FIG.36

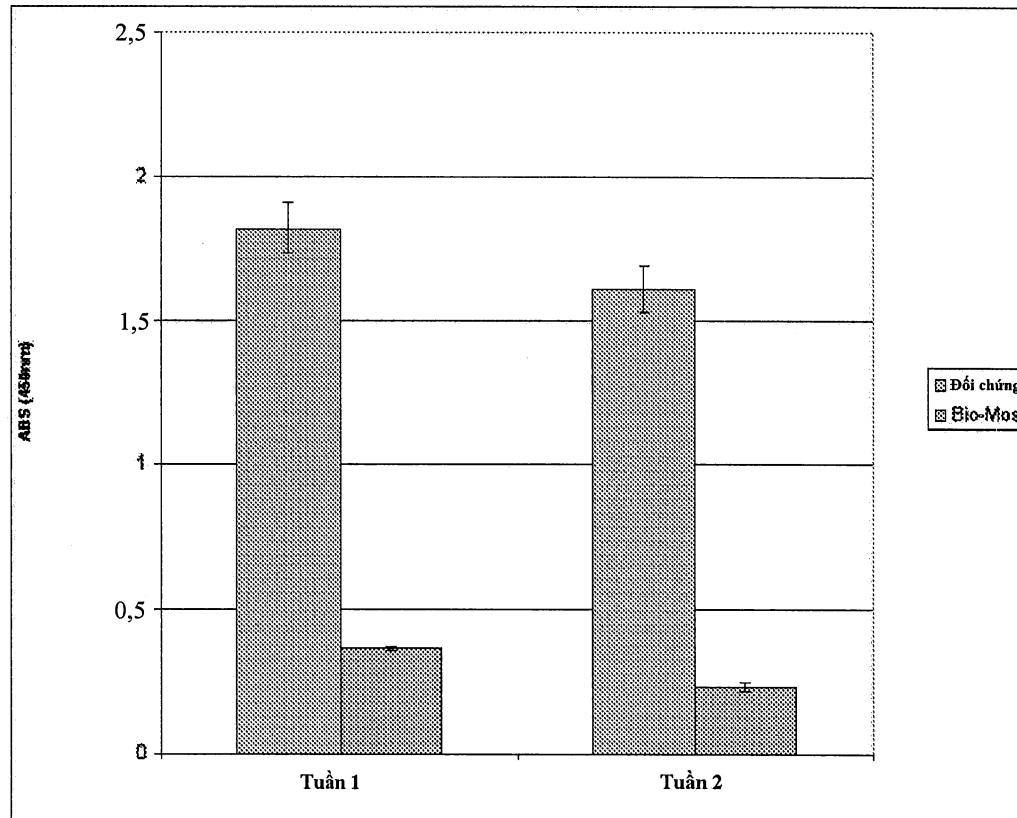


FIG.37

