



No. 12-012902- -00000-0000

Fecha: 2012-01-27 16:21:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 261

Act. 411 PRESENTACION Folios: 515



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO ADHERENCIA Y ANTIADHERENCIA BACTERIANA A MUCOSIDAD,
CELULAS EPITELIALES Y OTRAS CELULAS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE ALLTECH, INC.

DOMICILIO 3031 CATNIP HILL PIKE NICHOLASVILLE, KENTUCKY 40356, U.S

74. APODERADO ALVARO CORREA ORODNEZ

22. BOGOTÁ, D. C., ENERO 27, 2011

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITOR

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-012902- -00000-0000

Fecha: 2012-01-27 16:21:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 261

Act. 411 PRESENTACION Folios: 515

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE :

X

Patente de Invención

X

Capítulo I.

Patente de Modelo de Utilidad

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: ALLTECH, INC.

Dirección: 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356, US.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No. 10-62 Piso 6

Teléfono: 6341500

Fax: 3762211

E-Mail: office.bogota@bakermckenzie.com

IDENTIFICACION

C.C.

NIT

C.E.

Otro

Cual

Número 79.143.366 Usaquén TP 20281

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: DAWSON, Karl, A.; MORAN, Colm; APAJALAHTI, Juha; LAURAEUS, Marko

Dirección: 4877 Wyndhurst Lexington, KY 40515 (US); 10 chemin de Groupède F-13600 La Ciotat (FR); Kytöniityntie 24C FIN-00670 Helsinki (FI); Paulatie 12 FIN-03100 Nummela (FI)

Nacionalidad o Domicilio: Estados unidos de América, Francia y Finlandia (Respectivamente)

5

PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2010/041396

Fecha 08.07.2010

Publicación Internacional No. WO2011/005982

Fecha 13.01.2011

6

Título (54)

ADHERENCIA Y ANTIADHERENCIA BACTERIANA A MUCOSIDAD, CÉLULAS EPITELIALES Y OTRAS CÉLULAS

7

Clasificación Internacional (51)

C12Q 1/00; G01N 33/00

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

08-07-2009

61/223,755

SI

X

NO

9

Comprobante de pago No.

12-003773 - 12-003774 - 12-003821

Fecha 13-01-2012

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Extractos

11

FIGURA CARATERISTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

2012/001

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 003773
		Bogotá D.C., Enero 13 de 2012 - 16:51:56

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411692610	12/01/2012	71.172.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-012902- -00000-0000

Fecha: 2012-01-27 16:21:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 261

TRA. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 515

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 13 de 2012 - 16:52:25

4
2012/001

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 003774

Bogotá D.C., Enero 13 de 2012 - 16:51:56

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE

NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411692610	12/01/2012	71.176.000.00

*** Conceptos Pagados ***

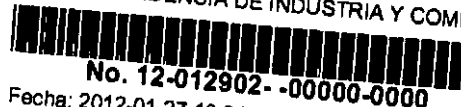
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
				\$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-012902- -00000-0000

Fecha: 2012-01-27 16:21:49
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 261Fecha: 2012-01-27
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACIONEve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 515

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.slc.gov.co e-mail: Info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 13 de 2012 - 16:52:25

2012/001

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 12 - 003821

Bogotá D.C., Enero 13 de 2012 - 16:51:56

RECIBIDO DE : BAKER & MCKENZIE

NI 900.034.906

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411692610	12/01/2012	71.78.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-02	PRORROGAS Y RENOVACIONES	30 PRORROGAS Y RENOVACIONES	820.000.00
				820.000.00
				\$820.000.00

SON: **OCHOCIENTOS VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 12-012902- -00000-0000

Fecha: 2012-01-27 16:21:49

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 281

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 315

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.slc.gov.co e-mail: info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 13 de 2012 - 16:52:27

EXTRACTOS

 Industria y Comercio		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
SUPERINTENDENCIA		PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐	
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional: C12Q 1/00; G01N 33/00			
(71) Solicitante(s): ALLTECH, INC.			
(72) Inventor(es): DAWSON, Karl, A.; MORAN, Colm; APAJALAHTI, Juha; LAURAEUS, Marko			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) Pais
	61/223,755	08-07-2009	US
(85) Fecha inicio fase nacional: 08-02-2012		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 13-01-2011	
Fecha de presentación de la solicitud: 08-07-2010		N° publicación: WO2011/005982	
No. de solicitud: PCT/US2010/041396			
(54) Título: ADHERENCIA Y ANTIADHERENCIA BACTERIANA A MUCOSIDAD, CÉLULAS EPITELIALES Y OTRAS CÉLULAS			

 Industria y Comercio		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMATICO	
SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION		PCT ☒	MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional: C12Q 1/00; G01N 33/00			
(71) Solicitante(s) ALLTECH, INC.			
(72) Inventor(es): DAWSON, Karl, A.; MORAN, Colm; APAJALAHTI, Juha; LAURAEUS, Marko			
(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/223,755	(32) Fecha 08-07-2009	(33) País US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 08-02-2012		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 08-07-2010 No. de solicitud: PCT/US2010/041396		Fecha: 13-01-2011 No. Publicación: WO2011/005982	
(54) Título: ADHERENCIA Y ANTIADHERENCIA BACTERIANA A MUCOSIDAD, CÉLULAS EPITELIALES Y OTRAS CÉLULAS			
(57) Resumen: La presente invención se refiere de manera general a métodos para detectar, identificar y medir la adherencia bacteriana a mucosidad y células epiteliales. En particular, la presente invención proporciona ensayos para detectar e identificar la presencia o ausencia de adherencia bacteriana a mucosidad (células epiteliales (por ejemplo, presente en los intestinos)), u otra parte de una animal en la que pueden estar presentes bacterias, y métodos para identificar y caracterizar (por ejemplo, la eficacia de) moduladores de adherencia bacteriana a mucosidad y células epiteliales, u otra parte del animal en la que las pueden estar presentes bacterias.			
CONTINUA AL RESPALDO			



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl:	C12Q 1/00; G01N 33/00
22) Fecha de solicitud:	(71) Solicitante(s)	ALLTECH, INC.
(30) Prioridad (31) No. 61/223,755	32) Fecha 08-07-2009	(33) País US
	(72) Inventor(es)	DAWSON, Karl, A.; MORAN, Colm; APAJALAHTI, Juha; LAURAEUS, Marko
	(74) Apoderado:	ALVARO CORREA ORDOÑEZ
(85) Fecha limite inicio fase nacional:	(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha:	13-01-2011
Fecha de presentación de la solicitud:	N° publicación:	WO2011/005982
No. de solicitud	PCT/US2010/041396	
(54) Título: ADHERENCIA Y ANTIADHERENCIA BACTERIANA A MUCOSIDAD, CÉLULAS EPITELIALES Y OTRAS CÉLULAS		

Resumen: La presente invención se refiere de manera general a métodos para detectar, identificar y medir la adherencia bacteriana a mucosidad y células epiteliales. En particular, la presente invención proporciona ensayos para detectar e identificar la presencia o ausencia de adherencia bacteriana a mucosidad (células epiteliales (por ejemplo, presente en los intestinos)), u otra parte de una animal en la que pueden estar presentes bacterias, y métodos para identificar y caracterizar (por ejemplo, la eficacia de) moduladores de adherencia bacteriana a mucosidad y células epiteliales, u otra parte del animal en la que las pueden estar presentes bacterias.

COPIA SOLICITUD
INTERNACIONAL

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 January 2011 (13.01.2011)(10) International Publication Number
WO 2011/005982 A1

PCT

(51) International Patent Classification:
C12Q 1/00 (2006.01) G01N 33/00 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/US2010/041396(22) International Filing Date:
8 July 2010 (08.07.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/223,755 8 July 2009 (08.07.2009) US(71) Applicant (for all designated States except US): ALI-
TECH, INC. [US/US]; 3031 Camip Hill Pike,
Nicholasville, KY 40345 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DAWSON, Karl,
A. [US/US]; 4877 Wyndhurst, Lexington, KY 40515
(US). MORAN, Colm [IE/FR]; 10 chemin de Groupède,
F-13600 La Ciotat (FR). APAJALAHTI, Juha [FI/FI];
Kytöniityntie 24C, FIN-00670 Helsinki (FI). LAU-
RAEUS, Marko [FI/FI]; Paulatie 12, FIN-03100 Num-
mela (FI).(74) Agent: SISK, Tyler, J.; Casimir Jones S.C., 2275 Dem-
ing Way, Middleton, WI 53562 (US).(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: BACTERIAL ADHERENCE AND ANTI-ADHERENCE TO MUCUS, EPITHELIAL CELLS AND OTHER CELLS

(57) Abstract: The present invention generally relates to methods for detecting, identifying, and measuring bacterial adherence to mucus and epithelial cells. In particular, the present invention provides assays for detecting and identifying the presence or absence of bacterial adherence to mucus (epithelial cells (e.g., present in the intestines), or other portion of an animal where bacteria may be present, and methods for identifying and characterizing (e.g., the efficacy of) modulators of bacterial adherence to mucus and epithelial cells, or other portion of the animal where bacteria may be present.

**BACTERIAL ADHERENCE AND ANTI-ADHERENCE TO
MUCUS, EPITHELIAL CELLS AND OTHER CELLS**

OTHER CELLS

5 CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

The present Application claims priority to U.S. Provisional Application Serial Number 61/223,755 filed July 8, 2009, the entirety of which is herein incorporated by reference.

10 FIELD OF THE INVENTION

The present invention generally relates to methods for detecting, identifying, and measuring bacterial adherence to mucus and epithelial cells. In particular, the present invention provides assays for detecting and identifying the presence or absence of bacterial adherence to mucus (epithelial cells (e.g., present in the intestines), or other portion of an animal where bacteria may be present, and methods for identifying and characterizing (e.g., the efficacy of) modulators of bacterial adherence to mucus and epithelial cells, or other portion of the animal where bacteria may be present.

BACKGROUND OF THE INVENTION

20 The epithelial cells in the small intestine, the respiratory tract, the urinary tract, and the reproductive tracts of animals are covered by a relatively thick layer of mucus which comprises mucin, many small associated proteins, glycoproteins, lipids, and glycolipids. The epithelial cells and mucus contain receptors that recognize specific bacterial adhesion proteins. Adhesion or close association of bacteria to the epithelial cells may contribute to colonization as well as to bacterial pathogenicity. In addition, bacterial adhesion to 25 intestinal mucus and epithelia appears important for individual stability within the microbial flora.

SUMMARY OF THE INVENTION

30 The present invention generally relates to methods for detecting, identifying, and measuring bacterial adherence and anti-adherence to mucus and cells (e.g., epithelial cells). In particular, the present invention provides assays for detecting and identifying bacterial adherence to mucus (e.g., intestinal mucosal lining) and epithelial cells, and methods for

identifying modulators of bacterial adherence to mucus and epithelial cells. The assays are non-radioactive, microbiologically safe, as well as stable, easily transported, and easily stored.

Accordingly, in some embodiments, the present invention provides kits comprising a
5 non-radioactive enzyme-linked immunosorbent assay (*ELISA*) for the assay of bacterial adherence with mucus and/or epithelial cells. The kits are not limited to particular components. In some embodiments, the kits comprise a solid support having mucus or epithelial cells coated thereon, a sample comprising bacteria, a primary antibody specific for the bacteria, and a detectably labeled secondary antibody specific for the primary antibody
10 bound to the bacteria. In some embodiments, the kits comprise a substrate which allows the visualization of the detectably labeled secondary antibody. In some embodiments, the detectably labeled secondary antibody comprises an enzyme label. In some embodiments, the substrate is a composition for providing a colorimetric, fluorimetric or chemiluminescent signal in the presence of the enzyme label. In some embodiments, the
15 detectably labeled secondary antibody comprises pig anti-IgG immunoglobulins coupled to peroxidase. In some embodiments, the colorimetric composition is 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine. In some embodiments, the solid support is a 96-well plate. In some embodiments, the bacteria is *E. coli* bacteria. Examples of mucus include, but are not limited to, pig proximal ileum mucus, pig distal colon mucus, broiler duodenum mucus and
20 broiler caecum mucus. Examples of primary antibodies include but are not limited to HRP-conjugated polyclonal antibodies specific to *E. coli* O and K antigenic serotypes, polyclonal antibodies specific to *E. coli* O and K antigenic serotypes. Examples of secondary antibodies include but are not limited to affinity purified Rabbit anti-Goat IgG-HRP, affinity purified Rabbit anti-Goat IgG-AP, polyclonal FITC-conjugated antibodies to Goat IgG (H&L),
25 Streptavidin-Alkaline Phosphatase from *Streptomyces avidinii*, and Streptavidin-Peroxidase from *Streptomyces avidinii*.

In certain embodiments, the present invention provides methods for measuring adherence and anti-adherence between bacteria and mucus and bacteria and epithelial cells. The methods are not limited to particular techniques for measuring adherence between
30 bacteria and mucus and bacteria and epithelial cells. In some embodiments, the methods comprise providing a sample comprising bacteria and mucus, and combining the sample comprising bacteria and mucus within a non-radioactive colorimetric assay under conditions such that adherence between the bacteria and the mucus is measured. In some

embodiments, the non-radioactive colorimetric assay is an ELISA assay. In some
embodiments, the conditions comprise adding primary antibodies specific for the bacteria
bound with the mucus, epithelial or other cells, and adding detectably labeled secondary
antibodies specific for the primary antibodies bound with the bacteria. In some
5 embodiments, the methods comprise adding a substrate which allows the visualization of
the detectably labeled secondary antibodies bound with the primary antibodies. In some
embodiments, mucus is coated onto a microtitre plate. In some embodiments, the detectably
labeled secondary antibody comprises an enzyme label. In some embodiments, the substrate
is a composition for providing a colorimetric, fluorimetric or chemiluminescent signal in the
10 presence of the enzyme label. In some embodiments, the detectably labeled secondary
antibody comprises pig anti-IgG immunoglobulins coupled to peroxidase. In some
embodiments, the colorimetric composition is 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine. In some
embodiments, the bacteria is *E. coli* bacteria. The methods are not limited to particular
primary or secondary antibodies. In some embodiments, examples of primary antibodies
15 include but are not limited to an HRP-conjugated polyclonal antibody specific to *E. coli* O
and K antigenic serotypes, and a polyclonal antibody specific to *E. coli* O and K antigenic
serotypes. Examples of secondary antibodies include but are not limited to an affinity
purified Rabbit anti-Goat IgG-HRP, an affinity purified Rabbit anti-Goat IgG-AP, a polyclonal
FITC-conjugated antibody to Goat IgG (H&L), Streptavidin-Alkaline Phosphatase from
20 *Streptomyces avidinii*, and Streptavidin-Peroxidase from *Streptomyces avidinii*.

In certain embodiments, the present invention provides methods for identifying an
agent that modulates adherence between bacteria and mucus, comprising providing a
sample comprising bacteria, mucus, and an agent, and combining the sample comprising
bacteria, the mucus, and the agent within a non-radioactive colorimetric assay under
25 conditions such that adherence between the bacteria and the mucus is measured. The
methods further comprise comparing the bacterial adherence in the presence and absence of
the agent, and identifying the agent as a modulator of adherence between the bacteria and
the mucus if the measured adherence is higher or lower than adherence between the bacteria
and the mucus in the absence of the agent. In some embodiments, the non-radioactive
30 colorimetric assay is an ELISA assay. In some embodiments, the conditions comprise
adding primary antibodies specific for the bacteria bound with the mucus. In some
embodiments, the conditions comprise adding detectably labeled secondary antibodies
specific for the primary antibodies bound with the bacteria. In some embodiments, the

conditions comprise adding a substrate which allows the visualization of the detectably labeled secondary antibodies bound with the primary antibodies. In some embodiments, the mucus are coated onto a microtitre plate. In some embodiments, the detectably labeled secondary antibody comprises an enzyme label. In some embodiments, the substrate is a composition for providing a colorimetric, fluorimetric or chemiluminescent signal in the presence of the enzyme label. In some embodiments, the detectably labeled secondary antibody comprises pig anti-IgG immunoglobulins coupled to peroxidase. In some embodiments, the colorimetric composition is 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine. In some embodiments, the bacteria are *E. coli* bacteria. Examples of primary antibodies include, but are not limited to, an HRP-conjugated polyclonal antibody specific to *E. coli* O and K antigenic serotypes, a polyclonal antibody specific to *E. coli* O and K antigenic serotypes. Examples of secondary antibodies include, but are not limited to, an affinity purified Rabbit anti-Goat IgG-HRP, an affinity purified Rabbit anti-Goat IgG-AP, a polyclonal FITC-conjugated antibody to Goat IgG (H&L), Streptavidin-Alkaline Phosphatase from *Streptomyces avidinii*, and Streptavidin-Peroxidase from *Streptomyces avidinii*. In some embodiments, the agent is selected from a list consisting of a naturally occurring molecule, a synthetically derived molecule, and a recombinantly derived molecule.

In certain embodiments, the present invention provides compositions comprising an agent, wherein the agent is a modulator of bacterial adherence with mucus, and wherein the agent is identified through a process comprising providing i) a sample comprising bacteria, ii) mucus, iii) an agent; combining the sample comprising bacteria, the mucus, and the agent within a non-radioactive colorimetric assay under conditions such that adherence between the bacteria and the mucus is measured; comparing the bacterial adherence in the presence and absence of the agent; and identifying the agent as a modulator of adherence between the bacteria and the mucus if the measured adherence is higher or lower than adherence between the bacteria and the mucus in the absence of the agent. In some embodiments, the composition is within a foodstuff configured for consumption by a subject selected from the group consisting of livestock, companion animals, fish, and shellfish.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the effect of mucus concentration (mg protein/ ml) of *E. coli* AL1 84 and AL1446 adherence, as measured by radioactively-labeled bacteria.

Figure 2 shows the effect of primary antibodies on the adherence of *E. coli* AL184, as measured by scintillation counter with radioactively-labeled bacteria. Primary antibodies: HRP=HRP-conjugated anti-*E. coli*; BP2022=unconjugated anti-*E. coli*, Biotin=biotin-conjugated anti-*E. coli*.

5 Figure 3 shows the effect of primary antibodies on the adherence of *E. coli* AL1446, as measured by scintillation counter with radioactive-labeled bacteria. Primary antibodies: HRP=HRP-conjugated anti-*E. coli*; BP2022=unconjugated anti-*E. coli*, Biotin=biotin-conjugated anti-*E. coli*.

10 Figure 4 shows color development of three different 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) ELISA substrates when incubated with *E. coli* -bacteria (strains AL184 and AL1446).

Figure 5 shows color development of p-nitrophenyl phosphate (pNPP) and 2,2'-Azino-bis(3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (AzBTS) ELISA substrates when incubated with *E. coli* strains AL184 and AL1446. E=ABTS microwell enhancer.

15 Figure 6 shows color development of different ELISA substrates when incubated in mucus coated wells. The photo was taken at 60 min, a weak signal was observed in the six positive (yellow) wells at 15 min.

Figure 7 shows the plate layout when testing unspecific binding of antibodies to mucus or plate. BP2022=anti- *E. coli*-primary antibody; BP2022HRP=peroxidase conjugated anti-*E. coli*- primary antibody; Biotin=biotin conjugated anti-*E. coli*-primary
20 antibody. HRP=peroxidase conjugated secondary antibody; StrHRP=peroxidase conjugated streptavidin. AP=alkaline phosphatase conjugated secondary antibody; StrAP=streptavidin conjugated secondary antibody antibody. No bacteria were used in this experiment.

Figure 8 shows binding of antibodies to mucus or plate. Plate layout is described in Figure 7.

25 Figure 9 shows non-specific binding test with primary and secondary antibodies. Primary antibodies: HRP = HRP-conjugated 1st ab, BP2022= non-conjugated polyclonal anti-*E. coli* 1st antibody; Biotin= biotin-conjugated anti-*E. coli* 1st antibody. Secondary antibodies: HRP=HRP-conjugated IgG; StrHRP=HRP-labeled streptavidin. No bacteria were used in this experiment.

30 Figure 10 shows unspecific binding test with primary and secondary antibodies. Plate layout is described in Figure 9. Primary antibodies: HRP = HRP-conjugated 1st ab, BP2022= non-conjugated polyclonal anti-*E. coli*; Biotin= biotin-conjugated anti-*E. coli*. Secondary antibodies: HRP=HRP-conjugated IgG; Str.HRP = HRP-labeled streptavidin.

Figure 11 shows a table describing conditions utilized for optimizing the dilution of antibodies and the number of bacteria/well. Primary antibody: HRP-conjugated primary antibody, no secondary antibody.

5 Figure 12 shows data obtained from testing the dilution of antibodies and optimal number of bacteria/well. Primary antibody: HRP-conjugated primary antibody, no secondary antibody. Plate layout is shown in Figure 11.

Figure 13 shows a table describing conditions utilized for optimizing the dilution of antibodies and the number of bacteria/well. Primary antibody: biotin-conjugated anti-*E. coli*, secondary antibody: HRP-conjugated streptavidin.

10 Figure 14 shows data obtained from testing the dilution of antibodies and optimal number of bacteria/well. Primary antibody: biotin-conjugated anti-*E. coli*, secondary antibody: HRP-conjugated streptavidin.

Figure 15 shows ELISA absorbances with 10^6 - 10^8 bacteria added in the wells. A logarithmic trend line has been added.

15 Figure 16 shows ELISA absorbances with 0- 10^6 of bacteria added in the wells.

Figure 17 shows A) the effect of different concentrations of Bio-Mos on bacterial adherence. The effect is shown as percentage of absorbance when no Bio-Mos was added; and B) the effect of Bio-Mos on the adherence of *E. coli* strain AL184, measured with radioactively-labeled bacteria in scintillation counter.

20 Figure 18 shows data from experiments testing the number of bacteria/well to find an optimal level for detecting adherence/attachment altering effects (e.g., using Bio-Mos).

Figure 19 shows data from experiments testing the number of bacteria/well to find an optimal level for detecting adherence/attachment altering effects (e.g., using Bio-Mos).

25 Figure 20 shows data related to primary antibody dilution for detecting differences between different concentrations of Bio-Mos.

Figure 21 shows the effect of Bio-Mos in ELISA using different types of mucus and multiple Bio-Mos concentrations.

30 Figure 22 shows Comparison of Bio-Mos effect in the radioactive attachment assay and ELISA procedure. Standard errors of the mean between replicate samples are shown as error bars.

Figure 23 shows adherence of differently inactivated bacteria to mucus coated plates. Adherence was measured with and without Bio-Mos. Data for UV and DMSO-inactivated bacteria is not shown.

Figure 24 shows adherence of bacteria to mucus on freshly coated plates according to the ELISA method.

Figure 25 shows the effect of ethanol concentration in *E. coli* preservation liquid on the adherence of the bacteria on mucus.

5 Figure 26 shows adherence of bacteria with and without Bio-Mos on differently stored mucus coated plates.

Figure 27 shows the Bio-Mos effect on adherence of ethanol inactivated *E. coli* on mucus coated, air-dried plates. Standard errors of the mean between replicates are shown as error bars.

10 Figure 28 shows absolute plate-to-plate variation for different Bio-Mos test levels. Replicate assays (wells) of the same sample are shown as groups of bars.

Figure 29 shows absolute plate-to-plate variation for different Bio-Mos test levels. The four panels of the figure represent assays carried out on four different days, but with a single batch of *E. coli*. Replicate assays (wells) of the same sample are shown as groups of
15 bars.

Figure 30 shows absolute plate-to-plate variation for different Bio-Mos test levels in different panels. The four sets of columns in each panel represent assays carried out on four different days, but with a single batch of *E. coli*.

Figure 31 shows relative plate-to-plate variation for different Bio-Mos test levels. Columns represent means of the replicate test wells and the bars indicate standard errors of the mean. Assays were carried out on four different days, but with a single batch of *E. coli*. The two panels show the same data, but displayed differently to emphasize either plate-to-plate variation (upper panel) or the effect of Bio-Mos (lower panel).

Figure 32 shows relative batch-to-batch variation for the effect of Bio-Mos. Columns of the upper panel represent means of the replicate test wells and the bars indicate standard errors of the mean. Assays were carried out totally independently starting from the medium and buffer preparations, and the cultivation of *E. coli*. The upper panel shows the measured signals and the lower panel the values relative to the control wells.

Figure 33 shows number of replicate wells needed to detect indicated differences
30 between the test treatments with the developed assay.

Figure 34 shows signals measured for five (5) independent batches of bacterial preparation in the presence and absence of Bio-Mos (2ng/ml).

Figure 35 shows signals measured for five (5) independent batches of mucus plates in the presence and absence of Bio-Mos (2ng/ml).

Figure 36 shows signals of test after 1 and 2 weeks of storage.

Figure 37 shows a vacuum sealed plate and ampoule in one embodiment of the invention.

DEFINITIONS

To facilitate an understanding of the invention, a number of terms are defined below.

As used herein, the term "mucus" refers to a relatively thick secretion produced by and covering portions of the digestive tract (e.g., produced by and covering the epithelial cells of the intestine). Mucus may comprise one or more components such as mucin, proteins, glycoproteins, lipids, and glycolipids. Mucus may also comprise one or more types of receptors (e.g., that recognize specific adhesion proteins). Adhesion and/or close association of bacteria to mucus and/or epithelial cells (e.g., via the mucus layer) may contribute to bacterial adhesion to intestinal mucus and/or epithelia (e.g., thereby playing a role in populations of bacteria that inhabit the gut). The present invention is not limited to any particular type of mucus or to mucus obtained from any particular source (e.g., type of animal) or location (e.g., part of the digestive tract (e.g., ileum (e.g., proximal, distal, etc.), duodenum, caecum, colon or other part of the digestive tract)).

As used herein, the terms "peptide," "polypeptide" and "protein" all refer to a primary sequence of amino acids that are joined by covalent "peptide linkages." In general, a peptide consists of a few amino acids, typically from 2-50 amino acids, and is shorter than a protein. The term "polypeptide" encompasses peptides and proteins. In some embodiments, the peptide, polypeptide or protein is synthetic, while in other embodiments, the peptide, polypeptide or protein are recombinant or naturally occurring. A synthetic peptide is a peptide that is produced by artificial means in vitro (i.e., was not produced in vivo).

The terms "sample" and "specimen" are used in their broadest sense and encompass samples or specimens obtained from any source. As used herein, the term "sample" is used to refer to biological samples obtained from animals (including humans), and encompasses fluids, solids, tissues, and gases. In some embodiments of this invention, biological samples include cerebrospinal fluid (CSF), serous fluid, urine, saliva, blood, and blood products

such as plasma, serum and the like. However, these examples are not to be construed as limiting the types of samples that find use with the present invention.

As used herein, the terms "host" and "subject" refer to any animal, including but not limited to, human and non-human animals (e.g., dogs, cats, cows, horses, sheep, poultry, fish, crustaceans, etc.) that is studied, analyzed, tested, diagnosed or treated. As used herein, the terms "host," "subject" and "patient" are used interchangeably, unless indicated otherwise.

As used herein, the term "antibody" (or "antibodies") refers to any immunoglobulin that binds specifically to an antigenic determinant, and specifically binds to proteins identical or structurally related to the antigenic determinant that stimulated their production. Thus, antibodies can be useful in assays to detect the antigen that stimulated their production. Monoclonal antibodies are derived from a single clone of B lymphocytes (i.e., B cells), and are generally homogeneous in structure and antigen specificity. Polyclonal antibodies originate from many different clones of antibody-producing cells, and thus are heterogenous in their structure and epitope specificity, but all recognize the same antigen. In some embodiments, monoclonal and polyclonal antibodies are used as crude preparations, while in preferred embodiments, these antibodies are purified. For example, in some embodiments, polyclonal antibodies contained in crude antiserum are used. Also, it is intended that the term "antibody" encompass any immunoglobulin (e.g., IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, etc.) obtained from any source (e.g., humans, rodents, non-human primates, lagomorphs, caprines, bovines, equines, ovines, etc.).

As used herein, the term "antigen" is used in reference to any substance that is capable of being recognized by an antibody. It is intended that this term encompass any antigen and "immunogen" (i.e., a substance that induces the formation of antibodies). Thus, in an immunogenic reaction, antibodies are produced in response to the presence of an antigen or portion of an antigen. The terms "antigen" and "immunogen" are used to refer to an individual macromolecule or to a homogeneous or heterogeneous population of antigenic macromolecules. It is intended that the terms antigen and immunogen encompass protein molecules or portions of protein molecules, that contains one or more epitopes. In many cases, antigens are also immunogens, thus the term "antigen" is often used interchangeably with the term "immunogen." In some preferred embodiments, immunogenic substances are used as antigens in assays to detect the presence of appropriate antibodies in the serum of an immunized animal.

As used herein, the terms "antigen fragment" and "portion of an antigen" and the like are used in reference to a portion of an antigen. Antigen fragments or portions typically range in size, from a small percentage of the entire antigen to a large percentage, but not 100%, of the antigen. However, in situations where "at least a portion" of an antigen is specified, it is contemplated that the entire antigen may also be present (e.g., it is not intended that the sample tested contain only a portion of an antigen). In some embodiments, antigen fragments and/or portions thereof, comprise an "epitope" recognized by an antibody, while in other embodiments these fragments and/or portions do not comprise an epitope recognized by an antibody. In addition, in some embodiments, antigen fragments and/or portions are not immunogenic, while in preferred embodiments, the antigen fragments and/or portions are immunogenic.

The terms "antigenic determinant" and "epitope" as used herein refer to that portion of an antigen that makes contact with a particular antibody variable region. When a protein or fragment (or portion) of a protein is used to immunize a host animal, numerous regions of the protein are likely to induce the production of antibodies that bind specifically to a given region or three-dimensional structure on the protein (these regions and/or structures are referred to as "antigenic determinants"). In some settings, antigenic determinants compete with the intact antigen (i.e., the "immunogen" used to elicit the immune response) for binding to an antibody.

The terms "specific binding" and "specifically binding" when used in reference to the interaction between an antibody and an antigen describe an interaction that is dependent upon the presence of a particular structure (i.e., the antigenic determinant or epitope) on the antigen. In other words, the antibody recognizes and binds to a protein structure unique to the antigen, rather than binding to all proteins in general (i.e., non-specific binding).

As used herein, the term "immunoassay" refers to any assay that uses at least one specific antibody for the detection or quantitation of an antigen. Immunoassays include, but are not limited to, Western blots, ELISAs, radio-immunoassays, and immunofluorescence assays.

As used herein, the term "ELISA" refers to enzyme-linked immunosorbent assay (or EIA). Numerous ELISA methods and applications are known in the art, and are described in many references (See, e.g., 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)). In addition, there are numerous commercially available ELISA test systems.

As used herein, the terms "reporter reagent," "reporter molecule," "detection substrate" and "detection reagent" are used in reference to reagents that permit the detection and/or quantitation of an antibody bound to an antigen. For example, in some embodiments, the reporter reagent is a colorimetric substrate for an enzyme that has been conjugated to an antibody. Addition of a suitable substrate to the antibody-enzyme conjugate results in the production of a colorimetric or fluorimetric signal (e.g., following the binding of the conjugated antibody to the antigen of interest). Other reporter reagents include, but are not limited to, radioactive compounds. This definition also encompasses the use of biotin and avidin-based compounds (e.g., including but not limited to neutravidin and streptavidin) as part of the detection system.

As used herein, the term "signal" is used generally in reference to any detectable process that indicates that a reaction has occurred, for example, binding of antibody to antigen. It is contemplated that signals in the form of radioactivity, fluorimetric or colorimetric products/reagents will all find use with the present invention. In various embodiments of the present invention, the signal is assessed qualitatively, while in alternative embodiments, the signal is assessed quantitatively.

As used herein, the term "solid support" is used in reference to any solid or stationary material to which reagents such as antibodies, antigens, and other test components are attached. For example, in an ELISA method, the wells of microtiter plates provide solid supports. Other examples of solid supports include microscope slides, coverslips, beads, particles, cell culture flasks, as well as many other suitable items.

As used herein, the term "effective amount" refers to the amount of a composition sufficient to effect beneficial or desired results. An effective amount can be administered and/or combined with another material in one or more administrations, applications or dosages and is not intended to be limited to a particular formulation or administration route.

As used herein, the terms "administration" and "administering" refer to the act of giving a drug, prodrug, or other agent, or therapeutic treatment (e.g., an agent identified as a modulator of bacterial adherence to mucus through use of the methods of the present invention) to a subject (e.g., a subject or in vivo, in vitro, or ex vivo cells, tissues, and organs). Exemplary routes of administration can be through the eyes (ophthalmic), mouth

(oral), skin (topical or transdermal), nose (nasal), lungs (inhalant), oral mucosa (buccal), ear, rectal, vaginal, by injection (e.g., intravenously, subcutaneously, intratumorally, intraperitoneally, etc.) and the like.

As used herein, the terms "co-administration" and "co-administering" refer to the administration of at least two agent(s) (e.g., an agent identified as a modulator of bacterial adherence to mucus through use of the methods of the present invention and one or more other agents (e.g., a therapy known to treat pathogenic bacteria disorders) to a subject and/or material (e.g., a foodstuff (e.g., animal feed))). In some embodiments, the co-administration of two or more agents or therapies is concurrent. In other embodiments, a first agent/therapy is administered prior to a second agent/therapy. Those of skill in the art understand that the formulations and/or routes of administration of the various agents or therapies used may vary. The appropriate dosage for co-administration can be readily determined by one skilled in the art. In some embodiments, when agents or therapies are co-administered, the respective agents or therapies are administered and/or formulated at lower dosages than appropriate for their administration and/or formulation alone. Thus, co-administration is especially desirable in embodiments where the co-administration/co-formulation of the agents or therapies lowers the requisite dosage of a potentially harmful (e.g., toxic) agent(s), and/or when co-administration of two or more agents results in sensitization of a subject to beneficial effects of one of the agents via co-administration of the other agent.

As used herein "post-colonization treatment" or "post-application" refers to treatment after the removal of infectious disease.

As used herein "pre-application" and/or "prophylactic treatment" refers to treatments used as a preventative measure (e.g., to prevent infection and/or disease).

As used herein, the terms "disease" and "pathological condition" are used interchangeably to describe a state, signs, and/or symptoms that are associated with any impairment of the normal state of a living animal or of any of its organs or tissues that interrupts or modifies the performance of normal functions, and may be a response to environmental factors (such as malnutrition, industrial hazards, or climate), to specific infective agents (such as worms, bacteria, or viruses), to inherent defect of the organism (such as various genetic anomalies, or to combinations of these and other factors).

As used herein, the term "suffering from disease" refers to a subject (e.g., an animal or human subject) that is experiencing a particular disease. It is not intended that the present invention be limited to any particular signs or symptoms, nor disease. Thus, it is intended

that the present invention encompass subjects that are experiencing any range of disease (e.g., from sub-clinical manifestation to full-blown disease) wherein the subject exhibits at least some of the indicia (e.g., signs and symptoms) associated with the particular disease.

As used herein, the term "toxic" refers to any detrimental or harmful effects on a subject, a cell, or a tissue as compared to the same cell or tissue prior to the administration of the toxicant.

As used herein, the term "functional feed ingredient" or "functional feed additive" refers to the combination of an active agent (e.g., an agent identified as a modulator of bacterial adherence with mucus) with a carrier, inert or active, making the composition especially suitable for diagnostic or therapeutic use in vitro, in vivo or ex vivo. .

As used herein, the term "carrier" refers to any standard carriers including, but not limited to, phosphate buffered saline solution, water, emulsions (e.g., such as an oil/water or water/oil emulsions), and various types of wetting agents, any and all solvents, dispersion media, coatings, sodium lauryl sulfate, isotonic and absorption delaying agents, disintrigrants (e.g., potato starch or sodium starch glycolate), corn cob, dried distillers grains, wheat bran, yeast (e.g., whole spent yeast), yeast components (e.g., yeast cell wall extract), and the like. The compositions also can include stabilizers and preservatives. For examples of carriers, stabilizers and adjuvants. (See e.g., Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. (1975), incorporated herein by reference).

As used herein, the term "digest" refers to the conversion of food, feedstuffs, or other organic compounds into absorbable form; to soften, decompose, or break down by heat and moisture or chemical action.

As used herein, "digestive system" refers to a system (including gastrointestinal system) in which digestion can or does occur.

As used herein, the term "feedstuffs" refers to material(s) that are consumed by animals and contribute energy and/or nutrients to an animal's diet. Examples of feedstuffs include, but are not limited to, Total Mixed Ration (TMR), forage(s), pellet(s), concentrate(s), premix(es) coproduct(s), grain(s), distiller grain(s), molasses, fiber(s), fodder(s), grass(es), hay, kernel(s), leaves, meal, soluble(s), and supplement(s).

As used herein, the term "animal" refers to those of kingdom Animalia. This includes, but is not limited to livestock, farm animals, domestic animals, pet animals, marine and freshwater animals, and wild animals.

As used herein, the term "pharmaceutically acceptable salt" refers to any salt (e.g., obtained by reaction with an acid or a base) of a compound of the present invention (e.g., comprising a viable yeast cell or cell wall component of the invention) that is physiologically tolerated in the target subject (e.g., a mammalian, humans, avian, bovine, porcine, equine, ovine, caprine, canine, feline, piscine, camelid, rodent species as well as fish and shellfish subjects subject, and/or in vivo or ex vivo, cells, tissues, or organs).

"Salts" of the compounds of the present invention may be derived from inorganic or organic acids and bases. Examples of acids include, but are not limited to, hydrochloric, hydrobromic, sulfuric, nitric, perchloric, fumaric, maleic, phosphoric, glycolic, lactic, salicylic, succinic, toluene-p-sulfonic, tartaric, acetic, citric, methanesulfonic, ethanesulfonic, formic, benzoic, malonic, sulfonic, naphthalene-2-sulfonic, benzenesulfonic acid, and the like. Other acids, such as oxalic, while not in themselves pharmaceutically acceptable, may be employed in the preparation of salts useful as intermediates in obtaining the compounds of the invention and their pharmaceutically acceptable acid addition salts.

Examples of bases include, but are not limited to, alkali metal (e.g., sodium) hydroxides, alkaline earth metal (e.g., magnesium) hydroxides, ammonia, and compounds of formula NW_4^+ , wherein W is C_{1-4} alkyl, and the like.

Examples of salts include, but are not limited to: acetate, adipate, alginate, aspartate, benzoate, benzenesulfonate, bisulfate, butyrate, citrate, camphorate, camphorsulfonate, cyclopentanepropionate, digluconate, dodecylsulfate, ethanesulfonate, fumarate, flucoheptanoate, glycerophosphate, hemisulfate, heptanoate, hexanoate, chloride, bromide, iodide, 2-hydroxyethanesulfonate, lactate, maleate, methanesulfonate, 2-naphthalenesulfonate, nicotinate, oxalate, palmoate, pectinate, persulfate, phenylpropionate, picrate, pivalate, propionate, succinate, tartrate, thiocyanate, tosylate, undecanoate, and the like. Other examples of salts include anions of the compounds of the present invention compounded with a suitable cation such as Na^+ , NH_4^+ , and NW_4^+ (wherein W is a C_{1-4} alkyl group), and the like. For therapeutic use, salts of the compounds of the present invention are contemplated as being pharmaceutically acceptable. However, salts of acids and bases that are non-pharmaceutically acceptable may also find use, for example, in the preparation or purification of a pharmaceutically acceptable compound.

For therapeutic and/or prophylactic use, salts of the compounds of the present invention are contemplated as being pharmaceutically acceptable. However, salts of acids

and bases that are non-pharmaceutically acceptable may also find use, for example, in the preparation or purification of a pharmaceutically acceptable compound.

As used herein, the term "cell culture" refers to any in vitro culture of cells. Included within this term are continuous cell lines (e.g., with an immortal phenotype), primary cell
5 cultures, transformed cell lines, finite cell lines (e.g., non-transformed cells), and any other cell population maintained in vitro.

As used, the term "eukaryote" refers to organisms distinguishable from "prokaryotes." It is intended that the term encompass all organisms with cells that exhibit the usual characteristics of eukaryotes, such as the presence of a true nucleus bounded by a
10 nuclear membrane, within which lie the chromosomes, the presence of membrane-bound organelles, and other characteristics commonly observed in eukaryotic organisms. Thus, the term includes, but is not limited to such organisms as fungi, protozoa, and animals (e.g., humans).

As used herein, the term "in vitro" refers to an artificial environment and to
15 processes or reactions that occur within an artificial environment. In vitro environments can consist of, but are not limited to, test tubes and cell culture. The term "in vivo" refers to the natural environment (e.g., an animal or a cell) and to processes or reaction that occur within a natural environment.

As used herein, the term "sample" is used in its broadest sense. In one sense, it is
20 meant to include a specimen or culture obtained from any source, as well as biological and environmental samples. Biological samples may be obtained from animals (including humans) and encompass fluids, solids, tissues, and gases. Biological samples include blood products, such as plasma, serum and the like. Environmental samples include
environmental material such as surface matter, soil, water, crystals and industrial samples.
25 Such examples are not however to be construed as limiting the sample types applicable to the present invention.

As used herein, the term "kit" refers to a packaged set of materials.

As used herein "anti-adherence modulators" and/or "anti-adhesion modulators" refer to modulators that block adherence (e.g., block a compound from adhering to fimbria,
30 and/or block adherence of bacteria to mucous epithelia cells and/or to other types of cells).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Radioactive binding assays have been shown to measure bacterial adherence to intestinal mucus, and that certain agents effectively prevent such adherence (see, e.g., Conway, et al., 1990, *Infection and Immunity* 58:3178-3182; herein incorporated by reference in its entirety). In particular, radioactive binding assays shown to measure bacterial adherence to intestinal mucus have further shown the effect of Bio-Mos, a mannoprotein derived from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*, on inhibiting bacterial adherence. However, no non-radioactive routine method is available for detecting, identifying, and measuring bacterial adherence to mucus. The methods and compositions of the present invention overcome such limitations through providing non-radioactive methods for detecting, identifying, and measuring bacterial adherence to mucus.

In particular, the present invention provides a simple and accurate immunoassay for measuring bacterial adherence to mucus and for testing the effect of products that modulate (e.g., inhibit, promote) adherence. In some embodiments, the immunoassay is a Western blot. In some embodiments, the immunoassay is a radio-immunoassay. In some embodiments, the immunoassay is an immunofluorescence assay. In some embodiments, the immunoassay is an ELISA based assay. An ELISA based method is an attractive alternative to a radioactive assay due to flexibility in the use of difference combinations of primary and secondary antibodies and various colorimetric detection systems for different microbial species. Accordingly, the present invention provides ELISA based methods for detecting and identifying, bacterial adherence to mucus (e.g., intestinal mucosal lining).

Thus, in some embodiments, the present invention provides a non-radioactive, colorimetric assay for monitoring and/or characterizing interaction (e.g., binding, attachment, affinity, etc.) between mucus and bacterial cells. In some embodiments, the non-radioactive assay is as sensitive and/or more sensitive than a radioactive assay utilized for similar monitoring and/or characterizing. In some embodiments, a non-radioactive, colorimetric assay of the invention is utilized to monitor and/or characterize the ability of one or more test agents to alter (e.g., inhibit and/or enhance) bacterial cell interaction (e.g., binding, attachment, affinity, etc.) with mucus.

For example, in some embodiments, the present invention provides an enzyme linked immunosorbant as assay (ELISA) method for monitoring and/or characterizing interaction (e.g., binding, attachment, affinity, etc.) between mucus and bacterial cells (e.g., as described in Examples 1-16. In some embodiments, the assay is performed at room temperature. In some embodiments, the assay is performed at 37°C. In some embodiments,

the assay is optimized as described in Examples 2-15. In some embodiments, plates (e.g., microtitre plates (e.g., MAXISORP plates (e.g., containing 6, 12, 24, 48, 96, 128 or more wells))) are coated with mucus. The present invention is not limited by the type, source or amount of mucus. In some embodiments, the mucus utilized is animal mucus. In some
5 embodiments, mucus is obtained from a pig, a chicken, a cow, an equine, a canine, a feline, or other type of animal. In some embodiments, the mucus is obtained from one or more portions of the digestive tract. For example, in some embodiments, mucus is obtained from the ileum (e.g., proximal ileum, distal ileum, etc.), duodenum, caecum, colon and/or other part of the digestive tract. The present invention is not limited by the amount of mucus
10 utilized to coat the plates (e.g., depending upon the number and/or size of the wells on the plate). In some embodiments, mucus is diluted in a coating buffer and then utilized for coating the plates. In some embodiments, the coating buffer is a solution comprising 1 liter of water into which 1.6 g Na_2CO_3 , 2.94 g NaHCO_3 , and 0.2 g Na-azide have been dissolved and the pH adjusted to 9.6, or similar buffer. In some embodiments, a coating buffer
15 comprising between about 0.001 - 0.2 mg of mucus protein per ml of coating buffer is utilized to coat each well on the plate, although greater (e.g., 0.3mg/ml, 0.4mg/ml, 0.5mg/ml, 0.75mg/ml, 1.0 mg/ml or more) or lesser (e.g., 0.0005 mg/ml or less) amounts may be utilized. In some embodiments, about 300 μl of the coating suspension is utilized to coat each well, although greater (e.g., 400 μl , 500 μl , 600 μl , 700 μl or more) or lesser (e.g.,
20 200 μl , 100 μl , 50 μl , 25 μl or less) volumes of coating solution may be utilized (e.g., depending upon the size of the well, amount of signal desired, or other factors (e.g., bacterial adherence)). Once the coating solution is added to the wells, the mucus is allowed to coat each well for a period of time (e.g., about 1 hour, about 2 hours, about 3 hours, about 6 hours, about 12 hours, about 24 hours, or more) at a constant temperature (e.g., 4°C, room
25 temperature, or warmer (e.g., 37°C)). In some embodiments, the plates are covered during incubation (e.g., to prevent evaporation of the coating solution). Sometime during the coating period, a test agent (e.g., that is to be tested for its ability to alter (e.g., inhibit and/or enhance) bacterial binding to the mucus) is prepared. The test agent is diluted in any appropriate buffer (e.g., phosphate buffered saline (PBS) (e.g., a PBS solution generated by
30 dissolving 8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g KH_2PO_4 into 1L of water and adjusting to pH 7.4). The present invention is not limited by the type of test agent. Indeed, a variety of test agents can be monitored and/or characterized utilizing methods of the invention including, but not limited to, those described herein.

After coating is complete, the coating solution is removed from the wells (e.g., without mixing the contents of the wells) and each well is washed with an appropriate volume (e.g., 100ml, 200ml, 300ml, 400ml or more) of washing solution (e.g., PBS).

Bacteria to be monitored and/or characterized for interaction with mucus are

5 prepared by collecting the bacteria under conditions that do not disrupt the integrity of the bacteria. The present invention is not limited to any particular type of bacteria nor to any particular growth phase of the bacteria. Indeed, a variety of bacteria may be monitored and/or characterized in an assay of the invention including but not limited to the types of bacteria described herein. Once collected (e.g., via centrifuging to pellet the bacterial cells),

10 the bacteria are resuspended in buffer (e.g., PBS) to a desired concentration depending upon how many bacteria are desired per well. In some embodiments, the number of bacteria added per well is about 10^7 , although greater (e.g., 10^8 , 10^9 , 10^{10}) or fewer (e.g., 10^6 , 10^5 , 10^4) bacteria may be added to each well. After the final wash of the plates, bacteria are added to the wells. In some embodiments, a test agent solution is added to the bacteria

15 suspension just prior to adding to the wells. The amount test agent and the amount of cells can be varied as described herein. Once added to the wells, the bacteria and/or bacteria plus test agent are allowed to incubate in the wells for a set period of time (e.g., 1 hour, 2 hours, 4 hours, 8 hours or more). Post incubation, the wells are washed (e.g., one, two, three or more times with PBS). Post washing, a blocking buffer (e.g., fetal bovine serum (FBS),

20 bovine serum albumin (BSA), milk, or other suitable blocking agent (e.g., 10% FBS diluted in PBS) is added to each well (e.g., using the same volume of blocking buffer that was utilized to coat the wells with mucus). The blocking solution is incubated in the wells for a set period of time (e.g., about 1 hour, about 2 hours, about 3 hours or more) at a constant temperature (e.g., 4°C, room temperature, or warmer (e.g., 37°C)). Blocking buffer is

25 removed and then a primary antibody (e.g., with specific affinity for the bacteria being monitored and/or characterized) is added to the wells. The primary antibody is diluted (e.g., at 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000 or more) in the blocking buffer. The volume of diluted primary antibody to be added to the wells is about 100ml to about 400ml (e.g., 200ml) and is incubated in the wells for a set period of time (e.g., about 1 hour, about 2 hours, about 3

30 hours or more) at a constant temperature (e.g., 4°C, room temperature, or warmer (e.g., 37°C)). The present invention is not limited to by the primary antibody utilized. Indeed, any antibody with specific affinity for the type of bacteria being monitored and/or characterized may be utilized. In some embodiments, the primary antibody is a polyclonal

antibody. In some embodiments, the primary antibody is a monoclonal antibody. In some
embodiments, the primary antibody is an antibody fragment. In some embodiments, the
primary antibody is a conjugated antibody. For example, in some embodiments, the
primary antibody is biotin conjugated. In some embodiments, the primary antibody is a
5 biotin conjugated polyclonal antibody to *E. coli*. Post primary antibody incubation, the
wells are washed (e.g., one, two, three or more times) using a washing buffer (e.g., PBS).
Washing buffer is removed and then a secondary antibody (e.g., with specific affinity for
the primary antibody is added to the wells. The secondary antibody is also diluted (e.g., at
1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000 or more) in the blocking buffer. The present invention is not
10 limited to the type of secondary antibody utilized. In some embodiments, the secondary
antibody is a polyclonal antibody. In some embodiments, the secondary antibody is a
monoclonal antibody. In some embodiments, the secondary antibody is an antibody
fragment. In some embodiments, the secondary antibody is a conjugated antibody. In some
embodiments, the secondary antibody is conjugated to streptavidin. In some embodiments,
15 the secondary antibody is conjugated to an enzyme (e.g., peroxidase, phosphatase, etc.).
The volume of diluted secondary antibody to be added to the wells is about 100ml to about
400ml (e.g., 200ml) and is incubated in the wells for a set period of time (e.g., about 1 hour,
about 2 hours, about 3 hours or more) at a constant temperature (e.g., 4°C, room
temperature, or warmer (e.g., 37°C)). After the incubation, the wells are washed (e.g., two,
20 three, four, five or more times) with a washing buffer (e.g., PBS). Post the last wash, a
colorimetric substrate is added to the wells. The present invention is not limited by the type
of substrate utilized. Exemplary substrates include, but are not limited to, 3,3', 5,5'-
tetramethylbenzidine (TMB) (e.g., for peroxidase-conjugated secondary antibodies), (p-
NitroPhenyl Phosphate (pNPP) (e.g., for phosphates conjugated antibodies), etc.). Color
25 develops in the wells and is detected and/or quantified (e.g., using a spectrophotometer).
Color development can be stopped by the addition of an acidic buffer (e.g., 2M H₂SO₄) at
any time point (e.g., to prevent strong color signal production (e.g., in order to quantify
bacterial attachment)).

The present invention is not limited to a particular ELISA based method for
30 detecting, identifying, and measuring bacterial adherence to mucus. In some embodiments,
methods are provided wherein 1) plates configured for use in ELISA based assays are
coated with a mucus sample, 2) bacteria are applied to the mucus coated plates, 3) primary
antibodies directed to bacteria are applied, 4) secondary antibodies directed to the primary

antibodies are applied, 5) a liquid substrate is applied, and 6) bacterial adherence is measured. In some embodiments, washing steps are applied between one or more of the steps. In some embodiments, blocking solution is applied between one or more of the steps. The methods are not limited to particular types or kinds of mucus samples, bacteria, primary
 5 antibodies, secondary antibodies, liquid substrate, and/or techniques for measuring bacterial adherence.

The methods for detecting, identifying, and measuring bacterial adherence to mucus is not limited to a particular type of bacteria. Indeed, any type of bacteria may be used in the present invention. Examples of bacteria include, but are not limited to, *Acidobacteria*,
 10 *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes/Chlorobi*, *Chlamydiae/Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Chrysiogenetes*, *Cyanobacteria*, *Deferribacteres*, *Deinococcus-Thermus*, *Dictyoglomi*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *Tenericutes*, *Thermodesulfobacteria*, and *Thermotogae*. In some embodiments, the bacteria is pathogenic
 15 bacteria such as, for example, *Bordetella* (e.g., *Bordetella pertussis*), *Borrelia* (e.g., *Borrelia burgdorferi*), *Brucella* (e.g., *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*), *Campylobacter* (e.g., *Campylobacter jejuni*), *Chlamydia* (e.g., *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*), *Clostridium* (e.g., *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*),
 20 *Corynebacterium* (e.g., *Corynebacterium diphtheriae*), *Enterococcus* (e.g., *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*), *Escherichia* (e.g., *Escherichia coli*), *Francisella* (e.g., *Francisella tularensis*), *Haemophilus* (e.g., *Haemophilus influenzae*), *Helicobacter* (e.g., *Helicobacter pylori*), *Legionella* (e.g., *Legionella pneumophila*), *Leptospira* (e.g., *Leptospira interrogans*), *Listeria* (e.g., *Listeria monocytogenes*), *Mycobacterium* (e.g.,
 25 *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*), *Mycoplasma* (e.g., *Mycoplasma pneumoniae*), *Neisseria* (e.g., *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*), *Pseudomonas* (e.g., *Pseudomonas aeruginosa*), *Rickettsia* (e.g., *Rickettsia rickettsii*), *Salmonella* (e.g., *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*), *Shigella* (e.g., *Shigella sonnei*), *Staphylococcus* (e.g., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*,
 30 *Staphylococcus saprophyticus*), *Streptococcus* (e.g., *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*), *Treponema* (e.g., *Treponema pallidum*), *Vibrio* (e.g., *Vibrio cholerae*), and *Yersinia* (e.g., *Yersinia pestis*). In some

embodiments, the bacteria are selected from particular strains of *E. Coli* known to have strong adherence to pig mucus (e.g., *E. coli* ALI84 and/or ALI446).

The present invention is not limited to a particular manner of preparing and/or utilizing bacteria within the ELISA based methods for detecting, identifying, and measuring bacterial adherence to mucus. In some embodiments, the bacteria are inactivated prior to its use (e.g., for storage purposes) and activated during testing. The methods are not limited to a particular method for inactivating the bacteria. Examples of inactivating the bacteria include, but are not limited to, freezing the bacteria, suspending the bacteria with ethanol, suspending the bacteria with glutaraldehyde, suspending the bacteria with formalin, irradiating the bacteria with ultraviolet irradiation, suspending the bacteria with dimethyl sulfoxide, and heating the bacteria before cooling for storage. The methods are not limited to a particular manner of activating the inactivated bacteria for testing purposes. In some embodiments, the bacteria are activated (e.g., harvested) through centrifugation techniques.

The methods are not limited to a particular manner of inactivating bacteria with ethanol. In some embodiments, the bacteria are grown and transferred in a fresh medium (e.g., 10% inoculums) prior to inactivation (e.g., one day prior to inactivation) with ethanol. Next, the bacteria are inactivated and preserved by adding ethanol directly to the bacterial culture (e.g., to approximately a final concentration of 40% vol/vol (e.g., 20% vol/vol; 30% vol/vol; 33% vol/vol; 35% vol/vol; 37% vol/vol; 40% vol/vol; 42% vol/vol; 45% vol/vol; 50% vol/vol; 60% vol/vol). In some embodiments, bacteria inactivated with ethanol (e.g., to a final concentration of approximately 40% vol/vol) are stored at approximately +4°C (e.g., 2°C; 3°C; 4°C; 5°C; 6°C). In some embodiment, bacteria inactivated with ethanol (e.g., to a final concentration of approximately 40% vol/vol) (e.g., stored at approximately +4°C) is activated (e.g., harvested) through centrifugation. In some embodiments, the bacteria are suspended in phosphate buffer saline (e.g., PBS) (e.g., 8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.4 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0.2 g KH₂PO₄, ad. 1000 ml MilliQ H₂O, pH 7.4).

The methods for detecting, identifying, and measuring bacterial adherence to mucus is not limited to a particular type of mucus. Indeed, any type of mucus may be used in the present invention. In some embodiments, the mucus used is from a pig (e.g., pig colon mucus) (e.g., pig intestine mucus (e.g., scraped from the proximal ileum of an approximately one year old pig)).

The present invention is not limited to a particular manner of preparing and/or utilizing mucus samples (e.g., mucus from a pig) within the ELISA based methods for

detecting, identifying, and measuring bacterial adherence to mucus. In some embodiments, the mucus samples are suspended with a coating buffer. The methods are not limited to a particular configuration for the coating buffer. In some embodiments, the coating buffer comprises 1.6 g Na₂CO₃ (dry), 2.94 g NaHCO₃, 0.2 g Na-azide, 1 l H₂O with pH 9.6 (by mixing the components ends up to be 9.7).

In some embodiments, the mucus samples are coated onto plates (e.g., wells) (e.g., 96 well plates) (e.g., 96 well MaxiSorp plates) configured for use in ELISA based assays. The mucus samples are not limited to a particular manner of coating onto plates configured for use in ELISA based assays. In some embodiments, the mucus samples are directly coated onto the plates just prior to the testing. In some embodiments, the mucus samples are pre-coated onto the plates so as to permit long term storage prior to testing. The methods are not limited to particular methods of pre-coating plates configured for use in ELISA based assays with mucus samples (e.g., mucus from pig intestine). In some embodiments, pre-coating plates configured for use in ELISA based assays with mucus samples is accomplished through coating the plates with the mucus samples and subsequently freezing the coated plates. In some embodiments, pre-coating plates configured for use in ELISA based assays with mucus samples is accomplished through coating the plates with the mucus samples and subsequently air-drying the coated plates. The methods are not limited to a particular manner of re-hydrating mucus samples pre-coated onto plates configured for use in ELISA based assays. In some embodiments, re-hydration is accomplished through exposing the samples to phosphate buffer saline (e.g., PBS) (e.g., 8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.4 g Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0.2 g KH₂PO₄, ad. 1000 ml MilliQ H₂O, pH 7.4).

The methods for detecting, identifying, and measuring bacterial adherence to mucus is not limited to a particular type of primary antibody. In some embodiments, the primary antibodies are directed toward the bacteria for which mucosal adherence is being tested. In some embodiments, the primary antibody is an HRP-conjugated polyclonal antibody to *E. coli* O and K antigenic serotypes (Acris catalogue number BP2022HRP). In some embodiments, the primary antibody is a polyclonal antibody to *E. coli* O and K antigenic serotypes (Acris catalogue number BP2022). In some embodiments, the primary antibody is a biotin-conjugated polyclonal antibody to *E. coli* O and K antigenic serotypes (Acris catalogue number BP1021B).

The methods for detecting, identifying, and measuring bacterial adherence to mucus is not limited to a particular type of secondary antibody. In some embodiments, the secondary antibodies are configured for detecting binding of the primary antibody with bacteria bound to mucus. As such, in some embodiments, the secondary antibodies are directed toward the primary antibody. In some embodiments, the secondary antibody is an affinity purified Rabbit anti-Goat IgG-HRP (Acris catalogue number R1317HRP). In some embodiments, the secondary antibody is an affinity purified Rabbit anti-Goat IgG-AP (Acris catalogue number R1317AP). In some embodiments, the secondary antibody is a polyclonal FITC-conjugated antibody to Goat IgG (H&L) (Acris catalogue number R13 17F). In some embodiments, the secondary antibody is Streptavidin-Alkaline Phosphatase from *Streptomyces avidinii* (Sigma catalogue number S2890). In some embodiments, the secondary antibody is Streptavidin-Peroxidase from *Streptomyces avidinii* (Sigma catalogue number S5512).

In some embodiments, the primary antibodies and secondary antibodies are diluted in a blocking solution. The methods are not limited to a particular type of blocking solution. In some embodiments, the blocking solution is milk. In some embodiments, the blocking solution is fetal bovine serum (FBS). In some embodiments, the blocking solution is bovine serum albumin (BSA).

The methods for detecting, identifying, and measuring bacterial adherence to mucus is not limited to a particular type of liquid substrate. In some embodiments, the liquid substrate is configured to facilitate detection of the binding of the primary antibody and/or the secondary antibody within the assay 3,3', 5,5' -tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma catalogue number T4319). In some embodiments, the liquid substrate is TMB slow kinetic form (later TMB slow) (Sigma catalogue number T0440). In some embodiments, the liquid substrate is TMB super sensitive (later TBM super) (Sigma catalogue number T4444). In some embodiments, the liquid substrate is P-nitrophenyl phosphate (Sigma catalogue number N7653). In some embodiments, the liquid substrate is 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (AzBTS; Sigma catalogue number A3219) + ABTS microwell enhancer (Sigma catalogue number AI227).

The methods for detecting, identifying, and measuring bacterial adherence to mucus is not limited to a particular technique for measuring such bacterial adherence to mucus. In some embodiments, bacterial adherence to mucus is measured visually (e.g., using imagery and/or photography). In some embodiments, bacterial adherence to mucus is measured with

an ELISA plate reader. In some embodiments, the technique employed to measure bacterial adherence to mucus detects, measures and quantifies, for example, absorbance, fluorescence intensity, luminescence, time-resolved fluorescence, and/or fluorescence polarization.

In some embodiments, the methods for detecting, identifying, and measuring bacterial adherence to mucus (e.g., the ELISA based methods) are used to identify agents that modulate bacterial adherence to mucus. In some embodiments, methods for detecting, identifying and/or measuring bacterial adherence of the invention are utilized to generate and/or identify optimized (e.g., second, third, fourth or more generation) compositions (e.g., that show greater efficacy (e.g., at preventing bacterial adherence) than an earlier generation composition. The methods are not limited to a particular technique for identifying agents that modulate bacterial adherence to mucus and/or cells (e.g., epithelial cells). In some embodiments, a potential modulator of bacterial adherence to mucus and/or cells (e.g., epithelial cells) is co-applied with a bacterial sample to a plate coated with mucus and/or cells (e.g., epithelial cells) (e.g., pig intestine mucus and/or epithelial cells), and primary and secondary antibodies, and liquid substrate subsequently applied. In some embodiments, characterization of the modulation activity of the agent is accomplished through comparing bacterial adherence in the presence and absence of the agent. For example, agents that increase bacterial adherence to mucus and/or cells (e.g., epithelial cells) are characterized as, for example, facilitators of adherence between that specific type of bacteria and that specific type of mucus and/or cells (e.g., epithelial cells). Agents that decrease bacterial adherence to mucus and/or cells (e.g., epithelial cells) are characterized as, for example, inhibitors of adherence between that specific type of bacteria and that specific type of mucus and/or cells (e.g., epithelial cells). The methods are not limited to a particular type or kind of potential agent. In some embodiments, the agent is, for example, a naturally occurring molecule, a synthetically derived molecule, or a recombinantly derived molecule.

In some embodiments, the methods involve pre-application of one or more agents known to modulate bacterial adherence to mucus or epithelial cells as a prophylactic, or preventative measure. For example, in some embodiments, the methods involve pre-application of one or more agents known to inhibit bacterial adherence to mucus. Methods of the invention are not limited to any particular type of agent known to inhibit bacterial adherence to mucus and/or cells (e.g., epithelial cells). For example, in some embodiments, the agent known to inhibit bacterial adherence to mucus is Bio-Mos (e.g., a mannoprotein derived from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*), although the present invention is

not so limited. In some embodiments, the agent known to inhibit bacterial adherence to mucus is identified through use of the ELISA based methods of the present invention. In some embodiments, the methods involve co-application of one or more agents known to enhance bacterial adherence to mucus. The methods are not limited to a particular type of agent known to enhance bacterial adherence to mucus. In some embodiments, the agent known to enhance bacterial adherence to mucus is identified through use of the ELISA based methods of the present invention.

In some embodiments, the methods involve co-application of one or more agents known to modulate bacterial adherence to mucus. For example, in some embodiments, the methods involve co-application of one or more agents known to inhibit bacterial adherence to mucus. The methods are not limited to a particular type of agent known to inhibit bacterial adherence to mucus. In some embodiments, the agent known to inhibit bacterial adherence to mucus is Bio-Mos (e.g., a mannoprotein derived from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*). In some embodiments, the agent known to inhibit bacterial adherence to mucus is identified through use of the ELISA based methods of the present invention. In some embodiments, the methods involve co-application of one or more agents known to enhance bacterial adherence to mucus. The methods are not limited to a particular type of agent known to enhance bacterial adherence to mucus. In some embodiments, the agent known to enhance bacterial adherence to mucus is identified through use of the ELISA based methods of the present invention.

In some embodiments, the methods involve post-application of one or more agents known to modulate bacterial adherence to mucus or epithelial cells after infectious disease has been removed. For example, in some embodiments, the methods involve post-application of one or more agents known to inhibit bacterial adherence to mucus and/or cells (e.g., epithelial cells). The methods are not limited to a particular type of agent known to inhibit bacterial adherence to mucus. In some embodiments, the agent known to inhibit bacterial adherence to mucus is Bio-Mos (e.g., a mannoprotein derived from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*). In some embodiments, the agent known to inhibit bacterial adherence to mucus is identified through use of the ELISA based methods of the present invention. In some embodiments, the methods involve co-application of one or more agents known to enhance bacterial adherence to mucus. The methods are not limited to a particular type of agent known to enhance bacterial adherence to mucus. In some embodiments, the

agent known to enhance bacterial adherence to mucus is identified through use of the ELISA based methods of the present invention.

In some embodiments, assays of the invention are utilized to identify and/or characterize anti-adherence compounds for intestinal and/or urinary tract bacteria (e.g., bacteria that colonize mucosal surfaces of the intestinal and/or urinary tract). In some
5 embodiments, anti-adherence compounds are identified that are utilized to prevent and/or treat disease and/or signs and/or symptoms of the same (e.g., salmonellosis, metritis, etc. (e.g., in animals (e.g., reproductive animals such as dairy cows, sows, etc.))). In some
10 embodiments, assays of the invention can be performed anywhere a microplate reader can be utilized including, but not limited to, in a lab (e.g., university, private, public, or other type of lab), in the field (e.g., on a ranch, a farm, or site of user of the assay), etc. In some
embodiments, assays and/or assay components are sold commercially and utilized by an end user (e.g., purchaser of an assay) in the end user's own lab (e.g., to check product (e.g., anti-adherence compound) efficacy, performance and/or consistency). Thus, the present
15 invention provides compositions and methods that allow users of an assay to perform their own quality characterization of compounds (e.g., anti-adherence compounds) at a user's site (e.g., on site at use of anti-adherence compound (e.g., BIO-MOS). In some embodiments, information (e.g., efficacy, quality, consistency, etc.) related to the anti-adherence
compound generated using assays of the invention is collected. In some embodiment,
20 information is collected using a database (e.g., online database) or mailings. In some embodiments, the information and/or data collected related to anti-adherence compound (e.g., efficacy, quality, consistency, etc.) is utilized in a quality control program. In some
embodiments, the information and/or data collected related to anti-adherence compound (e.g., efficacy, quality, consistency, etc.) is utilized by a provider and/or manufacturer of the
25 anti-adherence compound to monitor activity of the compound. In some embodiments, information and/or data collected related to anti-adherence compound (e.g., efficacy, quality, consistency, etc.) is utilized with animal health data collected at the site of use of the anti-adherence compound (e.g., to provide information related animal performance). In
some embodiments, a preferred physical form of an agent identified through use of the
30 ELISA based methods of the present invention (e.g., identified as a modulator of bacterial adherence to mucus) is a dry free-flowing powder suitable for direct inclusion into animal feeds or as a direct supplement to an animal. In other embodiments, a preferred physical form of an agent identified through use of the ELISA based methods of the present

invention (e.g., identified as a modulator of bacterial adherence to mucus) is a liquid or a paste that is administered post-pellet or through drinking water.

Compositions of the invention comprising an agent identified through use of the ELISA based methods of the present invention (e.g., identified as a modulator of bacterial adherence to mucus) can be added to any commercially available feedstuffs for livestock, companion animals, fishes, and shellfishes including, but not limited to, Total Mixed Ration (TMR), forage(s), pellet(s), concentrate(s), premix(es) coproduct(s), grain(s), distiller grain(s), molasses, fiber(s), fodder(s), grass(es), hay, kernel(s), leaves, meal, soluble(s), and supplement(s). Compositions of the invention comprising an agent identified through use of the ELISA based methods of the present invention (e.g., identified as a modulator of bacterial adherence to mucus) are incorporated directly into animal feeds (e.g., commercially available pelleted feeds). When incorporated directly into animal feeds, compositions comprising an agent identified through use of the ELISA based methods of the present invention may be added to the animal, fish, or shellfish feedstuffs in amounts ranging from about 0.0125% to about 0.4% by weight of feed. In some embodiments, the composition is added to animal, fish, shellfish feedstuffs in amounts from about 0.025% to about 0.2% by weight of feed. Alternatively, compositions of the invention are directly fed to animals as a supplement (e.g., in an amount ranging from about 2.5 to about 20 grams per animal per day). One of ordinary skill in the art immediately appreciates that the amount of a composition fed varies depending upon animal species, size, and the type of feedstuff to which a composition of the invention is added.

Compositions of the invention comprising an agent identified through use of the ELISA based methods of the present invention (e.g., identified as a modulator of bacterial adherence to mucus) can be fed to any animal, including but not limited to ruminant and equine species. When admixed with feed or fed as a supplement, compositions of the invention comprising an agent identified through use of the ELISA based methods of the present invention (e.g., identified as a modulator of bacterial adherence to mucus) modulate (e.g., increase or decrease depending on the agent) bacterial adherence to mucus in the animal, improving performance and health and reducing incidence of disease.

In some embodiments, the present invention provides methods for treating disorders caused by pathogenic bacteria through administering to a subject an agent known to modulate (e.g., inhibit, facilitate) bacterial adherence to mucus. In some embodiments, the agent is identified through use of the ELISA based methods of the present invention. In

method involves administration of cephalosporins, amoxicillin, and/or doxycycline. In some embodiments, the disorder is caused by *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* (e.g., brucellosis), and in some embodiments the method involves co-administration of doxycycline, streptomycin, and/or gentamycin. In some embodiments, the disorder is caused by *Campylobacter jejuni* (e.g., acute enteritis), and in some embodiments the method involves co-administration of ciprofloxacin. In some embodiments, the disorder is caused by *Chlamydia pneumoniae* (e.g., community-acquired respiratory infection), and in some embodiments the method involves co-administration of doxycycline, and/or erythromycin. In some embodiments, the disorder is caused by *Chlamydia psittaci* (e.g., Psittacosis), and in some embodiments the method involves co-administration of tetracycline, doxycycline, and/or erythromycin. In some embodiments, the disorder is caused by *Chlamydia trachomatis* (e.g., nongonococcal urethritis (NGU), trachoma, inclusion conjunctivitis of the newborn (ICN), lymphogranuloma venereum (LGV)), and in some embodiments the method involves co-administration of azithromycin, erythromycin, tetracyclines, and/or doxycycline. In some embodiments, the disorder is caused by *Clostridium botulinum* (e.g., botulism), *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani* (e.g., tetanus), *Corynebacterium diphtheriae* (e.g., diphtheria), *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis* (e.g., tularemia), *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila* (e.g., Legionnaire's Disease), *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae* (e.g., Hansen's disease), *Mycobacterium tuberculosis* (e.g., tuberculosis), *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsii*, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*,

some embodiments, the disorder is caused by *Bacillus anthracis* (e.g., cutaneous anthrax, pulmonary anthrax, gastrointestinal anthrax), and in some embodiments the method involves co-administration of penicillin, doxycycline and/or ciprofloxacin. In some embodiments, the disorder is caused by *Bordetella pertussis* (e.g., whooping cough, secondary bacterial pneumonia), and in some embodiments the method involves co-administration of macrolide antibiotics (e.g., azithromycin, erythromycin, clarithromycin). In some embodiments, the disorder is caused by *Borrelia burgdorferi* (e.g., lyme disease), and in some embodiments the method involves co-administration of cephalosporins, amoxicillin, and/or doxycycline. In some embodiments, the disorder is caused by *Brucella* pathogenic bacteria (e.g., *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*) (e.g., brucellosis), and in some embodiments the method involves co-administration of doxycycline, streptomycin, and/or gentamycin. In some embodiments, the disorder is caused by *Campylobacter jejuni* (e.g., acute enteritis), and in some embodiments the method involves co-administration of ciprofloxacin. In some embodiments, the disorder is caused by *Chlamydia pneumoniae* (e.g., community-acquired respiratory infection), and in some embodiments the method involves co-administration of doxycycline, and/or erythromycin. In some embodiments, the disorder is caused by *Chlamydia psittaci* (e.g., Psittacosis), and in some embodiments the method involves co-administration of tetracycline, doxycycline, and/or erythromycin. In some embodiments, the disorder is caused by *Chlamydia trachomatis* (e.g., nongonococcal urethritis (NGU), trachoma, inclusion conjunctivitis of the newborn (ICN), lymphogranuloma venereum (LGV)), and in some embodiments the method involves co-administration of azithromycin, erythromycin, tetracyclines, and/or doxycycline. In some embodiments, the disorder is caused by *Clostridium botulinum* (e.g., botulism), *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani* (e.g., tetanus), *Corynebacterium diphtheriae* (e.g., diphtheria), *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis* (e.g., tularemia), *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila* (e.g., Legionnaire's Disease), *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae* (e.g., Hansen's disease), *Mycobacterium tuberculosis* (e.g., tuberculosis), *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsii*, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*,

Streptococcus pneumoniae, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholerae*, and *Yersinia pestis* (e.g., plague).

In some embodiments, the present invention provides kits configured to permit a user to practice the methods of the present invention (e.g., methods for detecting, identifying, and measuring bacterial adherence to mucus). In some embodiments, the kits contain one or more the following ingredients, mucus samples, plates coated with mucus samples, bacteria, primary antibodies, secondary antibodies, liquid substrate, washing solutions, a device configured to interpret ELISA based assays, instructions, an agent known to decrease bacterial adherence to mucus (e.g., Bio-Mos) (e.g., an agent identified through use of the ELISA based methods of the present invention), an agent known to increase bacterial adherence to mucus (e.g., an agent identified through use of the ELISA based methods of the present invention), and additional treatment agents (e.g., antibiotics).

15 EXPERIMENTAL

The following examples are provided in order to demonstrate and further illustrate certain preferred embodiments and aspects of the present invention and are not to be construed as limiting the scope thereof.

20 Example 1

Materials and methods utilized in colorimetric ELISA versus radioactive detection of bacterial adherence to intestinal matter

Bacterial strains. Two *E. coli* strains were selected for the development project: *E. coli* ALI84 and ALI446. The former was originally isolated from sick birds and the latter strain was isolated from a pig with diarrhea. These strains were selected because they have displayed adherence to pig mucus. The bacteria were grown in LB-broth and transferred to a fresh medium (culture:medium 1: 10) on the day before experiments. The number of bacteria was estimated according to culturing time.

Antibodies. Antibodies were purchased from Acris Antibodies GmbH, Germany and Sigma Aldrich, Germany. Primary antibodies included: a HRP-conjugated polyclonal antibody to *E. coli* O and K antigenic serotypes (Acris catalogue number BP2022HRP); a polyclonal antibody to *E. coli* O and K antigenic serotypes (Acris catalogue number

BP2022); and a biotin-conjugated polyclonal antibody to *E. coli* O and K antigenic serotypes (Acris catalogue number BP1021B).

Secondary antibodies include: an affinity purified Rabbit anti-Goat IgG-HRP (Acris catalogue number R1317HRP); an affinity purified Rabbit anti-Goat IgG-AP (Acris catalogue number R1317AP); a polyclonal FITC-conjugated antibody to Goat IgG (H&L) (Acris catalogue number R13 17F); Streptavidin-Alkaline Phosphatase from *Streptomyces avidinii* (Sigma catalogue number S2890); Streptavidin-Peroxidase from *Streptomyces avidinii* (Sigma catalogue number S5512). ELISA-substrates were purchased as ready-to-use solutions from Sigma-Aldrich, Germany: 3,3',5,5' -tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma catalogue number T4319); TMB slow kinetic form (later TMB slow) (Sigma catalogue number T0440); TMB super sensitive (later TBM super) (Sigma catalogue number T4444); P-nitrophenyl phosphate (Sigma catalogue number N7653); 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (AzBTS; Sigma catalogue number A3219) + ABTS microwell enhancer (Sigma catalogue number AI227).

15 Buffers. Originally, HEPES-Hanks buffer (pH 7.4) was used for washing the wells except for the final wash in which PBS was used to avoid disturbance of the red colored HEPES-Hanks in ELISA. In some embodiments, PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) was included in all steps in place of HEPES-Hanks buffer.

Plates. For ELISA experiments, 96-well immuno plates were used (MaxiSorp, Nunc, Denmark, later in this report "Maxisorp plates"). For scintillation experiments, polyethylene terephthalate microtiter plates were used (96-well PET sample plate, 1450-401; Wallac Oy, Turku; referred to herein as "soft plates") for use in a scintillation counter.

A conventional radioactive binding/attachment assay, described below, was utilized as a control for the colorimetric ELISA.

25 Radioactive labeling of bacteria for radioactive attachment assay. The bacteria were grown overnight at +37°C and the bacterial suspension diluted 1: 10 into a new batch of LB and methyl-1, -2, 3H thymidine (117 I-Ci/mmol; Amersham) was added. The bacteria were incubated for 2h at +37°C and collected by centrifugation for 5 min at 3000 g. Bacterial pellet was resuspended in HEPES-Hanks buffer or PBS and used in the attachment assay.

30 Radioactive attachment assay. 200ul of diluted bacterial suspension was added in microtiter wells and the plates were incubated for 1h at +37°C. Unbound cells were removed by washing three times with 300ul of HEPES-Hanks buffer or PBS. 250ul of scintillation liquid was added and the radioactivity measured with a scintillation counter.

Mucus isolation and immobilization. The plates were coated with different concentrations of mucus from different animals. Mucus from the proximal ileum of a -1 year old pig was used unless otherwise indicated. The mucus was scraped from the surface of intestine and washed. Crude mucus extract was stored at -80°C until usage. For coating, the protein concentration of the mucus was adjusted to 0.0 - 0.2 mg/ml using sodium carbonate buffer (coating buffer, pH 9.6), and the optimal mucus concentration for bacterial adherence tested. Mucus solution was immobilized on the plates by introducing 300µl or 200µl of mucus into each 350ul well. The plate was then incubated at +4°C overnight. Extra mucus was removed from the microtiter wells by washing twice with 300µl of HEPES-Hanks buffer or PBS.

Microfuge method used in testing unspecific color development by *E. coli* with ELISA-substrates. A fresh culture of *E. coli* ($\sim 10^8$ bacteria/ml) was divided into microfuge tubes ($\sim 10^7$ /tube). The tubes were centrifuged for 5 minutes/3000g, and the supernatant was removed. The bacteria were suspended to 700µl of ELISA substrate. The absorbance of the suspension was read with spectrophotometer at 370, 405 and 630 nm after five minutes and then each 15 minutes until 3 hours.

FITC method used in testing primary antibody specificity. The specificity of the primary antibody (polyclonal anti-*E. coli*, BP2022, compatible with FITC-conjugated secondary antibody) was tested with fluorescence microscopy. 10^8 bacteria were introduced to each microfuge tube and washed three times with 1 ml of PBS (and centrifuged 3000g/5min between the washes). Primary antibody diluted to 1: 100, 1:500, 1: 1000 in 1%BSA/PBS was introduced to each tube and incubated at room temperature for 45 min. 1%BSA/PBS was used as a negative control. The bacteria were washed three times with PBS and the secondary antibody (FITC-conjugated rabbit antigoat IgG) was introduced in dilutions of 1:100,1:500, and 1:1000 in 1% BSA/PBS. The tubes were incubated at room temperature for 1h. The bacteria were washed twice with PBS and filtered with Whatman BLACK NUCLEPORE membranes, pore size 0.2µm. The filters were washed twice with PBS, moved to microscope slides and sealed with a drop of immersion oil. The slides were kept dark.

Basic ELISA protocol. A basic protocol is described below, but the exact conditions in each experiment are described in context of the results described below. 0 to 10^7 bacteria suspended in buffer were introduced in the mucus coated wells. Unless otherwise stated, 0.1 mg/ml mucus concentration and 10^7 bacteria/well were used. In some experiments, Bio-

Mos (Alltech, Nicholasville, KY) was added together with the bacteria diluted in PBS at the below described concentrations.

The plates were incubated at +37°C or room temperature for 1 hour. The plates were washed with buffer (PBS or HEPES-Hanks, 300ul), three times. Unspecific binding was blocked either with milk, fetal bovine serum or BSA (bovine serum albumin) in PBS. The plates were incubated for 1 hour at +37°C or room temperature. The blocking buffer was removed and primary antibody was introduced in dilutions between 1:200 and 1:100 000. The antibody was diluted in blocking buffer. The plates were again incubated for 1 hour at +37°C or room temperature and washed three times with PBS or HEPES-Hanks. Secondary antibody was added in dilutions between 1: 1000 and 1: 100 000 in blocking buffer. The plates were incubated for 1 hour at +37°C or room temperature. After the last incubation, the plates were washed five times with PBS (300ul/well) to ensure that all free secondary antibody was completely removed. Substrate was added and the plate read with an ELISA reader and/or photographed.

15

Example 2

Intestinal mucus concentration

In order to identify concentrations of mucus in the coating suspension, wells were coated with suspensions with different mucus concentrations. Mucous concentration was a variable identified to be important for assay reliability (e.g., if the mucus concentration is too low the bacteria may bind to the plate instead of mucus). Basic method: Radioactive attachment assay (see above Materials and methods). Plates: 96-well PET plates (soft plates); Mucus: Pig proximal ileum, 0.0-0.2 mg protein/ml coating buffer; Bacteria: *E. coli* strain ALI84 on one plate, *E. coli* strain ALI446 on the other plate; 10^7 bacteria/well. Buffer: HEPES-Hanks; Blocking: No blocking; Primary antibody: None; Secondary antibody: None; Incubation temperature: +37°C. The effect of mucus concentration of *E. coli* ALI 84 and ALI446, as measured by radioactively-labeled bacteria is shown in Figure 1.

Figure 1 indicates that the bacteria showed optimal adherence to the wells with no mucus. In order to verify that the bacteria attach to the mucus and not to the plate, a relatively high mucus concentration (0.1mg protein/ml coating buffer) was identified and chosen for subsequent experiments. Thus, in some embodiments, the present invention

30

utilizes a suitable mucous concentration for coating wells (e.g., an amount that reduces and/or eliminates bacteria binding to plate wells).

Example 3

5 **Analysis of inhibitory effects of primary antibodies on bacterial adherence**

To test if the primary antibodies influence the adherence of bacteria, bacteria in mucus coated wells were incubated with antibody dilutions ranging from no antibody to 1:200. Basic method: Radioactive attachment assay (see Materials and methods). Plates: 96-well PET plates (soft plates); Mucus: Pig proximal ileum; Bacteria: *E. coli* strain ALI84
10 on one plate, *E. coli* strain ALI446 on the other plate. 10^7 bacteria/well; Buffer: HEPES-Hanks; Blocking: No blocking; Primary antibodies: HRP=HRP-conjugated anti-*E. coli*; BP2022=unconjugated anti-*E. coli*, Biotin=biotin-conjugated anti-*E. Coli*; Secondary antibodies: No 2nd antibody; Incubation temperature: +37°C.

As described in Figures 2 and 3, two different first primary antibodies enhanced the
15 adherence of the bacteria to mucus at the lowest concentration (diluted 1:20000) but slightly reduced the adherence at the 1:200 dilution. It is possible that the Fc region of the two first antibodies is free to attach to the mucus, whereas the binding of this region to the mucus is blocked by biotin in the third antibody. At a low concentration, the two first antibodies may act to associate the bacteria and mucus (Fab region binding to bacteria and Fc region
20 binding to mucus). At higher concentrations, (dilution 1:200), the binding of bacteria to the mucus is reduced as antibodies are apparently blocking mucus binding sites on the bacterial surface (or bacteria binding sites on the mucus). The biotin-conjugated antibody had a very small effect; it appears to have enhanced adhesion. Furthermore, in this experiment, primary antibody was added together with the bacteria, but in the colorimetric attachment ELISA
25 methods described herein, the bacteria are first incubated alone for 1 hour. Thus, in some embodiments, the effect of antibodies on bacterial adherence/binding (e.g., antibody actually increasing or decreasing bacterial adherence) is reduced and/or eliminated when the bacteria have attached to the mucus (e.g., in the absence of antibody). Also, in some embodiments, fetal bovine serum or other blocking agent can be utilized for blocking
30 unspecific binding. Thus, in some embodiments, the present invention provides that HRP-conjugated primary antibody and non-conjugated primary antibody alter (e.g., enhance or inhibit) adherence of bacteria to mucus in a conventional, radioactive attachment assay, and that the colorimetric assay of the present invention does not suffer from such alteration.

Furthermore, as all antibodies tested appeared suitable for methods described herein, the present invention also provides that binding/attachment assays of the invention are suitable with a wide variety of antibodies (e.g., non-conjugated and conjugated antibodies).

5

Example 4

Non-specific color development by *E. coli* with ELISA-substrates

The ability of the two selected strains of *E. coli* to produce an non-specific color reaction with ELISA-substrates was tested. The experiment was carried out in microfuge tubes incubating bacteria with the substrates. A microfuge method (See Example 1
10 Materials and methods) was utilized.

As shown in Figures 4 and 5, the color produced by the bacteria was minimal and comparable to the color development of the substrate only. Within a time frame of about 5 to 30 minutes, none of the substrates produced a significant color reaction. Thus, in some embodiments, the present invention provides that each of the ELISA substrates described
15 herein is suitable for use in an adherence/attachment assay of the invention.

Example 5

Non-specific color development by mucus with ELISA-substrates

Five mucus samples from a -1 year old pig were tested for their ability to produce an
20 non-specific color reaction with the ELISA substrates. An ELISA was performed as described in Example 1 Materials and methods. Plate: Soft plate; Mucus: Pig proximal ileum, mid and distal ileum and proximal and distal colon; Bacteria: No bacteria; Antibodies: No antibodies; Buffer: PBS; Blocking: 1% BSA/PBS 1hour; Incubation temperature: +37°C; Substrate: All six substrates shown in Figure 6.

As shown in Figure 6, the mucus from pig ileum but not colon produced a color
25 reaction with para-nitrophenyl phosphate (pNPP). Other substrates did not react with the mucus. The color production of pNPP may be due to an intrinsic phosphatase present in the ileal mucus. Thus, the present invention provides, in some embodiments, mucus from pig ileum but not colon produces a color reaction with para-nitrophenyl phosphate (pNPP).
30 Other substrates did not react with the mucus.

Example 6

Primary antibody specificity testing

The specificity of the primary antibody was tested with fluorescence microscopy. In brief, the bacteria were blocked with BSA, incubated first with a primary and then with a secondary, FITC-conjugated antibody. The fluorescence was visualized with a fluorescence microscope. The FITC method described in Materials and Methods of Example 1 was
5 utilized.

All samples with the secondary antibody showed some fluorescence even if primary antibody was absent, and the concentration of the secondary antibody produced the most remarkable differences between the samples. Thus the present invention provides that, in some embodiments, non-specific binding can be attenuated and/or inhibited using fetal
10 bovine serum (FBS) and/or bovine serum albumin (BSA)

Example 7

Non-specific binding of antibodies to mucus or plate

To test if antibodies bind non-specifically to the plate or mucus without bacteria,
15 primary and secondary antibodies were added into a mucus coated plate. The ELISA method described in Example 1 was utilized. BSA was used for blocking non-specific binding. Plate: MaxiSorp plate; Mucus: Pig proximal ileum; Bacteria: No bacteria; Blocking: 1 % BSA in PBS; Buffer: PBS; Primary antibodies: see Table 1; 200ul of different dilutions in 1 % BSA in PBS; Secondary antibodies: see Table 1; 200ul of
20 different dilutions in 1 % BSA in PBS; Incubation temperature: +37°C; Substrates: TMB (for HRP-conjugated 2nd antibodies), pNPP (for AP-conjugated 2nd antibodies). Figures 7 and 8 shows the plate layout for testing of non-specific binding of antibodies to mucus or plate, and results of non-specific binding, respectively. No bacteria were used in the experiment. Thus, in some embodiments, the present invention provides a strong non-
25 specific binding of the antibodies to the mucus or plate. In some embodiments, BSA is not an appropriate blocking agent for the attachment assays of the invention.

Example 8

Testing blocking agents to prevent non-specific binding of antibodies

30 The secondary antibody bound strongly to mucus/plate without addition of any bacteria or primary antibody (See Figure 8). Thus, milk and fetal bovine serum were tested in place of BSA for blocking the non-specific binding. The basic ELISA method described in Example 1 was utilized. Plate: MaxiSorp plate; Mucus: Pig proximal ileum; Blocking:

5% non-fat milk powder in PBS or 10% fetal bovine serum in PBS for 1h at +37°C; Buffer: PBS; Primary antibodies: see Table 2; 200ul of different dilutions in the blocking buffer; Secondary antibodies: see Table 2; 200ul of different dilutions in the blocking buffer; Streptavidin-conjugated secondary antibody was used in dilutions of 1: 1000 and 1: 10000, according to the manufacturer's recommendation. Incubation temperature: +37°C; Substrate: TMB. Figure 9 shows the plate layout for the assay. Primary antibodies: **HRP** = HRP-conjugated 1st ab, BP2022= non-conjugated polyclonal anti-*E. coli* 1st antibody; Biotin= biotin-conjugated anti-*E. coli* 1st antibody. Secondary antibodies: HRP=HRP-conjugated IgG; StrHRP=HRP-labeled streptavidin. No bacteria were used in this experiment.

As shown in Figure 10, fetal bovine serum blocked non-specific binding more efficiently than milk. Non-specific binding was minimal with the biotin-streptavidin-complex and strongest with BP2022 -primary antibody. Based on this experiment, 10% fetal bovine serum in PBS was chosen for blocking in experiments. Thus, the present invention provides that 10% fetal bovine serum in PBS was a suitable blocking agent for attachment assays of the present invention.

Example 9

Bacterial binding to mucus coated plates

Optimization of the whole ELISA protocol (including both mucus and bacteria) was commenced by optimizing the dilution of the antibodies and the number of bacteria/well. The basic ELISA method described in Example 1 was utilized. Plate: MaxiSorp plate; Mucus: Pig proximal ileum; Bacteria: *E. coli* strains AL184 and AL1446, the number of bacteria/well is indicated in Figure 11. Buffer: HEPES-HanksIPBS; Blocking: 10 % fetal bovine serum in PBS; Primary antibodies: 200ul of different dilutions in the blocking buffer (Figures 11 and 13); Secondary antibody: 200ul of different dilutions in the blocking buffer (Figure 13); Incubation temperature: +37°C; Substrate: TMB.

As shown in Figures 12 and 14, the biotin-streptavidin complex was more specific than the HRP-conjugated primary antibody. No unspecific binding was observed (See Figure 14, controls, two separate rows). This confirmed the result obtained in Example 8.

Thus, it was determined to continue with the biotin-streptavidin combination only. Figure 14 shows that a dilution of 1: 1000 was able to produce a reaction on even smaller number of bacteria, and therefore this dilution was chosen for additional experiments. The

dilution of the primary antibody was also optimized. Figure 14 shows that 1: 10 000 was too small of a dilution of secondary antibody (streptavidin-HRP) to be useful for detecting a small number of bacteria (thus, in some embodiments, a 1:1000 dilution was utilized).

5 Biotin-streptavidin combination was more specific than other antibodies and was utilized in subsequent experiments. Thus, the present invention provides that, in some embodiments, 10^7 bacteria/well is an optimal number of bacteria to utilize in a attachment assay of the invention, although greater (e.g., more than 10^7 bacteria/well (e.g., 10^8 bacteria, 10^9 bacteria, 10^{10} bacteria or more)) or fewer (e.g., less than 10^7 bacteria/well (e.g., 10^6 bacteria, 10^5 bacteria, 10^4 bacteria or less)) can also be utilized. A 1:1000 - 1:10 000
10 dilution of primary antibody was optimal in this experiment, but the amount of primary antibody can be above or below this range. In some embodiments, an amount of primary antibody is chosen so as not to limit the color reaction.

Example 10

15 Linearity of the ELISA in detecting the number of bacteria

In order to estimate the linear range of the ELISA method, the ELISA was performed with different numbers of bacteria/well. The basic ELISA method described in Example 1 was utilized. Plate: MaxiSorp plate; Mucus: Pig proximal ileum; Bacteria: *E. coli* strain ALI84, 107 bacteria/well; Buffer: PBS; Bio-Mos: None; Blocking: 10 % fetal
20 bovine serum; Primary antibody: biotin-conjugated primary antibody, 1: 1000 dilution in blocking; Buffer; Secondary antibody: HRP-conjugated streptavidin, 1: 1000 dilution in blocking buffer; Incubation temperature: $+37^{\circ}\text{C}$ for one plate, room temperature for the other plate; Reagents at room temperature; Substrate: TMB.

The absorbance at 620 nm versus the number of bacteria was plotted. For bacterial
25 counts up to 10^6 bacteria/well, the relationship was linear (See Figure 16), but from 10^6 to 10^8 , the closest fit trend line was logarithmic (See Figure 15). Thus, the present invention provides that at a certain number of bacteria/well, the ability of mucus to bind to bacteria decreases as the binding sites become saturated.

Thus, in some embodiments, an assay of the invention is linear through a range of
30 bacterial cell numbers/well (e.g., from 0 through about 10^6 bacteria per well). In some embodiments, the present invention provides a highly sensitive calculation of bacteria attached per well. In some embodiments, the methods of the invention are standardized (e.g., to achieve repeatable, comparative results).

Example 11

The effect of Bio-Mos on bacterial adherence

To test the linearity and resolution of the ELISA-method, different concentrations of Bio-Mos were used to block the adhesion of bacterial cells to mucus. The results using the basic colorimetric ELISA described in Example 1 were compared with results obtained utilizing the radioactive attachment assay also described in Example 1. Plate: MaxiSorp plate and soft plate; Mucus: Pig proximal ileum; Bacteria: *E. coli* strains ALI84 and ALI446, $\sim 10^7$ bacteria/well. The same suspension of radioactively labeled bacteria was used for both plates to ensure that the plates were identical; Buffer: HEPES-Hanks, PBS; Bio-Mos: Concentrations 0-20 g/l, diluted in PBS; Blocking (only MaxiSorp plate): 10% fetal bovine serum in PBS; Primary antibody (only MaxiSorp plate): biotin-conjugated primary antibody (1:1000 in blocking buffer); Secondary antibody (only MaxiSorp plate): HRP-conjugated streptavidin (1:1000 in blocking buffer); Incubation temperature: +37°C; Substrate: TMB.

As shown in Figures 17A and 17B, the radioactive assay detected differences in bacterial adherence when different concentrations of Bio-Mos were used. After performing the ELISA, both plates were measured with scintillation counter (5min/well). Figure 17B shows that the scintillation counts are lower after performing the ELISA, suggesting that bacteria were washed away during the ELISA. However, a clear effect of Bio-Mos was observed.

An unexpected feature of the colorimetric ELISA method was identified in that it was able to detect attachment differences between wells with no bacteria (controls) and wells with the greatest concentration of Bio-Mos (with the smallest number of bacteria) (See Figure 17A), whereas the scintillation counts of the wells with the greatest Bio-Mos concentration are close to the no bacteria control (Figure 15). Thus, the present invention provides, in some embodiments, an ELISA method that can detect a attachment/adherence differences between wells with the greatest concentration of Bio-Mos (with the fewest number of bacterial cells) and with no bacteria (controls) (e.g., the colorimetric assay is much more sensitive than the radioactive assay in this concentration range).

Example 12

Bacterial numbers important for detecting attachment alteration effects

The aim of this experiment was to find the number of bacteria/well for detecting the effect of Bio-Mos. Basic method: ELISA (see Materials and methods); Plate: MaxiSorp plate; Mucus: Pig proximal ileum; Bacteria: *E. coli* strains ALI84 and ALI446, 0-108/well; Bio-Mos: Concentrations 0-20g/l diluted in PBS; Buffer: PBS; Blocking: 10 % fetal bovine serum; Primary antibody: Biotin-conjugated primary antibody, 1: 1000 dilution in blocking buffer; Secondary antibody: HRP-conjugated streptavidin, 1: 1000 dilution in blocking buffer; Incubation temperature: +37°C; Substrate: TMB.

As shown in Figures 18-19, it was determined that, in some embodiments, the number of bacteria/well should exceed 10^5 in order to produce detectable differences. Clear differences can be seen when using 10^7 bacteria/well. 10^8 bacteria/well also produces clear differences, but the reaction reaches its endpoint very fast and can thus cause variation as the substrate cannot be added simultaneously to all wells. It is also possible that at very high number of bacteria/well, antibody- or substrate concentrations or mucus binding sites become limiting. Therefore, subsequent experiments were performed with $\sim 10^7$ bacteria/well. With both *E. coli* strains, very low concentrations of Bio-Mos appeared to enhance the attachment of the bacteria to the mucus. Thus, in some embodiments, assays of the present invention have identified that relatively low levels (e.g., about 0.1 to about 1.0 g/l) of an inhibiting agent (e.g., Bio-Mos) removes bacteria more efficiently than a larger amount of agent.

Example 13

Improved washing method

Until now, a Nunc immunowash device was utilized for washing steps, but due to considerable variation between replicate wells, it was determined that this may be too rough of a method. Therefore, a different washing method was tested in order to minimize the variation between samples. The new method was based on shaking away the liquids. Basic method: ELISA (see Materials and methods); Plate: MaxiSorp plate; Mucus: Broiler duodenum; Bacteria: *E. coli* strain ALI84, 107 bacteria/well; Buffer: PBS; Bio-Mos: Concentrations 0, 0.1, 1 and 10, added together with bacteria; Blocking: 10 % fetal bovine serum; Primary antibody: Biotin-conjugated primary antibody, 1: 1000 in blocking buffer; Secondary antibody: HRP-conjugated streptavidin, 1: 1000 in blocking buffer; Incubation temperature: +37°C; Substrate: TMB. As shown in Figure 20, the new washing method ("shake wash") provided superior results for the ELISA method. The overall signals were

greater, and greater differences were detected between different Bio-Mos concentrations. The new method is also faster and allows handling several plates simultaneously. However, it is important that the method be performed under conditions to avoid mixing the contents of the wells. Thus, the present invention provides a new shake-wash method that is superior to conventional washing methods. In the shake-wash method wash buffer is added with a pipette to the well before gently shaking the plate upside down to empty the wells without allowing the solution to transfer from one well to another. This is repeated as many times as necessary.

10

Example 14

Primary antibody concentration

Until now, a 1: 1000 dilution of the primary antibody had conventionally been utilized in radioactive assays in order to ensure that the antibody concentration did not limit the sensitivity of the ELISA. Thus, if an assay of the present invention is to be utilized in large scale settings, antibody dilution may play a critical role in deployment of the assay. Dilution of primary antibody was tested to determine feasibility of deployment of the assay on a large scale. The basic ELISA describe in Example 1 was utilized; Plate: MaxiSorp plate; Mucus: Pig proximal ileum; Bio-Mos: Concentrations 0, 5 and 10 g/l, diluted in PBS; Bacteria: *E. coli* strain ALI84, $\sim 10^7$ bacteria/well; Blocking: 10 % fetal bovine serum in PBS; Primary antibody: 200 μ l of biotin-conjugated primary antibody (in a range of 1: 1000-1: 10 000) in blocking buffer); Secondary antibody: 200 μ l of HRP-conjugated streptavidin (1: 1000 in blocking buffer); Incubation temperature: room temperature; Substrate: TMB.

The 1: 1000 dilution provided a good resolution between Bio-Mos levels, although lesser dilutions also worked well. Thus, in some embodiments, a dilution of 1:1000 or less (e.g., 1:900, 1:750, 1:500, or less) is utilized to provide discernable resolution differences in an assay of the invention. Thus, in some embodiments, a dilution of primary antibody is chosen that is capable of saturating all binding sites on the bacteria tested in an assay. In some embodiments, if an assay of the invention is utilized for detecting the effect of very low amounts (e.g., concentrations of about 0.0001 g/l to about 1.0g/l), of attachment inhibiting agent (e.g., Bio-Mos) even smaller dilution of primary antibody may be utilized (e.g., 1:750, 1:500 or less (e.g., to ensure that antibody concentration does not limit color

development). Alternatively, in some embodiments, the number of bacteria per well is reduced to increase color formation.

Example 15

Assay reaction volume

5 Colorimetric signal developed extremely rapidly in wells with the greatest number of bacteria. Therefore, it was determined whether a smaller mucus area (e.g., that is capable of binding fewer bacteria (e.g., thereby reducing signal intensity)) would reduce the signal intensity. It was also determined if it is possible to reduce the amount of reagents by
10 reducing the volume needed to fill the coated well. Wells with a smaller mucus area worked well, and the detection limit of bacteria/well was similar to results obtained in earlier examples. The color developed slower than earlier. Thus, the present invention provides that, in some embodiments, the volume of the mucus in a single well can be between about 200 μ l to about 300 μ l (e.g., depending upon the strength of the signal
15 desired). In some embodiments, the volume of mucus can be less than 200 μ l (e.g., 150 μ l, 100 μ l, or less) or more than 300 μ l (e.g., 350 μ l, 400 μ l, or more). In some embodiments, the present invention provides that smaller volumes of mucus coating permits use of fewer reagents (e.g., about half the amount of reagents is sufficient for wells with 200 μ l of mucus compared to the amount required with a well containing 300 μ l of mucus) without a loss of
20 assay sensitivity and functionality (e.g., detectable signal). Thus, the present invention provides methods and assays for maintaining assay sensitivity and functionality while concurrently reducing expense related to reagent depletion.

Example 16

Mucus source

25 In previously conducted experiments (e.g., Examples 1-15), pig proximal ileum mucus had been utilized. In order to determine if colorimetric detection is possible with other sources of mucus, multiple other sources of mucus were tested (e.g., pig proximal ileum, pig distal colon, broiler duodenum and broiler caecum) in the context of the ELISA
30 assay described in Example 1. Plate: MaxiSorp plate; Mucus: Pig proximal ileum and distal colon, broiler duodenum and caecum; Bacteria: *E. coli* strain ALI84, 10^7 bacteria/well; Buffer: PBS; Bio-Mos: Concentrations 0, 0.1, 1 and 10, added together with bacteria; Blocking: 10 % fetal bovine serum; Primary antibody: Biotin-conjugated primary

antibody, 1: 1000 dilution in blocking buffer; Secondary antibody: HRP-conjugated streptavidin, 1: 1000 dilution in blocking buffer; Incubation temperature: +37°C; Substrate: TMB.

As shown in Figure 21, bacteria displayed different levels (e.g., strength and/or affinity) of attachment depending upon the type of mucus utilized. For example, bacteria tested displayed almost a two fold greater attachment to mucus obtained from broiler duodenum and broiler caecum than to mucus obtained from pig ileum and pig colon. However, the colorimetric assay was sensitive and robust enough to capture the different levels of bacterial adherence, as well as the ability of a blocking agent (e.g., Bio-Mos) to inhibit bacteria adherence to mucus over a range of blocking agent concentrations. Thus, in some embodiments, the present invention provides a non-radioactive, colorimetric binding assay that find utility with various types and/or sources of mucus (e.g., from different animals and from different portions of the digestive tract (e.g., gut)).

Example 17

Radioactive assay versus colorimetric assay

A side-by-side experiment was conducted to compare materials and methods utilized in the colorimetric assay of the invention with materials and methods utilized in conventional radioactive assays and to assess each assay's ability to detect Bio-Mos induced differences in bacterial adherence. Plates: MaxiSorp plate and soft plate; Mucus: Pig proximal ileum; Bio-Mos: 50µl/well in different concentrations, diluted in PBS; Bacteria: ~10⁷ bacteria/well. The same suspension of radioactively labeled bacteria was used for both plates to ensure that the plates are identical; Blocking (only on MaxiSorp plate): 10 % fetal bovine serum in PBS; Primary antibody (only on MaxiSorp plate): 100µl of biotin-conjugated primary antibody (1: 1000 in blocking buffer); Secondary antibody (only on MaxiSorp plate): HRP-conjugated streptavidin (1: 1000 in blocking buffer); Incubation temperature: Room temperature; Substrate: TMB; After the ELISA, both plates were filled with scintillation liquid and radioactivity was measured with a scintillation counter.

The effect of Bio-Mos was observed to be very similar utilizing the materials and methods of both assays. Low concentrations of Bio-Mos appeared to enhance the attachment of the bacteria to the mucus. Although a mechanism is not necessary to practice the invention and the invention is not limited to any particular mechanism of action, in some embodiments, at the lowest concentrations, Bio-Mos or other type of inhibitory agent

participates in the formation of aggregates of the bacteria. Thus, even if the lowest concentration increased the attachment as measured by the assays, it is likely that (e.g., in the context of the lumen of the gut) the aggregates are more easily washed away from the gut. Thus, low Bio-Mos or other inhibitory agent concentration (e.g., identified and/or
5 characterized by methods of the invention described herein) may actually remove bacteria more efficiently than and/or as efficiently as higher concentrations.

As seen in Figure 22, at very low concentrations of Bio-Mos, the absorbance of the two methods differed somewhat. The trend of the ELISA line is similar already at very early time points (=low absorbances), and thus the downward trend from 1.0g/l to 0.1g/l is
10 unlikely to result from limitations in the capacity of the ELISA reader. It is possible that color development might be limited by the concentrations of antibodies or substrate, but this hypothesis does not explain the slight downward trend from 1.0 g/l to 0.1 g/l.

These results and those of the other examples show that the highest absorbances are obtained with either 0.1 g/l or 1.0 g/l. Thus, the present invention provides that the
15 variation is caused, in some embodiments, by differences in the number of bacteria between experiments. Thus, in some embodiments, for comparable results, one can use the same bacterial suspension or standardize the culturing method to make sure that the original number of bacteria is similar in parallel experiments. Thus, in some embodiments, reducing the number of bacteria/well might ensure that Bio-Mos and/or other blocking agent (e.g.,
20 test agent) concentration is the most limiting factor, instead of the number of mucus binding sites or antibody or substrate concentrations.

Example 18

Non-radioactive bacterial binding assay

25 Experiments were conducted during the development of embodiments of the invention in order to further test use of the colorimetric ELISA generated herein for measuring pathogen attachment and to assess the degree of test agent alteration of the attachment. Thus, experiments were conducted to determine if the assay could be utilized to screen test agents that may or may not alter (e.g., inhibit) bacterial attachment to mucus.
30 Thus, experiments were conducted to determine if the assay could be utilized to screen test agents that may or may not alter (e.g., inhibit) bacterial attachment to mucus. In short, the present invention provides an alternative to using radioactive, live pathogens (e.g., an assay of the invention need not use live nor radioactive bacteria (e.g., the present invention

provides that ethanol-inactivated bacteria can be utilized in an attachment assay)) and also provides air dried, mucus coated plates. Thus, methods developed during development of embodiment s of the invention provide significant benefits over conventional methods in that, in some embodiments, the methods provided herein eliminate the need to use live
5 and/or radioactive bacteria (e.g., pathogenic bacteria) and also eliminate the need to adjust bacterial density each time the assay is conducted.

Storage and uniformity of the bacterial preparation. As described in Examples 9, 10 and 12, the density of bacterial preparation used in the attachment assay was identified as an important variable in the reaction. At low bacterial density the signal was weak, whereas at
10 high bacterial density the signal was above the linear range. From these data, it was determined that for accuracy, sensitivity and comparability of successive assays, a fixed bacterial density was needed. It was also determined whether a standard, bacterial suspension (e.g., for use in a series of assays not taking place at the same time (e.g., on different days, or in different weeks or months)) could be generated (e.g., that was easy to
15 store, use, and that was non-pathogenic). A plurality of bacterial preservation and inactivation methods were identified and tested including preservation and inactivation by chemical fixatives (e.g., ethanol, glutaraldehyde, formalin, DMSO), inactivation by UV irradiation, and use of frozen, live bacterial suspension

Conservation of the mucus-coated plates. In the previously described assays (e.g.,
20 Example 1-15), 96-well plates were coated with mucus each time the assay was run. As described, this procedure required overnight incubation. Thus, experiments were conducted to determine if this time consuming process could be replaced (e.g., by pre-coated, long term storable mucus coated plates). A variety of methods were tested including freezing coated plates as well as air drying the plates and using post long term storage (e.g., with
25 different mucus types).

Methods.

Culturing and inactivation of bacteria. Bacteria were grown at 37°C in Luria broth and transferred in a fresh medium (10% inoculum) one day before intended tests. Multiple different methods of inactivating or preserving bacteria were tested:

30 Freezing: grown bacterial culture was frozen at -20°C. Before use, the culture was thawed at room temperature. One batch was frozen with glycerol to protect the cells from damage during freezing, but this approach was discontinued as collecting bacteria from glycerol was problematic and produced non-useful results.

Ethanol: 99% ethanol was added 1:1 to bacterial culture in Luria broth to produce a 50% ethanol solution. The suspension was stored at 4°C.

Glutaraldehyde: glutaraldehyde was used at 4% final concentration. The suspension was stored at 4°C.

5 Formalin: formaldehyde was used at 4% final concentration. The suspension was stored at 4°C.

UV: the culture was irradiated under a UV lamp for 30 or 60 minutes. The suspension was stored at 4°C.

10 Dimethyl sulfoxide: DMSO was added in the culture at 10% concentration. The suspension was stored at 4°C.

Heat: The culture was heated at 70°C for 30 minutes and thereafter stored at 4°C.

Bacteria were harvested by centrifugation just before use.

Preparing and conserving the mucus-coated plates. Mucus scraped from the intestine of piglets was diluted in NaCO₃ -buffer (pH 9.6) to produce a suspension with 0.1-
15 0.3 mg mucus protein/ml. 300 µl of this suspension was introduced into each well on a 96-well IgA plate. The plate was incubated at 4°C overnight.

In air-drying, the plates were washed twice with PBS and dried in a laminar flow cabinet overnight. The plates were stored at room temperature in plastic bags. Prior to use, 300 µl PBS was introduced into each well and the mucus was allowed to rehydrate for 10
20 minutes, after which the PBS was removed by gently shaking the plate upside down.

For freezing, the plates were frozen at -20°C with the mucus suspension. Prior to use, the plate was thawed at room temperature and washed three times with PBS.

The fresh plates were washed three times with PBS after overnight coating with mucus.

25 Results

Initial screening of the bacterial conservation methods using the radioactive assay. Three methods using preserved bacteria appeared satisfactory as compared to the assay with fresh bacteria (See Figure 23). These were ethanol, UV irradiation and freezing (the other methods were identified as being not suitable for the assay). Data for UV and DMSO-
30 inactivated bacteria is not shown in Figure 23 as different bacterial suspensions were used. DMSO inactivation dramatically inhibited bacterial adherence whereas UV irradiation of the test bacteria yielded relatively good adherence results.

In addition to absolute adherence, the capability of the method to detect the effect of test agent inhibition of attachment was also characterized. The results for the bacterial conservation methods other than DMSO and UV-irradiation are shown in Figure 23.

Regardless of the method chosen, the assay was able to reveal that Bio-Mos inhibited *E. coli* adherence.

ELISA assays with selected bacterial conservation methods. Based on these results, three bacterial inactivation methods were tested in the ELISA bacterial detection system. While the present invention is not limited to any mechanism of action and an understanding of the mechanism of action is not necessary to practice the invention, it is possible that fixing the bacteria by any of the above-mentioned methods would change antigenic characteristics of the bacteria thus leading to failure of the antibody-based methods to detect the modulated bacteria. However, the ELISA method appeared to work for the tested bacterial preparations. Of the bacterial inactivation methods, the UV-inactivation and freezing were better than ethanol conservation considering absolute bacterial adhesion efficiency, as shown in Figure 24. However, these methods have major drawbacks when considering practicality of use: UV-inactivated bacterial suspension is stable only when unopened, but is easily spoiled by other bacteria when exposed to ambient microbes. The frozen bacteria, on the other hand, are still alive and may start growing or be metabolically active after thawing. This will influence accuracy and reproducibility of the assay. Furthermore, safety issues have to be considered when working with live bacteria.

Optimizing the ethanol concentration in bacterial suspension. Even though it appeared that the bacterial conservation by ethanol was not ideal, it was determined to continue to attempt to develop this approach due to the other benefits the method provided. Initially, ethanol at 50% concentration was utilized based on its ability to kill bacteria. However, other alcohol concentrations were tested to determine the effect of alcohol concentration on bacterial adhesion. It was determined that ethanol concentration affected significantly the efficiency of bacterial adherence. While the present invention is not limited to any mechanism of action and an understanding of the mechanism of action is not necessary to practice the invention, in some embodiments, the present invention provides that ethanol detaches or destroys fimbriae essential for the binding, or changes other antigenic properties of the bacteria. Ethanol at a concentration of 40% appeared significantly better than 50% ethanol when considering the efficiency of adherence. The surprising nonlinear trend shown in Figure 25 was observed repeatedly.

Conservation of the mucus-coated plates. The ability of bacteria to adhere on mucus-coated plates conserved by air-drying and freezing were tested by comparing them with freshly coated plates. In tests with radio-labeled bacteria an air-dried plate was comparable to a freshly coated plate, whereas the frozen plate gave somewhat higher counts. Each method was tested using a non-radioactive ELISA method of the invention.

As shown in Figure 26, air-dried plates gave a weaker signal than the freeze stored and freshly coated plates. However, the effect of Bio-Mos on bacterial adhesion was clear with all methods used. Thus, the present invention provides a method of using previously generated and stored mucus coated plates (e.g., air-dried or freeze-stored plates).

Rehydration time of the dried plates. Time spans from 1 minute to 12 hours were tested to rehydrate the air-dried plates before running the assay. It was determined that rehydration time did not greatly influence the results of the assay, but in order to obtain comparable results, a constant (e.g., 10 minute) rehydration time was utilized for all subsequent assays.

Mucus concentration in the wells. Mucus concentration in the wells had been tested previously, but it was decided to test whether the adherence of the bacteria could be enhanced with a higher mucus concentration. Three levels of mucus in the coating buffer were tested; the levels corresponded to 0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml and 0.3 mg/ml of protein, respectively. The adherence of bacteria clearly improved when the mucus concentration was increased, 0.3 mg protein/ml yielding the highest adherence.

Detecting an alteration in bacterial adherence using a test agent (e.g., Bio-Mos). Based on the preliminary scintillation and ELISA experiments, ethanol-inactivated bacteria and air-dried plates were utilized to test the effect of a test agent (e.g., Bio-Mos) and its ability to alter adherence of bacteria to mucus. Data obtained showed that the resulting curve was highly similar to the curve obtained when conducting ELISA with fresh bacteria and plates.

Applicability to other mucus types. The ELISA (using stored plates and EtOH inactivated bacteria) was tested with other mucus types. The ELISA produced useful data using multiple types of mucus including pig proximal ileum, pig distal colon, broiler duodenum and broiler caecum. The present invention provides that ELISA using stored plates and EtOH inactivated and stored bacteria provides useful data regarding, and the effect of a test agent ability to block bacteria attachment/adhesion (e.g., Bio-Mos) was similar regardless of the source of mucus. Thus, the present invention provides

compositions (e.g., ethanol-inactivated bacteria and air-dried mucus coated plates) and methods (e.g., non-radioactive ELISA) useful for monitoring and characterizing bacterial cell attachment/adhesion to mucus that is easy to use, safe, and the materials are easily stored and transported.

5 Further characterization of the non-radioactive bacterial binding assay. Experiments were conducted during development of the invention in order to determine if the non-radioactive assays provided herein were reliable, reproducible and minimized variability. Variation between different batches of bacteria and plates was tested and the reproducibility of the assay was determined (e.g., by running on different days (between plate-variation)
10 and monitoring in plate-variation of replicate samples).

Methods

Culturing and inactivation of bacteria. The bacteria were grown at 37°C in Luria broth and transferred in a fresh medium (10% inoculum) one day before inactivation with ethanol. Bacteria were inactivated and preserved by adding ethanol directly in the overnight
15 grown culture to the final concentration of 40% vol/vol. The suspension was stored at 4°C and harvested by centrifugation just prior to use. The pellet was suspended in the original volume of Luria broth to obtain a suspension with approximately 10⁸ bacteria/ml.

Preparing and conserving the mucus-coated plates. Mucus scraped from the intestines of piglets was diluted in NaCO₃ buffer (pH 9.6) to produce a suspension with 0.3
20 mg mucus protein/ml. 300 µl of this suspension was introduced into each well on a 96-well IgA plate. The plate was incubated at 4°C overnight. The plates were then washed twice with PBS and dried in laminar flow cabinet overnight and stored at room temperature in plastic bags. Prior to use, 300 µl PBS was introduced into each well and the mucus was allowed to rehydrate for 10 minutes, after which the PBS was removed by gently shaking
25 the plate upside down.

ELISA method. Mucus-coated, air-dried plates were allowed to rehydrate for 10 minutes with PBS before adding 100 µl of bacterial suspension and 100 µl of either Bio-Mos suspension in PBS or 100 µl of pure PBS. The samples of treatments were assigned randomly to the wells to avoid systematic errors. The plate was incubated for 1 h at room
30 temperature, protected from light and evaporation. After the incubation, the plate was washed three times with PBS and the blocking buffer (10% fetal bovine serum) was added. The plate was incubated as described above and emptied. Primary antibody was added, the plate incubated, and washed as described above. Secondary antibody was added and the

plate was incubated and washed as described above. Finally, TMB-substrate was added to the wells and the color was allowed to develop for 15-30 minutes. The reaction was stopped with sulfuric acid and absorbance measured at 450 nm.

Statistical analyses. Coefficients of variation were estimated for values that were scaled so that the average of zero samples for each plate was 100%. Within plate and between plate estimates for coefficients of variation were then calculated for these scaled values of levels 1 and 2 using the MSEs of one-way ANOVA for between and within treatment as variance estimates. This estimation was performed separately for different levels of Bio-Mos. Power analysis was done to provide an estimate on how many replicates would be needed to detect a difference between two treatments. Risk level $\alpha=0.05$ and power = 0.8 or 0.9 were used.

Results

Variation measured from the replicate samples analyzed in the same plate. For the product evaluation purposes it is important that when run in several replicates in the same plate, the assay is repeatable, and thus provides a reliable test, the detection limit of which is known and considered sufficient for the practical use of the assay. For this purpose, the assay was run in the plate coated with homogenous mucus, and with a single batch of the bacterial preparation. Figure 28 shows that there is some well-to-well variation, but the adherence inhibiting effect of the added Bio-Mos was clear and repeated. Comparison with the control wells showed that the levels 1 mg/ml and 2 mg/ml of Bio-Mos differed from the control with the p-value <0.0001 . However, the two Bio-Mos levels did not differ from each other as shown in Figure 28. Coefficients of variation were calculated separately for each treatment.

Variation measured from four different mucus plates

For the product evaluation purposes it is important that the assay is repeatable. In order to determine if the assay was repeatable (e.g., at different times using the same reagents), the experiment in which the data is shown in Figure 28 was repeated 4 times on four different days. Each set of tests was carried out on a different day and mucus plate, but with a single bacterial preparation. The results are illustrated in the four panels of the Figure 29. The average variation within different plates were 14%, 14% and 13% for the plates 1, 2 and 3, respectively, and as high as 22% for the plate 4. Table 1, below, shows the CVs calculated for each test within each plate. There appeared to be a trend that the CV was

lower for the control wells than for those with Bio-Mos. The average CV calculated from all four test plates and all treatments was 16% (Table 1).

Table 1.

Test	CV measured from the indicated test replicates				
	Plate 1	Plate 2	Plate 3	Plate 4	Mean
No Bio-Mos	1%	8%	8%	23%	1%
Bio-Mos 1 mg/ml	13%	12%	15%	24%	16%
Bio-Mos 2 mg/ml	19%	23%	14%	21%	19%
All	14%	14%	13%	22%	16%

5

Difference in the absolute signal measured from four different mucus plates. Figure 30 shows the data in the Figure 29, but arranged in a different way to emphasize the magnitude of the absolute signal in different tests. The plates were handled similarly but independently. The samples were assigned randomly to the wells to avoid systematic errors due to factors such as well position. It is noteworthy that the absolute levels of signals vary from day-to-day even though the attempt has been to repeat every step of the assay exactly in the same way. While the present invention is not limited to any mechanism of action and an understanding of the mechanism of action is not necessary to practice the invention, in some embodiments, the variation is due to one or more steps including: 1. Mucus binding 2. Washing of the wells 3. Bacterial binding 4. Washing off the free bacteria 5. Binding of the primary antibody 6. Washing 7. Binding of the secondary antibody 8. Color development reaction. However, the present invention provides that although there is some variation in color development, the variation is limited and does not inhibit the generation of useful data (e.g., regarding the ability of one or more test agents to alter (e.g., inhibit) bacterial binding to mucus).

10

15

20

Comparison of plate-to-plate variation when using relative signals. If and when the relevant control treatments were present in the same plate as the products to be tested, the plate-to-plate signal variation is not be problematic. All the signals were changed to relative values by giving the mean of all control wells the value of 1, and the wells with test compounds values normalized to that. The normalized results are shown in Figure 31. When presented as relative signals it was observed that the detected magnitude of the Bio-Mos effect was nearly identical in all plates.

25

Variation between batches of bacteria. In order to test variation between batches of bacteria and plates, multiple, independently grown bacterial cultures were generated, and multiple, independently made, mucus-coated plates were also generated. The batches were produced completely independently, using different batches of PBS, Luria broth and growing each culture from a new frozen storage bead. A similar ELISA assay was performed with each of the independent plates and cultures. The results of this experiment are shown in Figure 32.

As shown in Figure 32, the absolute levels of the signals varied from experiment to experiment, but when compared to the signal of the control tests, the totally independent studies produced data characterizing nearly the identical effect of Bio-Mos on attachment (See Figure 32)

Power analysis. Using the experimental data, it was possible to estimate the numbers of replicates required to achieve a desired detection power. By detection power it is meant the percent difference between the responses of two test compounds or treatments that provides a statistically significantly difference from each other. Figure 33 and Table 2 below show the relationship between the detection power and the number of replicates.

The present invention provide that if batches of test agents are being compared, as few as 5 (or less) replicates are enough to be able to state that two agents (or dilutions thereof) are different when the product A is, for example, inhibiting adherence by 50%, whereas the product B is inhibiting it by 66%, then 5 replicates would be enough.

Table 2. Examples of detection power

Number of replicates	Difference detected
5	31%
10	22%
15	18%

Based on 80% power at 5% risk level

Example 19
Generation of stable functional bacterial preparations and mucus coated plates

Experiments were conducted during development of embodiments of the invention in an effort to prepare a bacterial suspension that possessed the following characteristics: fimbriae present and/or retained on prepared bacteria capable of mediating bacterial adherence on mucus, wherein the fimbriae are numerous and structurally intact permitting bacteria to bind to and/or adhere to mucus at high affinity; bacterial surface antigens that retain their immunological characteristics thereby permitting efficient binding of primary antibodies used in ELISA and the killing and/or inactivation of the bacteria in such a way so as to not alter antibody binding; and/or bacteria preparation carried out in such a way so as to generate a formulation that has a long shelf life and allows simple and instant use in ELISA.

Modifications of the non-radioactive bacterial binding assay including the bacterial inoculum preparations of Example 18 were performed. Experiments were conducted using a less aggressive and more gentle (e.g., so as to preserve fimbriae and/or bacterial surface antigens (e.g., for antibody binding)) dual-kill procedure. As described below, a freeze dry procedure facilitated long term storage of the inoculum. For example, in some embodiments, the freeze dry procedure permitted the generation of single-use ampoules containing exactly the correct number of bacteria (e.g., for use with a mucus coated plate in an assay (e.g., for use in a kit)). These novel methods and compositions significantly reduced potential error on a technician's part (e.g., in having to determine the correct inoculum size), reduces risk of contamination of the inoculum and minimizes deterioration of the bacterial preparation over time. The freeze dried ampoules were stable at room temperature and are transportable (e.g., globally) without risk of loss of functionality.

Bacterial preparation method. Bacteria (e.g., *E. coli* F4+ (former K88) strain) were grown at 37°C in Luria Bertani broth. The cultures were harvested by centrifugation, re-suspended in saline solution and instantly enumerated by microscopic counting. Bacterial suspensions were killed by heating at 65 °C for 45 minutes followed by UV radiation for 45 minutes. Bacterial batches were then divided into ampoules, each containing 1×10^9 bacterial cells and frozen at -80 °C. After 24 hours of freezing the ampoules were freeze-dried and sealed. The ampoules were stored at +4 °C. Viable *E. coli* in the ampoules was determined by two different approaches, direct plating and using Most Probable Number (MPN). Ten-fold serial dilutions were prepared in five replicates from each of the bacterial batches for direct plating. The medium used was a rich unselective Luria Berthani. Colonies were counted after 2 days incubation at 37 °C. MPN was performed by serial dilution of the

content of the ampoule directly in rich unselective nutrient broth. MPN was done in three replicates (3-tube MPN). Growth in the MPN tubes was first recorded after 2 days at 37 °C, and, then again after 2 weeks. In the MPN method the whole contents of the bacterial ampoule ($\sim 10^9$ cells) were suspended in the first, least diluted tube. Thus, MPN provides
5 that a single viable bacterium should be detected. In plate count, the contents of the ampoule were suspended in 10ml of diluent, of which 0.1 ml was spread on plates. Thus, no growth represents that the ampoule contained less 100 viable *E. coli* cells. Five different batches of bacterial preparation (ampoules) were tested for viability. The results from both testing methods, direct plating and MPN enumeration, showed no signs of viability. Thus, the
10 present invention provides a new dual-kill method that provides a highly reproducible and consistent bacterial preparation (e.g., as determined in the mucus adherence assay (See, e.g., Figure 34)).

Production and Stabilization of mucus coated plates. Experiments were conducted during development of the invention in order to prepare a mucus coated plate that possessed
15 the following characteristics: mucus coating of even quality between wells of each plate and between different plates; mucus plates that are stabilized in such a way that does not destroy the bacteria and/or binding characteristics of the mucus coated on the plates (e.g., that preserves mucus surface properties involved in binding bacteria); and/or mucus coated plates that are stable (e.g., at room temperature or colder) for long periods of time (e.g.,
20 days, weeks, months, a year or more) that can are ready to be used (e.g., in an ELISA).

Mucus coated microtitre plates. Mucus was harvested from freshly slaughtered pigs by scraping the mucosa from the distal small intestine (ileum). Mucus was washed and clarified by centrifugation as described in Example 18. Mucus protein was quantified by using Bicinchoninic Acid Protein Assay kit from SIGMA (B9643). Nunc MaxiSorb plates
25 (96-well format) were coated with mucus buffer solution containing 0.1 mg mucus protein/ml coating buffer. Batches of microtitre plates were independently prepared on different days and stored at +4 °C until testing day. The bacterial adherence assay, with and without Bio-Mos, was run in these plates to test plate-to-plate variation. Inhibition average between plates was 81.9%, from which the individual batches deviated in the average 1.5%
30 (See, e.g., Figure 35).

Additional experiments were performed during development of the invention to investigate the stability of the mucus plates when stored under mucus-buffer solution for 1 and 2 weeks in a vacuum seal package at 4°C. After two weeks of storage, the mucus plates

were tested in order to determine if they could be used in an adherence assay with bacterial preparation. The results are shown in Figure 36. The absolute signals in the assay show slight deterioration of intensity. However, in previous studies, variations were observed in intensity with respect to plate-to-plate variation and may have nothing to do with the storage of the plates. The application of the anti-adherence product, Bio-Mos, demonstrated that an approximate 80% inhibition was observed. Thus, the present invention provides methods of generating mucus coated plates, and the mucus coated plates themselves, that can be stored and utilized at a later time point (e.g., for adherence assays). For example, in some embodiments the present invention provides a mucus coated plate and/or a bacterial preparation (e.g., stored in an ampoule) that can either be stored individually or together (e.g., in a vacuum sealed package (See, e.g., Figure 37)), that may be made commercially available for purchase and/or use (e.g., in an adherence assay).

All publications and patents mentioned in the above specification are herein incorporated by reference. Various modifications and variations of the described compositions and methods of the invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention that are obvious to those skilled in the relevant fields are intended to be within the scope of the present invention.

CLAIMS

We Claim:

- 5 1. A kit comprising a non-radioactive enzyme-linked immunosorbent assay (*ELISA*) for the assay of bacterial adherence and anti-adherence with mucus and/or epithelial cells comprising a solid support having mucus and/or epithelial cells coated thereon, a sample comprising bacteria, a primary antibody specific for said bacteria, and a detectably labeled secondary antibody specific for said primary antibody bound to said bacteria.
- 10 2. The kit of claim 1, further comprising a substrate which allows the visualization of the detectably labeled secondary antibody.
- 15 3. The kit of claim 2, wherein said detectably labeled secondary antibody comprises an enzyme label.
4. The kit of claim 3, wherein said substrate is a composition for providing a colorimetric, fluorimetric or chemiluminescent signal in the presence of said enzyme label.
- 20 5. The kit of claim 1, wherein said detectably labeled secondary antibody comprises pig anti-IgG immunoglobulins coupled to peroxidase.
- 25 6. The kit of claim 4, wherein said colorimetric composition is 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine.
7. The kit of claim 1, wherein said solid support is a 96-well plate.
8. The kit of claim 1, wherein said bacteria is *E. coli* bacteria.
- 30 9. The kit of claim 1, wherein said mucus is selected from the group consisting of pig proximal ileum mucus, pig distal colon mucus, broiler duodenum mucus and broiler caecum mucus.

10. The kit of claim 1, wherein said primary antibody is an horseradish peroxidase (HRP)-conjugated polyclonal antibody specific to *E. coli* O and K antigenic serotypes.
11. The kit of claim 1, wherein said primary antibody is a polyclonal antibody specific to *E. coli* O and K antigenic serotypes.
12. The kit of claim 1, wherein said secondary antibody is an affinity purified Rabbit anti-Goat IgG-HRP.
13. The kit of claim 1, wherein said secondary antibody is an affinity purified Rabbit anti-Goat IgG-AP.
14. The kit of claim 1, wherein said secondary antibody is a polyclonal FITC-conjugated antibody to Goat IgG.
15. The kit of claim 1, wherein secondary antibody is Streptavidin-Alkaline Phosphatase from *Streptomyces avidinii*.
16. The kit of claim 1, wherein secondary antibody is Streptavidin-Peroxidase from *Streptomyces avidinii*.
17. A method for measuring adherence and anti-adherence between bacteria and mucus and/or epithelial cells comprising
- a) providing
 - i) a sample comprising bacteria; and
 - ii) mucus and/or epithelial, or other cells; and
 - b) combining said sample comprising bacteria and said mucus and/or epithelial cells within a non-radioactive colorimetric assay under conditions such that adherence and anti-adherence between said bacteria and said mucus and/or epithelial cells is measured.
18. The method of claim 17, wherein said non-radioactive colorimetric assay is an ELISA assay.

19. The method of claim 17, wherein said conditions comprise adding primary antibodies specific for said bacteria bound with mucus and/or epithelial cells.
20. The method of claim 19, wherein said conditions comprise adding detectably labeled secondary antibodies specific for said primary antibodies bound with said bacteria.
21. The method of claim 20, wherein said conditions comprise adding a substrate which allows the visualization of said detectably labeled secondary antibodies bound with said primary antibodies.
22. The method of claim 17, wherein said mucus and/or epithelial are coated onto a microtitre plate.
23. The method of claim 20, wherein said detectably labeled secondary antibody comprises an enzyme label.
24. The method of claim 21, wherein said substrate is a composition for providing a colorimetric, fluorimetric or chemiluminescent signal in the presence of said enzyme label.
25. The method of claim 24, wherein said detectably labeled secondary antibody comprises pig anti-IgG immunoglobulins coupled to peroxidase.
26. The method of claim 24, wherein said colorimetric composition is 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine.
27. The method of claim 17, wherein said bacteria is *E. coli* bacteria.
28. The method of claim 17, wherein said mucus is selected from the group consisting of pig proximal ileum mucus, pig distal colon mucus, broiler duodenum mucus and broiler caecum mucus.
29. The method of claim 19, wherein said primary antibody is an HRP-conjugated polyclonal antibody specific to *E. coli* O and K antigenic serotypes.

30. The method of claim 19, wherein said primary antibody is a polyclonal antibody specific to *E. coli* O and K antigenic serotypes.
- 5 31. The method of claim 20, wherein said secondary antibody is an affinity purified Rabbit anti-Goat IgG-HRP.
32. The method of claim 20, wherein said secondary antibody is an affinity purified Rabbit anti-Goat IgG-AP.
- 10 33. The method of claim 20, wherein said secondary antibody is a polyclonal FITC-conjugated antibody to Goat IgG.
34. The method of claim 20, wherein secondary antibody is Streptavidin-Alkaline
15 Phosphatase from *Streptomyces avidinii*.
35. The method of claim 20, wherein secondary antibody is Streptavidin-Peroxidase from *Streptomyces avidinii*.
- 20 36. A method for identifying an agent that modulates adherence between bacteria and mucus and/or epithelial cells, comprising
- a) providing
 - i) a sample comprising bacteria;
 - ii) mucus and/or epithelial cells; and
 - 25 iii) an agent; and
 - b) combining said sample comprising bacteria, said mucus and/or epithelial cells, and said agent within a non-radioactive colorimetric assay under conditions such that adherence between said bacteria and said mucus and/or epithelial cells is measured;
 - c) comparing said bacterial adherence in the presence and absence of said
30 agent; and
 - d) identifying said agent as a modulator of adherence between said bacteria and said mucus and/or epithelial cells if said measured adherence is higher or lower than

adherence between said bacteria and said mucus and/or epithelial cells in the absence of said agent.

37. The method of claim 36, wherein said non-radioactive colorimetric assay is an
5 ELISA assay.

38. The method of claim 36, wherein said conditions comprise adding primary
antibodies specific for said bacteria bound with said mucus and/or epithelial cells.

10 39. The method of claim 38, wherein said conditions comprise adding detectably labeled
secondary antibodies specific for said primary antibodies bound with said bacteria.

40. The method of claim 39, wherein said conditions comprise adding a substrate which
allows the visualization of said detectably labeled secondary antibodies bound with said
15 primary antibodies.

41. The method of claim 36, wherein said mucus is coated onto a microtitre plate.

42. The method of claim 39, wherein said detectably labeled secondary antibody
20 comprises an enzyme label.

43. The method of claim 40, wherein said substrate is a composition for providing a
colorimetric, fluorimetric or chemiluminescent signal in the presence of said enzyme label.

25 44. The method of claim 43, wherein said detectably labeled secondary antibody
comprises pig anti-IgG immunoglobulins coupled to peroxidase.

45. The method of claim 43, wherein said colorimetric composition is 3, 3', 5, 5'-
tetramethylbenzidine.
30

46. The method of claim 36, wherein said bacteria is *E. coli* bacteria.

47. The method of claim 36, wherein said mucus and/or epithelial cells are selected from the group consisting of pig proximal ileum mucus, pig distal colon mucus, broiler chicken duodenum mucus and broiler chicken caecum mucus.
- 5 48. The method of claim 38, wherein said primary antibody is an HRP-conjugated polyclonal antibody specific to *E. coli* O and K antigenic serotypes.
49. The method of claim 38, wherein said primary antibody is a polyclonal antibody specific to *E. coli* O and K antigenic serotypes.
- 10 50. The method of claim 39, wherein said secondary antibody is an affinity purified Rabbit anti-Goat IgG-HRP.
51. The method of claim 39, wherein said secondary antibody is an affinity purified
- 15 Rabbit anti-Goat IgG-AP.
52. The method of claim 39, wherein said secondary antibody is a polyclonal FITC-conjugated antibody to Goat IgG.
- 20 53. The method of claim 39, wherein secondary antibody is Streptavidin-Alkaline Phosphatase from *Streptomyces avidinii*.
54. The method of claim 39, wherein secondary antibody is Streptavidin-Peroxidase from *Streptomyces avidinii*.
- 25 55. The method of claim 36, wherein said agent is selected from a list consisting of a naturally occurring molecule, a synthetically derived molecule, and a recombinantly-derived molecule.
- 30 56. A composition comprising an agent, wherein said agent is a modulator of bacterial adherence with mucus and/or epithelial cells, wherein said agent is identified through a process comprising:
- a) providing

- i) a sample comprising bacteria;
- ii) mucus and/or epithelial cells; and
- iii) an agent; and
- b) combining said sample comprising bacteria, said mucus and/or epithelial
5 cells, and said agent within a non-radioactive colorimetric assay under conditions such that
adherence between said bacteria and said mucus and/or epithelial cells is measured;
- c) comparing said bacterial adherence in the presence and absence of said
agent; and
- d) identifying said agent as a modulator of adherence between said bacteria and
10 said mucus and/or epithelial cells if said measured adherence is higher or lower than
adherence between said bacteria and said mucus and/or epithelial cells in the absence of
said agent.

57. The composition of claim 56, wherein said composition is within a foodstuff
15 configured for consumption by a subject selected from the group consisting of livestock,
animals, fish, and shellfish.

FIGURE 1

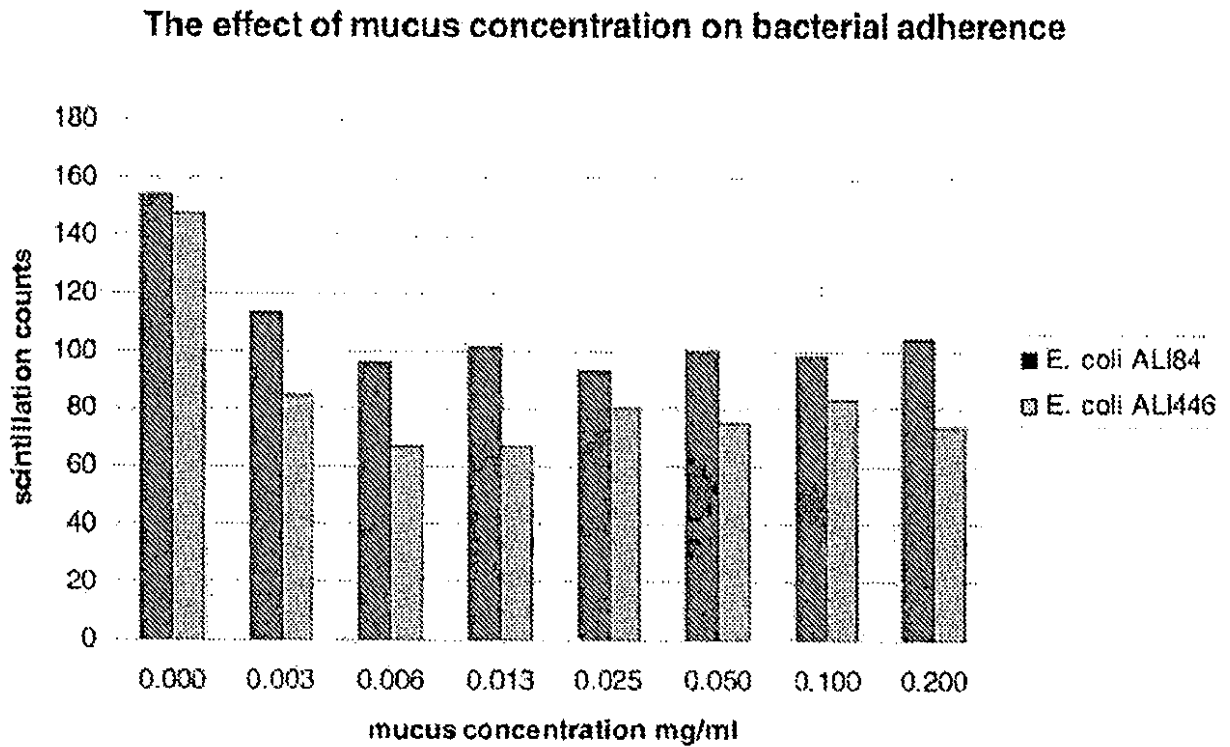


FIGURE 2

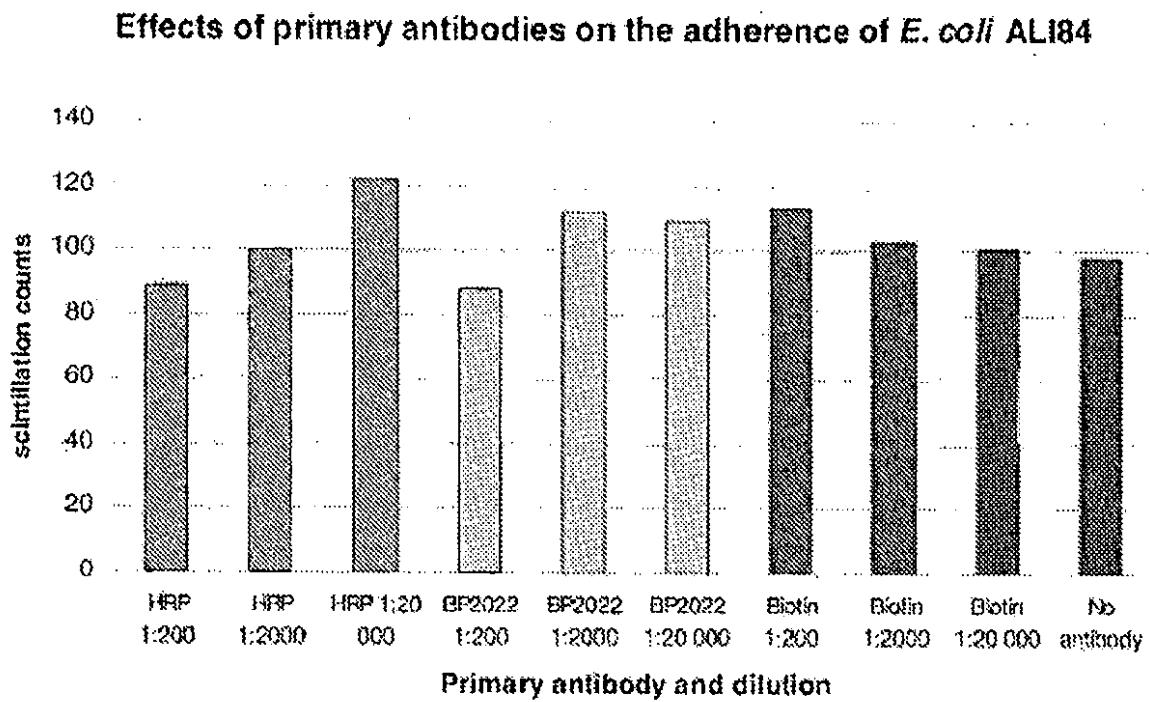


FIGURE 3

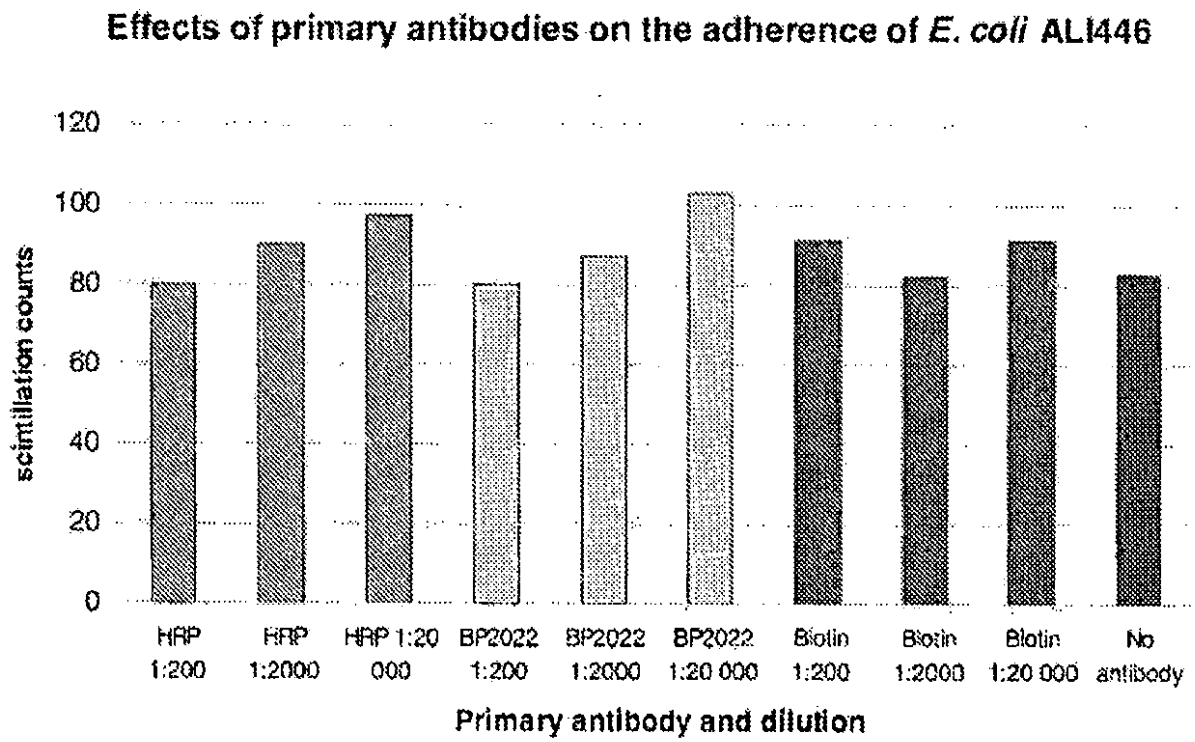


FIGURE 4

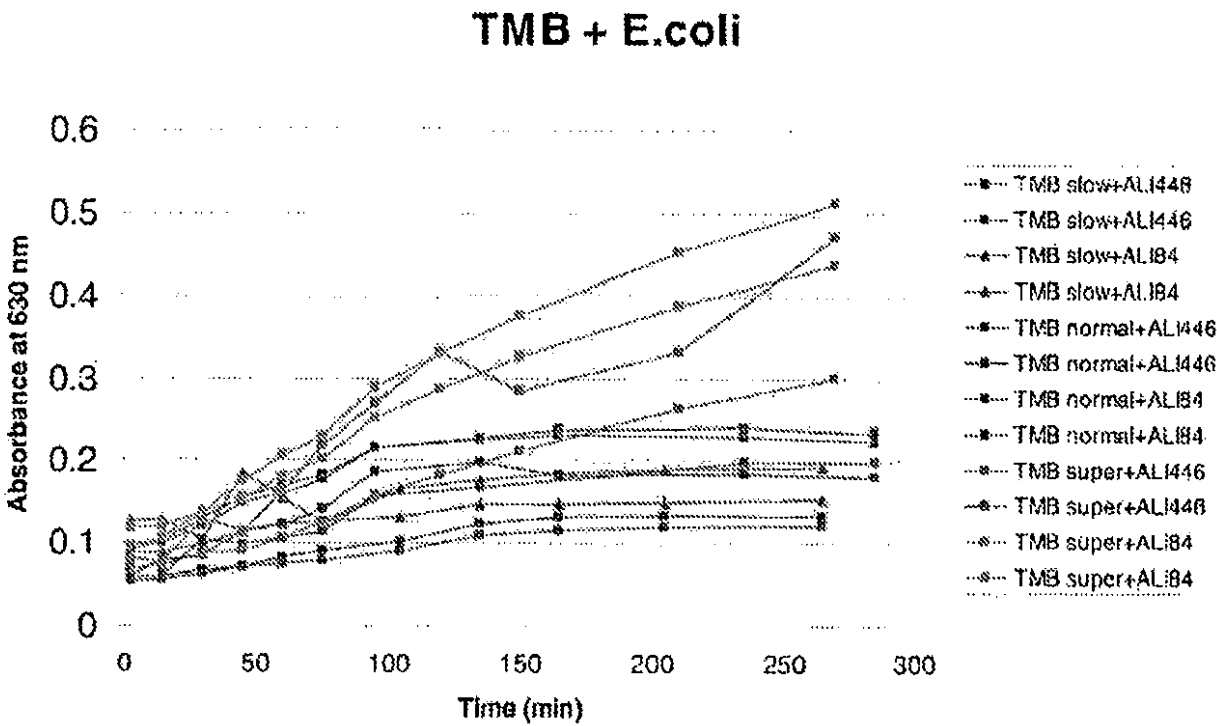


FIGURE 5

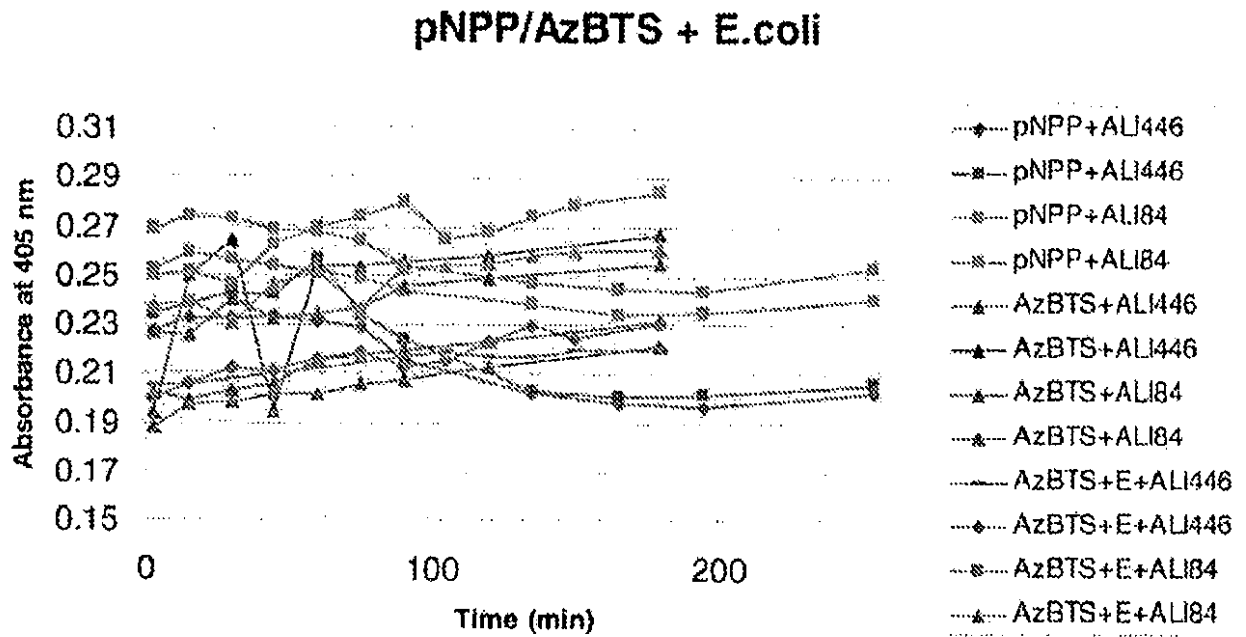


FIGURE 6

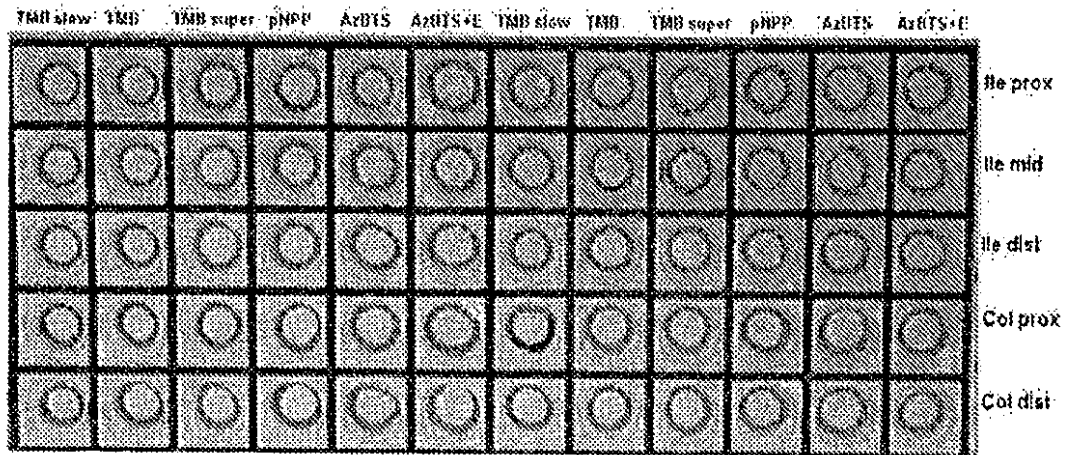


FIGURE 7

Primary antibody (right)	BP2022HRP			BP2022			Biotin			No 1 st antibody			
Secondary antibody (down)	1:2000	1:10000	1:100000	1:2000	1:10000	1:100000	1:2000	1:10000	1:100000				
HRP1:1000/ StrHRP1:100	HRP-conj. 1 st ab, no 2 nd ab			BP2022, HRP-conj. 2 nd ab			Biotin-conj. 1 st ab, StrHRP 2 nd ab			No 1 st ab, HRP-conj. 2 nd ab		No 1 st ab, StrHRP 2 nd ab	
HRP1:100000/ StrHRP1:1000													
HRP1:100000/ StrHRP1:10000													
AP 1:1000/ StrAP1:100	No ab, only BSA+ substrate (TMB)			BP2022, AP-conj. 2 nd ab			Biotin-conj. 1 st ab, StrAP 2 nd ab			No 1 st ab, AP-conj. 2 nd ab		No 1 st ab, StrAP 2 nd ab	
AP 1:100000/ StrAP1:1000	No ab, only BSA+ substrate (pNPP)												
AP 1:100000/ StrAP1:10000	Empty												

FIGURE 8

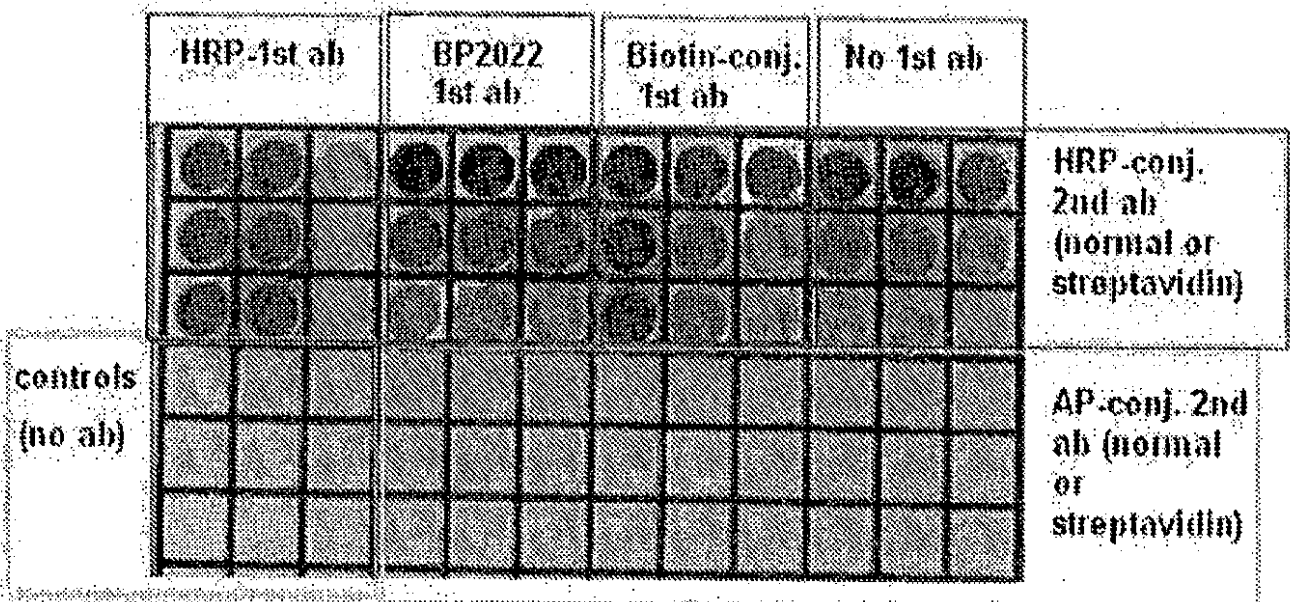
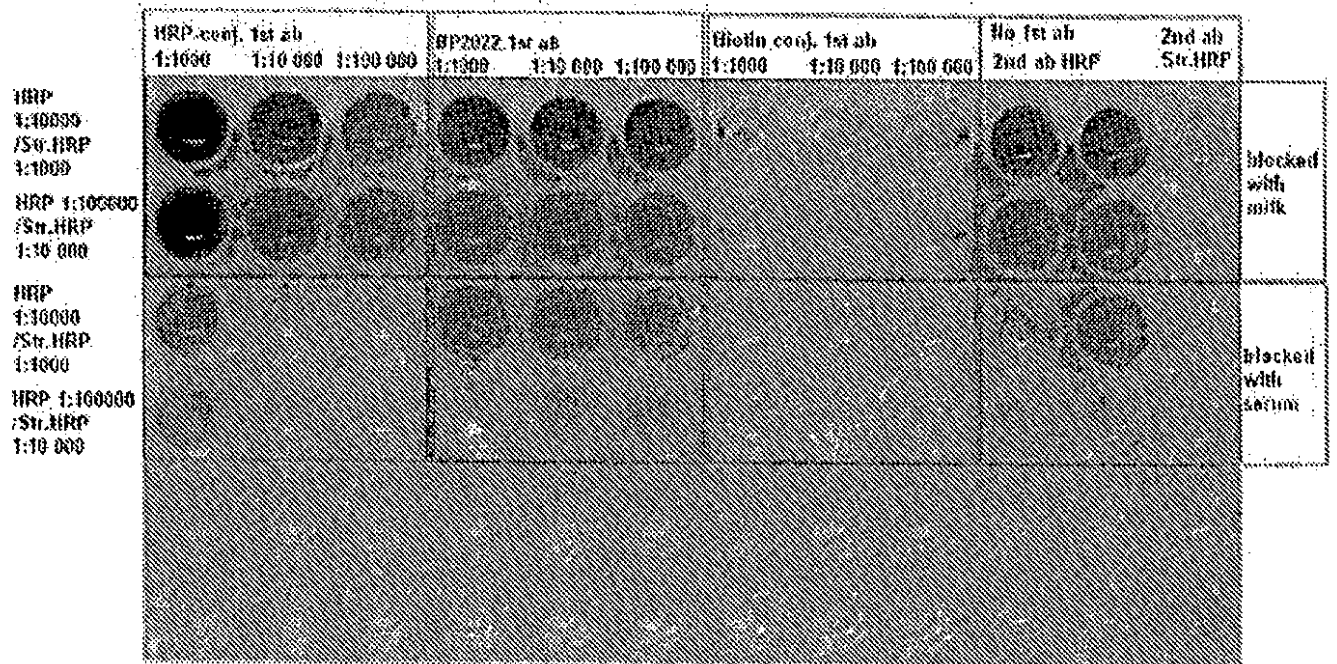


FIGURE 9

	HRP			BP2022			Biotin			No 1 st antibody	
	100000	10000	1000	100000	10000	1000	100000	10000	1000		
HRP1:10000 /StrHRP1:1000	Only HRP- conj. 1 st ab in milk			1 st + 2 nd ab in milk			1 st + 2 nd ab in milk			No 1 st ab, 2 nd ab HRP in milk	No 1 st ab, 2 nd ab Str-HRP in milk
HRP1:100000 /StrHRP1:10000											
HRP1:10000 /StrHRP1:1000	Only HRP- conj. 1 st ab in 10% fetal bovine serum			1 st + 2 nd ab in 10% fetal bovine serum			1 st + 2 nd ab in 10% fetal bovine serum			No 1 st ab, 2 nd ab HRP in 10% fetal bovine serum	No 1 st ab, 2 nd ab Str-HRP in 10% fetal bovine serum.
HRP1:100000 /StrHRP1:10000											
Empty										Only milk and substrate	
										Only serum and substrate	

FIGURE 10



Bacteria	AL184				AL1446			
/well	1:1000	1:10000	1:100 000	1:1000	1:10000	1:100 000		
10 ¹								
10 ²								
10 ³								
10 ⁴								
10 ⁵								
0								

FIGURE 12

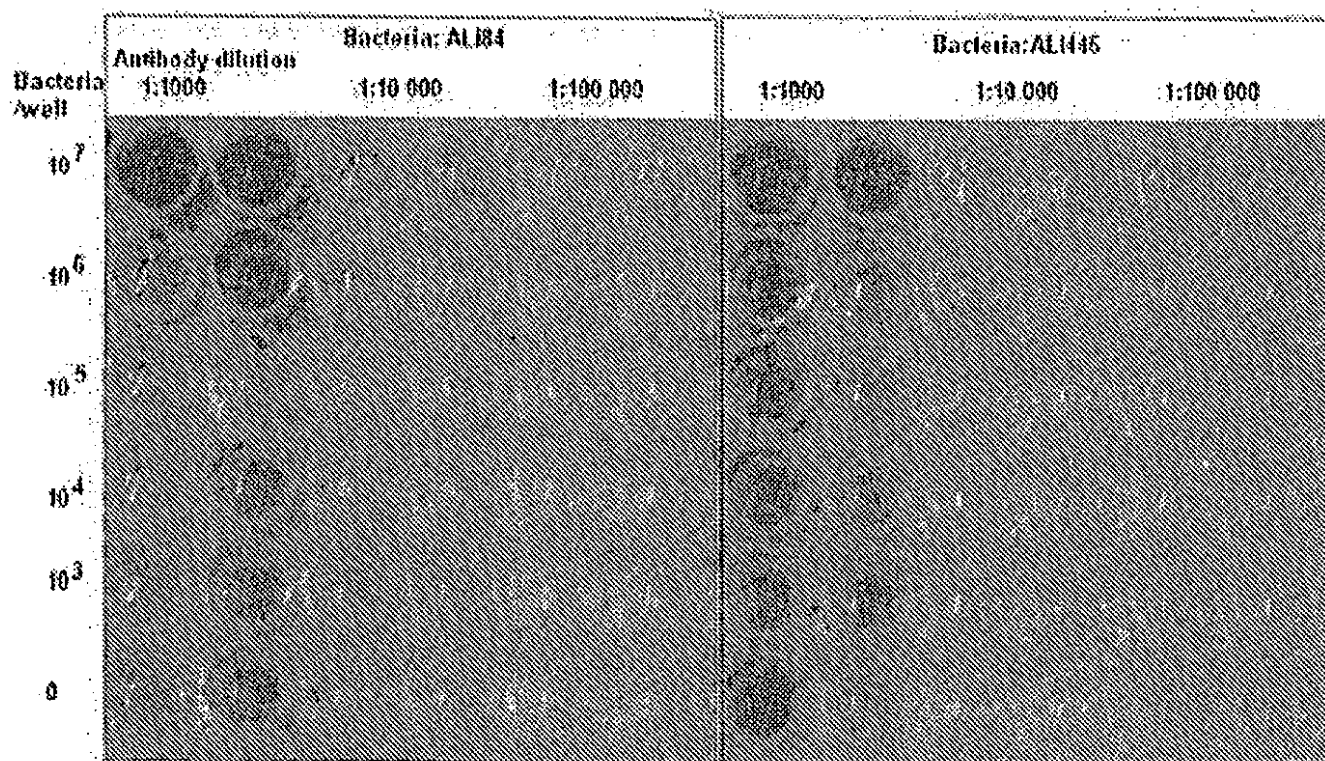


FIGURE 13

Bacteria /well	2 nd ab dilution	<i>E. coli</i> strain AL184			<i>E. coli</i> strain AL1446			
		1 st antibody dilution						
		1:1000	1:10000	1:100000	1:1000	1:10000	1:100000	
10 ⁷	1:1000							
	1:10000							
10 ⁶	1:1000							
	1:10000							
10 ⁵	1:1000							
	1:10000							
10 ⁴	1:1000							
10 ³	1:10000							
10 ²	1:1000	AL184, no 1 st ab		AL1446, no 1 st ab		No bacteria, no 1 st ab		
10 ¹	1:10000	AL184, no 1 st ab		AL1446, no 1 st ab		No bacteria, no 1 st ab		

FIGURE 14

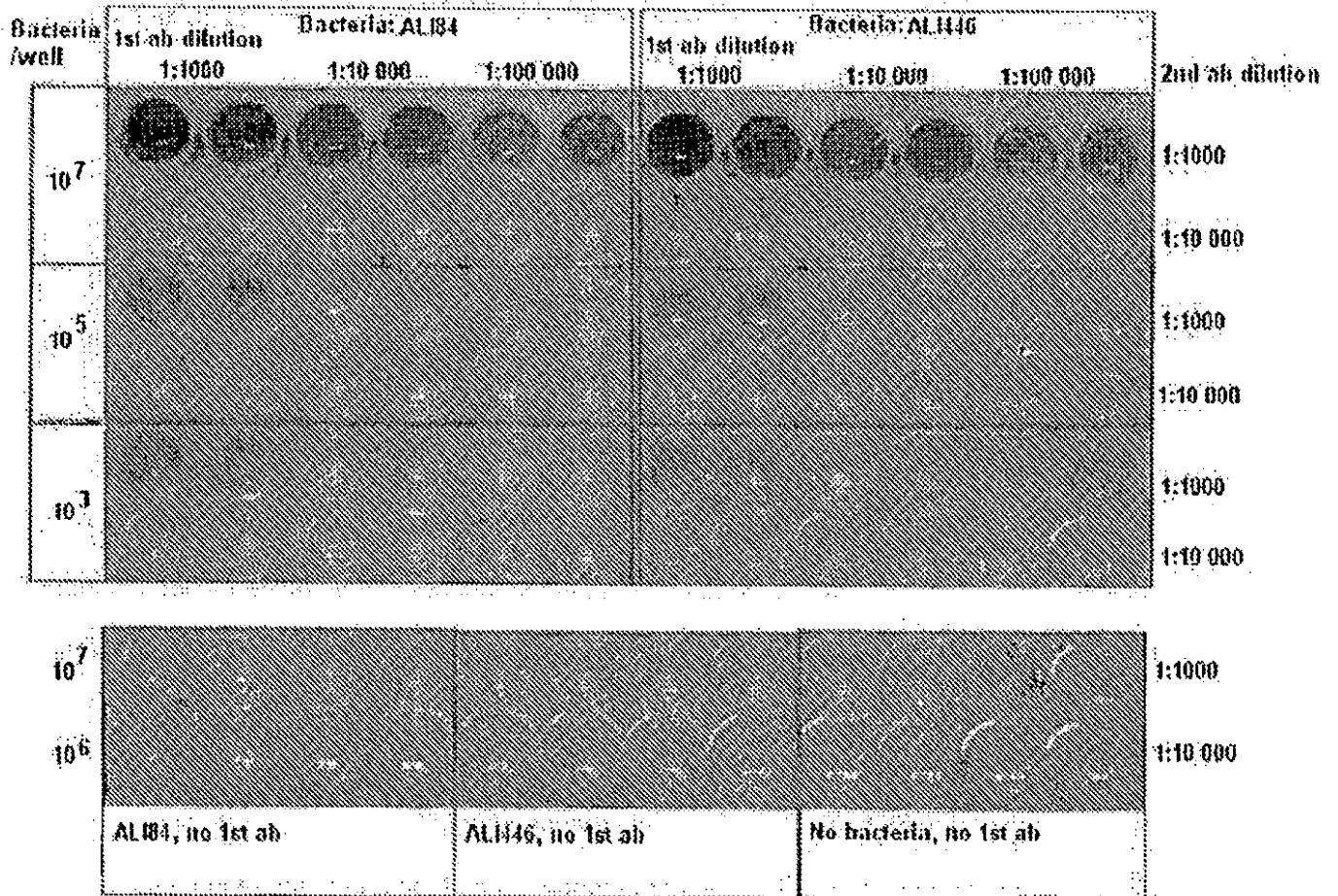


FIGURE 15

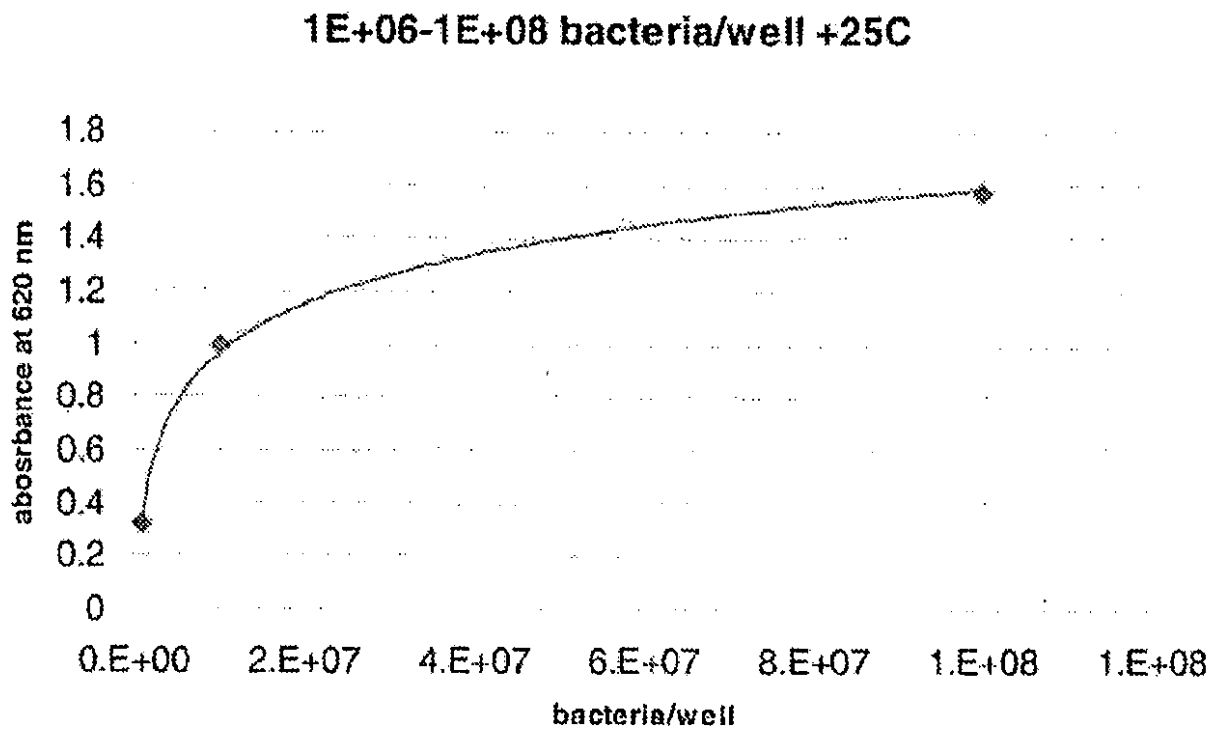


FIGURE 16

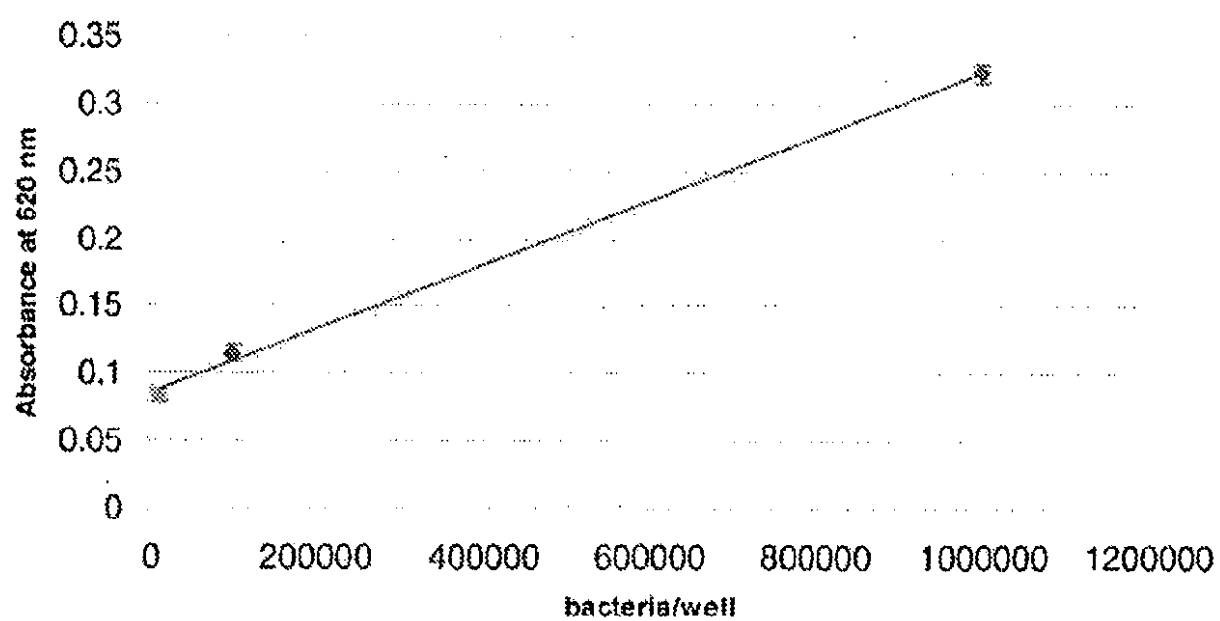
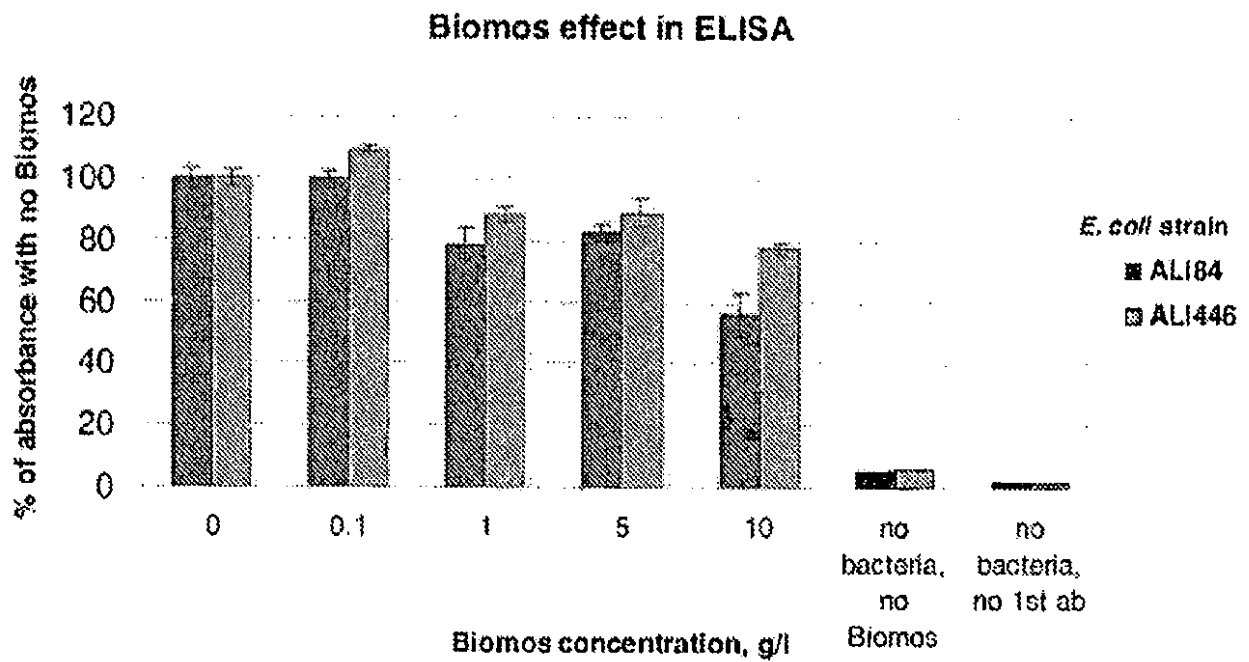


FIGURE 17

A



B

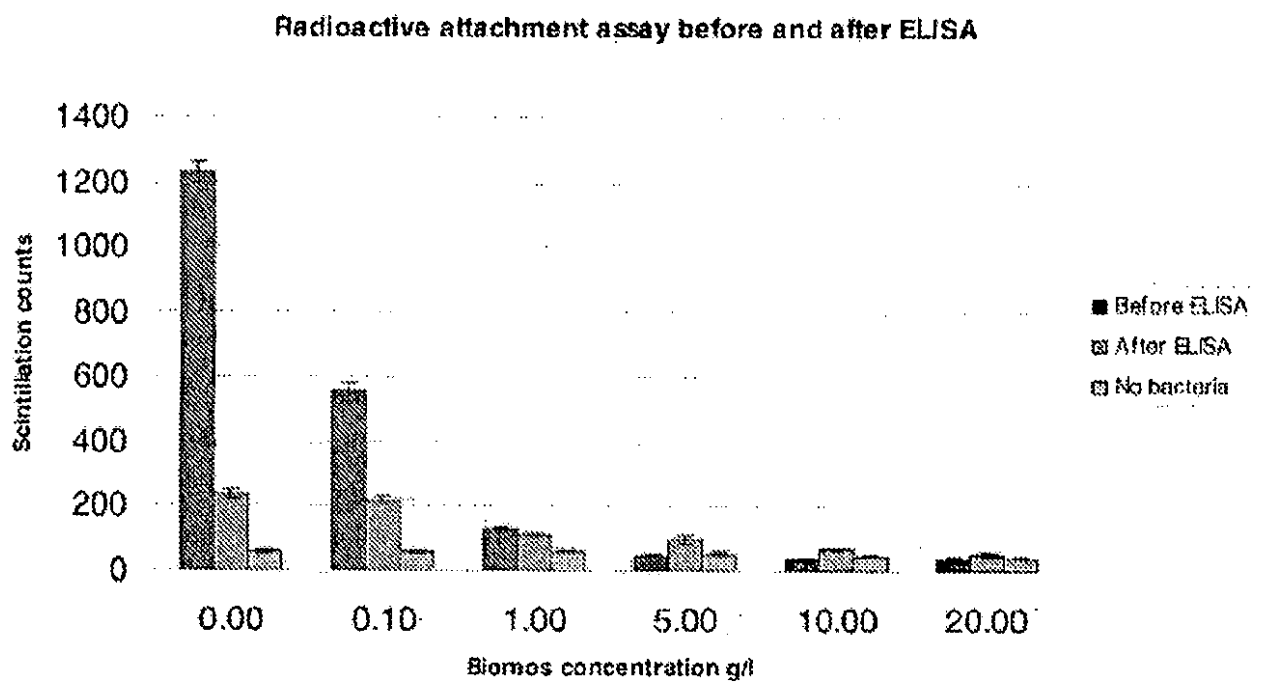


FIGURE 18

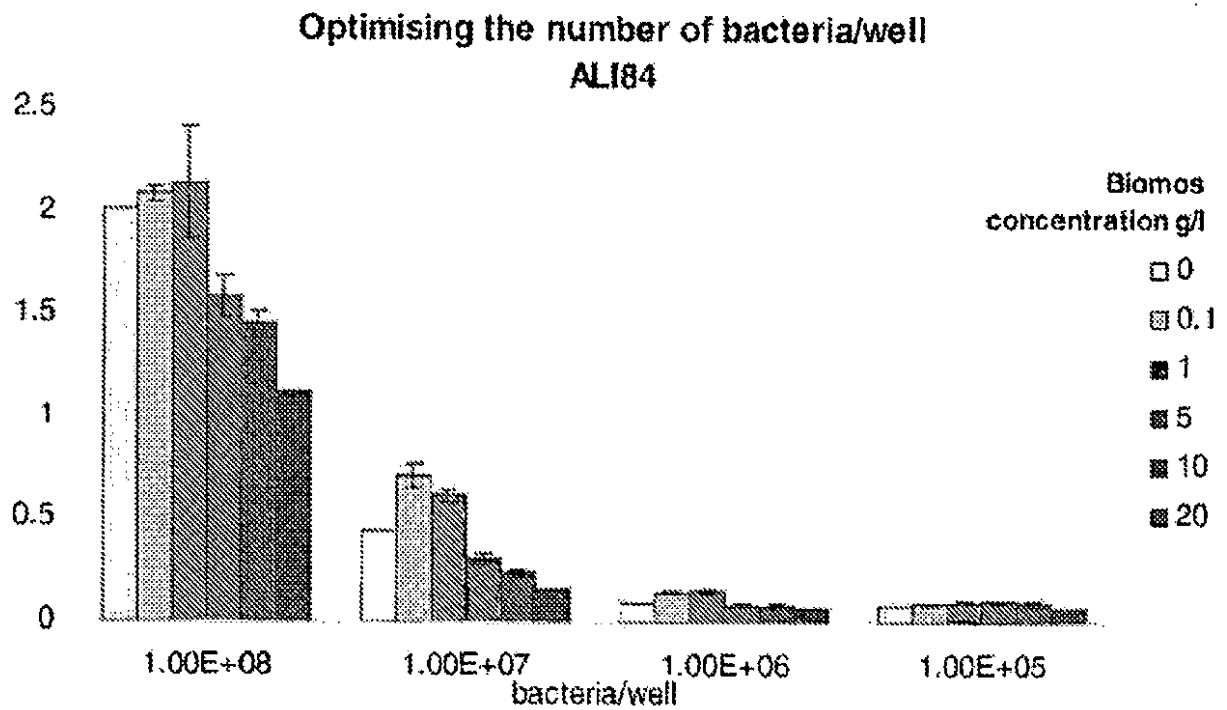


FIGURE 19

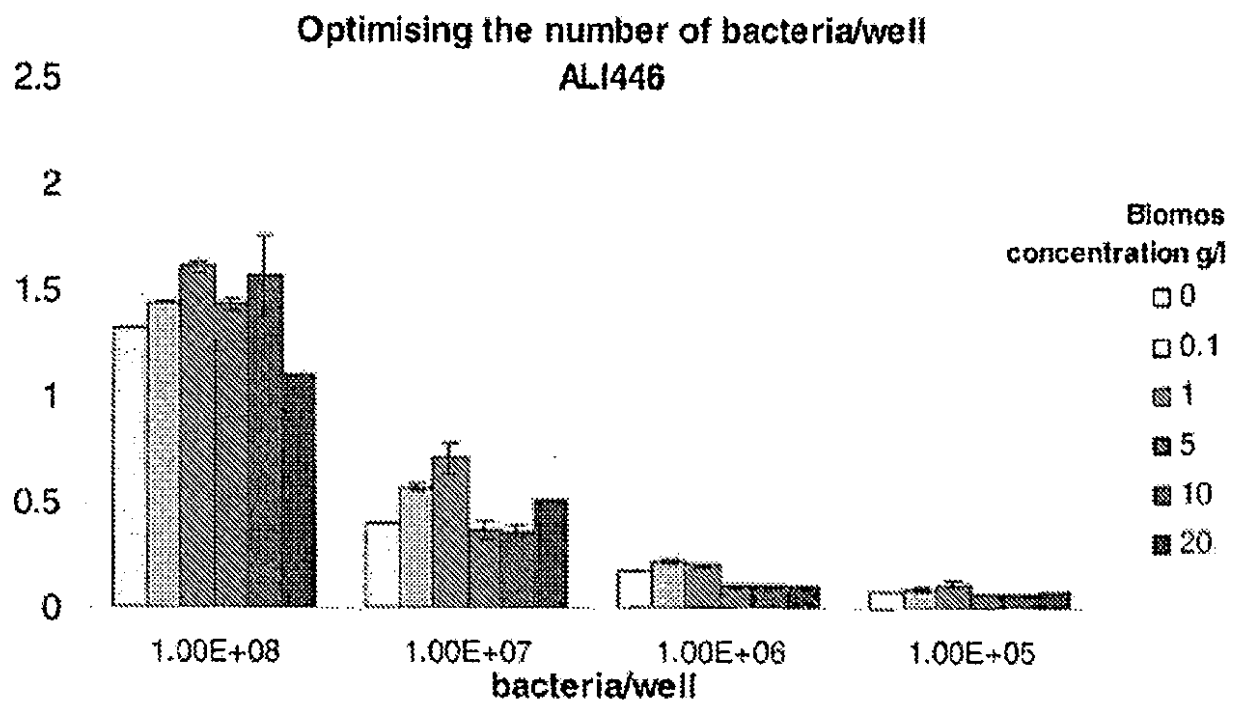


FIGURE 20

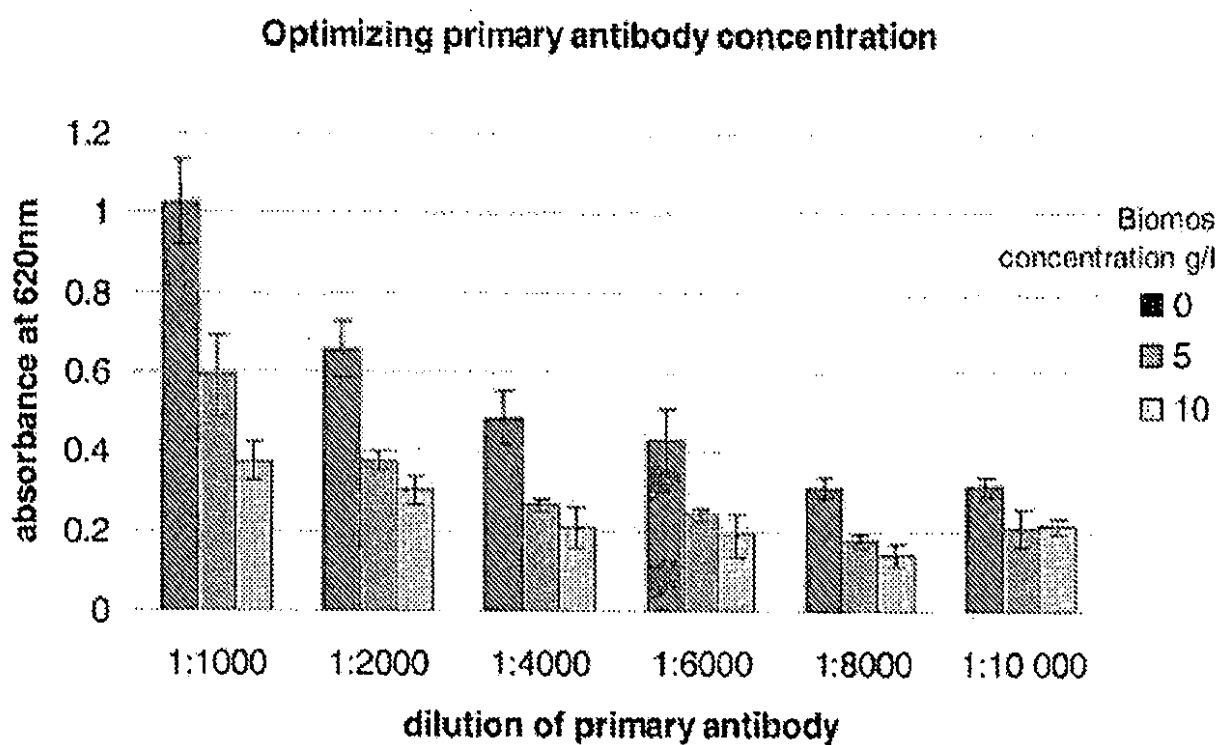


FIGURE 21

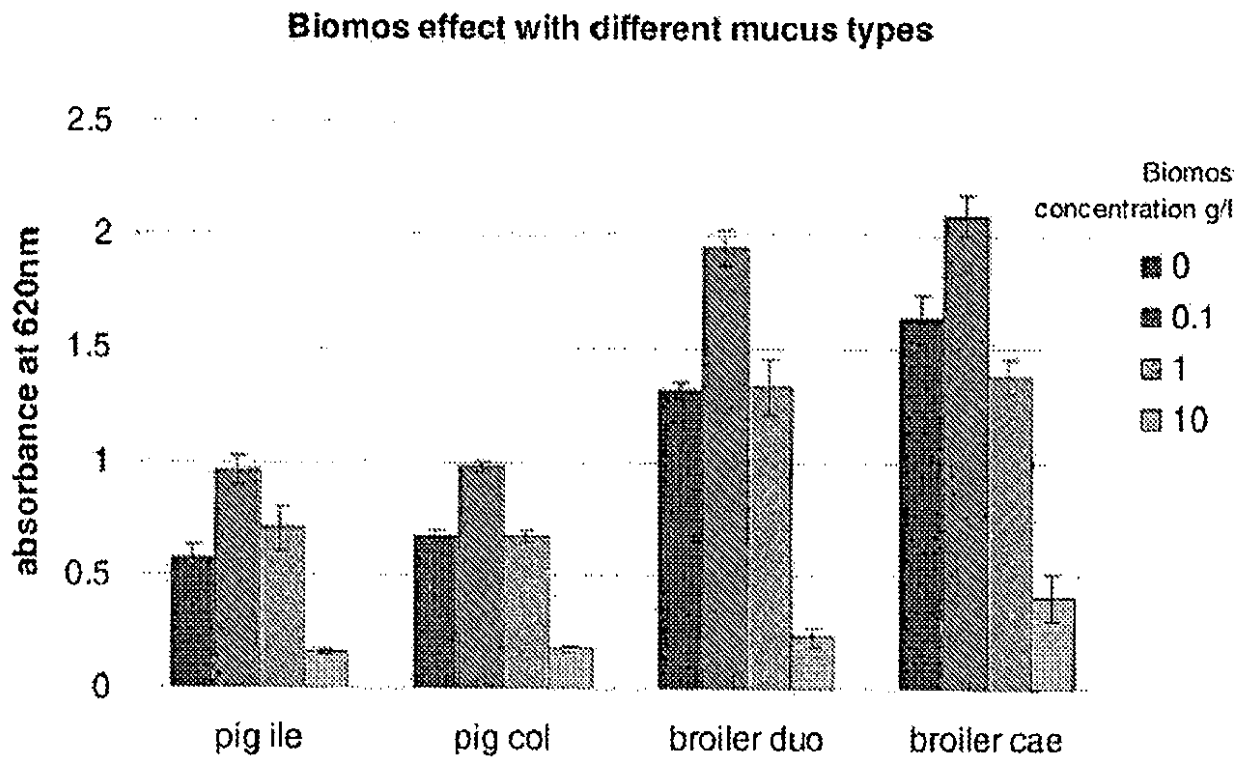


FIGURE 22

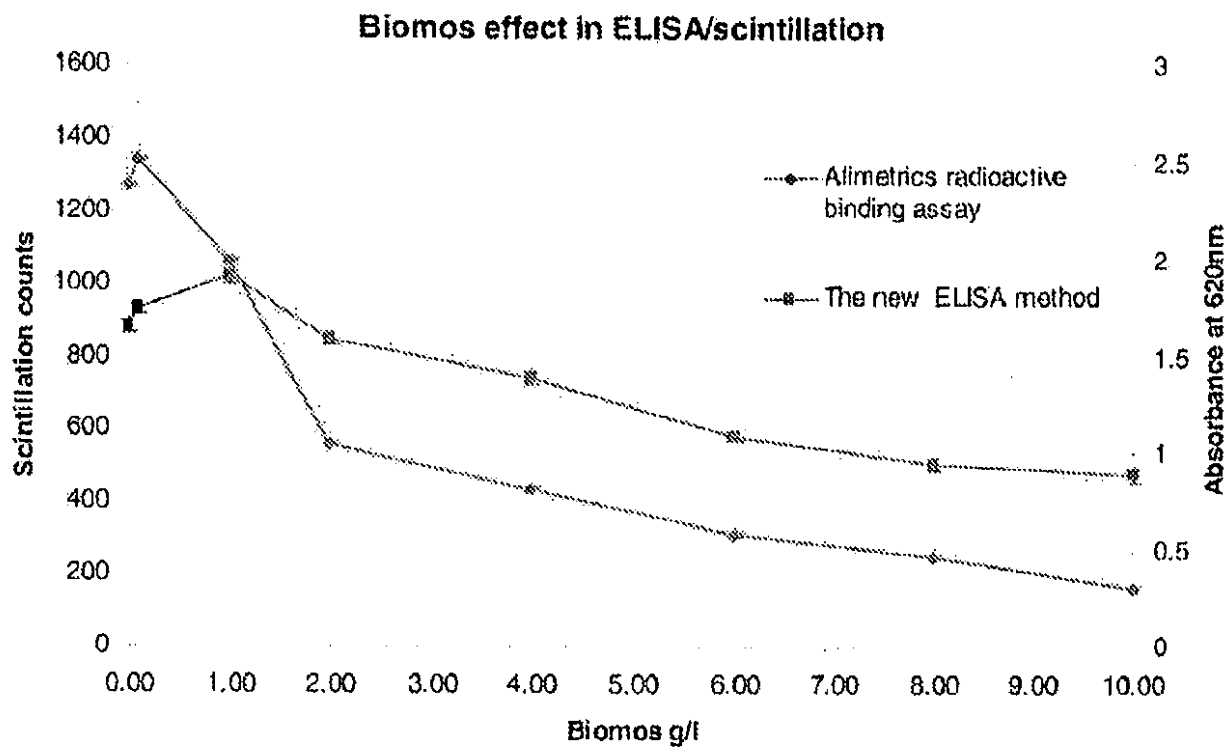


FIGURE 23

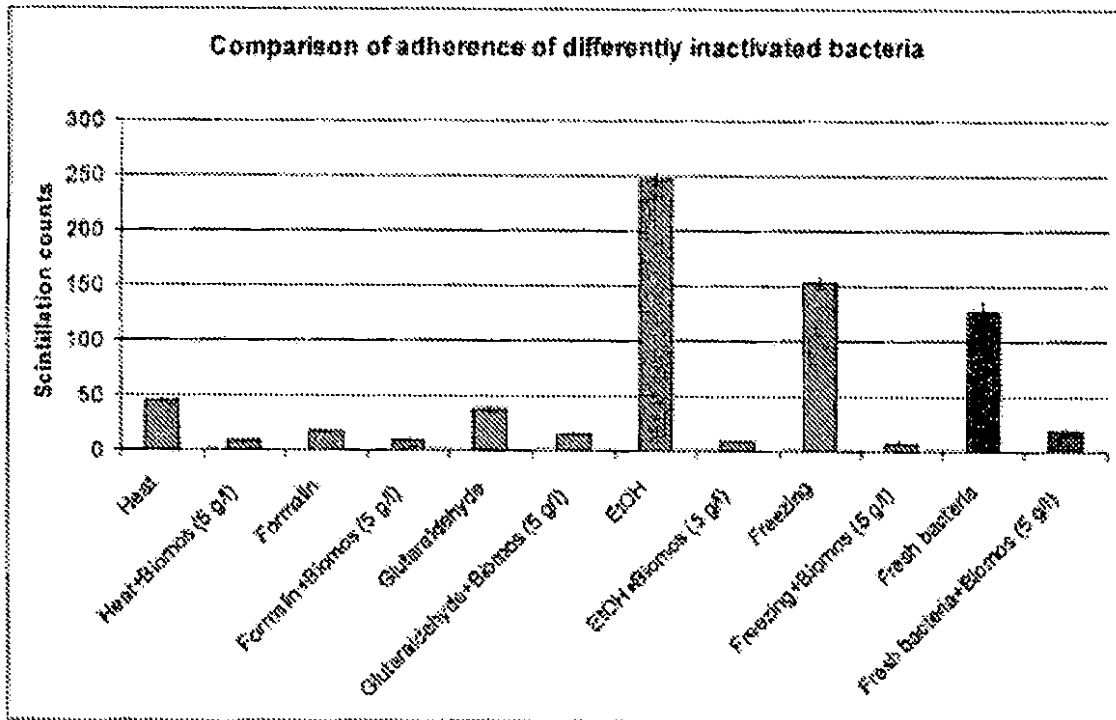


FIGURE 24

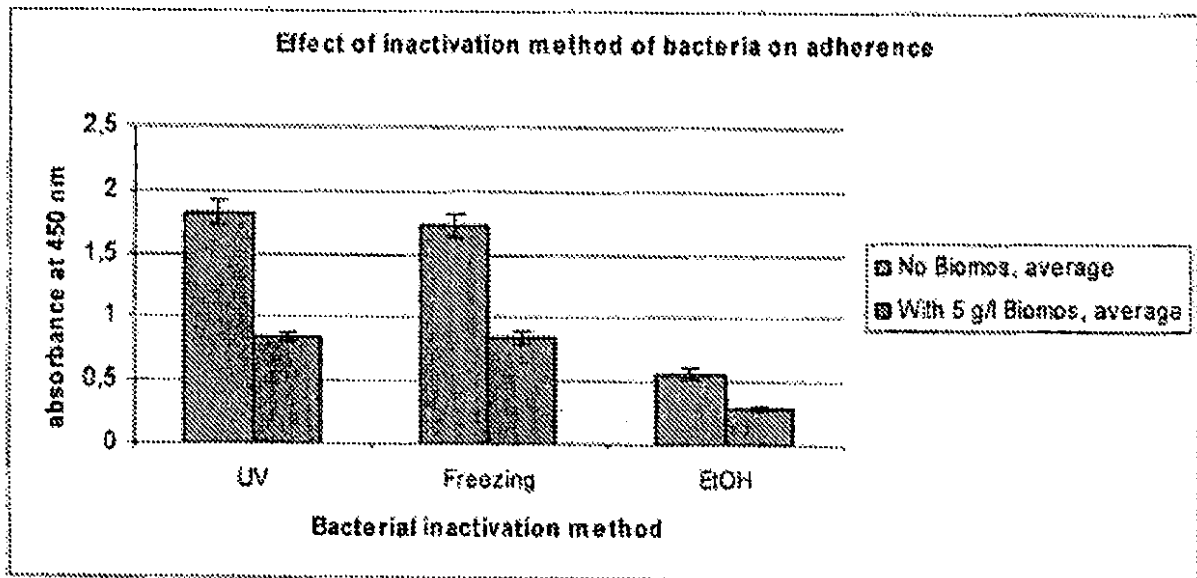


FIGURE 25

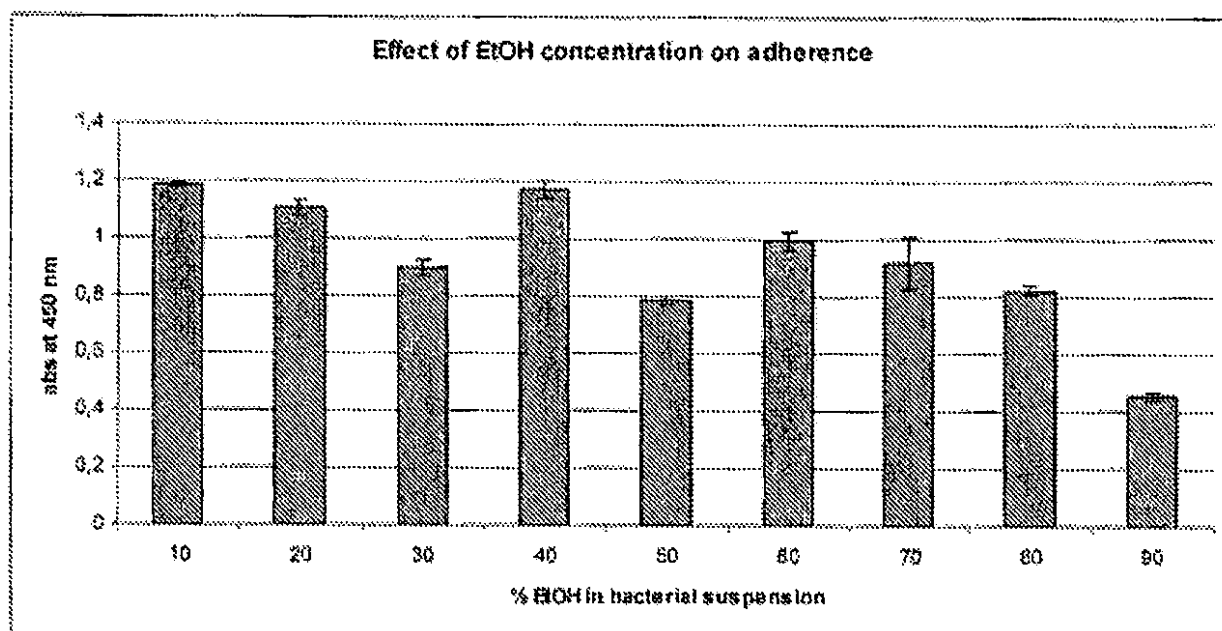


FIGURE 26

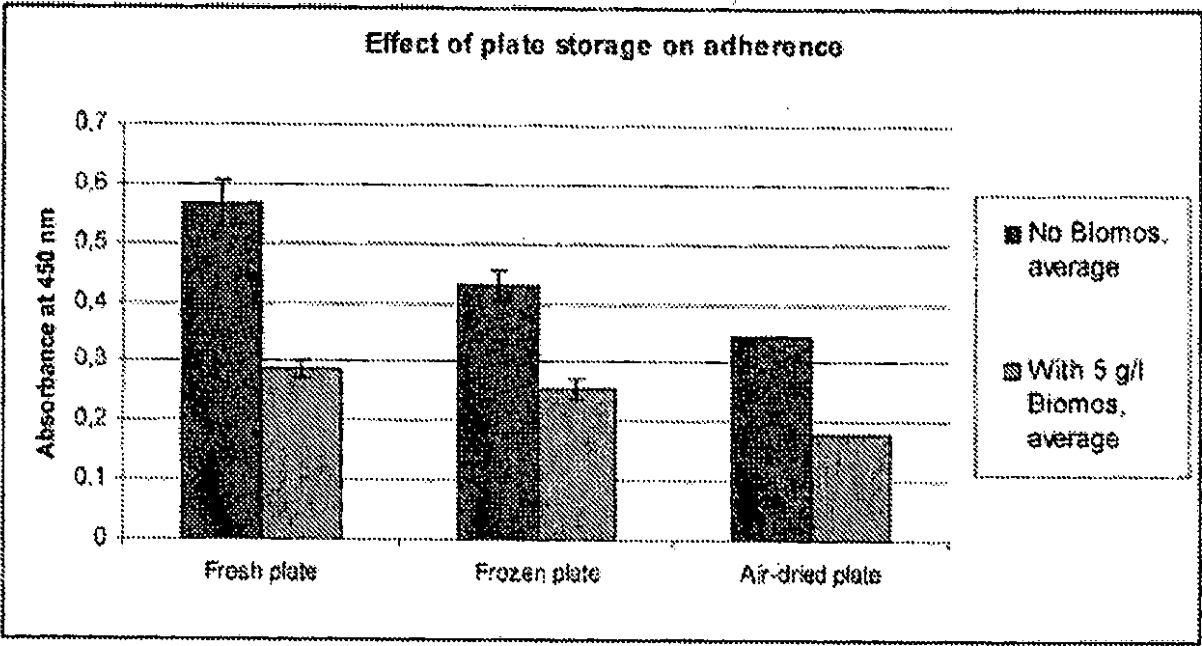


FIGURE 27

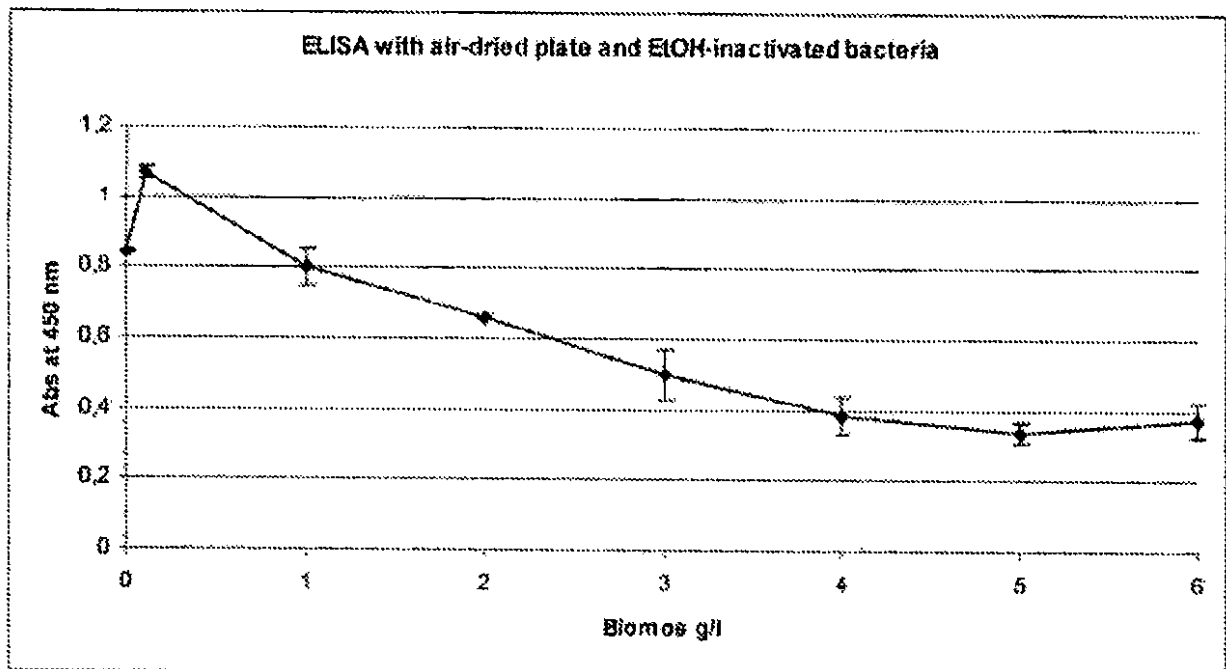


FIGURE 28

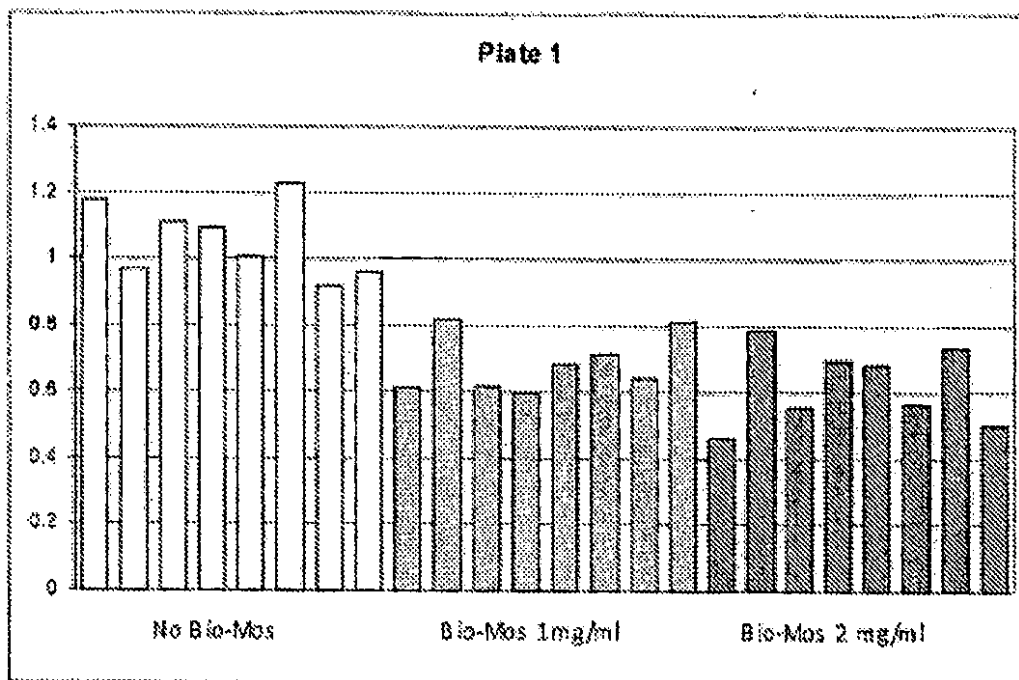


FIGURE 29

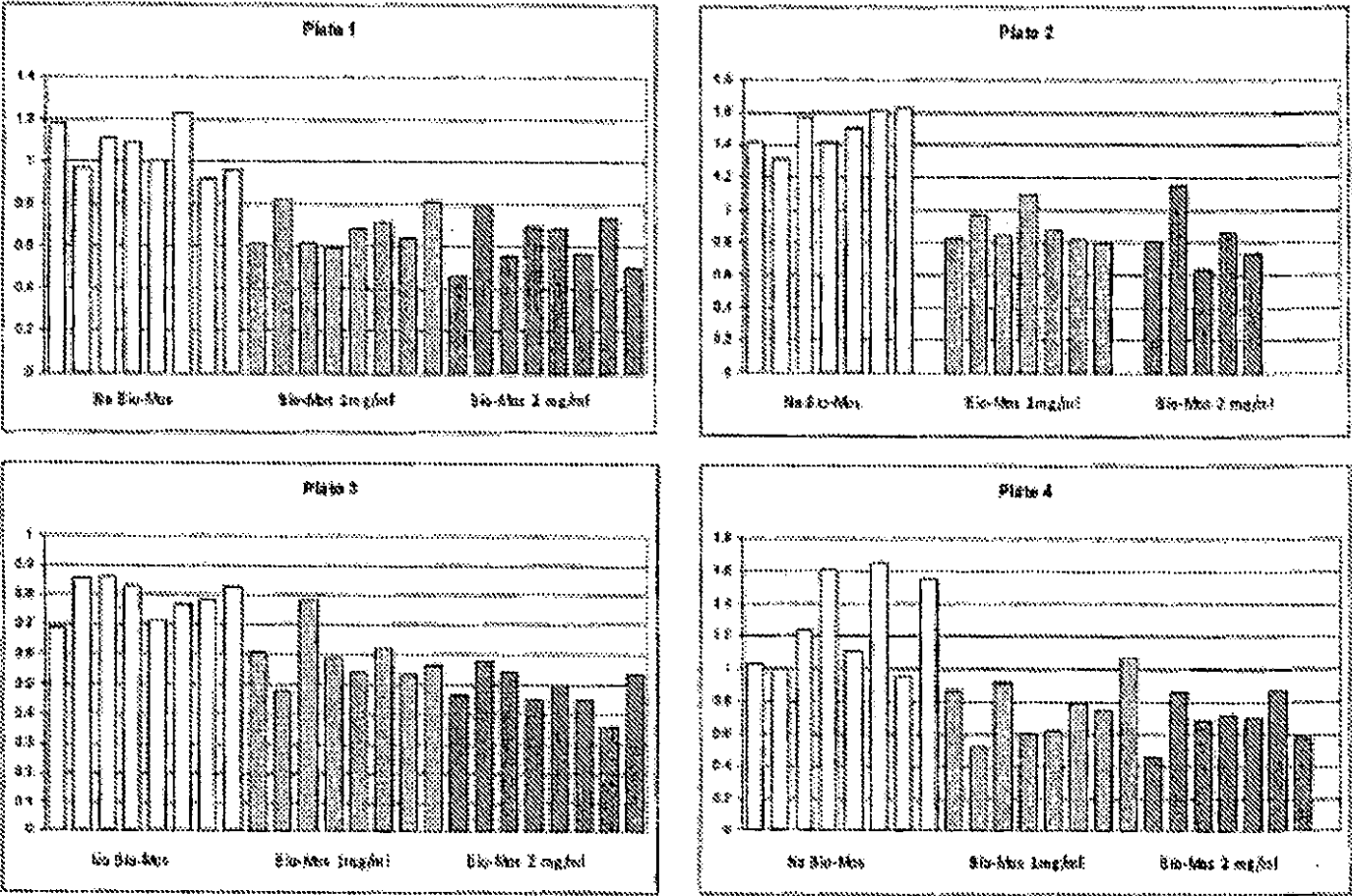


FIGURE 30

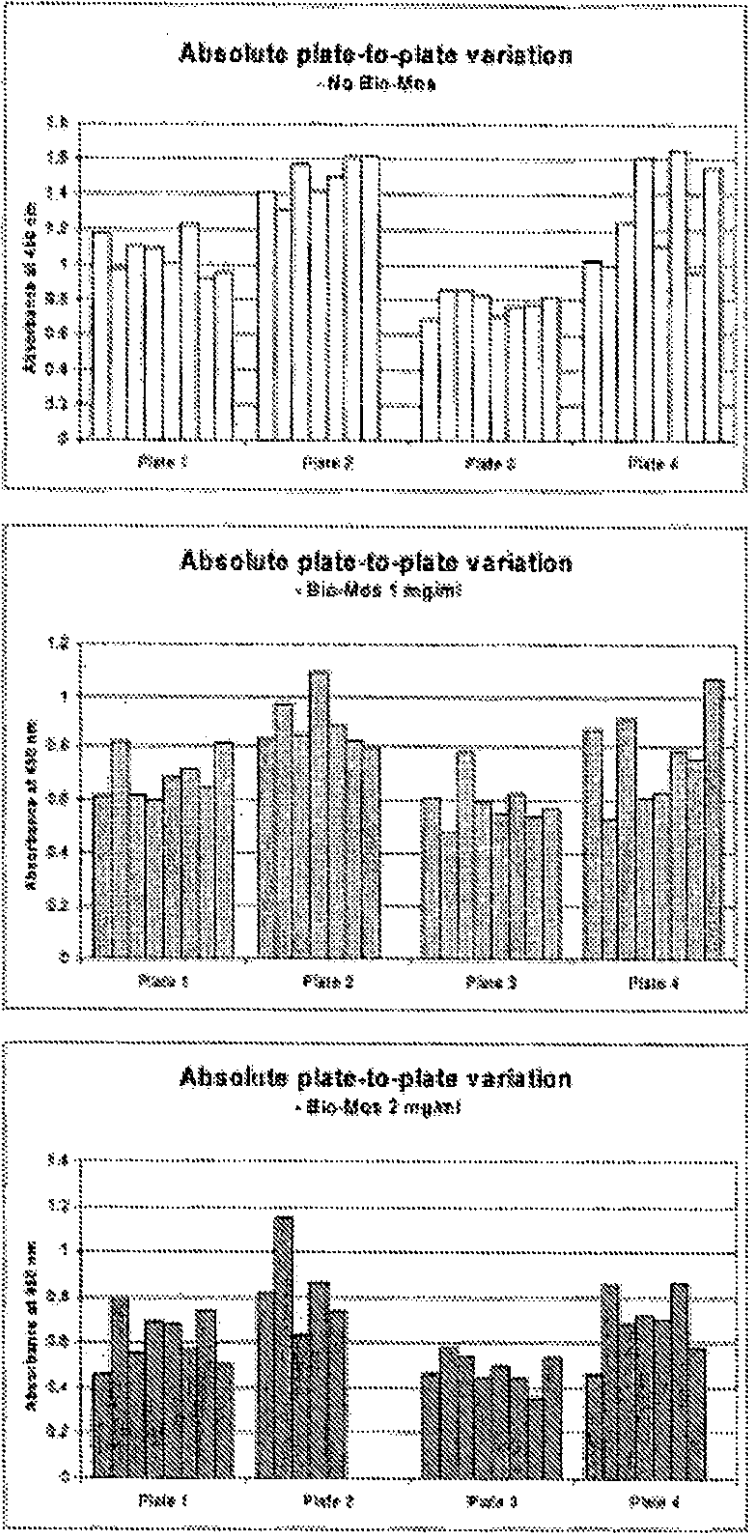


FIGURE 31

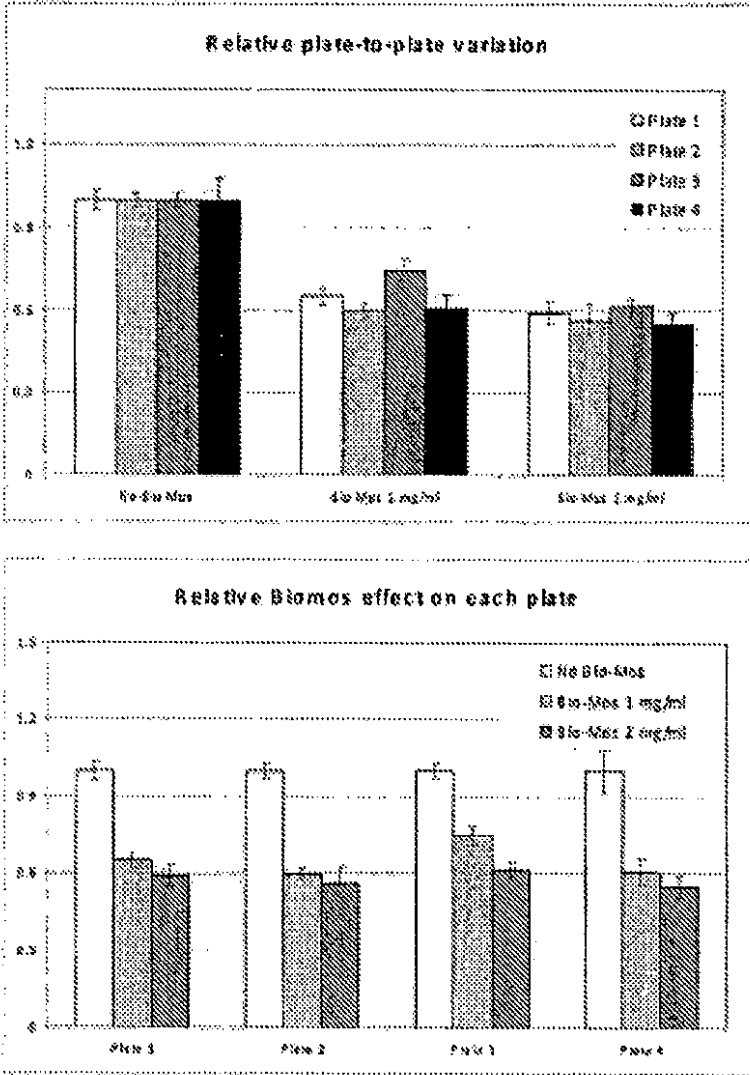


FIGURE 32

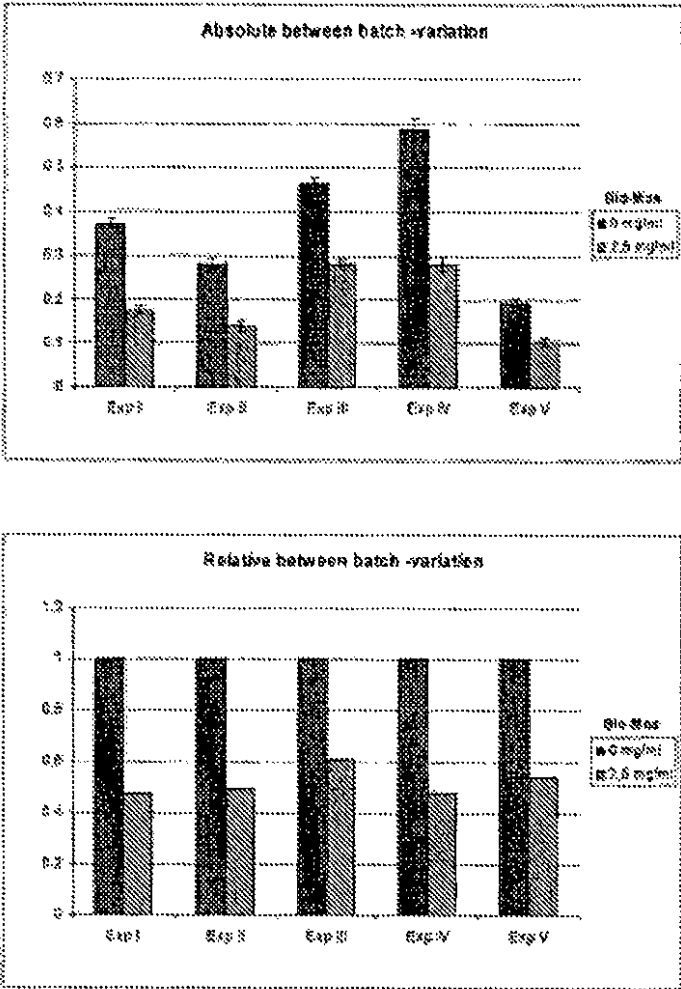


FIGURE 33

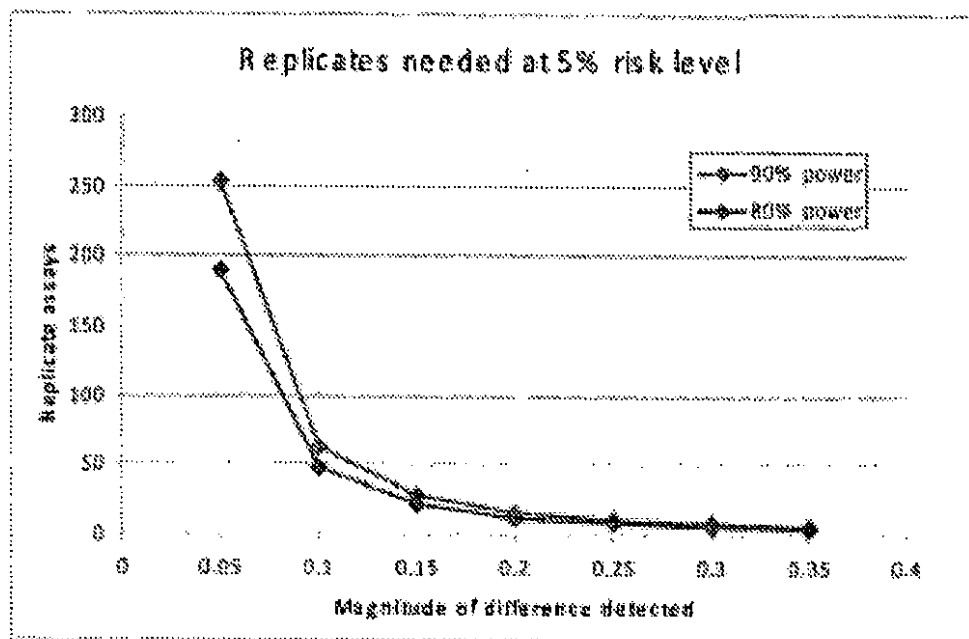


FIGURE 34

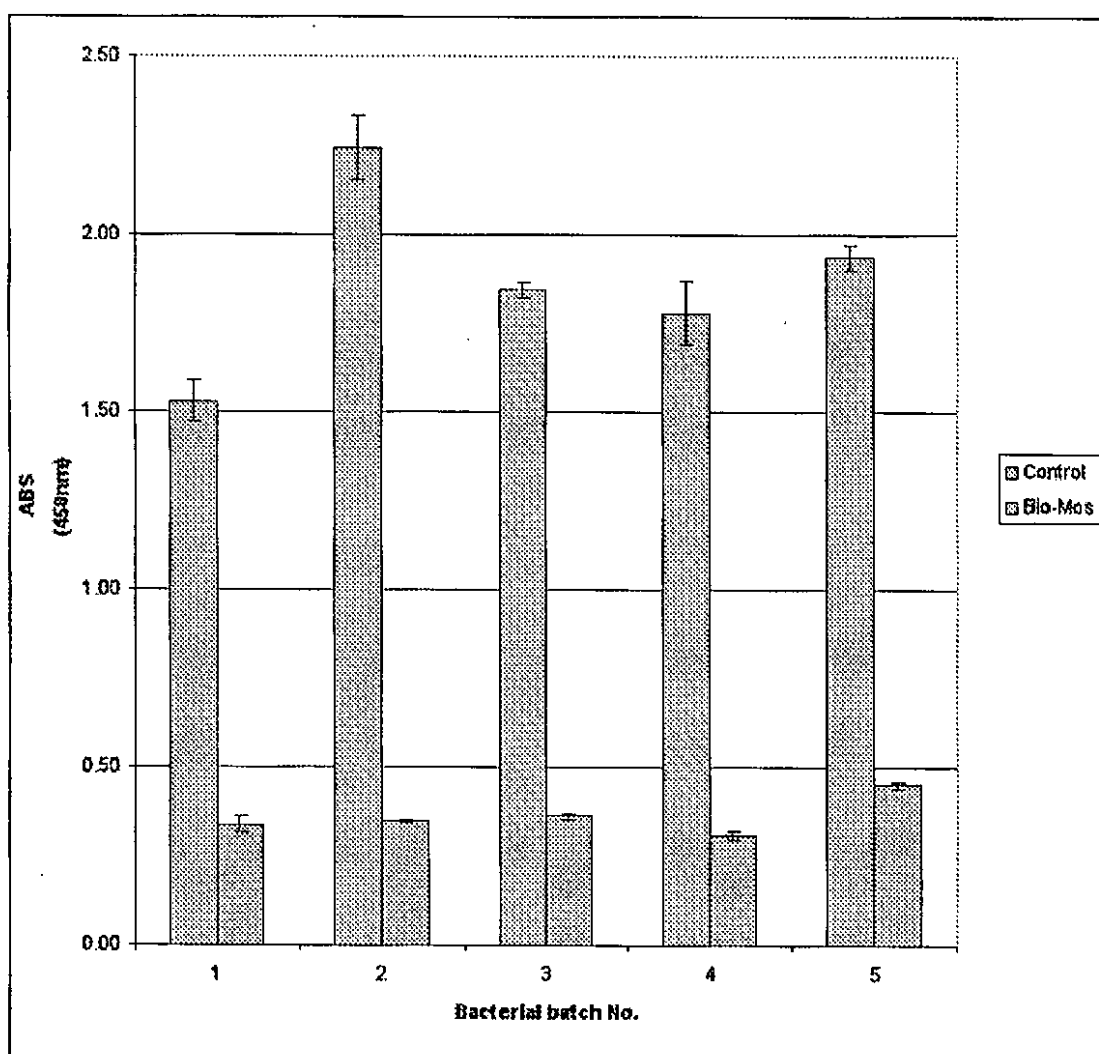


FIGURE 35

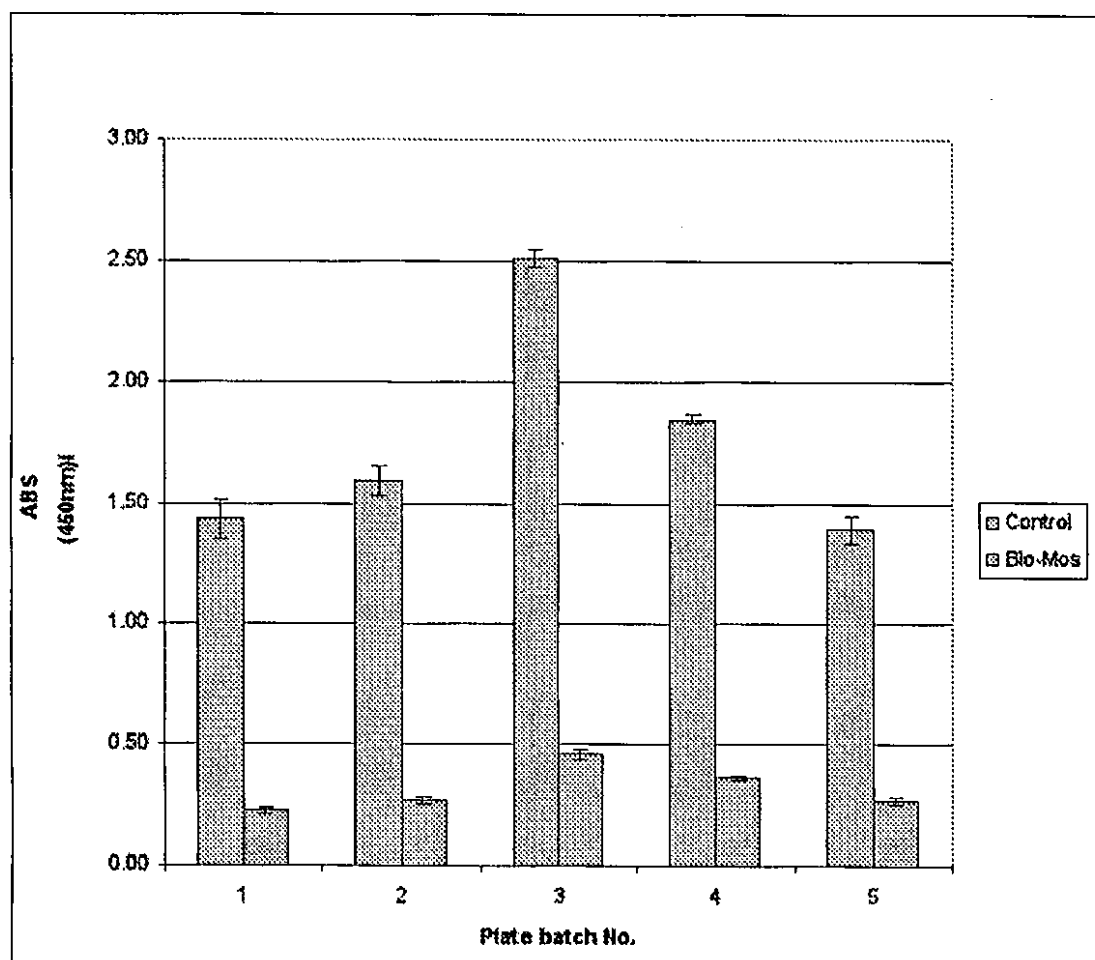


FIGURE 36

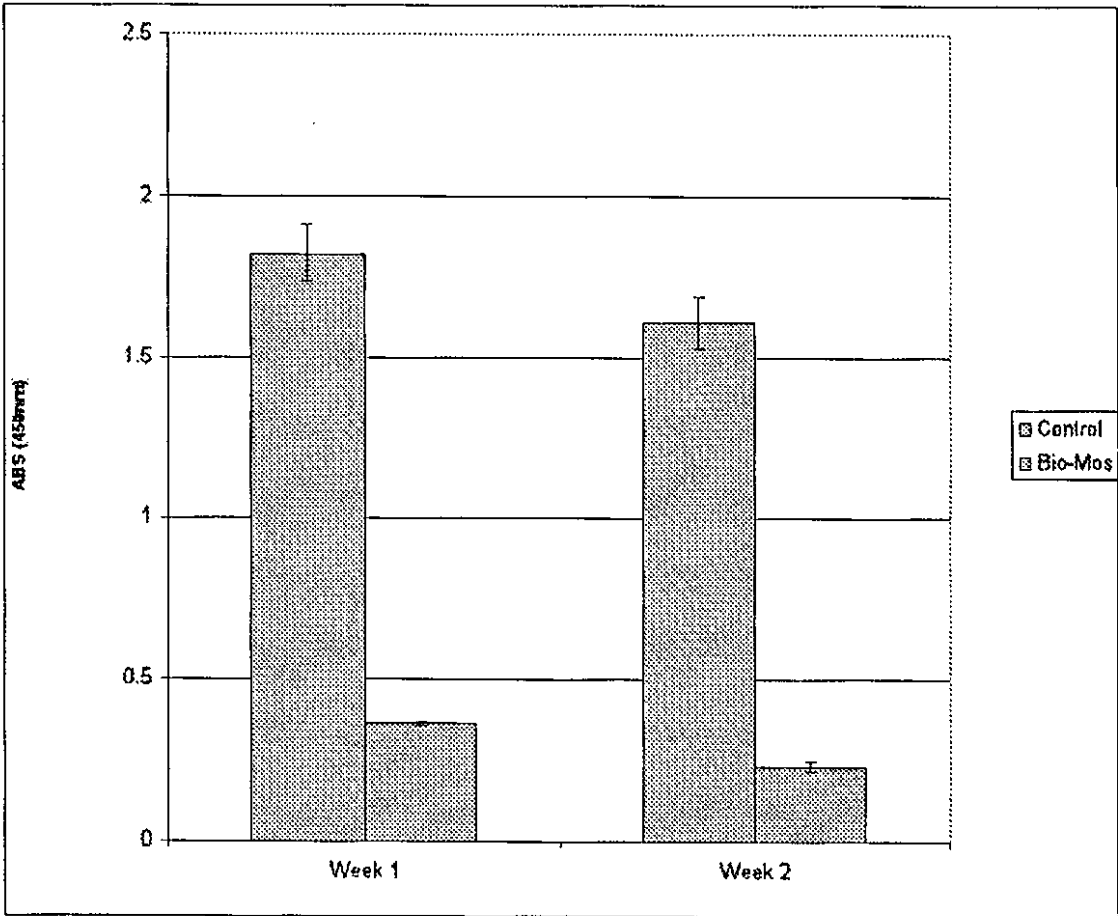
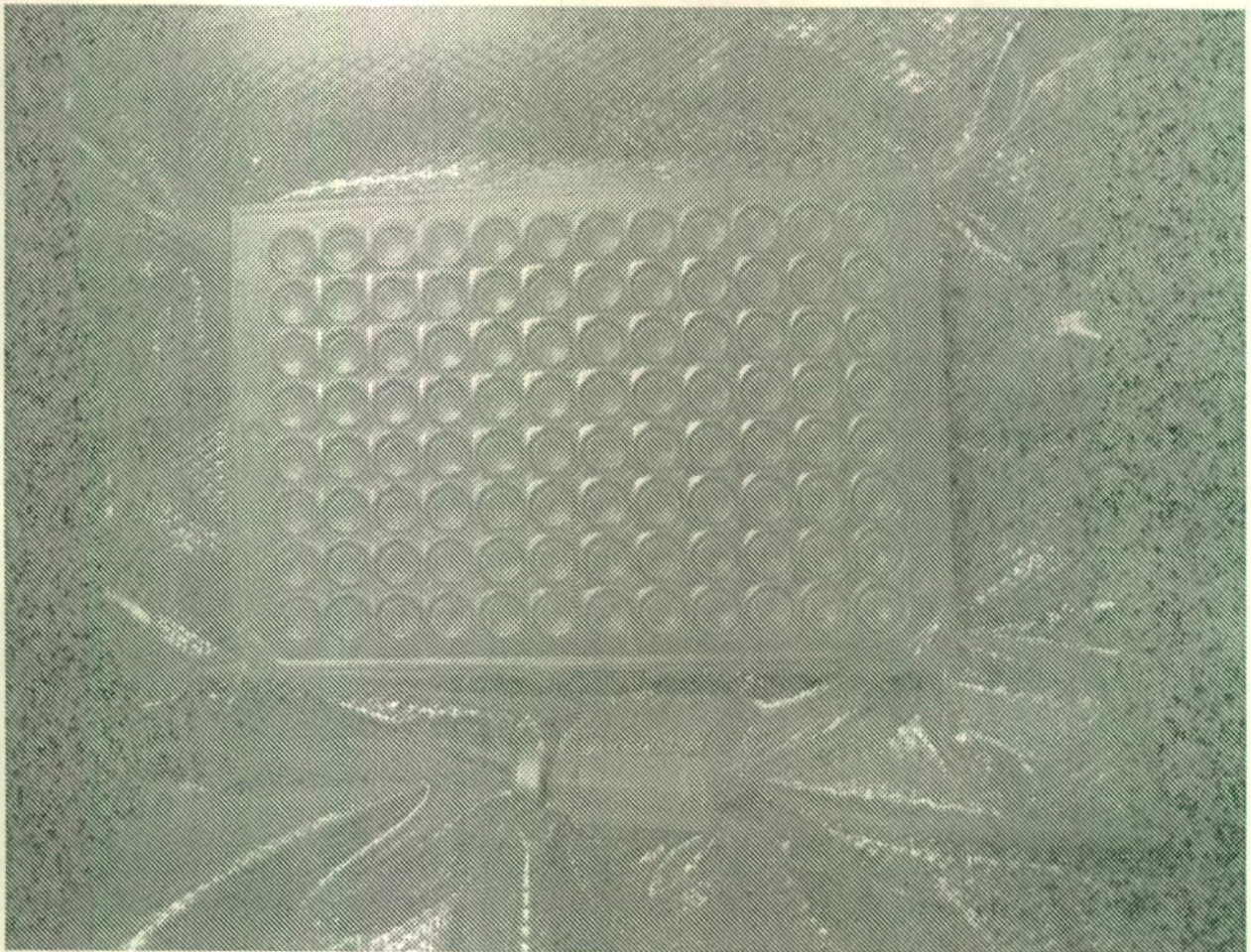


FIGURE 37



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/41396

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12Q 1/00; G01N 33/00 (2010.01)

USPC - 435/4; 435/7.92

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC - 435/4, 7.92Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 436/524 (text search, see terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubWEST(PGPB,USPT,EPAB,JPAB); Google/Scholar (text search, see terms below)

Search Terms: Adherent, adherence, adhesion, assay, ELISA, immunoassay, bacteria, E. coli, eschericia, streptococcus, colorimetric, mucus, tetramethylbenzidine, alkaline phosphatase, peroxidase, serotype

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---- Y	Olek et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for adherence of bacteria to animal cells. Journal of Clinical Microbiology, 1986, vol 24(4), pp 512-516; Table 2, (page 513, col 1, paras 1,3,5,6), (page 513, col 2, paras 2,3), (page 514, col 1, paras 1,2,6), (page 514, col 2, para 5)	1-5, 7, 8, 12-14, 17-25, 27, 31-33, 36-44, 46, 50-52, 55, 56 ----- 6, 9-11, 15, 16, 26, 28-30, 34, 35, 45, 47-49, 53, 54, 57
Y	US 2004/0115210 A1 (TIMMERMAN et al.) 17 June 2004 (17.06.2004); para [0160]	6, 26, 45
Y	Conway et al. Presence of K88-specific receptors in porcine ileal mucus is age dependent. Infection and Immunity, 1990, vol 58(10), pp 3178-3182; Abstract, (page 3178, col 2, para 3)	9, 28, 47
Y	US 2003/0054356 A1 (JACKOBSON et al.) 20 March 2003 (20.03.2003); para [0046]	10, 11, 29, 30, 48, 49
Y	Blixt et al. Sialoside specificity of the Siglec family assessed using novel multivalent probes. Journal of Biological Chemistry, 2003, vol 278(33), pp 31007-31019; (page 31008, col 1, para 4), (page 31009, col 1, para 1)	15, 34, 53
Y	Koo et al. Construction and expression of a bifunctional single-chain antibody against Bacillus cereus spores. Applied and Environmental Microbiology, 1998, vol 64(7), pp 2490-2496; Abstract, (page 2491, col 2, para 5)	16, 35, 54
Y	US 2002/0061345 A1 (VUORENMAA et al.) 23 May 2002 (23.05.2002); para [0003], [0004]	57

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance to the invention

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 August 2010 (31.08.2010)

Date of mailing of the international search report

13 SEP. 2010

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/41396

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Acris-Antibodies Datasheet "Polyclonal antibody to eschericia coli (O & K antigens) - HRP" for Catalog No. BP2022HRP. November 22, 2007. Retrieved from the internet: <URL:http://www.acris-antibodies.com/media/pdf/BP2022HRP.pdf>.	10, 29, 48
A	Acris-Antibodies Datasheet "Polyclonal antibody to eschericia coli (O & K antigens)-Ig fraction" for Catalog No. BP2022. September 30, 2008. Retrieved from the internet: <URL:http://www.acris-antibodies.com/media/pdf/BP2022.pdf>.	11, 30, 49
A	Acris-Antibodies Datasheet "Polyclonal antibody to Goat IgG (H&L)-HRP" for Catalog No. R1317HRP. January 08, 2009. Retrieved from the internet: <URL:http://www.acris-antibodies.com/media/pdf/R1317HRP.pdf>.	12, 31, 50
A	Acris-Antibodies Datasheet "Polyclonal antibody to Goat IgG (H&L)-AP" for Catalog No. R1317AP. April 28, 2009. Retrieved from the internet: <URL:http://www.acris-antibodies.com/media/pdf/R1317AP.pdf>.	13, 32, 51

5

10

15

ADHERENCIA Y ANTIADHERENCIA BACTERIANA A MUCOSIDAD, CÉLULAS
EPITELIALES Y OTRAS CÉLULAS

14/10/00
t.s

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional estadounidense con n.º de serie 61/223.755 presentada el 8 de julio de 2009, cuya totalidad se incorpora en el presente documento como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere de manera general a métodos para detectar, identificar y medir la adherencia bacteriana a mucosidad y células epiteliales. En particular, la presente invención proporciona ensayos para detectar e identificar la presencia o ausencia de adherencia bacteriana a mucosidad (células epiteliales (por ejemplo, presente en los intestinos)), u otra parte de un animal en la que pueden estar presentes bacterias, y a métodos para identificar y caracterizar (por ejemplo, la eficacia de) moduladores de adherencia bacteriana a mucosidad y células epiteliales, u otra parte del animal en la que pueden estar presentes bacterias.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las células epiteliales en el intestino delgado, las vías respiratorias, vías urinarias y las vías reproductoras de los animales están cubiertas por una capa relativamente gruesa de mucosidad que comprende mucina, muchas proteínas asociadas pequeñas, glicoproteínas, lípidos y glicolípidos. Las células epiteliales y la mucosidad contienen receptores que reconocen proteínas de adhesión bacteriana específicas. La adhesión o una asociación cercana de bacterias a las células epiteliales pueden contribuir a la colonización así como a la patogenicidad bacteriana. Además, la adhesión bacteriana a la mucosidad y el epitelio intestinales parece importante para la estabilidad individual dentro de la flora microbiana.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere de manera general a métodos para detectar, identificar y medir la adherencia y antiadherencia bacteriana a mucosidad y células (por ejemplo, células epiteliales). En particular, la presente invención proporciona ensayos para detectar e identificar la adherencia bacteriana a mucosidad (por ejemplo, revestimiento de la mucosidad intestinal) y células epiteliales, y métodos para identificar moduladores de adherencia bacteriana a mucosidad y células epiteliales. Los ensayos no son radioactivos, son microbiológicamente seguros, así como son estables, se transportan fácilmente y se almacenan fácilmente.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona kits que comprenden un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas no radioactivo (ELISA) para someter a ensayo la adherencia bacteriana con mucosidad y/o células epiteliales. Los kits no se limitan a componentes particulares. En algunas realizaciones, los kits comprenden un soporte sólido que tiene mucosidad o células epiteliales recubiertas sobre el mismo, una muestra que comprende bacterias, un anticuerpo primario específico para las bacterias, y un anticuerpo secundario marcado de forma detectable específico para el anticuerpo primario unido a las bacterias. En algunas realizaciones, los kits comprenden un sustrato que permite la visualización del anticuerpo secundario marcado de forma detectable. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario marcado de forma detectable comprende un marcador enzimático. En algunas realizaciones, el sustrato es una composición para proporcionar una señal quimioluminiscente, fluorimétrica o colorimétrica en presencia del marcador enzimático. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario marcado de forma detectable comprende inmunoglobulinas de cerdo anti-IgG acopladas a peroxidasa. En algunas realizaciones, la composición colorimétrica es 3,3',5,5'-tetrametilbencidina. En

algunas realizaciones, el soporte sólido es una placa de 96 pocillos. En algunas realizaciones, las bacterias son bacterias *E. coli*. Los ejemplos de mucosidad incluyen, pero no se limitan a, mucosidad del íleon proximal de cerdo, mucosidad del colon distal de cerdo, mucosidad del duodeno de pollo de engorde y mucosidad del ciego de pollo de engorde. Los ejemplos de anticuerpos primarios incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales conjugados con HRP específicos para los serotipos antigénicos O y K de *E. coli*, anticuerpos policlonales específicos para los serotipos antigénicos O y K de *E. coli*. Los ejemplos de anticuerpos secundarios incluyen, pero no se limitan a, anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-HRP purificado por afinidad, anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-AP purificado por afinidad, anticuerpos policlonales conjugados con FITC frente a IgG de cabra (H&L), estreptavidina-fosfatasa alcalina de *Streptomyces avidinii*, y estreptavidina-peroxidasa de *Streptomyces avidinii*.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para medir la adherencia y la antiadherencia entre bacterias y mucosidad, y bacterias y células epiteliales. Los métodos no se limitan a técnicas particulares para medir la adherencia entre bacterias y mucosidad, y bacterias y células epiteliales. En algunas realizaciones, los métodos comprenden proporcionar una muestra que comprende bacterias y mucosidad, y combinar la muestra que comprende bacterias y mucosidad dentro de un ensayo colorimétrico no radioactivo en condiciones tales que se mide la adherencia entre las bacterias y la mucosidad. En algunas realizaciones, el ensayo colorimétrico no radioactivo es un ensayo ELISA. En algunas realizaciones, las condiciones comprenden añadir anticuerpos primarios específicos para las bacterias unidas con la mucosidad, células epiteliales u otras, y añadir anticuerpos secundarios marcados de forma detectable específicos para los anticuerpos primarios unidos con las bacterias. En algunas realizaciones, los métodos

comprenden añadir un sustrato que permite la visualización de los anticuerpos secundarios marcados de forma detectable unidos con los anticuerpos primarios. En algunas realizaciones, la mucosidad está recubierta sobre una placa de microtitulación. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario marcado de forma detectable comprende un marcador enzimático. En algunas realizaciones, el sustrato es una composición para proporcionar una señal quimioluminiscente, fluorimétrica o colorimétrica en presencia del marcador enzimático. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario marcado de forma detectable comprende inmunoglobulinas de cerdo anti-IgG acopladas a peroxidasa. En algunas realizaciones, la composición colorimétrica es 3,3',5,5'-tetrametilbencidina. En algunas realizaciones, las bacterias son bacterias *E. coli*. Los métodos no se limitan a anticuerpos primarios o secundarios particulares. En algunas realizaciones, los ejemplos de anticuerpos primarios incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo policlonal conjugado con HRP específico para los serotipos antigénicos O y K de *E. coli*, y un anticuerpo policlonal específico para los serotipos antigénicos O y K de *E. coli*. Los ejemplos de anticuerpos secundarios incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-HRP purificado por afinidad, un anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-AP purificado por afinidad, un anticuerpo policlonal conjugado con FITC frente a IgG de cabra (H&L), estreptavidina-fosfatasa alcalina de *Streptomyces avidinii*, y estreptavidina-peroxidasa de *Streptomyces avidinii*.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para identificar un agente que modula la adherencia entre bacterias y mucosidad, que comprende proporcionar una muestra que comprende bacterias, mucosidad y un agente, y combinar la muestra que comprende bacterias, la mucosidad y el agente dentro de un ensayo colorimétrico no radioactivo en condiciones tales que se mide la adherencia

entre las bacterias y la mucosidad. Los métodos comprenden además comparar la adherencia bacteriana en presencia y ausencia del agente, e identificar el agente como un modulador de adherencia entre las bacterias y la mucosidad si la adherencia medida es superior o inferior a la adherencia entre las bacterias y la mucosidad en ausencia del agente. En algunas realizaciones, el ensayo colorimétrico no radioactivo es un ensayo ELISA. En algunas realizaciones, las condiciones comprenden añadir anticuerpos primarios específicos para las bacterias unidas con la mucosidad. En algunas realizaciones, las condiciones comprenden añadir anticuerpos secundarios marcados de forma detectable específicos para los anticuerpos primarios unidos con las bacterias. En algunas realizaciones, las condiciones comprenden añadir un sustrato que permite la visualización de los anticuerpos secundarios marcados de forma detectable unidos con los anticuerpos primarios. En algunas realizaciones, la mucosidad está recubierta sobre una placa de microtitulación. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario marcado de forma detectable comprende un marcador enzimático. En algunas realizaciones, el sustrato es una composición para proporcionar una señal quimioluminiscente, fluorimétrica o colorimétrica en presencia del marcador enzimático. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario marcado de forma detectable comprende inmunoglobulinas de cerdo anti-IgG acopladas a peroxidasa. En algunas realizaciones, la composición colorimétrica es 3,3',5,5'-tetrametilbencidina. En algunas realizaciones, las bacterias son bacterias *E. coli*. Los ejemplos de anticuerpos primarios incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo policlonal conjugado con HRP específico para los serotipos antigénicos O y K de *E. coli*, un anticuerpo policlonal específico para los serotipos antigénicos O y K de *E. coli*. Los ejemplos de anticuerpos secundarios incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-HRP purificado por afinidad, un anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-AP

purificado por afinidad, un anticuerpo policlonal conjugado con FITC frente a IgG de cabra (H&L), estreptavidina-fosfatasa alcalina de *Streptomyces avidinii*, y estreptavidina-peroxidasa de *Streptomyces avidinii*. En algunas realizaciones, el agente se selecciona de una lista que consiste en una molécula que se produce de manera natural, una molécula derivada de manera sintética y una molécula derivada de manera recombinante.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones que comprenden un agente, en las que el agente es un modulador de adherencia bacteriana con mucosidad, y en las que el agente se identifica mediante un procedimiento que comprende proporcionar i) una muestra que comprende bacterias, ii) mucosidad, iii) un agente; combinar la muestra que comprende bacterias, la mucosidad y el agente dentro de un ensayo colorimétrico no radioactivo en condiciones tales que se mide la adherencia entre las bacterias y la mucosidad; comparar la adherencia bacteriana en presencia y ausencia del agente; e identificar el agente como un modulador de adherencia entre las bacterias y la mucosidad si la adherencia medida es superior o inferior a la adherencia entre las bacterias y la mucosidad en ausencia del agente. En algunas realizaciones, la composición está dentro de producto alimenticio para su consumo por un sujeto seleccionado del grupo que consiste en ganado, animales de compañía, peces y moluscos.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra el efecto de la concentración de mucosidad (mg de proteína/ml) sobre la adherencia de *E. coli* ALI 84 y AL1446, tal como se mide mediante bacterias marcadas radioactivamente.

La figura 2 muestra el efecto de anticuerpos primarios sobre la adherencia de *E. coli* AL184, tal como se mide mediante contador de centelleo con bacterias marcadas radioactivamente. Anticuerpos primarios: HRP = anticuerpo

anti-*E. coli* conjugado con HRP; BP2022 = anticuerpo anti-*E. coli* no conjugado, Biotina = anticuerpo anti-*E. coli* conjugado con biotina.

5 La figura 3 muestra el efecto de anticuerpos primarios sobre la adherencia de *E. coli* AL1446, tal como se mide mediante contador de centelleo con bacterias marcadas radioactivamente. Anticuerpos primarios: HRP = anticuerpo anti-*E. coli* conjugado con HRP; BP2022= anticuerpo anti-*E. coli* no conjugado, Biotina = anticuerpo anti-*E. coli* conjugado
10 con biotina.

La figura 4 muestra el desarrollo de color de tres sustratos diferentes de ELISA de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) cuando se incuban con bacterias *E. coli* (cepas AL184 y AL1446).

15 La figura 5 muestra el desarrollo de color de los sustratos de ELISA fosfato de p-nitrofenilo (pNPP) y 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (AzBTS) cuando se incuban con las cepas de *E. coli* AL184 y AL 1446. E = potenciador de micropocillo de ABTS.

20 La figura 6 muestra desarrollo de color de diferentes sustratos de ELISA cuando se incuban en pocillos recubiertos con mucosidad. La fotografía se tomó a los 60 min., se observó una señal débil en los seis pocillos positivos (amarillos) a los 15 min.

25 La figura 7 muestra la distribución de la placa cuando se somete a prueba para detectar la unión no específica de anticuerpos a mucosidad o a la placa. BP2022 = anticuerpo primario anti-*E. coli*; BP2022HRP = anticuerpo primario anti-*E. coli* conjugado con peroxidasa; Biotina = anticuerpo primario
30 anti-*E. coli* conjugado con biotina. HRP = anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa; StrHRP = estreptavidina conjugada con peroxidasa. AP = anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina; StrAP = anticuerpo secundario conjugado con estreptavidina. No se usaron bacterias en este
35 experimento.

La figura 8 muestra la unión de anticuerpos a mucosidad o a la placa. La distribución de la placa se describe en la figura 7.

La figura 9 muestra una prueba de unión no específica con anticuerpos primarios y secundarios. Anticuerpos primarios: HRP = Ac. primario conjugado con HRP, BP2022= anticuerpo primario anti-*E.coli* policlonal no conjugado; Biotina = anticuerpo primario anti-*E. coli* conjugado con biotina. Anticuerpos secundarios: HRP = IgG conjugada con HRP; StrHRP=estreptavidina marcada con HRP. No se usaron bacterias en este experimento.

La figura 10 muestra una prueba de unión no específica con anticuerpos primarios y secundarios. La distribución de la placa se describe en la figura 9. Anticuerpos primarios: HRP = Ac. primario conjugado con HRP, BP2022 = anticuerpo anti-*E.coli* policlonal no conjugado; Biotina = anticuerpo anti-*E. coli* conjugado con biotina. Anticuerpos secundarios: HRP = IgG conjugada con HRP; Str.HRP = estreptavidina marcada con HRP.

La figura 11 muestra una tabla que describe las condiciones usadas para optimizar la dilución de anticuerpos y el número de bacterias/pocillo. Anticuerpo primario: anticuerpo primario conjugado con HRP, sin anticuerpo secundario.

La figura 12 muestra datos obtenidos a partir de someter a prueba la dilución de anticuerpos y el número óptimo de bacterias/pocillo. Anticuerpo primario: anticuerpo primario conjugado con HRP, sin anticuerpo secundario. La distribución de la placa se muestra en la figura 11.

La figura 13 muestra una tabla que describe las condiciones usadas para optimizar la dilución de anticuerpos y el número de bacterias/pocillo. Anticuerpo primario: anticuerpo anti-*E. coli* conjugado con biotina, anticuerpo secundario: estreptavidina conjugada con HRP.

La figura 14 muestra datos obtenidos a partir de someter a prueba la dilución de anticuerpos y el número óptimo de

bacterias/pocillo. Anticuerpo primario: anticuerpo anti-*E. coli* conjugado con biotina, anticuerpo secundario: estreptavidina conjugada con HRP.

5 La figura 15 muestra absorbancias de ELISA con 10^6 - 10^8 bacterias añadidas en los pocillos. Se ha añadido una línea de tendencia logarítmica.

La figura 16 muestra absorbancias de ELISA con 0 - 10^6 bacterias añadidas en los pocillos.

10 La figura 17 muestra A) el efecto de diferentes concentraciones de Bio-Mos sobre la adherencia bacteriana. El efecto se muestra como porcentaje de absorbancia cuando no se añadió Bio-Mos; y B) el efecto de Bio-Mos sobre la adherencia de la cepa de *E. coli* AL184, medido con bacterias marcadas radioactivamente en un contador de centelleo.

15 La figura 18 muestra datos de experimentos que someten a prueba el número de bacterias/pocillo para encontrar un nivel óptimo para detectar efectos que alteran la adherencia/unión (por ejemplo, usando Bio-Mos).

20 La figura 19 muestra datos de experimentos que someten a prueba el número de bacterias/pocillo para encontrar un nivel óptimo para detectar efectos que alteran la adherencia/unión (por ejemplo, usando Bio-Mos).

25 La figura 20 muestra datos relacionados con la dilución del anticuerpo primario para detectar diferencias entre diferentes concentraciones de Bio-Mos.

La figura 21 muestra el efecto de Bio-Mos en ELISA usando diferentes tipos de mucosidad y múltiples concentraciones de Bio-Mos.

30 La figura 22 muestra una comparación del efecto de Bio-Mos en el ensayo de unión radioactiva y procedimiento de ELISA. Los errores estándar de la media entre muestras repetidas se muestran como barras de error.

La figura 23 muestra la adherencia de bacterias inactivadas de manera diferente a placas recubiertas con

mucosidad. Se midió la adherencia con y sin Bio-Mos. No se muestran datos para bacterias inactivadas con UV y DMSO.

La figura 24 muestra adherencia de bacterias a mucosidad sobre placas recién recubiertas según el método de ELISA.

5 La figura 25 muestra el efecto de la concentración de etanol en líquido de conservación de *E. coli* sobre la adherencia de las bacterias a mucosidad.

10 La figura 26 muestra la adherencia de bacterias con y sin Bio-Mos sobre placas recubiertas con mucosidad almacenadas de manera diferente.

15 La figura 27 muestra el efecto de Bio-Mos sobre la adherencia de *E. coli* inactivada con etanol sobre placas secadas al aire, recubiertas con mucosidad. Los errores estándar de la media entre repeticiones se muestran como barras de error.

La figura 28 muestra variación entre placas absoluta para diferentes niveles de prueba de Bio-Mos. Los ensayos de repeticiones (pocillos) de la misma muestra se muestran como grupos de barras.

20 La figura 29 muestra variación entre placas absoluta para diferentes niveles de prueba de Bio-Mos. Los cuatro paneles de la figura representan ensayos llevados a cabo en cuatro días diferentes, pero con un único lote de *E. coli*. Los ensayos repetidos (pocillos) de la misma muestra se muestran como grupos de barras.

25 La figura 30 muestra variación entre placas absoluta para diferentes niveles de prueba de Bio-Mos en diferentes paneles. Los cuatro conjuntos de columnas en cada panel representan ensayos llevados a cabo en cuatro días diferentes, pero con un único lote de *E. coli*.

30 La figura 31 muestra variación entre placas relativa para diferentes niveles de prueba de Bio-Mos. Las columnas representan medias de los pocillos de prueba repetidos y las barras indican errores estándar de la media. Se llevaron a cabo ensayos en cuatro días diferentes, pero con un único lote

35

de *E. coli*. Los dos paneles muestran los mismos datos, pero expuestos de manera diferente para enfatizar o bien la variación entre placas (panel superior) o bien el efecto de Bio-Mos (panel inferior).

5 La figura 32 muestra variación entre lotes relativa para el efecto de Bio-Mos. Las columnas del panel superior representan medias de los pocillos de prueba repetidos y las barras indican errores estándar de la media. Los ensayos se llevaron a cabo de manera totalmente independiente a partir de las preparaciones de tampón y medio, y el cultivo de *E. coli*. El panel superior muestra las señales medidas y el panel inferior los valores en relación con los pocillos control.

10 La figura 33 muestra el número de pocillos repetidos necesarios para detectar las diferencias indicadas entre los tratamientos de prueba con el ensayo desarrollado.

15 La figura 34 muestra señales medidas para cinco (5) lotes independientes de preparación bacteriana en presencia y ausencia de Bio-Mos (2 ng/ml).

20 La figura 35 muestra señales medidas para cinco (5) lotes independientes de placas con mucosidad en presencia y ausencia de Bio-Mos (2 ng/ml).

La figura 36 muestra señales de prueba tras 1 y 2 semanas de almacenamiento.

25 La figura 37 muestra una placa y ampolla selladas a vacío en una realización de la invención.

DEFINICIONES

Para facilitar un entendimiento de la invención, a continuación se definen varios términos.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "mucosidad" se refiere a una secreción relativamente espesa producida por y que cubre partes del tubo digestivo (por ejemplo, producida por y que cubre las células epiteliales del intestino). La mucosidad puede comprender uno o más
35 componentes tales como mucina, proteínas, glicoproteínas,

lípidos y glicolípidos. La mucosidad también puede comprender uno o más tipos de receptores (por ejemplo, que reconocen proteínas de adhesión específicas). La adhesión y/o asociación cercana de bacterias a mucosidad y/o células epiteliales (por ejemplo, mediante la capa de mucosidad) puede contribuir a la adhesión bacteriana a la mucosidad y/o epitelio intestinal (por ejemplo, desempañando así un papel en poblaciones de bacterias que habitan en el intestino). La presente invención no se limita a ningún tipo particular de mucosidad o a mucosidad obtenida a partir de ninguna fuente particular (por ejemplo, tipo de animal) o ubicación (por ejemplo, parte del tubo digestivo (por ejemplo, íleon (por ejemplo, proximal, distal, etc.), duodeno, ciego, colon u otra parte del tubo digestivo)).

Tal como se usan en el presente documento, los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se refieren todos a una secuencia primaria de aminoácidos que están unidos mediante "enlaces peptídicos" covalentes. En general, un péptido consiste en algunos aminoácidos, normalmente desde 2-50 aminoácidos, y es más corto que una proteína. El término "polipéptido" abarca péptidos y proteínas. En algunas realizaciones, el péptido, el polipéptido o la proteína son sintéticos, mientras que en otras realizaciones, el péptido, el polipéptido o la proteína son recombinantes o se producen de manera natural. Un péptido sintético es un péptido que se produce mediante medios artificiales *in vitro* (es decir, no se produjo *in vivo*).

Se usan los términos "muestra" y "especimen" en su sentido lo más amplio y abarcan muestras o especímenes obtenidos a partir de cualquier fuente. Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra" se usa para referirse a muestras biológicas obtenidas de animales (incluyendo seres humanos), y abarca fluidos, sólidos, tejidos y gases. En algunas realizaciones de esta invención, las muestras biológicas incluyen líquido cefalorraquídeo (LCR), serosidad,

orina, saliva, sangre y hemoderivados tales como plasma, suero y similares. Sin embargo, estos ejemplos no deben interpretarse como limitativos de los tipos de muestras que pueden encontrar uso con la presente invención.

5 Tal como se usan en el presente documento, los términos "huésped" y "sujeto" se refieren a cualquier animal, incluyendo, pero sin limitarse a, seres humanos y animales no humanos (por ejemplo, perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, aves de corral, peces, crustáceos, etc.) que se estudia,
10 analiza, somete a prueba, diagnóstica o trata. Tal como se usan en el presente documento, los términos "huésped", "sujeto" y "paciente" se usan de manera intercambiable, a menos que se indique de otra forma.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" (o "anticuerpos") se refiere a cualquier inmunoglobulina que se une específicamente a un determinante antigénico, y específicamente se une a proteínas idénticas o estructuralmente relacionadas al determinante antigénico que estimuló su producción. Por tanto, los anticuerpos pueden ser
20 útiles en ensayos para detectar el antígeno que estimuló su producción. Los anticuerpos monoclonales se derivan a partir de un único clon de linfocitos B (es decir, células B), y son generalmente homogéneos en cuanto a la estructura y especificidad de antígeno. Los anticuerpos policlonales se
25 originan a partir de muchos clones diferentes de células que producen anticuerpos, y por tanto, son heterogéneos en cuanto a su estructura y especificidad de epítipo, pero todos reconocen el mismo antígeno. En algunas realizaciones, se usan anticuerpos monoclonales y policlonales como preparaciones en
30 bruto, mientras que en realizaciones preferidas, se purifican estos anticuerpos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se usan anticuerpos policlonales contenidos en antisuero en bruto. Además, se pretende que el término "anticuerpo" abarque cualquier inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, etc.) obtenida a partir de cualquier fuente (por ejemplo,
35

seres humanos, roedores, primates no humanos, lagomorfos, caprinos, bovinos, equinos, ovinos, etc.).

Tal como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se usa con referencia a cualquier sustancia que puede reconocerse por un anticuerpo. Se pretende que este término abarque cualquier antígeno e "inmunógeno" (es decir, una sustancia que induce la formación de anticuerpos). Por tanto, en una reacción inmunogénica, se producen anticuerpos en respuesta a la presencia de un antígeno o parte de un antígeno. Los términos "antígeno" e "inmunógeno" se usan para referirse a una macromolécula individual o a una población homogénea o heterogénea de macromoléculas antigénicas. Se pretende que los términos antígeno e inmunógeno abarquen moléculas de proteína o partes de moléculas de proteína, que contienen uno o más epítomos. En muchos casos, los antígenos también son inmunógenos, por tanto el término "antígeno" a menudo se usa intercambiablemente con el término "inmunógeno". En algunas realizaciones preferidas, se usan sustancias inmunogénicas como antígenos en ensayos para detectar la presencia de anticuerpos apropiados en el suero de un animal inmunizado.

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "fragmento de antígeno" y "parte de un antígeno" y similares se usan con referencia a una parte de un antígeno. Los fragmentos o partes de antígenos normalmente oscilan en cuanto al tamaño, desde un pequeño porcentaje del antígeno entero hasta un gran porcentaje, pero no el 100%, del antígeno. Sin embargo, en situaciones en las que se especifica "al menos una parte" de un antígeno, se contempla que también puede estar presente el antígeno entero (por ejemplo, no se pretende que la muestra sometida a prueba contenga sólo una parte de un antígeno). En algunas realizaciones, los fragmentos de antígeno y/o partes del mismo, comprenden un "epítomo" reconocido por un anticuerpo, mientras en otras realizaciones estos fragmentos y/o partes no comprenden un

epítipo reconocido por un anticuerpo. Además, en algunas realizaciones, los fragmentos de antígeno y/o partes no son inmunogénicos, mientras que en realizaciones preferidas, los fragmentos de antígeno y/o partes son inmunogénicos.

5 Las expresiones "determinante antigénico" y "epítipo" tal como se usan en el presente documento se refieren a esa parte de un antígeno que entra en contacto con una región variable de anticuerpo particular. Cuando se usa una proteína o fragmento (o parte) de una proteína para inmunizar un animal huésped, es probable que varias regiones de la proteína induzcan la producción de anticuerpos que se unen específicamente a una estructura tridimensional o región dada en la proteína (estas regiones y/o estructuras se denominan "determinantes antigénicos"). En algunas ocasiones, los
10 determinantes antigénicos compiten con el antígeno intacto (es decir, el "inmunógeno" usado para provocar la respuesta inmunitaria) para unirse a un anticuerpo.

15 Las expresiones "unión específica" y "unirse específicamente" cuando se usan con referencia a la interacción entre un anticuerpo y un antígeno describen una interacción que depende de la presencia de una estructura particular (es decir, el determinante antigénico o epítipo) en el antígeno. En otras palabras, el anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína única para el antígeno, en lugar de unirse a todas las proteínas en general (es decir, unión no específica).
20

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "inmunoensayo" se refiere a cualquier ensayo que usa al menos un anticuerpo específico para la detección o cuantificación de un antígeno. Los inmunoensayos incluyen, pero no se limitan a, inmunotransferencias de tipo Western, ELISA, radioinmunoensayos y ensayos de inmunofluorescencia.
30

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "ELISA" se refiere a ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (o EIA). En la técnica se conocen varios métodos de

ELISA y aplicaciones, y se describen en muchas referencias (véase, por ejemplo, Crowther, "Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)", en Molecular Biomethods Handbook, Rapley et al. (eds.), págs. 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, Cap. 11, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1994)). Además, hay varios sistemas de prueba de ELISA disponibles comercialmente.

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "reactivo indicador", "molécula indicadora", "sustrato de detección" y "reactivo de detección" se usan con referencia a reactivos que permiten la detección y/o cuantificación de un anticuerpo unido a un antígeno. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el reactivo indicador es un sustrato colorimétrico para una enzima que se ha conjugado a un anticuerpo. La adición de un sustrato adecuado al conjugado anticuerpo-enzima da como resultado la producción de una señal fluorimétrica o colorimétrica (por ejemplo, tras la unión del anticuerpo conjugado al antígeno de interés). Otros reactivos indicadores incluyen, pero no se limitan a, compuestos radioactivos. Esta definición también abarca el uso de compuestos a base de biotina y avidina (por ejemplo, incluyendo, pero sin limitarse a, neutravidina y estreptavidina) como parte del sistema de detección.

Tal como se usa en el presente documento, el término "señal" se usa generalmente con referencia a cualquier procedimiento detectable que indica que ha ocurrido una reacción, por ejemplo, la unión del anticuerpo al antígeno. Se contempla que las señales en forma de productos/reactivos colorimétricos, fluorimétricos o radioactividad encontrarán todas un uso con la presente invención. En diversas realizaciones de la presente invención, la señal se evalúa cualitativamente, mientras que en realizaciones alternativas, la señal se evalúa cuantitativamente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "soporte sólido" se usa con referencia a cualquier material estacionario o sólido al que se unen reactivos tales como anticuerpos, antígenos y otros componentes de prueba. Por ejemplo, en un método de ELISA, los pocillos de placas de microtitulación proporcionan soportes sólidos. Otros ejemplos de soportes sólidos incluyen láminas portaobjetos de microscopio, cubreobjetos, perlas, partículas, frascos de cultivo celular, así como muchos otros artículos adecuados.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de una composición suficiente para proporcionar resultados deseados o beneficiosos. Una cantidad efectiva puede administrarse y/o combinarse con otro material en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones y no pretende limitarse a una formulación o vía de administración particular.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "administración" y "administrar" se refieren al acto de proporcionar un fármaco, profármaco u otro agente, o tratamiento terapéutico (por ejemplo, un agente identificado como un modulador de adherencia bacteriana a mucosidad mediante el uso de los métodos de la presente invención) a un sujeto (por ejemplo, un sujeto o células, tejido y órganos *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*). Vías de administración a modo de ejemplo pueden ser a través de los ojos (oftálmica), boca (oral), piel (tópica o transdérmica), nariz (nasal), pulmones (inhalada), mucosidad oral (bucal), oído, rectal, vaginal, mediante inyección (por ejemplo, vía intravenosa, vía subcutánea, vía intratumoral, vía intraperitoneal, etc.) y similares.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "co-administración" y "co-administrar" se refieren a la administración de al menos dos agentes (por ejemplo, un agente identificado como un modulador de adherencia bacteriana a mucosidad mediante el uso de los métodos de la presente

invención y uno o más otros agentes (por ejemplo, una terapia conocida para tratar trastornos de bacterias patogénicas) a un sujeto y/o material (por ejemplo, un producto alimenticio (por ejemplo, alimento para animales))). En algunas realizaciones, la co-administración de dos o más agentes o terapias es concurrente. En otras realizaciones, se administra un primer agente/terapia antes que un segundo agente/terapia. Los expertos en la técnica entienden que las formulaciones y/o vías de administración de los diversos agentes o terapias usados pueden variar. La dosificación apropiada para la co-administración puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica. En algunas realizaciones, cuando se co-administran agentes o terapias, los agentes o terapias respectivos se administran y/o formulan en dosificaciones inferiores a las apropiadas para su administración y/o formulación solos. Por tanto, la co-administración es especialmente deseable en realizaciones en las que la co-administración/co-formulación de los agentes o terapias disminuye la dosificación requerida de un(os) agente(s) posiblemente dañino(s) (por ejemplo, tóxico(s)), y/o cuando la co-administración de dos o más agentes da como resultado la sensibilización de un sujeto frente a efectos beneficiosos de uno de los agentes mediante co-administración del otro agente.

Tal como se usan en el presente documento, "tratamiento de poscolonización" o "posaplicación" se refieren al tratamiento después de la eliminación de la enfermedad infecciosa.

Tal como se usan en el presente documento, la "preaplicación" y/o "tratamiento profiláctico" se refieren a tratamientos usados como medida preventiva (por ejemplo, para prevenir infección y/o enfermedad).

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "enfermedad" y "estado patológico" se usan intercambiabilmente para describir un estado, signos y/o síntomas que se asocian con cualquier deterioro del estado

normal de un animal vivo o de cualquiera de sus órganos o tejidos que interrumpe o modifica el rendimiento de las funciones normales, y puede ser una respuesta a factores medioambientales (tales como malnutrición, peligros industriales o el clima), a agentes infecciosos específicos (tales como gusanos, bacterias o virus), a defecto inherente del organismo (tales como diversas anomalías genéticas, o a combinaciones de estos y otros factores).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "padeciendo la enfermedad" se refiere a un sujeto (por ejemplo, un sujeto animal o humano) que está experimentando una enfermedad particular. No se pretende que la presente invención se limite a ningún síntoma o signo particular, ni enfermedad. Por tanto, se pretende que la presente invención abarque sujetos que están experimentando cualquier intervalo de la enfermedad (por ejemplo, desde la manifestación subclínica hasta la enfermedad desarrollada) en el que el sujeto muestra al menos algunos de los indicios (por ejemplo, signos y síntomas) asociados con la enfermedad particular.

Tal como se usa en el presente documento, el término "tóxico" se refiere a cualquier efecto dañino o perjudicial en un sujeto, una célula o un tejido en comparación con la misma célula o tejido antes de la administración de la sustancia tóxica.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "componente de alimento funcional" o "aditivo de alimento funcional" se refiere a la combinación de un principio activo (por ejemplo, un agente identificado como un modulador de adherencia bacteriana con mucosidad) con un portador, inerte o activo, haciendo que la composición sea especialmente adecuada para su uso terapéutico o de diagnóstico *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Tal como se usa en el presente documento, el término "portador" se refiere a cualquier portador convencional incluyendo, pero sin limitarse a, solución salina tamponada

con fosfato, agua, emulsiones (por ejemplo, tales como emulsiones de aceite/agua o agua/aceite), y diversos tipos de agentes humectantes, cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, laurilsulfato de sodio, agentes que retrasan la absorción e isotónicos, disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón), mazorca de maíz, granos de destilación secos, salvado de trigo, levadura (por ejemplo, levadura entera usada), componentes de levadura (por ejemplo, extracto de pared celular de levadura), y similares. Las composiciones también pueden incluir estabilizadores y conservantes. Para ejemplos de portadores, estabilizadores y adyuvantes, (véase por ejemplo, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. (1975), incorporado en el presente documento como referencia).

Tal como se usa en el presente documento, el término "digerir" se refiere a la conversión de alimento, piensos u otros compuestos orgánicos en una forma que puede absorberse; a ablandar, descomponer o degradar mediante calor y humedad o acción química.

Tal como se usa en el presente documento, "sistema digestivo" se refiere a un sistema (incluyendo sistema gastrointestinal) en el que puede producirse o se produce digestión.

Tal como se usa en el presente documento, el término "piensos" se refiere a material(es) que se consume(n) por animales y proporciona(n) energía y/o nutrientes a la dieta del animal. Los ejemplos de piensos incluyen, pero no se limitan a, ración mezclada total (TMR), forraje(s), gránulo(s), concentrado(s), premezcla(s), coproducto(s), grano(s), grano(s) de destilación, melaza, fibra(s), pasto(s), césped(es), heno, semilla(s), hojas, harina, producto(s) soluble(s) y suplemento(s).

Tal como se usa en el presente documento, el término "animal" se refiere a aquellos del reino *Animalia*. Esto

incluye, pero no se limita a, ganado, animales de granja, animales domésticos, mascotas, animales de agua dulce y marinos y animales salvajes.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier sal (por ejemplo, obtenida mediante reacción con un ácido o una base) de un compuesto de la presente invención (por ejemplo, que comprende un componente de pared celular o célula de levadura viable de la invención) que se tolera fisiológicamente en el sujeto objetivo (por ejemplo, un mamífero, seres humanos, especies de aves, bovinas, porcinas, equinas, ovinas, caprinas, caninas, felinas, de peces, camélidas, roedoras así como sujetos peces y moluscos, y/o órganos, tejidos o células *in vivo* o *ex vivo*). "Sales" de los compuestos de la presente invención pueden derivarse de ácidos y bases orgánicos o inorgánicos. Los ejemplos de ácidos incluyen, pero no se limitan a, ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, 15 tolueno-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, sulfónico, naftaleno-2-sulfónico, bencenosulfónico, y similares. Otros ácidos, tales como oxálico, aunque no son en sí mismos farmacéuticamente aceptables, pueden emplearse en la preparación de sales útiles como productos intermedios para obtener los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. 20 25

Ejemplos de bases incluyen, pero no se limitan a, hidróxidos de metales alcalinos (por ejemplo, sodio), 30 hidróxidos de metales alcalinotérreos (por ejemplo, magnesio), amoníaco y compuestos de fórmula NW_4^+ , en la que W es alquilo C_{1-4} , y similares.

Los ejemplos de sales incluyen, pero no se limitan a: acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, 35 bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanforato,

alcanforsulfonato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, flucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, cloruro, bromuro, yoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, undecanoato, y similares. Otros ejemplos de sales incluyen aniones de los compuestos de la presente invención combinados con un catión adecuado tal como Na^+ , NH_4^+ y NW_4^+ (en el que W es un grupo alquilo C_{1-4}), y similares. Para uso terapéutico, se contempla que sales de los compuestos de la presente invención son farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, las sales de ácidos y bases que no son farmacéuticamente aceptables también pueden encontrar uso, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable.

Para uso terapéutico y/o profiláctico, se contempla que las sales de los compuestos de la presente invención son farmacéuticamente aceptables. Sin embargo, las sales de ácidos y bases que no son farmacéuticamente aceptables también pueden encontrar uso, por ejemplo, en la preparación o purificación de un compuesto farmacéuticamente aceptable.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cultivo celular" se refiere a cualquier cultivo de células *in vitro*. Dentro de este término se incluyen líneas celulares continuas (por ejemplo, con un fenotipo inmortal), cultivos celulares primarios, líneas celulares transformadas, líneas celulares finitas (por ejemplo, células no transformadas), y cualquier otra población celular mantenida *in vitro*.

Tal como se usa, el término "eucariota" se refiere a organismos que pueden distinguirse de "procariotas". Se pretende que el término abarque todos los organismos con células que muestran las características usuales de eucariotas, tales como la presencia de un núcleo verdadero

unido por una membrana nuclear, dentro de la que se encuentran los cromosomas, la presencia de orgánulos unidos a la membrana, y otras características comúnmente observadas en organismos eucariotas. Por tanto, el término incluye, pero no se limita a, organismos tales como hongos, protozoos y animales (por ejemplo, seres humanos).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "in vitro" se refiere a un entorno artificial y a procesos o reacciones que se producen dentro de un entorno artificial. Los entornos *in vitro* pueden consistir en, pero no se limitan a, tubos de ensayo y cultivo celular. La expresión "in vivo" se refiere al entorno natural (por ejemplo, un animal o una célula) y a procesos o reacciones que se producen dentro de un entorno natural.

Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra" se usa en su sentido lo más amplio. En un sentido, pretende incluir un espécimen o cultivo obtenido a partir de cualquier fuente, así como muestras biológicas y medioambientales. Pueden obtenerse muestras biológicas a partir de animales (incluyendo seres humanos) y abarcan fluidos, sólidos, tejidos y gases. Las muestras biológicas incluyen hemoderivados, tales como plasma, suero y similares. Las muestras medioambientales incluyen material medioambiental tal como material de la superficie, tierra, agua, cristales y muestras industriales. Sin embargo, tales ejemplos no deben interpretarse como limitativos de los tipos de muestra que pueden aplicarse a la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, el término "kit" se refiere a un conjunto envasado de materiales.

Tal como se usa en el presente documento, "moduladores antiadherencia" y/o "moduladores antiadhesión" se refieren a moduladores que bloquean la adherencia (por ejemplo, bloquean que un compuesto se adhiera a la fimbria, y/o bloquean la adherencia de bacterias a células epiteliales de la mucosidad y/o a otros tipos de células).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se ha mostrado que ensayos de unión radioactiva miden la adherencia bacteriana a la mucosidad intestinal, y que determinados agentes previenen eficazmente tal adherencia (véase, por ejemplo, Conway, et al., 1990, Infection and Immunity 58:3178-3182; incorporado en el presente documento como referencia en su totalidad). En particular, ensayos de unión radioactiva que se ha mostrado que miden la adherencia bacteriana a la mucosidad intestinal han mostrado además el efecto de Bio-Mos, una manoproteína derivada de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*, sobre la inhibición de la adherencia bacteriana. Sin embargo, no hay ningún método de rutina no radioactivo disponible para detectar, identificar y medir la adherencia bacteriana a mucosidad. Los métodos y composiciones de la presente invención superan tales limitaciones proporcionando métodos no radioactivos para detectar, identificar y medir la adherencia bacteriana a mucosidad.

En particular, la presente invención proporciona un inmunoensayo preciso y simple para medir la adherencia bacteriana a la mucosidad y para someter a prueba el efecto de productos que modulan (por ejemplo, inhiben, promueven) la adherencia. En algunas realizaciones, el inmunoensayo es una inmunotransferencia de tipo Western. En algunas realizaciones, el inmunoensayo es un radioinmunoensayo. En algunas realizaciones, el inmunoensayo es un ensayo de inmunofluorescencia. En algunas realizaciones, el inmunoensayo es un ensayo basado en ELISA. Un método basado en ELISA es una alternativa atractiva con respecto a un ensayo radioactivo debido a la flexibilidad en el uso de diferentes combinaciones de anticuerpos primarios y secundarios y diversos sistemas de detección colorimétrica para diferentes especies microbianas. Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos basados en ELISA para detectar e identificar la adherencia

bacteriana a mucosidad (por ejemplo, revestimiento mucoso intestinal).

Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un ensayo colorimétrico, no radioactivo para monitorizar y/o caracterizar la interacción (por ejemplo, de unión, fijación, afinidad, etc.) entre mucosidad y células bacterianas. En algunas realizaciones, el ensayo no radioactivo es tan sensible como y/o más sensible que un ensayo radioactivo utilizado para monitorizar y/o caracterizar de manera similar. En algunas realizaciones, se usa un ensayo colorimétrico, no radioactivo de la invención para monitorizar y/o caracterizar la capacidad de uno o más agentes de prueba para alterar (por ejemplo, inhibir y/o potenciar) la interacción de células bacterianas (por ejemplo, unión, fijación, afinidad, etc.) con mucosidad.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para monitorizar y/o caracterizar la interacción (por ejemplo, unión, fijación, afinidad, etc.) entre mucosidad y células bacterianas (por ejemplo, tal como se describe en los ejemplos 1-16). En algunas realizaciones, el ensayo se realiza a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, el ensayo se realiza a 37°C. En algunas realizaciones, el ensayo se optimiza tal como se describe en los ejemplos 2-15. En algunas realizaciones, se recubren placas (por ejemplo, placas de microtitulación (por ejemplo, placas MAXISORP (por ejemplo, que contienen 6, 12, 24, 48, 96, 128 o más pocillos))) con mucosidad. La presente invención no se limita por el tipo, fuente o cantidad de mucosidad. En algunas realizaciones, la mucosidad utilizada es mucosidad de animal. En algunas realizaciones, la mucosidad se obtiene a partir de un cerdo, un pollo, una vaca, un equino, un canino, un felino u otro tipo de animal. En algunas realizaciones, la mucosidad se obtiene a partir de una o más partes del tubo digestivo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la mucosidad

se obtiene a partir del íleon (por ejemplo, íleon proximal, íleon distal, etc.), duodeno, ciego, colon y/u otra parte del tubo digestivo. La presente invención no se limita por la cantidad de mucosidad utilizada para recubrir las placas (por ejemplo, dependiendo del número y/o tamaño de los pocillos en la placa). En algunas realizaciones, la mucosidad se diluye en un tampón de recubrimiento y entonces se utiliza para recubrir las placas. En algunas realizaciones, el tampón de recubrimiento es una disolución que comprende 1 litro de agua en la que se han disuelto 1,6 g de Na_2CO_3 , 2,94 g de NaHCO_3 , y 0,2 g de Na-azida y se ha ajustado el pH a 9,6, o un tampón similar. En algunas realizaciones, se usa un tampón de recubrimiento que comprende entre aproximadamente 0,001 - 0,2 mg de proteína de mucosidad por ml de tampón de recubrimiento para recubrir cada pocillo en la placa, aunque pueden usarse cantidades mayores (por ejemplo, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1,0 mg/ml o más) o menores (por ejemplo, 0,0005 mg/ml o menos). En algunas realizaciones, se usan aproximadamente 300 μl de la suspensión de recubrimiento para recubrir cada pocillo, aunque pueden usarse volúmenes mayores (por ejemplo, 400 μl , 500 μl , 600 μl , 700 μl o más) o menores (por ejemplo, 200 μl , 100 μl , 50 μl , 25 μl o menos) de disolución de recubrimiento (por ejemplo, dependiendo del tamaño del pocillo, cantidad de señal deseada, u otros factores (por ejemplo, adherencia bacteriana)). Una vez que añadida la disolución de recubrimiento a los pocillos, se deja que la mucosidad recubra cada pocillo durante un periodo de tiempo (por ejemplo, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, o más) a una temperatura constante (por ejemplo, 4°C, temperatura ambiente, o más caliente (por ejemplo, 37°C)). En algunas realizaciones, las placas se recubren durante incubación (por ejemplo, para impedir la evaporación de la disolución de

recubrimiento). En algún momento durante el periodo de recubrimiento, se prepara un agente de prueba (por ejemplo, que debe someterse a prueba para determinar su capacidad para alterar (por ejemplo, inhibir y/o potenciar) la unión bacteriana a la mucosidad). Se diluye el agente de prueba en cualquier tampón apropiado (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS) (por ejemplo, una disolución de PBS generada disolviendo 8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,4 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g de KH_2PO_4 en 1 L de agua y ajustando a pH 7,4). La presente invención no se limita por el tipo de agente de prueba. De hecho, puede monitorizarse y/o caracterizarse una variedad de agentes de prueba usando métodos de la invención incluyendo, pero sin limitarse a, los descritos en el presente documento.

Tras completarse el recubrimiento, se retira la disolución de recubrimiento de los pocillos (por ejemplo, sin mezclar el contenido de los pocillos) y se lava cada pocillo con un volumen apropiado (por ejemplo, 100 ml, 200 ml, 300 ml, 400 ml o más) de disolución de lavado (por ejemplo, PBS).

Se preparan bacterias que van a monitorizarse y/o caracterizarse para determinar su interacción con mucosidad recogiendo las bacterias en condiciones que no alteran la integridad de las bacterias. La presente invención no se limita a ningún tipo particular de bacterias ni a ninguna fase de crecimiento particular de las bacterias. De hecho, puede monitorizarse y/o caracterizarse una variedad de bacterias en un ensayo de la invención incluyendo, pero sin limitarse a, los tipos de bacterias descritos en el presente documento. Una vez recogidas (por ejemplo, mediante centrifugación para sedimentar las células bacterianas), se resuspenden las bacterias en tampón (por ejemplo, PBS) hasta una concentración deseada dependiendo de cuántas bacterias se desean por pocillo. En algunas realizaciones, el número de bacterias añadidas por pocillo es de aproximadamente 10^7 , aunque pueden añadirse más (por ejemplo, 10^8 , 10^9 , 10^{10}) o menos (por

ejemplo, 10^6 , 10^5 , 10^4) bacterias a cada pocillo. Tras el lavado final de las placas, se añaden bacterias a los pocillos. En algunas realizaciones, se añade una disolución de agente de prueba a la suspensión de bacterias justo antes de añadirlas a los pocillos. La cantidad de agente de prueba y la cantidad de células pueden variarse tal como se describe en el presente documento. Una vez añadidas a los pocillos, se deja que las bacterias y/o bacterias más agente de prueba se incuben en los pocillos durante un periodo de tiempo establecido (por ejemplo, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas o más). Tras la incubación, se lavan los pocillos (por ejemplo, una, dos, tres o más veces con PBS). Tras el lavado, se añade un tampón de bloqueo (por ejemplo, suero bovino fetal (FBS), albúmina sérica bovina (BSA), leche u otro agente de bloqueo adecuado (por ejemplo, FBS al 10% diluido en PBS) a cada pocillo (por ejemplo, usando el mismo volumen de tampón de bloqueo que se utilizó para recubrir los pocillos con mucosidad). Se incuba la disolución de bloqueo en los pocillos durante un periodo de tiempo establecido (por ejemplo, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas o más) a una temperatura constante (por ejemplo, 4°C , temperatura ambiente, o más caliente (por ejemplo, 37°C)). Se retira el tampón de bloqueo y entonces se añade un anticuerpo primario (por ejemplo, con afinidad específica por las bacterias que están monitorizándose y/o caracterizándose) a los pocillos. Se diluye el anticuerpo primario (por ejemplo, a 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000 o más) en el tampón de bloqueo. El volumen de anticuerpo primario diluido que debe añadirse a los pocillos es de aproximadamente 100 ml a aproximadamente 400 ml (por ejemplo, 200 ml) y se incuba en los pocillos durante un periodo de tiempo establecido (por ejemplo, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas o más) a una temperatura constante (por ejemplo, 4°C , temperatura ambiente, o más caliente (por ejemplo, 37°C)). La presente invención no

se limita por el anticuerpo primario usado. De hecho, puede usarse cualquier anticuerpo con afinidad específica por el tipo de bacterias que están monitorizándose y/o caracterizándose. En algunas realizaciones, el anticuerpo primario es un anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo primario es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo primario es un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo primario es un anticuerpo conjugado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo primario está conjugado con biotina. En algunas realizaciones, el anticuerpo primario es un anticuerpo policlonal conjugado con biotina frente a *E. coli*. Tras la incubación del anticuerpo primario, se lavan los pocillos (por ejemplo, una, dos, tres o más veces) usando un tampón de lavado (por ejemplo, PBS). Se retira el tampón de lavado y entonces se añade un anticuerpo secundario (por ejemplo, con afinidad específica por el anticuerpo primario) a los pocillos. También se diluye el anticuerpo secundario (por ejemplo, a 1:500, 1:1000, 1:2500, 1:5000 o más) en el tampón de bloqueo. La presente invención no se limita al tipo de anticuerpo secundario usado. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario es un anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario es un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario es un anticuerpo conjugado. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario está conjugado con estreptavidina. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario está conjugado con una enzima (por ejemplo, peroxidasa, fosfatasa, etc.). El volumen de anticuerpo secundario diluido que debe añadirse a los pocillos es de aproximadamente 100 ml a aproximadamente 400 ml (por ejemplo, 200 ml) y se incuba en los pocillos durante un periodo de tiempo establecido (por ejemplo, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas,

aproximadamente 3 horas o más) a una temperatura constante (por ejemplo, 4°C, temperatura ambiente, o más caliente (por ejemplo, 37°C)). Tras la incubación, se lavan los pocillos (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o más veces) con un
5 tampón de lavado (por ejemplo, PBS). Tras el último lavado, se añade un sustrato colorimétrico a los pocillos. La presente invención no se limita por el tipo de sustrato usado. Sustratos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (por ejemplo, para
10 anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa), (fosfato de p-nitrofenilo (pNPP) (por ejemplo, para anticuerpos conjugados con fosfatos), etc.). Se desarrolla color en los pocillos y se detecta y/o cuantifica (por ejemplo, usando un espectrofotómetro). El desarrollo de color puede detenerse
15 mediante la adición de un tampón ácido (por ejemplo, H₂SO₄ 2 M) en cualquier momento (por ejemplo, para impedir una producción de señal de color intensa (por ejemplo, con el fin de cuantificar la fijación bacteriana)).

La presente invención no se limita a un método basado en
20 ELISA particular para detectar, identificar y medir la adherencia bacteriana a mucosidad. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos en los que 1) se recubren placas configuradas para su uso en ensayos basados en ELISA con una muestra de mucosidad, 2) se aplican bacterias a las placas
25 recubiertas con mucosidad, 3) se aplican anticuerpos primarios dirigidos frente a las bacterias, 4) se aplican anticuerpos secundarios dirigidos frente a los anticuerpos primarios, 5) se aplica un sustrato líquido, y 6) se mide la adherencia bacteriana. En algunas realizaciones, se aplican etapas de
30 lavado entre una o más de las etapas. En algunas realizaciones, se aplica disolución de bloqueo entre una o más de las etapas. Los métodos no se limitan a tipos o clases particulares de muestras de mucosidad, bacterias, anticuerpos primarios, anticuerpos secundarios, sustrato líquido y/o
35 técnicas para medir la adherencia bacteriana.

Los métodos para detectar, identificar y medir la adherencia bacteriana a mucosidad no se limitan a un tipo particular de bacterias. De hecho, puede usarse cualquier tipo de bacterias en la presente invención. Ejemplos de bacterias incluyen, pero no se limitan a, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Aquificae*, *Bacteroidetes/Chlorobi*, *Chlamydiae/Verrucomicrobia*, *Chloroflexi*, *Chrysiogenetes*, *Cyanobacteria*, *Deferribacteres*, *Deinococcus-Thertnus*, *Dictyoglomi*, *Fibrobacteres*, *Firmicutes*, *Fusobacterias*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Proteobacterias*, *Spirochaetes*, *Synergistetes*, *Tenericutes*, *Thermodesulfobacteria*, y *Thermotogae*. En algunas realizaciones, las bacterias son bacterias patogénicas tales como, por ejemplo, *Bordetella* (por ejemplo, *Bordetella pertussis*), *Borrelia* (por ejemplo, *Borrelia burgdorferi*), *Brucella* (por ejemplo, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*), *Campylobacter* (por ejemplo, *Campylobacter jejuni*), *Chlamydia* (por ejemplo, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia trachomatis*), *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*), *Corynebacterium* (por ejemplo, *Corynebacterium diphtheriae*), *Enterococcus* (por ejemplo, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecum*), *Escherichia* (por ejemplo, *Escherichia coli*), *Francisella* (por ejemplo, *Francisella tularensis*), *Haemophilus* (por ejemplo, *Haemophilus influenzae*), *Helicobacter* (por ejemplo, *Helicobacter pylori*), *Legionella* (por ejemplo, *Legionella pneumophila*), *Leptospira* (por ejemplo, *Leptospira interrogans*), *Listeria* (por ejemplo, *Listeria monocytogenes*), *Mycobacterium* (por ejemplo, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*), *Mycoplasma* (por ejemplo, *Mycoplasma pneumoniae*), *Neisseria* (por ejemplo, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*), *Pseudomonas* (por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa*), *Rickettsia* (por ejemplo, *Rickettsia rickettsii*), *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*), *Shigella* (por

ejemplo, *Shigella sonnet*), *Staphylococcus* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*), *Streptococcus* (por ejemplo, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*), *Treponema* (por ejemplo, *Treponema pallidum*), *Vibrio* (por ejemplo, *Vibrio cholerae*), y *Yersinia* (por ejemplo, *Yersinia pestis*). En algunas realizaciones, las bacterias se seleccionan de cepas particulares de *E. Coli* que se sabe que tienen una fuerte adherencia a mucosidad de cerdo (por ejemplo, *E. coli* ALI84 y/o ALI446).

La presente invención no se limita a una manera particular de preparar y/o usar bacterias en los métodos basados en ELISA para detectar, identificar y medir adherencia bacteriana a mucosidad. En algunas realizaciones, las bacterias se inactivan antes de su uso (por ejemplo, para fines de almacenamiento) y se activan durante las pruebas. Los métodos no se limitan a un método particular para inactivar las bacterias. Ejemplos de inactivación de las bacterias incluyen, pero no se limitan a, congelar las bacterias, suspender las bacterias en etanol, suspender las bacterias en glutaraldehído, suspender las bacterias en formalina, irradiar las bacterias con irradiación ultravioleta, suspender las bacterias en dimetilsulfóxido, y calentar las bacterias antes de enfriar para su almacenamiento. Los métodos no se limitan a una manera particular de activar las bacterias inactivadas para fines de pruebas. En algunas realizaciones, las bacterias se activan (por ejemplo, se recogen) mediante técnicas de centrifugación.

Los métodos no se limitan a una manera particular de inactivación de bacterias con etanol. En algunas realizaciones, se hacen crecer las bacterias y se transfieren en un medio reciente (por ejemplo, inóculos al 10%) antes de la inactivación (por ejemplo, un día antes de la inactivación) con etanol. A continuación, se inactivan las bacterias y se conservan añadiendo etanol directamente al cultivo bacteriano

(por ejemplo, hasta una concentración final de aproximadamente el 40% vol/vol (por ejemplo, el 20% vol/vol; el 30% vol/vol; el 33% vol/vol; el 35% vol/vol; el 37% vol/vol; el 40% vol/vol; el 42% vol/vol; el 45% vol/vol; el 50% vol/vol; el 60% vol/vol)). En algunas realizaciones, se almacenan bacterias inactivadas con etanol (por ejemplo, hasta una concentración final de aproximadamente el 40% vol/vol) a aproximadamente +4°C (por ejemplo, 2°C; 3°C; 4°C; 5°C; 6°C). En alguna realización, se activan (por ejemplo, se recogen) bacterias inactivadas con etanol (por ejemplo, hasta una concentración final de aproximadamente el 40% vol/vol) (por ejemplo, almacenadas a aproximadamente +4°C) mediante centrifugación. En algunas realizaciones, se suspenden las bacterias en solución salina tamponada con fosfato (por ejemplo, PBS) (por ejemplo, 8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,4 g de Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,2 g de KH₂PO₄, ad. 1000 ml H₂O MilliQ, pH 7,4).

Los métodos para detectar, identificar y medir adherencia bacteriana a mucosidad no se limitan a un tipo particular de mucosidad. De hecho, puede usarse cualquier tipo de mucosidad en la presente invención. En algunas realizaciones, la mucosidad usada procede de un cerdo (por ejemplo, mucosidad de colon de cerdo) (por ejemplo, mucosidad de intestino de cerdo (por ejemplo, raspada del íleon proximal de un cerdo de aproximadamente un año de edad)).

La presente invención no se limita a una manera particular de preparar y/o usar muestras de mucosidad (por ejemplo, mucosidad procedente de un cerdo) en los métodos basados en ELISA para detectar, identificar y medir adherencia bacteriana a mucosidad. En algunas realizaciones, se suspenden las muestras de mucosidad con un tampón de recubrimiento. Los métodos no se limitan a una configuración particular para el tampón de recubrimiento. En algunas realizaciones, el tampón de recubrimiento comprende 1,6 g de Na₂CO₃ (anhidro), 2,94 g de NaHCO₃, 0,2 g de Na-azida, 1 l de H₂O con pH 9,6 (mezclando los componentes acaba siendo de 9,7).

En algunas realizaciones, se recubren las muestras de mucosidad sobre placas (por ejemplo, pocillos) (por ejemplo, placas de 96 pocillos) (por ejemplo, placas de 96 pocillos MaxiSorp) configuradas para su uso en ensayos basados en ELISA. Las muestras de mucosidad no se limitan a una manera particular de recubrirlas sobre placas configuradas para su uso en ensayos basados en ELISA. En algunas realizaciones, las muestras de mucosidad se recubren directamente sobre las placas justo antes de las pruebas. En algunas realizaciones, las muestras de mucosidad se recubren previamente sobre las placas para permitir un almacenamiento a largo plazo antes de las pruebas. Los métodos no se limitan a métodos particulares de recubrimiento previo de placas configuradas para su uso en ensayos basados en ELISA con muestras de mucosidad (por ejemplo, mucosidad procedente de intestino de cerdo). En algunas realizaciones, el recubrimiento previo de placas configuradas para su uso en ensayos basados en ELISA con muestras de mucosidad se logra mediante el recubrimiento de las placas con las muestras de mucosidad y posteriormente la congelación de las placas recubiertas. En algunas realizaciones, el recubrimiento previo de placas configuradas para su uso en ensayos basados en ELISA con muestras de mucosidad se logra mediante el recubrimiento de las placas con las muestras de mucosidad y posteriormente el secado al aire de las placas recubiertas. Los métodos no se limitan a una manera particular de rehidratar muestras de mucosidad previamente recubiertas sobre placas configuradas para su uso en ensayos basados en ELISA. En algunas realizaciones, la rehidratación se logra mediante la exposición de las muestras a solución salina tamponada con fosfato (por ejemplo, PBS) (por ejemplo, 8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,4 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g de KH_2PO_4 , ad. 1000 ml de H_2O MilliQ, pH 7,4).

Los métodos para detectar, identificar y medir adherencia bacteriana a mucosidad no se limitan a un tipo particular de anticuerpo primario. En algunas realizaciones,

los anticuerpos primarios se dirigen frente a las bacterias cuya adherencia a la mucosidad está sometándose a prueba. En algunas realizaciones, el anticuerpo primario es un anticuerpo policlonal conjugado con HRP frente a los serotipos antigénicos O y K de *E. coli* (número de catálogo de Acris BP2022HRP). En algunas realizaciones, el anticuerpo primario es un anticuerpo policlonal frente a los serotipos antigénicos O y K de *E. coli* (número de catálogo de Acris BP2022). En algunas realizaciones, el anticuerpo primario es un anticuerpo policlonal conjugado con biotina frente a los serotipos antigénicos O y K de *E. coli* (número de catálogo de Acris BP 1021B).

Los métodos para detectar, identificar y medir adherencia bacteriana a mucosidad no se limitan a un tipo particular de anticuerpo secundario. En algunas realizaciones, los anticuerpos secundarios están configurados para detectar la unión del anticuerpo primario con bacterias unidas a mucosidad. Como tal, en algunas realizaciones, los anticuerpos secundarios se dirigen frente al anticuerpo primario. En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario es un anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-HRP purificado por afinidad (número de catálogo de Acris R1317HRP). En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario es un anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-AP purificado por afinidad (número de catálogo de Acris RB 17AP). En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario es un anticuerpo policlonal conjugado con FITC frente a IgG de cabra (H&L) (número de catálogo de Acris R1317F). En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario es estreptavidina-fosfatasa alcalina de *Streptomyces avidinii* (número de catálogo de Sigma S2890). En algunas realizaciones, el anticuerpo secundario es estreptavidina-peroxidasa de *Streptomyces avidinii* (número de catálogo de Sigma S5512).

En algunas realizaciones, los anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios se diluyen en una disolución de

bloqueo. Los métodos no se limitan a un tipo particular de disolución de bloqueo. En algunas realizaciones, la disolución de bloqueo es leche. En algunas realizaciones, la disolución de bloqueo es suero bovino fetal (FBS). En algunas realizaciones, la disolución de bloqueo es albúmina sérica bovina (BSA).

Los métodos para detectar, identificar y medir adherencia bacteriana a mucosidad no se limitan a un tipo particular de sustrato líquido. En algunas realizaciones, el sustrato líquido está configurado para facilitar la detección de la unión del anticuerpo primario y/o el anticuerpo secundario dentro del ensayo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (número de catálogo de Sigma T4319). En algunas realizaciones, el sustrato líquido es la forma cinética lenta de TMB (a continuación, TMB lenta) (número de catálogo de Sigma T0440). En algunas realizaciones, el sustrato líquido es TMB super-sensible (a continuación, TBM super) (número de catálogo de Sigma T4444). En algunas realizaciones, el sustrato líquido es fosfato de p-nitrofenilo (número de catálogo de Sigma N7653). En algunas realizaciones, el sustrato líquido es 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (AzBTS; número de catálogo de Sigma A3219) + potenciador de micropocillos ABTS (número de catálogo de Sigma AI227).

Los métodos para detectar, identificar y medir adherencia bacteriana a mucosidad no se limitan a una técnica particular para medir tal adherencia bacteriana a mucosidad. En algunas realizaciones, la adherencia bacteriana a mucosidad se mide visualmente (por ejemplo, usando obtención de imágenes y/o fotografía). En algunas realizaciones, la adherencia bacteriana a mucosidad se mide con un lector de placas de ELISA. En algunas realizaciones, la técnica empleada para medir la adherencia bacteriana a mucosidad detecta, mide y cuantifica, por ejemplo, la absorbancia, intensidad de

fluorescencia, luminiscencia, fluorescencia de resolución temporal y/o polarización de fluorescencia.

5 En algunas realizaciones, los métodos para detectar, identificar y medir adherencia bacteriana a mucosidad (por ejemplo, los métodos basados en ELISA) se usan para identificar agentes que modulan la adherencia bacteriana a mucosidad. En algunas realizaciones, se usan métodos para detectar, identificar y/o medir adherencia bacteriana de la invención para generar y/o identificar composiciones optimizadas (por ejemplo, de segunda, tercera, cuarta o más generación) (por ejemplo, que muestran mayor eficacia (por ejemplo, en la prevención de la adherencia bacteriana) que una composición generación anterior. Los métodos no se limitan a una técnica particular para identificar agentes que modulan la adherencia bacteriana a mucosidad y/o células (por ejemplo, células epiteliales). En algunas realizaciones, se aplica conjuntamente un posible modulador de adherencia bacteriana a mucosidad y/o células (por ejemplo, células epiteliales) con una muestra bacteriana a una placa recubierta con mucosidad y/o células (por ejemplo, células epiteliales) (por ejemplo, mucosidad de intestino de cerdo y/o células epiteliales), y se anticuerpos primarios y secundarios, y sustrato líquido posteriormente aplicados. En algunas realizaciones, la caracterización de la actividad de modulación del agente se logra comparando la adherencia bacteriana en presencia y ausencia del agente. Por ejemplo, agentes que aumentan la adherencia bacteriana a mucosidad y/o células (por ejemplo, células epiteliales) se caracterizan como, por ejemplo, facilitadores de la adherencia entre ese tipo específico de bacterias y ese tipo específico de mucosidad y/o células (por ejemplo, células epiteliales). Agentes que disminuyen la adherencia bacteriana a mucosidad y/o células (por ejemplo, células epiteliales) se caracterizan como, por ejemplo, inhibidores de adherencia entre ese tipo específico de bacterias y ese tipo específico de mucosidad y/o células (por

10

15

20

25

30

35

ejemplo, células epiteliales). Los métodos no se limitan a un tipo o clase particular de posible agente. En algunas realizaciones, el agente es, por ejemplo, una molécula que se produce de manera natural, una molécula derivada de manera sintética, o una molécula derivada de manera recombinante.

En algunas realizaciones, los métodos suponen la aplicación previa de uno o más agentes que se sabe que modulan la adherencia bacteriana a mucosidad o células epiteliales como medida profiláctica o preventiva. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos suponen la aplicación previa de uno o más agentes que se sabe que inhiben la adherencia bacteriana a mucosidad. Los métodos de la invención no se limitan a ningún tipo particular de agente que se sabe que inhibe la adherencia bacteriana a mucosidad y/o células (por ejemplo, células epiteliales). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente que se sabe que inhibe la adherencia bacteriana a mucosidad es Bio-Mos (por ejemplo, una manoproteína derivada de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*), aunque la presente invención no se limita al mismo. En algunas realizaciones, el agente que se sabe que inhibe la adherencia bacteriana a mucosidad se identifica mediante el uso de los métodos basados en ELISA de la presente invención. En algunas realizaciones, los métodos suponen la aplicación conjunta de uno o más agentes que se sabe que potencian la adherencia bacteriana a mucosidad. Los métodos no se limitan a un tipo particular de agente que se sabe que potencia la adherencia bacteriana a mucosidad. En algunas realizaciones, el agente que se sabe que potencia la adherencia bacteriana a mucosidad se identifica mediante el uso de los métodos basados en ELISA de la presente invención.

En algunas realizaciones, los métodos suponen la aplicación conjunta de uno o más agentes que se sabe que modulan la adherencia bacteriana a mucosidad. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos suponen la aplicación conjunta de uno o más agentes que se sabe que inhiben la

adherencia bacteriana a mucosidad. Los métodos no se limitan a un tipo particular de agente que se sabe que inhibe la adherencia bacteriana a mucosidad. En algunas realizaciones, el agente que se sabe que inhibe la adherencia bacteriana a mucosidad es Bio-Mos (por ejemplo, una manoproteína derivada de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*). En algunas realizaciones, el agente que se sabe que inhibe la adherencia bacteriana a mucosidad se identifica mediante el uso de los métodos basados en ELISA de la presente invención. En algunas realizaciones, los métodos suponen la aplicación conjunta de uno o más agentes que se sabe que potencian la adherencia bacteriana a mucosidad. Los métodos no se limitan a un tipo particular de agente que se sabe que potencia la adherencia bacteriana a mucosidad. En algunas realizaciones, el agente que se sabe que potencia la adherencia bacteriana a mucosidad se identifica mediante el uso de los métodos basados en ELISA de la presente invención.

En algunas realizaciones, los métodos suponen la aplicación posterior de uno o más agentes que se sabe que modulan la adherencia bacteriana a mucosidad o células epiteliales tras haberse eliminado la enfermedad infecciosa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos suponen la aplicación posterior de uno o más agentes que se sabe que inhiben la adherencia bacteriana a mucosidad y/o células (por ejemplo, células epiteliales). Los métodos no se limitan a un tipo particular de agente que se sabe que inhibe la adherencia bacteriana a mucosidad. En algunas realizaciones, el agente que se sabe que inhibe la adherencia bacteriana a mucosidad es Bio-Mos (por ejemplo, una manoproteína derivada de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*). En algunas realizaciones, el agente que se sabe que inhibe la adherencia bacteriana a mucosidad se identifica mediante el uso de los métodos basados en ELISA de la presente invención. En algunas realizaciones, los métodos suponen la aplicación conjunta de uno o más agentes que se sabe que potencian la adherencia

bacteriana a mucosidad. Los métodos no se limitan a un tipo particular de agente que se sabe que potencia la adherencia bacteriana a mucosidad. En algunas realizaciones, el agente que se sabe que potencia la adherencia bacteriana a mucosidad se identifica mediante el uso de los métodos basados en ELISA de la presente invención.

En algunas realizaciones, se usan ensayos de la invención para identificar y/o caracterizar compuestos de antiadherencia para bacterias del tubo intestinal y/o urinario (por ejemplo, bacterias que colonizan superficies mucosas del tubo intestinal y/o urinario). En algunas realizaciones, se identifican compuestos de antiadherencia que se usan para prevenir y/o tratar una enfermedad y/o signos y/o síntomas de la misma (por ejemplo, salmonelosis, metritis, etc. (por ejemplo, en animales (por ejemplo, animales reproductores tales como vacas lecheras, cerdos, etc.))). En algunas realizaciones, pueden realizarse ensayos de la invención en cualquier lugar en el que pueda usarse un lector de microplacas incluyendo, pero sin limitarse a, en un laboratorio (por ejemplo, universidad, privado, público, u otro tipo de laboratorio), en el campo (por ejemplo, en un rancho, una granja, un emplazamiento del usuario del ensayo), etc. En algunas realizaciones, se venden comercialmente ensayos y/o componentes de ensayo y se usan por un usuario final (por ejemplo, comprador de un ensayo) en el propio laboratorio del usuario final (por ejemplo, para comprobar la eficacia, rendimiento y/o consistencia de un producto (por ejemplo, compuesto de antiadherencia)). Por tanto, la presente invención proporciona composiciones y métodos que permiten a los usuarios de un ensayo realizar su propia caracterización de calidad de compuestos (por ejemplo, compuestos de antiadherencia) en un emplazamiento del usuario (por ejemplo, en el emplazamiento de uso de compuesto de antiadherencia (por ejemplo, BIO-MOS). En algunas realizaciones, se recoge información (por ejemplo, eficacia, calidad, consistencia,

etc.) relacionada con el compuesto de antiadherencia generada usando ensayos de la invención. En alguna realización, se recoge información usando una base de datos (por ejemplo, base de datos en línea) o correos electrónicos. En algunas realizaciones, la información y/o los datos recogidos relacionados con un compuesto de antiadherencia (por ejemplo, eficacia, calidad, consistencia, etc.) se usan en un programa de control de calidad. En algunas realizaciones, la información y/o los datos recogidos relacionados con un compuesto de antiadherencia (por ejemplo, eficacia, calidad, consistencia, etc.) se usan por un proveedor y/o fabricante del compuesto de antiadherencia para monitorizar la actividad del compuesto. En algunas realizaciones, la información y/o los datos recogidos relacionados con un compuesto de antiadherencia (por ejemplo, eficacia, calidad, consistencia, etc.) se usan con datos de salud de animales recogidos en el emplazamiento de uso del compuesto de antiadherencia (por ejemplo, para proporcionar información relacionada con el estado general del animal). En algunas realizaciones, una forma física preferida de un agente identificado mediante el uso de los métodos basados en ELISA de la presente invención (por ejemplo, identificado como un modulador de adherencia bacteriana a mucosidad) es un polvo seco que fluye libremente adecuado para su inclusión directa en alimentos para animales o como suplemento directo para un animal. En otras realizaciones, una forma física preferida de un agente identificado mediante el uso de los métodos basados en ELISA de la presente invención (por ejemplo, identificado como un modulador de adherencia bacteriana a mucosidad) es un líquido o una pasta que se administra tras la granulación o a través de agua para beber.

Pueden añadirse composiciones de la invención que comprenden un agente identificado mediante el uso de los métodos basados en ELISA de la presente invención (por ejemplo, identificado como un modulador de adherencia

bacteriana a mucosidad) a cualquier pienso comercialmente disponible para ganado, animales de compañía, peces y moluscos incluyendo, pero sin limitarse a, ración mezclada total (TMR), forraje(s), gránulo(s), concentrado(s), premezcla(s), coproducto(s), grano(s), grano(s) de destilación, melaza, fibra(s), pasto(s), césped(es), heno, semilla(s), hojas, harina, producto(s) soluble(s), y suplemento(s). Composiciones de la invención que comprenden un agente identificado mediante el uso de los métodos basados en ELISA de la presente invención (por ejemplo, identificado como un modulador de adherencia bacteriana a mucosidad) se incorporan directamente en alimentos para animales (por ejemplo, alimentos granulados comercialmente disponibles). Cuando se incorporan directamente en alimentos para animales, las composiciones que comprenden un agente identificado mediante el uso de los métodos basados en ELISA de la presente invención pueden añadirse a los piensos para animales, pescado o moluscos en cantidades que oscilan entre aproximadamente el 0,0125% y aproximadamente el 0,4% en peso de alimento. En algunas realizaciones, la composición se añade a piensos para animales, pescado, moluscos en cantidades de desde aproximadamente el 0,025% hasta aproximadamente el 0,2% en peso de alimento. Alternativamente, se alimentan directamente composiciones de la invención a animales como suplemento (por ejemplo, en una cantidad que oscila entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 20 gramos por animal al día). Un experto en la técnica aprecia fácilmente que la cantidad de una composición alimentada varía dependiendo de la especie, el tamaño del animal y el tipo de pienso al que se añade una composición de la invención.

Pueden alimentarse composiciones de la invención que comprenden un agente identificado mediante el uso de los métodos basados en ELISA de la presente invención (por ejemplo, identificado como un modulador de adherencia bacteriana a mucosidad) a cualquier animal, incluyendo, pero

sin limitarse a, especies de rumiantes y equinas. Cuando se mezclan con alimentos o se alimentan como un suplemento, las composiciones de la invención que comprenden un agente identificado mediante el uso de los métodos basados en ELISA de la presente invención (por ejemplo, identificado como un modulador de adherencia bacteriana a mucosidad) modulan (por ejemplo, aumentan o disminuyen dependiendo del agente) la adherencia bacteriana a mucosidad en el animal, mejorando el rendimiento y la salud y reduciendo la incidencia de enfermedad.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para tratar trastornos provocados por bacterias patogénicas mediante la administración a un sujeto de un agente que se sabe que modula (por ejemplo, inhibe, facilita) la adherencia bacteriana a mucosidad. En algunas realizaciones, el agente se identifica mediante el uso de los métodos basados en ELISA de la presente invención. En algunas realizaciones, el trastorno está provocado por *Bacillus anthracis* (por ejemplo, ántrax cutáneo, ántrax pulmonar, ántrax gastrointestinal), y en algunas realizaciones el método implica la administración conjunta de penicilina, doxiciclina y/o ciprofloxacina. En algunas realizaciones, el trastorno está provocado por *Bordetella pertussis* (por ejemplo, tosferina, neumonía bacteriana secundaria), y en algunas realizaciones el método implica la administración conjunta de antibióticos macrólidos (por ejemplo, azitromicina, eritromicina, claritromicina). En algunas realizaciones, el trastorno está provocado por *Borrelia burgdorferi* (por ejemplo, enfermedad de Lyme), y en algunas realizaciones el método implica la administración conjunta de cefalosporinas, amoxicilina y/o doxiciclina. En algunas realizaciones, el trastorno está provocado por bacterias patogénicas de *Brucella* (por ejemplo, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*) (por ejemplo, brucelosis), y en algunas realizaciones el método implica la administración

conjunta de doxiciclina, estreptomina, y/o gentamicina. En algunas realizaciones, el trastorno está provocado por *Campylobacter jejuni* (por ejemplo, enteritis aguda), y en algunas realizaciones el método implica la administración conjunta de ciprofloxacina. En algunas realizaciones, el trastorno está provocado por *Chlamydia pneumoniae* (por ejemplo, infección respiratoria adquirida en la comunidad), y en algunas realizaciones el método implica la administración conjunta de doxiciclina, y/o eritromicina. En algunas realizaciones, el trastorno está provocado por *Chlamydia psittaci* (por ejemplo, *Psittacosis*), y en algunas realizaciones el método implica la administración conjunta de tetraciclina, doxiciclina, y/o eritromicina. En algunas realizaciones, el trastorno está provocado por *Chlamydia trachomatis* (por ejemplo, uretritis no gonocócica (NGU), tracoma, conjuntivitis por inclusión del recién nacido (ICN), linfogranuloma venéreo (LGV)), y en algunas realizaciones el método implica la administración conjunta de azitromicina, eritromicina, tetraciclinas, y/o doxiciclina. En algunas realizaciones, el trastorno está provocado por *Clostridium botulinum* (por ejemplo, botulismo), *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani* (por ejemplo, tétano), *Corynebacterium diphtheriae* (por ejemplo, difteria), *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecum*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis* (por ejemplo, tularemia), *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila* (por ejemplo, enfermedad del legionario), *Leptospira interrogans*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae* (por ejemplo, enfermedad de Hansen), *Mycobacterium tuberculosis* (por ejemplo, tuberculosis), *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rickettsia rickettsii*, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Treponema*

pallidum, *Vibrio cholerae*, y *Yersinia pestis* (por ejemplo, plaga).

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona kits configurados para permitir a un usuario poner en práctica los métodos de la presente invención (por ejemplo, métodos para detectar, identificar y medir adherencia bacteriana a mucosidad). En algunas realizaciones, los kits contienen uno o más de los siguientes componentes, muestras de mucosidad, placas recubiertas con muestras de mucosidad, bacterias, anticuerpos primarios, anticuerpos secundarios, sustrato líquido, disoluciones de lavado, un dispositivo configurado para interpretar ensayos basados en ELISA, instrucciones, un agente que se sabe que disminuye la adherencia bacteriana a mucosidad (por ejemplo, Bio-Mos) (por ejemplo, un agente identificado mediante el uso de los métodos basados en ELISA de la presente invención), un agente que se sabe que aumenta la adherencia bacteriana a mucosidad (por ejemplo, un agente identificado mediante el uso de los métodos basados en ELISA de la presente invención), y agentes de tratamiento adicionales (por ejemplo, antibióticos).

PARTE EXPERIMENTAL

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar adicionalmente determinadas realizaciones y aspectos preferidos de la presente invención y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Materiales y métodos utilizados en ELISA colorimétrico frente a detección radioactiva de la adherencia bacteriana a la materia intestinal

Cepas bacterianas. Se seleccionaron dos cepas de *E. coli* para el proyecto de desarrollo: *E. coli* ALI84 y ALI446. La primera se aisló originalmente de aves enfermas y la segunda se aisló de un cerdo con diarrea. Se seleccionaron estas cepas

porque han presentado adherencia a la mucosidad del cerdo. Se hicieron crecer las bacterias en caldo LB y se transfirieron a un medio reciente (cultivo:medio 1:10) el día antes de los experimentos. Se estimó el número de bacterias según el tiempo de cultivo.

Anticuerpos. Se adquirieron anticuerpos de Acris Antibodies GmbH, Alemania y Sigma Aldrich, Alemania. Los anticuerpos primarios incluyeron: un anticuerpo policlonal conjugado con HRP frente a los serotipos antigénicos O y K de *E. coli* (número de catálogo de Acris BP2022HRP); un anticuerpo policlonal frente a los serotipos antigénicos O y K de *E. coli* (número de catálogo de Acris BP2022); y un anticuerpo policlonal conjugado con biotina frente a los serotipos antigénicos O y K de *E. coli* (número de catálogo de Acris BP 102 IB).

Los anticuerpos secundarios incluyen: un anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-HRP purificado por afinidad (número de catálogo de Acris R1317HRP); un anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-AP purificado por afinidad (número de catálogo de Acris R1317AP); un anticuerpo policlonal conjugado con FITC frente a IgG de cabra (H&L) (número de catálogo de Acris R1317F); estreptavidina-fosfatasa alcalina de *Streptomyces avidinii* (número de catálogo de Sigma S2890); estreptavidina-peroxidasa de *Streptomyces avidinii* (número de catálogo de Sigma S5512). Se adquirieron los sustratos para ELISA como disoluciones listas para su uso de Sigma-Aldrich, Alemania: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (número de catálogo de Sigma T4319); forma cinética lenta de TMB (más adelante TMB lenta) (número de catálogo de Sigma T0440); TMB supersensible (más adelante TBM super) (número de catálogo de Sigma T4444); fosfato de P-nitrofenilo (número de catálogo de Sigma N7653); 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (AzBTS; número de catálogo de Sigma A3219) + potenciador de micropocillos de ABTS (número de catálogo de Sigma AI227).

Tampones. Originalmente, se usó tampón HEPES-Hanks (pH 7,4) para lavar los pocillos excepto para el lavado final en el que se usó PBS para evitar la alteración del HEPES-Hanks coloreado de rojo en el ELISA. En algunas realizaciones, se
5 incluyó PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4) en todas las etapas en lugar del tampón HEPES-Hanks.

Placas. Para los experimentos de ELISA, se usaron inmunoplasmas de 96 pocillos (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca, más adelante en este informe "placas Maxisorp"). Para los
10 experimentos de centello, se usaron placas de microtitulación de poli(tereftalato de etileno) (placa de muestra PET de 96 pocillos, 1450-401; Wallac Oy, Turku; denominadas en el presente documento "placas blandas") para su uso en un contador de centelleo.

15 Se utilizó un ensayo de fijación/unión radiactiva convencional, descrito a continuación, como control para el ELISA colorimétrico.

Marcaje radioactivo de bacterias para el ensayo de unión radiactiva. Se hicieron crecer las bacterias durante la noche a +37°C y se diluyó la suspensión bacteriana 1:10 en un nuevo
20 lote de LB y se añadió metil-1,-2,3H timidina (117 I-1Ci/mmol; Amersham). Se incubaron las bacterias durante 2 h a +37°C y se recogieron mediante centrifugación durante 5 min. a 3000 g. Se resuspendió el sedimento bacteriano en tampón HEPES-Hanks o
25 PBS y se usó en el ensayo de unión.

Ensayo de unión radiactiva. Se añadieron 200 ul de suspensión bacteriana diluida en pocillos de microtitulación y se incubaron las placas durante 1 h a +37°C. Se eliminaron las
30 células no unidas lavando tres veces con 300 µl de tampón HEPES-Hanks o PBS. Se añadieron 250 ul de líquido de centello y se midió la radioactividad con un contador de centelleo.

Aislamiento e inmovilización de la mucosidad. Se recubrieron las placas con diferentes concentraciones de mucosidades de diferentes animales. Se usó la mucosidad del
35 ileon proximal de un cerdo de 1 año de edad a menos que se

indique lo contrario. Se raspó la mucosidad de la superficie del intestino y se lavó. Se almacenaron los extractos de mucosidad brutos a -80°C hasta su uso. Para el recubrimiento, se ajustó la concentración de proteínas a $0,0 - 0,2 \text{ mg/ml}$ usando tampón de carbonato de sodio (tampón de recubrimiento, pH 9,6), y se sometió a prueba la concentración de la mucosidad óptima para la adherencia bacteriana. Se inmovilizó la disolución de mucosidad sobre las placas introduciendo $300 \mu\text{l}$ o $200 \mu\text{l}$ de mucosidad en cada pocillo de $350 \mu\text{l}$. Entonces, se incubó la placa a $+4^{\circ}\text{C}$ durante la noche. Se eliminó la mucosidad extra de los pocillos de microtitulación lavando dos veces con $300 \mu\text{l}$ de tampón HEPES-Hanks o PBS.

Método de microcentrifugación usado en pruebas de desarrollo de color no específico por *E. coli* con sustratos de ELISA. Se dividió un cultivo reciente de *E. coli* ($\sim 10^8$ bacterias/ml) en tubos de microcentrífuga ($\sim 10^7$ /tubo). Se centrifugaron los tubos durante 5 minutos/ 3000 g , y se retiró el sobrenadante. Se suspendieron las bacterias hasta $700 \mu\text{l}$ de sustrato de ELISA. Se leyó la absorbancia de la suspensión con espectrofotómetro a 370, 405 y 630 nm tras cinco minutos y luego cada 15 minutos hasta 3 horas.

Método de FITC usado para someter a prueba la especificidad del anticuerpo primario. Se sometió a prueba la especificidad del anticuerpo primario (anticuerpo policlonal anti-*E. coli*, BP2022, compatible con anticuerpo secundario conjugado con FITC) con microscopía de fluorescencia. Se introdujeron 10^8 bacterias en cada tubo de microcentrífuga y se lavaron tres veces con 1 ml de PBS (y se centrifugaron a $3000 \text{ g}/5 \text{ min.}$ entre los lavados). Se introdujo el anticuerpo primario diluido hasta 1:100, 1:500, 1:1000 en BSA al 1%/PBS en cada tubo y se incubó a temperatura ambiente durante 45 min. Se usó BSA al 1%/PBS como control negativo. Se lavaron las bacterias tres veces con PBS y se introdujo el anticuerpo secundario (anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra conjugado

con FITC) en diluciones de 1:100, 1:500, y 1:1000 en BSA al 1%/PBS. Se incubaron los tubos a temperatura ambiente durante 1 h. Se lavaron las bacterias dos veces con PBS y se filtraron con membranas BLACK NUCLEPORE de Whatman, tamaño de poro 0,2 μ m. Se lavaron los filtros dos veces con PBS, se trasladaron a los portaobjetos de microscopio y se sellaron con una gota de aceite de inmersión. Los portaobjetos se mantuvieron en la oscuridad.

Protocolo de ELISA básico. Se describe un protocolo básico a continuación, pero las condiciones exactas en cada experimento se describen en el contexto de los resultados descritos a continuación. Se introdujeron de 0 a 10^7 bacterias suspendidas en tampón en los pocillos recubiertos con mucosidad. A menos que se indique lo contrario, se usaron 0,1 mg/ml de concentración de mucosidad y 10^7 bacterias/pocillo. En algunos experimentos, se añadió Bio-Mos (Alltech, Nicholasville, KY) junto con las bacterias diluidas en PBS a las concentraciones descritas a continuación.

Se incubaron las placas a $+37^{\circ}\text{C}$ o temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron las placas con tampón (PBS o HEPES-Hanks, 300 μ l), tres veces. Se bloqueó la unión no específica con o bien leche, suero bovino fetal o bien BSA (albúmina sérica bovina) en PBS. Se incubaron las placas durante 1 hora a $+37^{\circ}\text{C}$ o temperatura ambiente. Se eliminó el tampón de bloqueo y se introdujo el anticuerpo primario en diluciones de entre 1:200 y 1:100.000. Se diluyó el anticuerpo en tampón de bloqueo. Se incubaron las placas de nuevo durante 1 hora a $+37^{\circ}\text{C}$ o temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS o HEPES-Hanks. Se añadió anticuerpo secundario en diluciones de entre 1:1000 y 1:100.000 en tampón de bloqueo. Se incubaron las placas durante 1 hora a $+37^{\circ}\text{C}$ o temperatura ambiente. Tras la última incubación, se lavaron las placas cinco veces con PBS (300 μ l/pocillo) para garantizar que se eliminaba completamente todo el anticuerpo secundario libre. Se añadió

el sustrato y se leyó la placa con un lector de ELISA y/o se fotografió.

Ejemplo 2

5 **Concentración de la mucosidad intestinal**

Con el fin de identificar las concentraciones de mucosidad en la suspensión de recubrimiento, se recubrieron los pocillos con suspensiones con diferentes concentraciones de mucosidad. La concentración de mucosidad era una variable identificada como importante para la fiabilidad del ensayo (por ejemplo, si la concentración de mucosidad es demasiado baja, las bacterias pueden unirse a la placa en lugar de a la mucosidad). Método básico: ensayo de unión radiactiva (véase Materiales y métodos anteriormente). Placas: placas PET de 96 pocillos (placas blandas); mucosidad: íleon proximal de cerdo, 0,0-0,2 mg de proteína/ml de tampón de recubrimiento; bacterias: *E. coli* cepa ALI84 en una placa, *E. coli* cepa ALI446 en la otra placa; 10^7 bacterias/pocillo. Tampón: HEPES-Hanks; bloqueo: sin bloqueo; anticuerpo primario: ninguno; anticuerpo secundario: ninguno; temperatura de incubación: +37°C. El efecto de la concentración de la mucosidad de *E. coli* ALI 84 y ALI446, tal como se midió mediante bacterias marcadas radiactivamente se muestra en la figura 1.

La figura 1 indica que las bacterias mostraron adherencia óptima a los pocillos sin mucosidad. Con el fin de verificar que las bacterias se unían a la mucosidad y no a la placa, se identificó una concentración de mucosidad relativamente alta (0,1 mg de proteína/ml de tampón de recubrimiento) y se eligió para experimentos posteriores. Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención utiliza una concentración de mucosidad adecuada para recubrir los pocillos (por ejemplo, una cantidad que reduce y/o elimina la unión de las bacterias a los pocillos de la placa).

Ejemplo 3

**Análisis de los efectos inhibidores de los anticuerpos
primarios en la adherencia bacteriana**

Para someter a prueba si los anticuerpos primarios influyen en la adherencia de las bacterias, se incubaron bacterias en pocillos recubiertos con mucosidad con diluciones de anticuerpos que oscilaban entre sin anticuerpo y 1:200. Método básico: ensayo de unión radiactiva (véase Materiales y métodos). Placas: placas PET de 96 pocillos (placas blandas); mucosidad: íleon proximal de cerdo; bacterias: *E. coli* cepa ALI84 en una placa, *E. coli* cepa ALI446 en la otra placa. 10^7 bacterias/pocillo; tampón: HEPES-Hanks; bloqueo: sin bloqueo; anticuerpos primarios: HRP = anticuerpo anti-*E. coli* conjugado con HRP; BP2022 = anticuerpo anti-*E. coli* no conjugado, Biotina = anticuerpo anti-*E. coli* conjugado con biotina; anticuerpos secundarios: sin 2° anticuerpo; temperatura de incubación: +37°C.

Tal como se describe en las figuras 2 y 3, dos primeros anticuerpos primarios diferentes potenciaron la adherencia de las bacterias a la mucosidad a la concentración más baja (diluido 1:20000) pero redujeron ligeramente la adherencia a la dilución de 1:200. Es posible que la región Fc de los dos primeros anticuerpos esté libre para unirse a la mucosidad, mientras que se bloquea la unión de esta región a la mucosidad mediante la biotina en el tercer anticuerpo. A una concentración baja, los dos primeros anticuerpos pueden actuar para asociar las bacterias y la mucosidad (región Fab que se une a las bacterias y región Fc que se une a la mucosidad). A concentraciones superiores, (dilución 1:200), se reduce la unión de las bacterias a la mucosidad a medida que los anticuerpos están bloqueando aparentemente los sitios de unión a la mucosidad en la superficie bacteriana (o sitios de unión de bacterias en la mucosidad). El anticuerpo conjugado con biotina tuvo un efecto muy pequeño, parece tener adhesión potenciada. Además, en este experimento, se añadió el

anticuerpo primario junto con las bacterias, pero en los métodos de ELISA de unión colorimétricos descritos en el presente documento, las bacterias en primer lugar se incuban solas durante 1 hora. Por tanto, en algunas realizaciones, el efecto de los anticuerpos en la adherencia/unión bacteriana (por ejemplo, aumentando o disminuyendo realmente el anticuerpo la adherencia bacteriana) se reduce y/o elimina cuando las bacterias se han unido a la mucosidad (por ejemplo, en ausencia de anticuerpos). Además, en algunas realizaciones, puede utilizarse suero bovino fetal u otro agente de bloqueo para bloquear la unión no específica. Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona que el anticuerpo primario conjugado con HRP y el anticuerpo primario no conjugado alteran (por ejemplo, potencian o inhiben) la adherencia de las bacterias a la mucosidad en un ensayo de unión radiactiva convencional y que el ensayo colorimétrico de la presente invención no se ve afectado por tal alteración.

Además, como todos los anticuerpos sometidos a prueba parecían adecuados para los métodos descritos en el presente documento, la presente invención también proporciona que los ensayos de fijación/unión de la invención son adecuados con una amplia variedad de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos no conjugados y conjugados).

Ejemplo 4

Desarrollo de color no específico por *E. coli* con sustratos de ELISA

Se sometió a prueba la capacidad de las dos cepas seleccionadas de *E. coli* para producir una reacción de color no específica con sustratos de ELISA. Se llevó a cabo el experimento en tubos de microcentrífuga incubando las bacterias con los sustratos. Se utilizó un método de microcentrifugación (véase Materiales y métodos del ejemplo 1).

Tal como se muestran en las figuras 4 y 5, el color producido por las bacterias era mínimo y comparable con el desarrollo de color del sustrato sólo. En el plazo de un periodo de tiempo de aproximadamente 5 a 30 minutos, ninguno de los sustratos produjo una reacción de color significativa. Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona que cada uno de los sustratos de ELISA descritos en el presente documento es adecuado para su uso en un ensayo de adherencia/unión de la invención.

Ejemplo 5

Desarrollo de color no específico por la mucosidad con sustratos de ELISA

Se sometieron a prueba cinco muestras de mucosidades de un cerdo de 1 año de edad para determinar su capacidad para producir una reacción de color no específica con los sustratos de ELISA. Se realizó un ELISA tal como se describe en Materiales y métodos del ejemplo 1. Placa: placa blanda; mucosidad: íleon proximal, íleon medio y distal y colon proximal y distal de cerdo; bacterias: sin bacterias; anticuerpos: sin anticuerpos; tampón: PBS; bloqueo: BSA al 1%/PBS 1 hora; temperatura de incubación: +37°C; sustrato: los seis sustrato mostrados en la figura 6.

Tal como se muestra en la figura 6, la mucosidad procedente de íleon de cerdo pero no de colon produjo una reacción de color con fosfato de para-nitrofenilo (pNPP). Otros sustratos no reaccionaron con la mucosidad. La producción de color de pNPP puede deberse a una fosfatasa intrínseca presente en la mucosidad del íleon. Por tanto, la presente invención proporciona, en algunas realizaciones, que la mucosidad procedente de íleon de cerdo pero no de colon produce una reacción de color con fosfato de para-nitrofenilo (pNPP). Otros sustratos no reaccionaron con la mucosidad.

Ejemplo 6**Pruebas de especificidad de anticuerpo primario**

Se sometió a prueba la especificidad del anticuerpo primario con microscopía de fluorescencia. En resumen, se bloquearon las bacterias con BSA, se incubaron en primer lugar con un anticuerpo primario y luego con un anticuerpo secundario conjugado con FTIC. Se visualizó la fluorescencia con un microscopio de fluorescencia. Se utilizó el método de FITC descrito en Materiales y métodos del ejemplo 1.

Todas las muestras con el anticuerpo secundario mostraron alguna fluorescencia aunque estuviera ausente el anticuerpo primario, y la concentración del anticuerpo secundario produjo las diferencias más notables entre las muestras. Por tanto, la presente invención proporciona que, en algunas realizaciones, puede atenuarse y/o inhibirse la unión no específica usando suero bovino fetal (FBS) y/o albúmina sérica bovina (BSA).

Ejemplo 7**Unión no específica de anticuerpos a la mucosidad o a la placa**

Para someter a prueba si los anticuerpos se unen de manera no específica a la placa o a la mucosidad sin bacterias, se añadieron anticuerpos primarios y secundarios a una placa recubierta con mucosidad. Se utilizó el método de ELISA descrito en el ejemplo 1. Se usó BSA para bloquear la unión no específica. Placa: placa MaxiSorp; mucosidad: íleon proximal de cerdo; bacterias: sin bacterias; bloqueo: BSA al 1% en PBS; tampón: PBS; anticuerpos primarios: véase la tabla 1; 200 ul de diferentes diluciones en BSA al 1% en PBS; anticuerpos secundarios: véase la tabla 1; 200 ul de diferentes diluciones en BSA al 1% en PBS; temperatura de incubación: +37°C; sustratos: TMB (para anticuerpos secundarios conjugados con HRP), pNPP (para anticuerpos secundarios conjugados con AP). Las figuras 7 y 8 muestran la distribución de la placa para someter a prueba la unión no

específica de anticuerpos a la mucosidad o a la placa, y los resultados de la unión no específica, respectivamente. No se usó ninguna bacteria en el experimento. Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona una unión no específica fuerte de los anticuerpos a la mucosidad o a la placa. En algunas realizaciones, BSA no es un agente de bloqueo apropiado para los ensayos de unión de la invención.

Ejemplo 8

Pruebas de agentes de bloqueo para evitar la unión no específica de anticuerpos

El anticuerpo secundario se unió fuertemente a la mucosidad/placa sin adición de ninguna bacteria o anticuerpo primario (véase la figura 8). Por tanto, se sometieron a prueba leche y suero bovino fetal en lugar de BSA para bloquear la unión no específica. Se utilizó el método de ELISA básico descrito en el ejemplo 1. Placa: placa MaxiSorp; mucosidad: íleon proximal de cerdo; bloqueo: leche en polvo desnatada al 5% en PBS o suero bovino fetal al 10% en PBS durante 1 h a +37°C; tampón: PBS; anticuerpos primarios: véase la tabla 2; 200 ul de diferentes diluciones en el tampón de bloqueo; anticuerpos secundarios: véase la tabla 2; 200 ul de diferentes diluciones en el tampón de bloqueo; se usó anticuerpo secundario conjugado con estreptavidina en diluciones de 1:1000 y 1:10000, según la recomendación del fabricante. Temperatura de incubación: +37°C; sustrato: TMB. La figura 9 muestra la distribución de la placa para el ensayo. Anticuerpos primarios: HRP = anticuerpo primario conjugado con HRP, BP2022 = anticuerpo primario anti-*E. coli* policlonal no conjugado; biotina = anticuerpo primario anti-*E. coli* conjugado con biotina. Anticuerpos secundarios: HRP = Ig conjugada con HRP; StrHRP = estreptavidina marcada con HRP. No se usó ninguna bacteria en este experimento.

Tal como se muestra en la figura 10, el suero bovino fetal bloqueó la unión no específica más eficazmente que la

leche. La unión no específica era mínima con el complejo biotina-estreptavidina y más fuerte con BP2022-anticuerpo primario. Basándose en este experimento, se eligió suero bovino fetal al 10% en PBS para el bloqueo en los experimentos. Por tanto, la presente invención proporciona que el suero bovino fetal al 10% en PBS es un agente de bloqueo adecuado para los ensayos de unión de la presente invención.

Ejemplo 9

Unión bacteriana a las placas recubiertas con mucosidad

Se comenzó la optimización del protocolo de ELISA completo (que incluye tanto mucosidad como bacterias) optimizando la dilución de los anticuerpos y el número de bacterias/pocillo. Se utilizó el método de ELISA básico descrito en el ejemplo 1. Placa: placa MaxiSorp; mucosidad: íleon proximal de cerdo; bacterias: *E. coli* cepas ALI84 y ALI446, el número de bacterias/pocillo se indica en la figura 11. Tampón: HEPES-HanksIPBS; bloqueo: suero bovino fetal al 10% en PBS; anticuerpos primarios: 200 ul de diferentes diluciones en el tampón de bloqueo (figuras 11 y 13); anticuerpo secundario: 200 ul de diferentes diluciones en el tampón de bloqueo (figura 13); temperatura de incubación: +37°C; sustrato: TMB.

Tal como se muestra en la figuras 12 y 14, el complejo biotina-estreptavidina era más específico que el anticuerpo primario conjugado con HRP. No se observó ninguna unión no específica (véase la figura 14, controles, dos filas separadas). Esto confirmó el resultado obtenido en el ejemplo 8.

Por tanto, se determinó continuar sólo con la combinación biotina-estreptavidina. La figura 14 muestra que una dilución de 1:1000 pudo producir una reacción en un número incluso menor de bacterias, y por tanto se eligió esta dilución para experimentos adicionales. También se optimizó la dilución del anticuerpo primario. La figura 14 muestra que 1:

10.000 era una dilución demasiado pequeña de anticuerpo secundario (estreptavidina-HRP) para ser útil para detectar un número pequeño de bacterias (por tanto, en algunas realizaciones, se utilizó una dilución 1:1000).

5 La combinación biotina-estreptavidina era más específica que otros anticuerpos y se utilizó en experimentos posteriores. Por tanto, la presente invención proporciona que, en algunas realizaciones, 10^7 bacterias/pocillo es un número óptimo de bacterias para utilizarse en un ensayo de unión de la invención, aunque también puede utilizarse un número mayor (por ejemplo, más de 10^7 bacterias/pocillo (por ejemplo, 10^8 bacterias, 10^9 bacterias, 10^{10} bacterias o más)) o menor (por ejemplo, menos de 10^7 bacterias/pocillo (por ejemplo, 10^6 bacterias, 10^5 bacterias, 10^4 bacterias o menos)). Una dilución 1:1000 - 1:10.000 de anticuerpo primario era óptima en este experimento, pero la cantidad de anticuerpo primario puede estar por encima o por debajo de este intervalo. En algunas realizaciones, se elige una cantidad de anticuerpo primario de modo que se limite la reacción de color.

Ejemplo 10

Linealidad del ELISA en la detección del número de bacterias

Con el fin de estimar el intervalo lineal del método de ELISA, se realizó el ELISA con diferentes números de bacterias/pocillo. Se utilizó el método de ELISA básico descrito en el ejemplo 1. Placa: placa MaxiSorp; mucosidad: íleon proximal de cerdo; bacterias: *E. coli* cepa ALI84, 10^7 bacterias/pocillo; tampón: PBS; Bio-Mos: ninguno; bloqueo: suero bovino fetal al 10% ; anticuerpo primario: anticuerpo primario conjugado con biotina, dilución 1:1000 en tampón de bloqueo; anticuerpo secundario: estreptavidina conjugada con HRP, dilución 1:1000 en tampón de bloqueo; temperatura de incubación: +37°C para una placa, temperatura ambiente para la otra placa; reactivos a temperatura ambiente; sustrato: TMB.

Se representó gráficamente la absorbancia a 620 nm frente al número de bacterias. Para recuentos bacterianos de hasta 10^6 bacterias/pocillo, la relación era lineal (véase la figura 16), pero desde 10^6 hasta 10^8 , la línea de tendencia de ajuste más próxima era logarítmica (véase la figura 15). Por tanto, la presente invención proporciona que a un determinado número de bacterias/pocillo, la capacidad de la mucosidad de unirse a las bacterias disminuye a medida que los sitios de unión se saturan.

Por tanto, en algunas realizaciones, un ensayo de la invención es lineal en un intervalo de números de células bacterianas/pocillo (por ejemplo, desde 0 hasta aproximadamente 10^6 bacterias por pocillo). En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un cálculo altamente sensible de bacterias unidas por pocillo. En algunas realizaciones, los métodos de la invención están normalizados (por ejemplo, para lograr resultados comparativos, repetibles).

Ejemplo 11

El efecto de Bio-Mos en la adherencia bacteriana

Para someter a prueba la linealidad y la resolución del método de ELISA, se usaron diferentes concentraciones de Bio-Mos para bloquear la adhesión de las células bacterianas a la mucosidad. Se compararon los resultados usando el ELISA colorimétrico básico descrito en el ejemplo 1 con los resultados obtenidos utilizando el ensayo de unión radiactiva también descrito en el ejemplo 1. Placa: placa MaxiSorp y placa blanda; mucosidad: íleon proximal de cerdo; bacterias: *E. coli* cepas ALI84 y ALI446, $\sim 10^7$ bacterias/pocillo. Se usó la misma suspensión de bacterias marcadas radiactivamente para ambas placas para garantizar que las placas eran idénticas; tampón: HEPES-Hanks, PBS; Bio-Mos: concentraciones 0-20 g/l, diluido en PBS; bloqueo (sólo placa MaxiSorp): suero bovino fetal al 10% en PBS; anticuerpo primario (sólo placa

MaxiSorp): anticuerpo primario conjugado con biotina (1:1000 en tampón de bloqueo); anticuerpo secundario (sólo placa MaxiSorp): estreptavidina conjugada con HRP (1:1000 en tampón de bloqueo); temperatura de incubación: +37°C; sustrato: TMB.

5 Tal como se muestra en las figuras 17A y 17B, el ensayo radioactivo detectó diferencias en la adherencia bacteriana cuando se usaron diferentes concentraciones de Bio-Mos. Tras realizar el ELISA, se midieron ambas placas con un contador de centelleo (5 min./pocillo). La figura 17B muestra que los
10 recuentos de centelleo son menores tras realizar el ELISA, lo que sugiere que las bacterias se eliminaron por lavado durante el ELISA. Sin embargo, se observó un efecto claro de Bio-Mos.

Se identificó una característica inesperada del método de ELISA colorimétrico porque éste pudo detectar diferencias
15 de unión entre los pocillos sin bacterias (controles) y los pocillos con la mayor concentración de Bio-Mos (con el menor número de bacterias) (véase la figura 17A), mientras que los recuentos de centelleo de los pocillos con la mayor concentración de Bio-Mos están próximos al control sin
20 bacterias (figura 15). Por tanto, la presente invención proporciona, en algunas realizaciones, un método de ELISA que puede detectar diferencias de unión/adherencia entre los pocillos con la mayor concentración de Bio-Mos (con el menor número de células bacterianas) y sin bacterias (controles)
25 (por ejemplo, el ensayo colorimétrico es mucho más sensible que el ensayo radioactivo en este intervalo de concentración).

Ejemplo 12

Números bacterianos importantes para detectar efectos de la 30 alteración de unión

El objetivo de este experimento era encontrar el número de bacterias/pocillo para detectar el efecto de Bio-Mos. Método básico: ELISA (véase Materiales y métodos); placa: placa MaxiSorp; mucosidad: íleon proximal de cerdo; bacterias:
35 *E. coli* cepas ALI84 y ALI446, 0-10⁸/pocillo; Bio-Mos:

concentraciones 0-2 g/l diluido en PBS; tampón: PBS; bloqueo: suero bovino fetal al 10% ; anticuerpo primario: anticuerpo primario conjugado con biotina, dilución 1:1000 en tampón de bloqueo; anticuerpo secundario: estreptavidina conjugada con HRP, dilución 1:1000 en tampón de bloqueo; temperatura de incubación: +37°C; sustrato: TMB.

Tal como se muestra en las figuras 18-19, se determinó que, en algunas realizaciones, el número de bacterias/pocillo debería exceder 10^5 con el fin de producir diferencias detectables. Pueden observarse claras diferencias cuando se usan 10^7 bacterias/pocillo. 10^8 bacterias/pocillo también producen claras diferencias, pero la reacción alcanza su punto final muy rápido y por tanto puede provocar variación a medida que el sustrato no puede añadirse simultáneamente a todos los pocillos. También es posible que un número muy alto de bacterias/pocillo, concentraciones de sustrato o anticuerpos o sitios de unión a mucosidad se vuelvan limitativos. Por tanto, se realizaron experimentos posteriores con $\sim 10^7$ bacterias/pocillo. Con ambas cepas de *E. coli*, concentraciones muy bajas de Bio-Mos parecieron potenciar la unión de las bacterias a la mucosidad. Por tanto, en algunas realizaciones, ensayos de la presente invención han identificado que niveles relativamente bajos (por ejemplo, aproximadamente de 0,1 a aproximadamente 1,0 g/l) de un agente de inhibición (por ejemplo, Bio-Mos) eliminan las bacterias de manera más eficaz que una mayor cantidad del agente.

Ejemplo 13

Método de lavado mejorado

Hasta ahora, se había utilizado un dispositivo de inmunolavado Nunc para las etapas de lavado, pero debido a la considerable variación entre pocillos repetidos, se determinó que este podría ser un método muy tosco. Por tanto, se sometió a prueba un método de lavado diferente con el fin de minimizar la variación entre muestras. El nuevo método se basó en

retirar por agitación los líquidos. Método básico: ELISA (véase Materiales y métodos); placa: placa MaxiSorp; mucosidad: duodeno de pollo de engorde; bacterias: *E. coli* cepa ALI84, 10^7 bacterias/pocillo; tampón: PBS; Bio-Mos: concentraciones 0, 0,1, 1 y 10, añadido junto con las bacterias; bloqueo: suero bovino fetal al 10%; anticuerpo primario: anticuerpo primario conjugado con biotina, 1:1000 en tampón de bloqueo; anticuerpo secundario: estreptavidina conjugada con HRP, 1:1000 en tampón de bloqueo; temperatura de incubación: $+37^{\circ}\text{C}$; sustrato: TMB. Tal como se muestra en la figura 20, el nuevo método de lavado ("lavado con agitación") proporcionó resultados superiores para el método de ELISA. Las señales totales fueron mayores, y se detectaron mayores diferencias entre diferentes concentraciones de Bio-Mos. El nuevo método también es más rápido y permite manipular varias placas simultáneamente. Sin embargo, es importante que el método se realice en condiciones que eviten el mezclado de contenido de los pocillos. Por tanto, la presente invención proporciona un nuevo método de lavado con agitación que es superior a los métodos de lavado convencionales. En el método de lavado con agitación, se añade tampón de lavado con una pipeta al pocillo antes de agitar suavemente la placa invirtiéndola para vaciar los pocillos sin permitir que la disolución se transfiera de un pocillo al otro. Esto se repite tantas veces como sea necesario.

Ejemplo 14

Concentración de anticuerpo primario

Hasta ahora, se había utilizado convencionalmente una dilución 1:1000 del anticuerpo primario en ensayos radioactivos con el fin de garantizar que la concentración del anticuerpo no limite la sensibilidad del ELISA. Por tanto, si se ha de utilizar un ensayo de la presente invención en entornos a gran escala, la dilución del anticuerpo puede desempeñar un papel crítico en la utilización del ensayo. Se

sometió a prueba la dilución del anticuerpo primario para determinar la viabilidad de la utilización del ensayo a gran escala. Se utilizó el ELISA básico descrito en el ejemplo 1; placa: placa MaxiSorp; mucosidad: íleon proximal de cerdo; Bio-Mos: concentraciones 0,5 y 10 g/l, diluido en PBS; bacterias: *E. coli* cepa ALI84, $\sim 10^7$ bacterias/pocillo; bloqueo: suero bovino fetal al 10% en PBS; anticuerpo primario: 200 μ l de anticuerpo primario conjugado con biotina (en un intervalo de 1:1000-1:10.000) en tampón de bloqueo); anticuerpo secundario: 200 μ l de estreptavidina conjugada con HRP (1:1000 en tampón de bloqueo); temperatura de incubación: temperatura ambiente; sustrato: TMB.

La dilución 1:1000 proporcionó una buena resolución entre los niveles de Bio-Mos, aunque diluciones menores también funcionaron bien. Por tanto, en algunas realizaciones, se utilizó una dilución de 1:1000 o menos (por ejemplo, 1:900, 1:750, 1:500, o menos) para proporcionar diferencias de resolución discernibles en un ensayo de la invención. Por tanto, en algunas realizaciones, se eligió una dilución de anticuerpo primario que puede saturar todos los sitios de unión en las bacterias sometidas a prueba en un ensayo. En algunas realizaciones, si se utiliza un ensayo de la invención para detectar el efecto de cantidades muy bajas (por ejemplo, concentraciones de aproximadamente 0,0001 g/l a aproximadamente 1,0 g/l), de agente de inhibición de unión (por ejemplo, Bio-Mos) puede utilizarse incluso una dilución menor de anticuerpo primario (por ejemplo, 1:750, 1:500 o menos (por ejemplo, para garantizar que la concentración de anticuerpos no limita el desarrollo de color). Alternativamente, en algunas realizaciones, se reduce el número de bacterias por pocillo para aumentar la formación de color.

Ejemplo 15**Volumen de reacción del ensayo**

La señal colorimétrica se desarrolló de manera extremadamente rápida en pocillos con el mayor número de bacterias. Por tanto, se determinó si una zona de mucosidad menor (por ejemplo, que puede unir menos bacterias (por ejemplo, reduciendo de ese modo la intensidad de la señal)) reduciría la intensidad de la señal. También se determinó si es posible reducir la cantidad de reactivos reduciendo el volumen necesario para llenar el pocillo recubierto. Los pocillos con una zona de mucosidad menor funcionaron bien, y el límite de detección de bacterias/pocillo fue similar a los resultados obtenidos en los ejemplos anteriores. El color se desarrolló más lento que antes. Por tanto, la presente invención proporciona que, en algunas realizaciones, el volumen de mucosidad en un pocillo individual puede ser de entre aproximadamente 200 μ l y aproximadamente 300 μ l (por ejemplo, dependiendo de la intensidad de la señal deseada). En algunas realizaciones, el volumen de mucosidad puede ser menos de 200 μ l (por ejemplo, 150 μ l, 100 μ l o menos) o más de 300 μ l (por ejemplo, 350 μ l, 400 μ l o más). En algunas realizaciones, la presente invención proporciona que volúmenes menores de recubrimiento de mucosidad permiten el uso de menos reactivos (por ejemplo, aproximadamente es suficiente la mitad de la cantidad de reactivos para los pocillos con 200 μ l de mucosidad en comparación con la cantidad requerida con un pocillo que contiene 300 μ l de mucosidad) sin pérdida de la sensibilidad y funcionalidad del ensayo (por ejemplo, señal detectable). Por tanto, la presente invención proporciona métodos y ensayos para mantener la sensibilidad y funcionalidad del ensayo mientras que se reducen simultáneamente el gasto relacionado con el agotamiento del reactivo.

Ejemplo 16**Fuente de la mucosidad**

En experimentos realizados previamente (por ejemplo, ejemplos 1-15), se ha utilizado mucosidad de íleon proximal de cerdo. Con el fin de determinar si es posible la detección colorimétrica con otras fuentes de mucosidad, se sometieron a prueba otras múltiples fuentes de mucosidad (por ejemplo, íleon proximal de cerdo, colon distal de cerdo, duodeno de pollo de engorde y ciego de pollo de engorde) en el contexto del ensayo de ELISA descrito en el ejemplo 1. Placa: placa MaxiSorp; mucosidad: íleon proximal y colon distal de cerdo, duodeno y ciego de pollo de engorde; bacterias: *E. coli* cepa ALI84, 10^7 bacterias/pocillo; tampón: PBS; Bio-Mos: concentraciones 0, 0,1, 1 y 10, añadido junto con las bacterias; bloqueo: suero bovino fetal al 10%; anticuerpo primario: anticuerpo primario conjugado con biotina, dilución 1:1000 en tampón de bloqueo; anticuerpo secundario: estreptavidina conjugada con HRP, dilución 1:1000 en tampón de bloqueo; temperatura de incubación: +37°C; sustrato: TMB.

Tal como se muestra en la figura 21, las bacterias presentaron diferentes niveles (por ejemplo, intensidad y/o afinidad) de unión dependiendo del tipo de mucosidad utilizada. Por ejemplo, las bacterias sometidas a prueba presentaron casi un unión dos veces mayor a la mucosidad obtenida del duodeno de pollo de engorde y del ciego de pollo de engorde que a la mucosidad obtenida de ileones de cerdo y colon de cerdo. Sin embargo, el ensayo colorimétrico fue suficientemente sensible y robusto como para capturar los diferentes niveles de adherencia bacteriana, así como la capacidad de un agente de bloqueo (por ejemplo, Bio-Mos) para inhibir la adherencia bacteriana a la mucosidad a lo largo de un intervalo de concentraciones de agente de bloqueo. Por tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un ensayo de unión colorimétrico, no radioactivo que encuentra utilidad con diversos tipos y/o fuentes de

mucosidades (por ejemplo, de diferentes animales y de diferentes partes del aparato digestivo (por ejemplo, intestino)).

5

Ejemplo 17

Ensayo radioactivo frente a ensayo colorimétrico

Se realizó un experimento en paralelo para comparar los materiales y métodos utilizados en el ensayo colorimétrico de la invención con los materiales y métodos utilizados en ensayos radioactivos convencionales y para evaluar la capacidad de cada ensayo para detectar diferencias inducidas por Bio-Mos en la adherencia bacteriana. Placas: placa MaxiSorp y placa blanda; mucosidad: íleon proximal de cerdo; Bio-Mos: 50 µl/pocillo en diferentes concentraciones, diluido en PBS; bacterias: $\sim 10^7$ bacterias/pocillo. Se usó la misma suspensión de bacterias marcadas radiactivamente para ambas placas para garantizar que las placas eran idénticas; bloqueo (sólo en la placa MaxiSorp): suero bovino fetal al 10% en PBS; anticuerpo primario (sólo en la placa MaxiSorp): 100 µl de anticuerpo primario conjugado con biotina (1:1000 en tampón de bloqueo); anticuerpo secundario (sólo en la placa MaxiSorp): estreptavidina conjugada con HRP (1:1000 en tampón de bloqueo); temperatura de incubación: temperatura ambiente; sustrato: TMB. Tras el ELISA, se llenaron las placas con líquido de centelleo y se midió la radioactividad con un contador de centelleo.

25

30

Se observó que el efecto de Bio-Mos es muy similar utilizando los materiales y los métodos de ambos ensayos. Las bajas concentraciones de Bio-Mos parecieron potenciar la unión de las bacterias a la mucosidad. Aunque no es necesario un mecanismo para poner en práctica la invención y la invención no se limita a ningún mecanismo de acción particular, en algunas realizaciones, a las concentraciones más bajas, Bio-Mos u otro tipo de agente inhibidor participa en la formación

de agregados de las bacterias. Por tanto, aunque las concentraciones más bajas aumentaron la unión tal como se midió mediante los ensayos, es probable que (por ejemplo, en el contexto de la luz del intestino) los agregados se eliminen por lavado más fácilmente del intestino. Por tanto, una baja concentración de Bio-Mos u otro agente inhibidor (por ejemplo, identificado y/o caracterizado por los métodos de la invención descritos en el presente documento) puede eliminar realmente bacterias de manera más eficaz que y/o de manera tan eficaz como a mayores concentraciones.

Tal como se observa en la figura 22, a concentraciones muy bajas de Bio-Mos, la absorbancia de los dos métodos se diferenció de algún modo. La tendencia de la línea de ELISA es similar ya en puntos de tiempo muy tempranos (= absorbancias bajas), y por tanto la tendencia descendente desde 1,0 g/l hasta 0,1 g/l es poco probable que resulte de limitaciones en la capacidad del lector de ELISA. Es posible que el desarrollo del color pueda limitarse por las concentraciones de anticuerpos o sustrato, pero esta hipótesis no explica la ligera tendencia descendente desde 1,0 g/l hasta 0,1 g/l.

Estos resultados y los de otros ejemplos muestran que las absorbancias más altas se obtienen con o bien 0,1 g/l o bien 1,0 g/l. Por tanto, la presente invención proporciona que se produzca la variación, en algunas realizaciones, por diferencias en el número de bacterias entre experimentos. Por tanto, en algunas realizaciones, para resultados comparables, puede usarse la misma suspensión bacteriana o normalizar el método de cultivo para asegurarse que el número de bacterias original sea similar en experimentos paralelos. Por tanto, en algunas realizaciones, la reducción del número de bacterias/pocillo podría garantizar que la concentración de Bio-Mos y/u otro agente de bloqueo (por ejemplo, agente de prueba) sea el factor más limitativo, en lugar del número de sitios de unión a la mucosidad o concentraciones de sustrato o anticuerpos.

Ejemplo 18**Ensayo de unión bacteriana no radioactivo**

Se realizaron los experimentos durante el desarrollo de las realizaciones de la invención con el fin de someter a prueba adicionalmente el uso del ELISA colorimétrico generado en el presente documento para medir la unión de patógenos y para evaluar el grado de alteración del agente de prueba de la unión. Por tanto, se realizaron experimentos para determinar si podría utilizarse el ensayo para seleccionar agentes de prueba que puedan o no puedan alterar (por ejemplo, inhibir) la unión bacteriana a la mucosidad. En resumen, la presente invención proporciona una alternativa al uso de patógenos vivos, radioactivos (por ejemplo, un ensayo de la invención no necesita usar bacterias vivas ni radioactivas (por ejemplo, la presente invención proporciona que pueden utilizarse bacterias inactivadas con etanol en un ensayo de unión)) y también proporciona placas recubiertas con mucosidad, secadas al aire. Por tanto, los métodos desarrollados durante el desarrollo de las realizaciones de la invención proporcionan beneficios significativos con respecto a los métodos convencionales porque, en algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento eliminan la necesidad para usar bacterias vivas y/o radioactivas (por ejemplo, bacterias patógenas) y también eliminan la necesidad de ajustar la densidad bacteriana cada vez que se realiza el ensayo.

Almacenamiento y uniformidad de la preparación bacteriana. Tal como se describe en los ejemplos 9, 10 y 12, se identificó la densidad de la preparación bacteriana usada en el ensayo de unión como una variable importante en la reacción. A una densidad bacteriana baja la señal era débil, mientras que a una densidad bacteriana alta la señal estaba por encima del intervalo lineal. A partir de estos datos, se determinó que para la precisión, sensibilidad y capacidad de comparación de ensayos sucesivos, era necesaria una densidad

bacteriana fija. También se determinó si podría generarse una suspensión bacteriana, patrón (por ejemplo, que fuese fácil de almacenar, usar y que no fuese patógena) (por ejemplo, para su uso en una serie de ensayos que no tienen lugar al mismo tiempo (por ejemplo, en diferentes días o en diferentes semanas o meses)). Se identificaron una pluralidad de métodos de conservación e inactivación bacteriana y se sometieron a prueba incluyendo la conservación e inactivación mediante fijadores químicos (por ejemplo, etanol, glutaraldehído, formalina, DMSO), inactivación por irradiación UV y uso de suspensión bacteriana viva, congelada.

Conservación de las placas recubiertas con mucosidad. En los ensayos descritos previamente (por ejemplo, ejemplos 1-15), se recubrieron placas de 96 pocillos con mucosidad cada vez que se ejecutó el ensayo. Tal como se describe, este procedimiento requirió incubación durante la noche. Por tanto, se realizaron experimentos para determinar si podría sustituirse este procedimiento que requiere mucho tiempo (por ejemplo, mediante recubrimiento previo, placas recubiertas con mucosidad que pueden almacenarse a largo plazo). Se sometieron a prueba una variedad de métodos que incluían congelación de placas recubiertas así como secado al aire de las placas y uso de almacenamiento posterior a largo plazo (por ejemplo, con diferentes tipos de mucosidad).

Métodos.

Cultivo e inactivación de bacterias. Se hicieron crecer bacterias a 37°C en caldo Luria y se transfirieron a un medio reciente (inóculo al 10%) un día antes de las pruebas deseadas. Se sometieron a prueba múltiples métodos diferentes de inactivación y conservación de bacterias:

Congelación: se congelaron cultivos bacterianos hechos crecer a -20°C. Antes de su uso, se descongeló el cultivo a temperatura ambiente. Se congeló un lote con glicerol para proteger las células del daño durante la congelación, pero este enfoque se interrumpió a medida que la recogida de

bacterias del glicerol se volvió problemática y no producía resultados útiles.

Etanol: se añadió etanol al 99% 1:1 al cultivo bacteriano en caldo Luria para producir una disolución de etanol al 50%. Se almacenó la suspensión a 4°C.

Glutaraldehído: se usó glutaraldehído a una concentración final del 4%. Se almacenó la suspensión a 4°C.

Formalina: se usó formaldehído a una concentración final del 4%. Se almacenó la suspensión a 4°C.

UV: se irradió el cultivo bajo una lámpara UV durante 30 ó 60 minutos. Se almacenó la suspensión a 4°C.

Dimetilsulfóxido: se añadió DMSO en el cultivo a una concentración del 10%. Se almacenó la suspensión a 4°C.

Calor: se calentó el cultivo a 70°C durante 30 minutos y después se almacenó a 4°C.

Se recogieron las bacterias mediante centrifugación justo antes de su uso.

Preparación y conservación de las placas recubiertas con mucosidad. Se diluyó la mucosidad raspada del intestino de lechones en tampón NaCO_3 (pH 9,6) para producir una suspensión con 0,1-0,3 mg de proteína de mucosidad/ml. Se introdujeron 300 μl de esta suspensión en cada pocillo en una placa de IgA de 96 pocillos. Se incubó la placa a 4°C durante la noche.

En el secado al aire, se lavaron las placas dos veces con PBS y se secaron en una cabina de flujo laminar durante la noche. Se almacenaron las placas a temperatura ambiente en bolsas de plástico. Antes de su uso, se introdujeron 300 μl de PBS en cada pocillo y se dejó que la mucosidad se rehidratara durante 10 minutos, tras lo cual se retiró el PBS agitando cuidadosamente la placa invirtiéndola.

Para la congelación, se congelaron las placas a -20°C con la suspensión de mucosidad. Antes de su uso, se descongeló la placa a temperatura ambiente y se lavó tres veces con PBS.

Se lavaron las placas recientes tres veces con PBS tras el recubrimiento durante la noche con mucosidad.

Resultados

Selección inicial de los métodos de conservación bacteriana usando el ensayo radioactivo. Los tres métodos que usaron bacterias conservadas parecieron satisfactorios en comparación con el ensayo con bacterias recientes (véase la figura 23). Estos eran etanol, irradiación UV y congelación (los otros métodos se identificaron como no adecuados para el ensayo). Los datos para bacterias inactivadas por UV y DMSO no se muestran en la figura 23 puesto que se usaron suspensiones bacterianas diferentes. La inactivación por DMSO inhibió espectacularmente la adherencia bacteriana mientras que la irradiación UV de las bacterias de prueba produjo relativamente buenos resultados de adherencia.

Además de la adherencia absoluta, también se caracterizó la capacidad del método para detectar el efecto de la inhibición de unión del agente de prueba. Los resultados para los métodos de conservación bacteriana distintos de DMSO e irradiación UV se muestran en la figura 23. Independientemente del método elegido, el ensayo pudo revelar que Bio-Mos inhibió la adherencia de *E. coli*.

Ensayos de ELISA con los métodos de conservación bacteriana seleccionados. Basándose en estos resultados, se sometieron a prueba tres métodos de inactivación bacteriana en el sistema de detección bacteriana de ELISA. Aunque la presente invención no se limita a ningún mecanismo de acción y no es necesario un entendimiento del mecanismo de acción para poner en práctica la invención, es posible que la fijación de las bacterias mediante cualquiera de los métodos mencionados anteriormente cambie las características antigénicas de las bacterias conduciendo de ese modo al fallo de los métodos basados en anticuerpos para detectar las bacterias moduladas. Sin embargo, el método de ELISA pareció funcionar para las preparaciones bacterianas sometidas a prueba. De los métodos de inactivación bacteriana, la inactivación por UV y la congelación fueron mejores que la conservación en etanol

considerando la eficacia de adhesión bacteriana absoluta, tal como se muestra en la figura 24. Sin embargo, estos métodos tienen inconvenientes importantes cuando se considera el aspecto práctico de su uso: la suspensión bacteriana inactivada por UV es estable sólo cuando no está abierta, pero se estropea fácilmente por otras bacterias cuando se expone a microbios medioambientales. Las bacterias congeladas, por otra parte, todavía están vivas y pueden comenzar a crecer o ser metabólicamente activas tras la descongelación. Esto influirá en la precisión y reproducibilidad del ensayo. Además, han de considerarse asuntos de seguridad cuando se trabaja con bacterias vivas.

Optimización de la concentración de etanol en la suspensión bacteriana. Aunque parecía que la conservación bacteriana no era ideal, se determinó continuar intentando desarrollar este enfoque debido a los otros beneficios del método proporcionado. Inicialmente, se utilizó etanol a una concentración del 50% basándose en su capacidad para destruir bacterias. Sin embargo, se sometieron a prueba otras concentraciones de alcohol para determinar el efecto de la concentración de alcohol en la adhesión bacteriana. Se determinó que la concentración de etanol afectaba significativamente a la eficacia de la adherencia bacteriana. Aunque la presente invención no se limita a ningún mecanismo de acción y no es necesaria una comprensión del mecanismo de acción para poner en práctica la invención, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona que el etanol desprende o destruye fimbrias esenciales para la unión, o cambia otras propiedades antigénicas de las bacterias. El etanol a una concentración del 40% parecía significativamente mejor que el etanol al 50% cuando se considera la eficacia de adherencia. Se observó repetidamente la tendencia no lineal sorprendente mostrada en la figura 25.

Conservación de las placas recubiertas con mucosidad. Se sometió a prueba la capacidad de las bacterias para adherirse

a placas recubiertas con mucosidad conservadas mediante secado al aire y congelación comparándolas con placas recién recubiertas. En pruebas con bacterias radiomarcadas, una placa secada al aire era comparable con una placa recién recubierta, mientras que la placa congelada dio recuentos algo superiores. Se sometió a prueba cada método usando un método de ELISA no radioactivo de la invención.

Tal como se muestra en la figura 26, las placas secadas al aire dieron una señal más débil que las placas almacenadas congeladas y recién recubiertas. Sin embargo, el efecto de Bio-Mos en la adhesión bacteriana era claro en todos los métodos usados. Por tanto, la presente invención proporciona un método de uso de placas recubiertas con mucosidad generadas y almacenadas anteriormente (por ejemplo, placas secadas al aire o almacenadas congeladas).

Tiempo de rehidratación de las placas secadas. Se sometieron a prueba periodos de tiempo desde 1 minuto hasta 12 horas para rehidratar las placas secadas al aire antes de ejecutar el ensayo. Se determinó que el tiempo de rehidratación no influyó en gran medida en los resultados del ensayo, pero con el fin de obtener resultados comparables, se utilizó un tiempo de rehidratación constante (por ejemplo, 10 minutos) para todos los ensayos posteriores.

Concentración de la mucosidad en los pocillos. Previamente se ha sometido a prueba la concentración de mucosidad en los pocillos, pero se decidió someter a prueba si la adherencia de las bacterias podría potenciarse con una concentración de la mucosidad superior. Se sometieron a prueba tres niveles de mucosidad en el tampón de recubrimiento; los niveles correspondieron a 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml y 0,3 mg/ml de proteína, respectivamente. La adherencia de las bacterias claramente mejoró cuando se aumentó la concentración de la mucosidad, 0,3 mg de proteína/ml produciendo la adherencia más alta.

Detección de una alteración en la adherencia bacteriana usando un agente de prueba (por ejemplo, Bio-Mos). Basándose en experimentos de ELISA y centelleo preliminares, se utilizaron bacterias inactivadas en etanol y placas secadas al
5 aire para someter a prueba el efecto de un agente de prueba (por ejemplo, Bio-Mos) y su capacidad para alterar la adherencia de las bacterias a la mucosidad. Los datos obtenidos mostraron que la curva resultante era altamente similar a la curva obtenida cuando se lleva a cabo ELISA con
10 bacterias y placas recientes.

Aplicabilidad a otros tipos de mucosidades. Se sometió a prueba ELISA (usando placas almacenadas y bacterias inactivadas con etanol) con otros tipos de mucosidades. El ELISA produjo datos útiles usando múltiples tipos de
15 mucosidades incluyendo íleon proximal de cerdo, colon distal de cerdo, duodeno de pollo de engorde y ciegos de pollo de engorde. La presente invención proporciona que ELISA usando placas almacenadas y bacterias inactivadas con EtOH y almacenadas proporciona datos útiles referentes, y que el
20 efecto de una capacidad del agente de prueba para bloquear la unión/adhesión de bacterias (por ejemplo, Bio-Mos) es similar independientemente de la fuente de mucosidad. Por tanto, la presente invención proporciona composiciones (por ejemplo, bacterias inactivadas con etanol y placas recubiertas con
25 mucosidad secadas al aire) y métodos (por ejemplo, ELISA no radioactivo) útiles para monitorizar y caracterizar la unión/la adhesión de células bacterianas a la mucosidad que son fáciles de usar, seguros, y los materiales se almacenan y transportan fácilmente.

30 Caracterización adicional del ensayo de unión bacteriana no radioactivo. Se realizaron los experimentos durante el desarrollo de la invención con el fin de determinar si los ensayos no radioactivos proporcionados en el presente documento eran fiables, reproducibles y de variabilidad
35 minimizada. Se sometió a prueba la variación entre diferentes

lotes de bacterias y se determinó la reproducibilidad del ensayo (por ejemplo, ejecutando en diferentes días (variación entre placas) y monitorizando la variación en placas de muestras repetidas).

5

Métodos

10

Cultivo e inactivación de bacterias. Se hicieron crecer bacterias a 37°C en caldo Luria y se transfirieron a un medio reciente (inóculo al 10%) un día antes de la inactivación con etanol. Se inactivaron y conservaron las bacterias añadiendo etanol directamente en el cultivo hecho crecer durante la noche hasta la concentración final de 40% vol/vol. Se almacenó la suspensión a 4°C y se recogió mediante centrifugación justo antes de su uso. Se suspendió el sedimento en el volumen original de caldo Luria para obtener una suspensión con aproximadamente 10^8 bacterias/ml.

15

20

Preparación y conservación de placas recubiertas con mucosidad. Se diluyó la mucosidad raspada de intestinos de lechones en tampón NaCO_3 (pH 9,6) para producir una suspensión con 0,3 mg de proteína de mucosidad/ml. Se introdujeron 300 μl de esta suspensión en cada pocillo en una placa de IgA de 96 pocillos. Se incubó la placa a 4°C durante la noche. Entonces se lavaron las placas dos veces con PBS y se secaron en cabina de flujo laminar durante la noche y se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas de plástico. Antes de su uso, se introdujeron 300 μl de PBS en cada pocillo y se dejó que la mucosidad se rehidratara durante 10 minutos, tras lo cual se retiró el PBS agitando cuidadosamente la placa invirtiéndola.

25

30

Método de ELISA. Se dejaron rehidratar placas secadas al aire, recubiertas con mucosidad durante 10 minutos con PBS antes de añadir 100 μl de suspensión bacteriana y 100 μl de o bien suspensión de Bio-Mos en PBS o bien 100 μl de PBS puro. Se asignaron al azar las muestras de tratamientos a los pocillos para evitar errores sistemáticos. Se incubó la placa durante 1 h a temperatura ambiente, protegida de la luz y la

evaporación. Tras la incubación, se lavó la placa tres veces con PBS y se añadió el tampón de bloqueo (suero bovino fetal al 10%). Se incubó la placa tal como se describió anteriormente y se vació. Se añadió el anticuerpo primario, se incubó la placa y se lavó tal como se describió anteriormente. Se añadió el anticuerpo secundario y se incubó la placa y se lavó tal como se describió anteriormente. Finalmente, se añadió el sustrato de TMB a los pocillos y se dejó que se desarrollara el color durante 15-30 minutos. Se detuvo la reacción con ácido sulfúrico y se midió la absorbancia a 450 nm.

Análisis estadístico. Se estimaron los coeficientes de variación para valores que se graduaron de modo que el promedio de cero muestras para cada placa era del 100%. Entonces, se calcularon estimaciones dentro de la placa y entre placas para coeficientes de variación para estos valores graduados de niveles 1 y 2 usando los MSE de ANOVA unilateral para entre tratamientos y dentro del tratamiento como estimaciones de varianza. Se realizó esta estimación por separado para diferentes niveles de Bio-Mos. Se realizó el análisis de potencia para proporcionar una estimación sobre cómo serían necesarias muchas repeticiones para detectar una diferencia entre dos tratamientos. Se usaron nivel de riesgo $\alpha = 0,05$ y potencia = 0,8 ó 0,9.

Resultados

Variación medida de las muestras repetidas analizadas en la misma placa. Para fines de evaluación del producto es importante que cuando se ejecuten varias repeticiones en la misma placa, el ensayo sea repetible, y por tanto proporcione una prueba fiable, cuyo límite de detección se conoce y se considera suficiente para el uso práctico del ensayo. Para este fin, se ejecutó el ensayo en la placa recubierta con mucosidad homogénea, y con un único lote de la preparación bacteriana. La figura 28 muestra que existe alguna variación entre pocillos, pero el efecto de inhibición de la adherencia

de Bio-Mos añadido era claro y repetido. La comparación con los pocillos control mostró los niveles de 1 mg/ml y 2 mg/ml de Bio-Mos diferían del control con el valor de $p < 0,0001$. Sin embargo, los dos niveles de Bio-Mos no diferían entre sí tal como se muestra en la figura 28. Se calcularon los coeficientes de variación por separado para cada tratamiento.

Variación medida a partir de cuatro placas con mucosidad diferentes

Para los fines de evaluación del producto es importante que el ensayo sea repetible. Para determinar si el ensayo era repetible (por ejemplo, en diferentes momentos usando los mismos reactivos), se repitió el experimento del que se muestran los datos en la figura 28 4 veces en cuatro días diferentes. Se llevó a cabo cada conjunto de pruebas en un día y con una placa con mucosidad diferente, pero con una preparación bacteriana individual. Se ilustran los resultados en los cuatro paneles de la figura 29. La variación promedio en diferentes placas era el 14%, 14% y 13% para las placas 1, 2 y 3, respectivamente, y de hasta el 22% para la placa 4. La tabla 1, a continuación, muestra los CV calculados para cada prueba en cada placa. Parecía que había una tendencia de que el CV era inferior para los pocillos control que para los que tenían Bio-Mos. El CV promedio calculado de las cuatro placas de prueba y todos los tratamientos era del 16% (tabla 1).

Tabla 1.

Prueba	CV medido de las repeticiones de prueba indicadas				
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Media
Sin Bio-Mos	1%	8%	8%	23%	1%
Bio-Mos 1 mg/ml	13%	12%	15%	24%	16%
Bio-Mos 2 mg/ml	19%	23%	14%	21%	19%
Todos	14%	14%	13%	22%	16%

Diferencia en la señal absoluta medida a partir de cuatro placas con mucosidad diferentes. La figura 30 muestra los datos en la figura 29, pero dispuestos de una manera diferente para hacer hincapié en la magnitud de la señal absoluta en diferentes pruebas. Se manejaron las placas de manera similar pero independiente. Se asignaron las muestras aleatoriamente a los pocillos para evitar errores sistemáticos debido a factores tales como posición del pocillo. Es notable que los niveles de señales absolutos varían de día a día incluso aunque se haya intentado repetir cada etapa del ensayo exactamente de la misma manera. Aunque la presente invención no se limita a ningún mecanismo de acción y no es necesaria una comprensión del mecanismo de acción para poner en práctica la invención, en algunas realizaciones, la variación es debe a una o más etapas incluyendo: 1. Unión a mucosidad 2. Lavado de los pocillos 3. Unión bacteriana 4. Eliminación mediante lavado de las bacterias libres 5. Unión del anticuerpo primario 6. Lavado 7. Unión del anticuerpo secundario 8. Reacción de desarrollo de color. Sin embargo, la presente invención proporciona que aunque existe alguna variación en el desarrollo de color, la variación es limitada y no inhibe la generación de datos útiles (por ejemplo, con respecto a la capacidad de uno o más agentes de prueba para alterar (por ejemplo, inhibir) la unión bacteriana a la mucosidad).

Comparación de la variación entre placas cuando se usan señales relativas. Cuando los tratamientos de control relevantes estaban presentes en la misma placa que los productos que iban a someterse a prueba, la variación de señal entre placas no era problemática. Se cambiaron todas las señales a valores relativos dando a la media de todos los pocillos control el valor de 1, y los pocillos con valores de compuestos de prueba se normalizaron a esto. Se muestran los resultados normalizados en la figura 31. Cuando se presentaron como señales relativas se observó que la magnitud detectada del efecto de Bio-Mos era casi idéntica en todas las placas.

Variación entre lotes de bacterias. Para someter a prueba la variación entre lotes de bacteria y placas, se generaron múltiples cultivos bacterianos de crecimiento independiente, y también se generaron múltiples placas recubiertas con mucosidad, preparadas de manera independiente. Se produjeron los lotes de manera completamente independiente, usando diferentes lotes de PBS, caldo Luria y haciendo crecer cada cultivo a partir de una nueva perla de almacenamiento congelada. Se realizó un ensayo ELISA similar con cada una de las placas y cultivos independientes. Se muestran los resultados de este experimento en la figura 32.

Tal como se muestra en la figura 32, los niveles absolutos de las señales variaron de un experimento a otro, pero cuando se compararon con la señal de las pruebas control, los estudios totalmente independientes produjeron datos que casi caracterizan el efecto idéntico de Bio-Mos en la unión (véase la figura 32)

Análisis de potencia. Usando los datos experimentales, fue posible estimar los números de repeticiones requeridas para lograr una potencia de detección deseada. Por potencia de detección se entiende que la diferencia en porcentaje entre las respuestas de dos compuestos de prueba o tratamientos que proporciona una diferencia estadísticamente significativa entre sí. La figura 33 y la tabla 2 a continuación muestran la relación entre la potencia de detección y el número de repeticiones.

La presente invención proporciona que si se están comparando lotes de agentes de prueba, son suficientes tan sólo 5 (o menos) repeticiones para establecer que dos agentes (o diluciones de los mismos) son diferentes cuando el producto A, por ejemplo, está inhibiendo la adherencia en el 50%, mientras que el producto B está inhibiendo en el 66%, entonces 5 repeticiones serían suficientes.

Tabla 2. Ejemplos de potencia de detección

Número de repeticiones	Diferencia detectada
5	31%
10	22%
15	18%

Basándose en el 80% de potencia a un 5% de nivel de riesgo

5

Ejemplo 19

Generación de preparaciones bacterianas funcionales estables y placas recubiertas con mucosidad

10

15

20

25

30

Se realizaron los experimentos durante el desarrollo de realizaciones de la invención en un esfuerzo por preparar una suspensión bacteriana que tiene las siguientes características: fimbrias presentes y/o retenidas en las bacterias preparadas que pueden mediar la adherencia bacteriana a la mucosidad, siendo las fimbrias numerosas y estructuralmente intactas permitiendo que las bacterias se unan a y/o se adhieran a la mucosidad con alta afinidad; los antígenos de la superficie bacteriana que conservan sus características inmunológicas permitiendo de ese modo la unión eficaz de anticuerpos primarios usados en ELISA y la destrucción y/o inactivación de las bacterias de tal manera que no altere la unión a anticuerpo; y/o la preparación de bacterias llevada a cabo de tal manera que se genere una formulación que tenga una larga duración y permita el uso sencillo e inmediato en ELISA.

Se realizaron modificaciones del ensayo de unión bacteriana no radioactiva incluyendo las preparaciones de inóculo bacteriano del ejemplo 18. Se realizaron los experimentos usando un procedimiento de destrucción doble menos agresivo y más suave (por ejemplo, para conservar los antígenos de superficie bacteriana y/o fimbrias (por ejemplo, para la unión al anticuerpo)). Tal como se describe a continuación, un procedimiento de liofilización proporcionó un

almacenamiento duradero del inóculo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el procedimiento de liofilización permitió la generación de ampollas de un solo uso que contenían exactamente el número de bacteria correcto (por ejemplo, para su uso con una placa recubierta con mucosidad en un ensayo (por ejemplo, para su uso en un kit)). Estas composiciones y métodos novedosos redujeron significativamente posibles errores por parte del técnico (por ejemplo, al tener que determinar el tamaño del inóculo correcto), redujeron el riesgo de contaminación del inóculo y minimizaron el deterioro de la preparación bacteriana a lo largo del tiempo. Las ampollas liofilizadas eran estables a temperatura ambiente y son transportables (por ejemplo, globalmente) sin riesgo de pérdida de funcionalidad.

Método de preparación bacteriana. Se hicieron crecer bacterias (por ejemplo, *E. coli* cepa F4+ (anteriormente K88)) a 37°C en caldo Luria Bertani. Se recogieron los cultivos mediante centrifugación, se resuspendieron en solución salina y se enumeraron instantáneamente mediante recuento microscópico. Se destruyeron las suspensiones bacterianas calentando a 65°C durante 45 minutos seguido por radiación UV durante 45 minutos. Entonces se dividieron los lotes bacterianos en ampollas, que contenía cada una 1×10^9 células bacterianas y se congelaron a 80°C. Tras 24 horas de congelación, se liofilizaron y sellaron las ampollas. Se almacenaron las ampollas a 4°C. Se determinó el número de *E. coli* viables en las ampollas mediante dos enfoques diferentes, siembra en placa directa y uso del número más probable (MPN). Se prepararon diluciones en serie diez veces en cinco repeticiones para cada uno de los lotes bacterianos para la siembra en placa directa. El medio usado fue un caldo Luria Berthani no selectivo rico. Se contaron las colonias tras 2 días de incubación a 37°C. Se realizó MPN mediante dilución en serie del contenido de la ampolla directamente en caldo nutritivo no selectivo rico. Se realizó MPN en tres

repeticiones (MPN de 3 tablas). Se registró en primer lugar el crecimiento en los tubos de MPN tras 2 días a 37°C y luego de nuevo tras dos semanas. En el método de MPN, todo el contenido de la ampolla bacteriana ($\sim 10^9$ células) se suspendió en el primer tubo menos diluido. Por tanto, MPN proporciona que debe detectarse una bacteria viable individual. En el recuento en placa, se suspendió en contenido de la ampolla en 10 ml de diluyente, de los que 0,1 ml se extendieron sobre placas. Por tanto, ausencia de crecimiento representa que la ampolla contiene menos de 100 células de *E. coli* viables. Se sometieron a prueba cinco lotes diferentes de preparación bacteriana (ampollas) para determinar la viabilidad. Los resultados de ambos métodos de prueba, siembra en placa directa y enumeración de MPN, no mostraron signos de viabilidad. Por tanto, la presente invención proporciona un nuevo método de destrucción doble que proporciona una preparación bacteriana altamente reproducible y constante (por ejemplo, tal como se determina en el ensayo de adherencia a mucosidad (véase, por ejemplo, la figura 34)).

Producción y estabilización de placas recubiertas con mucosidad. Se realizaron experimentos durante el desarrollo de la invención con el fin de preparar una placa recubierta con mucosidad que poseía las siguientes características: recubrimiento con mucosidad de calidad uniforme entre pocillos de cada placa y entre diferentes placas; placas con mucosidad que se estabilizan de una manera tal que no destruye las bacterias y/o las características de unión de la mucosidad recubierta sobre las placas (por ejemplo, que conserva las propiedades de superficie de la mucosidad implicadas en la unión de bacterias); y/o placas recubiertas con mucosidad que son estables (por ejemplo, a temperatura ambiente o más fría) durante largos periodos de tiempo (por ejemplo, días, semanas, meses, un año o más) que pueden estar listas para su uso (por ejemplo, en un ELISA).

Placas de microtitulación recubiertas con mucosidad. Se recogió la mucosidad de cerdos recién sacrificados raspando la mucosidad del intestino delgado distal (íleon). Se lavó y se aclaró la mucosidad mediante centrifugación tal como se describió en el ejemplo 18. Se cuantificaron las proteínas de la mucosidad mediante el uso del kit de ensayo de proteínas mediante ácido bicinconínico de SIGMA (B9643). Se recubrieron placas Nunc MaxiSorb (formato de 96 pocillos) con disolución tampón de mucosidad que contenía 0,1 mg de proteína de mucosidad/ml de tampón de recubrimiento. Se prepararon independientemente lotes de placas de microtitulación en días diferentes y se almacenaron a +4°C hasta el día de las pruebas. Se ejecutó el ensayo de adherencia bacteriana, con y sin Bio-Mos, en estas placas para someter a prueba la variación entre placas. El promedio de inhibición entre placas fue del 81,9%, del que los lotes individuales se desviaron en el promedio del 1,5% (véase, por ejemplo, la figura 35).

Se realizaron experimentos adicionales durante el desarrollo de la invención para investigar la estabilidad de las placas con mucosidad cuando se almacenaban con disolución tampón de mucosidad durante 1 y 2 semanas en un envase sellado a vacío a 4°C. Tras dos semanas de almacenamiento, se sometieron a prueba las placas con mucosidad con el fin de determinar si podían usarse en un ensayo de adherencia con preparación bacteriana. Los resultados se muestran en la figura 36. Las señales absolutas en el ensayo muestran un ligero deterioro de la intensidad. Sin embargo, en estudios anteriores, se observaron variaciones en la intensidad con respecto a la variación entre placas y puede que no tenga nada que ver con el almacenamiento de las placas. La aplicación del producto antiadherencia, Bio-Mos, demostró que se observaba una inhibición aproximada del 80%. Por tanto, la presente invención proporciona métodos de generación de placas recubiertas con mucosidad, y las propias placas recubiertas con mucosidad, que pueden almacenarse y utilizarse en un punto

de tiempo posterior (por ejemplo, para ensayos de adherencia). Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona una placa recubierta con mucosidad y/o una preparación bacteriana (por ejemplo, almacenada en una ampolla) que pueden almacenarse o bien individualmente o bien juntas (por ejemplo, en un envase sellado a vacío (véase, por ejemplo, la figura 37)), que puede estar comercialmente disponible para la adquisición y/o el uso (por ejemplo, en un ensayo de adherencia).

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la memoria descriptiva anterior se incorporan al presente documento como referencia. Diversas modificaciones y variaciones de las composiciones y métodos descritos de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse excesivamente a tales realizaciones específicas. De hecho, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en los campos relevantes estén dentro del alcance de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Kit que comprende un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas no radioactivo (ELISA) para someter a ensayo la adherencia y antiadherencia bacteriana con mucosidad y/o células epiteliales que comprende un soporte sólido que tiene mucosidad y/o células epiteliales recubiertas sobre el mismo, una muestra que comprende bacterias, un anticuerpo primario específico para dichas bacterias, y un anticuerpo secundario marcado de forma detectable específico para dicho anticuerpo primario unido a dichas bacterias.
2. Kit según la reivindicación 1, que comprende además un sustrato que permite la visualización del anticuerpo secundario marcado de forma detectable.
3. Kit según la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo secundario marcado de forma detectable comprende un marcador enzimático.
4. Kit según la reivindicación 3, en el que dicho sustrato es una composición para proporcionar una señal quimioluminiscente, fluorimétrica o colorimétrica en presencia de dicho marcador enzimático.
5. Kit según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo secundario marcado de forma detectable comprende inmunoglobulinas de cerdo anti-IgG acopladas a peroxidasa.
6. Kit según la reivindicación 4, en el que dicha composición colorimétrica es 3,3',5,5'-tetrametilbencidina.
7. Kit según la reivindicación 1, en el que dicho soporte sólido es una placa de 96 pocillos.
8. Kit según la reivindicación 1, en el que dichas bacterias son bacterias *E. coli*.
9. Kit según la reivindicación 1, en el que dicha mucosidad se selecciona del grupo que consiste en mucosidad del ileon proximal de cerdo, mucosidad del colon distal de

cerdo, mucosidad del duodeno de pollo de engorde y mucosidad del ciego de pollo de engorde.

- 5 10. Kit según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo primario es un anticuerpo policlonal conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) específico para los serotipos antigénicos O y K de *E. coli*.
- 10 11. Kit según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo primario es un anticuerpo policlonal específico para los serotipos antigénicos O y K de *E. coli*.
12. Kit según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo secundario es un anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-HRP purificado por afinidad.
- 15 13. Kit según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo secundario es un anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-AP purificado por afinidad.
14. Kit según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo secundario es un anticuerpo policlonal conjugado con FITC frente a IgG de cabra.
- 20 15. Kit según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo secundario es estreptavidina-fosfatasa alcalina de *Streptomyces avidinii*.
- 25 16. Kit según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo secundario es estreptavidina-peroxidasa de *Streptomyces avidinii*.
17. Método para medir la adherencia y antiadherencia entre bacterias y mucosidad y/o células epiteliales que comprende
- 30 a) proporcionar
- i) una muestra que comprende bacterias; y
- ii) mucosidad y/o células epiteliales u otras; y
- b) combinar dicha muestra que comprende bacterias y dicha mucosidad y/o células epiteliales dentro de un ensayo colorimétrico no radioactivo en condiciones tales
- 35 que se mide la adherencia y la antiadherencia entre

dichas bacterias y dicha mucosidad y/o células epiteliales.

18. Método según la reivindicación 17, en el que dicho ensayo colorimétrico no radioactivo es un ensayo ELISA.

5 19. Método según la reivindicación 17, en el que dichas condiciones comprenden añadir anticuerpos primarios específicos para dichas bacterias unidas con mucosidad y/o células epiteliales.

10 20. Método según la reivindicación 19, en el que dichas condiciones comprenden añadir anticuerpos secundarios marcados de forma detectable específicos para dichos anticuerpos primarios unidos con dichas bacterias.

15 21. Método según la reivindicación 20, en el que dichas condiciones comprenden añadir un sustrato que permite la visualización de dichos anticuerpos secundarios marcados de forma detectable unidos con dichos anticuerpos primarios.

20 22. Método según la reivindicación 17, en el que dicha mucosidad y/o epitelio está recubierto sobre una placa de microtitulación.

23. Método según la reivindicación 20, en el que dicho anticuerpo secundario marcado de forma detectable comprende un marcador enzimático.

25 24. Método según la reivindicación 21, en el que dicho sustrato es una composición para proporcionar una señal quimioluminiscente, fluorimétrica o colorimétrica en presencia de dicho marcador enzimático.

30 25. Método según la reivindicación 24, en el que dicho anticuerpo secundario marcado de forma detectable comprende inmunoglobulinas de cerdo anti-IgG acopladas a peroxidasa.

26. Método según la reivindicación 24, en el que dicha composición colorimétrica es 3,3',5,5'-tetrametilbencidina.

27. Método según la reivindicación 17, en el que dichas bacterias son bacterias *E. coli*.
28. Método según la reivindicación 17, en el que dicha mucosidad se selecciona del grupo que consiste en mucosidad del íleon proximal de cerdo, mucosidad del colon distal de cerdo, mucosidad del duodeno de pollo de carne y mucosidad del ciego de pollo de engorde.
29. Método según la reivindicación 19, en el que dicho anticuerpo primario es un anticuerpo policlonal conjugado con HRP específico para los serotipos antigénicos O y K de *E. coli*.
30. Método según la reivindicación 19, en el que dicho anticuerpo primario es un anticuerpo policlonal específico para los serotipos antigénicos O y K de *E. coli*.
31. Método según la reivindicación 20, en el que dicho anticuerpo secundario es un anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-HRP purificado por afinidad.
32. Método según la reivindicación 20, en el que dicho anticuerpo secundario es un anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-AP purificado por afinidad.
33. Método según la reivindicación 20, en el que dicho anticuerpo secundario es un anticuerpo policlonal conjugado con FITC frente a IgG de cabra.
34. Método según la reivindicación 20, en el que el anticuerpo secundario es estreptavidina-fosfatasa alcalina de *Streptomyces avidinii*.
35. Método según la reivindicación 20, en el que el anticuerpo secundario es estreptavidina-peroxidasa de *Streptomyces avidinii*.
36. Método para identificar un agente que modula la adherencia entre bacterias y mucosidad y/o células epiteliales, que comprende
- a) proporcionar
- i) una muestra que comprende bacterias;

ii) mucosidad y/o células epiteliales; y

iii) un agente; y

b) combinar dicha muestra que comprende bacterias, dicha mucosidad y/o células epiteliales, y dicho agente dentro de un ensayo colorimétrico no radioactivo en condiciones tales que se mide la adherencia entre dichas bacterias y dicha mucosidad y/o células epiteliales;

c) comparar dicha adherencia bacteriana en presencia y ausencia de dicho agente; y

d) identificar dicho agente como un modulador de adherencia entre dichas bacterias y dicha mucosidad y/o células epiteliales si dicha adherencia medida es superior o inferior a la adherencia entre dichas bacterias y dicha mucosidad y/o células epiteliales en ausencia de dicho agente.

37. Método según la reivindicación 36, en el que dicho ensayo colorimétrico no radioactivo es un ensayo ELISA.

38. Método según la reivindicación 36, en el que dichas condiciones comprenden añadir anticuerpos primarios específicos para dichas bacterias unidas con dicha mucosidad y/o células epiteliales.

39. Método según la reivindicación 38, en el que dichas condiciones comprenden añadir anticuerpos secundarios marcados de forma detectable específicos para dichos anticuerpos primarios unidos con dichas bacterias.

40. Método según la reivindicación 39, en el que dichas condiciones comprenden añadir un sustrato que permite la visualización de dichos anticuerpos secundarios marcados de forma detectable unidos con dichos anticuerpos primarios.

41. Método según la reivindicación 36, en el que dicha mucosidad está recubierta sobre una placa de microtitulación.

42. Método según la reivindicación 39, en el que dicho anticuerpo secundario marcado de forma detectable comprende un marcador enzimático.
- 5 43. Método según la reivindicación 40, en el que dicho sustrato es una composición para proporcionar una señal quimioluminiscente, fluorimétrica o colorimétrica en presencia de dicho marcador enzimático.
- 10 44. Método según la reivindicación 43, en el que dicho anticuerpo secundario marcado de forma detectable comprende inmunoglobulinas de cerdo anti-IgG acopladas a peroxidasa.
- 15 45. Método según la reivindicación 43, en el que dicha composición colorimétrica es 3,3',5,5'-tetrametilbencidina.
- 20 46. Método según la reivindicación 36, en el que dichas bacterias son bacterias *E. coli*.
47. Método según la reivindicación 36, en el que dicha mucosidad y/o células epiteliales se seleccionan del grupo que consiste en mucosidad del íleon proximal de cerdo, mucosidad del colon distal de cerdo, mucosidad de duodeno de pollo de engorde y mucosidad del ciego de pollo de engorde.
- 25 48. Método según la reivindicación 38, en el que dicho anticuerpo primario es un anticuerpo policlonal conjugado con HRP específico para los serotipos antigénicos O y K de *E. coli*.
- 30 49. Método según la reivindicación 38, en el que dicho anticuerpo primario es un anticuerpo policlonal específico para los serotipos antigénicos O y K de *E. coli*.
50. Método según la reivindicación 39, en el que dicho anticuerpo secundario es un anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-HRP purificado por afinidad.

51. Método según la reivindicación 39, en el que dicho anticuerpo secundario es un anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra-AP purificado por afinidad.
- 5 52. Método según la reivindicación 39, en el que dicho anticuerpo secundario es un anticuerpo policlonal conjugado con FITC frente a IgG de cabra.
53. Método según la reivindicación 39, en el que el anticuerpo secundario es estreptavidina-fosfatasa alcalina de *Streptomyces avidinii*.
- 10 54. Método según la reivindicación 39, en el que el anticuerpo secundario es estreptavidina-peroxidasa de *Streptomyces avidinii*.
- 15 55. Método según la reivindicación 36, en el que dicho agente se selecciona de una lista que consiste en una molécula que se produce de manera natural, una molécula derivada de manera sintética y una molécula derivada de manera recombinante.
- 20 56. Composición que comprende un agente, en la que dicho agente es un modulador de adherencia bacteriana con mucosidad y/o células epiteliales, en la que dicho agente se identifica mediante un procedimiento que comprende:
- a) proporcionar
- 25 i) una muestra que comprende bacterias;
- ii) mucosidad y/o células epiteliales; y
- iii) un agente; y
- b) combinar dicha muestra que comprende bacterias, dicha mucosidad y/o células epiteliales y dicho agente dentro de un ensayo colorimétrico no radioactivo en condiciones
- 30 tales que se mide la adherencia entre dichas bacterias y dicha mucosidad y/o células epiteliales;
- c) comparar dicha adherencia bacteriana en presencia y ausencia de dicho agente; e
- d) identificar dicho agente como un modulador de
- 35 adherencia entre dichas bacterias y dicha mucosidad y/o

células epiteliales si dicha adherencia medida es superior o inferior a la adherencia entre dichas bacterias y dicha mucosidad y/o células epiteliales en ausencia de dicho agente.

- 5 57. Composición según la reivindicación 56, estando dicha composición dentro de un producto alimenticio configurado para su consumo por un sujeto seleccionado del grupo que consiste en ganado, animales, peces y moluscos.

RESUMEN

La presente invención se refiere de manera general a métodos para detectar, identificar y medir la adherencia bacteriana a mucosidad y células epiteliales. En particular, la presente invención proporciona ensayos para detectar e identificar la presencia o ausencia de adherencia bacteriana a mucosidad (células epiteliales (por ejemplo, presente en los intestinos)), u otra parte de un animal en la que pueden estar presentes bacterias, y métodos para identificar y caracterizar (por ejemplo, la eficacia de) moduladores de adherencia bacteriana a mucosidad y células epiteliales, u otra parte del animal en la que las pueden estar presentes bacterias.

DIBUJOS

FIGURA 1

Efecto de la concentración de la mucosidad sobre la adherencia bacteriana

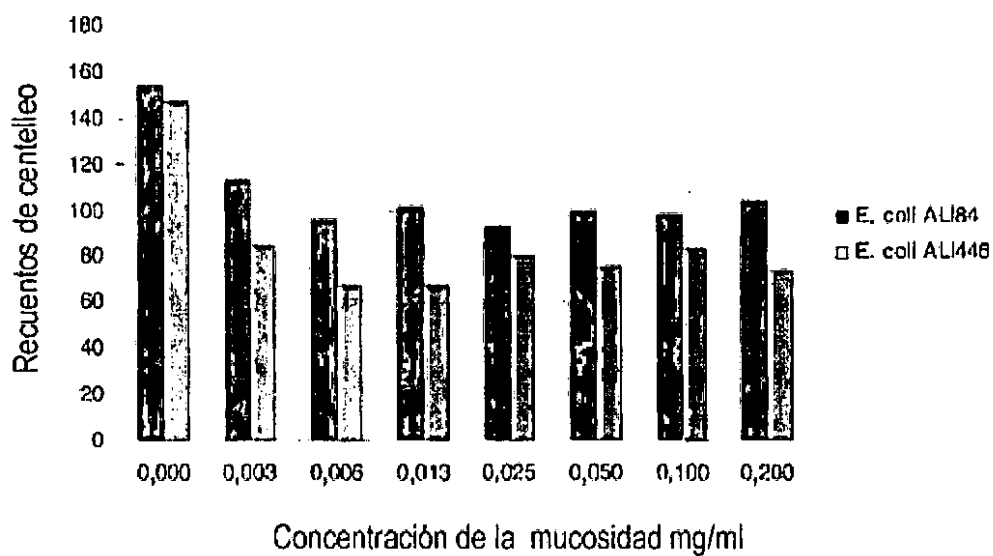


FIGURA 2

Efectos de los anticuerpos primarios sobre la adherencia de *E. coli* AL184

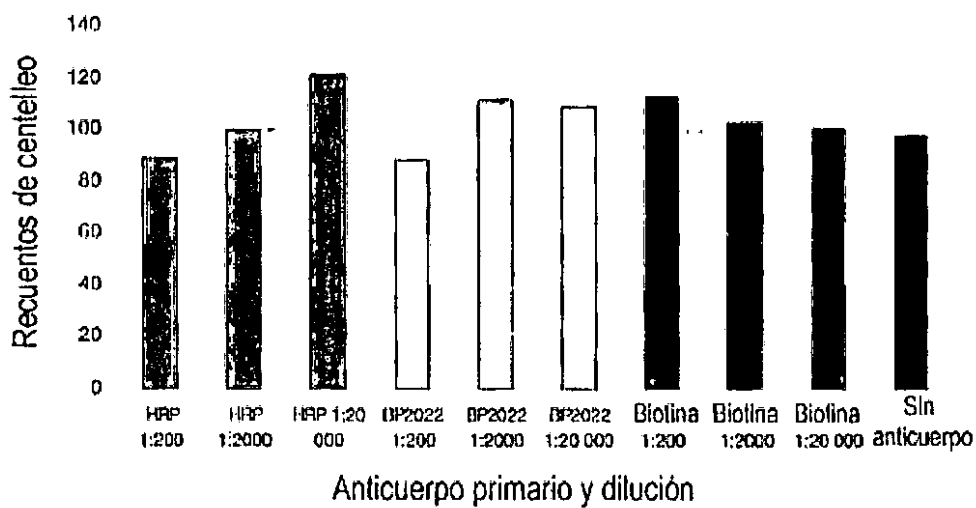


FIGURA 3

Efectos de los anticuerpos primarios sobre la adherencia de *E. coli* ALI446

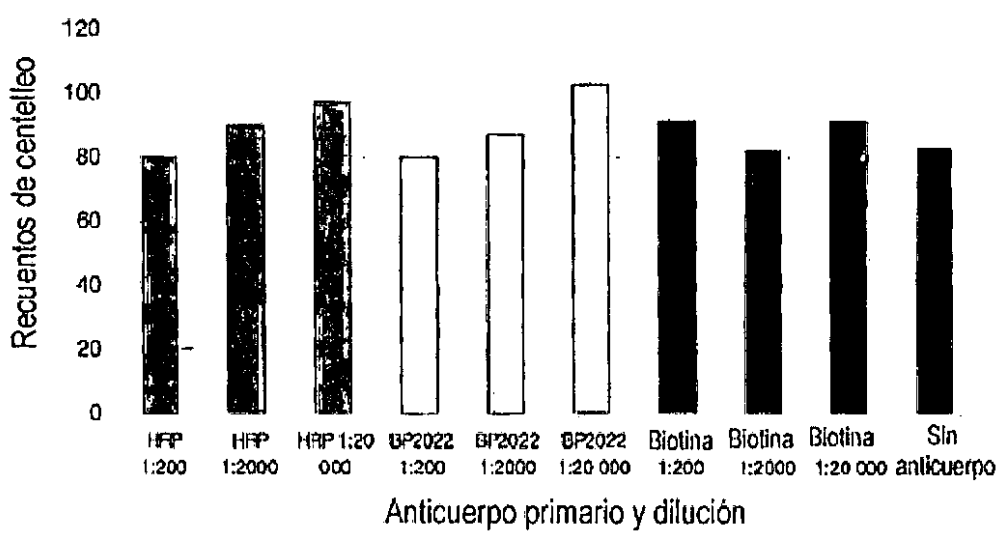


FIGURA 5

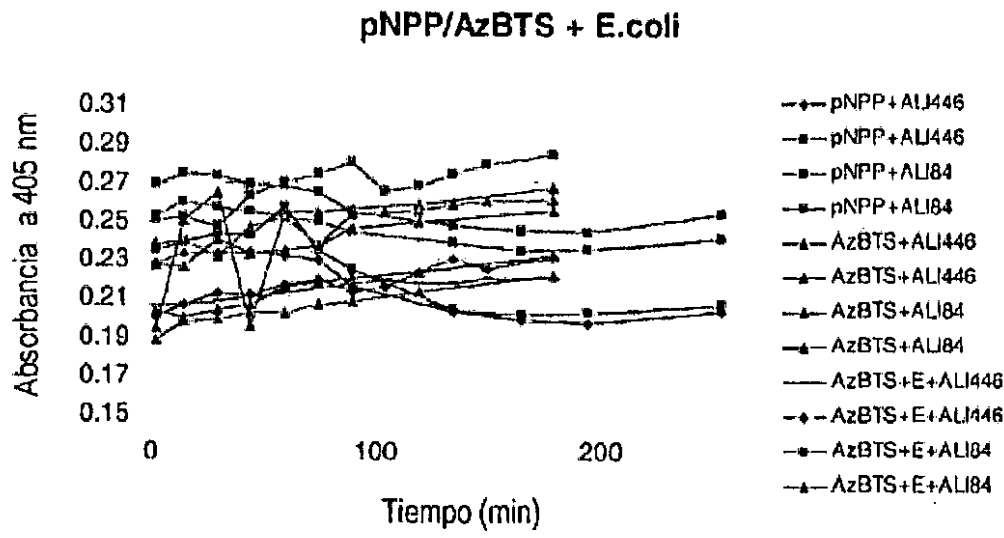


FIGURA 6

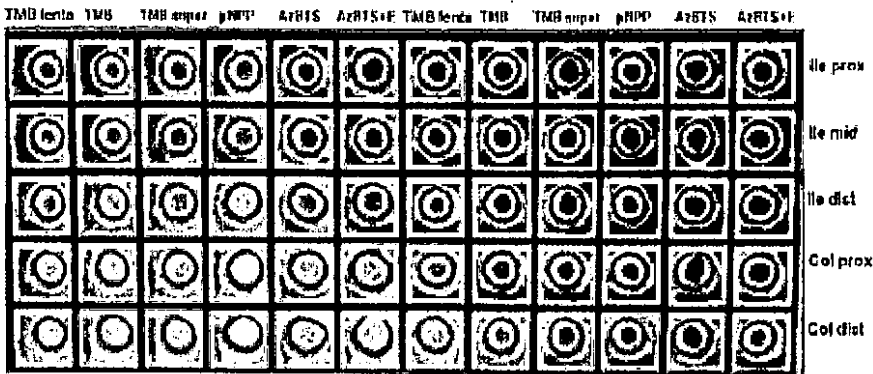


FIGURA 7

Anticuerpo primario (derecha)	BP2022HRP			BP2022			Biotina			Sin 1º anticuerpo			
Anticuerpo secundario (abajo)	1:2000	1:10 000	1:100 000	1:2000	1:10 000	1:100 000	1:2000	1:10 000	1:100 000				
HRP1:1000/ StrHRP1:100	1º ac conj. con HRP sin 2º ac			BP2022, 2º ac conj. con HRP			1º ac conj. con Biotina, StrHRP 2º ac			Sin 1º ac, 2º ac conj. con HRP		Sin 1º ac, StrHRP 2º ac	
HRP1:10000/ StrHRP1:1000													
HRP1:100000/ StrHRP1:10000													
AP 1:1000/ StrAP1:100	Sin ac, sólo BSA+ sustrato (TMB)			BP2022 2º ac conj. con AP			1º ac conj. con Biotina StrAP 2º ac			Sin 1º ac, 2º ac conj. con AP		Sin 1º ac, StrAP 2º ac	
AP 1:100000/ StrAP1:1000	Sin ac, sólo BSA + sustrato (pNPP)												
AP 1:100000/ StrAP1:10000	Vacío												

FIGURA 8

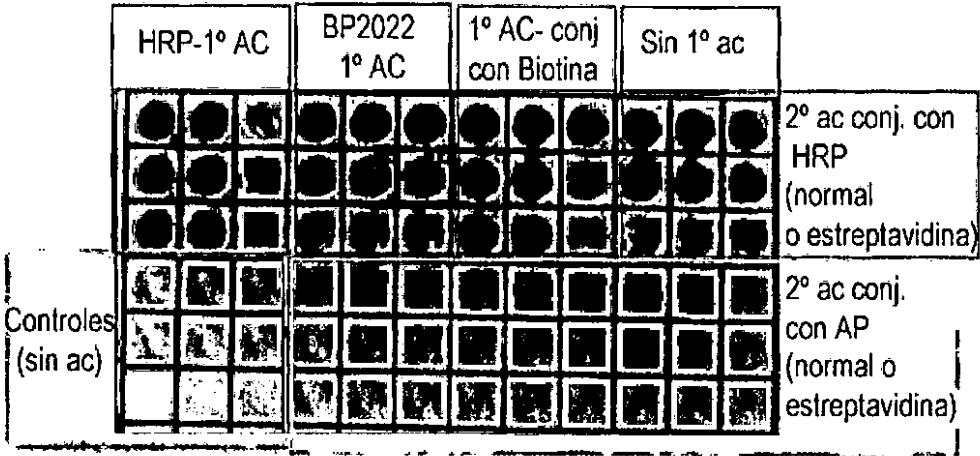


FIGURA 9

		HRP			BP2022			Biotina			Sin 1º anticuerpo		
		000:1	000 00:1:1	000 000 00:1:1	000:1	000 00:1:1	000 000 00:1:1	1:1000	1:10 000	1:100 000			
HRPI:10000 /SuHRPI:1000	Sólo 1º ac conj. HRP en leche				1º + 2º ac en leche		1º + 2º ac en leche			Sin 1ac, 2ºac HRP en leche		Sin 1º ac, 2º ac Str-HRP en leche	
HRPI:100000 /StrHRPI:10000													
HRPI:10000 /StrHRPI:1000	Sólo 1º ac conj. HRP en suero bovino fetal al 10%				1º + 2º ac en suero bovino fetal al 10%		1º + 2º ac en suero bovino fetal al 10%			Sin 1º ac, 2º ac HRP en suero bovino fetal al 10%		Sin 1º ac, 2º ac Str-HRP en suero bovino fetal al 10%	
HRPI:100000 /SuHRPI:10000													
											Sólo leche y sustrato		
											Sólo suero y sustrato		

FIGURA 10

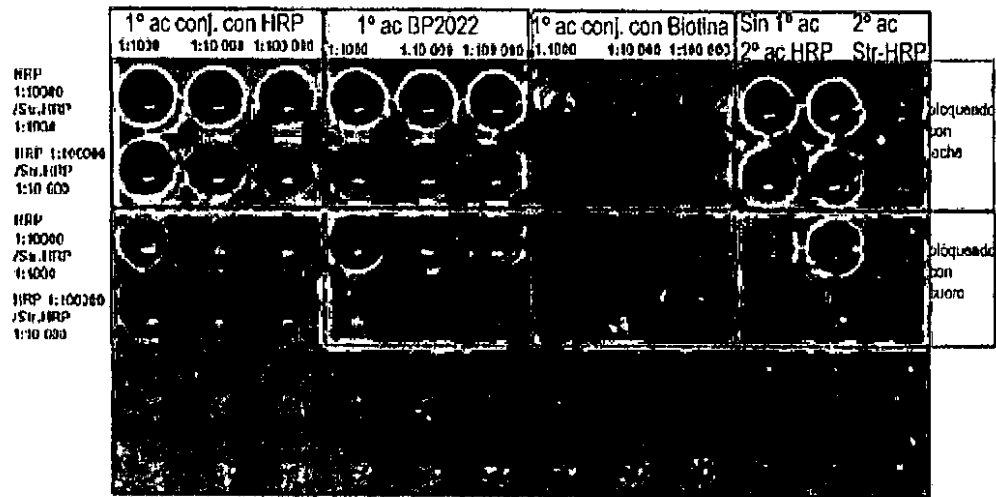


FIGURA 12

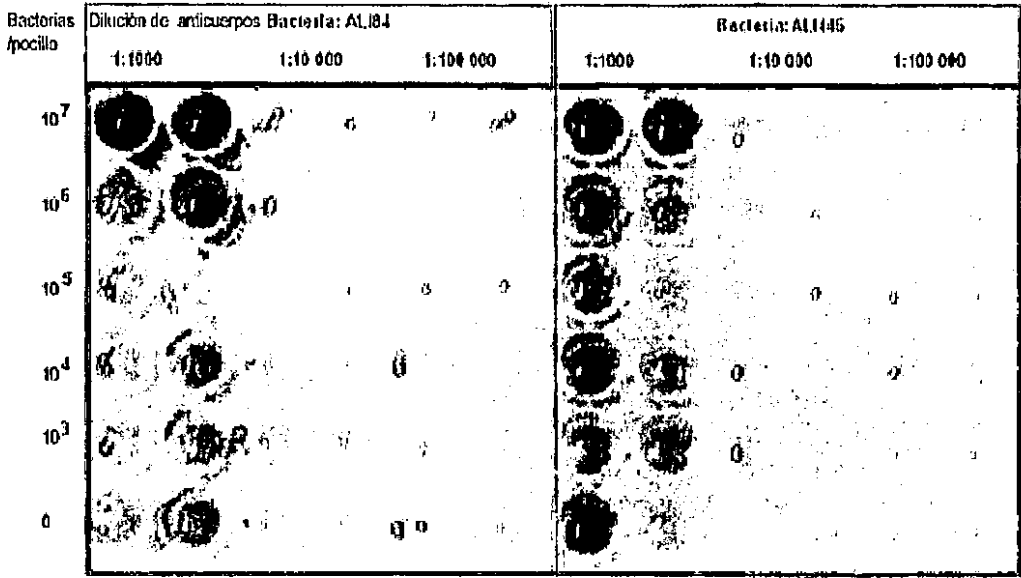


FIGURA 13

Bacterias /pocillo	Dilución de 2º ac	Cepa de <i>E. coli</i> ALI 84						Cepa de <i>E. coli</i> ALI 446					
		Dilución de 1º ac											
		1:1000		1:10000		1:100 000		1:1000		1:10000		1:100 000	
10 ⁷	1:1000												
	1:10 000												
10 ⁶	1:1000												
	1:10 000												
10 ⁵	1:1000												
	1:10 000												
10 ⁴	1:1000												
	1:10 000												
10 ³	1:1000	ALI 84, sin 1º ac				ALI 446, sin 1º ac				Sin bacterias, sin 1º ac			
10 ²	1:10 000	ALI 84, sin 1º ac				ALI 446, sin 1º ac				Sin bacterias, sin 1º ac			

FIGURA 14

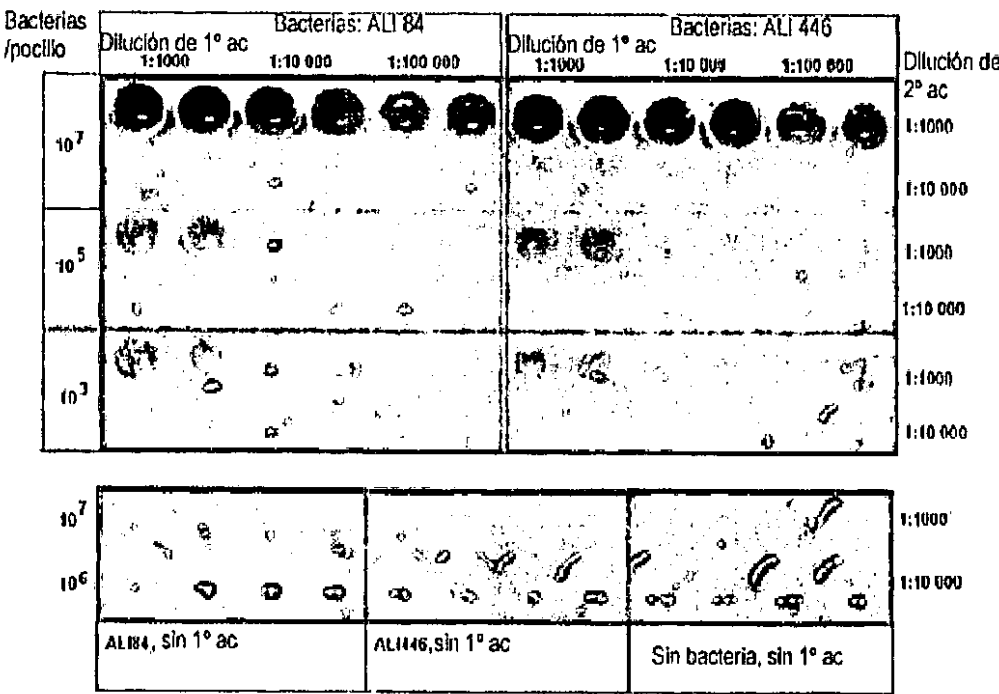


FIGURA 15

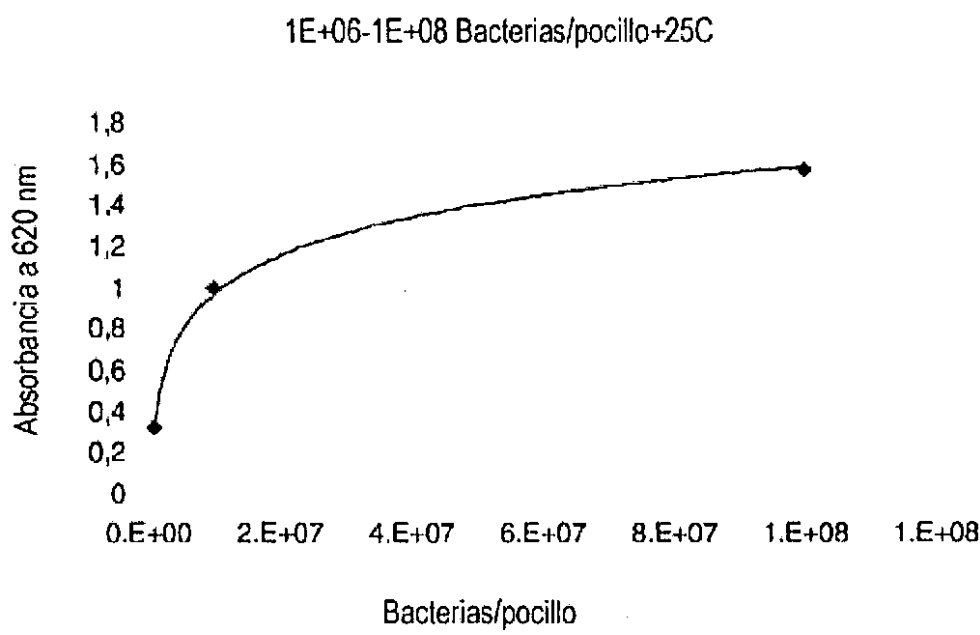


FIGURA 16

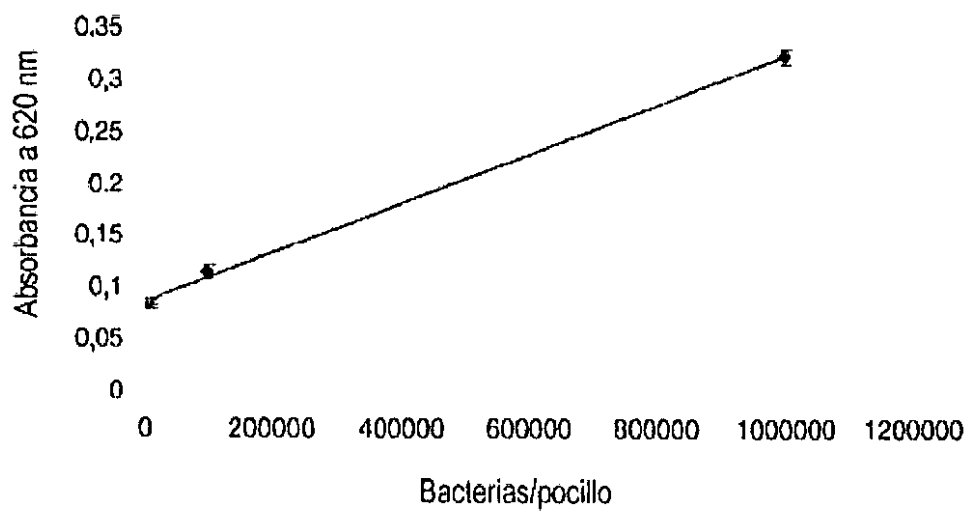


FIGURA 17

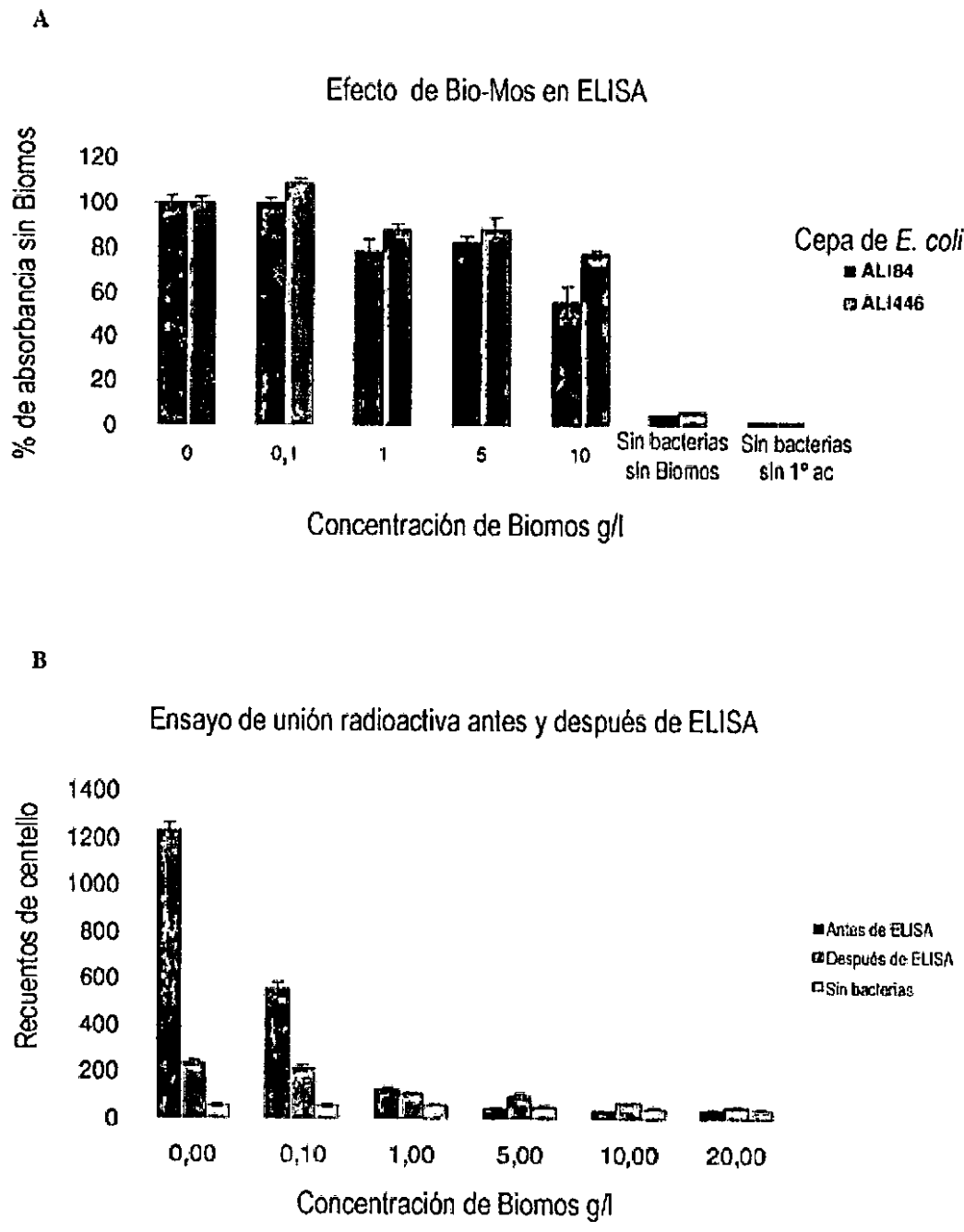


FIGURA 18

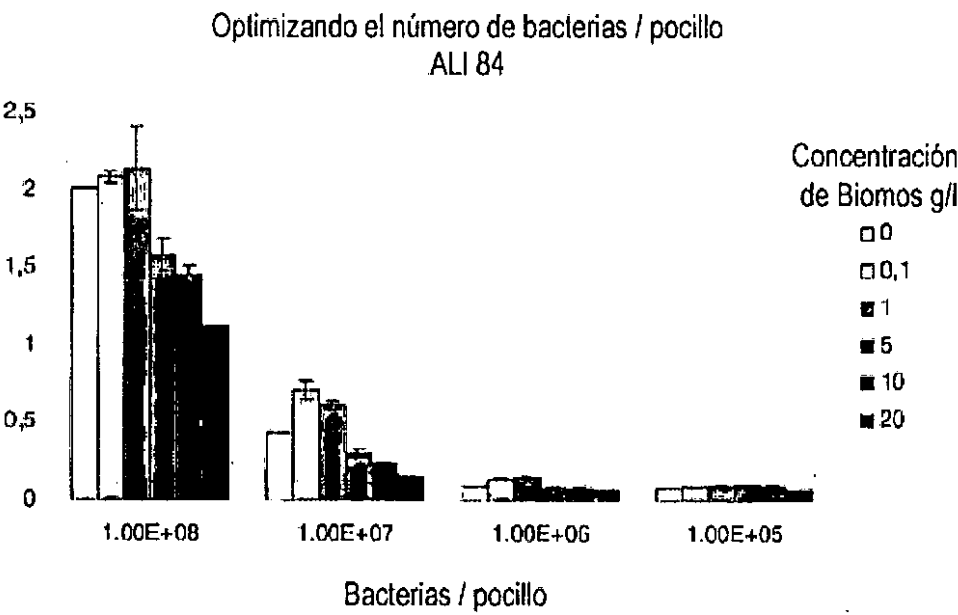


FIGURA 19

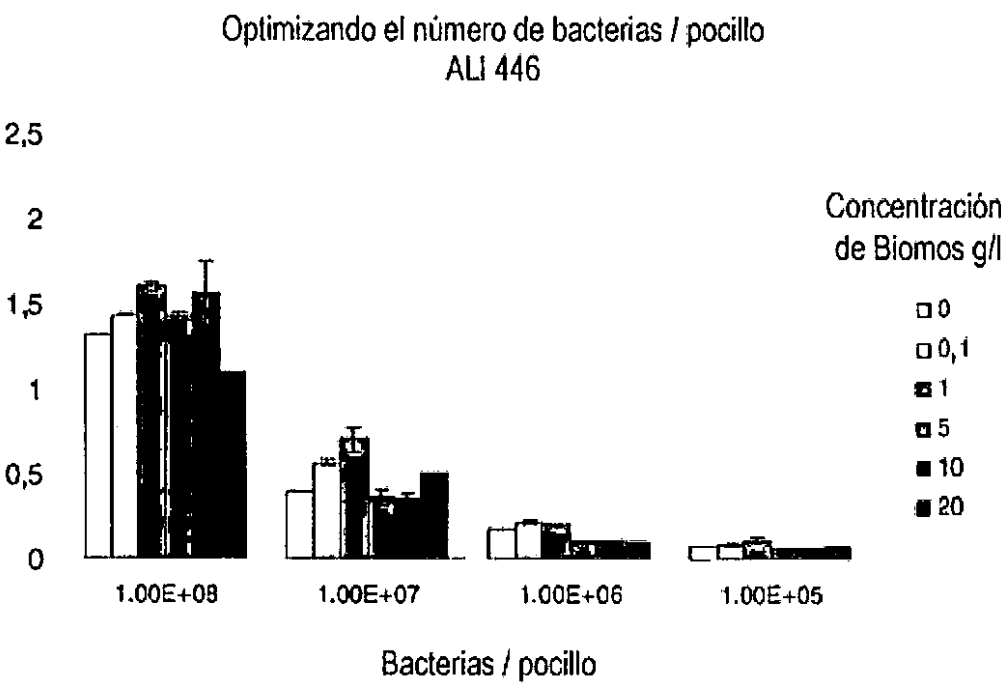


FIGURA 20

Optimizando la concentración de anticuerpo primario

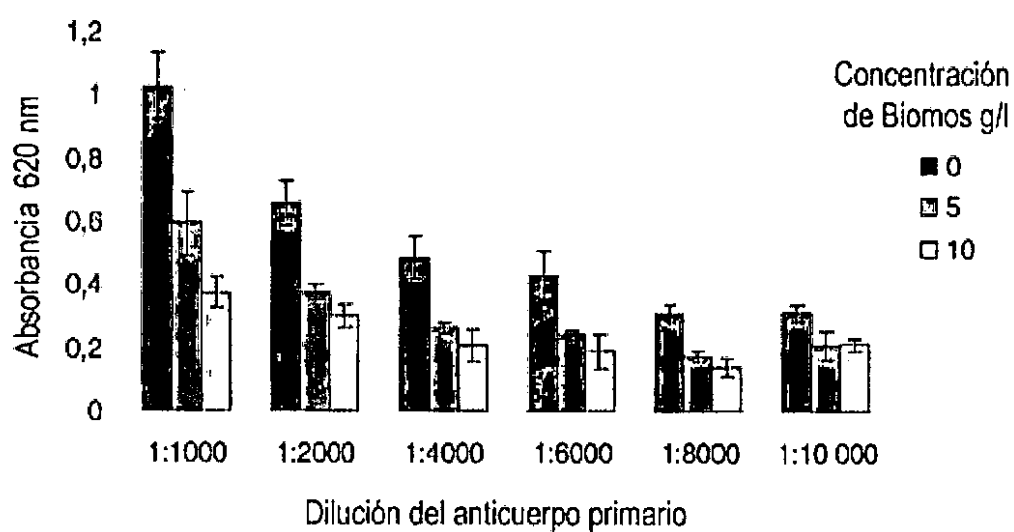


FIGURA 21

Efecto de Biomos con diferentes tipos de mucosidades

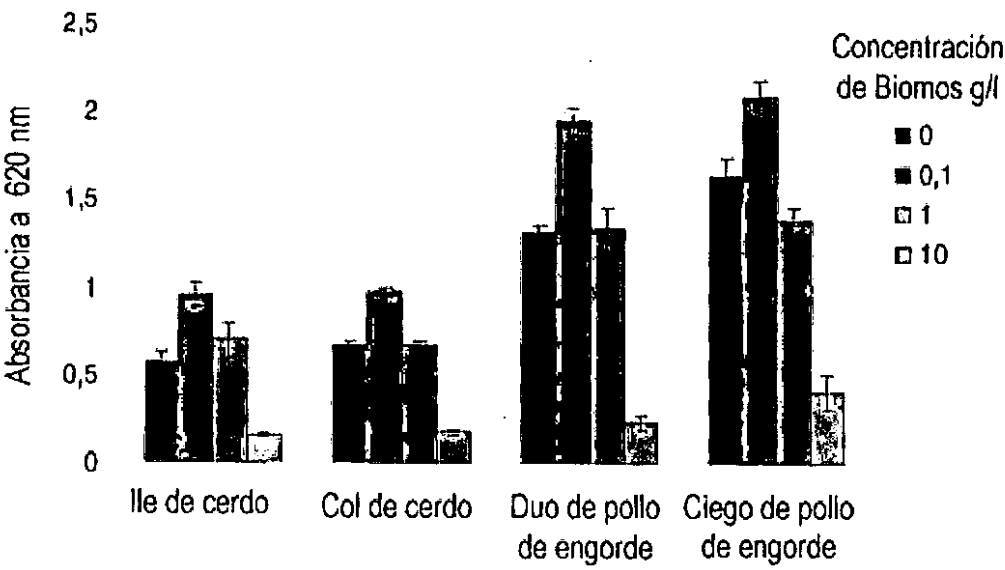


FIGURA 22

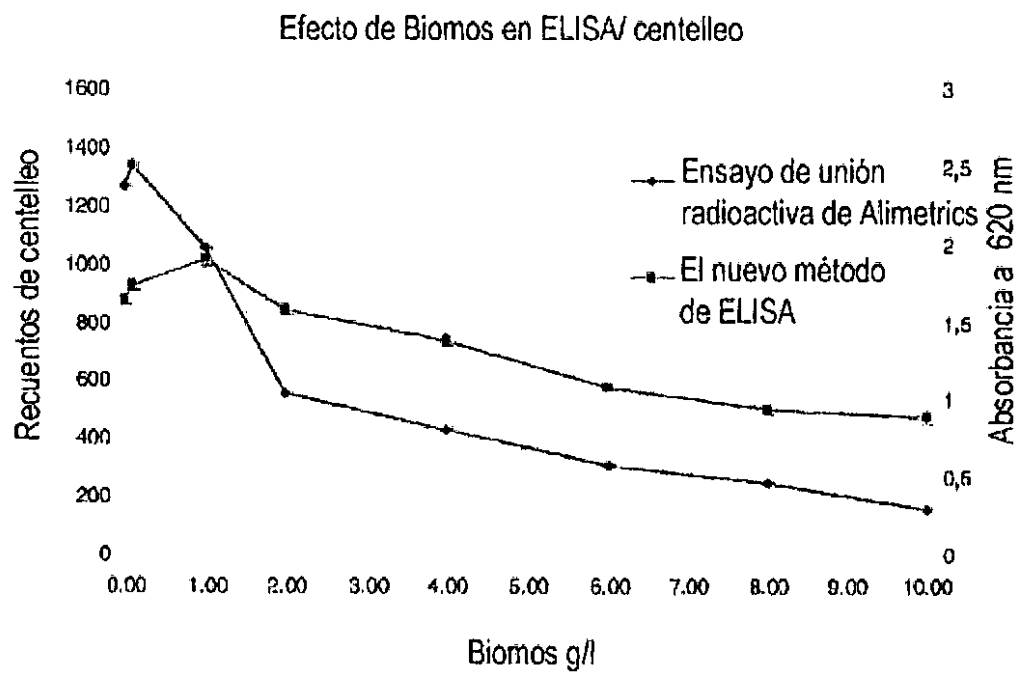


FIGURA 23

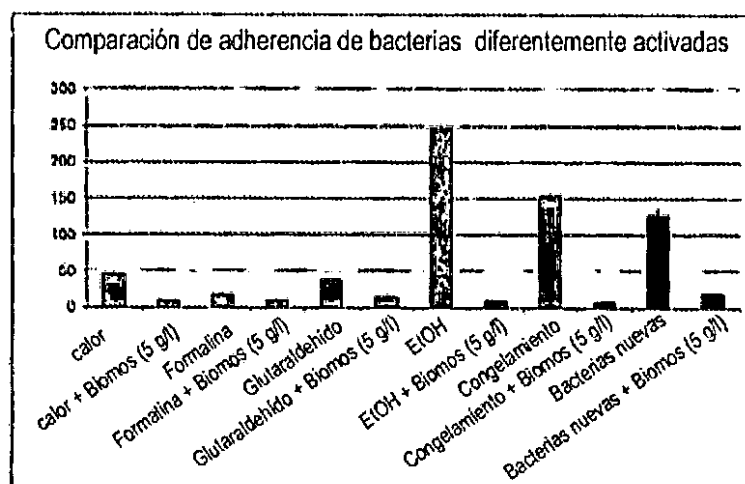


FIGURA 24

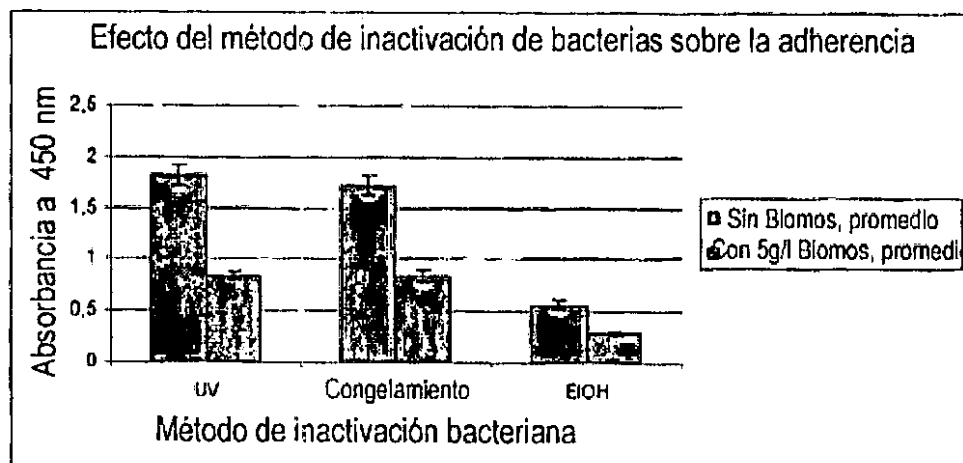


FIGURA 25

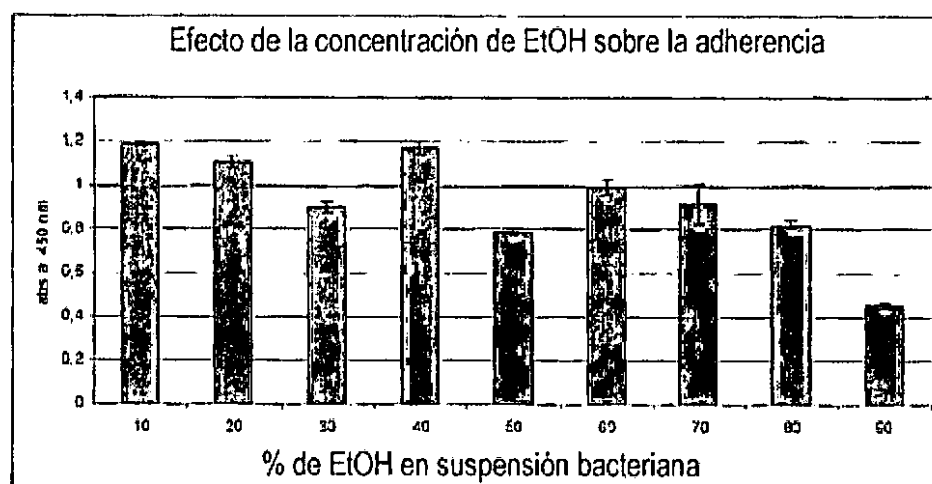


FIGURA 26

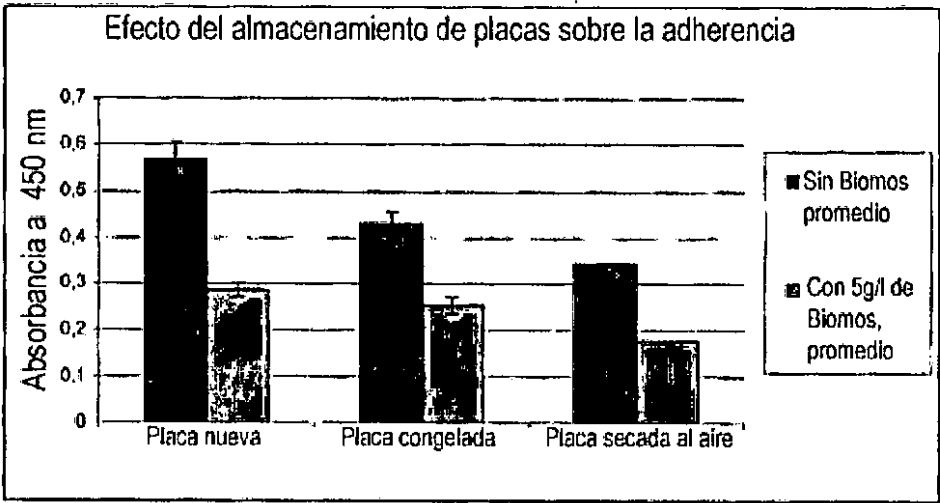


FIGURA 27

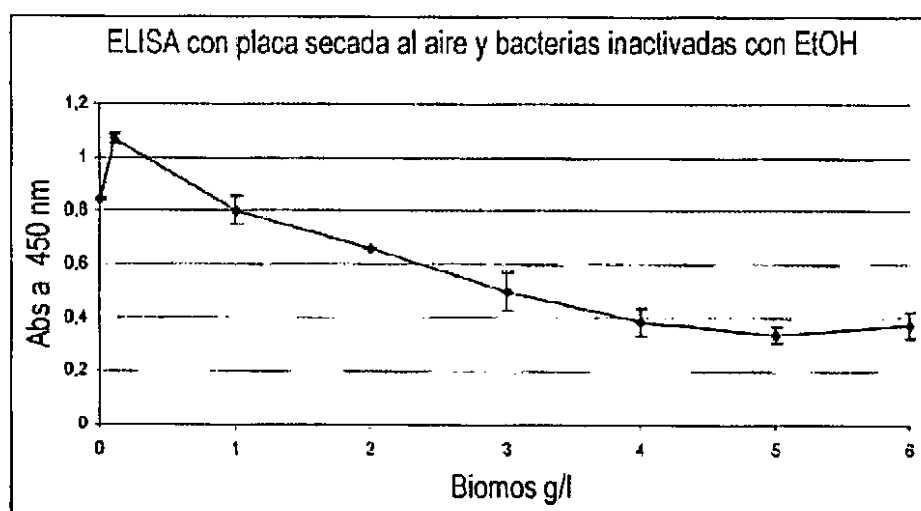


FIGURA 28

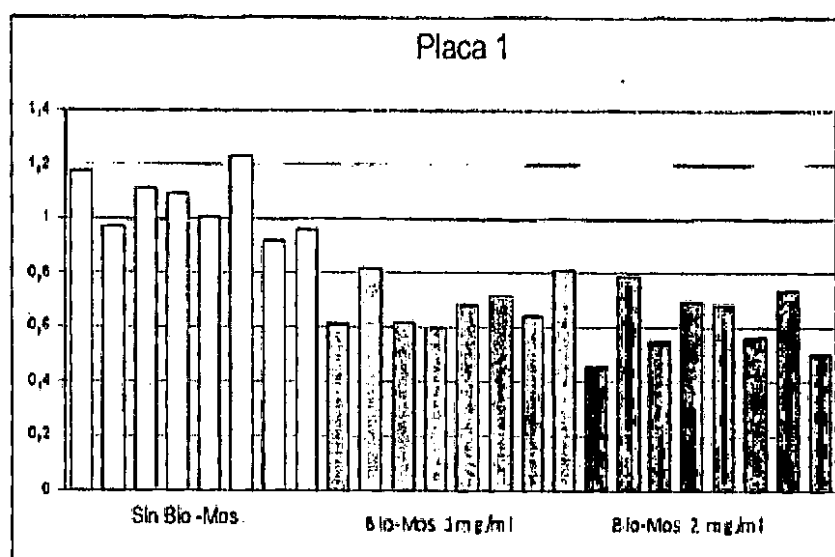


FIGURA 29

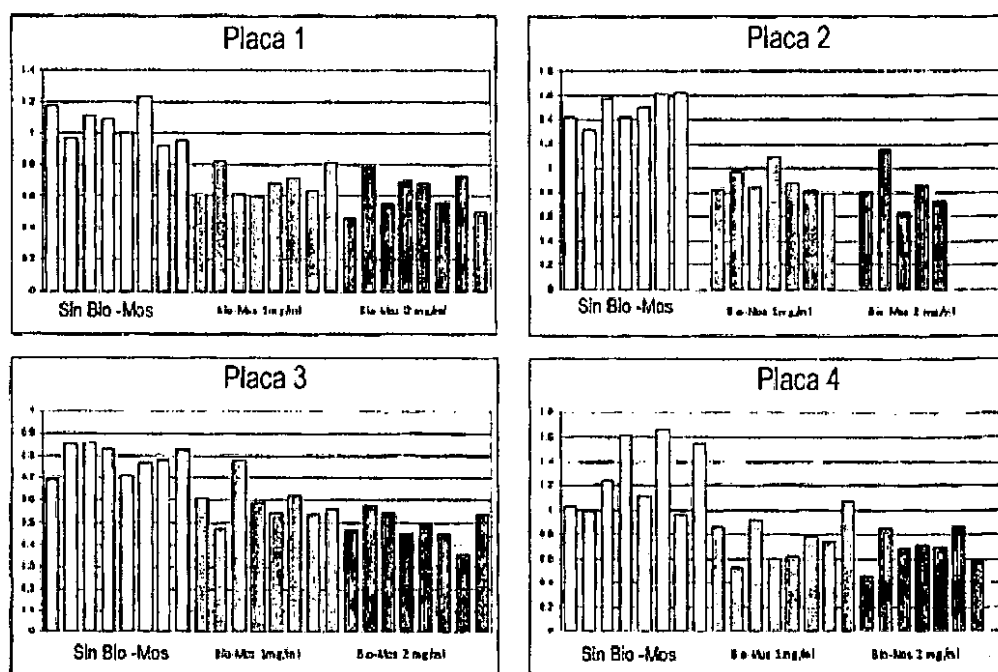


FIGURA 30

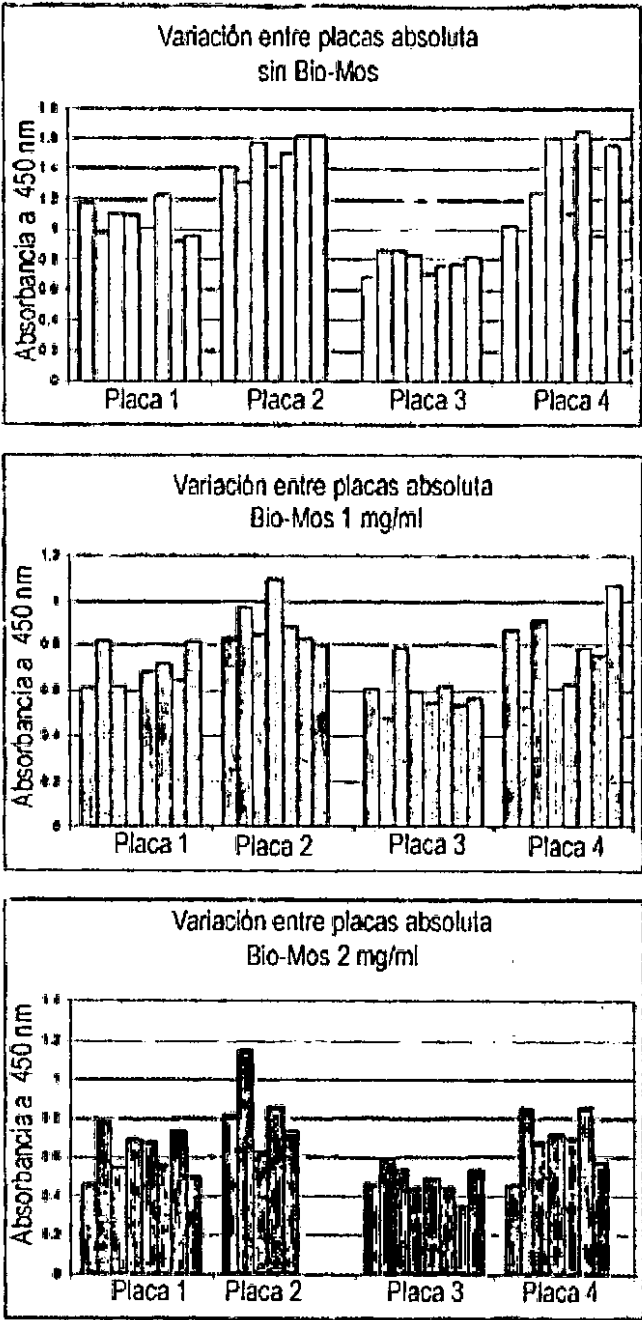


FIGURA 31

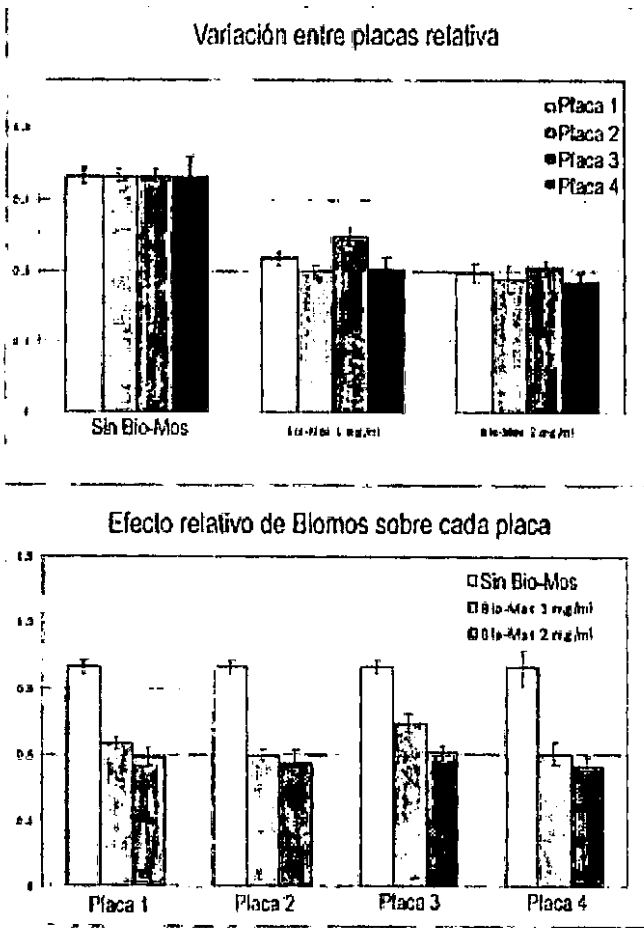


FIGURA 32

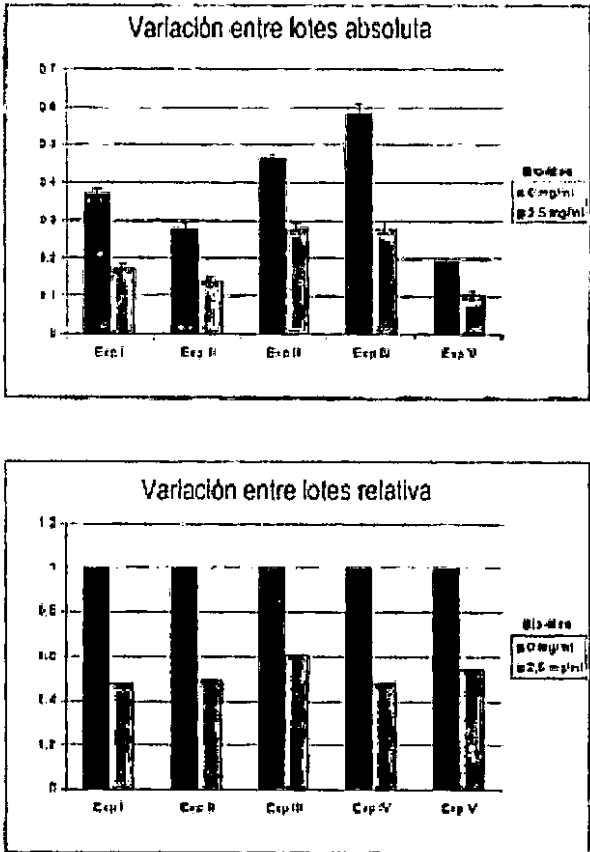


FIGURA 33

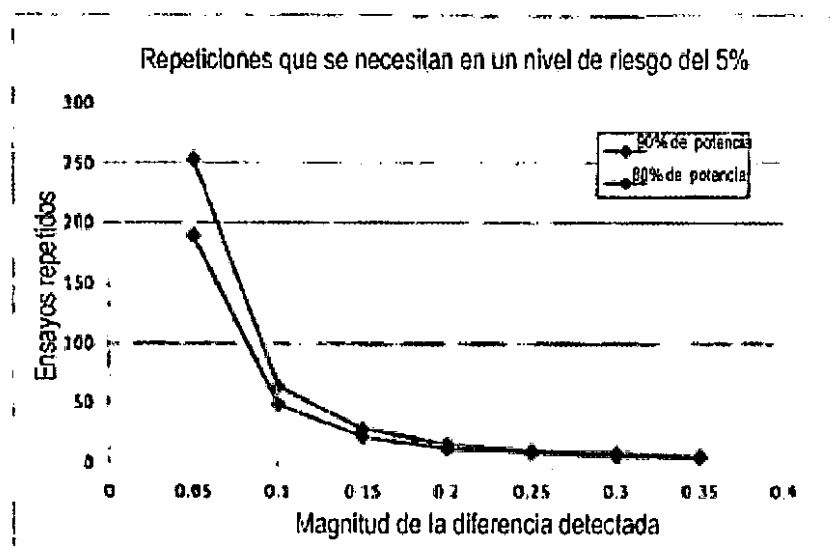


FIGURA 34

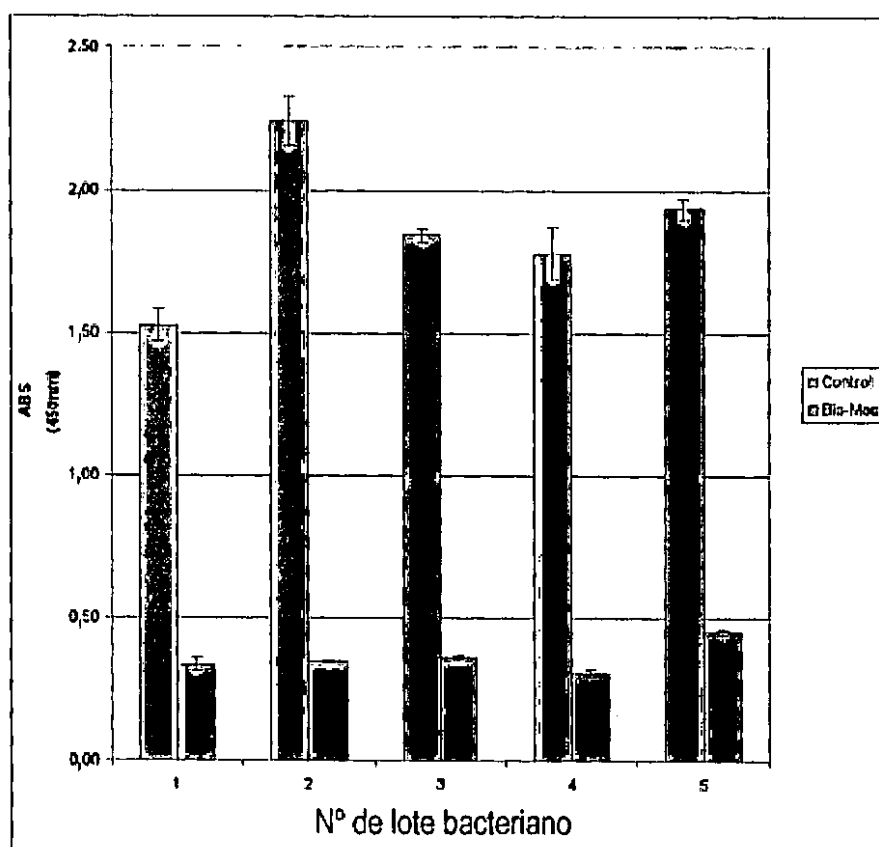


FIGURA 35

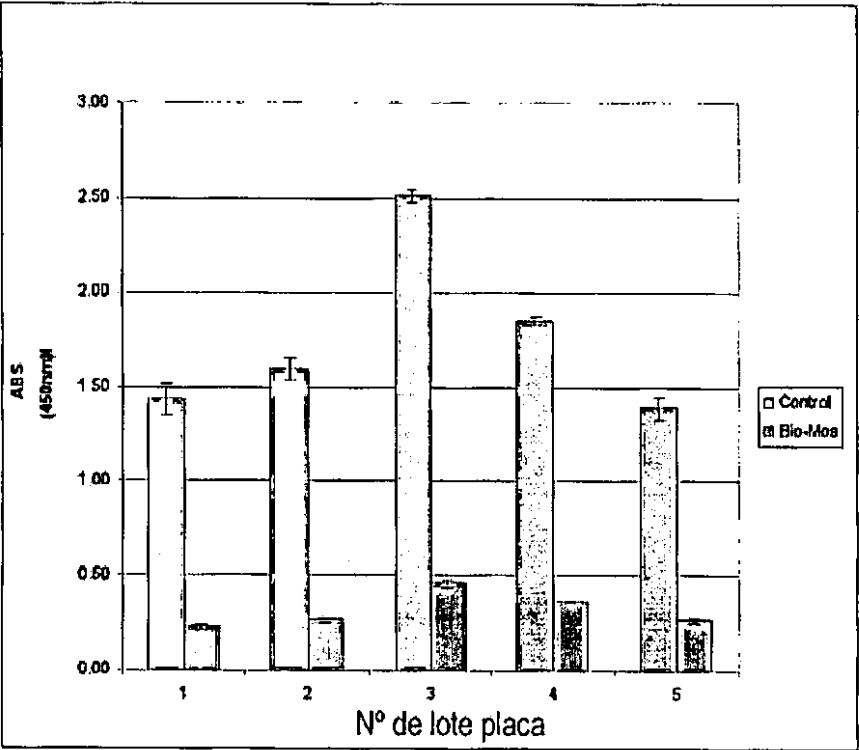


FIGURA 36

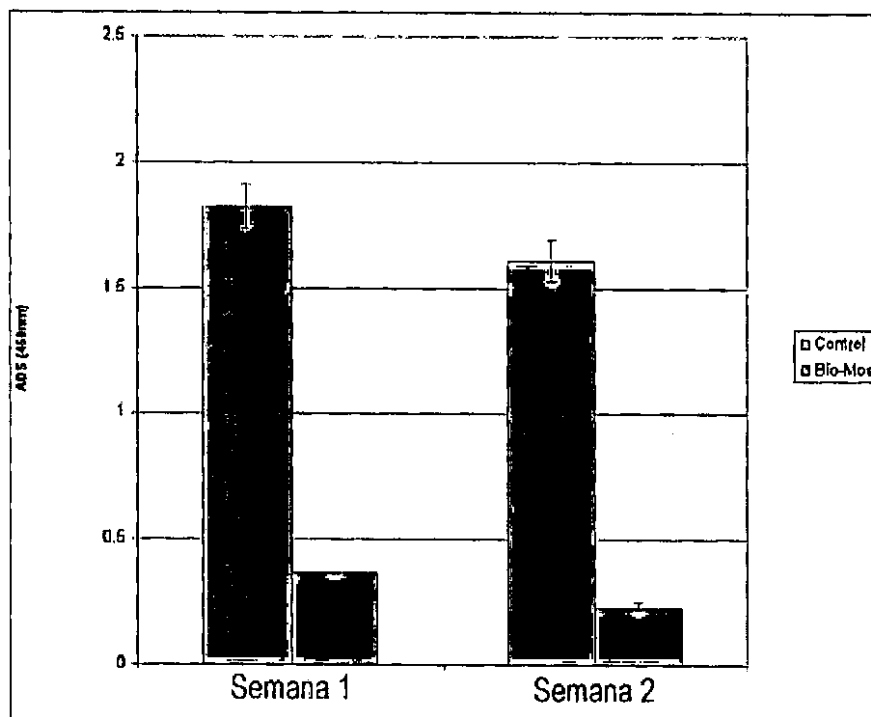
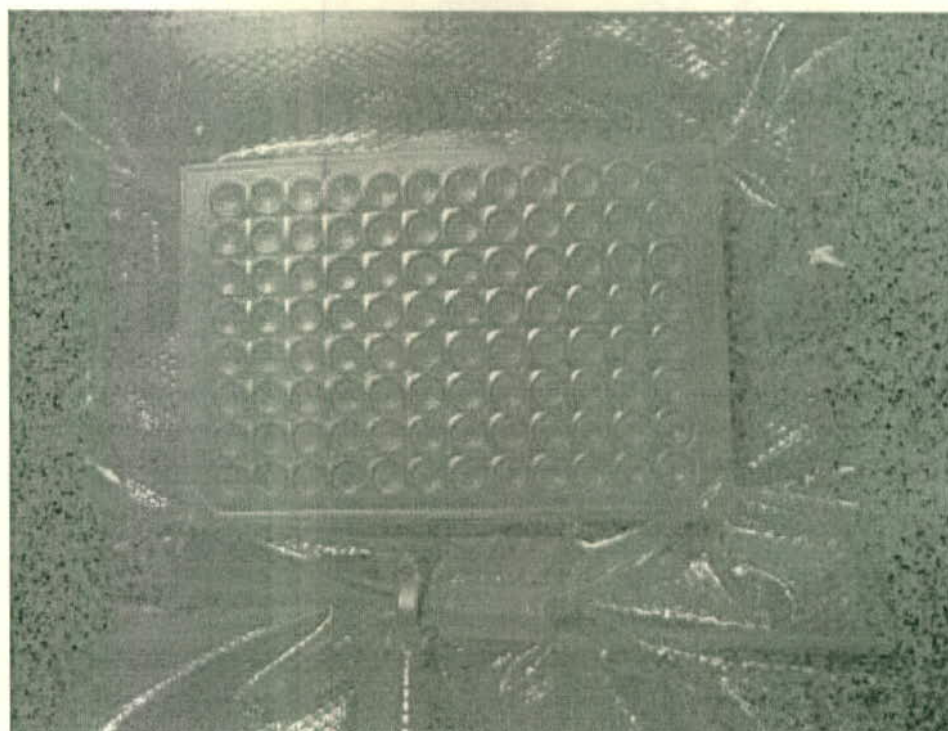


FIGURA 37



(12) International Application Status Report

Received at International Bureau: 25 July 2010 (25.07.2010)

Information valid as of: 16 December 2010 (16.12.2010)

Report generated on: 26 January 2012 (26.01.2012)

(10) Publication number:

WO2011/005982

(43) Publication date:

13 January 2011 (13.01.2011)

(26) Publication language:

English (EN)

(21) Application Number:

PCT/US2010/041396

(22) Filing Date:

08 July 2010 (08.07.2010)

(25) Filing language:

English (EN)

(31) Priority number(s):

61/223,755 (US)

(31) Priority date(s):

08 July 2009 (08.07.2009)

(31) Priority status:

Priority document received (in compliance with PCT Rule 17.1)

(51) International Patent Classification:

C12Q 1/00 (2006.01); G01N 33/00 (2006.01)

(71) Applicant(s):

ALLTECH, INC. [US/US]; 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, KY 40345 (US) *(for all designated states except US)*

DAWSON, Karl, A. [US/US]; 4877 Wyndhurst Lexington, KY 40515 (US) *(for US only)*

MORAN, Colm [IE/FR]; 10 chemin de Groupède F-13600 La Ciotat (FR) *(for US only)*

APAJALAHTI, Juha [FI/FI]; Kytöniityntie 24C FIN-00670 Helsinki (FI) *(for US only)*

LAURAEUS, Marko [FI/FI]; Paulatie 12 FIN-03100 Nummela (FI) *(for US only)*

(72) Inventor(s):

DAWSON, Karl, A.; 4877 Wyndhurst Lexington, KY 40515 (US)

MORAN, Colm; 10 chemin de Groupède F-13600 La Ciotat (FR)

APAJALAHTI, Juha; Kytöniityntie 24C FIN-00670 Helsinki (FI)

LAURAEUS, Marko; Paulatie 12 FIN-03100 Nummela (FI)

(74) Agent(s):

SISK, Tyler, J.; Casimir Jones S.C. 2275 Deming Way Middleton, WI 53562 (US)

(54) Title (EN): BACTERIAL ADHERENCE AND ANTI-ADHERENCE TO MUCUS, EPITHELIAL CELLS AND OTHER CELLS

(54) Title (FR): ADHÉRENCE ET ANTI-ADHÉRENCE BACTÉRIENNE AU MUCUS, AUX CELLULES ÉPITHÉLIALES ET AUTRES CELLULES

(57) Abstract:

(EN): The present invention generally relates to methods for detecting, identifying, and measuring bacterial adherence to mucus and epithelial cells. In particular, the present invention provides assays for detecting and identifying the presence or absence of bacterial adherence to mucus (epithelial cells (e.g., present in the intestines), or other portion of an animal where bacteria may be present, and methods for identifying and characterizing (e.g., the efficacy of) modulators of bacterial adherence to mucus and epithelial cells, or other portion of the animal where bacteria may be present.

(FR): La présente invention concerne d'une manière générale des procédés de détection, d'identification et de mesure de l'adhérence bactérienne au mucus et aux cellules épithéliales. En particulier, la présente invention porte sur des essais pour détecter et identifier la présence ou l'absence d'une adhérence bactérienne au mucus, aux cellules épithéliales (par exemple, présentes dans les intestins), ou autre partie d'un animal où des bactéries peuvent être présentes. L'invention porte également sur des procédés d'identification et de caractérisation (par exemple, de l'efficacité) de modulateurs de l'adhérence bactérienne au mucus et aux cellules épithéliales, ou autre partie de l'animal où des bactéries peuvent être présentes.

International search report:

Received at International Bureau: 19 September 2010 (19.09.2010) [US]

International preliminary examination report:

Not available

(81) Designated States:

AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

European Patent Office (EPO) : AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR

African Intellectual Property Organization (OAPI) : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

African Regional Intellectual Property Organization (ARIPO) : BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

Eurasian Patent Organization (EAPO) : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

The State of Wisconsin

Office of the
Secretary of State

000243



CERTIFIED

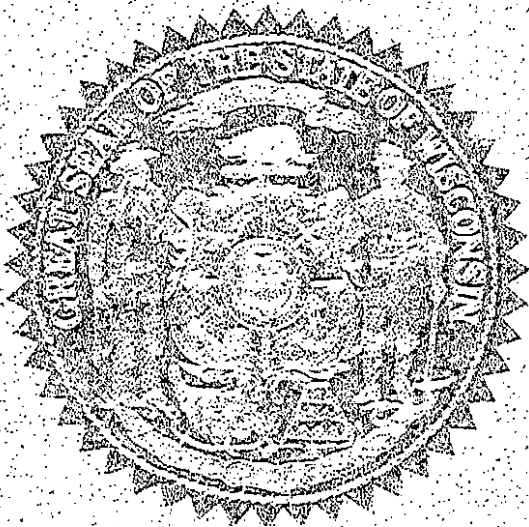
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by Vickie Hoeft
3. acting in the capacity of Notary Public, State of Wisconsin
4. bears the seal/stamp of Notary Public, State of Wisconsin.

CERTIFIED for Colombia

5. at Madison, Wisconsin
6. August 15, 2011
7. by the Secretary of State of Wisconsin
8. No. 210603
9. Seal/stamp:

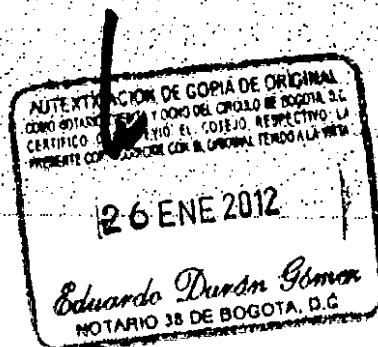


10. Signature

Douglas La Follette

DOUGLAS LA FOLLETTE
Secretary of State

This certificate only confirms the authority of the person named in Number 2. It does not mean that the contents of the attached document are correct, or that the Secretary of State approves of the contents.



NOTARIAL CERTIFICATE

(True Copy)



STATE OF WISCONSIN)
) SS
COUNTY OF DANE)

I, Vickie Hoeft, a Notary Public in and for the State of Wisconsin, duly appointed, certify that the instrument annexed is a true copy of the document produced and shown to me and being a Power of Attorney from ALLTECH, Inc., 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, KY 40356, USA. Executed by Nathan Hunter Hohman, appointing Baker & McKenzie as agent, dated July 20, 2011, the original of which I have examined.

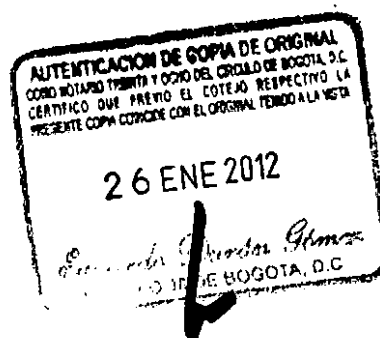
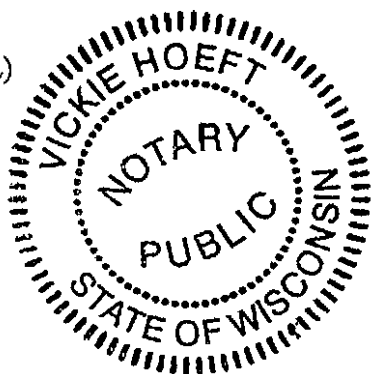
Dated at Madison, Wisconsin, this 11th day of August 2011.

A handwritten signature in cursive script that reads "Vickie Hoeft".

Notary Public State of Wisconsin

My Commission Expires: March 24, 2013

(SEAL)



POWER OF ATTORNEY

PODER

The undersigned.

La abajo firmada,

ALLTECH, INC.

ALLTECH, INC.

located at

domiciliada en

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

3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, Kentucky 40356, Estados
Unidos de América

declares that it hereby grants to

declara por el presente que otorga a

**ÁLVARO CORREA-ORDÓÑEZ and/or
RICARDO METKE MENDEZ and/or JUAN PABLO
CONCHA-DELGADO and/or
OLGA GEORGETTE OTERO**

**ÁLVARO CORREA-ORDÓÑEZ y/o RICARDO METKE
MÉNDEZ y/o JUAN PABLO CONCHA-DELGADO y/o OLGA
GEORGETTE OTERO**

of the firm Baker & McKenzie Colombia S.A members of
Baker & McKenzie, domiciled at Av. 82 No. 10-62, 6th floor, of
Bogotá D.C., Colombia, full and sufficient power of attorney to
pursue before the competent authorities the following matters:

de la firma Baker & McKenzie Colombia S.A., miembros de Baker &
McKenzie, domiciliada en la Av. 82 No. 10-62 Piso 6 en Bogotá D.C.,
Colombia, poder especial amplio y suficiente, para adelantar ante las
autoridades competentes los siguientes asuntos:

Trademark registrations and renewals; deposit and
registration of commercial names and commercial ensigns;
registration and renewal of domain names; Prosecution and
obtainment of patents, utility models, industrial designs,
integrated circuits layout-designs and vegetal varieties;
records of mergers, changes of name, assignments,
changes of domicile and address; security interests; liens
and other acts that affect or limit the mentioned industrial
property rights; filing and prosecution of oppositions;
recordal of license of use agreements; filing and prosecution
of cancellation actions, annulment actions, annulment
reinstatement of right action, and all judicial actions
available for the prosecution of proceedings related to
intellectual property matters, unfair competition, and
protection of consumers.

Registro y renovación de marcas; depósito y registro de nombres
comerciales y enseñas comerciales; registro y renovación de
nombres de dominio; trámite y obtención de solicitudes de patentes
de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, esquemas
de trazado de circuitos integrados y variedades vegetales;
inscripción de fusiones, cambios de nombre, traspasos, cambios de
domicilio y de dirección; inscripción de contratos de prenda,
embargos y otros actos que afecten o limiten los mencionados
derechos de propiedad industrial; presentación y tramitación de
solicitudes de licencias de uso; presentación y
inscripción de licencias de uso; presentación y
acciones de nulidad y restablecimiento del derecho y demás
acciones judiciales relacionadas con procesos de propiedad
industrial, competencia desleal y protección al consumidor.

to which end it empowers them to file requests, petitions and
lawsuits, appeals and objections, pay taxes, receive, including
faculties to enter into settlement agreements, conciliations and
transactions, abandon applications and renounce rights and, in
general, to take all the actions before the competent authorities
in order to duly protect our intellectual property. To the said
mandatories sufficient power is granted hereby to receive
notifications for and on behalf of the Company, to confer
powers on those who are to represent the Company judicially
and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims
and demands that may be presented in connection with the
marks and other intellectual property rights, and to do
everything that may be required before administrative or
judicial officers of any class to comply this power, giving them
likewise faculty to substitute these presents and revoke such
substitutions if necessary.

los cuales lo facultan para presentar solicitudes, peticiones y
demandas, interponer recursos, reclamos, pagar impuestos y tasas,
recibir, transigir y desistir, incluyendo facultades para entrar en
acuerdos amigables, conciliaciones y transacciones, abandonar
solicitudes y renunciar a derechos, y en general, a dar ante las
autoridades competentes todos los pasos necesarios para la debida
protección de nuestra propiedad industrial. Asimismo se concede a los
expresados mandatarios poder suficiente para recibir notificaciones a
nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar
a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas
las reclamaciones o demandas que por motivo de marcas y otros
derechos de propiedad industrial se presentaren y hacer cuanto fuere
necesario ante las autoridades administrativas o judiciales de cualquier
orden para el cumplimiento de este mandato, dándoles igualmente
facultad para sustituir el presente poder y en caso necesario, revocar
dichas sustituciones.

Done and subscribed in Nicholasville, Kentucky, USA

Dado y firmado en

On the 20 day of July of 2011

A los días del mes de de 20

Nathan Hunter Hohman
Secretary and Treasurer, Alltech, Inc.
Signature of the person Issuing the Power

Firma de la persona que firma el Poder

The State of Wisconsin

Office of the
Secretary of State



CERTIFIED

APOSTILLE

000246

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by Vickie Hoeft
3. acting in the capacity of Notary Public, State of Wisconsin
4. bears the seal/stamp of Notary Public, State of Wisconsin.

CERTIFIED for Colombia

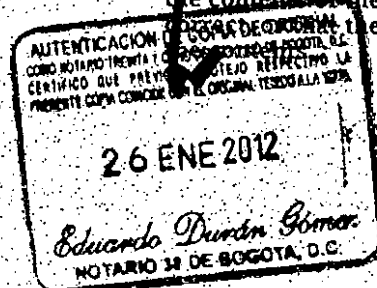
5. at Madison, Wisconsin
6. August 22, 2011
7. by the Secretary of State of Wisconsin
8. No. 210863
9. Seal/stamp:

10. Signature

Douglas La Follette

DOUGLAS LA FOLLETTE
Secretary of State

This certificate only confirms the authority of the person named in Number 2. It does not mean that the contents of the attached document are approved by the Secretary of State.





NOTARIAL CERTIFICATE

(True Copy)

000247

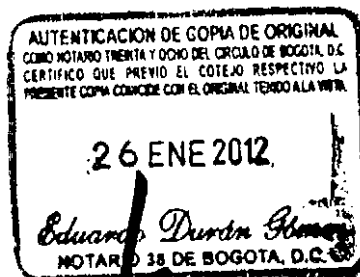
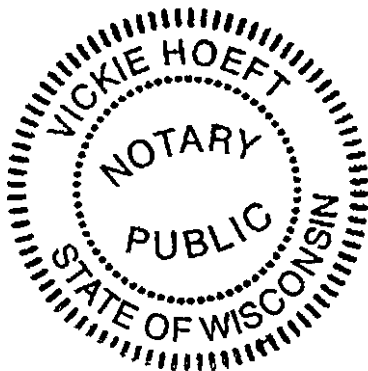
STATE OF WISCONSIN)
) SS
COUNTY OF DANE)

I, Vickie Hoeft, a Notary Public in and for the State of Wisconsin, duly appointed, certify that the instrument annexed is a true copy of the document produced and shown to me and being a Certificate of Existence for ALLTECH, Inc., 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, KY 40356, USA, the original of which I have examined.

Dated at Madison, Wisconsin, this 18th day of August 2011.

Notary Public State of Wisconsin
My Commission Expires: March 24, 2013

(SEAL)



Commonwealth of Kentucky
Elaine N. Walker, Secretary of State

8/4/2011

000248

Division of Corporations
Business Filings
P. O. Box 718
Frankfort, KY 40602
(502) 564-3490
<http://www.sos.ky.gov>

Certificate of Existence

Authentication Number: 116510

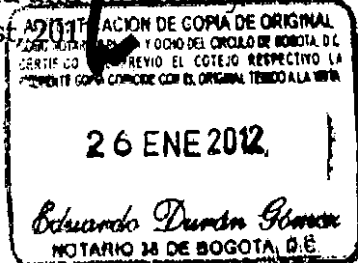
Visit <https://app.sos.ky.gov/fishow/certvalidate.aspx> to authenticate this certificate.

I, Elaine N. Walker, Secretary of State of the Commonwealth of Kentucky, do hereby certify that according to the records in the Office of the Secretary of State,

ALLTECH INC.
is a corporation duly incorporated and existing under KRS Chapter 271B, whose date of incorporation is August 7, 1980 and whose period of duration is perpetual.

I further certify that all fees and penalties owed to the Secretary of State have been paid; that articles of dissolution have not been filed; and that the most recent annual report required by KRS 271B.16-220 has been delivered to the Secretary of State.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed my Official Seal at Frankfort, Kentucky, this 4th day of August.



Elaine N. Walker

Elaine N. Walker
Secretary of State
Commonwealth of Kentucky
116510/0148768

The State of Wisconsin

CERTIFIED

Office of the
Secretary of State

000249

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
2. This public document has been signed by Vickie Hoeft
3. acting in the capacity of Notary Public, State of Wisconsin
4. bears the seal/stamp of Notary Public, State of Wisconsin.

CERTIFIED for Colombia

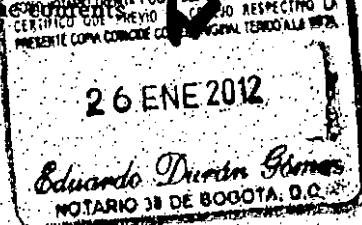
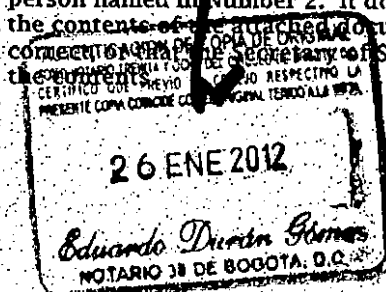
5. at Madison, Wisconsin
6. August 22, 2011
7. by the Secretary of State of Wisconsin
8. No. 210864
9. Seal/stamp:

10. Signature

Douglas La Follette

DOUGLAS LA FOLLETTE
Secretary of State

This certificate only confirms the authority of the person named in Number 2. It does not mean that the contents of the attached document are correct or that the Secretary of State approves of the contents.





NOTARIAL CERTIFICATE

(True Copy)

000250

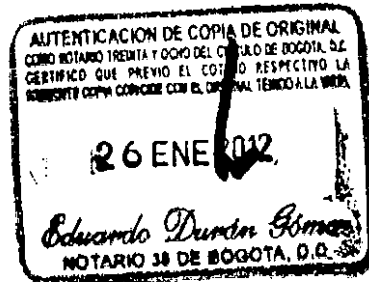
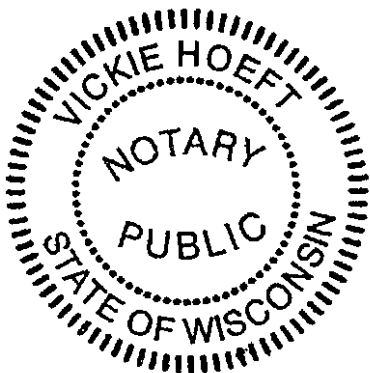
STATE OF WISCONSIN)
) SS
COUNTY OF DANE)

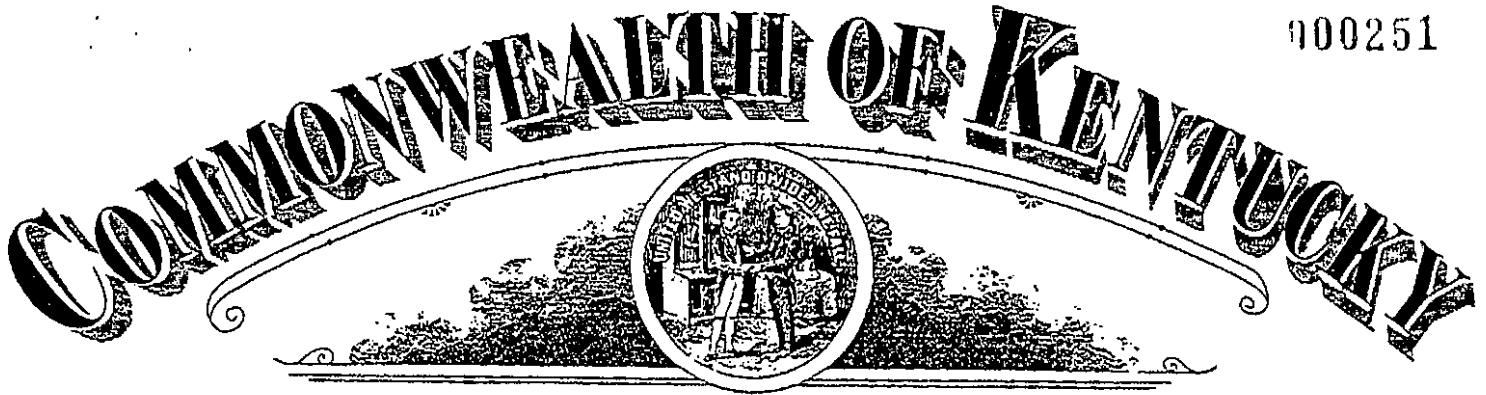
I, Vickie Hoeft, a Notary Public in and for the State of Wisconsin, duly appointed, certify that the instrument annexed is a true copy of the document produced and shown to me and being a Certificate of Incorporation and Annual Report from ALLTECH, Inc., 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville, KY 40356, USA, the originals of which I have examined.

Dated at Madison, Wisconsin, this 18th day of August 2011.

Notary Public State of Wisconsin
My Commission Expires: March 24, 2013

(SEAL)





Elaine N. Walker
Secretary of State

Certificate

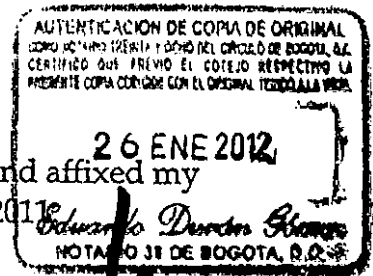
I, Elaine N. Walker, Secretary of State for the Commonwealth of Kentucky, do hereby certify that the foregoing writing has been carefully compared by me with the original thereof, now in my official custody as Secretary of State and remaining on file in my office, and found to be a true and correct copy of

CERTIFICATE OF INCORPORATION OF

ALLTECH, INC. FILED AUGUST 7, 1980;

2011 ANNUAL REPORT FILED MARCH 1, 2011.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed my
 Official Seal at Frankfort, Kentucky, this 4th day of August, 2011.



Elaine N. Walker

Elaine N. Walker
 Secretary of State
 Commonwealth of Kentucky
 dwilliams/0148768 - Certificate ID: 116511

Commonwealth of Kentucky

OFFICE OF
SECRETARY OF STATE

FRANCES JONES MILLS
Secretary



FRANKFORT,
KENTUCKY

CERTIFICATE OF INCORPORATION

I, **FRANCES JONES MILLS**, Secretary of State of the Commonwealth of Kentucky, do hereby certify that Articles of Incorporation of

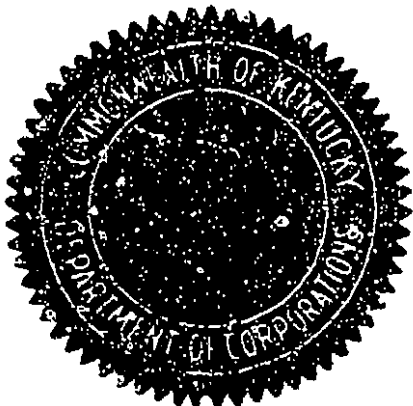
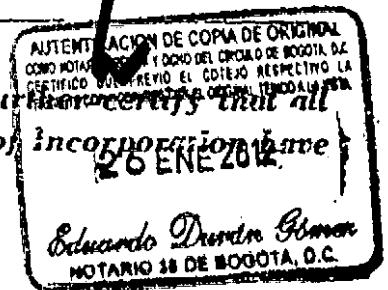
ALLTECH, INC.

whose initial agent for process is THOMAS PEARSE LYONS

LANE ALLEN PLAZA, 945 LANE ALLEN ROAD

and whose address is LEXINGTON, KENTUCKY

duly signed according to law, have been filed in my office. I further certify that all taxes, fees and charges payable upon the filing of said Articles of Incorporation have been paid.



SECRETARY OF STATE

Given under my hand and seal of Office as Secretary of State, at Frankfort, Kentucky, this 7TH day of AUGUST, 1980.

Frances Jones Mills
SECRETARY OF STATE

ASSISTANT SECRETARY OF STATE

Hoja en Blanco

ORIGINAL COPY FILED
SECRETARY OF STATE OF KENTUCKY
FRANKFORT, KENTUCKY

AUG 07 1980

Thomas Pearce Lyons
SECRETARY OF STATE

ARTICLES OF INCORPORATION
OF
ALLTECH, INC.

SECRETARY OF STATE
RECEIVED

AUG 7 1980

COMMONWEALTH OF KENTUCKY

The undersigned, Thomas Pearce Lyons, of Lexington, Kentucky, hereby forms a corporation under the laws of the Commonwealth of Kentucky.

ARTICLE I.

The name of the corporation shall be Alltech, Inc. **179945**

ARTICLE II.

The corporation shall continue perpetually, unless sooner dissolved according to the laws of the Commonwealth of Kentucky.

ARTICLE III.

The purpose of the corporation is to produce biochemicals for the food industry and to act as consultants therewith. In addition to the foregoing, the purposes of the corporation shall include the transaction of any and all lawful business for which corporations may be incorporated under the laws of the Commonwealth of Kentucky.

ARTICLE IV.

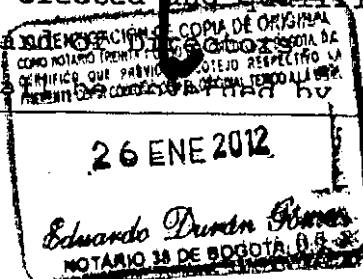
The total authorized number of shares of stock of this corporation is two thousand (2,000), the shares to be without par value, and the holder of each share of stock shall be entitled to one (1) vote for each share held.

ARTICLE V.

The initial registered office of the corporation is: Lane Allen Plaza, 345 Lane Allen Road, Lexington, Kentucky 40504. The initial registered agent of the corporation at the above address is: Thomas Pearce Lyons.

ARTICLE VI.

The initial Board of Directors shall consist of one (1) person who shall be: Thomas Pearce Lyons, 3529 Cornwall Drive, Lexington, Kentucky 40503. The director shall continue to serve until his successor has been elected and qualified. The subsequent organization of the Board of Directors shall include the number of directors. shall be



ARTICLE VII.

The incorporator of this corporation is: Thomas Pearse
Lyons, 3529 Cornwall Drive, Lexington, Kentucky 40503.

ARTICLE VIII.

This corporation shall have all of the powers granted to corporations under the laws of the Commonwealth of Kentucky.

IN WITNESS WHEREOF, witness the hand of the incorporator
hereof, this, the 17 day of August, 1980.

THOMAS PEARSE LYONS

STATE OF KENTUCKY))
COUNTY OF FAYETTE)) Sect.

Subscribed and sworn to before me by Thomas Pearse Lyons
this 6th day of August, 1980.

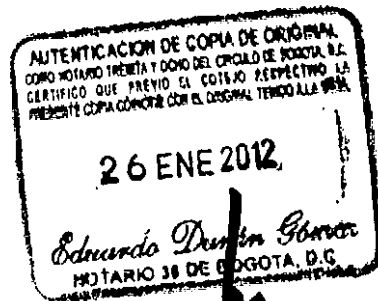
My Commission expires: 8/21/83

NOTARY PUBLIC, STATE AT LARGE
KENTUCKY

PREPARED BY:

GERALDS, CASSIDY & MOLCNEY
605 Court Square Building
Lexington, KY 40507

By Oscar H. Gerald, Jr.
OSCAR H. GERALDS, JR.



Commonwealth of Kentucky
Elaine N. Walker, Secretary of State

PARP
0148768
Elaine N. Walker
Secretary of State
Received and Filed
3/1/2011 4:08:15 PM
Fee receipt: \$15.00

Elaine N. Walker
Secretary of State
P. O. Box 1150
Frankfort, KY 40602-1150
(502) 564-3490
<http://www.sos.ky.gov>

**Annual Report
Online Filing**

ARP

Company: ALLTECH, INC.
Company ID: 0148768
State of origin: Kentucky
Formation date: 8/7/1980 12:00:00 AM
Date filed: 3/1/2011 4:08:15 PM
Fee: \$15.00

Principal Office

3031 CATNIP HILL
NICHOLASVILLE, KY 40356

Registered Agent Name/Address

NATIONAL REGISTERED AGENTS, INC
400 WEST MARKET STREET SUITE 1800
LOUISVILLE, KY 40202

Current Officers

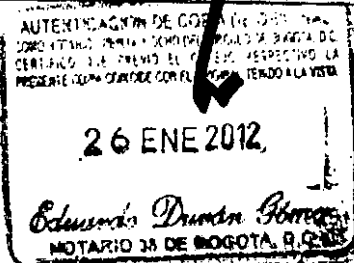
President	Thomas Pearse Lyons	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356
Secretary	Nathan H. Hohman	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356
Treasurer	Nathan H. Hohman	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356
Vice President	Mark Pearse Lyons	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356

Directors

Director	Thomas Pearse Lyons	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356
Director	Nathan H. Hohman	3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356

Signatures

Signature	Nathan Hohman
Title	Secretary/Treasurer



Oficina del Secretario de estado

Sello redondo. certificado

000257

APOSTILLA

(Convención De La Haya del 5 octubre de 1961)

1. País Estados Unidos de América
2. Este documento Público ha sido firmado por Vickie Hoeft
3. Quien ejerce funciones de notario público estado de Wisconsin
4. Lleva el sello notario público del estado de Wisconsin

CERTIFICADO

5. En Madison , Wisconsin 6. El 15 de agosto de 2011.
7. Por el secretario de estado- estado de Wisconsin
- 8 No. 210603 9. Sello del estado de Wisconsin
10. Firma ilegible Douglas Lafollette secretario de estado

La apostilla solo certifica la autoridad de la persona que firma en el n. 2. no significa que el contenido del documento es correcto o que el secretario apruebe el contenido. -

CERTIFICADO NOTARIAL:

(Copia verdadera)

Estado de Wisconsin

Condado de Dane) ss

Yo, Vickie Hoeft Notario público en y para el estado de Wisconsin, debidamente nombrada, certifico que el documento anexo es una copia verdadera del documento que me presentaron y es un Poder de ALLTECH, INC. con oficinas en 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville KY 40356, Estados Unidos, suscrito por Nathan Hunter Hohman, nombrando a Baker & McKenzie como agente, fechado el 20 de julio de 2011, cuyo original examiné

Fechado en Madison, Wisconsin, el 11 de agosto de 2011.

Firma ilegible de Vickie Hoeft notario del Estado de Wisconsin.

Sello oficial. Notario público, Su comisión vence el 24-03-2011-.

PODER

En inglés y español de ALLTECH, INC, firmado en Nicholasville, Kentucky Estados Unidos, el 20 julio de 2011. firmado por Nathan Hunter Hohman secretario y tesorero

De Alltech, Inc.

: Estado de Wisconsin.

Oficina del Secretario de estado

Sello redondo. certificado

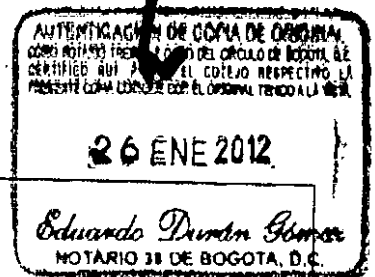
APOSTILLA

(Convención De La Haya del 5 octubre de 1961)

1. País Estados Unidos de América
2. Este documento Público ha sido firmado por Vickie Hoeft
3. Quien ejerce funciones de notario público estado de Wisconsin
4. Lleva el sello notario público del estado de Wisconsin

CERTIFICADO

5. En Madison , Wisconsin 6. El 22 de agosto de 2011.
7. Por el secretario de estado- estado de Wisconsin
- 8 No. 210603 9. Sello del estado de Wisconsin
10. Firma ilegible Douglas Lafollette secretario de estado



Marlén Neira Castro
MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

La apostilla solo certifica la autoridad de la persona que firma en el n. 2. no significa que el contenido del documento es correcto o que el secretario apruebe el contenido. -

2/5

CERTIFICADO NOTARIAL:

(Copia verdadera)

000258

Estado de Wisconsin

Condado de Dane) ss

Yo, Vickie Hoeft Notario público en y para el estado de Wisconsin, debidamente nombrada, certifico que el documento anexo es una copia verdadera del documento que me presentaron y es un Certificado de Existencia de ALLTECH, INC. con oficinas en 3031 Catnip Hill Pike NicholaSville KY 40356, Estados Unidos, cuyo original examiné

Fechado en Madison, Wisconsin, el 18 de agosto de 2011.

Firma ilegible de Vickie Hoeft notario del Estado de Wisconsin.

Sello oficial. Notario público, Su comisión vence el 24-03 - 2011- 8- 4- 2011 .

ESTADO DE KENTUCKY

Elaine N. Walker. Secretario de estado

División de sociedades anónimas Presentación de negocios Apartado 718 Frankfort KY 40602 (502) 564 23490 http://www.sos.ky.gov	Certificado de Existencia
No. De autenticación 11650	
Visite https:// app.sos.ky.gov/ftshow/certvalidate.aspx para autenticar este certificado	

Yo Elaine N. Walker. Secretario de estado de Kentucky, por el presente certifico que conforme a los registros en la oficina del secretario de estado

ALLTECH, INC es una sociedad anónima debidamente constituida y con existencia bajo el capítulo KRS 271B, cuya fecha de constitución es 7 de agosto de 1980, y con un período de duración a perpetuidad.

Certifico además que ha pagado todos los derechos y sanciones debidos al Secretario de estado , que la sociedad no ha presentado artículos de disolución, y que entregó al secretario de estado el informe anual más reciente requerido por KRS 271 B 16- 220.

Firma de Elaine N. Walker. Secretario de estado de Kentucky.

Sello redondo del secretario de estado de Kentucky

: Estado de Wisconsin. - Oficina del Secretario de estado

Sello redondo. certificado

APOSTILLA (Convención De La Haya del 5 octubre de 1961) 1. País Estados Unidos de América 2. Este documento Público ha sido firmado por Vickie Hoeft 3. Quien ejerce funciones de notario público estado de Wisconsin 4. Lleva el sello notario público del estado de Wisconsin 5. En Madison , Wisconsin 6. El 22 de agosto de 2011. 7. Por el secretario de estado- estado de Wisconsin 8 No. 210604 9. Sello del estado de Wisconsin 10. Firma ilegible Douglas Lafollette secretario de estado	CERTIFICADO 26 ENE 2012 <i>Eduardo Durán Gómez</i> NOTARIO 38 DE BOBÓTA, B.C.
--	--

La apostilla solo certifica la autoridad de la persona que firma en el n. 2. no significa que el contenido del documento es correcto o que el secretario apruebe el contenido. -

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

3/5

CERTIFICADO NOTARIAL:

(Copia verdadera)

900259

Estado de Wisconsin
Condado de Dane) ss

Yo, Vickie Hoeft Notario público en y para el estado de Wisconsin, debidamente nombrada, certifico que el documento anexo es una copia verdadera del documento que me presentaron y es un Certificado de Constitución de ALLTECH, INC. con oficinas en 3031 Catnip Hill Pike Nicholasville KY 40356, Estados Unidos, cuyo original examiné

Fecha en Madison, Wisconsin, el 18 de agosto de 2011.

Firma ilegible de Vickie Hoeft notario del Estado de Wisconsin.

Sello oficial. Notario público, Su comisión vence el 24-03 - 2011-

ESTADO DE KENTUCKY

Elaine N. Walker. Secretario de estado

CERTIFICADO

Yo Elaine N. Walker. Secretario de estado de Kentucky, por el presente certifico que he comparado cuidadosamente el escrito anterior con el original del mismo, ahora bajo mi custodia oficial como secretario de estado y que permanece en archivo en mi oficina, y encuentro que es una copia verdadera y correcta del CERTIFICADO DE CONSTITUCIÓN DE ALLTECH, INC presentado el 7 de agosto de 1980,

INFORME ANUAL DE 2001 Presentado el 1 marzo de 2011.

En testimonio de lo anterior, firmo y estampo el sello oficial en Frankfort, Kentucky el 4 de agosto de 2011.

Firma de Elaine N. Walker. Secretario de estado de Kentucky.

Sello redondo del secretario Estado De Kentucky-

---- : 148768

ESTADO DE WISCONSIN. - Oficina del Secretario de estado

Frances Jones Mills - secretaria Sello redondo. Frankfort Kentucky

CERTIFICADO DE CONSTITUCIÓN

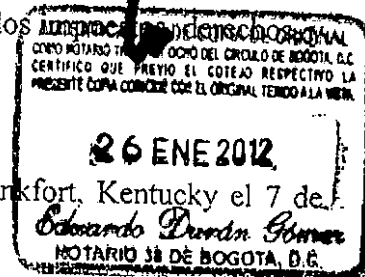
Yo Frances Jones Mills. Secretario de estado de Kentucky, por el presente certifico que he se ha presentado en esta oficina el Certificado De Constitución De

ALLTECH, INC , cuyo agente inicial para proceso es Thomas Pearse Lyons, dirección Lane Allen Plaza, 845 Lane Allen Road. Dirección en Lexington Kentucky, debidamente firmado conforme a la ley. Certifico además que esa compañía ha pagado todos los cargos pagaderos al momento de presentar tal Acta Constitutiva.

Expedido con mi firma y sello oficial de Secretario de Estado en Frankfort, Kentucky el 7 de agosto de 1980.

Firma de Frances Jones Mills.. Secretario de estado de Kentucky.

Sello redondo del secretario Estado De Kentucky-



16

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

9/5

000260

CERTIFICADO DE CONSTITUCIÓN DE ALLTECH, INC.

El suscrito Thomas Pearse Lyons, de Lexington Kentucky, por el presente constituye una sociedad anónima conforme a las leyes del estado de Kentucky

Artículo 1.

La razón social de la sociedad es Alltech, Inc.

Artículo II.

La sociedad tiene una duración a perpetuidad, a menos de que se disuelva antes conforme a las leyes del estado de Kentucky,

Artículo III

- El objeto social de la sociedad es producir bioquímicos para la industria alimentaria y actuar como consultores de la misma. Además de lo anterior, el objeto de la sociedad incluye hacer la transacción de todo negocio legal para los que se constituyan sociedades conforme a las leyes del estado de Kentucky.

Artículo IV.

El número total de acciones autorizadas de la sociedad es dos mil (2.000), acciones con valor nominal y el tenedor de cada acción de capital tendrá derecho a un voto por acción.

Artículo V. La oficina registrada inicial de la sociedad es: Lane Allen Plaza 845 Lane Allen Road, Lexington, Kentucky 40504. El agente inicial registrado de la sociedad anterior es: Thomas Pearse Lyons.

Artículo VI.

La junta directiva inicial consiste en una (1) persona que será Thomas Pearse Lyons, 35 29 Cornwall Drive, Lexington, Kentucky 40503. El director continuará sirviendo hasta que se elija y califique su sucesor. La organización subsiguiente de la Junta Directiva incluyendo el número de directores, se regirá por las leyes (N.-T.: texto cortado)

Artículo VII. El fundador de la sociedad es Thomas Pearse Lyons, 3529 Cornwall Drive, Lexington, Kentucky 40503.

Artículo VIII-

Esta sociedad tendrá todos los poderes otorgados a la sociedad conforme a las leyes del estado de Kentucky.

En testimonio de lo anterior, firma el fundador el 6 de agosto 1980.

Firma Thomas Pearse Lyons.

Estado de Kentucky)

Condado Fayette

Suscrito y legalizado ante mi por Thomas Pearse Lyons el 6 de agosto de 1980.

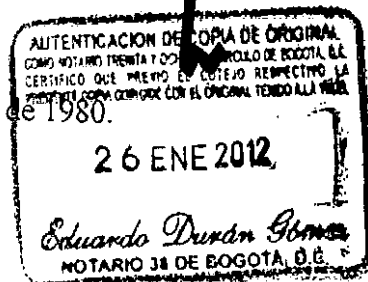
Su comisión vence el 8-27- 83.

Firma ilegible del Notario publico para todo el estado de Kentucky.

Preparado por Gerald Cassidy & Moloney.

605 Court Square Building. Lexington KY 40507

Por Oscar H. Gerald, JR.



Marlen Neira Castro
MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987

17

ESTADO DE KENTUCKY

Elaine N. Walker. Secretario de estado

5/5
000261

01480148768
Elaine N. Walker Secretario de estado- Recibido y archivado

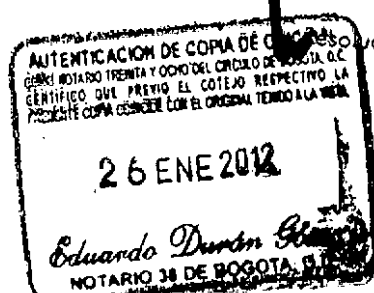
3/1/2011 4:08:15 PM pago de derechos: \$15.00

Apartado 1150 Frankfort KY 40602 (502) 564 23490 http://www.sos.ky.gov		INFORME ANUAL PRESENTACION EN LINEA - ARP	
Compañía ALLTECH, INC. Identificación de compañía 0148768 Estado de Origen Kentucky Fecha de constitución 817/1980 hora 12:00:00 AM Fecha de presentación 3/11201 hora 14:08:15 PM Derechos pagados \$15.06			
Oficina Principal 3031 CATNIP HILL NICHOLASVILLE, KY 40356			
Nombre de agente Registrado/dirección National Registered Agents, Inc 400 West Market Street Suite 1800 Louisville, Ky 40202 .			
Funcionarios actuales			
Presidente	Thomas Pearse Lyons 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356		
Secretario	Nathan H Hohman . 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356		
Tesorero	Nathan Hohman 3031	Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356	
Vice Presidente	Mark Pearse. Lyons	Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356	
Directores			
Director	Thomas Pearse Lyons	Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356	
Director	Nathan H Hohman	Catnip Hill Pike, Nicholasville; KY 40356	
Firmas			
Firma Nathan Hohman			
Cargo SecretarioTesorero			

Es traducción conforme con copia para confrontar. Bogota. Sept 6- 2011.

Marlen Neira Castro

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 7 Oct 1987





No. 12-012902-00000-0000

Fecha: 2012-01-27 16:21:49

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Evs: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 261

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 515

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐