



(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)



1-0025841

(51)<sup>7</sup> G01N 33/53; A61K 31/716

(13) B

(21) 1-2012-03385

(22) 13/05/2011

(86) PCT/US2011/036518 13/05/2011

(87) WO/2011/143613 17/11/2011

(30) 61/334,995 14/05/2010 US

(45) 26/10/2020 391

(43) 25/06/2013 303A

(73) ALLTECH, INC. (US)

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

(72) MORAN, Colm (IE); KWIATKOWSKI, Stefan (US); YIANNIKOURIS, Alexandros (FR); THIELEN, Ursula Anne (US).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN THÀNH PHẦN CỦA THÀNH TẾ BÀO NẤM MEN

(57) Sáng chế đề cập đến chất phụ gia thức ăn cho động vật và phương pháp phát hiện chúng trong sản phẩm thức ăn. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các thành phần của thành tế bào nấm men, phương pháp phân lập chúng, và hợp phần và phương pháp phát hiện chúng bằng miễn dịch.

### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến chất phụ gia thức ăn cho động vật và phương pháp phát hiện chúng trong sản phẩm thức ăn. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các thành phần của thành tế bào nấm men, phương pháp tách riêng chúng, và hợp phần và phương pháp phát hiện chúng bằng miễn dịch.

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

Trong lĩnh vực dinh dưỡng cho động vật, nhiều chất phụ gia và chất bổ sung khác nhau đã được sử dụng để cải thiện năng suất của gia súc. Trong một số trường hợp, các thành phần của thành tế bào nấm men được sử dụng làm chất phụ gia thức ăn cho động vật. Một ví dụ là chất phụ gia thức ăn MYCOSORB (được sản xuất bởi ALLTECH, Inc.). MYCOSORB liên kết với tạp chất độc tố nấm trong thực phẩm và thức ăn, nhờ đó cang hóa độc tố nấm ở trạng thái tiêu hóa được. Các tạp chất độc tố nấm như vậy thường xuất hiện do sự sinh trưởng của nấm cả ở trên cánh đồng và sau khi thu hoạch ở hạt, các sản phẩm phụ của hạt, và thức ăn gia súc ủ xilô ngô được sử dụng làm các thành phần nguyên liệu. Mặc dù các thành phần thức ăn thô và đã qua chế biến bán trên thị trường phải trải qua yêu cầu kiểm tra độc tố nấm, nhưng không có hệ thống kiểm soát nào có hiệu quả 100%. Trên thế giới, ước tính rằng khoảng 25% trong số tất cả các cây trồng thời vụ bị ảnh hưởng bởi sự nhiễm độc tố nấm (Council for Agricultural Science and Technology (1989) “Mycotoxins: Economics and Health Risks”, Task Force Report No. 116, Ames, IA), và do vậy, tác động khi các nguyên liệu bị nhiễm tạp đi vào chuỗi cung cấp thức ăn cho gia súc và động vật bầu bạn gần như không thể tránh được. Hậu quả khi gia súc tiêu thụ thức ăn bị nhiễm độc tố nấm gồm giảm cảm giác thèm ăn, giảm tốc độ sinh trưởng, giảm chức năng sinh sản và sản lượng sữa, suy giảm hệ miễn dịch, tiêu hóa kém, và trong các trường hợp nghiêm trọng gây chết gia súc. Do vậy, việc cang hóa độc tố nấm đã chứng tỏ là phương pháp hữu ích để làm

giảm nguy cơ rủi ro của các độc tố có trong tự nhiên mà tác động bất lợi đến sức khỏe động vật và con người.

Việc phát triển các phương pháp phân tích mạnh, đặc hiệu và bộ kit để phát hiện định tính và định lượng các chất phụ gia thức ăn bị làm phức tạp bởi sự có mặt của nhiều hợp chất cản trở, và bởi nồng độ tương đối thấp của chất phụ gia thức ăn được sử dụng trong thức ăn chế biến sẵn để động vật tiêu thụ.

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

Sáng chế đề cập đến chất phụ gia thức ăn cho động vật và phương pháp phát hiện chúng trong sản phẩm thức ăn. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các thành phần của thành tế bào nấm men, các phương pháp tách riêng chúng, và hợp phần và phương pháp phát hiện chúng bằng miễn dịch. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện thành phần thành tế bào nấm men và/hoặc mảnh của chúng trong mẫu (ví dụ, mẫu thức ăn, mẫu thực phẩm, hoặc phần chiết của chúng). Phương pháp này có thể được sử dụng, ví dụ, để xác định sự có mặt của chất phụ gia thực phẩm và thức ăn bao gồm các thành phần của thành tế bào nấm men (ví dụ, glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, chất phụ gia thức ăn MYCOSORB, chất phụ gia thức ăn BIOMOSS, chất phụ gia thức ăn ACTIGEN, và các chất tương tự) trong sản phẩm thức ăn (ví dụ, thức ăn cho gia súc, thức ăn cho động vật bầu bạn, hoặc các sản phẩm trung gian của chúng trong quá trình sản xuất). Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các phương pháp để chiết các thành phần của thành tế bào nấm men (ví dụ, glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, chất phụ gia thức ăn MYCOSORB, và các chất tương tự) từ sản phẩm thức ăn (ví dụ, thức ăn cho gia súc, thức ăn cho động vật bầu bạn, hoặc các sản phẩm trung gian của chúng trong quá trình sản xuất). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng nguyên để sử dụng để làm tăng kháng thể đối với các thành phần của thành tế bào nấm men đặc hiệu (ví dụ, (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men,

(1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, và/hoặc thể liên hợp của chúng). Theo các phương án được ưu tiên, các kháng nguyên như vậy được liên hợp với chất mang, ví dụ, chất mang protein (ví dụ, albumin huyết thanh bò (BSA)). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp hoạt hóa hydrat cacbon (ví dụ, hydrat cacbon chứa vòng glucopyranoza, glucan, (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan) nấm men ở (các) vị trí C6-OH. Theo một số phương án, sự hoạt hóa như vậy bao gồm sự oxy hóa nhẹ (ví dụ, sử dụng dimethylsulfoxit/anhydrit axetic). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể có khả năng nhận biết kháng nguyên thành tế bào nấm men (ví dụ, kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng có khả năng nhận biết (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, hoặc thể liên hợp của chúng; kháng thể đơn dòng 513A161.1 hoặc 513A431.1 được làm tăng chống lại kháng nguyên (1→4)- $\alpha$ -D-glucan/(1,6)- $\beta$ -D-glucan/BSA; kháng thể đa dòng được làm tăng chống lại kháng nguyên (1→4)- $\alpha$ -D-glucan/(1→6)- $\beta$ -D-glucan/BSA; hoặc được tinh chế, được pha loãng, được liên hợp, và/hoặc dạng đơn đặc hiệu của chúng). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất bộ kit bao gồm chất phản ứng để phát hiện các thành phần của thành tế bào nấm men (ví dụ, glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, chất phụ gia thức ăn MYCOSORB, và các chất tương tự) trong mẫu (ví dụ, mẫu thức ăn, mẫu thực phẩm, hoặc phần chiết của chúng).

Sáng chế không bị giới hạn bởi loại hoặc bản chất của mẫu được dùng để phân tích. Theo một số phương án được ưu tiên, mẫu là sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn hoặc thu được từ sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn. Sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn bao gồm (các) nguyên liệu bất kỳ mà được tiêu thụ (ví dụ, bởi động vật) đóng góp năng lượng và/hoặc chất dinh dưỡng cho chế độ ăn uống. Ví dụ về thực phẩm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Khẩu phần hỗn hợp hoàn chỉnh (TMR), (các) thức ăn cho súc vật, (các) viên tròn, (các) chất cô, (các) đồng sản phẩm thức ăn trộn sẵn, (các) hạt, (các) bã chưng cất rượu, ri đường, (các) chất xơ, cỏ khô (cho súc vật ăn), cỏ, cỏ khô, (các) hạt, lá, bột xay

thô, (các) chất tan, và (các) chất bổ sung. Thức ăn và thực phẩm không bị giới hạn bởi dạng vật lý của chúng. Thức ăn và thực phẩm có thể được chế biến thành cỡ hạt nhỏ hơn (ví dụ, được thái lát, được chặt nhỏ, được nghiền, được xay, hoặc các biện pháp tương tự); được làm thành dạng lỏng (ví dụ, được chiết, được đun sôi, được cô, được biến đổi thành xirô hoặc dạng dính nhót khác); hoặc được chế biến thành kích thước lớn hơn (ví dụ, được đóng thành kiện, được lèn chặt, được nén, hoặc được tạo thành các hình dạng hỗn hợp, ví dụ, hình viên, khối, hình vuông, hình bông tuyết, và các hình dạng tương tự).

Sáng chế không bị giới hạn bởi loại hoặc bản chất của phương pháp chiết được dùng để thu được mẫu để phân tích. Theo một số phương án, nguyên liệu ban đầu cần phân tích (ví dụ, sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn; thực phẩm) được cho qua kỹ thuật chiết để thu được mẫu để phân tích. Kỹ thuật chiết gồm nhưng không giới hạn ở chiết axit, chiết kiềm, chiết với dung môi hữu cơ, chiết với chất đệm, chiết với muối, chiết với chất tẩy rửa, chiết vật lý (ví dụ, đun sôi, chiết hơi, chiết nhiệt độ thấp, nghiền, và các cách tương tự), hoặc hỗn hợp của chúng. Theo một số phương án, nguyên liệu cần phân tích (ví dụ, sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn; thực phẩm) được chiết bằng cách sử dụng hỗn hợp của dung môi hữu cơ và dung dịch axit. Theo một số phương án, nguyên liệu cần phân tích (ví dụ, sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn; thực phẩm) được chiết bằng cách sử dụng dung dịch chứa dimetylsulfoxit (DMSO) và axit clohydric (HCl).

Sáng chế không bị giới hạn bởi lượng của chất phân tích (ví dụ, kháng nguyên, thành phần thành tế bào nấm men, glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, chất phụ gia thức ăn MYCOSORB, và các chất tương tự) có mặt trong mẫu ban đầu. Lượng chất phân tích có thể ít hơn 0,005 mg, 0,005-0,05 mg, 0,05-0,5 mg, 0,5-1 mg, 1-5 mg, 5-10 mg, 10-25 mg, 25 mg hoặc hơn nữa. Sáng chế không bị giới hạn bởi lượng của chất phân tích (ví dụ, kháng nguyên, thành phần thành tế bào nấm men, glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men,

(1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, chất phụ gia thức ăn MYCOSORB, và các chất tương tự) có mặt trong nguyên liệu ban đầu cần được kiểm tra. Lượng chất phân tích được phát hiện có thể ít hơn 0,05 kg cho mỗi tấn, 0,05-0,5 kg cho mỗi tấn, 0,5-1 kg cho mỗi tấn, 1,0-2,0 kg cho mỗi tấn, 2,0-3,0 kg cho mỗi tấn, 3,0-4,0 kg cho mỗi tấn, 4,0-5,0 kg cho mỗi tấn, 5,0-6,0 kg cho mỗi tấn, 6,0-10,0 kg cho mỗi tấn, 10 kg cho mỗi tấn hoặc lớn hơn.

Sáng chế không bị giới hạn bởi nồng độ làm việc của kháng thể được sử dụng để phát hiện chất phân tích (ví dụ, ví dụ, kháng nguyên, thành phần thành tế bào nấm men, glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, chất phụ gia thức ăn MYCOSORB, và các chất tương tự). Sự pha loãng để xử lý của kháng thể (ví dụ, kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng có khả năng nhận biết (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, hoặc thể liên hợp của chúng; kháng thể đơn dòng 513A161.1 hoặc 513A431.1 được làm tăng chống lại kháng nguyên (1→4)- $\alpha$ -D-glucan/(1→6)- $\beta$ -D-glucan/BSA; kháng thể đa dòng được làm tăng chống lại kháng nguyên (1→4)- $\alpha$ -D-glucan/(1→6)- $\beta$ -D-glucan/BSA; hoặc được tinh chế, được pha loãng, được liên hợp, và/hoặc dạng đơn đặc hiệu của chúng) có thể loãng hơn 1:100.000; 1:50.000 đến 1:100.000; 1:20.000 đến 1:50.000; 1:10.000 đến 1:20.000; 1:5.000 đến 1:10.000; 1:1.000 đến 1:5.000; 1:500 đến 1:1.000; 1:100 đến 1:500; 1:50 đến 1:100; 1:10-1:50; 1:1 đến 1:10; 2:1 đến 1:1; hoặc đặc hơn 2:1.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hợp phần gây miễn dịch bao gồm các thành phần của thành tế bào nấm men. Theo một số phương án, thành phần thành tế bào nấm men bao gồm glucan nấm men. Theo một số phương án, glucan bao gồm (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, hoặc thể liên hợp hoặc dẫn xuất của chúng. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men được liên hợp với chất mang (ví dụ, chất mang protein). Chất mang có thể tạo điều kiện thuận lợi cho tính sinh miễn

dịch và/hoặc độ ổn định ở động vật chủ. Ví dụ về chất mang bao gồm, nhưng không giới hạn ở, albumin huyết thanh bò (BSA), hemoxyanin hà (KLH), ovalbumin (OVA), thyroglobulin bò (THY), và kháng nguyên lõi viêm gan B vệt (DHBcAg) (Gathuru et al. (2005) Vaccine 23:4727-4733). Sáng chế không bị giới hạn bởi vị trí của liên kết giữa kháng nguyên và với chất mang. Theo một số phương án được ưu tiên, kháng nguyên (ví dụ, kháng nguyên hydrat cacbon, glucan, hydrat cacbon bao gồm (các) vòng glucopyranoza, (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan) nấm men được liên hợp với chất mang ở một hoặc nhiều vị trí O-6 so với kháng nguyên. Theo một số phương án, kháng nguyên là (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men được liên hợp với BSA ở vị trí C6.

Kháng thể theo sáng chế không bị giới hạn bởi loài vật chủ trong đó chúng được làm tăng. Loài vật chủ có thể là chuột cống, chuột nhắt, chuột lang, chuột đồng, thỏ, dê, cừu, gà, lừa, ngựa, bò, chó, mèo, lợn, khỉ, người, hoặc loài bất kỳ khác. Kháng thể theo sáng chế không bị giới hạn bởi chế độ cấy nhiễm, phương pháp điều chế kháng nguyên, hoặc phương pháp phân phối kháng nguyên được sử dụng để làm tăng kháng thể. Kháng nguyên có thể được trình diện trong điều kiện có mặt hoặc vắng mặt chất kích thích miễn dịch (ví dụ, tá được), chất đệm, muối, dung môi, hợp chất làm tăng khả năng hòa tan, hoặc các chất tương tự. Loài vật chủ có thể được gây miễn dịch bằng kháng nguyên 1 lần; 2 lần; 3 lần; 4 lần; 5 lần, 5-10 lần; 10-20 lần; hoặc lớn hơn 20 lần. Kháng thể theo sáng chế không bị giới hạn bởi độ dòng vô tính (ví dụ, đơn dòng, đa dòng). Kháng thể có thể được sử dụng ở dạng thô hoặc dạng được tinh chế. Kháng thể có thể là đa đặc hiệu hoặc đơn đặc hiệu. Theo các phương án được ưu tiên, kháng thể có khả năng nhận biết đặc hiệu kháng nguyên được sử dụng để làm tăng chúng. Theo một số phương án được ưu tiên, kháng thể theo sáng chế có khả năng nhận biết đặc hiệu (1→4)- $\alpha$ -D-glucan/(1→6)- $\beta$ -D-glucan được chiết từ thành tế bào nấm men (ví dụ, *Saccharomyces cerevisiae*). Theo một số phương án được ưu tiên, kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể đa dòng. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng có

khả năng nhận biết (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, hoặc mảnh, biến thể, hoặc thể liên hợp của chúng. Theo một số phương án, hợp phần kháng thể theo sáng chế liên kết với (1→4)- $\alpha$ -D-glucan của thành tế bào nấm men, nhưng không liên kết với các gốc chứa (1→4)- $\alpha$ -D-glucan có mặt trong các chất không phải polyme chứa (1→4)- $\alpha$ -D-glucan của thành tế bào nấm men (ví dụ, (1→4)- $\alpha$ -D-glucan của thành tế bào nấm men, (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan của thành tế bào nấm men, hoặc mảnh, biến thể, hoặc thể liên hợp của chúng). Theo một số phương án, hợp phần kháng thể theo sáng chế liên kết với (1→6)- $\beta$ -D-glucan của thành tế bào nấm men, nhưng không liên kết với gốc chứa (1→6)- $\beta$ -D-glucan có mặt trong các chất không phải là polyme chứa (1→6)- $\beta$ -D-glucan của thành tế bào nấm men (ví dụ, (1→6)- $\beta$ -D-glucan của thành tế bào nấm men, (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan của thành tế bào nấm men, hoặc mảnh, biến thể, hoặc thể liên hợp của chúng). Theo một số phương án, hợp phần kháng thể theo sáng chế liên kết với (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan của thành tế bào nấm men, nhưng không liên kết với các gốc chứa (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan có mặt trong các chất không phải là thành tế bào nấm men (ví dụ, (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan thành tế bào nấm men, hoặc mảnh, biến thể, hoặc thể liên hợp của chúng).

Một số phương pháp phát hiện kháng nguyên theo sáng chế bao gồm các phương pháp phát hiện miễn dịch. Theo một số phương án được ưu tiên, các phương pháp phát hiện miễn dịch bao gồm ELISA. Theo một số phương án, ELISA được tiến hành bằng cách sử dụng mẫu thu được từ nguyên liệu ban đầu cần phân tích (ví dụ, sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn; thực phẩm; chất chiết của chúng) và kháng thể sơ cấp (ví dụ, kháng thể có khả năng nhận biết thành phần của thành tế bào nấm men; kháng thể có khả năng nhận biết glucan nấm men; kháng thể có khả năng nhận biết (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, và/hoặc (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan) nấm men. Theo một số phương án, kháng thể được liên kết trực tiếp với chất có khả năng tạo ra tín hiệu phát hiện được (ví dụ, chất sinh màu, chất sinh huỳnh quang, chất đồng vị được đánh dấu phóng xạ, v.v.). Theo một số phương án, kháng thể

trực tiếp hoặc gián tiếp liên kết với chất khác có khả năng tạo ra tín hiệu phát hiện được (ví dụ, chất sinh màu, chất sinh huỳnh quang, chất đánh dấu phóng xạ, chất đồng vị, v.v.).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất bộ kit để phát hiện chất phân tích (ví dụ, kháng nguyên, thành phần của thành tế bào nấm men, glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, và/hoặc (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan) nấm men trong mẫu (ví dụ, sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn, thực phẩm, chất chiết của chúng). Các thành phần của bộ kit có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất phản ứng, chất đệm chiết, dung môi, chất tẩy rửa, chất phong bế, ống, kháng thể, tiêu chuẩn, hướng dẫn, và tờ hợp bất kỳ của chúng.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hệ thống dịch vụ trong đó thông tin về hàm lượng của chất phân tích (ví dụ, kháng nguyên, thành phần của thành tế bào nấm men, glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, và/hoặc (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan) nấm men thu được đối với nguyên liệu ban đầu cần phân tích (ví dụ, sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn, thực phẩm, chất chiết của chúng). Theo một số phương án, phân tích được tiến hành bởi người sử dụng sau cùng (ví dụ, người nông dân, chủ chăn nuôi gia súc, người điều khiển gia súc, người gây giống gia súc, chủ chăn nuôi động vật bầu bạn, người điều khiển động vật bầu bạn, người gây giống động vật bầu bạn, bác sĩ thú y, nhà sản xuất sản phẩm thức ăn hoặc thực phẩm, nhà phân phối sản phẩm thức ăn hoặc thực phẩm, nhân viên điều hành). Theo một số phương án, mẫu hoặc nguyên liệu ban đầu được đưa ra cho bên thứ ba bởi người sử dụng sau cùng (ví dụ, người nông dân, chủ chăn nuôi gia súc, người điều khiển gia súc, người gây giống gia súc, chủ chăn nuôi động vật bầu bạn, người điều khiển động vật bầu bạn, người gây giống động vật bầu bạn, bác sĩ thú y, nhà sản xuất sản phẩm thức ăn hoặc thực phẩm, nhà phân phối sản phẩm thức ăn hoặc thực phẩm, nhân viên điều hành) và bên thứ ba tiến hành phân tích. Theo một số phương án, bên thứ ba truyền đạt thông tin liên quan đến kết quả phân tích cho người sử dụng sau cùng (ví dụ, người nông dân, chủ

chăn nuôi gia súc, người điều khiển gia súc, người gây giống gia súc, chủ chăn nuôi động vật bầu bạn, người điều khiển động vật bầu bạn, người gây giống động vật bầu bạn, bác sĩ thú y, nhà sản xuất sản phẩm thức ăn hoặc thực phẩm, nhà phân phối sản phẩm thức ăn hoặc thực phẩm, nhân viên điều hành). Theo một số phương án, bên thứ ba truyền thông tin về kết quả phân tích cho bên thứ tư.

Các phương án bổ sung sẽ rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có liên quan dựa trên phần giải thích nêu trong bản mô tả này.

#### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig. 1 thể hiện biểu đồ quy trình sản xuất các phân đoạn glucan P1, P2, P3 và S1, S2, và S3 (xem Ví dụ 1 chẳng hạn).

Fig. 2 thể hiện đáp ứng của kháng huyết thanh thỏ ban đầu và bốn dịch nổi bề mặt của kháng huyết thanh đã được tinh chế ái lực. Kháng huyết thanh đã được tinh chế ái lực thu được từ việc phân tách kháng thể (Gab1-Gab4) đặc hiệu  $\beta$ -(1,6)-glucan đối với các đĩa vi lỗ được phủ BSA (xem Ví dụ 3 chẳng hạn).

Fig. 3 thể hiện đường chuẩn được xây dựng nhờ việc sử dụng kháng thể thỏ đa dòng kháng  $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-}/(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-glucan-BSA}$  đã được tinh chế được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này (xem Ví dụ 2 và 3 chẳng hạn).

Fig. 4 thể hiện đường cong chuẩn trung bình từ 5 thử nghiệm được tiến hành với 6 mức bao hàm của MYCOSORB trong nguyên liệu thức ăn của bầy bò sữa. Trục y thứ hai nêu rõ độ chụm trong điều kiện lặp lại trong ngày ( $\% \text{CV}_{\text{intra}}$ ) và giữa ngày ( $\% \text{CV}_{\text{inter}}$ ) đối với đường cong chuẩn.

Fig. 5 thể hiện đường cong chuẩn trung bình từ 5 thử nghiệm được tiến hành với 6 mức bao hàm của MYCOSORB trong nguyên liệu thức ăn cho gà. Trục y thứ hai nêu rõ độ chụm trong điều kiện lặp lại trong ngày ( $\% \text{CV}_{\text{intra}}$ ) và giữa ngày ( $\% \text{CV}_{\text{inter}}$ ) đối với đường cong chuẩn.

Fig. 6 thể hiện đường cong chuẩn trung bình từ 5 thử nghiệm được tiến hành với 6 mức bao hàm của MYCOSORB trong nguyên liệu thức ăn cho lợn. Trục y thứ hai nêu rõ độ chụm trong điều kiện lặp lại trong ngày (% CV<sub>intra</sub>) và giữa ngày (% CV<sub>inter</sub>) đối với đường cong chuẩn.

Fig. 7 thể hiện độ chênh lệch số đọc mật độ quang trung bình ( $\Delta OD_{450}$ ) của sản phẩm nhiều được trừ khỏi tín hiệu sản phẩm MYCOSORB thu được trong thức ăn cho gà đối với sự phân bố nhiều đĩa vi chuẩn độ (Ví dụ 7). Sản phẩm nhiều được bổ sung ở 50, 100, 200% (theo khối lượng) ngoài sản phẩm MYCOSORB (100%, 1,0 kg/T).

Fig. 8 thể hiện độ chênh lệch số đọc mật độ quang trung bình ( $\Delta OD_{450}$ ) của sản phẩm nhiều được trừ khỏi tín hiệu sản phẩm MYCOSORB thu được trong thức ăn cho gà đối với sự phân bố một đĩa vi chuẩn độ (Ví dụ 7). Sản phẩm nhiều được bổ sung ở 50, 100, 200% (theo khối lượng) ngoài sản phẩm MYCOSORB (100%, 1,0 kg/T).

Fig. 9 thể hiện kết quả thử nghiệm ELISA thể hiện khả năng phản ứng chéo của kháng thể đơn dòng 513A161.1 ở nồng độ 1:100 (đỉnh) hoặc 1:200 (đáy).

Fig. 10 thể hiện kết quả thử nghiệm ELISA thể hiện khả năng phản ứng chéo của kháng thể đơn dòng 513A161.1 ở nồng độ 1:500 (đỉnh) hoặc 1:1000 (đáy).

Fig. 11 thể hiện kết quả thử nghiệm ELISA thể hiện khả năng phản ứng chéo của kháng thể đơn dòng 513A161.1 ở nồng độ 1:1500 (đỉnh) hoặc 1:2000 (đáy).

Fig. 12 thể hiện kết quả thử nghiệm ELISA thể hiện khả năng phản ứng chéo của kháng thể đơn dòng 513A431.1 ở nồng độ 1:100 (đỉnh) hoặc 1:200 (đáy).

Fig. 13 thể hiện kết quả thử nghiệm ELISA thể hiện khả năng phản ứng chéo của kháng thể đơn dòng 513A431.1 ở nồng độ 1:500 (đỉnh) hoặc 1:1000 (đáy).

Fig. 14 thể hiện kết quả thử nghiệm ELISA thể hiện khả năng phản ứng chéo của kháng thể đơn dòng 513A431.1 ở nồng độ 1:1500 (đỉnh) hoặc 1:2000 (đáy).

Fig. 15 thể hiện số đọc độ hấp thụ thử nghiệm ELISA trung bình và độ lệch chuẩn của ba mẫu chuẩn chất chiết thành tế bào nấm men được dàn mỏng chưa được pha loãng hoặc được pha loãng 1:1 trong PBS hoặc PBS + 3% sữa bột không béo (Ví dụ 6).

Fig. 16 thể hiện đồ thị đường cong chuẩn chất chiết thức ăn đối với thời gian phủ vi đĩa ELISA và nhiệt độ ủ được mô tả trong Ví dụ 6.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

#### **Các định nghĩa**

Để dễ hiểu sáng chế, nhiều thuật ngữ và cụm từ được định nghĩa dưới đây:

Trong bản mô tả này, tất cả các thuật ngữ "peptit," "polypeptit" và "protein" chỉ trình tự bậc một của axit amin mà được nối bởi "liên kết peptit" cộng hóa trị. Nhìn chung, peptit gồm một số axit amin, thường từ 2-50 axit amin, và ngắn hơn protein. Thuật ngữ "polypeptit" bao 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 bằng biện pháp nhân tạo in vitro (tức là, không được tạo ra in vivo).

Thuật ngữ "(các) glycoprotein" hoặc "(các) glycopeptit" chỉ protein hoặc peptit chứa một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon được liên kết cộng hóa trị với mạch polypeptit. Thuật ngữ "(các) selenoprotein" hoặc "(các) selenopeptit" chỉ protein hoặc peptit chứa một hoặc nhiều nguyên tử selen. Thông thường, nguyên tử selen được kết hợp vào protein trong axit amin chứa selen bao gồm selenoxystein và selenomethionin.

Thuật ngữ "(các) selenoglycoprotein," "(các) selenoglycopeptit" hoặc "(các) SGP" chỉ glycoprotein hoặc glycopeptit mà kết hợp một hoặc nhiều

nguyên tử selen. Thông thường, “selenoglycoprotein” bao gồm một hoặc nhiều axit amin chứa selen. “Selenoglycoprotein” có thể bao gồm số lượng các hydrat cacbon ở nhiều dạng khác nhau bất kỳ.

Thuật ngữ "mẫu" và "mẫu kiểm tra" được sử dụng theo nghĩa rộng nhất của nó và bao gồm mẫu hoặc mẫu kiểm tra 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 chất lỏng, chất rắn, mô, và khí. Theo một số phương án của sáng chế, mẫu bao gồm mẫu chứa chất có nguồn gốc từ thực vật (thức ăn gia súc ủ xilô, ngũ cốc, thức ăn cho gia súc đã được chế biến, sản phẩm thức ăn trong các giai đoạn sản xuất trung gian). Tuy nhiên, các ví dụ này không được hiểu là làm giới hạn loại mẫu được sử dụng theo sáng chế.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “nấm men” và “tế bào nấm men” chỉ vi sinh vật có nhân điển hình được phân loại trong giới Fungi, có thành tế bào, màng tế bào và các thành phần nội bào. Nấm men không tạo thành nhóm phân loại hoặc phát sinh chủng loại đặc trưng. Hiện nay, khoảng 1500 loài đã được biết; ước tính rằng chỉ 1% trong số tất cả các loài nấm men đã được mô tả. Thuật ngữ "nấm men" thường được dùng như từ đồng nghĩa cho *S. cerevisiae*, nhưng tính đa dạng phát sinh chủng loại của nấm men được thể hiện bởi sự phân bố của chúng trong cả hai phân khu Ascomycota và Basidiomycota. Thuật ngữ “nấm men” bao gồm nấm men ủ rượu bia, nấm men nhà máy chưng cất rượu và nấm men làm bánh mì. Nấm men nảy chồi ("nấm men thật") được phân loại trong bộ Saccharomycetales. Hầu hết các loài nấm men sinh sản vô tính bằng cách nảy chồi, mặc dù một số sinh sản bằng sự sinh sản nhân đôi nhị nguyên. Nấm men là đơn bào, mặc dù một số loài trở thành đa bào thông qua sự tạo thành chuỗi các tế bào nảy chồi đã được liên kết được biết là *pseudohyphae*, hoặc *false hyphae*. Kích thước nấm men có thể thay đổi nhiều phụ thuộc vào loài, thường có đường kính xác định 3–4  $\mu\text{m}$ , mặc dù một số nấm men có thể đạt đến hơn 40  $\mu\text{m}$ . Trong bản mô tả này, thuật ngữ “thành tế bào nấm men” còn được gọi là “YCW” chỉ thành tế bào của sinh vật nấm men bao quanh màng sinh chất và các thành phần nội bào của nấm men. Thành tế bào nấm men gồm cả lớp bên ngoài (chủ yếu là mannan) và lớp bên trong (chủ

yếu là glucan và chitin) của thành tế bào nấm men. Chức năng của thành tế bào là để tạo ra cấu trúc và bảo vệ phần bên trong nấm men (tâm hoạt động trao đổi chất của nó). Con đường truyền tín hiệu và nhận biết xảy ra trong thành tế bào nấm men. Hợp phần của thành tế bào nấm men thay đổi theo từng chủng và theo điều kiện sinh trưởng của nấm men.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất chiết thành tế bào nấm men” chỉ thành tế bào nấm men của nấm men đã bị phá vỡ hoặc “được làm tan” (ví dụ, trong giai đoạn phá vỡ và làm tan) và được tách riêng khỏi các thành phần nội bào tan được của tế bào nấm men.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ theo khối lượng (khối lượng/khối lượng) chỉ lượng chất đã cho trong chế phẩm tính theo khối lượng. Ví dụ, thức ăn cho động vật bao gồm 0,02% theo khối lượng chất bổ sung cho thức ăn dinh dưỡng theo sáng chế có nghĩa là khối lượng của chất bổ sung cho thức ăn dinh dưỡng là 0,02% của tổng khối lượng của thức ăn cho động vật (ví dụ, 200 gam hợp phần chất bổ sung cho thức ăn dinh dưỡng theo sáng chế trong 907.200 gam thức ăn cho động vật).

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "được tinh chế" hoặc "tinh chế" chỉ việc loại bỏ các thành phần ra khỏi mẫu. Ví dụ, thành tế bào nấm men hoặc chất chiết thành tế bào nấm men được tinh chế bằng cách loại bỏ các thành phần không phải của thành tế bào nấm men (ví dụ, màng sinh chất và/hoặc các thành phần nội bào của nấm men); chúng cũng được tinh chế bằng cách loại bỏ tạp chất hoặc chất không phải thành tế bào nấm men. Việc loại bỏ các thành phần không phải của thành tế bào nấm men và/hoặc các tạp chất không phải thành tế bào nấm men tạo ra sự tăng tính theo % của thành tế bào nấm men hoặc thành phần của chúng trong mẫu. Ở mức phân tử, thuật ngữ "được tinh chế" chỉ phân tử (ví dụ, hydrat cacbon, glycoprotein) mà được lấy ra khỏi môi trường tự nhiên của nó, được phân lập hoặc được tách riêng. "Hydrat cacbon đã được phân lập" do vậy có thể là hydrat cacbon được tinh chế. Phân tử "về cơ bản được tinh chế" không có ít nhất 60%, tốt hơn nếu không có ít nhất 75%, và tốt hơn nữa nếu không có ít nhất 90% các thành phần khác mà chúng được kết hợp

tự nhiên với. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "được tinh chế" hoặc "tinh chế" còn chỉ việc loại bỏ tạp chất ra khỏi mẫu. Việc loại bỏ protein nhằm làm tăng % polypeptit được quan tâm trong mẫu. Ngoài ra, các polypeptit tái tổ hợp (ví dụ, glycoprotein) được biểu hiện trong hoặc được tinh chế từ thực vật, vi khuẩn, nấm men, hoặc tế bào chủ động vật có vú và các polypeptit được tinh chế bằng cách loại bỏ protein tế bào chủ; % polypeptit tái tổ hợp nhờ đó được làm tăng trong mẫu. Trong bản mô tả này, thuật ngữ “động vật” chỉ động vật thuộc giới Animalia. Thuật ngữ “động vật” bao gồm, nhưng không giới hạn ở, gia súc, động vật trang trại, động vật nuôi ở trang trại hoặc làm cảnh, động vật cưng hoặc bầu bạn, động vật biển và nước ngọt, và động vật hoang dã.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ, “gia súc” còn được gọi là “loài gia súc” và còn được gọi là “gia súc nuôi ở trang trại” và còn được gọi là “động vật nuôi trên quy mô thương mại” chỉ động vật được thuần hóa được dự định nuôi trong môi trường nông nghiệp hoặc nuôi trồng thủy sản để sản xuất thực phẩm hoặc sợi, hoặc để phục vụ lao động hoặc để làm bầu bạn.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất bổ sung cho thực phẩm", "chất bổ sung dinh dưỡng" "hợp phần chất bổ sung dinh dưỡng" và các thuật ngữ tương tự chỉ sản phẩm thực phẩm được phối trộn dưới dạng chất bổ sung cho chế độ ăn uống hoặc dinh dưỡng được sử dụng làm một phần của chế độ ăn uống, ví dụ, dưới dạng phân bổ sung thêm vào thức ăn cho động vật. Các hợp phần chất bổ sung dinh dưỡng nêu làm ví dụ được mô tả trong bản mô tả này.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "kit" được sử dụng để chỉ hỗn hợp của các chất phản ứng và các nguyên liệu khác. Dự định rằng kit có thể bao gồm chất phản ứng như dung dịch chiết, kháng thể, và chất phản ứng phát hiện. Không dự định giới hạn thuật ngữ “kit” ở hỗn hợp cụ thể của các chất phản ứng và/hoặc các nguyên liệu khác.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "độc" chỉ ảnh hưởng bất lợi hoặc có hại bất kỳ đến đối tượng, tế bào, hoặc mô so với tế bào hoặc mô này trước khi sử dụng chất độc.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “làm khô lạnh” và thuật ngữ “sấy đông khô nhanh” và thuật ngữ “sấy khô đông lạnh” chỉ việc loại bỏ dung môi ra khỏi chất ở trạng thái đông lạnh bằng sự thăng hoa. Điều này được thực hiện bằng cách làm lạnh nguyên liệu cần được sấy khô dưới điểm 0°C của nó và sau đó cung cấp ẩn nhiệt hóa hơi. Việc kiểm soát chính xác dòng nhiệt vào cho phép sấy khô từ trạng thái đông lạnh mà không có sự tan chảy lại của sản phẩm. Trong ứng dụng thực tế, quy trình được tăng tốc và được kiểm soát chính xác trong các điều kiện áp suất giảm.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “bột khô chảy tự do” chỉ bột khô chảy tự do, ví dụ bột mà có thể được rót từ đồ chứa, túi, bình, v.v. mà không gặp trở ngại do sự kết cụm lớn.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “nghiền” chỉ việc làm giảm cỡ hạt bằng sự va chạm, cắt, hoặc cọ mòn.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “rửa” chỉ việc loại bỏ hoặc làm sạch (ví dụ, sử dụng loại chất tan bất kỳ (ví dụ, nước cất, chất đệm, hoặc dung môi) hoặc hỗn hợp) của các tạp chất hoặc thành phần không mong muốn tan được của chế phẩm (ví dụ, chất chiết thành tế bào nấm men có thể được rửa để loại bỏ các thành phần không phải của thành tế bào nấm men ra khỏi mẫu; lõi của đĩa vi chuẩn độ có thể được rửa để loại bỏ các thành phần không liên kết hoặc liên kết không đặc hiệu).

Thuật ngữ "kháng thể" hoặc "globulin miễn dịch" chỉ protein liên kết với kháng nguyên đặc hiệu. Globulin miễn dịch bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể đa dòng, kháng thể đơn dòng, kháng thể khảm, và kháng thể được làm giống như của người, mảnh Fab, mảnh F(ab')<sub>2</sub>, và bao gồm globulin miễn dịch của các lớp sau: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, và globulin miễn dịch tiết (sIg). Globulin miễn dịch nhìn chung bao gồm hai chuỗi nặng giống nhau và hai chuỗi nhẹ. Tuy nhiên, thuật ngữ "kháng thể" và "globulin miễn dịch" còn bao gồm kháng thể chuỗi đơn và kháng thể hai chuỗi. Kháng thể có thể được tạo ra bằng hệ phương pháp bất kỳ đã biết (Xem, ví dụ, Current Protocols in Immunology (1998) John Wiley and Sons, Inc., N.Y.).

Thuật ngữ "kháng nguyên" chỉ hydrat cacbon, protein, glycoprotein, lipoprotein, lipit hoặc chất khác mà dễ phản ứng với kháng thể đặc hiệu đối với một phần của phân tử này.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất phân tích" chỉ nguyên tử, phân tử, nhóm nguyên tử và/hoặc phân tử, chất, hoặc phân tử hóa học. Chất phân tích, tự nó và bản thân nó không thể xác định được, đúng hơn là, các khía cạnh hoặc tính chất (vật lý, hóa học, sinh học, v.v.) của chất phân tích có thể được xác định bằng cách sử dụng quy trình phân tích, như HPLC hoặc NMR. Ví dụ, không thể xác định "ghế" (chất phân tích-thành phần) tự nó và bản thân nó, nhưng, chiều cao, chiều dày, v.v. của ghế có thể xác định được. Tương tự, không thể xác định độc tố nấm nhưng có thể xác định tín hiệu độc tố nấm (ví dụ, tín hiệu sinh màu, tín hiệu huỳnh quang) mà có liên quan đến nồng độ của nó.

Thuật ngữ "kết tủa miễn dịch," "tinh chế miễn dịch," và "tinh chế ái lực," và các biến đổi ngữ pháp như động từ và tính từ, chỉ việc sử dụng kháng thể để tách riêng kháng nguyên hoặc phần của nó ra khỏi hỗn hợp của các phân tử khác.

Thuật ngữ "phát hiện miễn dịch" và các biến thể ngữ pháp của nó chỉ việc sử dụng kháng thể để nhận diện sự có mặt của kháng nguyên hoặc phần của nó từ hỗn hợp của các phân tử khác.

Thuật ngữ "nhuộm màu" chỉ số lượng quy trình bất kỳ đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà được sử dụng để hiển thị hóa tốt hơn, phân biệt hoặc nhận diện (các) thành phần và/hoặc (các) đặc điểm đặc trưng của nguyên liệu (ví dụ, mẫu, mẫu thức ăn, phần chiết của mẫu thức ăn, tế bào, các tế bào).

Thuật ngữ "miễn dịch huỳnh quang" chỉ kỹ thuật nhuộm màu được dùng để nhận diện, đánh dấu, ghi nhãn, hiển thị hóa hoặc làm cho có thể thấy rõ dễ dàng bởi các quy trình đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, trong đó phối tử (thường là kháng thể) được liên kết với thụ thể (thường là kháng nguyên) và phối tử này, nếu là kháng thể, được liên hợp với

phân tử huỳnh quang, hoặc phối tử sau đó được liên kết bởi kháng thể đặc hiệu đối với phối tử này, và kháng thể này được liên hợp với phân tử huỳnh quang, trong đó phân tử huỳnh quang này có thể được hiển thị hóa bằng dụng cụ thích hợp (ví dụ, kính hiển vi huỳnh quang).

Thuật ngữ "quyết định kháng nguyên" chỉ một phần của kháng nguyên (ví dụ, epitop) tiếp xúc với kháng thể cụ thể. Khi protein hoặc mảnh của protein được sử dụng để gây miễn dịch động vật chủ, nhiều vùng của protein này có thể gây ra sự sản xuất kháng thể mà liên kết đặc hiệu với vùng đã cho hoặc cấu trúc ba chiều trên protein; các vùng hoặc cấu trúc này được gọi là quyết định kháng nguyên. Quyết định kháng nguyên có thể cạnh tranh với kháng nguyên nguyên vẹn ("chất sinh miễn dịch" được dùng để gọi ra đáp ứng miễn dịch) để liên kết với kháng thể.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "thử nghiệm miễn dịch" chỉ thử nghiệm định tính hoặc định lượng được dự định để cho phép phát hiện kháng nguyên trong mẫu. Thử nghiệm miễn dịch thường sử dụng kháng thể nhận biết kháng nguyên. Kháng thể nhận biết kháng nguyên có thể được kết hợp trực tiếp hoặc gián tiếp với bước hiển thị hóa, như chất đánh dấu hoặc enzym sinh màu hoặc sinh huỳnh quang. Ví dụ về thử nghiệm miễn dịch bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym ("ELISA"), thử nghiệm dòng chảy theo hướng ngang, thẩm tách western, thử nghiệm dựa trên vi hạt (ví dụ, thử nghiệm Luminex®), thử nghiệm miễn dịch từ tính, thẩm tách điểm, thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm miễn dịch phát quang hóa học (CLIA), thử nghiệm miễn dịch đếm (CIA), và các thử nghiệm tương tự. Thử nghiệm miễn dịch có thể là cạnh tranh hoặc không cạnh tranh.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ "thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym" hoặc "ELISA," đôi khi được gọi là "thử nghiệm bánh kẹp," chỉ loại đặc trưng của thử nghiệm miễn dịch. Thông thường, lượng chưa biết của kháng nguyên được hấp thụ hoặc được cố định trên bề mặt rắn và được cho tiếp xúc với kháng thể có khả năng nhận biết nó. Lượng kháng thể đã được liên kết nhìn

chung được xác định thông qua sự liên kết trực tiếp hoặc gián tiếp với enzym sinh huỳnh quang hoặc sinh màu. Các loại ELISA bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ELISA trực tiếp, ELISA gián tiếp, ELISA bán kẹp, ELISA cạnh tranh, và ELISA đảo. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "ELISA" chỉ thử nghiệm hấp phụ miễn dịch liên kết enzym (hoặc EIA). Nhiều phương pháp ELISA và ứng dụng của chúng đã được 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 Biomethods 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 trên thị trường. Trong bản mô tả này, thuật ngữ "thực phẩm," "thực phẩm - foodstuff," "thức ăn," "sản phẩm thức ăn," "thực phẩm - feedstuff" và các thuật ngữ tương tự chỉ (các) nguyên liệu bất kỳ mà được tiêu thụ (ví dụ, bởi động vật), mà đóng góp năng lượng và/hoặc chất dinh dưỡng cho chế độ ăn. Ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Khẩu phần hỗn hợp hoàn chỉnh (TMR), (các) thức ăn cho súc vật, (các) viên tròn, (các) chất cô, (các) đồng sản phẩm thức ăn trộn sẵn, ngũ cốc, (các) bã chung cất rượu, rỉ đường, (các) chất xơ, cỏ khô cho súc vật ăn, cỏ, cỏ khô, (các) hạt, lá, bột xay thô, (các) chất tan, và (các) chất bổ sung. Thực phẩm không bị giới hạn bởi dạng vật lý của chúng. Thực phẩm có thể được xử lý thành cỡ hạt nhỏ hơn (ví dụ, được thái lát, được chặt nhỏ, được nghiền, được xay, hoặc các biện pháp tương tự); được làm thành dạng lỏng (ví dụ, được chiết, được đun sôi, được cô, được biến đổi thành xirô hoặc dạng dính nhót khác); hoặc được xử lý thành kích thước lớn hơn (ví dụ, được đóng thành kiện, được lèn chặt, được nén, hoặc được tạo thành các hình dạng hỗn hợp, ví dụ, các viên, khối, hình vuông, hình bông tuyết, và các hình dạng tương tự).

Trong bản mô tả này, khi được sử dụng dưới dạng danh từ, "chất phụ gia" hoặc "chất bổ sung" chỉ chất hoặc thứ được bổ sung vào hoặc theo cách khác được bao gồm trong chất hoặc thứ khác. Ngoài ra, trong bản mô tả này,

khi được sử dụng dưới dạng danh từ, các cụm từ “chất phụ gia” hoặc “chất bổ sung” có thể được sử dụng thay thế lẫn nhau khi đề cập đến “chất phụ gia” hoặc “chất bổ sung” mà được trộn vào thức ăn cho động vật trước khi được cấp cho động vật.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “glucan” chỉ polyme hydrat cacbon chứa glucoza bất kỳ. Theo một số phương án, glucan là polyme của D-glucoza mà không bị giới hạn ở mức độ polyme hóa, sự kết hợp cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị với các polyme khác, hoặc hợp phần hydrat cacbon chính xác. Trong toàn bộ chiều dài của polyme glucan, các đơn vị D-glucoza có thể tham gia vào liên kết  $\alpha$ , liên kết  $\beta$ , hoặc cả liên kết  $\alpha$  và  $\beta$ .

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “hydrat cacbon” được sử dụng để chỉ hợp chất hữu cơ có công thức chung  $C_m(H_2O)_n$ . Hydrat cacbon chỉ gồm carbon, hydro và nguyên tử oxy trong đó nguyên tử hydro và oxy có tỷ lệ nguyên tử là 2:1.

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

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “nền rắn” được sử dụng để chỉ nguyên liệu rắn hoặc 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 phương pháp ELISA, các lỗ của đĩa vi chuẩn độ tạo ra nền rắn. Ví dụ khác về nền rắn bao gồm bản kính mang vật ở kính hiển vi, cửa sổ bảo vệ, hột, hạt, bình nuôi cấy tế bào, cũng như nhiều vật phẩm thích hợp khác.

Thuật ngữ “liên kết đặc hiệu” và “liên kết một cách đặc hiệu” khi được sử dụng để chỉ tương tác giữa kháng thể và kháng nguyên mô tả tương tác mà phụ thuộc vào sự có mặt của cấu trúc cụ thể (tức là, quyết định kháng nguyên

hoặc epitop) trên kháng nguyên. Theo cách khác, kháng thể nhận biết và liên kết với cấu trúc protein duy nhất đối với kháng nguyên, hơn là liên kết với tất cả các protein nói chung (tức là, liên kết không đặc hiệu).

Thành tế bào nấm men (YCW) bao gồm cấu trúc phức tạp gồm hai thành phần polysacarit chính:  $(1\rightarrow2)(1\rightarrow3)(1\rightarrow6)\text{-}\alpha\text{-D-mannan}$ , và  $(1\rightarrow3)(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-glucan}$ . Các polysacarit này được nối với protein YCW qua liên kết O- và N-glycosidyl, như nêu trong tạp chí được công bố gần đây (Lesage et al. (2006) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70:317-343; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Trên quy mô công nghiệp, YCW thường được tách riêng, hoặc được chiết từ sinh vật nấm men đã được làm tan bằng cách ly tâm và rửa như được báo cáo bởi D.A. Howes and K.E. Newman (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 6,045,834; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Ở giai đoạn này, YCW không hòa tan trong nước. Việc xử lý YCW ban đầu bằng enzym và hóa học sau đó làm cải biến cấu trúc của polysacarit và protein, nhờ đó làm cho các thành phần của YCW ít nhất tan được một phần trong nước và trong dimethyl sulfoxit "DMSO". Hợp phần của các phần tan được và không tan của sản phẩm tùy thuộc vào điều kiện của quy trình.

Thử nghiệm miễn dịch bao gồm các kỹ thuật phân tích nhạy mà có thể được sử dụng đối với hỗn hợp không đồng nhất, phức hợp như vậy. Theo một số phương án về phương pháp theo sáng chế, kháng thể từ động vật đã được gây miễn dịch bằng kháng nguyên chứa  $(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-glucan}$  nấm men mà liên kết tất cả các thành phần cấu trúc chính của thành tế bào (xem, Kollár et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:17762-17775; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) nhận biết polysacarit này, cho phép thiết lập thử nghiệm miễn dịch mạnh và nhạy. Theo một số phương án của sáng chế, thử nghiệm miễn dịch định lượng (ELISA) cho phép phân tích chất phụ gia dinh dưỡng có nguồn gốc từ YCW, MYCOSORB (ALLTECH, Inc.), trong mẫu thức ăn cho động vật. Thử nghiệm đối với  $(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-glucan}$  từ YCW là rất đặc hiệu trong việc định lượng YCW, vì  $(1\rightarrow6)\text{-}\beta\text{-D-glucan}$  rất hiếm thấy trong số các hydrat cacbon thực vật. Do vậy, kháng thể được hướng chống lại YCW polysacarit

này không tương tác một cách đáng kể với polysacarit thực vật có mặt trong thức ăn cho động vật, đảm bảo nền thử nghiệm thấp.

Ngoài ra, một số phương án của sáng chế còn đề xuất các phương pháp để: 1) phân tách (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-glucan tan được từ thành tế bào nấm men (xem, Kwiatkowski et al. (2009) J. Instit. Brew. 115:1031, và Arvindekar et al. (2002) Yeast 19:131-139, được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn), ví dụ, để làm kháng nguyên để điều chế kháng thể nhận biết (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men; oxy hóa nhóm polysacarit hydroxyl này ở vị trí C-6 của vòng glucopyranoza bằng chất phản ứng Pfizner-Moffat (xem, Pfizner et al. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:3027; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn), để biến đổi chúng thành nhóm aldehyt (xem, Zekovic et al. (2006) Chem. Papers 60:243-248; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn); và việc sử dụng dạng được oxy hóa này của (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-glucan trong phản ứng amin hóa khử (xem, Abdel-Magid et al. (1996) J. Org. Chem. 61:3849-3862; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) với gốc lysin của albumin huyết thanh bò (BSA), để sản xuất thể liên hợp polysacarit-protein. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp để tách riêng và tinh chế (ví dụ, sử dụng trao đổi ion, DEAE xenluloza và đệm  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  có nồng độ ion khác nhau) thể liên hợp (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-glucan-BSA, mà được sử dụng làm chất sinh miễn dịch tan được để gây miễn dịch động vật (ví dụ, thỏ) (xem, Howard et al. (2001) Basic Methods in Antibody Production and Characterization, CRC Press, pp. 11-18 and 31-50). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp điều chế nhựa pha ái lực được phủ BSA (xem, Matejtschuk (1997) Affinity Separations: Practical Approach, Oxford University Press) và việc sử dụng nó trong việc hấp thụ kháng thể đặc hiệu BSA từ huyết thanh thỏ chứa cả kháng thể đặc hiệu BSA và đặc hiệu (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-glucan. Theo một số phương án của sáng chế, các phương pháp để liên hợp polysacarit với protein được sử dụng để sản xuất các vacxin dùng cho người và động vật, vì các phương pháp này bảo toàn cấu trúc ban đầu của polysacarit và không biến đổi

đầu khử của nó như các phương pháp liên hợp thông thường (xem, Patent Mỹ số 6,596,861; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

#### Glucan thành tế bào *Saccharomyces cerevisiae*

Glucan là polysacarit phổ biến trong số các polysacarit thành tế bào *Saccharomyces cerevisiae* (xem, Kwiatkowski et al. (2009) J. Instit. Brew. 115:151-158). Vai trò của (1→3)- $\beta$ -D-glucan trong việc duy trì hình dạng và độ cứng của thành tế bào nấm men (xem, Klis et al. (2006) Yeast 23:185-202; Lesage et al. (2006) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70:317-343; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) và (1→6)- $\beta$ -D-glucan để làm polysacarit mà liên kết tất cả các polysacarit thành tế bào với nhau đã được nêu trong tài liệu (xem, Aimaniada et al. (2009) J. Biol. Chem. 284:13401-13412; Kollár et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:17762-1777; Klis et al. (2002) FEMS Microbiology Rev. 26:239-256; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Sự có mặt của (1→4)- $\alpha$ -D-glucan giống như glycogen tan được và không tan trong các tế bào của *S. cerevisiae* sinh trưởng hiếu khí thường được đề cập trong các tài liệu về nấm men trước đây (xem, Gunja-Smith et al. (1974) Biochem. Biophys. Res. Com. 56:588-592; Grba et al. (1975) Appl. Microbiol. Biotechnol. 2:29-37; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn), và hai dạng glycogen synthetaza đã được nhận diện (xem, Gunja-Smith et al. (1977) J. Bacteriol. 130:818-825; Rothman-Denes et al. (1970) PNAS 66:967-974; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Glycogen là hydrat cacbon bảo toàn năng lượng được tích lũy bởi *S. cerevisiae*, mà có thể được huy động trong khoảng thời gian thiếu ăn của nấm men. Nó là polyme của  $\alpha$ -D-glucosa với khối lượng phân tử  $\sim 10^8$  và cấu trúc phân nhánh với 10–14 gốc  $\alpha$ -D-glucosa được nối bởi liên kết 1→4 (xem, Aklujkar et al. (2008) J. Instit. Brew. 114:205-208; Boulton et al. (2001) The Biochemistry of Fermentation. In: Brewing Yeast and Fermentation, Blackwell Science, Iowa, pp. 89-92; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Hàm lượng (1→4)- $\alpha$ -D-glucan trong thành tế bào nấm men có thể thay đổi từ ít như 1% (xem, Lille et al. (1980) J. Bacteriol. 143:1384-1394) đến

nhiều như 29% (xem, Sedmak et al., đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0263415; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) khối lượng khô, tùy thuộc vào tình trạng dinh dưỡng của các tế bào, phương pháp phân lập, điều kiện môi trường và thời điểm các tế bào được thu hoạch (xem, Lille et al. (1980) J. Bacteriol. 143:1384-1394). Tế bào nấm men để làm bia được sản xuất trên quy mô công nghiệp (xem, Sedmak et al., đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0263415; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) chứa glucan ở nồng độ 28,9% khối lượng khô (dry weight - d.w.), gồm 12,4% d.w. của (1→4)- $\alpha$ -D-glucan. Khi các tế bào này được xử lý bằng proteaza kiềm, thành phần thành tế bào không tan trong nước chứa 54,5% d.w. của glucan và nhiều hơn một nửa khối lượng của (1→4)- $\alpha$ -D-glucan (29,2% d.w.).

Vào năm 2002, Arvindekar và Patil (xem, Arvindekar et al. (2002) Yeast 19:131-139; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) đưa ra phân giải thích về sự có mặt của phân đoạn không tan mà được các tác giả khác xác định là glycogen nấm men “khó rửa trôi” (xem, Fleet et al. (1976) J. Gen. Microbiol. 94:180-192; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) trong thành tế bào nấm men, dựa trên phát hiện của họ rằng (1→4)- $\alpha$ -D-glucan được liên kết cộng hóa trị với (1→6)- $\beta$ -D-glucan. Tuy nhiên, phát hiện này mâu thuẫn với bài thuyết trình năm 1997 được công bố bởi Kollar và các đồng nghiệp (xem, Kollár et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:17762-17775; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) và với tác phẩm được công bố bởi Aimagani và các đồng nghiệp (xem, Aimagani et al. (2009) J. Biol. Chem. 184:13401-13412; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) về vai trò và cấu trúc của (1→6)- $\beta$ -D-glucan trong thành tế bào nấm men. Đáng chú ý là, các phát hiện của Arvindekar và Patil đòi hỏi việc xác nhận cấu trúc, vì các tác giả này thao tác với các phân đoạn nhỏ từ sự thủy phân bằng enzym của thành tế bào nấm men và không sử dụng NMR để định lượng hoặc thiết lập cấu trúc cho sản phẩm đã được tách riêng của họ. Trong các thử nghiệm được tiến hành trong khoảng thời gian phát triển các phương án của sáng chế, phương pháp phân tách quy mô lớn được phát triển để tách riêng polysaccharit

(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucan/(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan hỗn hợp từ thành tế bào *S. cerevisiae*, và cấu trúc của sản phẩm này được thiết lập bằng cách sử dụng phổ học NMR.

#### Thực phẩm và thức ăn cho động vật

Thức ăn cho động vật là thức ăn bất kỳ được sử dụng cụ thể để nuôi gia súc gia cầm đã được thuần hóa (ví dụ, gia súc, dê, cừu, ngựa, gia cầm, trâu, anpaca, lạc đà không bướu, lừa, la, thỏ, gà, ngỗng, gà tây, và lợn). Thức ăn cho động vật thường bao gồm cỏ khô, rơm, thức ăn gia súc ủ xilô, thức ăn được nén và được vê viên, dầu và khẩu phần hỗn hợp, và cả các hạt mọc mầm và cây họ đậu. Ngành công nghiệp thức ăn cho động vật trên thế giới tiêu thụ 635 triệu tấn thức ăn vào năm 2006, với tốc độ sinh trưởng hàng năm khoảng 2%. Việc sử dụng đất nông nghiệp để phát triển thức ăn hơn là thực phẩm cho người có thể gây tranh cãi; một số loại thức ăn, như ngũ cốc (ngô), cũng có thể đóng vai trò làm thực phẩm cho người, trong khi các thức ăn khác như cỏ thì không. Ngoài việc cung cấp nguồn năng lượng cho động vật, thức ăn cho động vật còn cung cấp chất dinh dưỡng (ví dụ, selen) được sử dụng bởi cơ thể. Thức ăn cho động vật thường được trộn với chất bổ sung và/hoặc chất phụ gia (ví dụ, MYCOSORB) trước khi được cấp cho động vật.

#### Các phương pháp phát hiện miễn dịch

Sáng chế đề xuất các phương pháp để phát hiện chất trong mẫu, các phương pháp này bao gồm thử nghiệm phát hiện miễn dịch hoặc thử nghiệm miễn dịch. Thử nghiệm miễn dịch (thử nghiệm phát hiện miễn dịch, phương pháp phát hiện miễn dịch) gồm việc sử dụng kháng thể để phát hiện (hiển thị hóa, xác định định tính, phát hiện định lượng) chất (ví dụ, kháng nguyên) mà kháng thể liên kết với. Kháng nguyên được nhận biết bởi kháng thể có thể là đại phân tử hoặc mảnh của nó (ví dụ, polyme, hydrat cacbon, glycoprotein, protein, gốc hoặc monome của nó). Ví dụ, một số phương pháp theo sáng chế được sử dụng để phát hiện glucan thành tế bào nấm men (ví dụ, (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucan, (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan, và/hoặc (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ /(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan).

Nhiều thử nghiệm miễn dịch được sử dụng để phát hiện định tính hoặc định lượng chất (ví dụ, chất được phát hiện thấy ở nồng độ thấp, chất có mặt

trong hỗn hợp phức hợp, chất hydrat cacbon, (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-glucan) nấm men. Các loại thử nghiệm miễn dịch bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm dòng chảy theo hướng ngang, thẩm tách western, thử nghiệm dựa trên vi hạt (ví dụ, thử nghiệm Luminex®), thử nghiệm miễn dịch từ tính, thẩm tách điểm, thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm miễn dịch phát quang hóa học (CLIA), thử nghiệm miễn dịch đếm (CIA), và các thử nghiệm tương tự (xem, ví dụ, Wild et al. (2005) “The Immunoassay Handbook, 3<sup>rd</sup> Ed.”, Elsevier Ltd., Oxford, UK). Thử nghiệm miễn dịch có thể là cạnh tranh hoặc không cạnh tranh.

#### Thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA)

Thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym, “ELISA” đã được sử dụng làm công cụ chẩn đoán trong y học và bệnh lý thực vật, cũng như kiểm tra việc kiểm soát chất lượng trong các ngành công nghiệp khác nhau. Trong một ví dụ, ELISA tiêu biểu bao gồm phân tử dò mà trước tiên được cố định trên vi đĩa polystyren hoặc bề mặt khác. Tiếp theo, chất phong bế như BSA được áp dụng và được ủ. Mẫu sinh học hoặc mẫu khác chứa phân tử đích đặc hiệu (thường là protein) có nồng độ chưa biết được làm cho tiếp xúc với phân tử dò đã được cố định. Nếu có mặt, phân tử đích được bắt giữ bởi mẫu dò tương ứng với nồng độ của phân tử đích. Tiếp theo, bề mặt thường được rửa bằng dung dịch chất tẩy rửa nhẹ để loại bỏ phân tử bất kỳ không được liên kết một cách đặc hiệu. Tiếp theo, phân tử bổ sung, như kháng thể thứ hai, được áp dụng để tạo thành phức hợp “bánh kẹp” với mẫu dò bắt giữ, phân tử đích, và mẫu dò phát hiện đã được đánh dấu. Phân tử thứ hai thường được gọi là mẫu dò phát hiện hoặc kháng thể phát hiện, và thường được liên kết cộng hóa trị với enzym, hapten, hoặc phân tử đánh dấu khác.

Sau bước rửa cuối cùng, đĩa được hiện ảnh bằng cách bổ sung thể liên hợp liên kết với kháng thể phát hiện đã được đánh dấu và chứa cơ chất enzym, chất phản ứng phát hiện được đánh dấu huỳnh quang, hoặc nhiều chất chỉ thị

khác. Chất chỉ thị tạo ra tín hiệu phát hiện được tương ứng với lượng kháng nguyên đích trong mẫu. Thông thường, ELISA được đọc bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa so màu hoặc huỳnh quang và tạo ra một số đo chất phân tích đích cho mỗi lỗ. Các biến thể khác của thử nghiệm ELISA bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ELISA gián tiếp, cạnh tranh, hoặc đảo (xem, ví dụ, Crowther et al. (2008) “The ELISA Guidebook, 2<sup>nd</sup> Ed.”, Humana Press).

Trong nhiều trường hợp, ELISA được tiến hành trong các vi đĩa được làm phù hợp với dạng được chuẩn hóa để có thể xử lý bằng thiết bị tự động hóa. Các chuẩn này được thiết lập bởi Society of Biomolecular Sciences (SBS) và được biết là chuẩn SBS. Theo chuẩn SBS, “vết chân” cho đĩa đa lỗ là khoảng 85 mm×125 mm với các lỗ được bố trí ở dạng các vị trí xác định tùy thuộc vào tổng số lượng lỗ. Viện American National Standards Institute (ANSI) đã công bố Chuẩn SBS cho vi đĩa là: “Footprint Dimensions” (ANSI/SBS 1-2004), “Height Dimensions” (ANSI/SBS 2-2004), “Bottom Outside Flange Dimensions” (ANSI/SBS 3-2004) và “Well Positions” (ANSI/SBS 4-2004). Phổ biến nhất, người sử dụng ELISA sử dụng 96 lỗ trong một đĩa. Theo cách khác, khi cần ít hơn 96 lỗ trong thử nghiệm, có thể sử dụng lên đến mười hai “bảng” 8 lỗ để cho chỉ một phần trong số 96 lỗ được sử dụng tại một thời điểm.

#### Dịch vụ thử nghiệm

Theo một số phương án, chương trình phân tích dựa trên máy tính được sử dụng để dịch số liệu thô được tạo ra bởi thử nghiệm (ví dụ, thử nghiệm miễn dịch, ELISA) (ví dụ, sự có mặt, sự vắng mặt, hoặc lượng kháng nguyên) (ví dụ, (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men) thành số liệu có giá trị tiên đoán cho người sử dụng sau cùng (ví dụ, người gây giống hoặc người điều khiển gia súc hoặc động vật bầu bạn, bác sĩ thú y, người nông dân, người tiêu dùng). Người sử dụng sau cùng có thể tiếp cận số liệu tiên đoán bằng cách sử dụng phương tiện thích hợp bất kỳ. Như vậy, theo một số phương án, sáng chế đề xuất lợi ích thêm nữa mà người sử dụng sau cùng, người mà dường như không được hướng

dẫn về phân tích thử nghiệm miễn dịch, không cần hiểu số liệu thô. Số liệu được biểu thị trực tiếp cho người sử dụng sau cùng ở dạng hữu dụng nhất của nó. Sau đó, người sử dụng sau cùng có khả năng sử dụng ngay thông tin để tối ưu hóa việc chăm sóc đối tượng (ví dụ, gia súc hoặc động vật bầu bạn).

Sáng chế bao gồm phương pháp bất kỳ có khả năng nhận, xử lý, và truyền thông tin liên quan đến mẫu đến và từ phòng thí nghiệm tiến hành thử nghiệm. Ví dụ, theo một số phương án của sáng chế, mẫu (*ví dụ*, mẫu thức ăn, chất chiết của mẫu thức ăn) thu được và được đệ trình đến cơ quan dịch vụ định hình (*ví dụ*, phòng thí nghiệm v.v.), nằm ở vùng bất kỳ trên thế giới (*ví dụ*, ở quốc gia phù hợp với quốc gia trong đó đối tượng cư trú hoặc khác với quốc gia trong đó đối tượng cư trú hoặc trong đó thông tin cuối cùng được sử dụng) để tạo ra số liệu thô. Người sử dụng sau cùng có thể có mẫu (*ví dụ*, chất chiết thức ăn) thu được bởi bên thứ ba và được gửi đến trung tâm định hình, hoặc đối tượng có thể tự thu gom mẫu và trực tiếp gửi nó đến trung tâm định hình. Khi mẫu bao gồm thông tin đã được xác định trước đây, thông tin này có thể được gửi trực tiếp đến cơ quan dịch vụ định hình bởi người sử dụng sau cùng (*ví dụ*, thẻ thông tin chứa thông tin có thể được quét bởi máy tính và số liệu được truyền đến máy tính của trung tâm định hình sử dụng hệ thống truyền thông điện tử). Ngay khi cơ quan dịch vụ định hình nhận được, mẫu được xử lý và profin được tạo ra (*ví dụ*, hàm lượng kháng nguyên), đặc trưng đối với thông tin chẩn đoán hoặc tiên lượng mong muốn đối với người sử dụng sau cùng.

Sau đó, số liệu profin được chuẩn bị ở dạng thích hợp để thông dịch bởi người sử dụng sau cùng. Ví dụ, hơn là tạo ra số liệu thô, dạng đã được chuẩn bị có thể biểu thị sự đánh giá nguy cơ (*ví dụ*, xác suất của kháng nguyên có mặt) cho người sử dụng sau cùng, cùng với khuyến nghị về các tùy chọn chăm sóc gia súc cụ thể. Số liệu có thể được hiển thị đối với người sử dụng sau cùng bởi phương pháp thích hợp bất kỳ. Ví dụ, theo một số phương án, cơ quan dịch vụ định hình tạo ra báo cáo mà người sử dụng sau cùng có thể in ra (*ví dụ*, tại thời điểm tiếp xúc, tại thời điểm chăm sóc gia súc) hoặc được hiển thị cho người sử dụng sau cùng trên màn hình máy tính.

Theo một số phương án, thông tin trước tiên được phân tích tại thời điểm chăm sóc gia súc hoặc tại bộ phận vùng. Sau đó, số liệu thô được gửi đến bộ phận xử lý trung tâm để phân tích tiếp và/hoặc để biến đổi số liệu thô thành thông tin hữu ích cho người sử dụng sau cùng hoặc bên quan tâm khác. Bộ phận xử lý trung tâm tạo ra ưu điểm về tính bảo mật (tất cả các số liệu đều được lưu trữ trong bộ phận trung tâm với protocol bảo mật đồng đều), tốc độ, và độ đồng đều của phân tích số liệu. Sau đó, bộ phận xử lý trung tâm có thể kiểm soát tình trạng của số liệu sau khi thông tin cho người sử dụng sau cùng. Ví dụ, bằng cách sử dụng hệ thống truyền thông điện tử, bộ phận trung tâm có thể cung cấp số liệu cho người sử dụng sau cùng.

Theo một số phương án, người sử dụng sau cùng có thể tiếp cận trực tiếp số liệu bằng cách sử dụng hệ thống truyền thông điện tử. Người sử dụng sau cùng có thể tìm kiếm lời khuyên thêm nữa dựa trên các kết quả. Theo một số phương án, số liệu được sử dụng cho ứng dụng nghiên cứu. Ví dụ, số liệu có thể được sử dụng để tối ưu hóa thêm chế độ dinh dưỡng cho gia súc hoặc động vật bầu bạn.

#### Hợp phần & Bộ kit

Hợp phần để sử dụng (ví dụ, đủ để, cần thiết để, hoặc hữu ích để) trong các phương pháp của một số phương án theo sáng chế bao gồm chất phản ứng để phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của kháng nguyên đặc hiệu (ví dụ, (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men). Hợp phần bất kỳ trong số các hợp phần này, một mình hoặc kết hợp với các hợp phần khác theo sáng chế, có thể được cung cấp dưới dạng bộ kit. Bộ kit có thể còn bao gồm các đối chứng và/hoặc chất phản ứng phát hiện thích hợp.

#### Sự liên hợp kháng nguyên-chất mang

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hợp phần (ví dụ, kháng nguyên) được sử dụng trong phân tích (ví dụ, phân tích miễn dịch; để phân tách kháng thể) các chất của thành tế bào nấm men. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp để: phân tách (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan tan

được từ thành tế bào nấm men (xem, Kwiatkowski et al. (2009) J. Instit. Brew. 115:1031; Arvindekar et al. (2002) Yeast 19:131-139; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) để làm kháng nguyên cho (1→6)-β-D-glucan nấm men; oxy hóa nhóm hydroxyl của polysacarit này ở vị trí C-6 của vòng glucopyranoza bằng chất phản ứng Pfizner-Moffat (xem, Pfizner et al. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:3027; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn), để biến đổi chúng thành nhóm aldehyt (xem, Zekovic et al. (2006) Chem. Papers 60:243-248; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn); và việc sử dụng dạng được oxy hóa này của (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucan trong phản ứng amin hóa khử (xem, Abdel-Magid et al. (1996) J. Org. Chem. 61:3849-3862; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) với gốc lysin của chất mang (ví dụ, protein chất mang, ví dụ, BSA), để sản xuất thể liên hợp polysacarit-chất mang. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến ứng dụng của các kỹ thuật phân tách (ví dụ, trao đổi ion, DEAE xenluloza và đệm Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> có nồng độ ion khác nhau) để phân tách kháng nguyên tinh khiết (ví dụ, thể liên hợp (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucan-BSA), mà được sử dụng làm chất sinh miễn dịch hòa tan để gây miễn dịch động vật (ví dụ, thỏ) (xem, Howard et al. (2001) “Basic Methods in Antibody Production and Characterization”, CRC Press, pp. 11-18 và 31-50). Theo một số phương án, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm pha ái lực được phủ BSA (xem, Matejtschuk (1997) “Affinity Separations: A Practical Approach”, Oxford University Press) và ứng dụng của nó để hấp thụ kháng thể đặc hiệu chất mang (ví dụ, đặc hiệu BSA) từ kháng huyết thanh (ví dụ, huyết thanh thỏ) chứa cả kháng thể đối với chất mang (ví dụ, BSA) và kháng nguyên (ví dụ, (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucan), do đó tạo thuận lợi cho tính đặc hiệu của chế phẩm kháng thể thu được. Các phương pháp để liên hợp polysacarit với chất mang (ví dụ, chất mang protein, ví dụ, BSA) theo một số phương án của sáng chế được sử dụng để sản xuất các vaccin cho người và động vật, vì các phương pháp này bảo toàn cấu trúc polysacarit, hơn là gây ra sự biến đổi đầu khử như các phương pháp liên hợp thông thường (xem, Moreau et al., Patent Mỹ số 6,596,861; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Tính kháng nguyên yếu của poly- hoặc oligosacarit thường đòi hỏi cải biến trước khi sử dụng chúng làm kháng nguyên. Theo một số phương án của sáng chế, các phương pháp tổng hợp được phát triển trong đó kháng nguyên polysacarit (chứa (1→6)-β-D-glucan) được liên hợp với chất mang (ví dụ, chất mang protein, ví dụ, BSA) bắt nguồn hoặc thu được từ các loài động vật khác với loài được sử dụng để gây miễn dịch (xem, Howard et al. (2001) “Basic Methods in Antibody Production and Characterization”, CRC Press, pp. 11-18 và 31-50; Matejtschuk (1997) “Affinity Separations: A Practical Approach”, Oxford University Press). Mặc dù sáng chế không bị giới hạn bởi bản chất hoặc loại chất mang được sử dụng, nhưng BSA được thấy là có lợi do tính sẵn có của nó trên thị trường và sự có mặt của năm gốc lysin, mỗi gốc có một nhóm amino tự do có thể liên hợp được với poly- hoặc oligosacarit bởi nhiều phương pháp hóa học khác nhau (xem, Abdel-Magid et al. (1996) J. Org. Chem. 61:3849-3862; Lees et al. (1996) Vaccine 14:190-198; Pawlowski et al. (1999) Vaccine 17:1474-1483; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Theo một số phương án được ưu tiên, gốc hydrat cacbon của kháng nguyên và chất mang được sử dụng để liên hợp là tan được trong nước. Theo một số phương án, việc khử nhóm aldehyt đầu tận của gốc hydrat cacbon của kháng nguyên (ví dụ, polysacarit (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucan) không được sử dụng để liên hợp trực tiếp với chất mang (ví dụ, BSA), vì làm như vậy sẽ thay đổi về cơ bản cấu trúc và khả năng liên kết của kháng nguyên polysacarit. Theo một số phương án, sáng chế cho phép cấu trúc của gốc hydrat cacbon được bảo toàn lớn nhất thông qua việc áp dụng hệ anhydrit axetic /dimetylsulfoxit (Ac<sub>2</sub>O/DMSO) (xem, Zekovic et al. (2006) Chem. Papers 60:243-248; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) để oxy hóa ở các vị trí khác với C3.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp để sử dụng các thành phần của thành tế bào nấm men (ví dụ, (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucan tan được từ thành tế bào *Saccharomyces cerevisiae*) để tổng hợp thể liên hợp kháng nguyên (ví dụ, (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucan-BSA (Albumin huyết thanh bò)) được sử dụng để sản xuất kháng thể (ví dụ, kháng thể đa dòng). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất hợp phần miễn dịch bao gồm

(1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-glucan và/hoặc thể liên hợp (ví dụ, thể liên hợp protein hoặc đường) bao gồm hợp phần này. Theo một số phương án, hợp phần kháng thể theo sáng chế được sử dụng để phát hiện sản phẩm thành tế bào nấm men trong mẫu được quan tâm (ví dụ, mẫu thức ăn cho động vật hoặc dẫn xuất, phân đoạn, hoặc phần chiết của chúng). Theo một số phương án, hợp phần theo sáng chế được chiết từ nguyên liệu giàu glucan hoặc sản phẩm giàu glucan (GEM, ALLTECH, Inc., Nicholasville, KY, USA), ví dụ, bằng cách chiết axit (xem, Kwiatkowski et al. (2009) J. Instit. Brew. 115:1031; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Theo một số phương án, việc oxy hóa vừa phải polysacarit (ví dụ, (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-glucan) ở vị trí C-6 của vòng glucopyranoza sử dụng hỗn hợp dimetylsulfoxit (DMSO)/anhydrit axetic ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) (xem, Pfizner et al. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:3027; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) biến đổi nhóm C-6 hydroxymetylen ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) thành nhóm aldehyt ( $-\text{CH}=\text{O}$ ) (xem, Zekovic et al. (2006) Chem. Papers 60:243-248; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn), và làm cho dạng được oxy hóa của kháng nguyên (ví dụ, (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-glucan) có khả năng tiến hành amin hóa khử với chất mang (ví dụ, BSA) (xem, Moreau et al., Patent Mỹ số 6,596,861; Abdel-Magid et al. (1996) J. Org. Chem. 61:3849-3862; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn).

Các phương pháp liên hợp theo sáng chế, ví dụ, bao gồm sự hoạt hóa polysacarit ở C6-OH, tạo ra cấu trúc gốc được bảo toàn đầy đủ của gốc polysacarit, và do vậy có lợi để điều chế kháng nguyên. Các phương pháp thay thế để hoạt hóa poly- hoặc oligosacarit bao gồm, nhưng không giới hạn ở, oxy hóa periodat (xem, Hay et al. (1973) Methods Carb. Chem. 5:357-370; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn) hoặc hoạt hóa CDAP (xem, Lees et al. (1996) Vaccine 14:190-198) tạo ra polysacarit bị cải biến đáng kể, ảnh hưởng có hại đến tính hữu dụng của nó để làm kháng nguyên.

### Kháng thể

Khía cạnh khác của sáng chế là phương pháp điều chế globulin miễn dịch để sử dụng trong thử nghiệm để phát hiện các thành phần của thành tế bào nấm men (ví dụ, (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men) bao gồm các bước gây miễn dịch đối tượng với thành phần thành tế bào nấm men (ví dụ, (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men, (1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan nấm men, (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan-BSA, hoặc các mảnh khác, biến thể, hoặc thể liên hợp của chúng) và phân tách globulin miễn dịch từ thể nhận. Globulin miễn dịch được điều chế bởi phương pháp này là khía cạnh khác của sáng chế.

Nguyên liệu cây để sản xuất kháng thể đa dòng thường được điều chế bằng cách làm phân tán hợp phần kháng nguyên trong chất làm loãng dung chịu được về mặt sinh lý như nước muối hoặc các tá dược khác để tạo thành hợp phần gốc nước. Lượng kích thích miễn dịch của nguyên liệu cây được sử dụng cho đối tượng và đối tượng đã được cấy sau đó được duy trì trong khoảng thời gian đủ cho hợp phần kháng nguyên tạo ra kháng thể bảo vệ.

Kháng thể có thể được tách riêng đến mức độ mong muốn bởi các kỹ thuật đã biết rõ như sắc ký ái lực (xem, ví dụ, Harlow and Lane, Antibodies; a Laboratory Manual (1988) Cold Springs Harbor Laboratory Press).

Kháng thể bao gồm chế phẩm kháng huyết thanh từ nhiều động vật được sử dụng phổ biến (ví dụ, dê, động vật linh trưởng, thỏ, lừa, lợn, ngựa, chuột lang, chuột cống hoặc người). Động vật được lấy máu và huyết thanh được thu gom.

Globulin miễn dịch được tạo ra theo sáng chế có thể bao gồm kháng thể nguyên vẹn, mảnh hoặc mảnh phụ kháng thể. Kháng thể có thể là globulin miễn dịch nguyên vẹn thuộc lớp bất kỳ, ví dụ, IgG, IgM, IgA, IgD hoặc IgE, kháng thể khảm hoặc kháng thể lai với tính đặc hiệu kép đối với hai hoặc nhiều kháng nguyên theo sáng chế. Chúng cũng có thể là các mảnh, ví dụ, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv và các mảnh tương tự kể cả mảnh lai.

Theo cách khác, các kỹ thuật được mô tả để sản xuất kháng thể chuỗi đơn có thể được làm thích ứng bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực để sản xuất kháng thể chuỗi đơn mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể. Kháng thể với tính đặc hiệu có liên quan, nhưng của hợp phần idiotyp riêng biệt, có thể được tạo ra bằng cách sắp xếp lại trật tự mạch từ thư viện globulin miễn dịch tổ hợp ngẫu nhiên (xem, ví dụ, Burton, Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 11120-23, 1991).

Kháng thể chuỗi đơn cũng có thể được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng phương pháp khuếch đại ADN, như PCR, sử dụng cADN tế bào lai làm khuôn (xem, ví dụ, Thirion et al., 1996, Eur. J. Cancer Prev. 5, 507-11). Kháng thể chuỗi đơn có thể đơn đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép, và có thể có hóa trị hai hoặc hóa trị bốn. Việc tạo cấu trúc kháng thể chuỗi đơn hóa trị bốn, đặc hiệu kép được nêu, ví dụ, trong Coloma & Morrison, 1997, Nat. Biotechnol. 15, 159-63. Việc tạo cấu trúc kháng thể chuỗi đơn hóa trị hai, đặc hiệu kép được nêu, ví dụ, trong Mallender & Voss, 1994, J. Biol. Chem. 269, 199-206.

Trình tự nucleotit mã hóa kháng thể chuỗi đơn có thể được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng quy trình tổng hợp nucleotit thủ công hoặc tự động, được tách dòng vào cấu trúc biểu hiện sử dụng phương pháp ADN tái tổ hợp chuẩn, và được đưa vào tế bào để biểu hiện trình tự mã hóa, như được nêu dưới đây. Theo cách khác, kháng thể chuỗi đơn có thể được tạo ra trực tiếp bằng cách sử dụng, ví dụ, công nghệ thể thực khuẩn dạng sợi (xem, ví dụ, Verhaar et al., 1995, Int. J. Cancer 61, 497-501; Nicholls et al., 1993, J. Immunol. Meth. 165, 81-91).

Kháng thể mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên cụ thể cũng có thể được tạo ra bằng cách gây ra sự sản xuất in vivo trong quần thể tế bào lympho hoặc bằng cách sàng lọc thư viện hoặc panen globulin miễn dịch của chất phản ứng liên kết đặc hiệu cao như được nêu trong tài liệu (xem, ví dụ, Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 3833-3837, 1989; Winter et al., Nature 349, 293-299, 1991).

Kháng thể khảm có thể được tạo cấu trúc như được nêu trong WO 93/03151. Protein liên kết thu được từ globulin miễn dịch và đa hóa trị và đa đặc hiệu, như các "diabody" được bộc lộ trong WO 94/13804, cũng có thể được điều chế. Kháng thể có thể được tinh chế bởi các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực. Ví dụ, kháng thể có thể được tinh chế ái lực bằng cách đi qua cột mà kháng nguyên có liên quan được liên kết với. Sau đó, kháng thể đã được liên kết có thể được rửa giải khỏi cột bằng cách sử dụng chất đệm với nồng độ muối cao.

Hợp phần miễn dịch theo sáng chế có thể được sử dụng cho đối tượng mà sau đó đóng vai trò như là nguồn globulin miễn dịch, được tạo ra để đáp ứng lại thách thức từ hợp phần miễn dịch đặc hiệu. Đối tượng được xử lý theo cách như vậy sẽ cho huyết tương mà từ huyết tương này sẽ thu được globulin miễn dịch cao bằng hệ phương pháp phân đoạn huyết tương thông thường.

Hợp phần theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể (ví dụ, kháng thể đơn dòng và/hoặc đa dòng) mà có thể là globulin miễn dịch nguyên vẹn thuộc lớp bất kỳ (ví dụ, IgG, IgM, IgA, IgD hoặc IgE, kháng thể khảm) hoặc kháng thể lai với tính đặc hiệu đối với hai hoặc nhiều kháng nguyên theo sáng chế. Chúng cũng có thể là các mảnh, ví dụ, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv và các mảnh tương tự kể cả mảnh lai.

Các phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng đã được biết rõ trong lĩnh vực và có thể bao gồm dung hợp tế bào lá lách với các tế bào u tủy (Xem, ví dụ, Kohler and Milstein 1975 Nature 256; 495; Harlow and Lane, Antibodies; a Laboratory Manual (1988) Cold Springs Harbor Laboratory Press). Theo cách khác, mảnh Fv đơn dòng có thể thu được bằng cách sàng lọc thư viện biểu hiện thể thực khuẩn thích hợp (Xem, ví dụ, Vaughan TJ et al 1998 Nature Biotechnology 16; 535). Kháng thể đơn dòng có thể được làm giống như của người hoặc được làm giống một phần của người bởi các phương pháp đã biết.

Theo một số phương án của sáng chế, hợp phần kháng thể có khả năng nhận biết kháng nguyên thành tế bào nấm men (ví dụ, kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng có khả năng nhận biết (1→4)- $\alpha$ -D-glucan nấm men,

(1→6)-β-D-glucan nấm men, (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucan nấm men, hoặc mảnh, biến thể, hoặc thể liên hợp của chúng). Theo một số phương án, hợp phần kháng thể theo sáng chế liên kết với (1→4)-α-D-glucan thành tế bào nấm men, mà không phải các gốc chứa (1→4)-α-D-glucan có mặt trong chất không phải là polyme chứa (1→4)-α-D-glucan thành tế bào nấm men (ví dụ, (1→4)-α-D-glucan thành tế bào nấm men, (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucan thành tế bào nấm men, hoặc mảnh, biến thể, hoặc thể liên hợp của chúng). Theo một số phương án, hợp phần kháng thể theo sáng chế liên kết với (1→6)-β-D-glucan thành tế bào nấm men, mà không phải các gốc chứa (1→6)-β-D-glucan có mặt trong chất không phải polyme chứa (1→6)-β-D-glucan thành tế bào nấm men (ví dụ, (1→6)-β-D-glucan thành tế bào nấm men, (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucan thành tế bào nấm men, hoặc mảnh, biến thể, hoặc thể liên hợp của chúng). Theo một số phương án, hợp phần kháng thể theo sáng chế liên kết với (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucan thành tế bào nấm men, mà không phải gốc chứa (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucan có mặt trong chất không phải thành tế bào nấm men (ví dụ, (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucan thành tế bào nấm men, hoặc mảnh, biến thể, hoặc thể liên hợp của chúng).

#### Ví dụ thực hiện sáng chế

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

##### Ví dụ 1

Chiết (1→4)-α/(1→6)-β-D-glucan từ β-glucan thành tế bào nấm men *Saccharomyces cerevisiae* loại dùng cho thực phẩm

Chế phẩm glucan thành tế bào nấm men

(1→6)-β-D-glucan loại công nghiệp (ALL-BGY, ALLTECH, Inc., Nicholasville, KY, USA) được tạo ra từ *S. cerevisiae* bằng cách xử lý enzym/kiềm/nhiệt được rửa bốn lần bằng nước đã được khử ion để loại bỏ phần

cặn hòa tan bất kỳ. Sau khi làm khô lạnh, thu được “nguyên liệu giàu glucan” (“GEM”).

Tiêu hóa glucan thành tế bào nấm men bằng axit

Fig. 1 minh họa việc điều chế các phân đoạn khác nhau. Sự tiêu hóa glucan thành tế bào nấm men bằng axit được tiến hành như được nêu trong Kwiatkowski et al. (2009) J. Instit. Brew. 115:151-158; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. “Nguyên liệu giàu glucan” (“GEM”) (70 g) được cho qua thủy phân bằng 700 mL HCl nồng độ 100 mM (pH 2,2) ở nhiệt độ 80°C trong 6 giờ. Sau thời điểm này, hỗn hợp được ly tâm ở  $13.500 \times g/10^\circ\text{C}/10$  phút và dịch nổi bề mặt được thu gom. Viên tròn được chiết hai lần với 150 ml nước đã được khử ion và được làm đông khô nhanh, tạo ra 57,9 g sản phẩm vô định hình màu trắng (P1).

Hai dịch rửa được kết hợp với dịch nổi bề mặt ban đầu và được trung hòa đến pH 7,0 bằng NaOH nồng độ 2N. Chất kết tủa tạo thành được thu gom (viên tròn P1/7) từ quá trình ly tâm (1,82 g sau khi sấy đông khô nhanh) và dịch nổi bề mặt được cô đến thể tích bằng 450 ml sử dụng thiết bị bay hơi quay chân không Buchi dưới nhiệt độ 37°C. Dung dịch này được cô tiếp bằng cách sử dụng thiết bị ly tâm siêu lọc 5 kDa AMICON 15 (Millipore Corporation, Delaware USA). Chất cô (~150 mL) được rửa bằng cách ly tâm hai lần bằng hai thể tích bằng nhau của nước đã được khử ion, sử dụng cùng thiết bị siêu lọc, để loại bỏ muối và các thành phần có khối lượng phân tử thấp tạo ra từ sự thủy phân axit. Chất cô đã được rửa (S1) được làm đông khô nhanh, tạo ra 7,5 g sản phẩm vô định hình màu trắng. Một phần của viên tròn P1 được cho qua lần chiết thứ hai bằng cách sử dụng cùng tỷ lệ của chất phản ứng và điều kiện như trong lần chiết HCl 0,1N đầu tiên. Các sản phẩm này được làm đông khô nhanh để tạo thành P2 và S2. Lần chiết thứ hai với HCl 0,1N không tạo ra chất kết tủa sau khi dịch nổi bề mặt đã được trung hòa. Một phần của viên tròn P2 được cho qua lần chiết thứ ba sử dụng cùng tỷ lệ của chất phản ứng và điều kiện như trong lần chiết HCl 0,1N thứ nhất và sản phẩm được làm đông khô nhanh để tạo thành P3 và S3. Lần chiết thứ ba với HCl 0,1N không tạo ra chất

kết tủa sau khi dịch nổi bề mặt đã được trung hòa. Hợp phần hydrat cacbon và cấu trúc polysacarit của các phân đoạn hòa tan và không hòa tan từ lần chiết HCl 0,1N được thiết lập bằng cách sử dụng phổ học  $^1\text{H}$  NMR. Hàm lượng mannoza và glucoza trong mẫu được phân tích bằng cách sử dụng phân tích hợp phần  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -HPLC (xem, Dallies et al. (1998) Yeast 14:1297-1306; được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn). Lượng ước tính của hàm lượng protein được tính toán bằng cách sử dụng phân tích đốt cháy LECO và bằng cách nhân hàm lượng nitơ với hệ số 6,25.

#### Ví dụ 2

##### Chế phẩm kháng nguyên

Oxy hóa chế phẩm (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan bằng  $\text{Ac}_2\text{O}$ /DMSO

580 miligam glucan ‘tan được’ được đặt trong lọ thủy tinh dung tích 22 ml được lắp thanh khuấy từ và được làm dừng bằng vách ngăn cao su. 10ml DMSO khan và 110 $\mu$ l anhydrit axetic được bổ sung vào lọ này bằng cách sử dụng ống tiêm thủy tinh, ở nhiệt độ trong phòng và trong điều kiện khuấy. Hỗn dịch glucan hòa tan hoàn toàn trong 4 giờ khuấy ở nhiệt độ 20°C. Tiếp tục khuấy hỗn hợp trong 24 giờ, sau đó hỗn hợp phản ứng được pha loãng bằng 40ml nước. Dung dịch trong thu được được cô bằng cách sử dụng thiết bị ly tâm siêu lọc 30 kDa Amicon®15 và phần cặn trên thiết bị lọc được rửa năm lần, mỗi lần bằng 12 ml nước đã được khử ion, để tách riêng và tinh chế sản phẩm của quá trình oxy hóa khỏi dung môi và chất phản ứng. Tất cả các lần ly tâm đều được tiến hành ở điều kiện 4750  $\times$  g/30 phút/10°C. Phần cặn cuối cùng trên thiết bị lọc được thu gom và được làm khô lạnh tạo ra 502mg (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan đã được oxy hóa dưới dạng bột màu trắng. Sản phẩm này tan được một phần trong nước và tan được hoàn toàn trong DMSO.

##### Phân tích nguyên tố

Đối với glucan đã được oxy hóa phát hiện thấy: C-40,05%; H-6,61%.  
 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_5 \times \text{H}_2\text{O}$  theo tính toán: C-40,48%; H-5,66%

Amin hóa khử (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan đã được oxy hóa với BSA

Mẫu gồm 412 mg (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan đã được oxy hóa được hòa tan trong 20 ml nước đã được khử ion và được kết hợp với dung dịch chứa 256 mg BSA trong 2 ml nước đã được khử ion trong điều kiện khuấy từ. Sau đó, hỗn hợp này được xử lý bằng 60 mg natri xyanoborohydrua rắn. Lọ phản ứng được làm dừng bằng vách ngăn cao su, và hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ 20°C trong 24 giờ. Sau thời điểm này, 100 mg natri borohydrua được bổ sung và hỗn hợp được khuấy trong 22 giờ nữa. Sau đó, dung dịch trong được lọc qua thiết bị ly tâm siêu lọc 30 kDa Amicon®15 ở điều kiện 4750  $\times$  g/30 phút/10°C. Phần cặn được rửa trên thiết bị lọc bốn lần, mỗi lần bằng 12 ml nước và chất cặn cuối cùng được làm đông khô nhanh, tạo ra 573 mg bột màu trắng.

Phân tích nguyên tố

C 45,01%, H 6,40%, N 2,11%.

Phân tách thể liên hợp (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan-BSA bằng sắc ký trao đổi ion DEAE Xenluloza

Dung dịch chứa 400 mg thể liên hợp thô trong 5 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> nồng độ 5 mM được đưa vào trên mặt trên của cột sắc ký thủy tinh 2  $\times$  55cm chứa 50 g DEAE Xenluloza trong Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> nồng độ 5mM. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ở các nồng độ khác nhau được sử dụng để rửa giải: 40,1 mg (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan (220 ml, 5 mM); 132,3 mg thể liên hợp (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan-BSA tinh khiết (280 ml, 55 mM); và 96,7 mg BSA (80 ml, 100 mM). Dung dịch thể liên hợp (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan-BSA tinh khiết được cô đến thể tích 2 ml bằng cách sử dụng thiết bị ly tâm siêu lọc 30 kDa AMICON15, được rửa bằng nước đã được khử ion và được làm đông khô nhanh, tạo ra 132,3 mg (hiệu suất tổng cộng 24,4%) sản phẩm giống như bột màu trắng. Điện di gel tạo ra băng rộng phát hiện được bằng cách sử dụng phép nhuộm màu Comassie Blue và PAS, cùng với tâm ở ~170 kDa. Không phát hiện thấy BSA tự do hoặc tạp chất bất kỳ khác trong biểu đồ điện di.

### Phân tích nguyên tố

C 40,11%, H 6,23%, N 3,06%, (20,44% khối lượng của BSA). Tỷ lệ tính toán được của  $\beta$ -glucan: BSA là 4:1.

### Ví dụ 3

#### Điều chế và tinh chế kháng thể đa dòng

#### Chế phẩm kháng nguyên và gây miễn dịch ở thỏ

10 mg kháng nguyên được liên hợp BSA điều chế được như được nêu trong Ví dụ 2 được làm đông khô nhanh, được bảo quản ở nhiệt độ 4°C, và được dùng để gây miễn dịch ba con thỏ (200  $\mu$ g kháng nguyên cho mỗi lần gây miễn dịch). Protocol gây miễn dịch được liệt kê trong Bảng 1.

Bảng 1. Protocol gây miễn dịch để tạo ra kháng thể đa dòng kháng (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan-BSA ở thỏ.

| Ngày  | Công việc                                           |
|-------|-----------------------------------------------------|
| 0     | Thiết lập, trước khi lấy máu, gây miễn dịch ban đầu |
| 21    | Liều mạnh                                           |
| 35    | Liều mạnh                                           |
| 44-45 | Lấy máu                                             |
| 49    | Liều mạnh                                           |
| 58-59 | Lấy máu                                             |
| 63    | Lấy máu                                             |

#### Tinh chế pha ái lực kháng thể đa dòng

1 gam Agarosa được hoạt hóa bởi Epoxy (Sigma E 6632) được tạo hỗn dịch trong dung dịch chứa 2,68 g BSA (SIGMA A2153) trong 27 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  nồng độ 10 mM và hỗn hợp được khuấy trong 4 giờ ở nhiệt độ 4°C trong bể nước đá-nước. Sau thời điểm này, hỗn hợp được ly tâm ở tốc độ  $2500 \times g/5$  phút/10°C và viên tròn được rửa và được ly tâm bốn lần nữa, mỗi lần với 30 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  nồng độ 100 mM /0,05% khối lượng  $\text{NaN}_3$ .

Viên tròn từ lần ly tâm cuối cùng của pha ái lực được phủ BSA (được mô tả ở trên) được tạo hỗn dịch trong dung dịch chứa 750  $\mu$ l huyết thanh (được

thu gom từ thô đã được gây miễn dịch bằng thể liên hợp glucan-BSA ‘tan được’) trong 20 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  nồng độ 10 mM /0,05% khối lượng  $\text{NaN}_3$  và được xáo trộn 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng và sau đó được ly tâm ở tốc độ  $1500 \times g/5$  phút/ $10^\circ\text{C}$ . Dịch nổi bề mặt được thu gom và viên tròn được rửa ba lần nữa bằng 20 ml của cùng chất đệm, để thu được ba dịch nổi bề mặt nữa. Dịch nổi bề mặt được kiểm tra về tính đặc hiệu đối với BSA và glucan ‘tan được’ như được biểu thị trên Fig. 2. Dịch nổi bề mặt thứ nhất và thứ hai, chứa lượng kháng thể đáng kể, được thu gom cùng nhau và được cô đến thể tích 2,5 ml bằng cách ly tâm ở điều kiện  $5000 \times g/5$  phút/ $10^\circ\text{C}$  sử dụng thiết bị lọc ly tâm 10 kDa AMICON Ultra-15 Centrifugal Filter Device. Chất cô được rửa trên thiết bị lọc bằng  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  nồng độ 10 mM/0,05% khối lượng  $\text{NaN}_3$  và được pha loãng đến thể tích 6 ml (6 g) với cùng chất đệm. Dung dịch này ở độ pha loãng 1:800 của ‘kháng thể được tinh chế ái lực’ được sử dụng trong thử nghiệm ELISA cho MYCOSORB trong thức ăn dùng cho động vật. Đường chuẩn thu được được biểu thị trên Fig. 3.

#### Ví dụ 4

Phát hiện (1→4)- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -D-glucan của thành tế bào nấm men bằng ELISA

Nguyên liệu và phương pháp

Chất phản ứng

Chỉ có các chất phản ứng đã được công nhận là thuộc loại phân tích mới được sử dụng, trừ khi có quy định khác, và nước đã được khử ion hoặc khử khoáng hoặc độ tinh khiết tương đương với nước ( $18,2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$  ở nhiệt độ  $25^\circ\text{C}$ ).

Chất phản ứng và việc điều chế các dung dịch chất phản ứng là như sau:

- Axit clohydric, 12,1 N; HCl
- Axit clohydric loãng, 1 N; HCl: 41,3 ml HCl 12,1 N được bổ sung từ từ vào 400 ml nước đã được khử ion và được trộn bằng thanh khuấy trên đĩa khuấy cho đến khi nguội. Dung dịch được chuyển tới bình thể tích 500 ml và

được điền đầy đến thể tích này bằng nước đã được khử ion, sau đó được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng.

- Dimetyl sulfoxit: DMSO được sử dụng có độ tinh khiết cao, thích hợp cho việc đo quang phổ, sắc ký lỏng và sắc ký khí.
- Chất phản ứng chiết: Để điều chế chất phản ứng chiết, 900 ml DMSO được trộn với 98,75 ml nước đã được khử ion và 1,25 ml HCl 12,1N. Dung dịch được trộn bằng thanh khuấy trên đĩa khuấy ở tốc độ trung bình và nhiệt độ trong phòng, sau đó được bảo quản ở nhiệt độ 20°C hoặc lớn hơn.
- Natri clorua (“NaCl”)
- Kali clorua (“KCl”)
- Dinatri hydro phosphat (“Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>”)
- Kali dihydro phosphat (“KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>”)
- Nước muối đệm phosphat (“PBS”) 10X: Để điều chế 10X PBS, 80,0 g natri clorua [NaCl], 2,0 g kali clorua [KCl], 14,2 g dinatri hydro phosphat [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>] và 2,4 g kali dihydro phosphat [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] được trộn với khoảng 800 ml nước đã được khử ion. Dung dịch được khuấy bằng cách sử dụng thanh khuấy trên đĩa khuấy cho đến khi chất rắn đã được hòa tan hoàn toàn. Dung dịch được chuyển tới bình thể tích 1000 ml và được điền đầy đến thể tích này bằng nước đã được khử ion, sau đó được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng hoặc ở nhiệt độ 2 – 8°C. Thời gian bảo quản tối đa là 6 tháng ở nhiệt độ 2 – 8°C để làm chất lỏng chưa được pha loãng. Dung dịch được làm ấm lên nhiệt độ trong phòng trước khi sử dụng.
- PBS được pha loãng, 1X: Để điều chế 1X PBS, 1 thể tích PBS, 10X được pha loãng bằng 9 thể tích nước đã được khử ion. Dung dịch pha loãng được trộn bằng cách sử dụng thanh khuấy trên đĩa khuấy ở tốc độ trung bình và nhiệt độ trong phòng. Thời gian bảo quản tối đa là một ngày.
- Polysorbat 20

- Nước muối được đệm phosphat, 0,01 M với 0,05 % Polysorbat 20, pH 7,4: để điều chế, hàm lượng của một túi được hòa tan trong 1000 ml nước đã được khử ion. Dung dịch được khuấy trên đĩa khuấy cho đến khi được hòa tan hoàn toàn, sau đó được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng hoặc ở nhiệt độ 2 – 8°C. Thời gian bảo quản tối đa là 6 tháng ở nhiệt độ 2 – 8°C để làm chất lỏng chưa được pha loãng. Dung dịch được làm ấm lên nhiệt độ trong phòng trước khi sử dụng.
- Sữa bột không béo
- Sữa bột không béo, 3 % (khối lượng/thể tích) trong PBS, chất phản ứng 1X BLOCK: để điều chế chất phản ứng 1X Block, sữa bột được hòa tan hoàn toàn trong 1X PBS trước khi sử dụng. Thể tích 10 ml cân cho mỗi đĩa để phong bế. Thời gian bảo quản tối đa là một ngày.
- Kháng thể đa dòng ở thỏ; kháng thể sơ cấp (Dung dịch kháng thể #1): kháng thể được tinh chế ái lực được điều chế như được nêu trong bản mô tả này. Được bảo quản ở nhiệt độ – 80°C cho đến khi sử dụng.
- Dung dịch kháng thể đa dòng ở thỏ đã được pha loãng: được pha loãng đến 1: $X_i$  trong PBS bằng cách bổ sung 1  $\mu$ l dung dịch kháng thể #1 vào  $X_i$   $\mu$ l PBS, 1X. Thể tích dung dịch bằng 10 ml cân cho mỗi đĩa vi chuẩn độ. Dung dịch kháng thể đã được pha loãng được trộn kỹ trước khi sử dụng, và kháng thể đã được pha loãng dư được loại bỏ. Thời gian bảo quản tối đa là một ngày.
- IgG dê kháng thỏ tinh khiết ái lực được liên hợp Peroxidaza (H+L); kháng thể thứ cấp HRP, Ref. # 111-035-045 (Jackson ImmunoResearch, PA, USA - Dung dịch kháng thể #2): được tái hydrat hóa với 1,5 ml nước đã được khử ion và được ly tâm cho đến khi thu được dung dịch hoàn toàn trong suốt. Được bảo quản trong các lượng nhỏ 10  $\mu$ l ở nhiệt độ – 80°C cho đến khi sử dụng. Thời gian bảo quản tối đa là 6 tuần ở nhiệt độ 2 – 8°C để làm chất lỏng chưa được pha loãng.

- Kháng thể dê kháng thổ đã được pha loãng: được pha loãng đến 1:Y<sub>i</sub> trong PBS bằng cách bổ sung 1 µl dung dịch kháng thể #2 vào Y<sub>i</sub> µl PBS, 1X. Dung dịch kháng thể đã được pha loãng được trộn kỹ trước khi sử dụng, và kháng thể đã được pha loãng dư được loại bỏ. Thời gian bảo quản tối đa là một ngày.
- Cơ chất SureBlue Reserve TMB Microwell Peroxidase: Thẻ tích cần thiết chỉ được tái phân phối trong các chai Nalgene HDPE và LDPE màu hổ phách. Cơ chất được làm ấm lên nhiệt độ trong phòng trước khi sử dụng. Nắp được giữ kín chặt, được bảo vệ khỏi ánh sáng. Cơ chất dư được loại bỏ, và chất phản ứng được bảo quản ở nhiệt độ 2 – 8°C. Thời gian bảo quản tối đa là 24 tháng từ ngày sản xuất khi được bảo quản ở nhiệt độ 8°C.
- Mẫu gốc MYCOSORB; mẻ số #285965 (ALLTECH, Inc., KY, USA): Mẫu MYCOSORB đồng nhất được sử dụng.
- Pha loãng MYCOSORB trong thức ăn: 20 g nguyên liệu thức ăn được trộn với lượng tăng dần của sản phẩm MYCOSORB (0,01; 0,02; 0,08; 0,10; 0,12 g) trong chai ly tâm dung tích 250 ml trong ba bản sao để tạo ra đường cong chuẩn. Chai được lắc trên máy lắc quỹ đạo ở tốc độ 400 vòng/phút trong 1 giờ. Độ chụm đối với việc cân nguyên liệu thức ăn bằng  $\pm 0,025$  g và đối với sản phẩm MYCOSORB, bằng  $\pm 0,005$  g.
- Mẻ lớn của MYCOSORB đã được pha loãng trong thức ăn: Mẫu lớn của sản phẩm MYCOSORB đã được pha loãng trong thức ăn được điều chế bằng cách sử dụng 1,2 g sản phẩm và 300 g nguyên liệu thức ăn trong đồ chứa dung tích 1000 ml. Chai được lắc trên máy lắc quỹ đạo ở tốc độ 400 vòng/phút trong 1 giờ. Nồng độ cuối cùng của sản phẩm MYCOSORB trong nguyên liệu thức ăn là 4,0 kg/T. 20,0 g hỗn hợp sản phẩm-thức ăn mẻ lớn 300,0 g đã được làm đồng nhất được chuyển vào chai ly tâm dung tích 250 ml. Việc chuyển được lặp lại 9 lần nữa để thu được 10 bản sao mẫu. Hỗn hợp được lắc không liên tục giữa mỗi 3 lượng nhỏ đã được điều chế để tránh cho sản phẩm lắng xuống đáy chai. Độ chụm đối với việc cân nguyên liệu thức ăn bằng  $\pm 0,025$  g và đối với sản phẩm MYCOSORB, bằng  $\pm 0,005$  g.

- Pha loãng lượng MYCOSORB chưa được biết trong thức ăn: Mẫu chưa được biết được điều chế bằng cách chuyển lượng chưa biết của sản phẩm MYCOSORB và 20,0 g ( $\pm 0,025$  g) nguyên liệu thức ăn vào mỗi trong số năm chai ly tâm dung tích 250 ml. Chai được lắc trên máy lắc quỹ đạo ở tốc độ 400 vòng/phút trong 1 giờ. Việc chuẩn bị đường cong chuẩn của mẫu đối với (các) mẫu này được hoàn thành đồng thời.

#### Chế phẩm mẫu

Ba nguyên liệu thức ăn (xem Bảng 4, Bảng 5, và Bảng 6) được sử dụng để kiểm nhận thử nghiệm. Chế phẩm nguyên liệu thức ăn được chọn theo các hợp phần có thể được tìm thấy trong lĩnh vực. Kích thước mẫu là tổng cộng 15 kg nguyên liệu thức ăn đã được làm đồng nhất một cách cẩn thận trước khi được gửi đến phòng thí nghiệm. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 2 – 8°C trong toàn bộ thời gian nghiên cứu.

#### Kiểm tra độ đồng nhất của mẫu

Độ đồng nhất của việc pha loãng sản phẩm MYCOSORB trong nguyên liệu thức ăn được kiểm tra bằng cách điều chế mẻ lớn của sản phẩm MYCOSORB đã được pha loãng trong thức ăn ở nồng độ trung gian của sản phẩm trong thức ăn bằng 4,0 kg/T. Mẫu được chia thành 10 mẫu con và được chiết tiếp theo quy trình chiết và sau đó xác định hệ số biến đổi để phát hiện sản phẩm bằng thử nghiệm ELISA bốn lần đối với mỗi trong số 10 mẫu.

#### Điều chế mẫu

Việc điều chế mẫu chuẩn được thực hiện như được nêu trong bản mô tả này và được đưa ra trong Bảng 2, với sản phẩm MYCOSORB được thử nghiệm. Trong trường hợp này, sản phẩm gốc ban đầu được làm mẫu như được nêu trong bản mô tả này. Mẫu chưa biết được điều chế theo như được nêu ở trên. Không cần nghiền mẫu thức ăn trước khi tiến hành quy trình chiết, (cũng không nghiền mẫu thức ăn nếu nguyên liệu thức ăn được cung cấp ở dạng được vê viên). Đã phát hiện thấy rằng việc nghiền nguyên liệu thức ăn có thể ảnh hưởng đến độ tin cậy cuối cùng của thử nghiệm.

Bảng 2. Các bước pha loãng sản phẩm MYCOSORB đối với đường cong chuẩn.

| Hệ số pha loãng (kg/T) <sup>a</sup> | Số nhóm mẫu    | Thức ăn (g) <sup>b</sup> | MYCOSORB (g) <sup>c</sup> | Bản sao × Mẫu |
|-------------------------------------|----------------|--------------------------|---------------------------|---------------|
| 0                                   | 0              | 20,0                     | 0                         | 2 × 10        |
| 0,5                                 | 1              | 20,0                     | 0,01                      | 2 × 3         |
| 1,0                                 | 2              | 20,0                     | 0,02                      | 2 × 3         |
| 4,0                                 | 3              | 20,0                     | 0,08                      | 2 × 3         |
| 5,0                                 | 4              | 20,0                     | 0,10                      | 2 × 3         |
| 6,0                                 | 5              | 20,0                     | 0,12                      | 2 × 3         |
| 0 đến 6,0                           | C <sup>d</sup> | 20,0                     | 0 đến 0,12                | 4 × 10        |

<sup>a</sup> Hệ số pha loãng được biểu thị bằng kilogram sản phẩm MYCOSORB cho mỗi tấn nguyên liệu thức ăn

<sup>b</sup> Khoảng thức ăn =  $\pm 0,025$  g,

<sup>c</sup> Khoảng sản phẩm MYCOSORB =  $\pm 0,005$  g

<sup>d</sup> Trong đó C là lượng MYCOSORB chưa biết trong thức ăn

#### Quy trình chiết

Toàn bộ tập hợp các chai được lắc trên máy lắc quỹ đạo ở tốc độ 400 vòng/phút trong 1 giờ. Ba chai tại một thời điểm được lấy ra và chất phản ứng chiết với thể tích bằng 80 ml được bổ sung vào mỗi chai sử dụng ống định lượng thể tích ở phía trên chai. Chai được đậy nắp. Tất cả các mẫu được lắc bằng tay để đảm bảo sự trộn lẫn hoàn toàn với chất phản ứng chiết. Chai được đặt trong bể nước được duy trì ổn nhiệt ở nhiệt độ 80°C trong 1 giờ, đảm bảo rằng dung dịch thức ăn được làm ngập hoàn toàn. Sau khi ủ, chai được lấy ra khỏi bể nước và hàm lượng của chai được trộn bằng que (nhãn hiệu NALGENE) sử dụng máy khuấy phòng thí nghiệm mômen xoắn cao. Hỗn hợp được làm đồng nhất hoàn toàn. Que sạch được sử dụng đối với mỗi mức bao hàm MYCOSORB và đối với mẫu chưa biết. Chai được đặt lại trong bể nước được duy trì ổn nhiệt ở nhiệt độ 80°C trong 1 giờ. Sau khi ủ, chai được lấy ra khỏi bể nước và 80 ml nước đã được khử ion được bổ sung vào mỗi chai, sử dụng ống định lượng thể tích ở phía trên chai, và sau đó chai được đậy nắp. Chai được lắc bằng tay cho đến khi được trộn lẫn hoàn toàn; que nhãn hiệu NALGENE với máy khuấy phòng thí nghiệm mômen xoắn cao được sử dụng

khi cần. Chai được ly tâm ở tốc độ 8000 g trong 10 phút. Khoảng 10 ml dịch nổi bề mặt được chuyển vào ống ly tâm vô trùng dung tích 15 ml bằng cách sử dụng pipet thủy tinh. Ống được ly tâm ở tốc độ 4000 g trong 10 phút và được chuyển vào ống ly tâm vô trùng dung tích 15 ml mới, đã được ghi nhãn một cách tương xứng, bằng cách gạn. Ống được bảo quản ở nhiệt độ  $-20^{\circ}\text{C}$  qua đêm cho đến khi được sử dụng cho thử nghiệm ELISA.

#### Quy trình ELISA

Cơ chất SureBlue Reserve TMB Microwell Peroxidase được sử dụng để khởi phát phản ứng so màu thông qua phản ứng với kháng thể thứ cấp HRP đã được pha loãng, cho phản ứng tiếp với chính kháng thể sơ cấp đã được pha loãng phản ứng một cách đặc hiệu với cơ chất đang quan tâm được chiết từ sản phẩm MYCOSORB đã được pha loãng, mà được cố định trên đĩa vi chuẩn độ. Phản ứng so màu cuối cùng được kết thúc sau 20 phút bằng cách sử dụng HCl, 1N và việc đọc độ hấp thụ được tiến hành trên thiết bị đọc đĩa ở bước sóng bằng 450 nm. Do vậy, các mẫu trống chỉ được tạo nên từ nguyên liệu thức ăn được xác định để giải thích cho độ lệch so màu có thể xảy ra do nền thức ăn tạo ra tín hiệu nền trên quang phổ kế. Để tính toán, các giá trị mẫu trống được trừ khỏi các giá trị độ hấp thụ thu được đối với mỗi mẫu.

Các mẫu được chiết trước đây và đã được bảo quản qua đêm được làm tan đông và được làm ấm đến nhiệt độ trong phòng. Các mẫu được cuộn xoay để đảm bảo mẫu đồng nhất trước khi sử dụng trong ELISA để phủ các lỗ của đĩa vi chuẩn độ.

Đối với mỗi bản sao mẫu, 100  $\mu\text{l}$  dịch nổi bề mặt được chuyển vào mỗi trong số 3 lỗ trên đĩa vi chuẩn độ có 96 lỗ như được nêu trong Bảng 3. Sự phân phối ngẫu nhiên các mẫu trên đĩa có thể được tiến hành trong phòng thí nghiệm được lắp thiết bị phân phối lỗ vi chuẩn độ được tự động hóa theo hình thức đã được lập trình. Tất cả các mẫu của đường cong chuẩn và các bản sao mẫu đều được phân phối trên một đĩa duy nhất (tức là, tất cả các bản sao mẫu 0 kg/T đều được dàn mỏng qua hàng/cột E1 đến F10). Các mẫu bản sao MYCOSORB chưa được biết được phân phối trên cùng đĩa (tức là được dàn mỏng qua

hàng/cột A11 đến C12). Các đĩa vi chuẩn độ được bít kín bằng màng kết dính vi đĩa và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 1 giờ. Sau khi ủ, dung dịch trong mỗi lỗ của đĩa vi chuẩn độ được loại bỏ và được thay thế bằng 250 µl PBS, 1X cho một lần rửa. Công việc này được lặp lại tổng cộng 2 lần nữa. Mỗi lỗ của đĩa vi chuẩn độ được phong bế bằng 100 µl sữa không béo đã được pha loãng trong dung dịch PBS và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi ủ, dung dịch trong mỗi lỗ được loại bỏ và được thay thế bằng 250 µl PBS, 1X cho một lần rửa, sau đó là 250 µl PBS chứa polysorbat 20, 0,05% cho 2 lần rửa.

Kháng thể sơ cấp đã được pha loãng, với thể tích bằng 100 µl được bổ sung vào mỗi lỗ. Đĩa vi chuẩn độ được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi ủ, dung dịch trong mỗi lỗ của đĩa vi chuẩn độ được loại bỏ và được thay thế bằng 250 µl PBS, 1X chứa Polysorbat 20, 0,05% cho 3 lần rửa.

Kháng thể thứ cấp đã được pha loãng, với thể tích bằng 100 µl được bổ sung vào mỗi lỗ. Đĩa vi chuẩn độ được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau khi ủ, dung dịch trong mỗi lỗ của đĩa vi chuẩn độ được loại bỏ và được thay thế bằng 250 µl PBS, 1X chứa Polysorbat 20, 0,05% cho 3 lần rửa.

Cơ chất TMB đã được làm ấm sơ bộ đến nhiệt độ trong phòng, với thể tích bằng 100 µl, được bổ sung vào mỗi lỗ và đĩa vi chuẩn độ được ủ trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau đúng 20 phút với cơ chất TMB, HCl 1N với thể tích bằng 100 µl được bổ sung ngay vào mỗi lỗ để kết thúc sự hiện màu. Mỗi đĩa vi chuẩn độ được đọc trên thiết bị đọc đĩa vi chuẩn độ ở bước sóng 450 nm.

Bảng 3. Sự phân bố nhóm mẫu trên đĩa vi chuẩn độ.

| ** | 1          | 2        | 3        | 4        | 5        | 6        | 7        | 8        | 9        | 10        | 11  | 12  |
|----|------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----|-----|
| A  | $C_{.1}^*$ | $C_{.2}$ | $C_{.3}$ | $C_{.4}$ | $C_{.5}$ | $C_{.6}$ | $C_{.7}$ | $C_{.8}$ | $C_{.9}$ | $C_{.10}$ | -   | -   |
| B  | $C_{.1}$   | $C_{.2}$ | $C_{.3}$ | $C_{.4}$ | $C_{.5}$ | $C_{.6}$ | $C_{.7}$ | $C_{.8}$ | $C_{.9}$ | $C_{.10}$ | -   | -   |
| C  | $C_{.1}$   | $C_{.2}$ | $C_{.3}$ | $C_{.4}$ | $C_{.5}$ | $C_{.6}$ | $C_{.7}$ | $C_{.8}$ | $C_{.9}$ | $C_{.10}$ | -   | -   |
| D  | $C_{.1}$   | $C_{.2}$ | $C_{.3}$ | $C_{.4}$ | $C_{.5}$ | $C_{.6}$ | $C_{.7}$ | $C_{.8}$ | $C_{.9}$ | $C_{.10}$ | 5.1 | 5.1 |
| E  | 0.1        | 0.2      | 0.3      | 0.4      | 0.5      | 0.6      | 0.7      | 0.8      | 0.9      | 0.10      | 5.2 | 5.2 |
| F  | 0.1        | 0.2      | 0.3      | 0.4      | 0.5      | 0.6      | 0.7      | 0.8      | 0.9      | 0.10      | 5.3 | 5.3 |
| G  | 1.1        | 1.2      | 1.3      | 2.1      | 2.2      | 2.3      | 3.1      | 3.2      | 3.3      | 4.1       | 4.2 | 4.3 |
| H  | 1.1        | 1.2      | 1.3      | 2.1      | 2.2      | 2.3      | 3.1      | 3.2      | 3.3      | 4.1       | 4.2 | 4.3 |

\* Trong đó  $C$  là mức bao hàm của sản phẩm MYCOSORB chưa biết trong thức ăn

\*\*Tham khảo Bảng 2 đối với việc xác định nhóm mẫu

Loại trừ số liệu từ các bản sao

Phân tích số liệu thống kê là cần thiết để đảm bảo rằng tất cả các bản sao là tương tự, loại trừ các bản sao không qua được thử nghiệm Q-Test của Dixon và khi đó được xác định là khoảng loại bỏ theo định nghĩa:  $Q_n = |x_a - x_b|/R$ , trong đó  $R$  là khoảng chứa tất cả các điểm số liệu;  $x_a$  là khoảng loại bỏ bị nghi ngờ;  $x_b$  là điểm số liệu gần nhất với  $x_a$ . Nếu  $Q$  theo tính toán  $> Q$  bảng thì loại bỏ điểm đáng ngờ ở khoảng tin cậy 95%.

Chế phẩm của đường cong chuẩn

Đường chuẩn được sử dụng để định lượng. Các đường cong này được xây dựng đối với mỗi nền thức ăn sử dụng ít nhất năm mức (kể cả mức zero) trong khoảng làm việc của sản phẩm như được nêu trong Council Directive 96/23. Trung bình của ba bản sao độ hấp thụ của lỗ ở OD<sub>450</sub> đối với mỗi mẫu nhóm được tính toán. Trung bình của mười bản sao độ hấp thụ của lỗ ở OD<sub>450</sub> đối với mẫu thức ăn làm mẫu trống được tính toán. Đường cong chuẩn hoặc đường chuẩn sau đó được tạo nên với hiệu số  $\Delta OD_{450}$  (OD<sub>450</sub> nhóm mẫu – OD<sub>450</sub> thức ăn mẫu trống) thu được trên tung độ và các khoảng nồng độ khác nhau của sản phẩm MYCOSORB, 0,5, 1,0, 4,0, 5,0, 6,0 kg/T trên hoành độ.

Hệ số hồi quy và phương trình của mức bao hàm đã được vẽ đồ thị so với độ hấp thụ ở OD<sub>450</sub> được tính toán theo sự hồi quy tuyến tính sử dụng đường phù hợp nhất,  $\Delta \text{OD}_{450} = Ax$  (MYCOSORB) sau khi hiệu chỉnh các giá trị bằng giá trị mẫu trống tính trung bình. Khoảng chấp nhận được và độ tuyến tính của đường chuẩn được xác nhận bởi giá trị hệ số tương quan ( $r^2$ ) trên 0,95. Phương trình tương ứng của đường cong sau đó được sử dụng để xác định mức bao hàm của sản phẩm MYCOSORB trong (các) mẫu chưa biết bằng cách giải phương trình tương ứng.

#### Phép nội suy

Hệ số tương quan ở trên  $r^2 > 0,95$  phải được tìm thấy với đường cong chuẩn, phương trình tương ứng của đường cong đã được hiệu chỉnh  $F(x) = Ax$ , (được trừ khỏi tín hiệu nền và chặn zero) sau đó được sử dụng để xác định mức bao hàm của sản phẩm MYCOSORB trong (các) mẫu chưa biết. Trung bình của mười bản sao ở OD<sub>450</sub> đối với mức bao hàm chưa biết ( $C$ ) của sản phẩm MYCOSORB được tính toán. Giá trị trung bình thu được được trừ khỏi giá trị trung bình của mười bản sao độ hấp thụ của lỗ ở OD<sub>450</sub> đối với mẫu thức ăn mẫu trống đã được tính toán trước đây. Giá trị trung bình OD<sub>450</sub> sau đó được sử dụng để giải phương trình của đường cong đã được hiệu chỉnh  $F^{-1}(y_C)$ , trong đó  $y_C = Ax_C$ :

$x_C = y_C / A$ , trong đó  $y_C$  là giá trị thu được ở OD<sub>450</sub> đối với mẫu chưa biết ( $C$ ) trừ đi OD<sub>450</sub> của mẫu trống,  $x_C$  là mức bao hàm tương ứng của sản phẩm MYCOSORB, và  $A$  là độ dốc của đường cong chuẩn, tính bằng kg/T OD<sub>450</sub>.

#### Giới hạn phát hiện và định lượng

Giới hạn phát hiện ( $L_D = 3\sigma_{\text{trống}}$ ) và giới hạn định lượng ( $L_Q = 10\sigma_{\text{trống}}$ ) được xác định theo danh pháp IUPAC và được đưa ra dưới dạng  $\Delta \text{OD}_{450}$ .

Giới hạn phát hiện ( $L_D$ ) và Giới hạn định lượng ( $L_Q$ ) được xác định từ phân tích mẫu trống nền và được tính toán thành nồng độ từ sự hồi quy tuyến tính được hiệu chỉnh từ giá trị OD<sub>450</sub> nền trung bình bằng đường chuẩn  $F(x) = Ax$  được phân giải như sau theo:

$$L_D = 3\sigma_{blank}/A \quad \text{và} \quad L_Q = 3\sigma_{blank}/A, \text{ trong đó } L_D \text{ là nồng độ tối thiểu}$$

có thể phát hiện được của sản phẩm hoặc Giới hạn phát hiện;  $L_Q$  là nồng độ tối thiểu có thể định lượng được của sản phẩm hoặc Giới hạn định lượng.

Độ đồng nhất

Hệ số biến thiên độ đồng nhất ( $RSD_H = CV_H$ ) được định nghĩa là hệ số biến đổi trung bình từ 10 bản sao độc lập thu được từ cùng mẫu vào cùng ngày, từ cùng kỹ thuật viên, với cùng thiết bị và phương pháp.

Độ chụm: Độ lặp lại

Độ chụm trong điều kiện lặp lại trong chu trình ( $RSD_{intra} = CV_{intra}$ ) được định nghĩa là hệ số biến đổi trung bình từ các lần lặp lại thu được từ cùng mẫu vào cùng ngày đối với cùng chu trình, từ cùng kỹ thuật viên, với cùng thiết bị và phương pháp.

Độ chụm trong điều kiện lặp lại giữa chu trình ( $RSD_{inter} = CV_{inter}$ ) là hệ số biến đổi trung bình từ các kết quả độc lập thu được từ cùng mẫu ở các ngày khác nhau trong các chu trình khác nhau, từ cùng kỹ thuật viên, với cùng thiết bị và phương pháp.

Độ chụm: Độ chụm tổng thể

Độ chụm đánh giá độ phân tán (hoặc độ gần) của sự phù hợp giữa các phép đo kế tiếp của cùng đại lượng. Độ phân tán trong tập hợp các phép xác định thường được biểu thị dưới dạng độ lệch chuẩn. Độ chụm do đó được tính toán từ độ lệch chuẩn của một thử nghiệm riêng rẽ ở một mức bao hàm thu được từ cùng mẫu vào cùng ngày, từ cùng kỹ thuật viên, với cùng thiết bị và phương pháp; từ độ lệch chuẩn so sánh mỗi chu trình riêng rẽ, từ cùng kỹ thuật viên, với cùng thiết bị và phương pháp theo công thức:

$$\sigma_{Total} = \sqrt{\left[ \frac{\sigma_{intra}^2}{n} + \sigma_{inter}^2 \right]}, \text{ trong đó } \sigma_{Total} \text{ là độ lệch chuẩn của toàn bộ}$$

tập hợp các thử nghiệm,  $\sigma_{intra}$  là độ lệch chuẩn của một thử nghiệm riêng rẽ,  $\sigma_{inter}$  là độ lệch chuẩn giữa nhiều thử nghiệm, và  $n$  là số lượng bản sao.

So sánh độ lệch chuẩn đạt được từ sự phân tích phương sai (ANOVA một chiều) sử dụng kiểm định F (giá trị  $p \leq 0,05$ ) giữa phương sai của trung bình nhóm và trung bình của các phương sai trong nhóm.

#### Độ chính xác

Độ chính xác là độ gần của sự phù hợp mà có thể được tìm thấy giữa các kết quả thử nghiệm và giá trị tham chiếu đã được chấp nhận của sản phẩm đang được xác định. Độ chính xác do đó được đánh giá từ phép xác định độ thu hồi được biểu thị dưới dạng phân vị phần trăm. Độ thu hồi theo khía cạnh này biểu thị tỷ lệ của lượng có mặt trong chất phân tích hỗn hợp, mà được chiết và có sẵn cho phép xác định. Độ lệch là sự khác nhau giữa các kết quả thử nghiệm và giá trị tham chiếu đã được chấp nhận (nồng độ thêm chuẩn của chất phân tích). Tiến hành tính toán theo công thức:

$$\text{Độ thu hồi (\%)} = \frac{(X_c - X_b)}{X_{TH}} \times 100; \text{ trong đó } X_c \text{ là nồng độ được xác định trong}$$

mẫu đã được thêm chuẩn;  $X_b$  là nồng độ được xác định trong mẫu chưa được thêm chuẩn (mẫu trống);  $X_{TH}$  là nồng độ lý thuyết.

Nguyên liệu thức ăn được sử dụng cho thử nghiệm xác nhận tính hợp lệ

Các thử nghiệm được tiến hành ở trung tâm Center for Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutrition ở ALLTECH, Inc., KY, USA đối với chế phẩm thức ăn cho bầy bò sữa, chế phẩm thức ăn cho gà và chế phẩm thức ăn cho lợn được trộn với các mức bao hàm khác nhau của sản phẩm MYCOSORB. Mô tả đầy đủ về chế phẩm thức ăn được đưa ra dưới đây.

Nguyên liệu thức ăn cho bầy bò sữa

Nguyên liệu thức ăn này được phối trộn bởi Coralys Vern (Vern sur Seiche, France, Ref. #111605) dưới tên chế phẩm “Spirit Lait 2L5” (Bảng 4). Kích thước mẫu tổng cộng là 15 kg nguyên liệu thức ăn đã được làm đồng nhất một cách cẩn thận trước khi được gửi đến phòng thí nghiệm. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 2 – 8°C trong toàn bộ thời gian nghiên cứu. Nguyên liệu thức

ăn cho bầy bò sữa được cung cấp dưới dạng được vê viên. Không cần nghiền mẫu thức ăn trước khi tiến hành quy trình chiết.

Bảng 4. Chế phẩm thức ăn cho bầy bò sữa được sử dụng để xác nhận tính hợp lệ của phương pháp.

| Các thành phần                                           | Tỷ lệ      |
|----------------------------------------------------------|------------|
| Lúa mì chuẩn, %                                          | 20,00      |
| Lúa mạch, %                                              | 6,00       |
| Cọ dầu (bánh dùng cho thử nghiệm), %                     | 12,00      |
| Cây cải dầu (đã được loại dầu), %                        | 8,10       |
| Bánh dầu đậu tương 48/Brazil, %                          | 4,20       |
| Lúa mỳ, cám mịn, %                                       | 24,94      |
| Lúa mỳ amyplus (tiểu hắc mạch), %                        | 20,00      |
| Rỉ đường, %                                              | 1,00       |
| Vinasse (chất chiết từ quá trình lên men), %             | 1,50       |
| Bột Canxi Cacbonat, %                                    | 1,06       |
| Muối tinh, %                                             | 0,50       |
| EMROD, %                                                 | 0,20       |
| Super 26 Eco aa, % (tiền hỗn hợp vitamin và khoáng chất) | 0,50       |
| <b>Tổng cộng, %</b>                                      | <b>100</b> |
| <b>Chất dinh dưỡng</b>                                   |            |
| Chất khô, %                                              | 88,324     |
| Protein thô, %                                           | 17,002     |
| Chất béo, %                                              | 3,144      |
| Xenluloza, %                                             | 8,378      |
| Tro, %                                                   | 6,723      |
| Tinh bột, %                                              | 24,955     |
| Đường tổng cộng, %                                       | 4,420      |
| Tinh bột và đường, %                                     | 29,376     |
| Hydrat cacbon của động vật nhai lại, g/kg                | 352,926    |
| PDIN*, g/kg                                              | 117,260    |
| PDIE*, g/kg                                              | 103,028    |
| PDIA*, g/kg                                              | 49,723     |
| Nitơ của động vật nhai lại, g/kg                         | 124,906    |
| Lysin tiêu hóa được trong dạ cỏ, g/kg                    | 6,794      |
| Methionin tiêu hóa được trong dạ cỏ, g/kg                | 1,873      |
| Canxi, %                                                 | 0,800      |
| Phospho tổng, %                                          | 0,659      |
| Natri, %                                                 | 0,500      |
| Magie, %                                                 | 0,236      |
| Phospho tiêu hóa được trong dạ cỏ, %                     | 0,466      |
| Giá trị cấu trúc, %                                      | 0,220      |
| Bánh làm bằng bột mì, %                                  | 20,000     |

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| Bánh làm bằng bột mì tiểu hắc mạch, % | 20,000 |
| Bánh ngũ cốc, %                       | 26,000 |
| Kết quả tổng cộng, cám lúa mì, %      | 44,940 |
| Bánh cây cải dầu, %                   | 8,100  |
| MP Hạt tổng +, độ bền hạt %           | 20,000 |
| Vitamin A, UI/kg                      | 4000   |
| Vitamin D3, UI/kg                     | 2000   |

\* Dùng để xác định giá trị protein của thức ăn và nhu cầu protein của động vật, cả hai đều được biểu thị dưới dạng Protein thực thực sự được tiêu hóa trong ruột non (“PDI”). Hàm lượng PDI của thức ăn là tổng của (i) phân đoạn PDIA, protein thô chưa bị phân hủy trong dạ cỏ, nhưng thực sự được tiêu hóa trong ruột non; (ii) phân đoạn PDIM, protein thực của vi khuẩn thực sự được tiêu hóa trong ruột non. Mỗi thức ăn góp phần vào sự tổng hợp protein của vi khuẩn cả bởi N phân rã được (PDIMN) và năng lượng sẵn có mà nó cung cấp cho vi sinh vật của dạ cỏ (PDIME). Giá trị của mỗi thức ăn được đưa ra trực tiếp bằng tổng của PDIA và PDIM tính đến hai phương trình sau: (1) PDIN = PDIA + PDIMN và (2) PDIE = PDIA + PDIME.

#### Nguyên liệu thức ăn cho gà

Nguyên liệu thức ăn được phối trộn ở Coldstream University of Kentucky, bởi nhóm nghiên cứu Alliance giữa trường đại học University of Kentucky và ALLTECH, Inc., KY, USA (Bảng 5). Chế phẩm được tạo ra theo các hợp phần được tìm thấy trong lĩnh vực và có thể được khái quát hóa thành các chế phẩm thường được tìm thấy ở Liên minh châu Âu, Bắc Mỹ, châu Mỹ La tinh, v.v.. Kích thước mẫu là tổng cộng 15 kg nguyên liệu thức ăn đã được làm đồng nhất một cách cẩn thận trước khi được gửi đến phòng thí nghiệm. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 2 – 8°C trong toàn bộ thời gian nghiên cứu.

Bảng 5. Chế phẩm thức ăn cho gà được sử dụng để xác nhận tính hợp lệ của phương pháp.

| Các thành phần              | Công thức cho nhà chăn nuôi, 22-42 ngày |
|-----------------------------|-----------------------------------------|
|                             | Ngô-đậu tương cơ bản                    |
| Ngô                         | 62,15                                   |
| Bột xay thô đậu tương (48%) | 31,31                                   |
| Dầu ngô                     | 3,10                                    |
| Đá vôi                      | 1,37                                    |
| Đicacxi phosphat            | 1,30                                    |
| Muối                        | 0,45                                    |
| Vitamin-khoáng chất MIX a   | 0,25                                    |
| DL-Methionin                | 0,07                                    |
| L-lysin                     | -                                       |
| Tổng cộng                   | 100                                     |
| Chất dinh dưỡng             |                                         |
| ME, kcal/kg                 | 3120                                    |
| Protein thô, %              | 20                                      |
| Canxi, %                    | 0,90                                    |
| Phospho sẵn có, %           | 0,35                                    |
| Lysin, %                    | 1,11                                    |
| Methionin, %                | 0,39                                    |
| Methionin + Xystein, %      | 0,72                                    |
| Na, %                       | 0,20                                    |

<sup>a</sup> Vitamin được cung cấp cho mỗi kg thức ăn: 2200 IU vitamin A; 720 ICU vitamin D3; 27 IU vitamin E; 0,91 mg vitamin K3 (2-metyl-1,4-naphthoquinon); 2 mg thiamin; 8 mg riboflavin; 55 mg niacin; 18 mg Ca pantothenat; 5 mg vitamin B6 (pyridoxin); 0,221 mg biotin; 1 mg axit folic; 478 mg cholin; 28 µg vitamin B12 (xanocobalamin).

#### Nguyên liệu thức ăn cho lợn

Nguyên liệu thức ăn được phối trộn ở Coldstream University of Kentucky, bởi nhóm nghiên cứu Alliance giữa trường đại học University of Kentucky và ALLTECH, Inc., KY, USA (Bảng 6). Chế phẩm được tạo ra theo các hợp phần được tìm thấy trong lĩnh vực và có thể được khái quát hóa thành các chế phẩm thường được tìm thấy ở Liên minh châu Âu, Bắc Mỹ, châu Mỹ La tinh, v.v.. Kích thước mẫu là tổng cộng 15 kg nguyên liệu thức ăn đã được

làm đồng nhất một cách cẩn thận trước khi được gửi đến phòng thí nghiệm.  
Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 2 – 8°C trong toàn bộ thời gian nghiên cứu.

Bảng 6. Chế phẩm thức ăn cho lợn được sử dụng để xác nhận tính hợp lệ của phương pháp.

| Các thành phần                                  | Công thức đối với lợn<br>cái con và lợn cái trưởng<br>thành đang mang thai |      |       |
|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|------|-------|
|                                                 | Ngô-đậu tương cơ bản                                                       |      |       |
| Ngô (được nghiền, màu vàng)                     | 81,540                                                                     |      |       |
| Bột xay thô của đậu tương đã được bỏ vỏ (47,5%) | 12,310                                                                     |      |       |
| Dầu ngô                                         | 2,000                                                                      |      |       |
| Đá vôi (được nghiền)                            | 0,690                                                                      |      |       |
| Đicanxi phosphat                                | 2,630                                                                      |      |       |
| Muối                                            | 0,500                                                                      |      |       |
| Vitamin hỗn hợp (BASF) *                        | 0,050                                                                      |      |       |
| Hỗn hợp khoáng vết (Prince) **                  | 0,080                                                                      |      |       |
| Cholin clorua (60%)                             | 0,150                                                                      |      |       |
| Chromax                                         | 0,050                                                                      |      |       |
| Tổng cộng                                       | 100                                                                        |      |       |
| Chất dinh dưỡng                                 |                                                                            |      |       |
| ME, kcal/kg                                     | 3258                                                                       |      |       |
| CP, %                                           | 12,4                                                                       |      |       |
| Ca, %                                           | 0,54                                                                       |      |       |
| P sẵn có, %                                     | 0,60                                                                       |      |       |
| Lysin, %                                        | 0,54                                                                       |      |       |
| * Hợp phần Vitamin hỗn hợp:                     |                                                                            |      |       |
|                                                 | BASF PREMIX (Nồng<br>độ/kg thức ăn trộn lẫn)                               |      |       |
|                                                 | Nồng độ/kg thức ăn trộn<br>lẫn                                             |      |       |
| Vitamin A, IU                                   | 5500                                                                       |      |       |
| Vitamin D, IU                                   | 550                                                                        |      |       |
| Vitamin E, IU                                   | 33                                                                         |      |       |
| Vitamin K, mg                                   | 1,1                                                                        |      |       |
| Vitamin B12, µg                                 | 15,125                                                                     |      |       |
| Niabin, mg                                      | 15,125                                                                     |      |       |
| Axit pantothenic, mg                            | 13,75                                                                      |      |       |
| Riboflavin, mg                                  | 4,125                                                                      |      |       |
| Biotin, mg                                      | 0,17875                                                                    |      |       |
| Axit folic, mg                                  | 0,825                                                                      |      |       |
| Pyridoxin, mg                                   | 2,475                                                                      |      |       |
| Thiamin, mg                                     | 0,825                                                                      |      |       |
| Chất khoáng                                     | %                                                                          | phần | Nguồn |

|        |        | triệu<br>được<br>cung cấp<br>(1,5<br>#hỗn hợp<br>trộn<br>sẵn/tấn) |         |
|--------|--------|-------------------------------------------------------------------|---------|
| Sắt    | 13,33  | 100                                                               | Sulfat  |
| Kẽm    | 16,67  | 125                                                               | Oxit    |
| Mangan | 6,672  | 50                                                                | Oxit    |
| Đồng   | 2,000  | 15                                                                | Sulfat  |
| Iốt    | 0,1709 | 1,28                                                              | EDDI    |
| Selen  | 0,0402 | 0,30                                                              | selenit |
| Canxi  | 4,815  | 36                                                                | -       |

Xác nhận sử dụng nguyên liệu thức ăn cho bầy bò sữa

Các thử nghiệm được tiến hành ở Center for Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutrition ở ALLTECH, Inc., KY, USA đối với loại chế phẩm thức ăn cho bầy bò sữa rắn của châu Âu được trộn với năm nồng độ khác nhau của sản phẩm MYCOSORB.

Các nguyên liệu thức ăn cho bầy bò sữa đã được trộn riêng rẽ với 0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 kg/T sản phẩm MYCOSORB được phân tích cũng như mẫu của cùng nguyên liệu thức ăn cho bầy bò sữa được trộn với mức chưa biết của sản phẩm MYCOSORB khi được phân bố trên cùng đĩa vi chuẩn độ.

Khả năng áp dụng

Việc xác nhận tính hợp lệ được tiến hành để xác định đặc điểm của thử nghiệm ELISA được phát triển để phân tích đặc hiệu sản phẩm MYCOSORB và các sản phẩm thay thế, như quy trình điểm cuối truy tìm nguồn gốc cho mục đích theo dõi sản phẩm trong phức hợp thức ăn.

Sáu mức sản phẩm MYCOSORB được sử dụng để xác nhận tính hợp lệ tương ứng với khoảng làm việc của mức bao hàm (0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 kg/T) được trộn với mẫu thức ăn.

Dung dịch kháng thể đa dòng ở thô đã được pha loãng: dung dịch kháng thể sơ cấp được làm thích ứng theo các mức nền. Kháng thể được pha loãng như vậy đến 1:2500 trong PBS bằng cách bổ sung 1  $\mu$ l dung dịch kháng thể #1 vào 1,2 ml PBS, 1X. Thể tích dung dịch bằng 10 ml cần cho mỗi đĩa vi chuẩn độ.

Kháng thể dê kháng thô đã được pha loãng: dung dịch kháng thể thứ cấp được làm thích ứng theo các mức nền. Kháng thể được pha loãng như vậy đến 1:20.000 trong PBS bằng cách bổ sung 1  $\mu$ l dung dịch kháng thể #2 vào 20,0 ml PBS, 1X.

#### Độ đồng nhất

Việc kiểm tra độ đồng nhất của mẫu đạt được đối với mức bao hàm trung bình của sản phẩm MYCOSORB (4,0 kg/T) trong kế hoạch thử nghiệm. Thử nghiệm đối với mức cụ thể này được lặp lại 5 lần trên 10 mẫu riêng rẽ, mỗi lần sử dụng 4 bản sao.

Theo các giá trị đã được tính toán được tìm thấy chi tiết trong Bảng 7,  $CV_H$  là 4,53%.

Bảng 7. Đánh giá độ đồng nhất trên một nồng độ bằng 4,0 kg/T sản phẩm MYCOSORB được trộn với loại thức ăn của châu Âu cho bầy bò sữa được đánh giá thông qua quy trình ELISA cho 5 chu trình trên 10 chế phẩm mẫu riêng rẽ được phân tích trong 4 bản sao.

| Chu trình #                     | 4             | 5             | 8             | 9             | 11            | Trung bình    |
|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| $n$                             | $4 \times 10$ | $4 \times 10$ | $4 \times 10$ | $4 \times 10$ | $4 \times 10$ | $4 \times 10$ |
| OD <sub>450 nm</sub> trung bình | 1,155         | 1,055         | 0,833         | 1,166         | 1,044         | 1,051         |
| $\sigma_h$                      | 0,118         | 0,080         | 0,077         | 0,083         | 0,100         | -             |
| % $CV_h$                        | 10,21         | 7,58          | 9,27          | 7,09          | 9,59          | -             |
| Độ đồng nhất, % $CV_H$          | 8,75          |               |               |               |               |               |

#### Dụng đường chuẩn

Việc dựng đường chuẩn của thử nghiệm được tiến hành trên thức ăn được trộn với nồng độ mẫu chuẩn đã biết như được nêu trong bản mô tả này và trong khoảng từ 0,0 đến 6,0 kg/T sản phẩm MYCOSORB. Sự phù hợp đường

cong tuyến tính,  $y = Ax$ , được dùng để xác định mối quan hệ giữa nồng độ và đáp ứng (OD<sub>450</sub>). Đường cong chuẩn trung bình từ 5 chu trình được thể hiện trên Fig. 4.

#### Độ tuyến tính

Độ tuyến tính của đường cong chuẩn được đánh giá từ việc tính toán hệ số hồi quy theo phương trình của mức bao hàm đã được vẽ đồ thị so với độ hấp thụ ở OD<sub>450</sub> sử dụng phép chặn đường phù hợp nhất ở zero,  $\Delta \text{OD}_{450} = Ax(\text{MYCOSORB})$  sau khi trừ mẫu trống, độ tuyến tính của đường cong chuẩn được xác nhận với giá trị hệ số tương quan được tìm thấy ở trên  $r^2 > 0,95$ , Bảng 8.

Bảng 8. Độ tuyến tính của đường cong chuẩn.

| Chu trình #                               | 4       | 5       | 8       | 9       | 11     | Trung bình từ đường cong đã được tính trung bình |
|-------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|--------|--------------------------------------------------|
| Ngày tháng                                | 6/10/09 | 6/17/09 | 6/30/09 | 7/14/09 | 8/5/09 | 1/6 khoảng loại bỏ                               |
| $n$                                       | 50      | 50      | 50      | 50      | 50     | -                                                |
| Độ dốc ( $A$ )                            | 0,2702  | 0,2249  | 0,2161  | 0,2179  | 0,2444 | 0,2347                                           |
| Sai số bình phương trung bình ( $MSE$ ) * | 0,0037  | 0,0005  | 0,0034  | 0,0008  | 0,0009 | -                                                |
| Độ tuyến tính ( $r^2$ )                   | 0,969   | 0,974   | 0,970   | 0,949   | 0,978  | 0,979                                            |

\* Sai số bình phương trung bình được xác định trong mô hình hồi quy tuyến tính là:  $MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i^2$ , trong đó  $e_i = y_i - \hat{y}_i$ ;  $y_i$  là giá trị  $y$  được xác định bằng thực nghiệm;  $\hat{y}_i$  là giá trị lý thuyết đối với nồng độ  $x_i$  được mong đợi của sản phẩm MYCOSORB.

#### Độ lặp lại

Độ lặp lại là số đo phương sai trong bởi đánh giá độ lệch chuẩn lặp lại. Việc đánh giá độ lặp lại đối với việc lặp lại chu trình thu được từ cùng mẫu vào cùng ngày đối với cùng chu trình, từ cùng kỹ thuật viên, với cùng thiết bị và

phương pháp để biểu thị biến đổi của sự phát hiện trong chu trình,  $CV_{intra}$  (Bảng 9). Việc đánh giá độ lặp lại giữa các chu trình khác nhau thu được từ cùng mẫu ở các ngày khác nhau trong các chu trình khác nhau, từ cùng kỹ thuật viên, với cùng thiết bị và phương pháp để biểu thị biến đổi của sự phát hiện giữa các chu trình,  $CV_{Inter}$  Bảng 10).

Các kết quả cho thấy rằng đường cong chuẩn thu được vào cùng ngày và vào các ngày khác nhau có ít sự biến đổi, với độ chụm trong ngày trung bình bằng 5,70% và độ chụm giữa ngày bằng 7,86% khi được áp dụng cho khoảng làm việc của đường cong chuẩn từ 0,0 đến 6,0 kg/T. Độ chụm tổng thể là 8,28% (Bảng 11).

Bảng 9. Độ chụm trong điều kiện lặp lại trong chu trình để xây dựng đường cong chuẩn.

| Nồng độ (kg/T)                                     |                  | 0,0   | 0,5   | 1,0   | 4,0   | 5,0   | 6,0   |
|----------------------------------------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ngày 1<br>Chu trình<br>#4                          | OD               | 1,022 | 1,221 | 1,425 | 2,284 | 2,292 | 2,564 |
|                                                    | 450 nm           | 0,033 | 0,056 | 0,117 | 0,071 | 0,062 | 0,132 |
|                                                    | $\sigma_{intra}$ | 3,26  | 4,60  | 8,20  | 3,11  | 2,69  | 5,14  |
|                                                    | % CV             |       |       |       |       |       |       |
| Ngày 2<br>Chu trình<br>#5                          | OD               | 1,024 | 1,238 | 1,335 | 2,039 | 2,076 | 2,335 |
|                                                    | 450 nm           | 0,031 | 0,073 | 0,030 | 0,215 | 0,077 | 0,153 |
|                                                    | $\sigma_{intra}$ | 3,03  | 5,91  | 2,21  | 10,54 | 3,72  | 6,55  |
|                                                    | % CV             |       |       |       |       |       |       |
| Ngày 3<br>Chu trình<br>#8                          | OD               | 0,871 | 1,066 | 1,231 | 1,807 | 1,953 | 2,088 |
|                                                    | 450 nm           | 0,044 | 0,053 | 0,051 | 0,136 | 0,192 | 0,127 |
|                                                    | $\sigma_{intra}$ | 5,06  | 4,96  | 4,17  | 7,53  | 9,82  | 6,08  |
|                                                    | % CV             |       |       |       |       |       |       |
| Ngày 4<br>Chu trình<br>#9                          | OD               | 1,049 | 1,218 | 1,468 | 2,026 | 2,138 | 2,247 |
|                                                    | 450 nm           | 0,041 | 0,059 | 0,035 | 0,266 | 0,095 | 0,141 |
|                                                    | $\sigma_{intra}$ | 3,93  | 4,86  | 2,39  | 13,12 | 4,44  | 6,26  |
|                                                    | % CV             |       |       |       |       |       |       |
| Ngày 5<br>Chu trình<br>#11                         | OD               | 0,915 | 1,053 | 1,284 | 1,787 | 2,251 | 2,336 |
|                                                    | 450 nm           | 0,044 | 0,067 | 0,049 | 0,095 | 0,247 | 0,189 |
|                                                    | $\sigma_{intra}$ | 4,79  | 6,34  | 3,85  | 5,30  | 10,98 | 8,09  |
|                                                    | % CV             |       |       |       |       |       |       |
| % CV <sub>intra</sub><br>(độ chụm trong chu trình) |                  | 4,01  | 5,33  | 4,16  | 7,92  | 6,33  | 6,42  |
| Độ chụm trung bình,<br>% CV <sub>intra</sub>       |                  | 5,70  |       |       |       |       |       |

Bảng 10. Độ chụm trong điều kiện lặp lại giữa chu trình để xây dựng đường cong chuẩn.

| Nồng độ (kg/T)                                                           | 0,0   | 0,5   | 1,0   | 4,0   | 5,0   | 6,0   |
|--------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| OD 450 nm                                                                | 0,976 | 1,159 | 1,348 | 1,988 | 2,142 | 2,314 |
| $\sigma_{Inter}$                                                         | 0,078 | 0,091 | 0,098 | 0,203 | 0,136 | 0,172 |
| % CV <sub>Inter</sub>                                                    | 8,01  | 7,88  | 7,27  | 10,22 | 6,36  | 7,45  |
| Độ chụm trung bình,<br>% CV <sub>Inter</sub><br>(độ chụm giữa chu trình) | 7,86  |       |       |       |       |       |

Bảng 11. Độ chụm tổng thể để xây dựng đường cong chuẩn.

| Nồng độ (kg/T)                   | 0,0   | 0,5   | 1,0   | 4,0   | 5,0   | 6,0   |
|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $n$                              | 30    | 30    | 30    | 30    | 30    | 30    |
| $\sigma_{intra}$                 | 0,039 | 0,062 | 0,056 | 0,157 | 0,135 | 0,148 |
| $\sigma_{Inter}$                 | 0,078 | 0,091 | 0,098 | 0,203 | 0,136 | 0,172 |
| $\sigma_{tổng}$                  | 0,080 | 0,095 | 0,101 | 0,215 | 0,149 | 0,185 |
| Độ chụm, % $CV_{tổng}$           | 8,20  | 8,23  | 7,50  | 10,81 | 6,95  | 7,98  |
| Độ chụm tổng cộng, % $CV_{tổng}$ | 8,28  |       |       |       |       |       |

$L_D$  và  $L_Q$  (độ nhạy)

Các giá trị  $L_D$  và  $L_Q$  được báo cáo trong Bảng 12. Các giá trị  $L_Q$  được tìm thấy là thấp hơn tỷ lệ bao hàm tối thiểu theo khuyến cáo bằng 2 kg/T của sản phẩm MYCOSORB, làm cho có thể định lượng nó trong nguyên liệu thức ăn.

Giới hạn phát hiện  $L_D = 0,501 \pm 0,103$  kg/T

Giới hạn định lượng  $L_Q = 1,800 \pm 0,389$  kg/T

Bảng 12. Xác định  $L_D$  và  $L_Q$ .

| Chu trình # | n  | Mẫu trống OD <sub>450</sub>               |                       | $3\sigma$<br>( $\Delta$ OD <sub>450</sub> ) | $10\sigma$<br>( $\Delta$ OD <sub>450</sub> ) | $L_D$ (kg/T)      | $L_Q$ (kg/T)      |
|-------------|----|-------------------------------------------|-----------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------|-------------------|
|             |    | $\bar{x}_{b\ inter} - \bar{x}_{b\ intra}$ | $\sigma_{mẫu\ trống}$ |                                             |                                              |                   |                   |
| Ngày 1      | 10 | 0,046                                     | 0,033                 | 0,100                                       | 0,334                                        | 0,370             | 1,323             |
| Ngày 2      | 10 | 0,048                                     | 0,031                 | 0,093                                       | 0,311                                        | 0,415             | 1,488             |
| Ngày 3      | 10 | -0,105                                    | 0,044                 | 0,132                                       | 0,441                                        | 0,612             | 2,233             |
| Ngày 4      | 10 | 0,072                                     | 0,041                 | 0,124                                       | 0,412                                        | 0,568             | 2,100             |
| Ngày 5      | 10 | 0,915                                     | 0,044                 | 0,132                                       | 0,438                                        | 0,538             | 1,858             |
| Trung bình  |    |                                           |                       | 0,116 $\pm$ 0,018                           | 0,387 $\pm$ 0,061                            | 0,501 $\pm$ 0,103 | 1,800 $\pm$ 0,389 |

Độ chính xác

Độ chính xác được xác định từ 5 thử nghiệm độc lập, mỗi thử nghiệm gồm 10 mẫu độc lập và mỗi chu trình trong 4 bản sao đối với nồng độ 4,0-kg/T của sản phẩm MYCOSORB đã được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn. Nồng độ

cuối cùng đối với mỗi mẫu được tính toán theo phương trình đã được biểu thị trước đây bằng cách sử dụng các giá trị quan sát thu được để tính toán độ đồng nhất (Bảng 13). Sau đó, độ chụm trung bình được tính toán từ độ chính xác đã được tính trung bình thu được đối với tất cả các chu trình và được so sánh với lượng nồng độ thêm chuẩn của 4,0-kg/T sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn. Các tính toán được tiến hành theo các phương trình đã được đưa ra trước đây.

Các kết quả cho thấy rằng việc đánh giá độ thu hồi lý giải cho sự ước tính quá cao bằng 21% của hàm lượng thực của nguyên liệu thức ăn trong nồng độ thêm chuẩn của sản phẩm MYCOSORB (Bảng 14).

Bảng 13. Độ chính xác và độ chụm được xác định từ 5 thử nghiệm độc lập, mỗi thử nghiệm gồm 10 mẫu độc lập và mỗi chu trình trong 4 bản sao đối với nồng độ 4,0-kg/T của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn.

| Chu trình #                                     | $x_{TH}$ , thêm chuẩn (kg/T) | Bản sao #, $x_c$ (OD <sub>450</sub> ) |     |     |     |     |     |     |     |     |     | $\bar{x}_c$ | % CV |
|-------------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|------|
|                                                 |                              | 1                                     | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  |             |      |
| Ngày 1                                          | 4,0                          | 5,0                                   | 4,0 | 5,1 | 3,8 | 4,3 | 4,3 | 3,9 | 4,4 | 3,9 | 4,1 | 4,3         | 9,69 |
| Ngày 2                                          | 4,0                          | 4,2                                   | 5,0 | 5,1 | 4,7 | 4,6 | 4,6 | 4,5 | 4,2 | 4,8 | 5,2 | 4,7         | 7,19 |
| Ngày 3                                          | 4,0                          | 3,6                                   | 3,6 | 4,1 | 4,4 | 3,8 | 3,9 | 3,7 | 3,9 | 3,3 | 4,3 | 3,9         | 8,79 |
| Ngày 4                                          | 4,0                          | 5,4                                   | 5,0 | 5,0 | 4,9 | 5,2 | 5,6 | 5,1 | 5,5 | 5,7 | 6,1 | 5,4         | 6,73 |
| Ngày 5                                          | 4,0                          | 4,4                                   | 4,5 | 3,7 | 4,4 | 4,2 | 4,4 | 3,5 | 4,4 | 4,3 | 4,9 | 4,3         | 9,10 |
| % CV <sub>intra</sub> (độ chụm trong chu trình) |                              |                                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             | 8,30 |

Bảng 14. Độ thu hồi tổng thể được xác định từ trung bình của 5 thử nghiệm độc lập, mỗi thử nghiệm gồm 10 mẫu độc lập và mỗi chu trình trong 4 bản sao đối với nồng độ 4,0-kg/T của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn.

| $x_{TH}$ , thêm chuẩn (kg/T)              | Trung bình $\bar{x}_c$ | $\sigma_c$ |
|-------------------------------------------|------------------------|------------|
| 4,0                                       | 4,5                    | 0,6        |
| % $CV_{Inter}$ (độ chụm giữa chu trình)   |                        | 12,62      |
| Độ thu hồi tổng thể (% nồng độ lý thuyết) |                        | 112,21     |

Xác nhận tính hợp lệ bằng cách sử dụng nguyên liệu thức ăn cho gà

Các thử nghiệm được tiến hành ở Center for Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutrition ở ALLTECH, Inc., KY, USA đối với chế phẩm thức ăn rắn cho gà được trộn với năm nồng độ khác nhau của sản phẩm MYCOSORB.

Các nguyên liệu thức ăn cho gà được trộn riêng rẽ với 0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 kg/T sản phẩm MYCOSORB được phân tích cũng như mẫu của cùng nguyên liệu thức ăn cho gà được trộn với mức chưa biết của sản phẩm MYCOSORB khi được phân bố trên cùng đĩa vi chuẩn độ.

Khả năng áp dụng

Việc xác nhận tính hợp lệ được tiến hành để xác định đặc điểm của thử nghiệm ELISA được phát triển cho phân tích sản phẩm MYCOSORB và các sản phẩm thay thế, như quy trình điểm cuối truy tìm nguồn gốc cho mục đích theo dõi sản phẩm đã được đề cập trước đây trong phức hợp thức ăn.

Sáu mức sản phẩm MYCOSORB (Ref. #285965) được sử dụng để xác nhận tính hợp lệ tương ứng với khoảng làm việc của mức bao hàm (0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 kg/T) được trộn lẫn với mẫu thức ăn.

Dung dịch kháng thể đa dòng ở thỏ đã được pha loãng: dung dịch kháng thể sơ cấp được làm thích ứng theo các mức nền. Kháng thể được pha loãng như vậy đến 1:7500 trong PBS bằng cách bổ sung 1  $\mu$ l dung dịch kháng thể #1

(4,15) vào 7,5 ml PBS, 1X. Thể tích dung dịch bằng 10 ml cần cho mỗi đĩa vi chuẩn độ.

Kháng thể dê kháng thổ đã được pha loãng: dung dịch kháng thể thứ cấp được làm thích ứng theo các mức nền. Kháng thể được pha loãng như vậy đến 1:30.000 trong PBS bằng cách bổ sung 1  $\mu$ l dung dịch kháng thể #2 vào 30,0 ml PBS, 1X.

#### Độ đồng nhất

Việc kiểm tra độ đồng nhất của mẫu đạt được đối với mức bao hàm trung bình của sản phẩm MYCOSORB (4,0 kg/T) trong kế hoạch thử nghiệm. Thử nghiệm đối với mức cụ thể này được lặp lại 5 lần trên 10 mẫu riêng rẽ, mỗi lần sử dụng 4 bản sao (Bảng 15).

Bảng 15. Đánh giá độ đồng nhất trên một nồng độ bằng 4,0 kg/T của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn cho gà được đánh giá thông qua quy trình ELISA cho 5 chu trình trên 10 chế phẩm mẫu riêng rẽ được phân tích trong 4 bản sao.

| Chu trình #                     | 2             | 3             | 4             | 5             | 6             | Trung bình    |
|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| $n$                             | $4 \times 10$ | $4 \times 10$ | $4 \times 10$ | $4 \times 10$ | $4 \times 10$ | $4 \times 10$ |
| OD <sub>450 nm</sub> trung bình | 1,419         | 0,908         | 0,777         | 0,991         | 1,290         | 1,034         |
| $\sigma_h$                      | 0,048         | 0,060         | 0,081         | 0,060         | 0,069         | -             |
| % CV <sub>h</sub>               | 3,08          | 6,11          | 10,38         | 5,65          | 6,39          | -             |
| Độ đồng nhất, % CV <sub>H</sub> | 6,32          |               |               |               |               |               |

#### Dựng đường chuẩn

Việc dựng đường chuẩn của thử nghiệm được tiến hành trên thức ăn được trộn với nồng độ mẫu chuẩn chưa biết và trong khoảng từ 0,0 đến 6,0 kg/T sản phẩm MYCOSORB. Sự phù hợp đường cong tuyến tính,  $y = Ax$ , được dùng để xác định mối quan hệ giữa nồng độ và đáp ứng (OD<sub>450</sub>), đường cong chuẩn trung bình từ 5 chu trình được trình bày trên Fig. 5.

### Độ tuyến tính

Độ tuyến tính của đường cong chuẩn được đánh giá từ việc tính toán hệ số hồi quy theo phương trình của mức bao hàm đã được vẽ đồ thị so với độ hấp thụ ở OD<sub>450</sub> bằng cách sử dụng phép chặn đường phù hợp nhất ở zero,  $\Delta \text{OD}_{450} = Ax$  (MYCOSORB) sau khi trừ mẫu trống, độ tuyến tính của đường cong chuẩn được xác nhận với giá trị hệ số tương quan được tìm thấy ở trên  $r^2 > 0,95$ . Hệ số hồi quy được tính toán đối với mỗi đường cong chu trình chuẩn và đối với đường cong chu trình chuẩn đã được tính trung bình được báo cáo trong Bảng 16.

Bảng 16. Độ tuyến tính của đường cong chuẩn trong nguyên liệu thức ăn cho gà.

| Chu trình #                                    | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       | Trung bình từ đường cong đã được tính trung bình |
|------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|--------------------------------------------------|
| Ngày tháng                                     | 4/21/09 | 4/22/09 | 4/23/09 | 4/24/09 | 4/28/09 | 1/6<br>Khoảng loại bỏ                            |
| <i>n</i>                                       | 50      | 50      | 50      | 50      | 50      | -                                                |
| Độ dốc ( <i>A</i> )                            | 0,2954  | 0,1904  | 0,1555  | 0,2282  | 0,2302  | 0,2199                                           |
| Sai số bình phương trung bình ( <i>MSE</i> ) * | 0,0123  | 0,0018  | 0,0118  | 0,0003  | 0,0006  | -                                                |
| Độ tuyến tính ( $r^2$ )                        | 0,995   | 0,999   | 0,991   | 0,992   | 0,992   | 0,997                                            |

\* Sai số bình phương trung bình được xác định trong mô hình hồi quy

tuyến tính là:  $MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i^2$ , trong đó  $e_i^2 = y_i - \hat{y}_i$ ;  $y_i$  là giá trị  $y$  được xác định bằng thực nghiệm;  $\hat{y}_i$  là giá trị lý thuyết đối với nồng độ  $x_i$  được mong đợi của sản phẩm MYCOSORB.

### Độ lặp lại

Độ lặp lại là số đo phương sai trong bởi đánh giá độ lệch chuẩn lặp lại. Việc đánh giá độ lặp lại đối với việc lặp lại chu trình thu được từ cùng mẫu vào cùng ngày đối với cùng chu trình, từ cùng kỹ thuật viên, với cùng thiết bị và phương pháp để biểu thị biến đổi của sự phát hiện trong chu trình,  $CV_{intra}$

(Bảng 17). Việc đánh giá độ lặp lại giữa các chu trình khác nhau thu được từ cùng mẫu ở các ngày khác nhau trong các chu trình khác nhau, từ cùng kỹ thuật viên, với cùng thiết bị và phương pháp để biểu thị biến đổi của sự phát hiện giữa các chu trình,  $CV_{Inter}$  (Bảng 18).

Các kết quả cho thấy rằng đường cong chuẩn thu được vào cùng ngày và vào các ngày khác nhau có ít sự biến đổi, với độ chụm trong ngày trung bình bằng 6,00%. Tuy nhiên, sự khác nhau giữa các mẫu là rõ rệt hơn với độ chụm giữa ngày bằng 21,52% và độ chụm tổng cộng bằng 21,75% (Bảng 19) khi được áp dụng cho khoảng làm việc của đường cong chuẩn từ 0,0 đến 6,0 kg/T.

Bảng 17. Độ chụm trong điều kiện lặp lại trong chu trình để xây dựng đường cong chuẩn.

| Nồng độ (kg/T)                                     |                      | 0,0   | 0,5   | 1,0   | 4,0   | 5,0   | 6,0   |
|----------------------------------------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ngày 1<br>Chu trình<br>#2                          | OD <sub>450 nm</sub> | 0,380 | 0,606 | 0,728 | 1,622 | 1,837 | 2,114 |
|                                                    | $\sigma_{intra}$     | 0,031 | 0,018 | 0,041 | 0,104 | 0,070 | 0,098 |
|                                                    | % CV                 | 8,17  | 3,01  | 5,59  | 6,40  | 3,82  | 4,62  |
| Ngày 2<br>Chu trình<br>#3                          | OD <sub>450 nm</sub> | 0,310 | 0,401 | 0,492 | 1,092 | 1,237 | 1,463 |
|                                                    | $\sigma_{intra}$     | 0,030 | 0,034 | 0,021 | 0,030 | 0,016 | 0,050 |
|                                                    | % CV                 | 9,55  | 8,44  | 4,30  | 2,77  | 1,32  | 3,40  |
| Ngày 3<br>Chu trình<br>#4                          | OD <sub>450 nm</sub> | 0,227 | 0,344 | 0,418 | 0,856 | 0,950 | 1,192 |
|                                                    | $\sigma_{intra}$     | 0,019 | 0,017 | 0,020 | 0,025 | 0,041 | 0,035 |
|                                                    | % CV                 | 8,14  | 5,08  | 4,86  | 2,89  | 4,31  | 2,97  |
| Ngày 4<br>Chu trình<br>#5                          | OD <sub>450 nm</sub> | 0,343 | 0,457 | 0,617 | 1,338 | 1,491 | 1,644 |
|                                                    | $\sigma_{intra}$     | 0,058 | 0,032 | 0,029 | 0,057 | 0,140 | 0,124 |
|                                                    | % CV                 | 17,01 | 6,96  | 4,70  | 4,23  | 9,42  | 7,52  |
| Ngày 5<br>Chu trình<br>#6                          | OD <sub>450 nm</sub> | 0,361 | 0,517 | 0,588 | 1,341 | 1,561 | 1,661 |
|                                                    | $\sigma_{intra}$     | 0,064 | 0,011 | 0,035 | 0,069 | 0,109 | 0,047 |
|                                                    | % CV                 | 17,61 | 2,09  | 5,99  | 5,12  | 6,99  | 2,84  |
| % CV <sub>intra</sub><br>(độ chụm trong chu trình) |                      | 12,10 | 5,12  | 5,09  | 4,28  | 5,17  | 4,27  |
| Độ chụm trung bình, %<br>CV <sub>intra</sub>       |                      | 6,00  |       |       |       |       |       |

Bảng 18. Độ chụm trong điều kiện lặp lại giữa chu trình để xây dựng đường cong chuẩn.

| Nồng độ (kg/T)                                                           | 0,0   | 0,5   | 1,0   | 4,0   | 5,0   | 6,0   |
|--------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| OD 450 nm                                                                | 0,324 | 0,465 | 0,568 | 1,250 | 1,415 | 1,615 |
| $\sigma_{Inter}$                                                         | 0,060 | 0,102 | 0,119 | 0,289 | 0,337 | 0,337 |
| % CV <sub>Inter</sub>                                                    | 18,54 | 21,88 | 20,93 | 23,14 | 23,78 | 20,86 |
| Độ chụm trung bình, %<br>CV <sub>Inter</sub><br>(độ chụm giữa chu trình) | 21,52 |       |       |       |       |       |

Bảng 19. Độ chụm tổng thể để xây dựng đường cong chuẩn.

| Nồng độ (kg/T)                            | 0,0   | 0,5   | 1,0   | 4,0   | 5,0   | 6,0   |
|-------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>n</i>                                  | 30    | 30    | 30    | 30    | 30    | 30    |
| $\sigma_{intra}$                          | 0,059 | 0,034 | 0,034 | 0,071 | 0,060 | 0,060 |
| $\sigma_{Inter}$                          | 0,060 | 0,102 | 0,119 | 0,289 | 0,337 | 0,337 |
| $\sigma_{tổng}$                           | 0,063 | 0,102 | 0,120 | 0,290 | 0,338 | 0,338 |
| Độ chụm, % CV <sub>tổng</sub>             | 19,35 | 21,99 | 21,05 | 23,22 | 23,90 | 20,96 |
| Độ chụm tổng thể,<br>% CV <sub>tổng</sub> | 21,75 |       |       |       |       |       |

L<sub>D</sub> và L<sub>Q</sub> (độ nhạy)

Các giá trị L<sub>D</sub> và L<sub>Q</sub> được báo cáo trong Bảng 20. Các giá trị L<sub>Q</sub> được tìm thấy là thấp hơn tỷ lệ bao hàm tối thiểu theo khuyến cáo của sản phẩm MYCOSORB làm cho có thể định lượng nó trong nguyên liệu thức ăn.

Giới hạn phát hiện L<sub>D</sub> = 0,547 ± 0,237 kg/T.

Giới hạn định lượng L<sub>Q</sub> = 1,864 ± 0,806 kg/T.

Bảng 20. Xác định  $L_D$  và  $L_Q$  trong nguyên liệu thức ăn cho gà.

|            | n  | OD <sub>450</sub> mẫu trống                     |                       | $L_D (\Delta OD_{450})$ | $L_Q (\Delta OD_{450})$ | $x_D$ (kg/T) | $x_Q$ (kg/T) |
|------------|----|-------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|--------------|--------------|
|            |    | $x_{b\ inter} - \overline{x}_b$<br><i>Intra</i> | $\sigma_{mẫu\ trống}$ |                         |                         |              |              |
| Ngày 1     | 10 | 0,056                                           | 0,031                 | 0,093                   | 0,311                   | 0,316        | 1,093        |
| Ngày 2     | 10 | -0,014                                          | 0,030                 | 0,089                   | 0,297                   | 0,467        | 1,552        |
| Ngày 3     | 10 | -0,097                                          | 0,019                 | 0,056                   | 0,185                   | 0,357        | 1,228        |
| Ngày 4     | 10 | 0,018                                           | 0,058                 | 0,175                   | 0,583                   | 0,767        | 2,622        |
| Ngày 5     | 10 | 0,037                                           | 0,064                 | 0,191                   | 0,636                   | 0,829        | 2,827        |
| Trung bình |    |                                                 |                       |                         | 0,121±0,059             | 0,402±0,196  | 0,547±0,237  |

## Độ chính xác

Độ chính xác được xác định từ 5 thử nghiệm độc lập, mỗi thử nghiệm gồm 10 mẫu độc lập và mỗi chu trình trong 4 bản sao đối với nồng độ 4,0-kg/T của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn. Nồng độ cuối cùng đối với mỗi mẫu được tính toán như được nêu trong bản mô tả này sử dụng các giá trị đã được quan sát thấy thu được để tính toán độ đồng nhất (Bảng 21). Sau đó, độ chụm trung bình được tính toán từ độ chính xác đã được tính trung bình thu được đối với tất cả các chu trình và được so sánh với lượng nồng độ thêm chuẩn bằng 4,0-kg/T của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn. Các tính toán được tiến hành theo các phương trình được đưa ra trong bản mô tả này.

Các kết quả cho thấy rằng độ thu hồi lý giải cho sự ước tính quá cao, bằng 18% của hàm lượng thực của nguyên liệu thức ăn trong nồng độ thêm chuẩn của sản phẩm MYCOSORB (Bảng 22).

Bảng 21. Độ chính xác và độ chụm được xác định từ 5 thử nghiệm độc lập, mỗi thử nghiệm gồm 10 mẫu độc lập và mỗi chu trình trong 4 bản sao đối với nồng độ 4,0 kg/T của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn.

| Chu trình #                                     | $x_{TH}$ , thêm chuẩn (kg/T) | Bản sao #, $x_c$ (OD <sub>450</sub> ) |     |     |     |     |     |     |     |     |     | $\bar{x}_c$ | % CV  |
|-------------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|-------|
|                                                 |                              | 1                                     | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  |             |       |
| Ngày 1                                          | 4,0                          | 4,8                                   | 5,2 | 4,8 | 4,7 | 4,8 | 4,6 | 5,0 | 4,8 | 4,7 | 4,7 | 4,8         | 2,92  |
| Ngày 2                                          | 4,0                          | 5,0                                   | 4,6 | 4,9 | 4,5 | 4,9 | 4,2 | 4,6 | 5,0 | 5,0 | 4,9 | 4,8         | 5,80  |
| Ngày 3                                          | 4,0                          | 4,9                                   | 6,2 | 4,6 | 5,5 | 4,9 | 5,0 | 4,7 | 5,0 | 5,0 | 4,3 | 5,0         | 9,84  |
| Ngày 4                                          | 4,0                          | 4,7                                   | 4,4 | 4,0 | 4,2 | 3,9 | 4,7 | 4,4 | 4,4 | 4,3 | 4,3 | 4,3         | 5,36  |
| Ngày 5                                          | 4,0                          | 4,1                                   | 4,3 | 4,8 | 4,4 | 4,8 | 4,6 | 4,8 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 4,7         | 6,060 |
| % CV <sub>intra</sub> (độ chụm trong chu trình) |                              |                                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 6,00        |       |

Bảng 22. Độ thu hồi tổng thể được xác định từ trung bình của 5 thử nghiệm độc lập, mỗi thử nghiệm gồm 10 mẫu độc lập và mỗi chu trình trong 4 bản sao đối với nồng độ 4,0 kg/T của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn.

| $x_{TH}$ , thêm chuẩn (kg/T)                   | Trung bình $\bar{x}_c$ | $\sigma_c$ |
|------------------------------------------------|------------------------|------------|
| 4,0                                            | 4,7                    | 0,2        |
| % CV <sub>Inter</sub> (độ chụm giữa chu trình) |                        | 5,07       |
| Độ thu hồi tổng thể (% nồng độ lý thuyết)      |                        | 117,95     |

Xác nhận tính hợp lệ sử dụng nguyên liệu thức ăn cho lợn

Các thử nghiệm được tiến hành ở Center for Animal Nutrigenomics and Applied Animal Nutrition of ALLTECH, Inc., KY, USA đối với chế phẩm thức ăn rắn cho lợn được trộn với năm nồng độ khác nhau của sản phẩm MYCOSORB.

Các nguyên liệu thức ăn cho lợn được trộn riêng rẽ với 0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 kg/T sản phẩm MYCOSORB được phân tích cũng như mẫu của cùng

nguyên liệu thức ăn cho lợn được trộn với mức chưa biết của sản phẩm MYCOSORB khi được phân bố trên cùng đĩa vi chuẩn độ.

#### Khả năng áp dụng

Việc xác nhận tính hợp lệ được tiến hành để xác định đặc điểm của thử nghiệm ELISA được phát triển cho phân tích sản phẩm MYCOSORB và các sản phẩm thay thế, như quy trình điểm cuối truy tìm nguồn gốc cho mục đích theo dõi sản phẩm trong phức hợp thức ăn.

Sáu mức sản phẩm MYCOSORB được sử dụng để xác nhận tính hợp lệ tương ứng với khoảng làm việc của mức bao hàm (với 0,0; 0,5; 1,0; 4,0; 5,0; 6,0 kg/T) được trộn lẫn với mẫu thức ăn.

Dung dịch kháng thể đa dòng ở thô đã được pha loãng: dung dịch kháng thể sơ cấp được làm thích ứng theo các mức nền. Kháng thể được pha loãng như vậy đến 1:3500 trong PBS bằng cách bổ sung 1  $\mu$ l dung dịch kháng thể #1 vào 3,5 ml PBS, 1X. Thể tích dung dịch bằng 10 ml cần cho mỗi đĩa vi chuẩn độ.

Kháng thể dê kháng thô đã được pha loãng: dung dịch kháng thể thứ cấp được làm thích ứng theo các mức nền. Kháng thể được pha loãng như vậy đến 1:30.000 trong PBS bằng cách bổ sung 1  $\mu$ l dung dịch kháng thể #2 vào 30,0 ml PBS, 1X.

#### Độ đồng nhất

Việc kiểm tra độ đồng nhất của mẫu đạt được đối với mức bao hàm trung bình của sản phẩm MYCOSORB (4,0 kg/T) trong kế hoạch thử nghiệm. Thử nghiệm đối với mức cụ thể này được lặp lại 5 lần trên 10 mẫu riêng rẽ sử dụng 4 bản sao mỗi lần (Bảng 23).

Bảng 23. Đánh giá độ đồng nhất trên một nồng độ bằng 4,0 kg/T sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn cho lợn được đánh giá thông qua quy trình ELISA cho 5 chu trình trên 10 chế phẩm mẫu riêng rẽ được phân tích trong 4 bản sao.

| Chu trình #                            | 1             | 2             | 3             | 4             | 5             | Trung bình    |
|----------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| $n$                                    | $4 \times 10$ | $4 \times 10$ | $4 \times 10$ | $4 \times 10$ | $4 \times 10$ | $4 \times 10$ |
| OD <sub>450 nm</sub> trung bình        | 1,091         | 1,533         | 1,486         | 1,845         | 0,856         | 1,362         |
| $\sigma_{intra}$                       | 0,109         | 0,161         | 0,077         | 0,199         | 0,048         | -             |
| % CV <sub><i>h</i></sub>               | 10,02         | 10,51         | 5,15          | 10,76         | 5,57          | -             |
| Độ đồng nhất, % CV <sub><i>H</i></sub> | 8,40          |               |               |               |               |               |

#### Dựng đường chuẩn

Việc dựng đường chuẩn của thử nghiệm được tiến hành trên thức ăn được trộn với nồng độ mẫu chuẩn chưa biết và trong khoảng từ 0,0 đến 6,0 kg/T sản phẩm MYCOSORB, sự phù hợp đường cong tuyến tính,  $y = Ax$  với giá trị chặn được thiết lập ở zero, được dùng để xác định mối quan hệ giữa nồng độ và đáp ứng (OD<sub>450</sub>), đường cong chuẩn trung bình từ 5 chu trình được trình bày trên Fig. 6.

#### Độ tuyến tính

Độ tuyến tính của đường cong chuẩn được đánh giá từ tính toán hệ số hồi quy theo phương trình của mức bao hàm đã được vẽ đồ thị so với độ hấp thụ ở OD<sub>450</sub> bằng cách sử dụng đường phù hợp nhất, chặn đường phù hợp nhất ở zero,  $\Delta \text{OD}_{450} = Ax(\text{MYCOSORB})$  sau khi trừ mẫu trống. Độ tuyến tính của đường cong chuẩn được xác nhận với giá trị hệ số tương quan được tìm thấy ở trên  $r^2 > 0,95$ , hệ số hồi quy được tính toán đối với mỗi đường cong chu trình chuẩn và đối với đường cong chu trình chuẩn đã được tính trung bình được báo cáo trong Bảng 24.

Bảng 24. Độ tuyến tính của đường cong chuẩn trong nguyên liệu thức ăn cho lợn.

| Chu trình #                               | 1      | 2       | 3       | 4       | 5       | Trung bình từ đường cong đã được tính trung bình |
|-------------------------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|--------------------------------------------------|
| Ngày tháng                                | 5/7/09 | 5/12/09 | 5/13/09 | 5/22/09 | 8/18/09 | 1/6 Khoảng loại bỏ                               |
| $n$                                       | 50     | 50      | 50      | 50      | 50      | -                                                |
| Độ dốc ( $A$ )                            | 0,2522 | 0,2593  | 0,2620  | 0,2856  | 0,1818  | 0,1929                                           |
| Sai số bình phương trung bình ( $MSE$ ) * | 0,0017 | 0,0021  | 0,0020  | 0,0073  | 0,0181  | -                                                |
| Độ tuyến tính ( $r^2$ )                   | 0,996  | 0,995   | 0,990   | 0,974   | 0,987   | 0,997                                            |

Sai số bình phương trung bình được xác định trong mô hình hồi quy tuyến tính là:  $MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i^2$ , trong đó  $e_i^2 = y_i - \hat{y}_i$ ;  $y_i$  là giá trị  $y$  được xác định bằng thực nghiệm;  $\hat{y}_i$  là giá trị lý thuyết đối với nồng độ  $x_i$  được mong đợi của sản phẩm MYCOSORB.

#### Độ lặp lại

Độ lặp lại là số đo phương sai trong bởi đánh giá độ lệch chuẩn lặp lại. Việc đánh giá độ lặp lại đối với việc lặp lại chu trình thu được từ cùng mẫu vào cùng ngày đối với cùng chu trình, từ cùng kỹ thuật viên, với cùng thiết bị và phương pháp để biểu thị biến đổi của sự phát hiện trong chu trình,  $C_{intra}$  (Bảng 25). Việc đánh giá độ lặp lại giữa các chu trình khác nhau thu được từ cùng mẫu ở các ngày khác nhau trong các chu trình khác nhau, từ cùng kỹ thuật viên, với cùng thiết bị và phương pháp để biểu thị biến đổi của sự phát hiện giữa chu trình,  $CV_{Inter}$  (Bảng 26).

Các kết quả cho thấy rằng đường cong chuẩn thu được vào cùng ngày và vào các ngày khác nhau có ít sự biến đổi, với độ chụm trong ngày trung bình bằng 7% và độ chụm giữa ngày bằng 20% khi được áp dụng cho khoảng làm việc của đường cong chuẩn từ 0,0 đến 6,0 kg/T.

Bảng 25. Độ chụm trong điều kiện lặp lại trong chu trình để xây dựng đường cong chuẩn.

| Nồng độ (kg/T)                          |                  | 0,0   | 0,5   | 1,0   | 4,0   | 5,0   | 6,0   |
|-----------------------------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ngày 1<br>Chu trình<br>#1               | OD 450 nm        | 0,284 | 0,430 | 0,540 | 1,372 | 1,542 | 1,757 |
|                                         | $\sigma_{intra}$ | 0,012 | 0,040 | 0,055 | 0,051 | 0,111 | 0,121 |
|                                         | % CV             | 4,29  | 9,35  | 10,19 | 3,70  | 7,22  | 6,90  |
| Ngày 2<br>Chu trình<br>#2               | OD 450 nm        | 0,279 | 0,419 | 0,598 | 1,376 | 1,510 | 1,839 |
|                                         | $\sigma_{intra}$ | 0,035 | 0,028 | 0,011 | 0,040 | 0,201 | 0,137 |
|                                         | % CV             | 12,59 | 6,61  | 1,79  | 2,92  | 13,35 | 7,46  |
| Ngày 3<br>Chu trình<br>#3               | OD 450 nm        | 0,259 | 0,432 | 0,490 | 1,417 | 1,590 | 1,742 |
|                                         | $\sigma_{intra}$ | 0,020 | 0,007 | 0,028 | 0,118 | 0,044 | 0,174 |
|                                         | % CV             | 7,91  | 1,56  | 5,67  | 8,34  | 2,75  | 10,02 |
| Ngày 4<br>Chu trình<br>#4               | OD 450 nm        | 0,305 | 0,455 | 0,737 | 1,447 | 1,556 | 2,142 |
|                                         | $\sigma_{intra}$ | 0,027 | 0,024 | 0,101 | 0,271 | 0,104 | 0,060 |
|                                         | % CV             | 9,01  | 5,17  | 13,70 | 18,73 | 6,70  | 2,81  |
| Ngày 5<br>Chu trình<br>#5               | OD 450 nm        | 0,236 | 0,308 | 0,374 | 0,735 | 0,876 | 0,984 |
|                                         | $\sigma_{intra}$ | 0,020 | 0,018 | 0,017 | 0,029 | 0,048 | 0,023 |
|                                         | % CV             | 8,39  | 5,87  | 4,58  | 3,99  | 5,52  | 2,31  |
| % CV intra<br>(độ chụm trong chu trình) |                  | 8,44  | 5,71  | 7,18  | 7,53  | 7,10  | 5,90  |
| Tổng cộng %<br>(CV intra)               |                  | 6,98  |       |       |       |       |       |

Bảng 26. Độ chụm trong điều kiện lặp lại giữa chu trình để xây dựng đường cong chuẩn.

| Nồng độ (kg/T)                                                | 0,0   | 0,5   | 1,0   | 4,0   | 5,0   | 6,0   |
|---------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| OD 450 nm                                                     | 0,273 | 0,409 | 0,548 | 1,269 | 1,415 | 1,693 |
| $\sigma_{Inter}$                                              | 0,026 | 0,058 | 0,134 | 0,300 | 0,302 | 0,428 |
| % CV Inter                                                    | 9,62  | 14,16 | 24,45 | 23,67 | 21,38 | 25,28 |
| Độ chụm trung bình,<br>% CV Inter<br>(độ chụm giữa chu trình) | 19,76 |       |       |       |       |       |

Bảng 27. Độ chụm tổng thể để xây dựng đường cong chuẩn.

| Nồng độ (kg/T)                   | 0,0   | 0,5   | 1,0   | 4,0   | 5,0   | 6,0   |
|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $n$                              | 30    | 30    | 30    | 30    | 30    | 30    |
| $\sigma_{intra}$                 | 0,023 | 0,023 | 0,042 | 0,102 | 0,102 | 0,103 |
| $\sigma_{Inter}$                 | 0,026 | 0,058 | 0,134 | 0,300 | 0,302 | 0,428 |
| $\sigma_{Total}$                 | 0,028 | 0,059 | 0,135 | 0,304 | 0,306 | 0,430 |
| Độ chụm, % $CV_{tổng}$           | 10,33 | 14,39 | 24,70 | 23,94 | 21,63 | 25,42 |
| Độ chụm tổng cộng, % $CV_{tổng}$ | 20,07 |       |       |       |       |       |

$L_D$  và  $L_Q$  (độ nhảy)

Các giá trị  $L_D$  và  $L_Q$  được báo cáo trong Bảng 28. Các giá trị  $L_Q$  được tìm thấy là thấp hơn tỷ lệ bao hàm theo khuyến cáo của sản phẩm MYCOSORB, làm cho có thể định lượng nó trong nguyên liệu thức ăn.

Giới hạn phát hiện  $L_D = 0,403 \pm 0,150$  kg/T

Giới hạn định lượng  $L_Q = 1,363 \pm 0,498$  kg/T

Bảng 28. Xác định  $L_D$  và  $L_Q$  trong nguyên liệu thức ăn cho lợn.

|            | $n$ | OD <sub>450</sub> mẫu trống                      |                                | $3\sigma$<br>( $\Delta$ OD <sub>450</sub> ) | $10\sigma$<br>( $\Delta$ OD <sub>450</sub> ) | $L_D$ (kg/T)      | $L_Q$ (kg/T)      |
|------------|-----|--------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------|-------------------|
|            |     | $\bar{x}_{b\ inter} - \bar{x}_b$<br><i>Intra</i> | $\sigma_{mẫu}$<br><i>trống</i> |                                             |                                              |                   |                   |
| Ngày 1     | 10  | 0,064                                            | 0,071                          | 0,111                                       | 0,371                                        | 0,613             | 2,054             |
| Ngày 2     | 10  | -0,006                                           | 0,035                          | 0,105                                       | 0,351                                        | 0,407             | 1,386             |
| Ngày 3     | 10  | -0,027                                           | 0,020                          | 0,061                                       | 0,205                                        | 0,234             | 0,795             |
| Ngày 4     | 10  | 0,019                                            | 0,027                          | 0,082                                       | 0,275                                        | 0,289             | 0,991             |
| Ngày 5     | 10  | -0,050                                           | 0,020                          | 0,059                                       | 0,198                                        | 0,471             | 1,591             |
| Trung bình |     |                                                  |                                | 0,084 $\pm$ 0,024                           | 0,280 $\pm$ 0,080                            | 0,403 $\pm$ 0,150 | 1,363 $\pm$ 0,498 |

Độ chính xác

Độ chính xác được xác định từ 5 thử nghiệm độc lập, mỗi thử nghiệm gồm 10 mẫu độc lập và mỗi chu trình trong 4 bản sao đối với nồng độ 4,0 kg/T của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn. Nồng độ

cuối cùng đối với mỗi mẫu được tính toán như được nêu trong bản mô tả này sử dụng các giá trị đã được quan sát thấy thu được để tính toán độ đồng nhất (Bảng 29). Sau đó, độ chụm trung bình được tính toán từ độ chính xác đã được tính trung bình thu được đối với tất cả các chu trình và được so sánh với lượng nồng độ thêm chuẩn bằng 4,0 kg/T của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn. Các tính toán được tiến hành theo các phương trình được mô tả trong bản mô tả này.

Các kết quả cho thấy rằng việc đánh giá độ thu hồi lý giải cho sự ước tính quá cao, bằng 20% của hàm lượng thực của nguyên liệu thức ăn trong nồng độ thêm chuẩn của sản phẩm MYCOSORB (Bảng 30).

Bảng 29. Độ chính xác và độ chụm được xác định từ 5 thử nghiệm độc lập, mỗi thử nghiệm gồm 10 mẫu độc lập và mỗi chu trình trong 4 bản sao đối với nồng độ 4,0 kg/T của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn.

| Chu trình #                                     | $x_{TH}$ , thêm chuẩn (kg/T) | Bản sao #, $x_c$ (OD <sub>450</sub> ) |     |     |     |     |     |     |     |     |     | $\bar{x}_c$ | % CV  |
|-------------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|-------|
|                                                 |                              | 1                                     | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  |             |       |
| Ngày 1                                          | 4,0                          | 4,3                                   | 4,6 | 3,6 | 3,8 | 4,1 | 3,4 | 5,2 | 4,4 | 5,0 | 4,2 | 4,3         | 12,80 |
| Ngày 2                                          | 4,0                          | 6,1                                   | 4,9 | 4,1 | 4,5 | 4,6 | 4,5 | 4,7 | 4,2 | 5,2 | 5,7 | 4,8         | 12,50 |
| Ngày 3                                          | 4,0                          | 4,9                                   | 4,4 | 4,3 | 5,1 | 4,6 | 4,9 | 4,6 | 4,4 | 4,7 | 5,1 | 4,7         | 5,91  |
| Ngày 4                                          | 4,0                          | 5,0                                   | 4,2 | 5,9 | 4,3 | 5,6 | 5,4 | 5,4 | 5,6 | 6,6 | 5,6 | 5,4         | 12,64 |
| Ngày 5                                          | 4,0                          | 4,6                                   | 4,8 | 4,9 | 4,9 | 4,8 | 5,5 | 4,4 | 5,3 | 4,6 | 5,3 | 4,9         | 6,97  |
| % CV <sub>intra</sub> (độ chụm trong chu trình) |                              |                                       |     |     |     |     |     |     |     |     |     |             | 10,16 |

Bảng 30. Độ thu hồi tổng thể được xác định từ trung bình của 5 thử nghiệm độc lập, mỗi thử nghiệm gồm 10 mẫu độc lập và mỗi chu trình trong 4 bản sao đối với nồng độ 4,0 kg/T của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn.

| $x_{TH}$ , thêm chuẩn (kg/T)              | $\bar{x}_c$ trung bình | $\sigma_c$ |
|-------------------------------------------|------------------------|------------|
| 4,0                                       | 4,4                    | 0,3        |
| % $CV_{Inter}$ (độ chụm giữa chu trình)   |                        | 8,47       |
| Độ thu hồi tổng thể (% nồng độ lý thuyết) |                        | 120,46     |

Xác nhận bằng cách sử dụng nguyên liệu thức ăn cho gà và lợn

ELISA trong thử nghiệm thức ăn để phát hiện MYCOSORB được tiến hành ở thể nền gà và lợn, và được xác nhận trong phòng thí nghiệm độc lập và được so sánh với các kết quả xác nhận tính hợp lệ. Thử nghiệm được xác nhận ở Alimetries, Ltd., Koskelontie 19B, Espoo, Finland.

Việc dựng đường chuẩn của thử nghiệm được tiến hành vào hai ngày khác nhau đối với thức ăn được trộn với nồng độ mẫu chuẩn đã biết trong khoảng từ 0,0 đến 6,0 kg/T của sản phẩm MYCOSORB. Sự phù hợp đường cong tuyến tính với  $y = Ax$  và giá trị chặn được thiết lập ở zero được dùng để xác định mối quan hệ giữa nồng độ và đáp ứng ( $OD_{450}$ ) trong thức ăn cho lợn và trong thức ăn cho gà. Độ hấp thụ và việc dựng đường chuẩn thu được khác nhau một cách đáng kể giữa các chu trình khác nhau; tuy nhiên, nồng độ tuyệt đối đối với các mẫu đã biết và chưa biết giữ nguyên như nhau.

Độ tuyến tính

Độ tuyến tính của đường cong chuẩn được đánh giá từ việc tính toán hệ số hồi quy theo phương trình của mức bao hàm đã được vẽ đồ thị so với độ hấp thụ ở  $OD_{450}$  bằng cách sử dụng đường phù hợp nhất, chặn đường phù hợp nhất ở zero,  $\Delta OD_{450} = Ax(\text{MYCOSORB})$  sau khi trừ mẫu trống. Độ tuyến tính của đường cong chuẩn được xác nhận với giá trị hệ số tương quan được tìm thấy ở trên  $r^2 > 0,95$ , hệ số tương quan này nằm trong khoảng từ 0,991 đến 0,994 (Bảng 31).

Bảng 31. Độ tuyến tính của đường cong chuẩn trong nguyên liệu thức ăn cho gà và cho lợn.

| Chu trình #             | 1              | 2      | 3               | 4      | Trung bình từ đường cong đã được tính trung bình |
|-------------------------|----------------|--------|-----------------|--------|--------------------------------------------------|
| Thế nền                 | Thức ăn cho gà |        | Thức ăn cho lợn |        | -                                                |
| Ngày tháng              | 4/6/10         | 4/7/10 | 4/6/10          | 4/6/10 | -                                                |
| $n$                     | 15             | 15     | 15              | 15     | -                                                |
| Độ dốc ( $A$ )          | 0,0954         | 0,0775 | 0,0828          | 0,0809 | -                                                |
| Độ tuyến tính ( $r^2$ ) | 0,991          | 0,994  | 0,993           | 0,992  | 0,997                                            |

Sai số bình phương trung bình được xác định trong mô hình hồi quy tuyến tính là:  $MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n e_i^2$ , trong đó  $e_i^2 = y_i - \hat{y}_i$ ;  $y_i$  là giá trị  $y$  được xác định bằng thực nghiệm;  $\hat{y}_i$  là giá trị lý thuyết đối với nồng độ  $x_i$  được mong đợi của sản phẩm MYCOSORB.

$L_D$  và  $L_Q$  (độ nhảy)

Các giá trị  $L_D$  và  $L_Q$  được xác định trong thế nền axit clohydric nồng độ 40%. Ước tính của các giá trị  $L_D$  và  $L_Q$  tương ứng lần lượt là 0,35 và 1,20 kg/T của MYCOSORB được trộn lẫn với thức ăn cho gà và 0,27 và 0,91 kg/T của MYCOSORB được trộn lẫn với thức ăn cho lợn (Bảng 32 và Bảng 33, một cách tương ứng).

Bảng 32. Các kết quả thu được đối với các mẫu trống trong hai chu trình riêng rẽ được tiến hành ở khoảng thời gian một ngày và được thực hiện bởi phòng thí nghiệm kiểm tra đối với thức ăn cho gà.

|            | Ngày tháng | ID mẫu | Lượng lấy mẫu (g) | Kết quả (kg/T) |
|------------|------------|--------|-------------------|----------------|
| Ngày 1     | 4/6/2010   | 0,3    | 20                | 0,230          |
|            |            | 0,4    | 20                | 0,150          |
|            |            | 0,6    | 20                | 0,010          |
| Ngày 2     | 4/7/2010   | 0,1    | 20                | 0,320          |
|            |            | 0,4    | 20                | 0,110          |
|            |            | 0,10   | 20                | 0,020          |
| Trung bình |            |        | 0,140             |                |

Bảng 33. Các kết quả thu được trên mẫu trống trong hai chu trình riêng rẽ được tiến hành ở khoảng thời gian một ngày và được thực hiện bởi phòng thí nghiệm kiểm tra trên thức ăn cho lợn.

|            | Ngày tháng | ID mẫu | Lượng lấy mẫu (g) | Kết quả (kg/T) |
|------------|------------|--------|-------------------|----------------|
| Ngày 1     | 4/6/2010   | 0,2    | 20                | 0,230          |
|            |            | 0,3    | 20                | 0,290          |
|            |            | 0,4    | 20                | 0,082          |
| Ngày 2     | 4/7/2010   | 0,1    | 20                | 0,220          |
|            |            | 0,3    | 20                | 0,110          |
|            |            | 0,7    | 20                | 0,064          |
| Trung bình |            |        | 0,170             |                |

Độ chính xác và độ chụm đối với mẫu “đã biết”

Độ chính xác được xác định từ 2 thử nghiệm độc lập, mỗi thử nghiệm gồm 6 bản sao đối với nồng độ 4,0 kg/T của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn. Độ chụm trung bình được tính toán từ độ chính xác đã được tính trung bình thu được đối với tất cả các chu trình và được so sánh với lượng nồng độ thêm chuẩn bằng 4,0 kg/T của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn.

Các giá trị thu được đáp ứng các tiêu chuẩn đối với cả độ chính xác và độ chụm, như sau.

Việc đánh giá độ lặp lại đối với việc lặp lại chu trình thu được từ cùng mẫu vào cùng ngày đối với cùng chu trình, từ cùng kỹ thuật viên, với cùng thiết bị và phương pháp để biểu thị biến đổi của sự phát hiện trong chu trình,  $CV_{intra}$ . Việc đánh giá độ lặp lại giữa các chu trình khác nhau thu được từ cùng mẫu ở các ngày khác nhau trong các chu trình khác nhau, từ cùng kỹ thuật viên, với cùng thiết bị và phương pháp để biểu thị biến đổi của sự phát hiện giữa chu trình,  $CV_{inter}$ .

Các giá trị thu được đáp ứng các tiêu chuẩn đối với cả độ chính xác và độ chụm, như sau đối với thể nền gà và lợn (Bảng 34 và Bảng 35).

Bảng 34. Độ chính xác và độ chụm được xác định từ 6 thử nghiệm bản sao được tiến hành vào 2 ngày riêng rẽ sử dụng các mẫu đã biết (4,0 kg/T) của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn cho gà.

|                                           | Ngày tháng | ID mẫu | Lượng lấy mẫu (g) | Các kết quả (kg/T) |
|-------------------------------------------|------------|--------|-------------------|--------------------|
| Ngày 1                                    | 3/4/2010   | H.1    | 20                | 4,4                |
|                                           |            | H.2    | 20                | 4,4                |
|                                           |            | H.3    | 20                | 3,9                |
|                                           |            | H.4    | 20                | 4,1                |
|                                           |            | H.5    | 20                | 4,4                |
|                                           |            | H.6    | 20                | 4,2                |
| Ngày 2                                    | 3/5/2010   | H.7    | 20                | 3,8                |
|                                           |            | H.8    | 20                | 3,3                |
|                                           |            | H.9    | 20                | 3,7                |
|                                           |            | H.10   | 20                | 3,4                |
|                                           |            | H.11   | 20                | 3,8                |
|                                           |            | H.12   | 20                | 4,1                |
| Trung bình                                |            |        |                   | 4,0                |
| % $CV_{intra}$ (độ chụm trong chu trình)  |            |        | 6,6               |                    |
| % $CV_{Inter}$ (độ chụm giữa chu trình)   |            |        | 9,7               |                    |
| Độ thu hồi tổng thể (% nồng độ lý thuyết) |            |        | 99%               |                    |

Bảng 35. Độ chính xác và độ chụm được xác định từ 6 thử nghiệm bản sao được tiến hành vào 2 ngày riêng rẽ sử dụng các mẫu đã biết (4,0 kg/T) của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn cho lợn.

|                                           | Ngày tháng | ID mẫu | Lượng lấy mẫu (g) | Các kết quả (kg/T) |
|-------------------------------------------|------------|--------|-------------------|--------------------|
| Ngày 1                                    | 3/4/2010   | H.1    | 20                | 4,7                |
|                                           |            | H.2    | 20                | 4,1                |
|                                           |            | H.3    | 20                | 4,4                |
|                                           |            | H.4    | 20                | 4,6                |
|                                           |            | H.5    | 20                | 3,8                |
|                                           |            | H.6    | 20                | 4,3                |
| Ngày 2                                    | 3/5/2010   | H.7    | 20                | 3,5                |
|                                           |            | H.8    | 20                | 3,7                |
|                                           |            | H.9    | 20                | 3,1                |
|                                           |            | H.10   | 20                | 3,2                |
|                                           |            | H.11   | 20                | 3,6                |
|                                           |            | H.12   | 20                | 3,5                |
| Trung bình                                |            |        | 3,9               |                    |
| % $CV_{intra}$ (độ chụm trong chu trình)  |            |        | 7,5               |                    |
| % $CV_{Inter}$ (độ chụm giữa chu trình)   |            |        | 14,0              |                    |
| Độ thu hồi tổng thể (% nồng độ lý thuyết) |            |        | 96%               |                    |

Độ chính xác và độ chụm đối với mẫu “chưa biết”

Độ chính xác được xác định từ 2 thử nghiệm độc lập, mỗi thử nghiệm gồm 3 bản sao đối với nồng độ 4,0 kg/T của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn trong thử nghiệm mù. Các giá trị thu được đáp ứng các tiêu chuẩn đối với cả độ chính xác và độ chụm, như sau (Bảng 36 và Bảng 37).

Bảng 36. Độ chính xác và độ chụm được xác định từ 3 thử nghiệm bản sao được tiến hành trên các mẫu chưa biết (4,0 kg/T) của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn cho gà.

| Ngày tháng xác định   | ID mẫu (mL) | Lượng lấy mẫu (g) | Các kết quả (kg/T) |
|-----------------------|-------------|-------------------|--------------------|
| 4/6/2010              | C.6         | 20                | 4,0                |
|                       | C.7         | 20                | 3,8                |
|                       | C.8         | 20                | 4,1                |
| Trung bình            |             | 4,0               |                    |
| Độ lệch chuẩn lặp lại |             | 0,11              |                    |
| RSD (%)               |             | 3,0%              |                    |

Bảng 37. Độ chính xác và độ chụm được xác định từ 3 thử nghiệm bản sao được tiến hành trên các mẫu chưa biết (4,0 kg/T) của sản phẩm MYCOSORB được trộn lẫn với nguyên liệu thức ăn cho lợn.

| Ngày tháng xác định   | ID mẫu (mL) | Lượng lấy mẫu (g) | Các kết quả (kg/T) |
|-----------------------|-------------|-------------------|--------------------|
| 4/6/2010              | C.6         | 20                | 4,5                |
|                       | C.7         | 20                | 3,8                |
|                       | C.8         | 20                | 4,4                |
| Trung bình            |             | 4,2               |                    |
| Độ lệch chuẩn lặp lại |             | 0,36              |                    |
| RSD (%)               |             | 8,5%              |                    |

#### Độ vững (ổn định)

Phân tích độ vững đánh giá khả năng của phương pháp xác định để chống lại các thay đổi trong kết quả khi được cho qua các thay đổi thứ yếu trong môi trường và các biến số của quy trình.

Độ ổn định của thử nghiệm ELISA được kiểm tra bằng cách thay đổi dung dịch pha loãng kháng thể sơ cấp và thứ cấp, độ ổn định của kháng thể sơ cấp, bằng cách thay đổi sự phân bố của các mẫu khác nhau cần được thử nghiệm trên đĩa vi chuẩn độ (một đĩa chứa tất cả các mẫu cần được xác định và gồm mẫu trống, mẫu chuẩn và mẫu chưa biết so với nhiều đĩa vi chuẩn độ gồm nhiều lần lặp lại hơn cho mỗi mẫu được phân tích nhưng trong đó mẫu trống, mẫu chuẩn và mẫu chưa biết là trên các đĩa vi chuẩn độ khác nhau). Bảng 38

báo cáo các biến đổi và cho thấy rằng các kết quả là phù hợp, ngay cả với các thay đổi được thực hiện, thể hiện độ vững lớn của thử nghiệm đặc biệt là đối với sự biến đổi trong các dung dịch pha loãng kháng thể.

Bảng 38. Thử nghiệm độ vững. Các điều kiện chuẩn được thể hiện bằng chữ đậm. Mười phần trăm các thay đổi cũng được nêu bật nếu được tìm thấy.

| Điều kiện được làm thay đổi                        | Giá trị của điều kiện                | Mẫu thức ăn             | x <sub>c</sub>               | Độ thu hồi                           | CV <sub>intra</sub>            | CV <sub>Inter</sub>              | CV tổng                          |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Kháng thể sơ cấp,<br>Kháng thể thứ cấp<br>1:20 000 | 1:2000<br>1:2500<br>1:4000<br>1:5000 | Cho<br>bầy<br>bò<br>sữa | 4,45<br>4,47<br>4,44<br>4,49 | 120,98<br>121,06<br>121,01<br>123,30 | 7,90<br>8,98<br>10,54<br>9,57  | 10,85<br>13,86<br>10,18<br>13,42 | 12,06<br>15,13<br>14,12<br>16,14 |
| Kháng thể sơ cấp,<br>kháng thể thứ cấp<br>1:30 000 | 1:2000<br>1:2500<br>1:4000<br>1:5000 | Cho<br>bầy<br>bò<br>sữa | 4,37<br>4,55<br>4,30<br>4,35 | 119,56<br>121,75<br>115,85<br>117,29 | 10,03<br>8,86<br>10,66<br>9,91 | 9,39<br>14,58<br>11,11<br>14,55  | 12,70<br>15,73<br>14,10<br>16,33 |
| Độ ổn định của kháng thể sơ cấp                    | 2 - 8°C<br>1 tuần,<br>RT             | Cho<br>gà               | 4,8<br>4,9                   | 134,80<br>138,10                     | 5,59<br>6,85                   | -<br>-                           | -<br>-                           |
| Sự phân bố đĩa                                     | Một đĩa<br>Nhiều đĩa                 | Cho<br>gà               | 4,72<br>4,82                 | 120,68<br>124,23                     | 6,13<br>5,99                   | 5,19<br>5,89                     | 8,07<br>8,11                     |

#### Ví dụ 5

Thử nghiệm tính đặc hiệu của kháng thể đơn dòng

Các phương pháp

17 hợp chất được kiểm tra ở nồng độ 50 µg/ml trong PBS để xác định tính phản ứng chéo bởi các kháng thể đơn dòng được làm tăng chống lại thể liên hợp (1→4)-α-D-glucan/(1→6)-β-D-glucan nấm men-BSA.

Hợp chất được thử nghiệm là: tinh bột-khoai tây tan được, tinh bột-gạo, tinh bột-lúa mỳ, tinh bột-ngô, BSA, glycogen (từ thỏ), glycogen (từ con hàu), glycogen (bò), Mannan, Laminarin, Zymosin A, Maltrin QD, glucan từ nấm men làm bánh mỳ, (1→3)-β-D-glucan từ *Eug. gracilis*, nấm men *Torula*, viên

tròn Ycw-02 bead beater (chế phẩm phân đoạn thành tế bào nấm men – sử dụng máy phá tế bào bằng vi hạt (bead beater)),  $\beta$  glucan từ lúa mạch.

Chất chiết thành tế bào nấm men (MYCOSORB mẻ #08FS001) và kháng nguyên (1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucan/(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucan-BSA được sử dụng để làm tăng kháng thể đơn dòng cũng được thử nghiệm ở các nồng độ bằng 1  $\mu$ g/ml, 2  $\mu$ g/ml và 5  $\mu$ g/ml. Cả hai kháng thể đơn dòng (513A161.1 và 513A431.1) đều được thử nghiệm ở khoảng pha loãng sau: 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000, 1:1500 và 1:2000. Đĩa vi chuẩn độ Nunc 96 lỗ với Lô#0702013 được sử dụng. Các đĩa được phủ 100  $\mu$ l hợp chất/lỗ và được khuấy bằng cách gõ nhẹ 8-10 lần bằng đầu ngón tay. Các đĩa được đậy bằng băng kín và được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Dung dịch được loại bỏ và các đĩa được rửa 3 lần bằng 200  $\mu$ l PBS cho mỗi lần rửa sử dụng pipet nhiều kênh. Đĩa được gõ nhẹ 8-10 lần bằng đầu ngón tay trước khi loại bỏ mỗi dung dịch rửa. Giữa các lần rửa, chất lỏng dư được loại bỏ bằng cách gõ nhẹ đĩa này trên khăn giấy. Để phong bế, 100  $\mu$ l/lỗ 3% sữa (không được ly tâm) được bổ sung. Các đĩa được ủ 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch phong bế được loại bỏ và các lỗ được rửa bằng 1 x 200  $\mu$ l PBS, 2 x 200  $\mu$ l PBS + 0,05% polysorbat 20. Các đĩa được khuấy bằng cách gõ nhẹ 8-10 lần bằng đầu ngón tay trước khi loại bỏ mỗi dung dịch rửa. Giữa các lần rửa, chất lỏng dư được loại bỏ bằng cách gõ nhẹ đĩa này trên khăn giấy.

100  $\mu$ l mỗi dung dịch pha loãng của huyết thanh thích hợp được bổ sung cho mỗi lỗ. PBS (100  $\mu$ l/lỗ) được dùng cho các lỗ của mẫu trống. Đĩa được ủ, được đậy, trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch được loại bỏ và các lỗ được rửa 3 lần, mỗi lần bằng 200  $\mu$ l PBS + 0,05% polysorbat 20. Đĩa được gõ nhẹ 8-10 lần bằng đầu ngón tay để khuấy trước khi loại bỏ mỗi dung dịch rửa. Giữa các lần rửa, chất lỏng dư được loại bỏ bằng cách gõ nhẹ đĩa này trên khăn giấy. 100  $\mu$ l kháng thể thứ cấp (1:10.000 dê kháng chuột nhất, IgG-peroxidaza được liên hợp) được bổ sung vào mỗi lỗ. Đĩa được ủ, được đậy, trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Dung dịch được loại bỏ và các lỗ được rửa 3 lần bằng 200  $\mu$ l, cho mỗi lần rửa, PBS + 0,05% polysorbat 20. Đĩa được gõ nhẹ 8-10 lần

bằng đầu ngón tay để khuấy trước khi loại bỏ mỗi dung dịch rửa. Giữa các lần rửa, chất lỏng dư được loại bỏ bằng cách gõ nhẹ đĩa này trên khăn giấy.

100  $\mu$ l cơ chất TMB ở nhiệt độ trong phòng được bổ sung cho mỗi lỗ. Sau 5 phút, phản ứng được làm dừng bằng 100  $\mu$ l HCl nồng độ 1N cho mỗi lỗ. Đáy đĩa được lau sạch bằng đầu ngón tay, và sau khi lắc 10 giây, độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm được đọc bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa vi chuẩn độ.

#### Các kết quả

Biểu đồ dạng cột của số liệu ELISA được thể hiện trên các Fig 9-14. Cả 513A161.1 và 513A431.1 đều phản ứng rất mạnh với kháng nguyên 499-73-3 ở nồng độ thấp như 1  $\mu$ g/ml, trong đó 2  $\mu$ g/ml tạo ra số đọc độ hấp thụ mạnh nhất. Kháng thể cũng có khả năng nhận ra 08FS001 ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 1  $\mu$ g/ml đến 5  $\mu$ g/ml, trong đó số đọc độ hấp thụ mạnh nhất ở 5  $\mu$ g/ml. Tuy nhiên, độ hấp thụ đối với 08FS001 ít hơn một cách đáng kể so với đối với kháng nguyên 499-73-3. Kháng thể 513A161.1 nhận ra Laminarin và phản ứng với nó một cách đáng kể, nhưng 513A431.1 thì không. Cả hai kháng thể đều có số đọc độ hấp thụ rất mạnh đối với Zymosin A mà tương tự và đôi khi mạnh hơn so với độ hấp thụ được quan sát thấy với kháng nguyên 499-73-3. Ngạc nhiên là, kháng thể cho thấy sự phản ứng chéo đáng kể với Zymosin A, Maltrin QD, glucan từ nấm men bánh mỳ, (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan từ *Eug. gracilis*, nấm men *Torula* và viên tròn ycw-02 bead beater, điều này làm hạn chế ứng dụng của chúng cho thử nghiệm ELISA định lượng.

#### Ví dụ 6

Thử nghiệm tối ưu hóa điều kiện của thử nghiệm ELISA kháng thể đơn dòng để phát hiện kháng nguyên được chiết từ thức ăn

Pha loãng trong PBS so với PBS+3% sữa bột không béo

Số đọc độ hấp thụ thấp được tạo ra khi cố gắng sử dụng kháng thể đơn dòng 513A161.1 (Ví dụ 5) để phát hiện kháng nguyên được chiết từ thức ăn trong thử nghiệm ELISA định lượng. Để xác định xem việc pha loãng kháng thể trong 3% sữa chứ không phải là PBS có ảnh hưởng đến số đọc độ hấp thụ

(ví dụ, bằng cách gây ra sự phong bế quá mức khi kết hợp với các thành phần chất chiết thức ăn) hay không, protocol sau đây được tiến hành:

Chất chiết thành tế bào nấm men (MYCOSORB mẻ #08FS001) được đưa vào quy trình chiết hóa học như nêu trong ví dụ 4 bằng dung dịch chứa HCl nồng độ 0,5%. Thử nghiệm ELISA được tiến hành như được nêu trong Ví dụ 5, sử dụng kháng thể đơn dòng 513A161 ở tỷ lệ pha loãng 1:400 để làm kháng thể sơ cấp và kháng thể IgG-HRP dê kháng chuột nhất (1:10.000) được pha loãng trong PBS hoặc 3% sữa để làm kháng thể thứ cấp. Các đĩa vi chuẩn độ được phủ chất chiết thành tế bào nấm men với thể tích 100  $\mu$ l/lỗ hoặc chất chiết được pha loãng 1:1 trong PBS với thể tích 200  $\mu$ l/lỗ.

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 15 cho thấy rằng tác động nhỏ nhưng không có ý nghĩa về mặt thống kê của các dung dịch pha loãng kháng thể được quan sát thấy. Ngoài ra, cố gắng sử dụng kháng thể đơn dòng để phát hiện kháng nguyên trong các mẫu thức ăn chuẩn được chiết với HCl nồng độ 0,5%, ba bản sao tạo ra sự biến đổi lớn trong các số đọc giữa các bản sao, độ lệch chuẩn lớn, và số đọc độ hấp thụ được thổi phồng.

#### Bước phủ kháng nguyên – nhiệt độ và thời gian

Cố gắng sử dụng kháng thể đơn dòng 513A161.1 (Ví dụ 5) để phát hiện kháng nguyên được chiết từ thức ăn trong thử nghiệm ELISA định lượng tạo ra số đọc độ hấp thụ thấp. Để làm tăng số đọc độ hấp thụ trong thử nghiệm ELISA sử dụng kháng thể đơn dòng của chuột nhất 513A161.1, thử nghiệm sau được tiến hành để xác định xem việc thay đổi thời gian và nhiệt độ của bước ủ phủ kháng nguyên có cải thiện việc phát hiện kháng nguyên được chiết từ thức ăn mà không làm tăng liên kết nền/không đặc hiệu hay không.

Protocol gồm tiến hành việc chiết thức ăn như được nêu ở trên để tạo ra mẫu phân tích. Lượng nhỏ mẫu được phủ trên đĩa ngay lập tức hoặc được bảo quản qua đêm ở nhiệt độ -25°C. Việc điều chế mẫu được lặp lại 3 lần để tạo ra ba bản sao dung dịch chiết. Đường cong chuẩn sáu điểm (0, 0,4, 0,8, 1,2, 1,8, 2,4 kg/T) được điều chế bằng cách sử dụng kháng nguyên trong chế phẩm thức

ăn cho gà. Các đĩa được phủ chất chiết thức ăn của đường cong chuẩn và được để ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm (tĩnh), 4°C qua đêm (lắc), hoặc 37°C trong 1 giờ (tĩnh). Thử nghiệm ELISA được tiến hành như được nêu trong Ví dụ 5 sử dụng kháng thể đơn dòng 513A161.1 ở tỷ lệ pha loãng 1:400 được điều chế trong 3% sữa để làm kháng thể sơ cấp và kháng thể IgG-HRP dê kháng chuột nhất (1:10.000) được pha loãng trong 3% sữa để làm kháng thể thứ cấp. Việc ủ cơ chất xảy ra trong 30 phút, và độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm được xác định.

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 16 cho thấy rằng việc thay đổi thời gian và nhiệt độ ở đó kháng nguyên được phủ lên trên đĩa không làm tăng độ hấp thụ đến khoảng tối ưu và cũng không ảnh hưởng đến độ tuyến tính của đường cong chuẩn. Ngoài ra, nền được làm tăng theo cách không phụ thuộc vào thời gian ủ.

#### Ví dụ 7

Thử nghiệm độ chọn lọc (độ nhiều) kháng thể đa dòng

Để xác định mức độ nhiều, tập hợp các thử nghiệm được tiến hành bằng cách sử dụng nguyên liệu thức ăn cho gà được mô tả trong bản mô tả này không có và có sản phẩm MYCOSORB (Ref. #285965) có mặt ở 1 kg/T, khi có sản phẩm MYCOSORB thì không có hoặc có một vài phần của sản phẩm gây nhiều có thể tồn tại (50%, 100%, 200% so với mức bao hàm của sản phẩm MYCOSORB, theo khối lượng) thuộc loại hydrat cacbon hoặc sản phẩm phụ được tìm thấy trong chế phẩm thức ăn. Theo khía cạnh này, các sản phẩm sau đã được nghiên cứu và được kiểm tra để đánh giá tác động của chúng đến việc phát hiện sản phẩm MYCOSORB thông qua phương pháp chính xác nêu trong bản mô tả này:

- Amyloza (tinh bột khoai tây): (1→4):(1→6)- $\alpha$ -D-glucan với tỷ lệ 30:1.
- Maltodextrin và chất rắn xirô ngô: hydrat cacbon tiêu hóa được một cách dễ dàng được tạo ra từ tinh bột ngô tự nhiên, polyme của dextroza.

- Glycogen (từ gan bò, loại IX): (1→4):(1→6)- $\alpha$ -D-glucan với tỷ lệ 10:1.
- Laminarin (từ *Laminaria digitata*): (1→3): $\beta$ (1→6)- $\beta$ -D-glucan với tỷ lệ 3:1.
- Bã khô chưng cất rượu; sản phẩm phụ của quá trình sản xuất bioethanol từ ngô.
- Nấm men rượu khô có hoạt tính Red Star® Pasteur Champagne (từ *Saccharomyces bayanus*): nấm men và thành tế bào nấm men (phức hợp hydrat cacbon được tạo nên từ (1→3): $\beta$ (1→6)- $\beta$ -D-glucan, (1→4):(1→6)- $\alpha$ -D-polymannosa được liên kết với protein, (1→2):(1→4)- $\beta$ -N-acetylglucosamin).

Như được thể hiện trên Fig. 7 và Fig. 8, tổng các hiệu số giữa các tín hiệu thu được với sản phẩm MYCOSORB và sản phẩm MYCOSORB được trộn với 50, 100, 200% (theo khối lượng) chất nhiễu, xấp xỉ là giá trị OD<sub>450</sub> bằng 0. Các kết quả lý giải cho việc không có nhiễu và như vậy là các tính chất đặc trưng của thử nghiệm để phát hiện sản phẩm MYCOSORB trong nền thức ăn phức hợp gồm các hydrat cacbon nhiễu khác nhau.

Các kết quả được nêu chi tiết đối với mỗi chất nhiễu riêng rẽ và giới hạn của kiểm định ANOVA một chiều, đối với khoảng tin cậy 95%, được đưa ra trong Bảng 39 đến Bảng 44 trong đó các giá trị trung bình mật độ quang (450 nm) và hiệu số giữa các mẫu được tính toán, cũng như độ lệch chuẩn và hệ số biến đổi. Độ đồng nhất của các phương sai trong mỗi chất nhiễu được đánh giá bằng cách sử dụng các kiểm định của Levene, O'Brien, và Brown và Forsythe. Trong trường hợp phương pháp phương sai không phải là hằng số, phương pháp ANOVA một chiều Kruskal-Willis phi tham số được sử dụng, với sự biến đổi hạng tạo ra các kiểm định mạnh hơn đối với tính không chuẩn tắc, và tính kháng đối với các khoảng loại bỏ. Các phân tích được tiến hành trên các đĩa riêng rẽ đối với mỗi nồng độ chất nhiễu được thử nghiệm hoặc trên một đĩa riêng rẽ. Các kết quả giống nhau thu được đối với hai đĩa chế phẩm.

Bảng 39. Các giá trị OD<sub>450</sub> trung bình thu được đối với sản phẩm MYCOSORB khi được trộn với 0, 50, 100, 200% (theo khối lượng) amyloza trong thức ăn cho gà. Sự khác nhau giữa các giá trị được phân tích bằng cách thức ANOVA một chiều và kiểm định thống kê so sánh trung bình với khoảng tin cậy bằng 95%.

| MYCOSORB 1 kg/T |                                         | MYCOSORB / Tỷ lệ nhiều (theo khối lượng) |                      |                     |
|-----------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|----------------------|---------------------|
|                 |                                         | + 50 %                                   | + 100 %              | + 200 %             |
| ANOVA           |                                         | Phi tham số một chiều Kruskal-Wallis     |                      |                     |
| Amyloza         | Mẫu trống (chỉ có thức ăn)              |                                          |                      |                     |
|                 | N                                       | 24                                       | 24                   | 24                  |
|                 | Trung bình (OD <sub>450</sub> )         | 0,3317                                   | 0,3538               | 0,3638              |
|                 | Hạng trung bình                         | 20,396 <sup>C</sup>                      | 40,479 <sup>C</sup>  | 48,625 <sup>C</sup> |
|                 | $\sigma$ intra                          | 0,0157                                   | 0,0234               | 0,0242              |
|                 | % CV <sub>intra</sub>                   | 4,7471                                   | 6,6116               | 6,6448              |
|                 | Đối chứng                               |                                          |                      |                     |
|                 | N                                       | 24                                       | 24                   | 24                  |
|                 | Trung bình (OD <sub>450</sub> )         | 0,6601                                   | 0,7073               | 0,6294              |
|                 | Hạng trung bình                         | 154,25 <sup>AB</sup>                     | 196,48 <sup>A</sup>  | 113,17 <sup>B</sup> |
|                 | $\sigma$ intra                          | 0,0348                                   | 0,0351               | 0,0206              |
|                 | % CV <sub>intra</sub>                   | 5,2709                                   | 4,9578               | 3,2661              |
|                 | Đối chứng + Amyloza                     |                                          |                      |                     |
|                 | N                                       | 24                                       | 24                   | 24                  |
|                 | Trung bình (OD <sub>450</sub> )         | 0,6352 <sup>B</sup>                      | 0,6561 <sup>AB</sup> | 0,6365 <sup>B</sup> |
|                 | Hạng trung bình                         | 122,40 <sup>B</sup>                      | 151,13 <sup>AB</sup> | 129,58 <sup>B</sup> |
|                 | $\sigma$ intra                          | 0,0200                                   | 0,0221               | 0,0346              |
|                 | % CV <sub>intra</sub>                   | 3,1418                                   | 3,3738               | 5,4299              |
|                 | Hiệu số trung bình (OD <sub>450</sub> ) | -0,0249                                  | -0,0512              | 0,071               |
|                 | Hiệu số hạng trung bình                 | -31,85                                   | -45,35               | 16,41               |
|                 | Giá trị Z tới hạn                       | 3,197                                    |                      |                     |
|                 | Giá trị tới hạn để so sánh              | 57,678                                   |                      |                     |

Bảng 40. Các giá trị trung bình OD<sub>450</sub> thu được đối với sản phẩm MYCOSORB khi được trộn với 0, 50, 100, 200% (theo khối lượng) maltodextrin trong thức ăn cho gà. Sự khác nhau giữa các giá trị được phân tích bằng cách thức ANOVA một chiều và kiểm định thống kê so sánh trung bình với khoảng tin cậy bằng 95%.

| MYCOSORB 1 kg/T |                                                                                                                        | MYCOSORB / Tỷ lệ nhiều (theo khối lượng)      |                                               |                                               |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|                 |                                                                                                                        | + 50 %                                        | + 100 %                                       | + 200 %                                       |
| ANOVA           |                                                                                                                        | Kiểm định so sánh Turkey và tham số một chiều |                                               |                                               |
| Maltodextrin    | Mẫu trống (Chỉ có thức ăn)<br>N<br>Trung bình (OD <sub>450</sub> )<br>$\sigma_{\text{intra}}$<br>% CV <sub>intra</sub> | 24<br>0,3628 <sup>C</sup><br>0,0274<br>7,5505 | 24<br>0,3818 <sup>B</sup><br>0,0288<br>7,5414 | 24<br>0,3587 <sup>C</sup><br>0,0367<br>10,218 |
|                 | Đối chứng<br>N<br>Trung bình (OD <sub>450</sub> )<br>$\sigma_{\text{intra}}$<br>% CV <sub>intra</sub>                  | 24<br>0,7022 <sup>A</sup><br>0,0276<br>3,9264 | 24<br>0,6426 <sup>B</sup><br>0,0247<br>3,8422 | 24<br>0,6822 <sup>A</sup><br>0,0276<br>4,0480 |
|                 | Đối chứng + Maltodextrin<br>N<br>Trung bình (OD <sub>450</sub> )<br>$\sigma_{\text{intra}}$<br>% CV <sub>intra</sub>   | 24<br>0,7088 <sup>A</sup><br>0,0490<br>6,9145 | 24<br>0,6271 <sup>B</sup><br>0,0449<br>7,1518 | 24<br>0,6407 <sup>B</sup><br>0,0342<br>5,3306 |
|                 | Hiệu số                                                                                                                | 0,0066                                        | -0,0155                                       | -0,0415*                                      |
|                 | Giá trị tới hạn                                                                                                        | 0,0308                                        |                                               |                                               |
|                 | $\sigma$ để so sánh                                                                                                    | 0,0099                                        |                                               |                                               |
|                 |                                                                                                                        |                                               |                                               |                                               |
|                 |                                                                                                                        |                                               |                                               |                                               |
|                 |                                                                                                                        |                                               |                                               |                                               |
|                 |                                                                                                                        |                                               |                                               |                                               |
|                 |                                                                                                                        |                                               |                                               |                                               |

Bảng 41. Các giá trị OD<sub>450</sub> trung bình thu được đối với sản phẩm MYCOSORB khi được trộn với 0, 50, 100, 200% (theo khối lượng) glycogen trong thức ăn cho gà. Sự khác nhau giữa các giá trị được phân tích bằng cách thức ANOVA một chiều và kiểm định thống kê so sánh trung bình với khoảng tin cậy 95%.

| MYCOSORB 1 kg/T            |                                         | MYCOSORB / Tỷ lệ nhiều (theo khối lượng) |                     |                     |
|----------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|---------------------|---------------------|
|                            |                                         | + 50 %                                   | + 100 %             | + 200 %             |
| ANOVA                      |                                         | Phi tham số một chiều Kruskal-Wallis     |                     |                     |
| Glycogen                   | Mẫu trống (Chỉ có thức ăn)              | 24                                       | 24                  | 16                  |
|                            | N                                       | 0,4452                                   | 0,4414              | 0,4495              |
|                            | Trung bình (OD <sub>450</sub> )         | 35,604 <sup>B</sup>                      | 33,458 <sup>B</sup> | 40,437 <sup>B</sup> |
|                            | Hạng trung bình                         | 0,0311                                   | 0,0235              | 0,0270              |
|                            | $\sigma_{\text{intra}}$                 | 6,9773                                   | 5,3259              | 6,0070              |
|                            | % CV <sub>intra</sub>                   |                                          |                     |                     |
|                            | Đối chứng                               |                                          |                     |                     |
|                            | N                                       | 24                                       | 24                  | 24                  |
|                            | Trung bình (OD <sub>450</sub> )         | 0,8522                                   | 0,8423              | 0,8339              |
|                            | Hạng trung bình                         | 150,33 <sup>A</sup>                      | 143,69 <sup>A</sup> | 137,54 <sup>A</sup> |
|                            | $\sigma_{\text{intra}}$                 | 0,0610                                   | 0,0433              | 0,0312              |
|                            | % CV <sub>intra</sub>                   | 7,1611                                   | 5,1412              | 3,7443              |
|                            | Đối chứng + Glycogen                    |                                          |                     |                     |
|                            | N                                       | 24                                       | 24                  | 24                  |
|                            | Trung bình (OD <sub>450</sub> )         | 0,8474                                   | 0,8367              | 0,8051              |
|                            | Hạng trung bình                         | 149,94 <sup>A</sup>                      | 140,06 <sup>A</sup> | 124,58 <sup>A</sup> |
|                            | $\sigma_{\text{intra}}$                 | 0,0358                                   | 0,0576              | 0,0584              |
|                            | % CV <sub>intra</sub>                   | 4,2302                                   | 6,8847              | 7,2482              |
|                            | Hiệu số trung bình (OD <sub>450</sub> ) | -0,0048                                  | -0,0056             | -0,0288             |
|                            | Hiệu số hạng trung bình                 | 0,39                                     | -3,63               | -12,96              |
| Giá trị Z tới hạn          |                                         | 3,197                                    |                     |                     |
| Giá trị tới hạn để so sánh |                                         | 55,547 đến 62,103                        |                     |                     |

Bảng 42. Các giá trị OD<sub>450</sub> trung bình thu được đối với sản phẩm MYCOSORB khi được trộn với 0, 50, 100, 200% (theo khối lượng) laminarin trong thức ăn cho gà. Sự khác nhau giữa các giá trị được phân tích bằng cách thức ANOVA một chiều và kiểm định thống kê so sánh trung bình với khoảng tin cậy 95%.

| MYCOSORB 1 kg/T |                                                                                                                                  | MYCOSORB / Tỷ lệ nhiều (theo khối lượng)                 |                                                          |                                                          |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|                 |                                                                                                                                  | + 50 %                                                   | + 100 %                                                  | + 200 %                                                  |
| ANOVA           |                                                                                                                                  | Phi tham số một chiều Kruskal-Wallis                     |                                                          |                                                          |
| Laminarin       | Mẫu trống (Chỉ có thức ăn)<br>N<br>Trung bình (OD <sub>450</sub> )<br>Hạng trung bình<br>$\sigma$ intra<br>% CV <sub>intra</sub> | 24<br>0,3580<br>37,88 <sup>DE</sup><br>0,0428<br>11,951  | 24<br>0,3478<br>31,15 <sup>E</sup><br>0,0522<br>14,998   | 24<br>0,3673<br>40,48 <sup>DE</sup><br>0,0553<br>15,063  |
|                 | Đối chứng<br>N<br>Trung bình (OD <sub>450</sub> )<br>Hạng trung bình<br>$\sigma$ intra<br>% CV <sub>intra</sub>                  | 24<br>0,5618<br>126,96 <sup>BC</sup><br>0,0488<br>8,6916 | 24<br>0,5981<br>157,79 <sup>AB</sup><br>0,0229<br>3,8358 | 24<br>0,5224<br>94,708 <sup>CD</sup><br>0,0233<br>4,4521 |
|                 | Đối chứng + Laminarin<br>N<br>Trung bình (OD <sub>450</sub> )<br>Hạng trung bình<br>$\sigma$ intra<br>% CV <sub>intra</sub>      | 24<br>0,6288<br>187,33 <sup>A</sup><br>0,0245<br>3,8924  | 24<br>0,5630<br>125,50 <sup>BC</sup><br>0,0341<br>6,0501 | 24<br>0,6155<br>174,21 <sup>AB</sup><br>0,0312<br>5,0624 |
|                 | Hiệu số trung bình (OD <sub>450</sub> )<br>Hiệu số hạng trung bình                                                               | -0,0670<br>60,37 *                                       | -0,0351<br>-32,29                                        | 0,0931<br>79,502 *                                       |
|                 | Giá trị Z tới hạn                                                                                                                | 3,197                                                    |                                                          |                                                          |
|                 | Giá trị tới hạn để so sánh                                                                                                       | 57,68                                                    |                                                          |                                                          |
|                 |                                                                                                                                  |                                                          |                                                          |                                                          |

Bảng 43. Các giá trị OD<sub>450</sub> trung bình thu được đối với sản phẩm MYCOSORB khi được trộn với 0, 50, 100, 200% (theo khối lượng) nấm men rượu vang RED STAR trong thức ăn cho gà. Sự khác nhau giữa các giá trị được phân tích bằng cách thức ANOVA một chiều và kiểm định thống kê so sánh trung bình với khoảng tin cậy 95%.

| MYCOSORB 1 kg/T            |                                         | MYCOSORB / Tỷ lệ nhiều (theo khối lượng) |                     |                     |
|----------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|---------------------|---------------------|
|                            |                                         | + 50 %                                   | + 100 %             | + 200 %             |
| ANOVA                      |                                         | Phi tham số một chiều Kruskal-Wallis     |                     |                     |
| Nấm men rượu vang          | Mẫu trống (Chỉ có thức ăn)              |                                          |                     |                     |
|                            | N                                       | 24                                       | 24                  | 24                  |
|                            | Trung bình (OD <sub>450</sub> )         | 0,3533                                   | 0,3396              | 0,3490              |
|                            | Hạng trung bình                         | 41,75 <sup>B</sup>                       | 29,90 <sup>B</sup>  | 37,85 <sup>B</sup>  |
|                            | $\sigma$ intra                          | 0,0240                                   | 0,0205              | 0,0261              |
|                            | % CV <sub>intra</sub>                   | 6,7991                                   | 6,0454              | 7,4902              |
|                            | Đối chứng                               |                                          |                     |                     |
|                            | N                                       | 24                                       | 24                  | 24                  |
|                            | Trung bình (OD <sub>450</sub> )         | 0,6223                                   | 0,5566              | 0,5846              |
|                            | Hạng trung bình                         | 169,90 <sup>A</sup>                      | 117,38 <sup>A</sup> | 135,13 <sup>A</sup> |
|                            | $\sigma$ intra                          | 0,0534                                   | 0,0546              | 0,0413              |
|                            | % CV <sub>intra</sub>                   | 8,5726                                   | 9,8003              | 7,0725              |
|                            | Đối chứng + Nấm men Red Star®           |                                          |                     |                     |
|                            | N                                       | 24                                       | 24                  | 24                  |
|                            | Trung bình (OD <sub>450</sub> )         | 0,5977                                   | 0,6098              | 0,5950              |
|                            | Hạng trung bình                         | 145,65 <sup>A</sup>                      | 156,17 <sup>A</sup> | 142,79 <sup>A</sup> |
|                            | $\sigma$ intra                          | 0,0257                                   | 0,0253              | 0,0274              |
|                            | % CV <sub>intra</sub>                   | 4,2986                                   | 4,1468              | 4,6038              |
|                            | Hiệu số trung bình (OD <sub>450</sub> ) | -0,0246                                  | 0,0532              | 0,0104              |
|                            | Hiệu số hạng trung bình                 | -24,25                                   | 38,79               | 7,66                |
| Giá trị Z tới hạn          |                                         | 3,197                                    |                     |                     |
| Giá trị tới hạn để so sánh |                                         | 57,68                                    |                     |                     |

Bảng 44. Các giá trị OD<sub>450</sub> trung bình thu được đối với sản phẩm MYCOSORB khi được trộn với 0, 50, 100, 200% (theo khối lượng) bã khô chung cất rượu trong thức ăn cho gà. Sự khác nhau giữa các giá trị được phân tích bằng cách thức ANOVA một chiều và kiểm định thống kê so sánh trung bình với khoảng tin cậy bằng 95%.

| MYCOSORB 1 kg/T     |                                 | MYCOSORB / Tỷ lệ nhiều (theo khối lượng) |                      |                      |
|---------------------|---------------------------------|------------------------------------------|----------------------|----------------------|
|                     |                                 | + 50 %                                   | + 100 %              | + 200 %              |
| ANOVA               |                                 | Phi tham số một chiều Kruskal-Wallis     |                      |                      |
| DDG                 | Mẫu trống (Chỉ có thức ăn)      |                                          |                      |                      |
|                     | N                               | 24                                       | 24                   | 24                   |
|                     | Trung bình (OD <sub>450</sub> ) | 0,3504                                   | 0,3465               | 0,3458               |
|                     | Hạng trung bình                 | 38,81 <sup>C</sup>                       | 35,85 <sup>C</sup>   | 34,83 <sup>C</sup>   |
|                     | $\sigma_{\text{intra}}$         | 0,0464                                   | 0,0515               | 0,0510               |
|                     | % CV <sub>intra</sub>           | 13,228                                   | 14,858               | 14,744               |
|                     | Đối chứng                       |                                          |                      |                      |
|                     | N                               | 24                                       | 24                   | 24                   |
|                     | Trung bình (OD <sub>450</sub> ) | 0,8338                                   | 0,7825               | 0,7793               |
|                     | Hạng trung bình                 | 151,46 <sup>AB</sup>                     | 108,19 <sup>B</sup>  | 129,58 <sup>AB</sup> |
|                     | $\sigma_{\text{intra}}$         | 0,0411                                   | 0,0240               | 0,0934               |
|                     | % CV <sub>intra</sub>           | 4,9341                                   | 3,0669               | 11,990               |
|                     | Đối chứng + DDG                 |                                          |                      |                      |
|                     | N                               | 24                                       | 24                   | 24                   |
|                     | Trung bình (OD <sub>450</sub> ) | 0,8476                                   | 0,8136               | 0,8741               |
|                     | Hạng trung bình                 | 162,73 <sup>AB</sup>                     | 134,40 <sup>AB</sup> | 180,65 <sup>A</sup>  |
|                     | $\sigma_{\text{intra}}$         | 0,0382                                   | 0,0489               | 0,0465               |
|                     | % CV <sub>intra</sub>           | 4,5019                                   | 6,0098               | 5,3191               |
| Hiệu số             |                                 | 0,0138                                   | 0,0311               | 0,0948               |
|                     |                                 | 11,27                                    | 26,21                | 51,07                |
| Giá trị tới hạn     |                                 | 3,197                                    |                      |                      |
| $\sigma$ để so sánh |                                 | 57,68                                    |                      |                      |

Tất cả các tài liệu công bố và patent được đề cập trong phần mô tả ở trên đều được đưa vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn. Các cải biến và biến đổi khác nhau đối với các phương pháp và hệ thống theo sáng chế như đã được mô tả là sẽ rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này mà không đi trạch khỏi phạm vi của sáng chế. Mặc dù sáng chế đã được mô tả liên quan đến các phương án được ưu tiên cụ thể, nhưng cần phải hiểu rằng sáng

chế như được yêu cầu bảo hộ không bị giới hạn ở các phương án cụ thể này. Trên thực tế, các cải biến khác nhau đối với các cách thức thực hiện sáng chế như đã được mô tả mà rõ ràng với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hóa học hydrat cacbon, vi sinh vật học, thức ăn và dinh dưỡng cho động vật, miễn dịch học, hoặc các lĩnh vực có liên quan được dự định là nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ sau đây.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phát hiện thành phần của thành tế bào nấm men trong mẫu, bao gồm các bước:

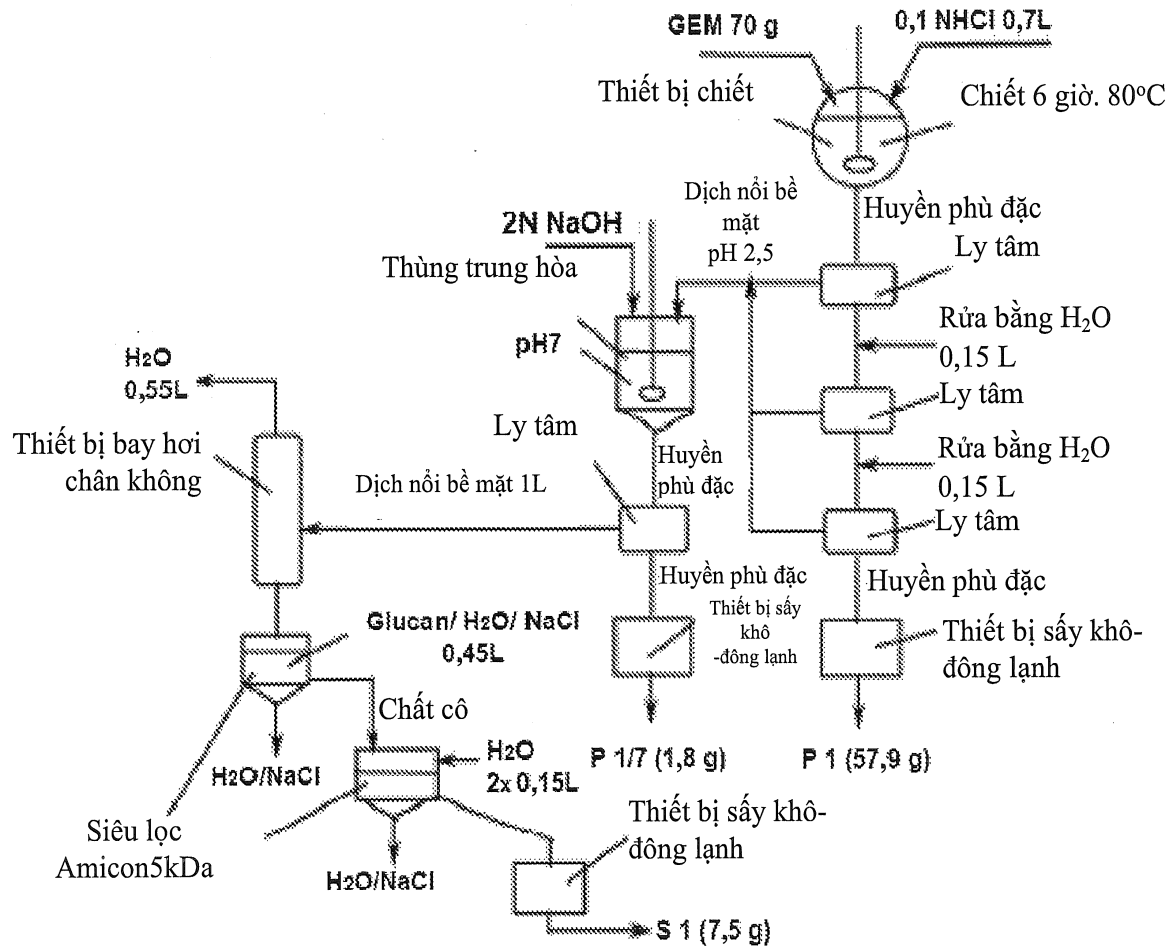
- cung cấp mẫu thực phẩm hoặc thức ăn được chọn từ nhóm bao gồm thức ăn cho gia súc gia cầm, thức ăn cho động vật bầu bạn, khẩu phần hỗn hợp hoàn chỉnh (TMR), thức ăn cho súc vật, viên thức ăn, thức ăn cô đặc, đồng sản phẩm thức ăn trộn sẵn, ngũ cốc, bã chưng cất rượu, rỉ đường, chất xơ, cỏ khô cho súc vật ăn, cỏ, cỏ khô, hạt, lá, bột xay thô, thức ăn hòa tan, và các chất chiết của nó;

- tiến hành thử nghiệm bao gồm việc cho kháng thể sơ cấp có khả năng liên kết với kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm (1→4)- $\alpha$ -D-glucan, (1→6)- $\beta$ -D-glucan, và (1→4)- $\alpha$ /(1→6)- $\beta$ -D-glucan tiếp xúc với mẫu trong các điều kiện sao cho kháng thể sơ cấp này tạo thành phức hợp với kháng nguyên, nếu có mặt; và sử dụng kháng thể thứ cấp để phát hiện phức hợp kháng thể sơ cấp - kháng nguyên, trong đó việc phát hiện phức hợp kháng thể sơ cấp - kháng nguyên này đưa ra chỉ báo về sự có mặt của thành phần của thành tế bào nấm men trong mẫu.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm việc thu chất chiết từ mẫu bằng cách sử dụng dung môi hữu cơ và axit.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm việc thu chất chiết từ mẫu bằng cách sử dụng dimethylsulfoxit và axit clohydric.

FIG.1



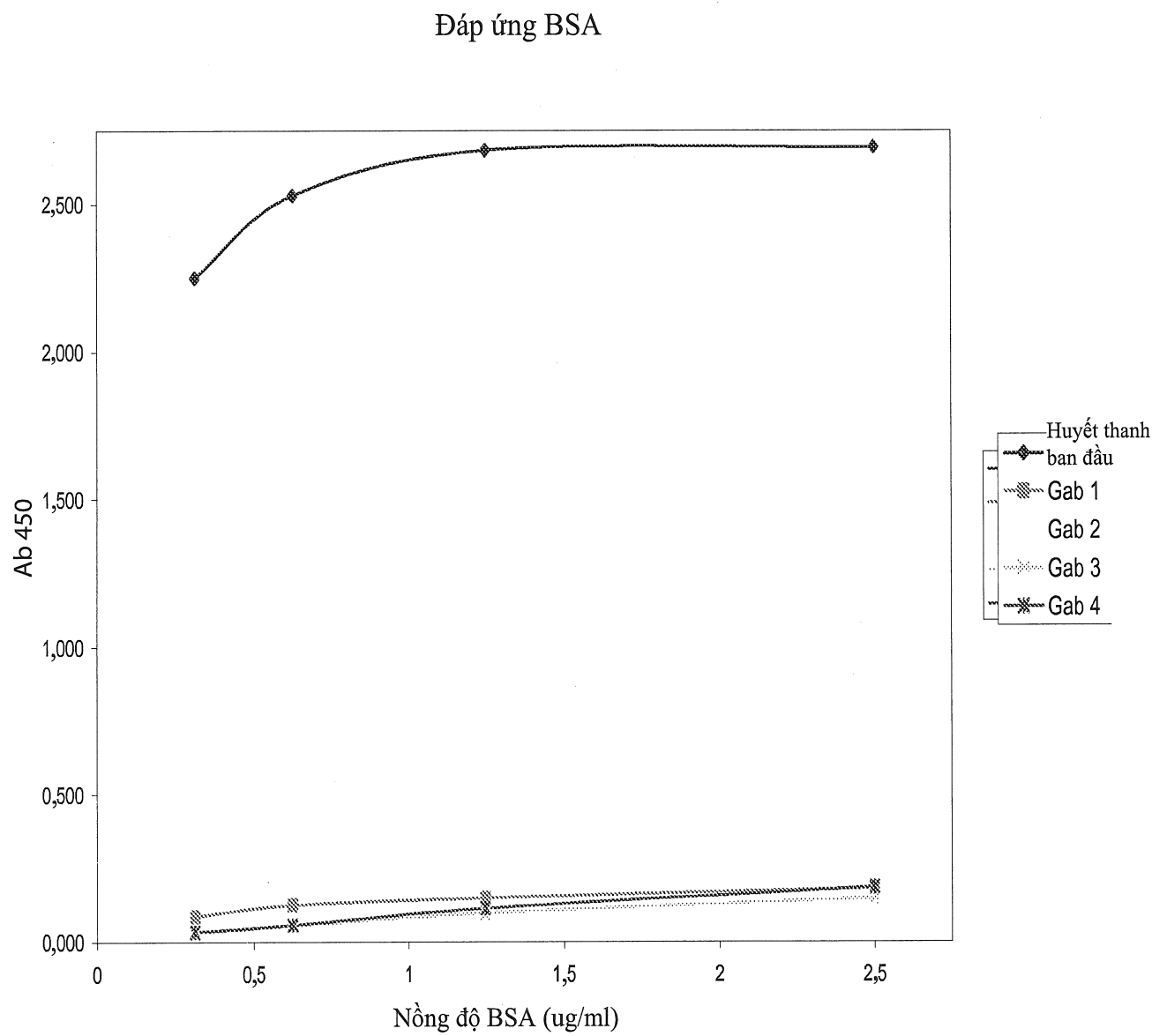
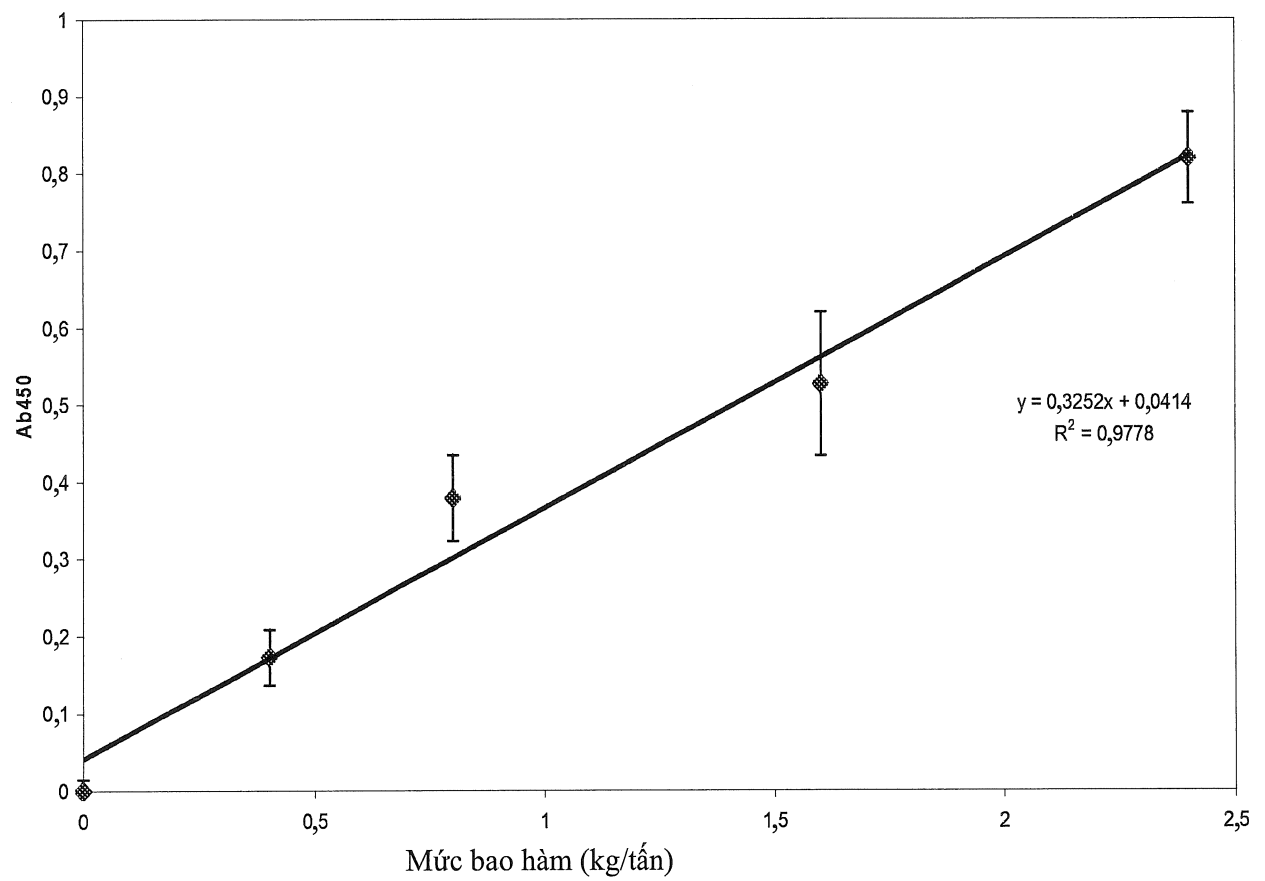
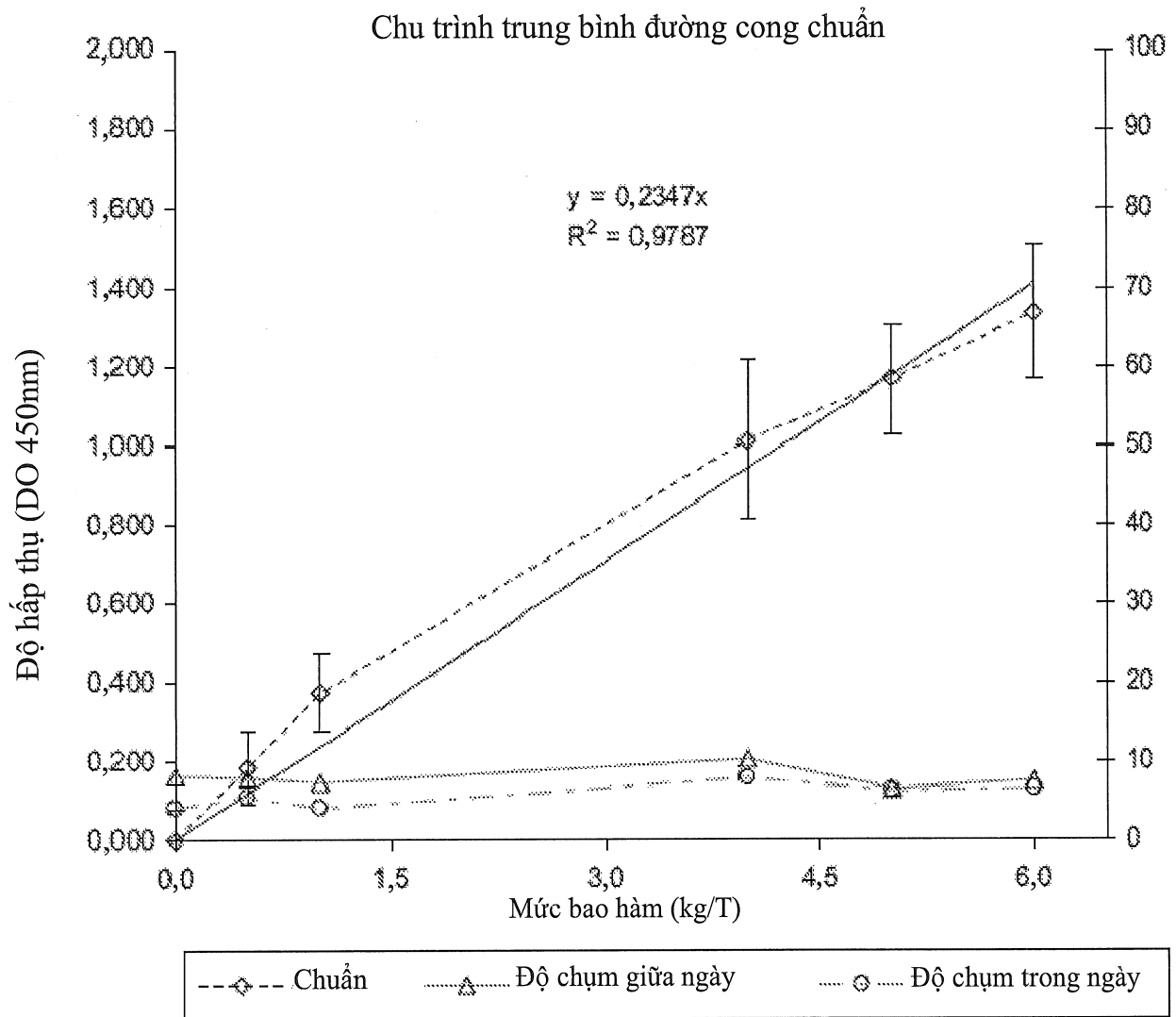
**FIG.2**

FIG.3

Đáp ứng G Ab 1+2: Đường cong chuẩn



**FIG.4**

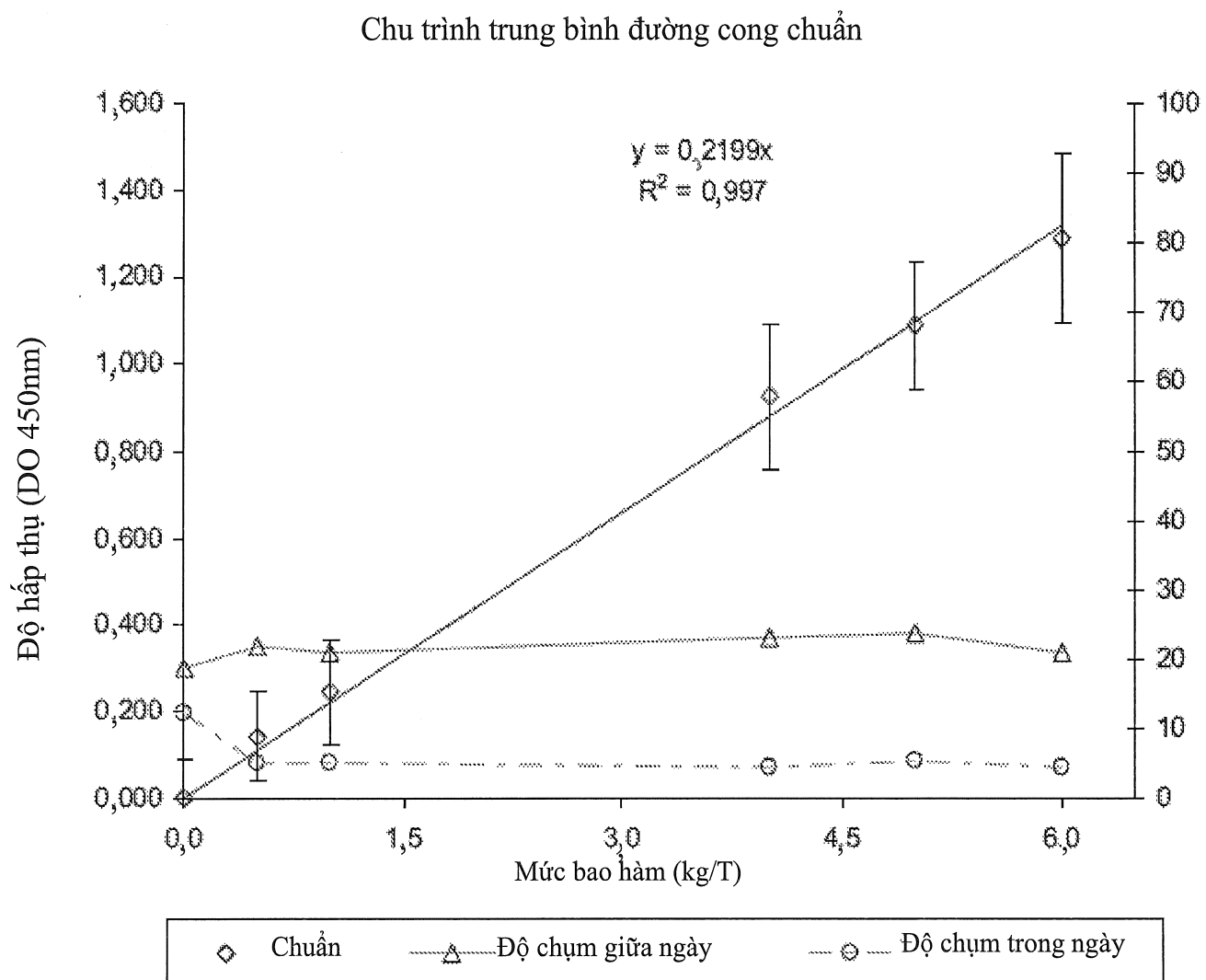
**FIG.5**

FIG.6

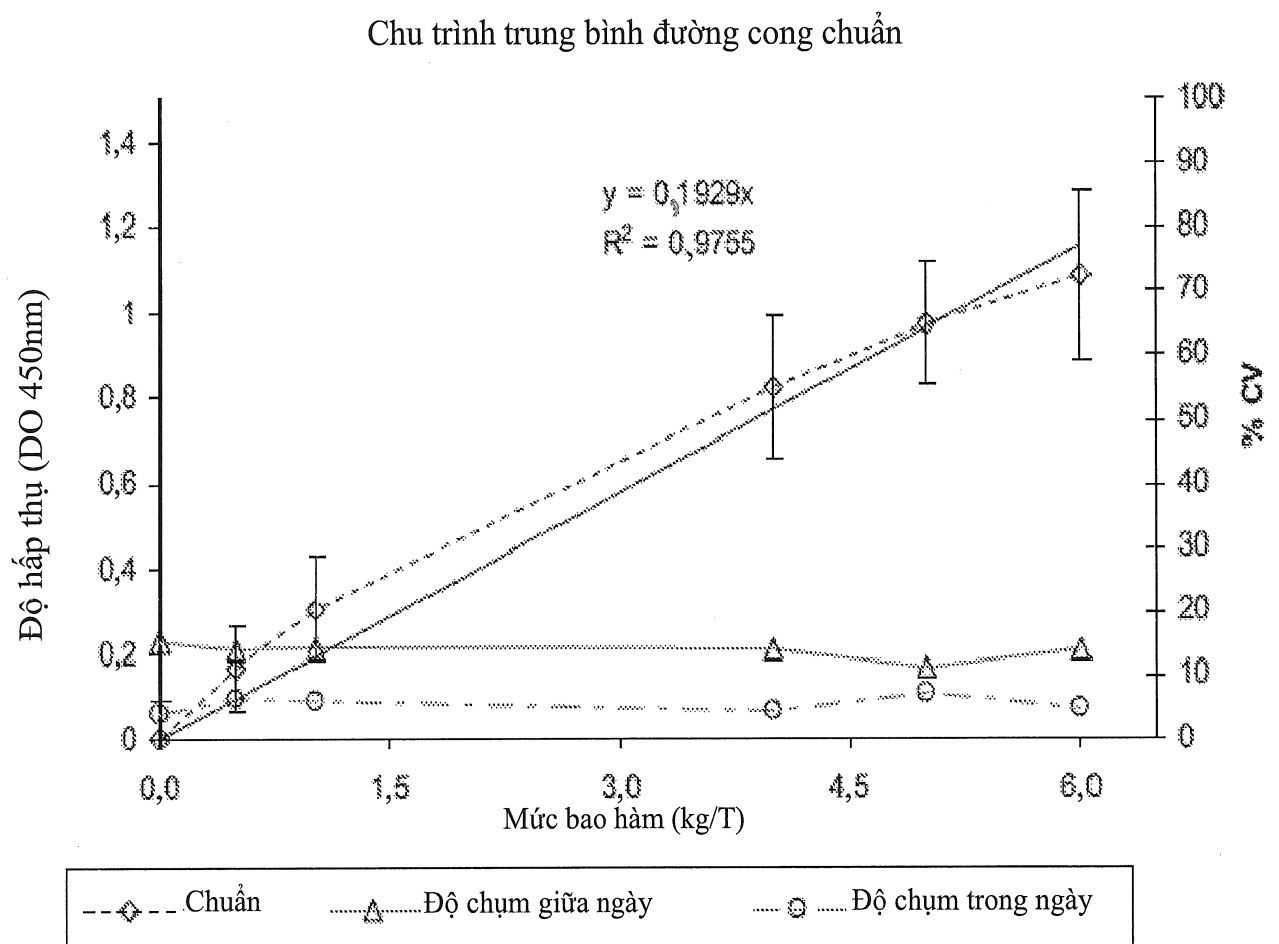
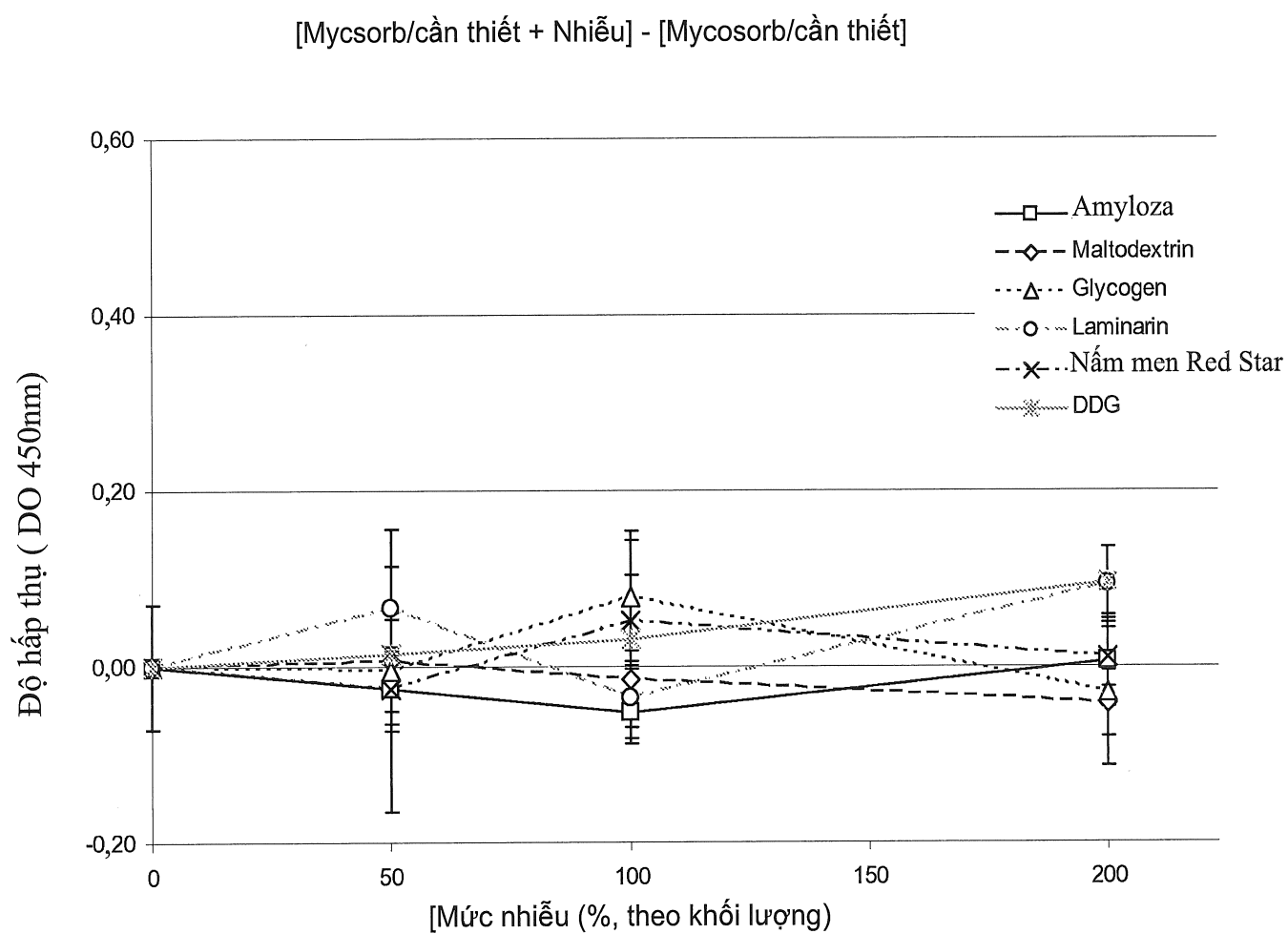


FIG.7



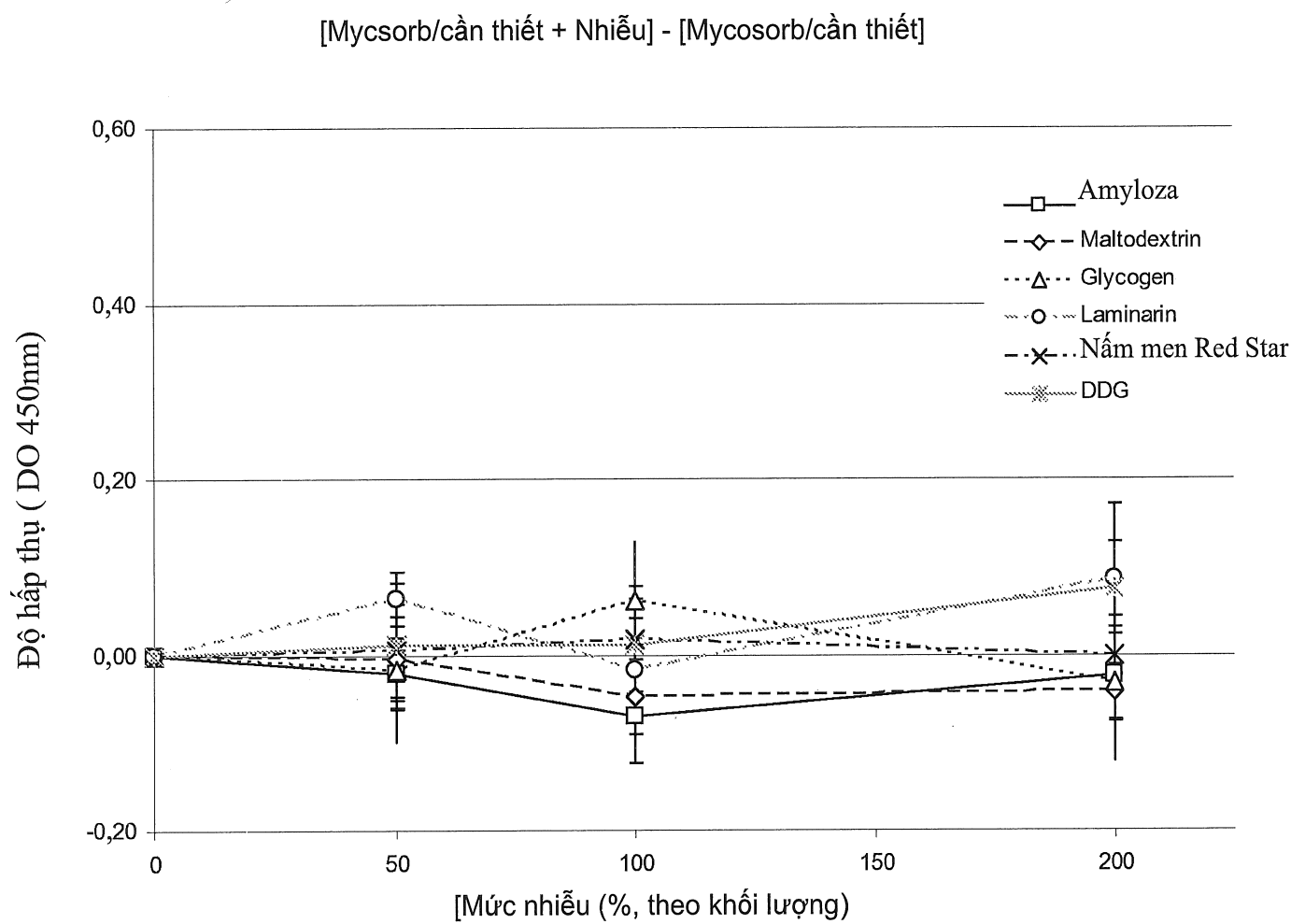
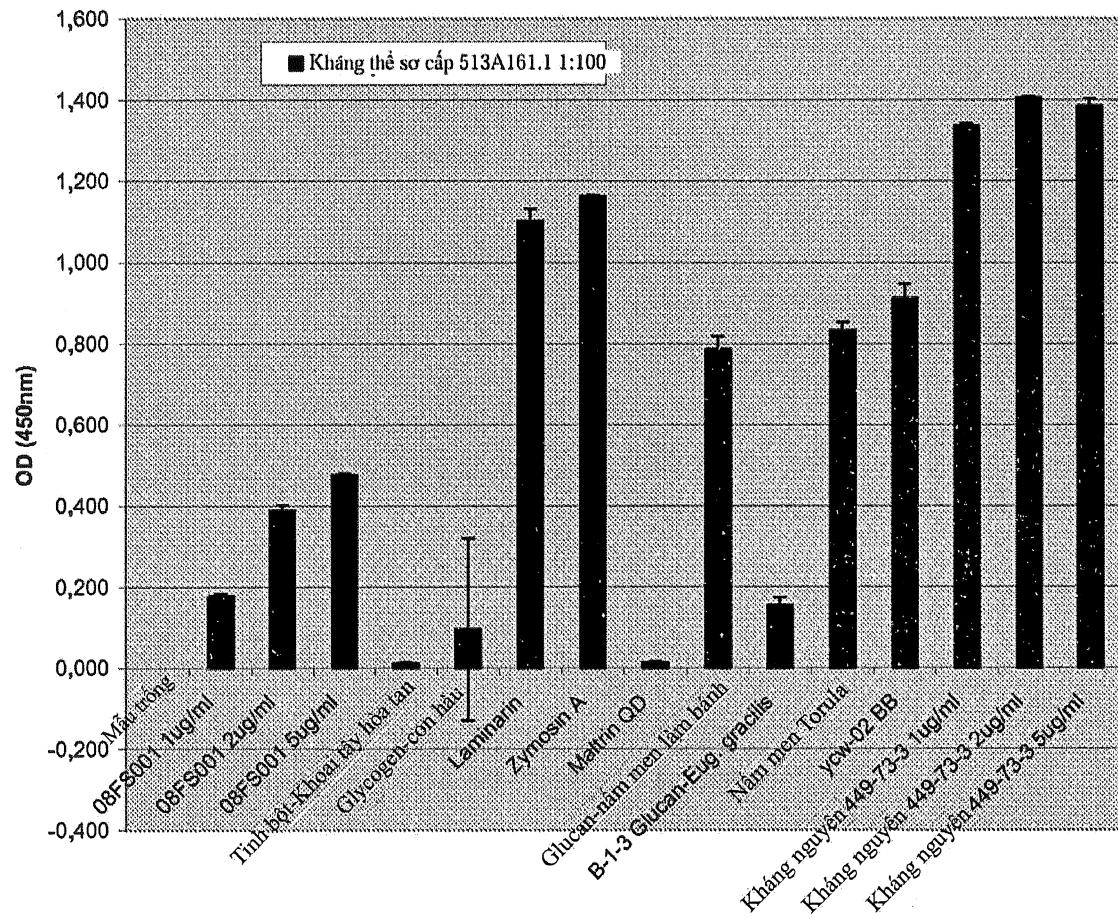
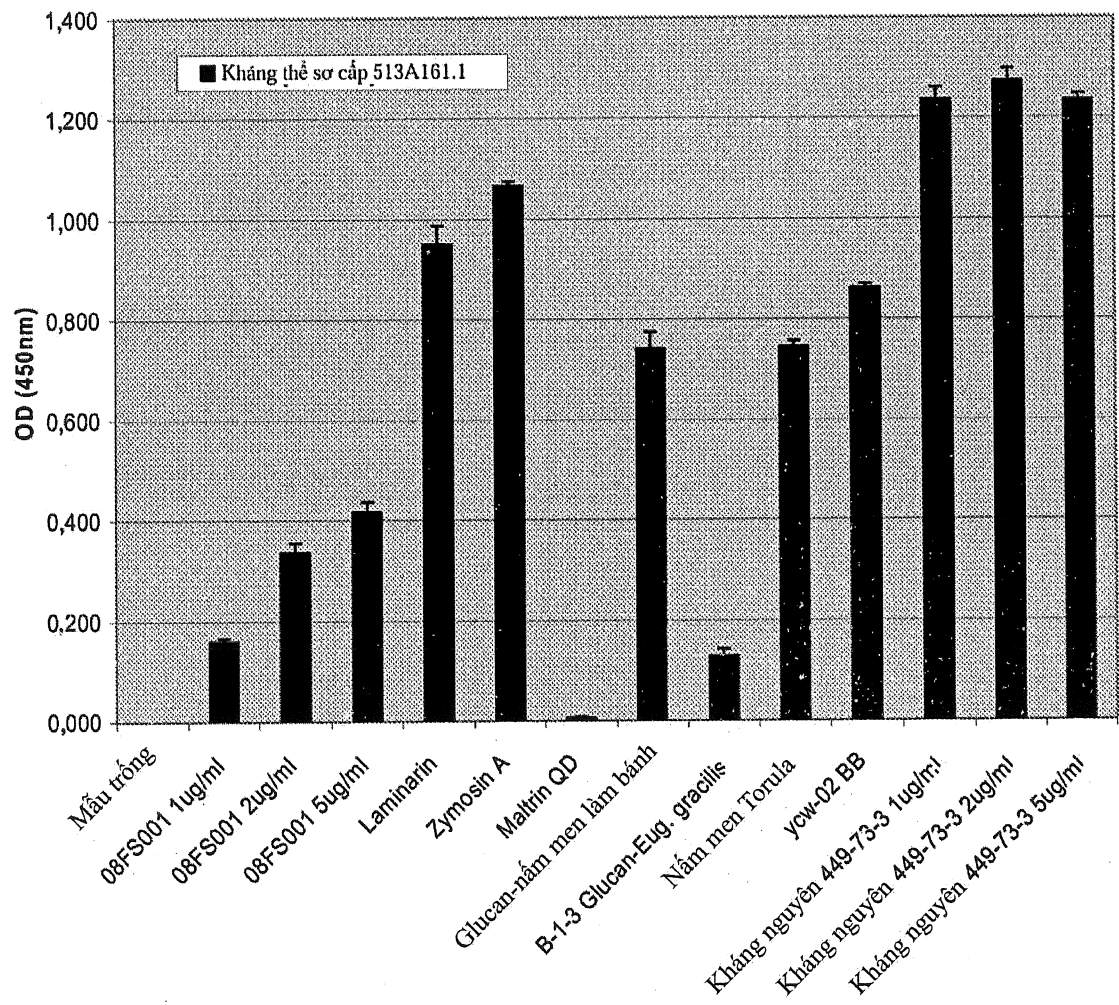
**FIG.8**

FIG.9



1:100

**FIG.9 TIẾP**

1:200

FIG.10

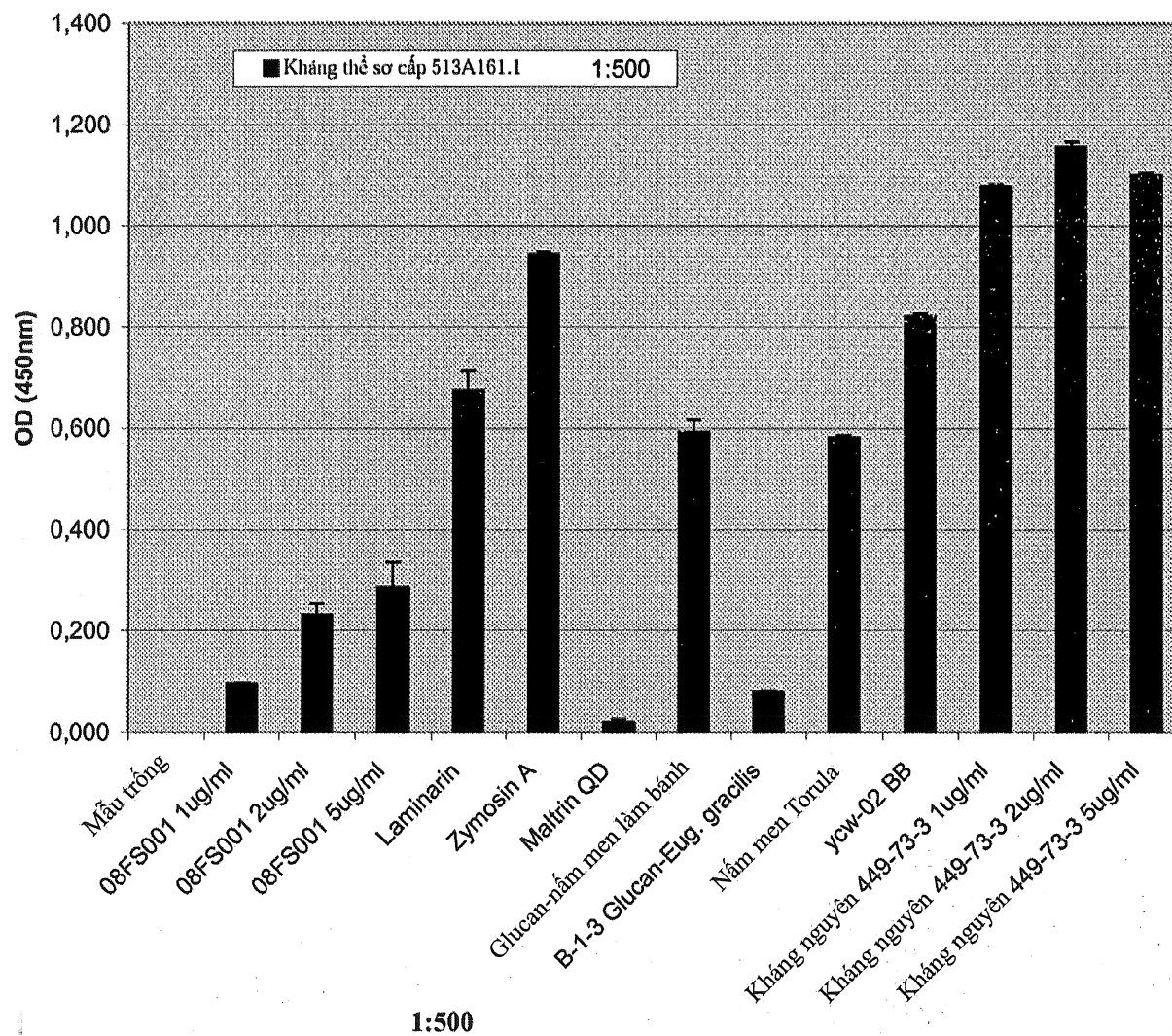


FIG.10 TIẾP

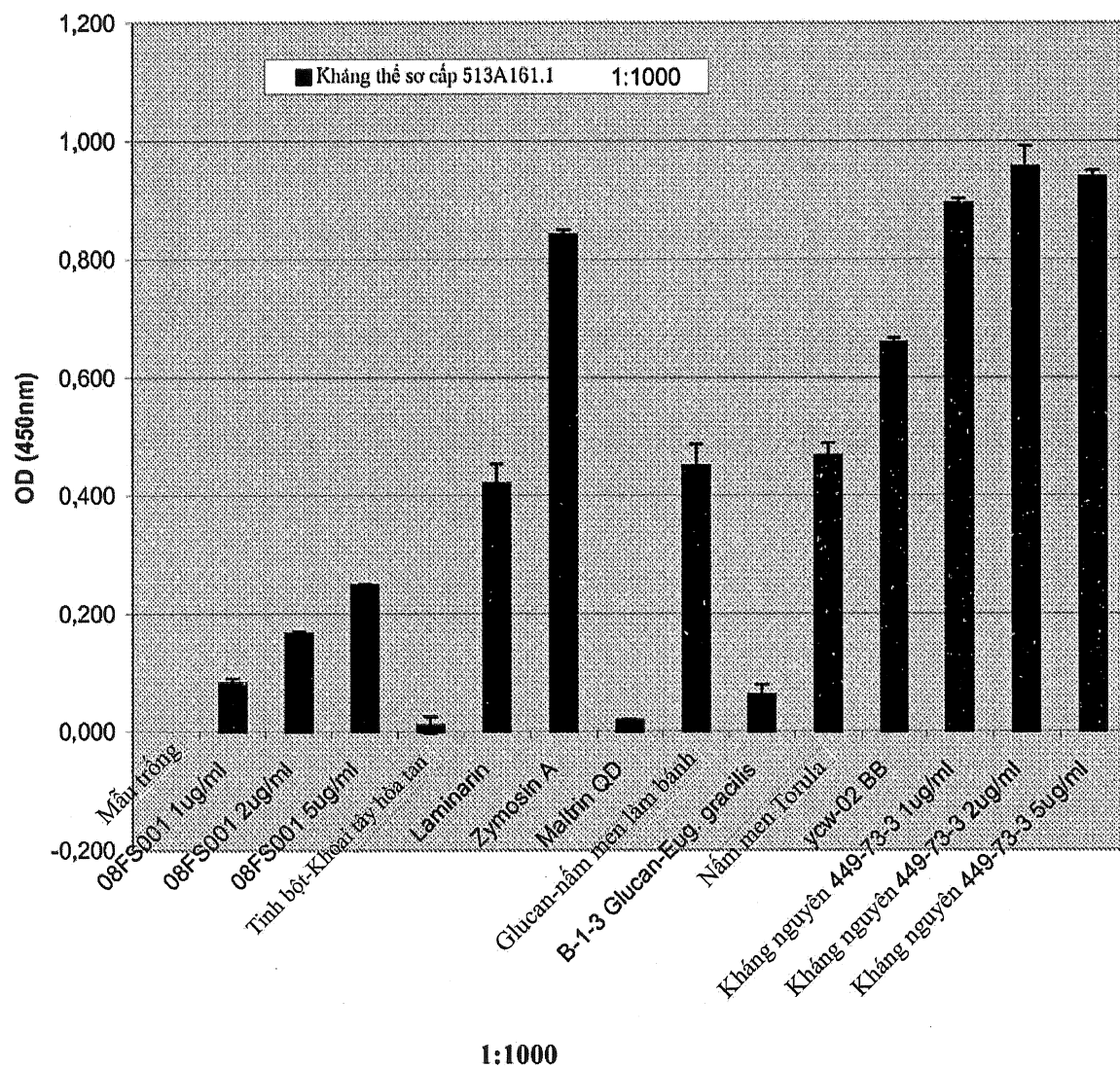
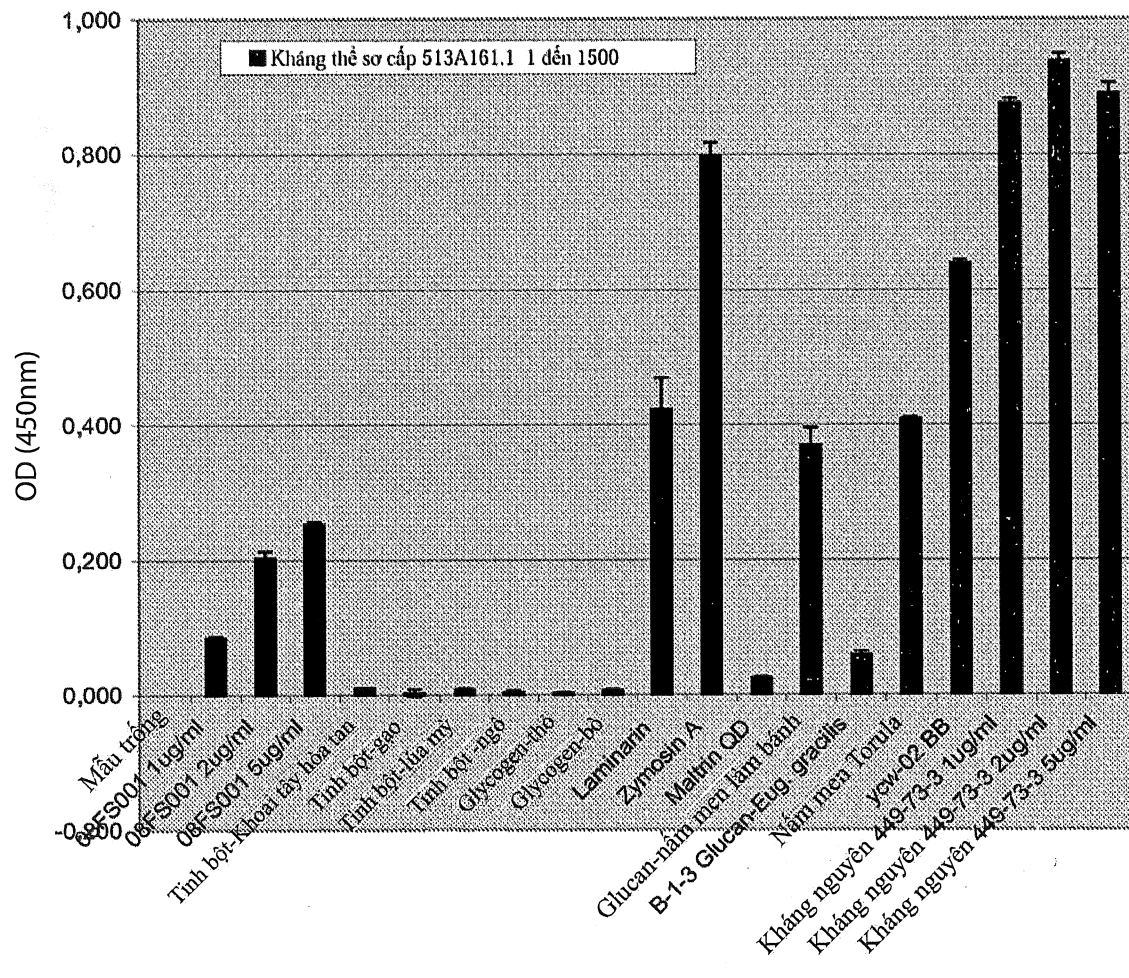
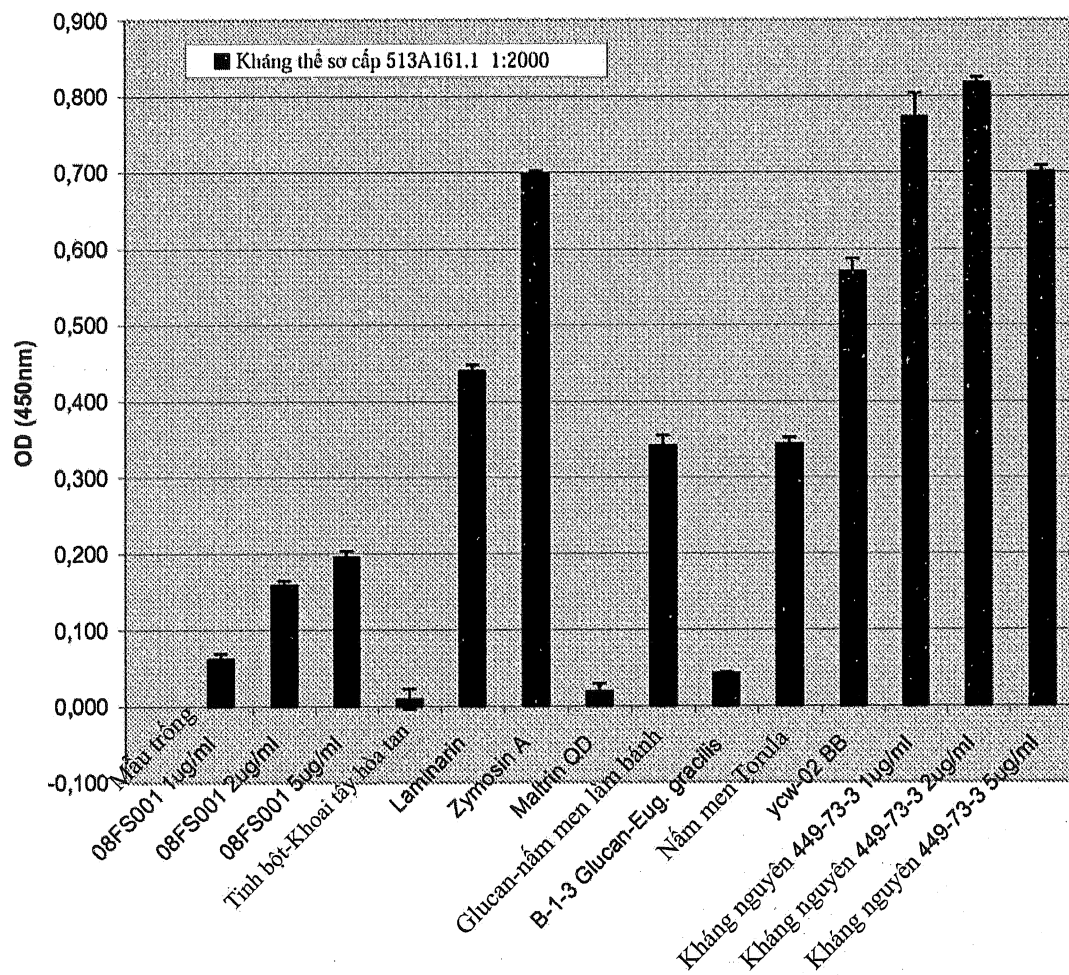


FIG.11



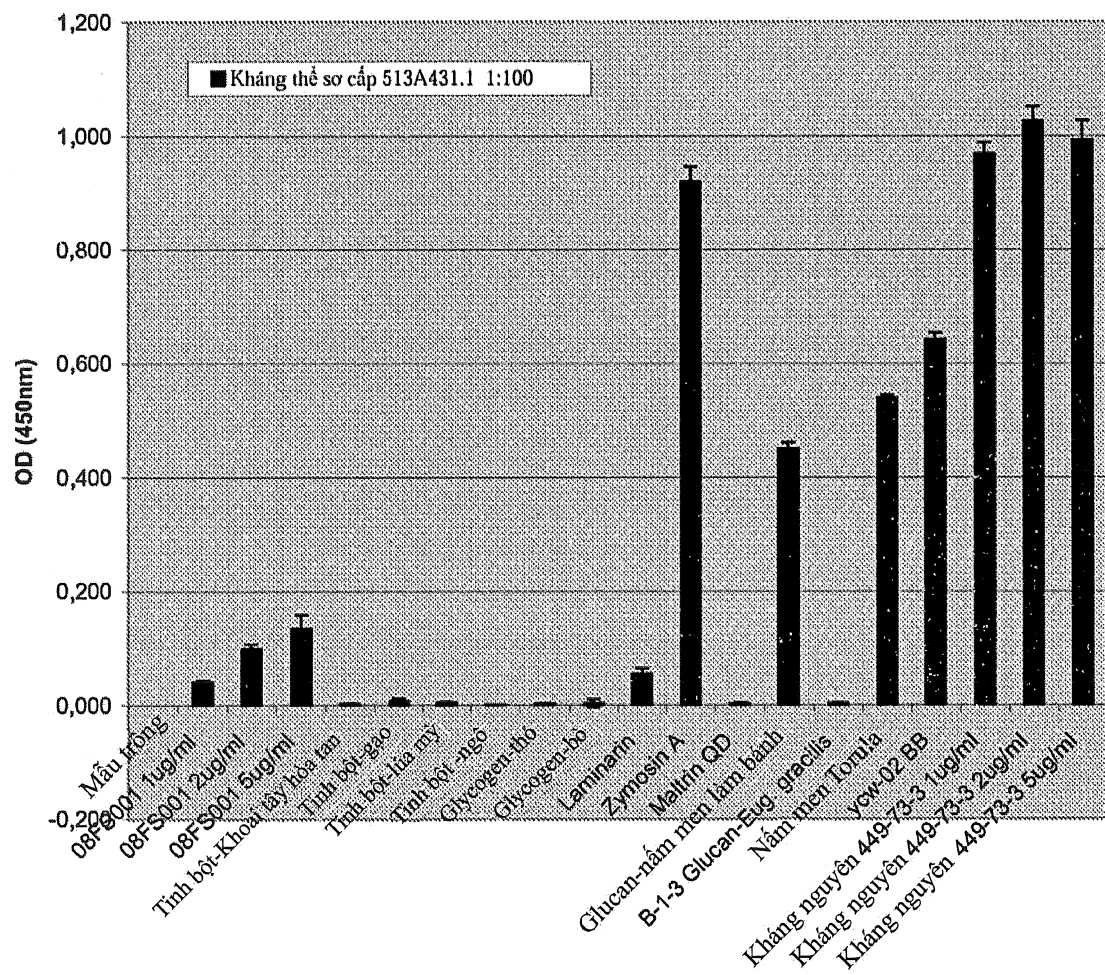
1:1500

FIG.11 TIẾP



1:2000

FIG.12



1:100

FIG.12 TIẾP

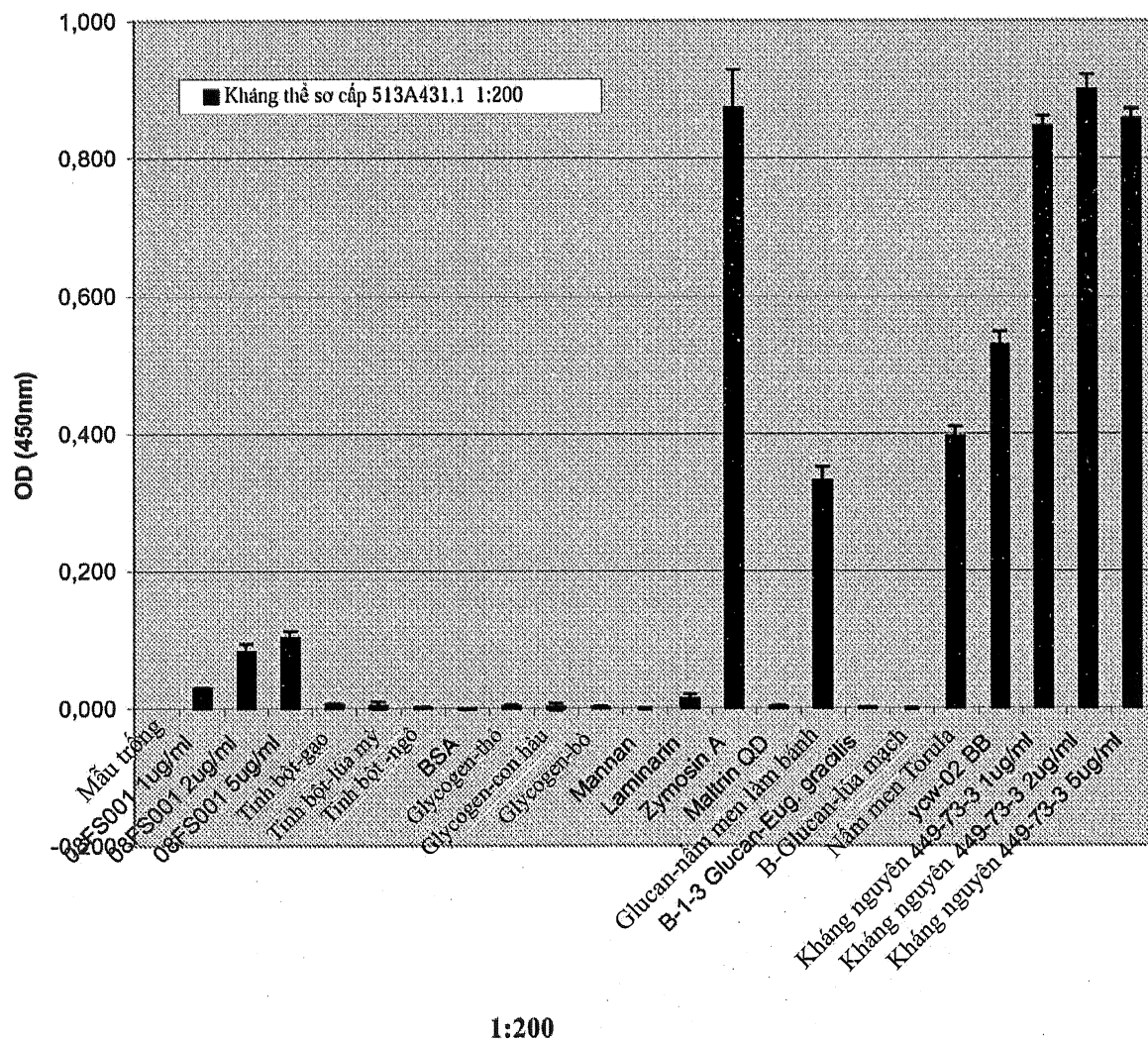


FIG.13

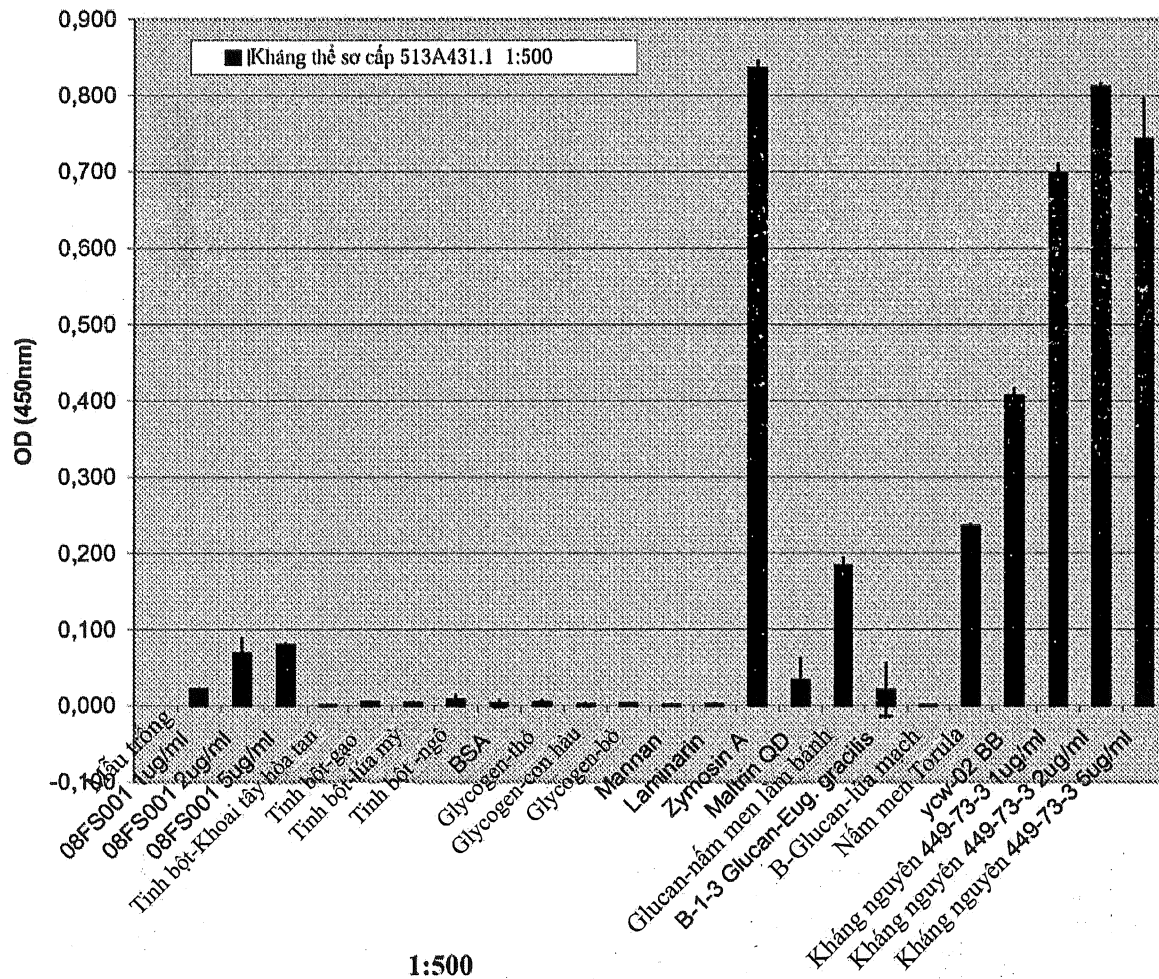


FIG.13 TIẾP

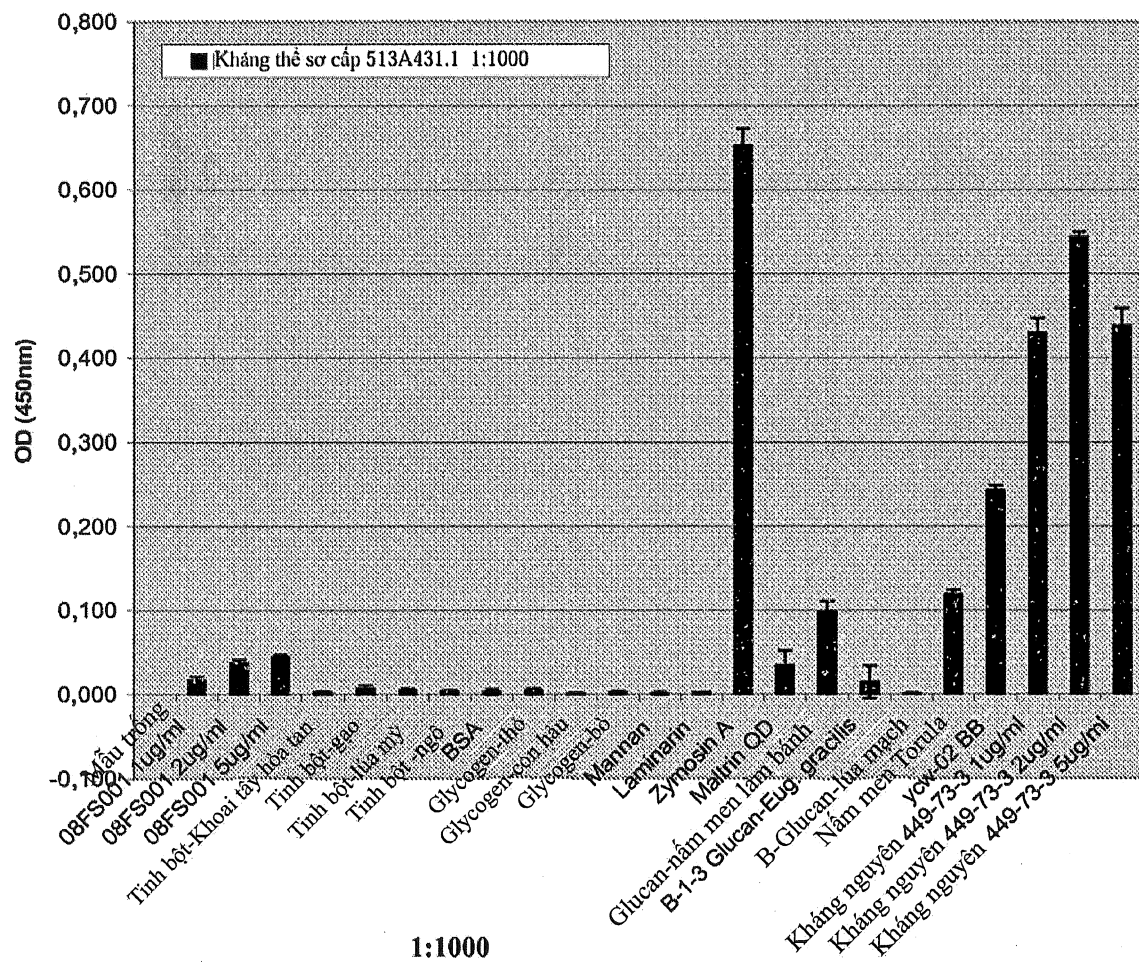


FIG.14

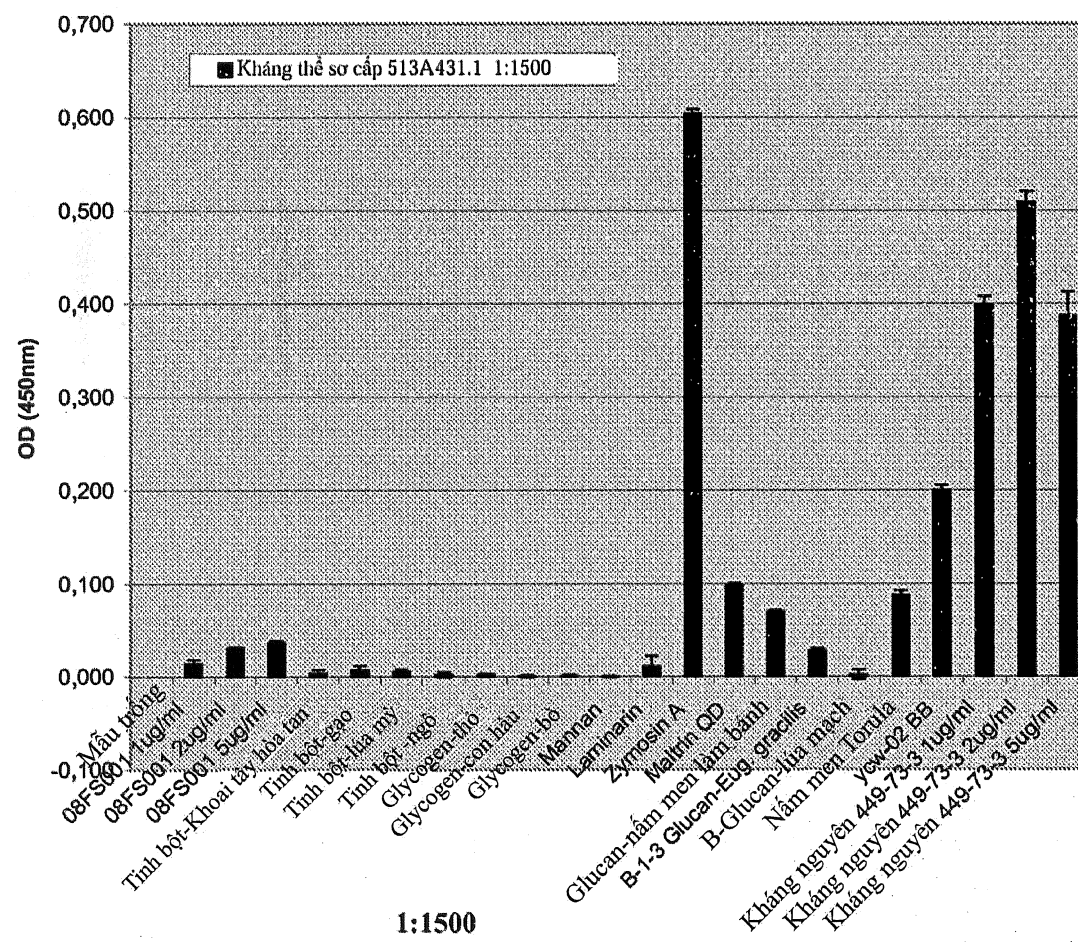


FIG.14 TIẾP

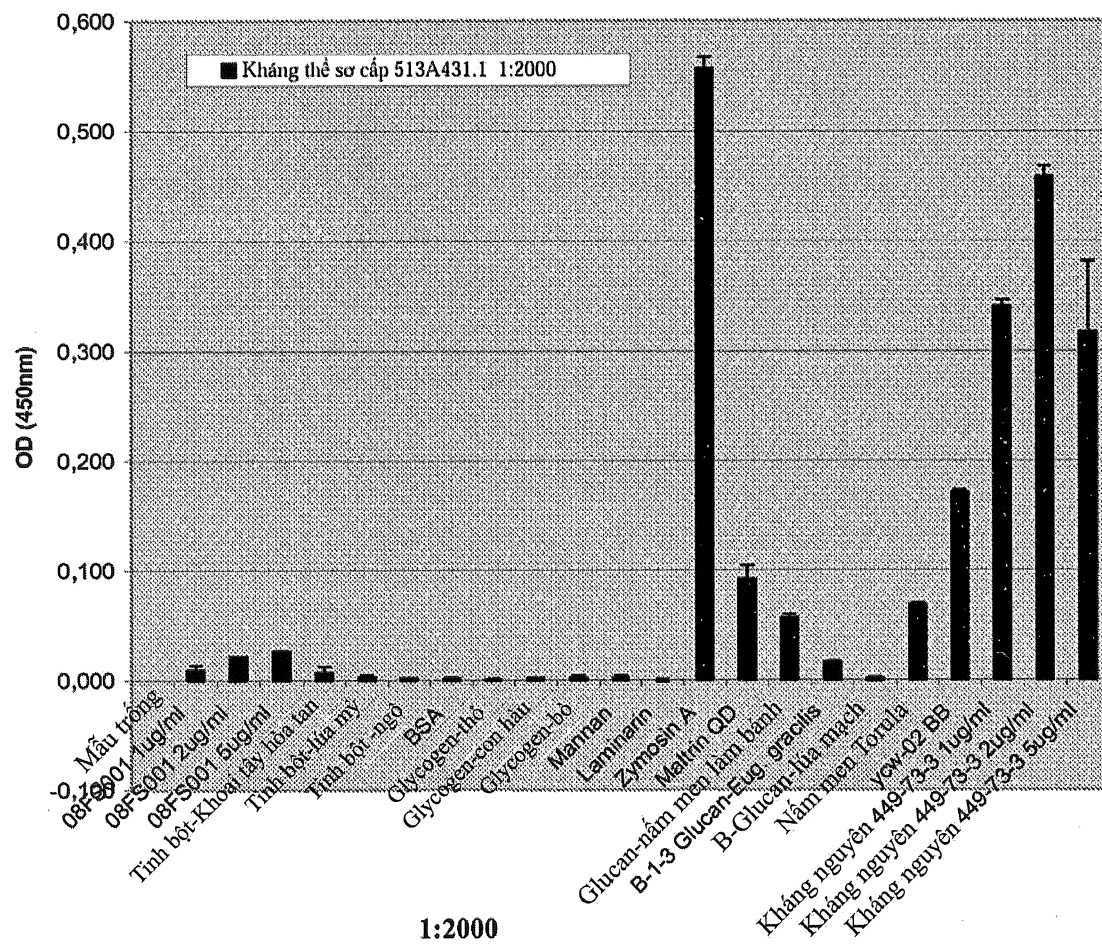


FIG.15

Lựa chọn pha loãng kháng thể và sự thay đổi pH trong dung dịch chiết

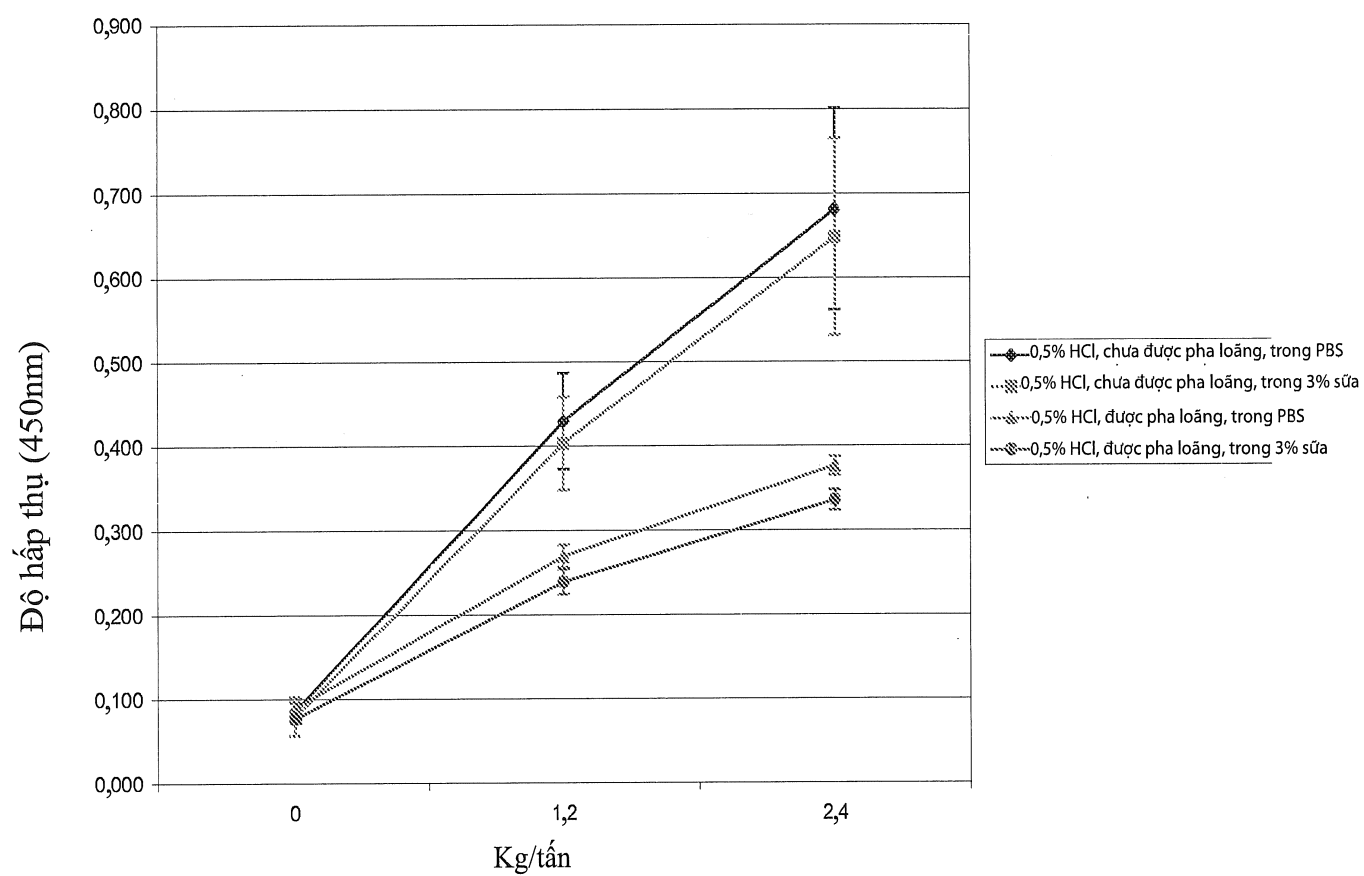


FIG.16

Tối ưu hóa thời gian phủ và nhiệt độ ủ

