



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0026183

(51)⁷ A61K 39/39; A61K 39/012

(13) B

(21) 1-2012-02288

(22) 14/01/2011

(86) PCT/FR2011/050069 14/01/2011

(87) WO/2011/092413 04/08/2011

(30) 1050663 01/02/2010 FR

(45) 25/11/2020 392

(43) 26/11/2012 296A

(73) SOCIÉTÉ D'EXPLOITATION DE PRODUITS POUR LES INDUSTRIES
CHIMIQUES SEPPIC (FR)

75 Quai d'Orsay F-75007 Paris (FR)

(72) DUPUIS, Laurent (FR); BERTRAND, François (FR); DEVILLE, Sébastien (FR).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) TÁ DƯỢC VACXIN VÀ VACXIN CHỨA TÁ DƯỢC NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến tá dược vacxin mà, trên cơ sở 100% khối lượng của nó, bao gồm từ 10% đến 95% dầu khoáng chứa: từ 0,05% khối lượng và 10% khối lượng chuỗi hydrocarbon có ít hơn 16 nguyên tử carbon, và từ 0,05% khối lượng đến 5% khối lượng chuỗi hydrocarbon có nhiều hơn 28 nguyên tử carbon. Ngoài ra, tá dược đã nêu có tỷ lệ P/N, tương ứng với tỷ lệ của số lượng khối lượng của chuỗi hydrocarbon parafin với số lượng khối lượng của chuỗi hydrocarbon naphthen, là từ 2,5 đến 3, tá dược đã nêu thích hợp dùng cho việc sản xuất chế phẩm vacxin để phòng ngừa bệnh trùng cầu.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến tá dược vacxin dùng cho việc điều chế các chế phẩm vacxin để điều trị bệnh trùng cầu ở gia cầm. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến vacxin chứa các tá dược này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh trùng cầu là bệnh ký sinh thường gặp ở gia cầm.

Gia cầm là những loài chim được nuôi ở nhà thường bao gồm chim có màng ở chân hoặc bộ gà được nuôi để lấy thịt hoặc trứng hoặc trong sân trại truyền thống hoặc được chăn nuôi ở trang trại.

Thuật ngữ gia cầm bao gồm gà, gà tây, ngỗng, vịt, gà Nhật, bồ câu, chim cút, chim trĩ, đà điểu.

Tác nhân căn nguyên (hoặc tác nhân mang bệnh) là ký sinh trùng đơn bào nội bào được gọi là bệnh trùng cầu, và thông thường nhất là thuộc về chi *Eimeria*.

Có một vài loại bệnh trùng cầu đối với từng loài gia cầm:

Bệnh trùng cầu gà: *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. tenella*, *E. mitis*, *E. praecox*.

Bệnh trùng cầu gà Tây: *E. meleagritidis*, *E. adenoeides*, *E. dispersa*, *E. gallopavonis*.

Bệnh trùng cầu ngỗng: *E. truncata* (nó cũng có thể ảnh hưởng đến ngan và thiên nga), *E. anseris*.

Bệnh trùng cầu vịt: *Tyzzeria perniciosus*, *E. mulardi*. Bệnh này đặc biệt ảnh hưởng đến vịt trời.

Bệnh trùng cầu gà Nhật: *E. numidia*, *E. grenieri* (thường gặp nhất nhưng có khả năng gây bệnh thấp hơn).

Bệnh trùng cầu bồ câu: *E. labbeana*

Việc phòng ngừa bệnh trùng cầu được thực hiện trên cơ sở các giải pháp sau:

a) Phương pháp phòng ngừa hóa học:

Phương pháp này sử dụng các hóa chất thuộc loại kháng sinh và có các nhược điểm:

- Gây nguy cơ phát triển dị ứng ở động vật được điều trị với các thuốc kháng sinh, đặc biệt có sự hiện diện của "dư lượng" hoặc sản phẩm phụ không mong muốn trong các thuốc kháng sinh này;
- Gây nguy cơ phát triển khả năng kháng thuốc kháng sinh trong các loài được điều trị;
- Bị điều chỉnh bởi những quy định hạn chế;
- Làm tổn hại đến hình ảnh của thịt gia cầm thương mại, với nguy cơ không còn có đối với nhân chất lượng yêu cầu bảo hộ chăn nuôi theo điều kiện "tự nhiên".

b) Phương pháp tiêm chủng liên quan đến các vacxin “sống”:

Các vacxin thu được từ các tác nhân sống được làm suy yếu được điều chế bằng cách nhân các tác nhân truyền nhiễm trong phòng thí nghiệm cho đến khi chúng mất đặc điểm gây bệnh của chúng, một cách tự nhiên hoặc nhân tạo, bởi đột biến.

Sau đó, những chủng thu được thì không có khả năng phát triển đầy đủ độc tính gây bệnh mà trước đó chúng đã gây ra.

Tuy nhiên, các chủng này vẫn duy trì các kháng nguyên của chúng, và khả năng của chúng trong việc tạo ra đáp ứng miễn dịch.

Phương thức tiêm chủng này, sau khi cung cấp cho động vật, chúng cư trú tại đường tiêu hóa và tránh được hiện tượng cấy ghép các chủng này với các tác nhân độc.

Phương thức tiêm chủng này có các nhược điểm:

- có thể hồi độc tính;
- cần nuôi cấy quy mô lớn đối với vi khuẩn gây bệnh tiềm năng;

- các động vật được tiêm chủng bằng phương pháp này có thể bài tiết ra, vì thế cấu thành nguồn gây bệnh tiềm năng trong môi trường và do đó tiềm ẩn nguy cơ gieo rắc những mầm bệnh này.

Do đó, nhược điểm cuối giúp hiểu rõ lý do tại sao nó không được ưu tiên trong trường hợp chăn nuôi gia cầm lộ thiên để tiêm chủng chống bệnh trùng cầu, là bệnh ký sinh và do đó, dễ dàng lan truyền bằng cách phát tán.

Các vaccin chống bệnh trùng cầu là những thuốc thú y. Kết quả là, chúng là đối tượng chịu sự điều chỉnh của luật đối với thuốc thú y, bản thân thuốc này chịu áp đặt của luật về thuốc.

Ba loại vaccin chống bệnh trùng cầu được cấp phép ở Pháp: chúng là những vaccin sống bao gồm những chủng “sớm” mà được làm giảm độc lực bằng gây miễn dịch để bảo vệ trước các loài được phát hiện trong lĩnh vực này.

Ba vaccin này chỉ có thể được sử dụng cho loài gà (*Gallus gallus*) vì chúng chỉ chứa loài có khả năng ký sinh loài gà, không có tính miễn dịch chéo chống lại các loài khác nhau của bệnh trùng cầu.

c) Các phương pháp thông thường của việc tiêm chủng bằng kháng nguyên không sống hoặc “không được hoạt hóa”:

Tính hiệu quả của các vaccin hiện có không được như kỳ vọng do mức của thành phần tế bào của đáp ứng miễn dịch không đủ cao để tạo ra sự bảo vệ hữu hiệu trong trường hợp cụ thể là bệnh ký sinh như bệnh trùng cầu cụ thể.

Nhiều ADN hỗ trợ mã hóa các kháng nguyên *Eimeria* đã được mô tả, và các thử nghiệm gây miễn dịch đang được thực hiện với một số loài này. Sự phát triển của khả năng đề kháng cũng phụ thuộc vào nền tảng di truyền và phương thức dùng thuốc (và vào tá dược). Một số kháng nguyên đã biểu hiện khả năng bảo vệ một phần. Nghiên cứu này liên quan đến các kháng nguyên chung cho một vài loài bệnh trùng cầu: ví dụ, kháng nguyên GX3262 mà có tính phản ứng với kháng thể đơn dòng có tác dụng nhận biết kháng nguyên thoa trùng mà chung cho bảy loài bệnh trùng cầu gà, tạo ra sự bảo vệ một phần.

Do đó, có nhu cầu cải thiện các chế phẩm vaccin không được hoạt hóa này.

Sự phát triển của các vacxin không được hoạt hóa hoặc các vacxin chứa các kháng nguyên được tinh chế ngày càng quan trọng bởi vì có thể tránh được càng nhiều càng tốt những tác dụng phụ không mong muốn tại vị trí đối tượng được tiêm chủng trước khi và sau khi tiêm chủng. Tuy nhiên, tình trạng cải thiện chất lượng của các kháng nguyên đạt được là nhờ tính sinh miễn dịch của chúng. Vì lý do này mà chúng được kết hợp với các tá dược mà có thể làm tăng đáp ứng miễn dịch tại vị trí đối tượng được tiêm chủng.

Những tá dược này thì đa dạng trong tự nhiên. Ví dụ, chúng có thể bao gồm liposom, nhũ tương chứa ít nhất một pha dầu và ít nhất một pha nước, của tá dược Freund, thường là các muối vô cơ không tan trong nước. Trong số các muối vô cơ được sử dụng đóng vai trò tá dược dùng cho các chế phẩm vacxin, có thể đề cập đến, ví dụ, nhôm hydroxit, xeri nitrat, kẽm sulfat, sắt hydroxit keo hoặc canxi clorua. Nhôm hydroxit là tá dược được dùng rộng rãi nhất. Các muối vô cơ này được sử dụng với vai trò là tá dược dùng cho các chế phẩm vacxin được mô tả cụ thể trong ấn phẩm của Rajesh K. Gupta và al "Adjuvants, balance between toxicity and adjuvanticity", Vacxin, Vol 11, No. 3, 1993, Pages 993-306".

Các tá dược được đề cập ở trên có nhược điểm là hiệu suất thấp. Ngoài ra, đã biết được rằng nhôm hydroxit chỉ tạo ra miễn dịch dịch thể một cách hiệu quả, chứ không phải miễn dịch tế bào. Hơn nữa, chúng có thể gây ra một số tính độc đối với đối tượng được điều trị. Cụ thể hơn, khi tiêm những chế phẩm vacxin này vào đối tượng được tiêm chủng, thì có thể quan sát được hiện tượng tạo thành các tổn thương và các phản ứng cục bộ khác như u hạt ở vị trí tiêm.

Các tá dược khác, bao gồm các muối kim loại hóa trị hai hoặc hóa trị ba hoặc khác nữa của các hợp chất kích thích thần kinh giao cảm được mô tả lần lượt trong WO 96/32964, WO 98/17311 và WO 98/15288.

Các nhũ tương là những hỗn hợp ổn định bao gồm hệ của hai chất lỏng không trộn lẫn được mà một chất được tạo thành hạt nhỏ trong chất kia. Vì vậy, nhũ tương bao gồm dầu, pha nước và các tác nhân hoạt động bề mặt mà có vai trò phân tán một trong hai pha trong pha còn lại và đạt được hỗn hợp đồng nhất và ổn định ở

mức hiển vi. Chúng thường được sử dụng làm tá dược miễn dịch trong dạng chế phẩm vaccin.

Cách sử dụng các loại dầu khoáng làm tá dược vaccin đã được biết đến từ nhiều năm trước (Freund 1956, Herbert 1967). Các loại dầu khoáng được sử dụng làm tá dược vaccin là những hydrocarbon lỏng mà thu được bằng quá trình chưng cất dầu mỏ và bằng cách sử dụng các bước xử lý kế tiếp như, ví dụ, bước loại lưu huỳnh, loại asphan, chiết các hợp chất thơm, chiết sáp, và các bước xử lý hoàn thiện khác. Các nghiên cứu về ảnh hưởng về chất lượng của dầu đối với đáp ứng miễn dịch chỉ diễn ra từng bước và theo phương thức không hoàn chỉnh. Thực sự, chế phẩm của các loại dầu khoáng bị ảnh hưởng nhiều bởi nguồn gốc địa lý của các loại dầu thô được sử dụng và quy trình (hóa học và thiết bị) được sử dụng cho việc điều chế chúng. Các nghiên cứu được thực hiện trên các phần khác nhau là để đánh giá bản chất độc hại đối với người lao động, người sử dụng (nhưng không đánh giá mục đích sử dụng trong lĩnh vực sức khỏe động vật hoặc sức khỏe con người). Những lần tối ưu hóa chế phẩm của các dầu khoáng này, trên cơ sở mô tả đặc điểm vĩ mô (độ nhớt, điểm nóng chảy) được thực hiện với các loại của dầu khoáng công nghiệp hiện có, hoặc của các sản phẩm hóa học phòng thí nghiệm tinh khiết, nhưng không tương ứng với những định nghĩa hoặc những mô tả đặc điểm của các loại nguyên liệu thô chấp nhận được. Vì vậy, thậm chí các nghiên cứu sâu rộng được thực hiện trên các loại dầu công nghiệp trong số các loại dầu khoáng được xác định bằng các thông số không phản ánh các thuộc tính sinh học của chúng khiến cho chúng đã và đang gây ra những thay đổi về hành vi trong suốt quá trình sử dụng đối với các vaccin tùy thuộc vào nguồn gốc của mỡ dầu khoáng. Những mỡ này, mặc dầu tương ứng với những tính năng kỹ thuật và yêu cầu phân tích vĩ mô của chúng và có cùng tên thương mại, có các chế phẩm mà khác biệt đủ để đem lại các thuộc tính tương tự đối với vaccin này. Hơn nữa, độ nhớt của nhũ tương đạt được từ dầu khoáng, mà không tối ưu hóa theo galen, gây ra sự thiên lệch về cách hiểu kết quả.

Ảnh hưởng của sự phân bố giữa mạch thẳng và mạch vòng được đánh giá để thẩm định tính độc tiềm tàng trong suốt quá trình sử dụng các loại dầu khoáng bằng cách tiêm, đã đặt ra nghi vấn về khả năng sinh quái thai của các dạng mạch vòng. Sau đó, tiêu chí về tính độc được xác định khi hình thành từ các dạng chưa bão hòa,

các dạng này được loại bỏ hoàn toàn trong các quy trình hiện có bằng quá trình hydro hóa mở rộng.

Không có nghiên cứu nào đã được thực hiện với mục đích đánh giá sự ảnh hưởng giữa tỷ lệ của các cấu tử mạch thẳng hoặc loại mạch vòng liên quan đến chất lượng đáp ứng miễn dịch.

Các loại dầu khoáng đã được sử dụng trong nhiều thập kỷ với vai trò là tá dược và để điều chế các tá dược nhằm mục đích dùng để làm tăng tính hiệu quả của đáp ứng miễn dịch của các vacxin. Thực sự, các kháng nguyên được nhũ hóa trước trong nhũ tương thuộc loại nước-trong-dầu khoáng (W/O) và sau đó, được cung cấp theo đường ngoài đường tiêu hóa khởi động các đáp ứng miễn dịch (và do đó, bảo vệ trước mầm bệnh) mạnh hơn và kéo dài hơn.

Bản chất của dầu khoáng được sử dụng cho việc điều chế các tá dược có ảnh hưởng lớn đến cường độ của đáp ứng miễn dịch cũng như đối với các phản ứng thứ cấp liên quan đến việc tiêm vacxin (phản ứng cục bộ và phản ứng toàn thân).

Có hai loại đáp ứng miễn dịch:

+ Đáp ứng miễn dịch dịch thể:

Đây là phản ứng mà được tạo ra khi các tế bào lympho B sở hữu các thụ thể cụ thể được kích thích bởi kháng nguyên và biệt hóa thành dòng thuần của các tương bào mà bắt đầu tiết các kháng thể. Những chất này hữu hiệu trong việc chống lại các tác nhân gây bệnh lưu thông trong máu và bạch huyết. Ngoài ra, việc hoạt hóa chọn lọc đối với các tế bào lympho B đem lại cho sinh vật các tế bào nhớ có tuổi thọ được kéo dài can thiệp vào đáp ứng miễn dịch thứ cấp, và

+ Đáp ứng miễn dịch tế bào

Phản ứng miễn dịch dịch thể giúp mạng lưới phòng vệ nhận biết và phá hủy các tác nhân gây bệnh tự do, nhưng đây là phản ứng do tế bào gây ra có tác dụng chống lại các tác nhân gây bệnh xâm nhập vào tế bào. Các tác nhân chính của tính miễn dịch do tế bào gây ra là các tế bào lympho T.

Các tế bào lympho T chỉ phản ứng với yếu tố quyết định kháng nguyên lộ ra ở bề mặt của các tế bào của sinh vật. Tế bào lympho T nhận biết những yếu tố quyết

định này nhờ các thụ thể của chúng, các protein bề mặt nằm trong màng huyết tương của chúng. Thụ thể của tế bào lympho T nhận biết kháng nguyên được kết hợp với một trong các glycoprotein của MHC của sinh vật. Ngoài vai trò của chúng trong đáp ứng dịch thể ra, tế bào lympho T hỗ trợ cũng có thể hoạt hóa các loại tế bào lympho T khác để khởi động các phản ứng do tế bào gây ra chống lại kháng nguyên. Các tế bào lympho T gây độc tế bào là những tế bào duy nhất có khả năng tiêu diệt các tế bào khác (các tế bào bị nhiễm các tác nhân gây bệnh nội bào).

Đã biết rõ các tá dược dạng dầu làm tăng thành phần dịch thể của đáp ứng miễn dịch học (được đo bằng thử nghiệm các globulin miễn dịch của nhóm 1 hoặc IGG1) trong khi đó các đáp ứng loại tế bào (được đo một cách gián tiếp bằng IGG2) thì rất khó đạt được.

Đã biết được rằng nhũ tương W/O, chất này đem lại các đáp ứng miễn dịch mạnh nhất, cũng tạo ra thành phần loại tế bào, nhưng theo các tỷ lệ thấp hơn, ví dụ, thấp hơn một số phân tử tan (saponin hoặc loại chất hoạt động bề mặt cation) chất này được cho là có chức năng định hướng đáp ứng về phía cơ chế tế bào.

Các nhũ tương với pha nước liên tục sử dụng các loại dầu khoáng thường có mặt trên thị trường là những chất trợ xúc tác rất yếu của đáp ứng tế bào.

Thực sự, loại đáp ứng do các vaccin tạo ra thì bị ảnh hưởng bởi cấu trúc của kháng nguyên, nhưng cũng bị ảnh hưởng bởi cách mà kháng nguyên được đưa vào hệ miễn dịch thông qua các tá dược. Các tá dược có các ảnh hưởng khác nhau đối với đáp ứng miễn dịch bởi vì chúng có thể gây ra đáp ứng miễn dịch trong một khoảng thời gian dài hơn hay ngắn hơn, với đặc điểm nổi trội thuộc loại tế bào hoặc loại dịch thể.

Miễn dịch do tế bào gây ra là quan trọng, hoặc thậm chí đôi khi là thiết yếu cho việc bảo vệ trước vi khuẩn, virus nội bào và phần lớn là ký sinh trùng. Nó liên quan đến hầu hết cơ chế bảo vệ vaccin như là phần bổ sung cho đáp ứng dịch thể.

Ví dụ, có thể phân loại khả năng của tá dược trong việc tạo ra đáp ứng miễn dịch học loại tế bào của chế phẩm vaccin chứa nó bằng cách so sánh các tỷ lệ IGG1/IGG2 đo được sau khi cung cấp ngoài đường tiêu hóa chế phẩm vaccin chứa

tá dược này cho các đối tượng có liên quan, ở các khoảng thời gian khác nhau sau ngày tiêm chủng các đối tượng đã nêu. Tỷ lệ này càng cao, thì càng nhiều tá dược sẽ định hướng đáp ứng miễn dịch của chế phẩm vaccin về phía thành phần dịch thể. Trị số của tỷ lệ IGG1/IGG2 gần với một sẽ được xem là dấu hiệu của đáp ứng miễn dịch được làm cân bằng của chế phẩm vaccin giữa hai thành phần của nó. Trị số của tỷ lệ IGG1/IGG2 là nhỏ hơn một sẽ là đặc trưng của đáp ứng miễn dịch của chế phẩm vaccin thuộc loại tế bào là chủ yếu.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là tạo ra tá dược dùng để bào chế các chế phẩm vaccin, tá dược này là để cải thiện thành phần tế bào trong đáp ứng miễn dịch, trong khi vẫn giữ được mức thành phần dịch thể tốt. Do đó, có nhu cầu tạo ra các tá dược vaccin có đáp ứng miễn dịch được làm cân bằng hoặc thậm chí thuộc loại tế bào chiếm đa số. Ngoài ra, các vaccin được điều chế bằng tá dược là đối tượng của sáng chế cần phải thể hiện tính an toàn tốt.

Theo mục đích này, đối tượng của sáng chế là tá dược vaccin chứa đối với 100% khối lượng của tá dược vaccin này chứa từ 10% đến 95%, và tốt hơn, nếu là từ 20% đến 90% dầu khoáng bao gồm:

- từ 0,05% khối lượng đến 10% khối lượng chuỗi hydrocarbon có ít hơn 16 nguyên tử carbon;
- từ 0,05% khối lượng đến 5% khối lượng chuỗi hydrocarbon có nhiều hơn 28 nguyên tử carbon;
- và có tỷ lệ P/N, tương ứng với tỷ lệ giữa số lượng theo khối lượng của chuỗi hydrocarbon thuộc loại parafin và số lượng theo khối lượng của chuỗi hydrocarbon thuộc loại naphten, là từ 2,5 đến 3,

dùng trong sản xuất chế phẩm vaccin có mục đích để phòng ngừa bệnh trùng cầu.

Hơn nữa, các phương án của sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều đặc điểm dưới đây:

Tá được như được định nghĩa trên đây, dùng để sản xuất chế phẩm vaccin nhằm mục đích dùng cho việc phòng ngừa bệnh trùng cầu ở động vật, cụ thể là gia cầm.

Tá được như được định nghĩa trên đây, khác biệt ở chỗ tỷ lệ P/N đã nêu là từ 2,5 đến 3, tốt hơn, nếu là từ 2,8 đến 2,9.

Tá được như được định nghĩa trên đây, khác biệt ở chỗ nó còn bao gồm:

- từ 5% đến 90% của ít nhất một chất hoạt động bề mặt. Tốt hơn là từ 5% đến 50%.

Theo một khía cạnh khác, đối tượng của sáng chế là vaccin có mục đích sử dụng để phòng ngừa bệnh trùng cầu, bao gồm tá được như được định nghĩa trên đây và ít nhất một kháng nguyên.

Hơn nữa, các phương án của sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều đặc điểm dưới đây:

- vaccin như được định nghĩa trên đây, dùng để phòng ngừa bệnh trùng cầu ở động vật, cụ thể là gia cầm,

- vaccin như được định nghĩa trên đây, khác biệt ở chỗ bệnh trùng cầu được chọn từ nhóm bao gồm *Eimeria*, *Isospora*, *Toxoplasma*, *Besnoitia*, *Neospora*, tốt hơn là *Eimeria*,

- vaccin như được định nghĩa trên đây, khác biệt ở chỗ nó ở dạng nhũ tương thuộc loại nước-trong-dầu (W/O), và

- vaccin như được định nghĩa trên đây, khác biệt ở chỗ kháng nguyên là protein tái tổ hợp chứa trình tự *Eimeria Acervulina* 3-1.

Theo một khía cạnh khác, đối tượng của sáng chế đề cập đến việc sử dụng dầu khoáng để sản xuất vaccin như được định nghĩa trên đây, khác biệt ở chỗ dầu đã nêu chứa đối với 100% khối lượng của nó:

- từ 0,05% đến 10% chuỗi hydrocarbon có ít hơn 16 nguyên tử carbon;

- từ 0,05% đến 5% chuỗi hydrocarbon có nhiều hơn 28 nguyên tử carbon;

và có tỷ lệ P/N, tương ứng với tỷ lệ giữa số lượng theo khối lượng của chuỗi carbon thuộc loại parafin và số lượng theo khối lượng của chuỗi carbon thuộc loại naphten, là từ 2,5 đến 3, tốt hơn, nếu là từ 2,8 đến 2,9.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chế phẩm theo sáng chế cũng có thể chứa một hoặc nhiều chất hoạt động bề mặt nhũ hóa. Chất hoạt động bề mặt nhũ hóa thể hiện đặc điểm ưa mỡ hoặc ưa nước được đặc trưng bởi trị số HLB (cân bằng ưa nước-ưa mỡ) là từ 1 đến 19.

Chất hoạt động bề mặt như vậy có thể bao gồm:

- alkylpolyglycosit hoặc hỗn hợp của alkylpolyglycosit có công thức $R_a-(O)_n-Zn$ trong đó R_a là gốc béo no mạch thẳng hoặc phân nhánh bao gồm từ 4 đến 24 nguyên tử carbon, Z là gốc của đường, tốt hơn, nếu là glucoza, và n là từ 1 đến 5, tốt hơn, nếu là từ 1,1 đến 2,
- saponin,
- các sorbitan este, như, ví dụ, sorbitan oleat, sorbitan stearat, sorbitan palmitat, sorbitan laurat;
- các mannitan este, như, ví dụ, mannitan oleat, mannitan stearat, mannitan palmitat, mannitan laurat;
- các sorbitan este được polyoxyetyl hóa từ 5 mol đến 20 mol etylen oxit, như, ví dụ, sorbitan oleat được etoxy hóa chứa 20 mol etylen oxit;
- các mannitan este được polyoxyetyl hóa từ 5 mol đến 20 mol etylen oxit, như, ví dụ, mannitan oleat được etoxy hóa chứa 20 mol etylen oxit;
- lexitin;
- các alkanol được polyoxyetyl hóa như, ví dụ, những loại được bán dưới tên thương mại BRIJ, và cụ thể là BRIJ 21 và BRIJ 221 bởi công ty UNIQEMA;
- các polyme hoạt động bề mặt chứa các khối được polyoxyetylen hóa và được polyoxypropylen hóa, như những loại được bán dưới tên thương mại PLURONICS bởi công ty BASF;
- các polyglycol hoặc polyglyxerol polyhydroxystearat như, ví dụ, các sản phẩm được gọi là HYPERMER™ B246, ARLACEL™ P135 được bán bởi công ty UNIQEMA.

Sự biểu hiện kháng nguyên được hiểu là phân tử bất kỳ có các thuộc tính sinh miễn dịch mà có khả năng gây ra một đáp ứng miễn dịch cụ thể. Các kháng nguyên này có thể là mầm bệnh được bất hoạt, như, ví dụ, vi khuẩn bị bất hoạt, các phân tử được chiết từ mầm bệnh, các phân tử được tạo ra bằng quá trình tái tổ hợp gen đối với vi sinh vật.

Các loại dầu khoáng thu được từ sự chưng cất, sau đó là quá trình hydro hóa mở rộng các sản phẩm có nguồn gốc dầu mỏ. Chúng bao gồm các phân tử hóa học thuộc họ alkan no. Đối với loại phân tử này, con số các nguyên tử carbon (n) thường là lớn hơn 9 và nhỏ hơn 30, nhờ đó chúng ở dạng lỏng ở 25°C. Thuật ngữ parafin lỏng cũng được sử dụng. Parafin rắn bao gồm các phân tử hóa học thuộc họ alkan mà trong đó, n là lớn hơn 30, có thể lên đến 50, và nhờ đó, chúng có dạng rắn ở 25°C. Parafin lỏng, hoặc dầu khoáng, là những chất lỏng trong suốt và không mùi mà độ nhớt động lực của chúng có thể giao động từ 2 miliPascal.giây (mPa.s) đến 1 Pascal.giây. Độ nhớt động lực của các loại dầu khoáng thì liên quan trực tiếp với chiều dài trung bình của chuỗi carbon của các alkan cấu thành các loại dầu khoáng đã nêu. Các alkan có chuỗi hydrocarbon dài nhất thì chịu trách nhiệm về các độ nhớt động lực cao nhất. Các phân tử liên quan có thể ở dạng chuỗi hydrocarbon thẳng hoặc phân nhánh (được phân nhóm dưới tên “parafin” (P) hoặc được tạo vòng (naphten N)) nhưng vẫn no (không có liên kết đôi mà bị loại bỏ trong suốt quá trình xử lý hydro hóa). Độ nhớt, điểm nóng chảy và điểm sôi thì liên quan trực tiếp với con số carbon mà chuỗi hydrocarbon chứa. Do đó, dầu khoáng trắng có thể được đặc trưng bởi khoảng chưng cất của nó, độ nhớt động lực của nó, con số trung bình của các nguyên tử carbon của nó, nhưng đồng thời bởi tỷ lệ P/N giữa phân tử mạch thẳng và phân nhánh và số lượng các phân tử được tạo vòng của nó (được xác định theo phương pháp DIN 51378). Cần phải lưu ý rằng tiêu chí độ nhớt động lực có thể được cải biến một cách nhân tạo bằng cách trộn hai phần cất khác nhau.

Ví dụ thực hiện sáng chế

I) Phần một

Những ví dụ dưới đây giúp cho có thể chứng minh các đặc tính của các chế phẩm phụ trợ theo sáng chế.

Theo sáng chế, nghiên cứu về các thuộc tính tá được của các loại dầu được mô tả rõ khác nhau đã giúp cho có thể nhận diện các chế phẩm gốc mới được đặc trưng bởi những giới hạn của các chế phẩm được thiết lập bởi sắc ký.

Nghiên cứu này được thực hiện trên các chế phẩm vacxin thử nghiệm trong trường hợp thứ nhất với các công thức được cung cấp ở dạng nhũ tương nước-trong-dầu (W/O) đã giúp cho có thể thiết lập được các điều kiện tối ưu để thu được các đáp ứng miễn dịch được làm cân bằng giữa hai hợp phần của nó và đáp ứng miễn dịch với thành phần tế bào chiếm đa số đối với các công thức được dung nạp tốt nơi chuột. Giai đoạn tiếp theo của thử nghiệm, được thực hiện trên các loại công thức khác và các động vật khác nhau, đã giúp cho có thể chứng minh được rằng các chế phẩm phụ trợ là đối tượng của sáng chế đem lại những đáp ứng miễn dịch tốt nhất cả về số lượng và chất lượng.

Trong các ví dụ dưới đây, các loại dầu khoáng được chọn thì chúng được đặc trưng bởi những đặc điểm sau:

- phần ngắn (SF) được biểu thị theo tỷ lệ phần trăm, tương ứng với tỷ lệ của các thực thể có số nguyên tử carbon $C < 16$.
- phần nặng (HF) được biểu thị theo tỷ lệ phần trăm, tương ứng với tỷ lệ của các thực thể có số nguyên tử carbon $C > 28$.
- dạng phân bố phân tử (MD) (được biểu thị theo dạng số của nguyên tử carbon C) được tính ở dạng trọng tâm của đường cong giữa C16 và C28 bằng cách gán cho hệ số bề mặt của các phần C16 đến C20 đồng hoá với 18 nguyên tử carbon, 20 nguyên tử carbon đến 24 nguyên tử carbon đồng hoá với 22 nguyên tử carbon và 24 nguyên tử carbon đến C28 đồng hoá với 26 C.
- tỷ lệ P/N (thu được theo phương pháp DIN 51378 tiêu chuẩn).

Các loại dầu thử nghiệm khác nhau được liệt kê trong bảng 1.

Bảng 1: Bảng dầu được tổng hợp và được mô tả đặc điểm dùng cho các thử nghiệm sinh học.

Sản phẩm tham chiếu dạng dầu	SF (<C16)	MD	HF (>C28)	P/N
1	13,7	20,6	3,3	1,78
2	4,9	21,5	7,1	1,86

Sản phẩm tham chiếu dạng dầu	SF (<C16)	MD	HF (>C28)	P/N
3	4,2	20,5	1,5	1,86
4	4,4	21,6	4,7	1,86
5	47,7	18,4	0,5	1,86
6	0,3	22,2	9,6	2,03
7	30	18,3	0,6	2,19
8	16	21,8	10	2,13
9	2	19,3	2,2	2,85
10	48,2	18,4	0,6	1,86
11	8,6	20,7	2,4	1,94
12	20,8	21,9	8,7	1,86

Nghiên cứu nhũ tương nước-trong-dầu W/O:

Dạng chế phẩm này được tạo ra theo mô hình loại tá được Freund (IFA) không hoàn chỉnh được sử dụng ở 50% trong nhũ tương vacxin mà vì tính đơn giản của công thức này (mannide monooleat 15% + dầu khoáng 85%) cho phép có sự so sánh thích hợp.

Vì vậy, các thuộc tính sinh học của các vacxin được tạo ra (50% IFA + 50% dung dịch đẳng trương của albumin trứng ở mức 10µg/liều; 1 liều lượng = 100µl nhũ tương) sau đó, được so sánh trên mô hình chuột về các thông số về tính an toàn (bảng 2) và tính hiệu quả đối với đáp ứng dịch thể hoặc đáp ứng tế bào.

Tính an toàn được đánh giá bằng cách quan sát vị trí tiêm 7 ngày sau khi tiêm chủng và sau đó, ghi điểm các phản ứng cục bộ (LR) trên thang điểm nằm trong khoảng từ 0 đến 4. Các trị số từ 0 đến 2 là chấp nhận được (đây là mức kết tụ dầu tối đa mà không có chứng rụng tóc, không có vết chai cứng có thể sờ được hoặc vị trí tiêm có thể nhìn thấy được); các trị số lớn hơn 2 được coi là không thích hợp và không chấp nhận được (điều này bao gồm hoại tử, chứng rụng tóc, vết chai cứng có thể sờ thấy được). Những kết quả này được gộp nhóm lại trong bảng 2; các loại dầu khoáng được thử nghiệm trong điều chế dạng chế phẩm W/O được phân loại theo SF của chúng. Rõ ràng là dạng chế phẩm W/O bao gồm các loại dầu khoáng có SF

< 13,7 thì thích hợp cho việc điều chế các chế phẩm vacxin mà có thể được sử dụng để tiêm.

Bảng 2: Đánh giá tính an toàn của các loại dầu khác nhau.

Chất tham chiếu dạng dầu	SF (<C16)	MD	HF (>C28)	P/N	LR
1	13,7	20,6	3,3	1,78	2,5
2	4,9	21,5	7,1	1,86	0,5
3	4,2	20,5	1,5	1,86	0
4	4,4	21,6	4,7	1,86	0,5
5	47,7	18,4	0,5	1,86	4
6	0,3	22,2	9,6	2,03	0
7	30	18,3	0,6	2,19	3
8	16	21,8	10	2,13	2,5
9	2	19,3	2,2	2,85	0
10	48,2	18,4	0,6	1,86	4
11	8,6	20,7	2,4	1,94	0,5
12	20,8	21,9	8,7	1,86	3

Sau đó, các công thức được chọn thì được thử nghiệm về tính hiệu quả miễn dịch học của chúng trên mô hình chuột. Các công thức đem lại những phản ứng không chấp nhận được bị loại bỏ. Các bảng 3 và 4 biểu hiện hiệu giá kháng thể thu được, so với chất tham chiếu nhôm hydroxit (tá dược vô cơ rắn được sử dụng trong ngành thú y và ngành thuốc dành cho người). Các hiệu giá được đưa ra vào 14/28/42/56/90 ngày sau ngày tiêm các mũi đầu, về đáp ứng dịch thể (IGG1) và đáp ứng tế bào (IGG2). Lần tiêm thứ hai đối với các công thức được thực hiện tại ngày thứ 28, sau khi ghi lại hiệu giá kháng thể. Các kết quả của đáp ứng dài hạn (90 ngày) cho thấy sự tương quan chặt chẽ giữa các trị số thấp của phần nặng và cường độ của đáp ứng dịch thể thời điểm 90 ngày. Đáp ứng bị giảm một cách đáng kể khi phần này lớn hơn 4,7% (7,1% và 9,6%).

Kết quả này cho thấy rằng dầu khoáng dùng cho tá dược vacxin ở dạng nhũ tương W/O chứa ít hơn 10% SF, ít hơn 5% HF và tỷ lệ P/N lớn hơn hoặc bằng 1,9 gây ra đáp ứng loại tế bào tốt.

Bảng 3: Đáp ứng kháng thể của loại IgG1 kháng lại OVA trên chuột đối với các loại dầu khác nhau sau khi tiêm ở dạng nhũ tương W/O theo thời gian.

Chất tham chiếu dạng dầu	SF (<C16)	MD	HF (>C28)	P/N	D14	D28	D42	D56	D90
2	4,9	21,5	7,1	1,86	9600	16.000	128.000	128.000	128.000
3	4,2	20,5	1,5	1,86	9600	16.000	128.000	256.000	256.000
4	4,4	21,6	4,7	1,86	9600	16.000	128.000	256.000	256.000
6	0,3	22,2	9,6	2,03	9600	16.000	64.000	64.000	64.000
9	2	19,3	2,2	2,85	9600	16.000	128.000	256.000	256.000
11	8,6	20,7	2,4	1,94	9600	16.000	128.000	256.000	256.000
AlOH					16.000	4 800	4 800	2400	2400

Bảng 4: Đáp ứng kháng thể của loại IgG2 chống lại OVA trong các con chuột đối với các loại dầu khác nhau sau khi tiêm ở dạng nhũ tương W/O.

Sản phẩm tham chiếu dạng dầu	SF (<C16)	MD	HF (>C28)	P/N	D14	D28	D42	D56	D90
2	4,9	21,5	7,1	1,86	9600	16.000	48.000	48.000	48.000
3	4,2	20,5	1,5	1,86	9600	16.000	48.000	48.000	48.000
4	4,4	21,6	4,7	1,86	9600	16.000	48.000	48.000	48.000
6	0,3	22,2	9,6	2,03	9600	16.000	128.000	256.000	256.000
9	2	19,3	2,2	2,85	9600	16.000	128.000	256.000	256.000
11	8,6	20,7	2,4	1,94	9600	16.000	128.000	256.000	256.000
AlOH					16.000	4800	4800	2400	2400

Nghiên cứu nhũ tương ở dạng pha nước liên tục:

Hai loại galen là nhũ tương pha nước liên tục (đa nhũ tương W/O/W và vi chất nhũ tương O/W) được thử nghiệm.

Vi chất nhũ tương dầu-trong-nước:

Công thức tá được bao gồm, đối với 100% khối lượng tá được, 40% khối lượng của chất hoạt động bề mặt ưa nước (polysorbat 80) và 60% khối lượng của dầu khoáng sẽ được thử nghiệm; vì vậy, pha dầu được tạo ra thì được nhũ hóa ở nhiệt độ trong phòng bằng thiết bị làm đồng nhất áp suất cao với sự có mặt của pha nước chứa kháng nguyên (OVA); pha dầu được điều chế trước đó được sử dụng ở mức 10% khối lượng trong chế phẩm vaccin cuối (OVA 10µg/liều, 100µl cho mỗi lần tiêm); đối chứng là nhôm hydroxit được dùng trong thử nghiệm. Kết quả này được trình bày trong bảng 5. Cường độ thấp của IGG1 đáp ứng tương quan trực tiếp với sự có mặt của HF, chất này ức chế đáp ứng ngắn hạn (28 ngày, D28) và đáp ứng dài hạn (90 ngày, D90).

Tương tự, bảng 6 trình bày hiệu giá IGG2.

Kết quả cho thấy tương quan giữa tỷ lệ P/N và đáp ứng IGG2; các công thức 6 và 9 hình thành từ các sản phẩm khác.

Bảng 5: Đáp ứng kháng thể của loại IgG1 kháng OVA trên chuột đối với các loại dầu khác nhau ở dạng vi chất nhũ tương O/W theo thời gian

Sản phẩm tham chiếu dạng dầu	SF (<C16)	MD	HF (>C28)	P/N	D14	D28	D42	D56	D90
2	4,9	21,5	7,1	1,9	12.800	16.000	96.000	48.000	48.000
3	4,2	20,5	1,5	1,9	9600	48.000	128.000	256.000	256.000
4	4,4	21,6	4,7	1,9	12800	48.000	128.000	128.000	128.000
6	0,3	22,2	9,6	2,0	4800	16.000	48.000	48.000	32.000
9	2,0	19,3	2,2	2,8	6400	48.000	32.000	128.000	128.000
11	8,6	20,7	2,4	1,9	9600	48.000	128.000	256.000	256.000
AlOH					16.000	4800	4800	2400	2400

Bảng 6: Đáp ứng kháng thể của loại IgG2 kháng OVA trên chuột đối với các loại dầu khác nhau ở dạng vi chất nhũ tương O/W theo thời gian.

Sản phẩm tham chiếu dạng dầu	SF (<C16)	MD	HF (>C28)	P/N	D14	D28	D42	D56	D90
2	4,9	21,5	7,1	1,86	400	12000	24.000	4000	400
3	4,2	20,5	1,5	1,86	600	16000	24.000	1000	1000
4	4,4	21,6	4,7	1,86	150	8000	8000	1000	1000
6	0,3	22,2	9,6	2,03	4800	16000	32.000	8000	4000
9	2	19,3	2,2	2,85	1600	32000	48.000	96.000	96.000
11	8,6	20,7	2,4	1,94	600	16000	24.000	1000	4000
AlOH					150	150	150	300	300

Kết quả so sánh giữa tỷ lệ IgG1/IgG2 cho thấy rõ ràng có sự khác biệt về hành vi trong đáp ứng đối với các nhóm được tiêm chủng dầu 9 và đến mức độ ít hơn với dầu 6 so với các dầu khác (bảng 7).

Bảng 7: Tỷ lệ IGG1/IGG2 kháng OVA trên chuột đối với các loại dầu khác nhau ở dạng vi chất nhũ tương O/W theo thời gian.

Sản phẩm tham chiếu dạng dầu	SF (<C16)	MD	HF (>C28)	P/N	D14	D28	D42	D56	D90
2	4,9	21,5	7,1	1,86	32	1	4	12	120
3	4,2	20,5	1,5	1,86	16	3	5	256	256
4	4,4	21,6	4,7	1,86	85	6	16	128	128
6	0,3	22,2	9,6	2,03	1	1	2	6	8
9	2	19,3	2,2	2,85	4	2	1	1	1
11	8,6	20,7	2,4	1,94	16	3	5	256	64
AlOH					107	32	32	8	8

Đa nhũ tương nước-trong-dầu-nước (W/O/W):

Công thức tá dược được thử nghiệm bao gồm anhydromannitol octadexenoate có mức cân bằng ưa nước-ưa mỡ (HLB) = 9, được phân tán ở mức 15% khối

lượng trong dầu khoáng được thử nghiệm. Chế phẩm vacxin được điều chế bằng cách trộn ở 30°C một phần theo trọng lượng của tá dược với một phần theo trọng lượng của môi trường kháng nguyên (pha nước) chứa kháng nguyên OVA.

Thử nghiệm trên chuột: các kết quả của thử nghiệm trên chuột đối với các đáp ứng IGG1 và đối với các đáp ứng IGG2 được trình bày lần lượt trong các bảng 8 và 9. Về đáp ứng tế bào, sự thay đổi của các trị số của các đáp ứng IGG2 cho thấy rằng dầu 9 gây ra đáp ứng rất mạnh và kéo dài, đặc biệt là sau 28 ngày.

Thử nghiệm trên mô hình bò: trong trường hợp này, các vacxin tương tự được thử nghiệm trên 5 con bò được tiêm 2ml dưới da; các công thức 9 và 11 được so sánh. Những kết quả này được trình bày trong bảng 10. Không quan sát thấy sự khác biệt về hiệu giá IGG1 (dữ liệu không được thể hiện). Quan sát thấy tác dụng tá dược mạnh so với trường hợp chỉ có kháng nguyên. Đáp ứng IGG2 là rất mạnh với dầu 9, thấp với dầu 11 và không đáp ứng đối với trường hợp chỉ có kháng nguyên.

Bảng 8: Đáp ứng kháng thể của loại IgG1 kháng OVA trong các con chuột đối với các loại dầu khác nhau ở dạng nhũ tương W/O/W theo thời gian.

Sản phẩm tham chiếu dạng dầu	SF (<C16)	MD	HF (>C28)	P/N	D14	D28	D42	D56	D90
2,0	4,9	21,5	7,1	1,9	16000	32000	64000	64000	64000
3,0	4,2	20,5	1,5	1,9	16000	64000	128000	128000	128000
4,0	4,4	21,6	4,7	1,9	16000	64000	128000	128000	128000
6,0	0,3	22,2	9,6	2,0	16.000	64000	64.000	64.000	64000
9,0	2,0	19,3	2,2	2,8	16.000	64000	128000	128000	128000
11,0	8,6	20,7	2,4	1,9	16.000	64000	128000	128000	128000
AlOH					16.000	4800	4800	2400	2400

Bảng 9: Đáp ứng kháng thể của loại IgG2 kháng OVA trên chuột đối với các loại dầu khác nhau ở dạng nhũ tương W/O/W theo thời gian.

Sản phẩm tham chiếu dạng dầu	SF (<C16)	MD	HF (>C28)	P/N	D14	D28	D42	D56	D90
2	4,9	21,5	7,1	1,86	400	12.000	24.000	4000	400
3	4,2	20,5	1,5	1,86	400	12.000	24.000	4000	400
4	4,4	21,6	4,7	1,86	400	12.000	24.000	4000	400
6	0,3	22,2	9,6	2,03	400	4.000	12.000	4000	400
9	2	19,3	2,2	2,85	9600	16.000	128.000	256000	256000
11	8,6	20,7	2,4	1,94	300	600	1 200	1200	1200
AlOH					150	150	150	300	300

Bảng 10: Đáp ứng kháng thể của loại IgG2A chống lại OVA nơi những con bò đối với dầu 9 và 11, ở dạng nhũ tương W/O/W theo thời gian.

Sản phẩm tham chiếu dạng dầu	SF (<C16)	MD	HF (>C28)	P/N	D0	D28	D60	D140
9	2	19,3	2,2	2,85	-	600	6.000	10.000
11	8,6	20,7	2,4	1,94	-	10	600	2.000

Để cải thiện thành phần tế bào của đáp ứng miễn dịch, mục tiêu nghiên cứu nhằm:

- A) thu được đáp ứng miễn dịch mà được đặc trưng bởi tỷ lệ IGG1/IGG2 trong khoảng từ 0,25 đến 4, và
- B) thu được đáp ứng miễn dịch tế bào mạnh, mà đặc trưng bởi IgG2 lớn hơn hoặc bằng 32.000 sau khi liều tiêm chủng tăng cường được cung cấp sau 28 ngày và sau khi đo hiệu giá IGG2 vào ngày này (đáp ứng thứ cấp và dài hạn).

A) Tỷ lệ IgG1/IgG2

a) trường hợp tá dược vacxin ở dạng nhũ tương W/O/W, kết quả thử nghiệm IgG1/IgG2 như sau:

- đối với dầu 6: 40 (D14), 16 (D28), 5,3 (D42), 16 (D56) và 160 (D90).

- đối với dầu 11: 53,3 (D14), 107 (D28), 107 (D42), 107 (D56) và 107 (D90).

- đối với dầu 9: 1,7 (D14), 4 (D28), 1 (D42), 0,5 (D56) và 0,5 (D90).

Dầu 9 giúp cho thấy có thể thu được tỷ lệ IGG1/IGG2 nằm trong khoảng từ 0,25 đến 4 trước và sau khi tiêm chủng tăng cường vào D28 (tiêm chủng tăng cường được thực hiện vào D28, được thực hiện sau khi đo đáp ứng miễn dịch).

b) trường hợp các tá dược vacxin mà ở dạng vi chất nhũ tương O/W, phần trình bày của sáng chế bao gồm những kết quả thử nghiệm IgG1/IgG2 dưới đây:

- đối với dầu 6 : 1 (D14), 1 (D28), 2 (D42), 6 (D56) và 8 (D90)

- đối với dầu 11: 16 (D14), 3 (D28), 5 (D42), 256 (D56) và 64 (D90)

- đối với dầu 9: 4 (D14), 2 (D28), 1 (D42), 1 (D56) và 1 (D90)

Đối với dầu 9, tỷ lệ IGG1/IGG2 vẫn đạt được trong khoảng từ 0,25 đến 4 trước khi tiêm chủng tăng cường vào D28 và vẫn ổn định theo thời gian.

Đối với dầu 6, thì cũng đạt được tỷ lệ IGG1/IGG2 nằm trong khoảng từ 0,25 đến 4 trước khi tiêm chủng tăng cường (đáp ứng sơ cấp), nhưng không kéo dài theo thời gian trong suốt quá trình đo đáp ứng thứ cấp (sau khi tiêm chủng tăng cường của D28) và của đáp ứng dài hạn (D90).

Đối với dầu 11, thì không quan sát thấy tỷ lệ IGG1/IGG2 nằm trong khoảng từ 0,25 đến 4 đối với đáp ứng thứ cấp hoặc đối với đáp ứng dài hạn.

c) trường hợp các tá dược vacxin mà ở dạng nhũ tương W/O, phần trình bày của sáng chế bao gồm những kết quả thử nghiệm IgG1/IgG2 dưới đây:

- đối với dầu 9: 1 (D14), 1 (D28), 1 (D42), 1 (D56) và 1 (D90)

Tất cả những kết quả được ghi lại này cho thấy kết quả tốt về tỷ lệ IgG1/IgG2.

B) Cường độ của các đáp ứng IgG2

a) Trường hợp các tá dược vacxin ở dạng nhũ tương W/O/W, kết quả thử nghiệm IgG2 như sau (bảng 9):

- đối với dầu 6 (D14), 4.000 (D28), 12.000 (D42), 4.000 (D56) và 400 (D90)

- đối với dầu 11: 300 (D14), 600 (D28), 1200 (D42), 1200 (D56) và 1200 (D90)
- đối với dầu 9: 9600 (D14), 16.000 (D28), 128.000 (D42), 256.000 (D56) và 256.000 (D90)

Dầu 9 giúp cho có thể thu được đáp ứng tế bào mạnh (theo tiêu chí được định nghĩa trên đây) sau khi cấp liều tiêm chủng tăng cường sau 28 ngày.

b) trường hợp các tá dược vacxin mà ở dạng vi chất nhũ tương O/W, phần trình bày của sáng chế bao gồm các kết quả thử nghiệm IgG2 dưới đây (bảng 6):

- đối với dầu 6: 4800 (D14), 16.000 (D28), 32.000 (D42), 8.000 (D56) và 4000 (D90)
- đối với dầu 11: 600 (D14), 16.000 (D28), 24.000 (D42), 1000 (D56) và 40.000 (D90)
- đối với dầu 9: 1600 (D14), 32.000 (D28), 48.000 (D42), 96.000 (D56) và 96.000 (D90)

Dầu 9 giúp cho có thể có đáp ứng tế bào mạnh (theo tiêu chí được định nghĩa trên đây) đối với đáp ứng thứ cấp (sau khi tiêm chủng tăng cường) và đối với đáp ứng dài hạn (D90).

c) trường hợp các tá dược vacxin mà ở dạng nhũ tương W/O, phần trình bày của sáng chế bao gồm các kết quả thử nghiệm IgG2 dưới đây (bảng 4):

- đối với dầu 9: 9600 (D14), 16.000 (D28), 128.000 (D42), 256.000 (D56) và 256.000 (D90)

Tất cả những kết quả được ghi lại này thể hiện kết quả tốt đối với đáp ứng IgG2.

Theo các kết quả trên, rõ ràng chế phẩm dầu khoáng có mục đích sử dụng làm tá dược vacxin có thể tiêm được, chất này là đối tượng của sáng chế, như dầu 9, ví dụ, có những đặc điểm dưới đây:

- SF < 10% và HF < 5%;
- P/N nằm trong khoảng từ 2,5 đến 3 (ở đây khoảng 2,85);

đảm bảo tính an toàn tốt, tính hiệu quả tốt như đối với đáp ứng dịch thể và đáp ứng tế bào mạnh cả ở dạng nhũ tương W/O và W/O/W và vi chất nhũ tương O/W.

II) Phần hai

Thử nghiệm 1: Thử nghiệm trên mô hình “gà”

Trong phạm vi thử nghiệm được sử dụng, tính hiệu quả của đáp ứng của mỗi công thức được dựa trên cơ sở các tiêu chí dưới đây:

- a) hiệu giá kháng thể trong huyết thanh;
- b) sự thâm nhiễm các bạch cầu tại vị trí tiêm;
- c) thử nghiệm tính độc bao gồm việc tiêm cho động vật thử nghiệm với 10.000 noãn nang của chủng *Emeria acervulina* hai tuần sau khi điều trị, và so sánh:
 - a) Tăng cân của các động vật
 - b) Tổng số ký sinh trùng bị thải ra

Bảng 11 cho thấy các công thức khác nhau được thử nghiệm:

Bảng 11

Nhóm	A	B	C	D	E	F
Nhũ tương	W/O	W/O	W/O/W	W/O/W	CFA	không có nhũ tương
dầu	1	2	1	2	khoáng tiêu chuẩn	không có dầu

Dầu có mặt trong thử nghiệm được mô tả đặc điểm trong bảng dưới đây

Sản phẩm tham chiếu dạng dầu	SF (<C16)	MD	HF (>C28)	P/N	LR
Khoáng tiêu chuẩn	4,9	21,5	7,1	1,86	0,5
Dầu 1 (O1)	2	19,3	2,2	2,85	0
Dầu 2 (O2)	8,6	20,7	2,4	1,94	0,5

Các dạng chế phẩm của các nhóm A và B, mà là nhũ tương W/O1 (nhóm A) và nhũ tương W/O2 (nhóm B), chứa tính theo 100% khối lượng:

- 30% khối lượng pha nước chứa kháng nguyên và nước
- 70% khối lượng tá dược dầu chứa, tính theo 100% khối lượng:
 - o 15% khối lượng mannitan oleat

- 85% khối lượng dầu (dầu 1 hoặc dầu 2)

Kháng nguyên, protein 3-1 E, có mặt trong những dạng chế phẩm này theo tỷ lệ sao cho liều lượng của dạng chế phẩm được tiêm bao gồm 50µg kháng nguyên, thể tích của liều lượng của dạng chế phẩm được tiêm là 100µl.

Các dạng chế phẩm của các nhóm C và D, mà là các vi chất nhũ tương W/O1/W (nhóm C) và các vi chất nhũ tương W/O2/W (nhóm D) tính theo 100% khối lượng:

- 90% khối lượng pha nước chứa kháng nguyên và nước
- 10% khối lượng tá dược dầu chứa, tính theo 100% khối lượng:
 - 40% khối lượng của sorbitan oleat được etoxy hóa chứa 20 mol etylen oxit (polysorbat 80)
 - 60% khối lượng của dầu (dầu 1 hoặc dầu 2).

Kháng nguyên, protein 3-1 E, có mặt trong những dạng chế phẩm này theo tỷ lệ sao cho liều lượng của dạng chế phẩm được tiêm bao gồm 50µg kháng nguyên, thể tích của liều lượng của dạng chế phẩm được tiêm là 100µl.

Trong trường hợp hiệu giá kháng thể trong huyết thanh, tất cả các nhóm được thử nghiệm có hiệu giá kháng thể huyết thanh cao và tương đương ngoại trừ nhóm chỉ có protein (nhóm F). Đáp ứng dịch thể thu được đối với mỗi nhóm trong số các nhóm này là ở mức cao và đạt như kỳ vọng (các kết quả không được thể hiện).

Trong trường hợp thâm nhiễm tại các bạch cầu ở vị trí tiêm, cường độ của thâm nhiễm cục bộ của các bạch cầu đã nêu (tế bào lympho và các đại thực bào) được đánh giá bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang gián tiếp trên các phần mô đối với các nhóm khác nhau.

Sinh thiết được thực hiện trên 3 con vật thử nghiệm của mỗi nhóm, tại vị trí tiêm, để thu được các mẫu da từ những con vật này. Phương pháp sinh thiết được thực hiện sau một ngày kể từ khi gây miễn dịch thứ hai đối với các con vật đã nêu, đó là 28 ngày sau lần gây miễn dịch thứ nhất. Những lần gây miễn dịch này bao gồm các lần tiêm hỗn hợp của profilin và các dạng chế phẩm được thử nghiệm. Đối chứng bao gồm lần tiêm profilin không chứa vacxin, trong cùng điều kiện thực hiện. Vì vậy, các mẫu thu được này được đông lạnh ngay lập tức trong môi trường chứa

nitơ lỏng và được bảo quản ở nhiệt độ -20°C . Sau đó, các mảnh của $5\mu\text{m}$ mỗi mẫu được đặt trên giá đã được làm sạch trước, và được rửa trong axeton trong 20 phút ở nhiệt độ là 4°C , và “được cố định” bằng 10% huyết thanh ngựa trong 20 phút ở nhiệt độ là 20°C . Kháng thể CD8 gà, được pha loãng theo tỷ lệ 1/200, được bổ sung và sau đó, hỗn hợp thu được từ đó được ủ ở nhiệt độ trong phòng (20°C) trong 2 giờ. Sau đó, các giá đỡ được rửa bằng dung dịch đệm phosphat và được ủ bằng kháng thể thứ cấp IgG của gà “Alexa Fluor 488-labeled antichicken” (được bán dưới tên Invitrogen bởi công ty Carlsbad) ở mức pha loãng là 1/500 trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng (20°C). Sau đó, các giá đỡ được cho tiếp xúc với chất chỉ thị so màu, Fluoromount-G, và được kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử (được bán dưới tên LSM 510 META bởi công ty Carl Zeiss).

Bằng cách trên, sự xuất hiện các tế bào CD8+ được đánh giá bằng điểm theo thang điểm dưới đây:

- điểm “0”: không xuất hiện các chấm của các tế bào CD8+,
- điểm “+”: xuất hiện, mật độ thấp, của các tế bào CD8+,
- điểm “++”: xuất hiện dày đặc, với mật độ cao, của các tế bào CD8+, và
- điểm “+++”: xuất hiện rất dày đặc, với mật độ rất cao, của các tế bào CD8+.

Số lượng và mật độ của tế bào lympho và các đại thực bào quan sát được ở vị trí tiêm càng cao, thì khả năng của vacxin được thử nghiệm trong việc phát triển một đáp ứng miễn dịch hữu hiệu càng lớn.

Kết quả được trình bày trong bảng 12

Bảng 12

Nhóm	A	B	C	D	E	F
Tá dược	W/O1	W/O2	W/O1/W	W/O2/W	CFA	Không có tá dược
Kháng nguyên	Có	Có	Có	Có	Có	Có
Tế bào lympho	+++	+	++	++	+	0
Đại thực bào	++	+	+	+	+	0

So với vacxin chứa tá dược của giải pháp kỹ thuật hiện có (nhóm E), thì các vacxin theo sáng chế cải thiện sự sản xuất tế bào lympho ở vị trí tiêm đối với các

nhóm D, C và A; trong khi đó đối với các đại thực bào, chỉ vaccin theo sáng chế của nhóm A mới giúp cho có thể cải thiện được sự sản xuất các đại thực bào và các vaccin khác theo sáng chế giúp cho có thể thu được các kết quả của sự sản xuất các đại thực bào ở vị trí tiêm tương tự với vaccin chứa tá dược của giải pháp kỹ thuật hiện có.

Trong trường hợp thử nghiệm tính độc, thì sự bảo vệ hữu hiệu bởi vaccin sẽ có nghĩa là các động vật:

- biểu hiện tăng cân tương tự so với đối chứng không được tiếp xúc với mầm bệnh và không được tiêm chủng;
- biểu hiện mức giảm về tải lượng ký sinh trùng (được đánh giá bằng con số ký sinh trùng bị đào thải) so với những động vật thử nghiệm được tiếp xúc với mầm bệnh và không được tiêm chủng.

Nhìn chung, thử nghiệm tính độc tương ứng với việc cung cấp liều lượng chính xác và được kiểm soát của tác nhân gây bệnh mà trước đó các động vật thử nghiệm đã được tiêm chủng để kháng lại nó. Sự bảo vệ do các vaccin thử nghiệm gây ra được đánh giá theo các tiêu chí khác nhau ở dạng hàm số của mô hình động vật và bản chất của mầm bệnh.

Hai tiêu chí chính được theo dõi sau thử nghiệm tính độc:

- sự tăng cân của các động vật thử nghiệm sau 10 ngày lây nhiễm, và
- mức giảm về lượng mầm bệnh được đào thải.

o Sự tăng cân của các động vật thử nghiệm 10 ngày sau lây nhiễm.

Bảng 13 tóm tắt những kết quả thu được trong suốt quá trình tiêm chủng và gây nhiễm gà kháng bệnh trùng cầu chim (chủng được sử dụng *Emeria acervulina*). Khả năng gây bệnh của chủng này là cao và giúp tăng cân đối với các động vật thử nghiệm được gây nhiễm.

Bảng 13: Tình trạng tăng cân của các nhóm khác nhau sau thử nghiệm tính độc.

Nhóm	A	B	C	D	E	F	G	H
Nhũ tương	W/O1	W/O2	W/O1/ W	W/O2/ W	CFA	Không có tá dược	Không có vacxin	Không có vacxin
Kháng nguyên	Có	Có	Có	Có	Có	Có	Không	không
Thử nghiệm tính độc	10.000 noãn nang <i>Emeria acervulina</i>							Không có thử nghiệm
Tăng cân sau mười ngày thử nghiệm (g)	834	798	802	740	773	735	730	850

Có thể thấy được rằng đối với các đối tượng được thử nghiệm, việc tiêm chủng không có tá dược không tạo ra sự bảo vệ theo phương diện tăng cân: vì đối chứng không có tá dược (nhóm F) và không có vacxin (nhóm G) tạo ra những kết quả tương tự.

So với các đối tượng được tiếp xúc với mầm bệnh và không được tiêm chủng (nhóm G), các vacxin theo sáng chế chứa tá dược trên cơ sở dầu O1 và O2 giúp tăng cân đáng kể ngoại trừ các vacxin của nhóm D.

So với vacxin chứa tá dược của giải pháp kỹ thuật hiện có (nhóm E), các vacxin theo sáng chế giúp tăng cân cao hơn ngoại trừ vacxin mà ở dạng nhũ tương W/O2/W (nhóm D).

Cần lưu ý rằng các vacxin theo sáng chế chứa tá dược trên cơ sở dầu 1 tạo ra giúp tăng cân cao hơn các vacxin theo sáng chế chứa tá dược trên cơ sở dầu 2.

Đối với các vacxin theo sáng chế của nhóm A, tăng cân chỉ là 1,9% thấp hơn so với tăng cân của những đối tượng không được tiếp xúc với mầm bệnh.

Hơn nữa, đối với mỗi dầu khoáng trong số các loại dầu khoáng được xem xét (O1 hoặc O2), cần phải lưu ý rằng các vacxin thử nghiệm được tạo ra ở dạng nhũ tương nước/dầu có vẻ có tính bảo vệ hơn các công thức nước/dầu/nước:

- đối với dầu 1, sự tăng cân của vacxin ở dạng nhũ tương W/O1 (nhóm A) là 834g, đó là tăng 99g so với các động vật thử nghiệm của nhóm không có tá dược (nhóm F), trong khi đó đối với vacxin ở dạng nhũ tương W/O1/W, mức tăng cân

(nhóm C) là 802 gam và đem lại mức tăng cân là 67g so với các động vật thử nghiệm của nhóm không có tá dược (nhóm F).

- đối với đầu 2, hiện tượng tăng cân của vacxin ở dạng nhũ tương W/O2 (nhóm B) là 798g, đó là mức tăng cân là 63g so với các động vật thử nghiệm của nhóm không có tá dược (nhóm F) trong khi đó đối với vacxin ở dạng nhũ tương W/O2/W, mức tăng cân (nhóm D) là 740 gam, và tăng cân 5g so với các động vật thử nghiệm của nhóm không có tá dược (nhóm F).

o Mức giảm về lượng mầm bệnh được đào thải:

Kết quả được trình bày trong bảng 14.

Các kết quả được biểu hiện ở dạng mức giảm về số lượng noãn nang được đào thải (càng nhiều động vật bị nhiễm, thì chúng được thải ra càng nhiều, do đó chúng được bảo vệ ít hơn).

Bảng 14

Nhóm	A	B	C	D	E	F
Tá dược	W/O1	W/O2	W/O1/W	W/O2/W	CFA	Không có tá dược
Kháng nguyên	Có	Có	Có	Có	Có	có
Mức thải ra trung bình (X10 E 8)	1,42	2,75	2,54	3,09	2,13	2,86
Độ lệch chuẩn	0,23	0,52	0,8	0,39	0,49	0,36

So với đối chứng trong nhóm F (kháng nguyên mà không có tá dược), các vacxin theo sáng chế do đó gây ra sự giảm về mức thải ra trung bình.

So với nhóm E (kháng nguyên + tá dược của giải pháp kỹ thuật hiện có), vacxin theo sáng chế của nhóm 1 đem lại sự giảm về mức thải ra trung bình.

Ngoài ra, độ lệch chuẩn của nhóm A là thấp nhất, cho thấy đáp ứng đồng nhất hơn của các động vật được tiêm chủng. Tiêu chí này là điểm quan trọng bởi vì nó có nghĩa là tính nhạy cảm riêng biệt trong đáp ứng sinh học của các động vật được cải thiện bằng tính hiệu quả của vacxin.

Thử nghiệm kết luận 1

Các vacxin chứa tá dược theo sáng chế giúp cho có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch được cải thiện và tính hiệu quả lớn hơn đối với việc bảo vệ gia cầm khỏi bệnh trùng cầu.

Hơn nữa, vacxin theo sáng chế mà ở dạng nhũ tương W/O1, với O1 được đặc trưng bởi tỷ lệ P/N >2, có ưu điểm là kích thích mức sản xuất các bạch cầu ở vị trí tiêm cao hơn, và điều hoà, sau thử nghiệm tính độc bằng chủng *Emeria acervulina*, cả hiện tượng tăng cân cao nhất và giảm đáng kể lượng noãn nang được đào thải.

Thử nghiệm 2: Chú ý đến thử nghiệm 1 và những kết luận, mà cho thấy hiệu suất của vacxin tốt hơn bao gồm:

- protein tái tổ hợp bao gồm *Eimeria acervulina* trình tự 3-1
- dầu 1
- nước
- hệ thống chất hoạt động bề mặt

và được cung cấp ở dạng nhũ tương W/O, các tác giả sáng chế đã thực hiện hai loại thử nghiệm tính độc:

- thử nghiệm tính độc bằng chủng *Emeria acervulina* (AE),
- thử nghiệm tính độc bằng chủng *Emeria tenella* (ET).

Các dạng chế phẩm được thử nghiệm, là nhũ tương W/O1, chứa, tính theo 100% khối lượng:

- 30% khối lượng của pha nước chứa kháng nguyên và nước
- 70% khối lượng của tá dược dầu chứa tính theo 100% khối lượng:
 - o 15% khối lượng của mannitan oleat;
 - o 85% khối lượng của dầu (dầu 1 hoặc dầu 2).

Kháng nguyên, protein 3-1 E, có mặt trong những dạng chế phẩm này theo tỷ lệ sao cho liều lượng dạng chế phẩm được tiêm chứa 30µg kháng nguyên, thể tích của liều lượng dạng chế phẩm được tiêm là 100µl.

Để nhận diện các thuộc tính mở rộng sự bảo vệ chéo của vacxin thí nghiệm được thử nghiệm. Thực sự, đáp ứng miễn dịch đã được tạo ra của loại tế bào như vậy giúp cho có thể bảo vệ trước các chủng ký sinh trùng khác nhau.

Liều lượng protein được sử dụng là 30µg/ml. Thử nghiệm tính độc được thực hiện bằng cách cung cấp 10.000 noãn nang đối với mỗi con chim (bảng 15).

Sau đó, các động vật thử nghiệm được theo dõi dựa trên các thông số của đối với việc tăng cân, kháng thể, sự tăng sinh của tế bào lympho lách sau quá trình tái kích thích kháng nguyên hoặc bằng các tác nhân gây phân bào (để định lượng đáp ứng tế bào) và sự bảo vệ trong suốt thử nghiệm tính độc.

E. acervulina: có tính gây bệnh vừa.

Các tổn thương nằm ở ruột non, đặc biệt là ở tá tràng, với các chấm hơi trắng và sau đó, các vết ở màng nhầy = các tổn thương “được tính điểm”. Các tổn thương là do noãn nang gây ra.

E. tenella: bệnh trùng cầu có tính gây bệnh mạnh nhất, các tổn thương là do các thể phân liệt gây ra.

Các tổn thương nằm ở manh tràng, những tổn thương này đầy máu, có thể vỡ hoặc bị hoại thư. Xác chết có thể có biểu hiện thiếu máu. Thường có tỷ lệ tử vong cao.

Bảng 15 mô tả các nhóm khác nhau được thử nghiệm:

Nhóm	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Mô tả	Không được tiêm chủng	Không được tiêm chủng	Không được tiêm chủng	Được tiêm chủng	Được tiêm chủng	Được tiêm chủng	Được tiêm chủng	Được tiêm chủng	Được tiêm chủng
Kháng nguyên 3-1 E (30µg/ml)	Không có	Không có	Không có	Có	Có	Có	Có	Có	Có
Tá được	Không được tiêm chủng	Không được tiêm chủng	Không được tiêm chủng	Không có	Không có	CFA	CFA	W/O1	W/O1
Chuỗi thử nghiệm tính độc	Không được thử thách	EA	ET	EA	ET	EA	ET	EA	ET

CFA: Tá được Freund hoàn chỉnh (tá được của giải pháp kỹ thuật hiện có)

Tiếp đó, những con gà được tiêm chủng theo các nhóm khác nhau và được theo dõi với các tiêu chí dưới đây:

a) sự tăng cân;

b) sản sinh hiệu giá kháng thể (huyết thanh học) ;

c) đánh giá các cường độ của thâm nhiễm cục bộ của các bạch cầu (tế bào lympho) bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang gián tiếp đối với các mẫu của các tế bào lách từ lách được lấy 48 giờ sau khi tiêm chủng (hay gây miễn dịch). Những lần gây miễn dịch này bao gồm việc tiêm hỗn hợp của profilin và các dạng chế phẩm được thử nghiệm. Đối chứng bao gồm lần tiêm profilin mà không có môi trường vacxin, cũng được thực hiện dưới những điều kiện vận hành tương tự. Quy trình được sử dụng là đồng nhất với quy trình được sử dụng trên các mẫu da từ các động vật, mà được mô tả trên đây, ấy là:

- Bảo quản các mẫu tế bào lách được thu gom, ở -20°C
- Đặt các mẫu tế bào lách trên các giá đỡ và rửa trong axeton trong 20 phút ở 20°C
- Bổ sung kháng thể CD8 được pha loãng 1/200 và bước ủ kế tiếp trong 2 giờ ở 20°C
- rửa giá đỡ thu được bằng dung dịch đệm phosphat, và bước ủ kế tiếp bằng kháng thể thứ cấp IgG của gà “Alexa Fluor 488-labeled antichickens” ở mức pha loãng là 1/500 trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng (20°C)
- cho tiếp xúc với chất chỉ thị so màu Fluoromount-G
- kiểm tra bằng kính hiển vi điện tử (được bán dưới tên LSM 510 META bởi công ty Carl Zeiss).

Bằng cách sử dụng quy trình này, hiện tượng xuất hiện các tế bào CD8+ tế bào lympho được đánh giá bằng điểm số theo thang điểm dưới đây:

- điểm “0”: không xuất hiện các chấm của các tế bào CD8+,
- điểm “+”: xuất hiện với mật độ thấp, của các tế bào CD8+,
- điểm “++”: xuất hiện dày đặc, với mật độ cao, của các tế bào CD8+, và
- điểm “+++”: xuất hiện rất dày đặc, với mật độ rất cao, của các tế bào CD8+;

d) số lượng noãn nang được đào thải.

Kết quả:

- sự tăng cân: các nhóm được tiêm chủng bằng vaccin mà ở dạng nhũ tương W/O1 thì được đặc trưng bởi sự tăng cân tương tự với sự tăng cân quan sát được đối với các nhóm khác (các kết quả không được thể hiện);
- huyết thanh học: mức sản sinh hiệu giá kháng thể cao, cao hơn mức quan sát được đối với các nhóm được tiêm chủng bằng vaccin có CFA trong vai trò là tá được và cao hơn mức quan sát được đối với các nhóm chỉ được tiêm chủng bằng vaccin mà không có tá được (các kết quả không được thể hiện);
- tình trạng tăng sinh tế bào lympho: điểm cao nhất là thu được đối với các nhóm H và I được tiêm chủng bằng vaccin mà ở dạng W/O và chất này chứa tá được với dầu O1.

Nhóm	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Chỉ số tăng sinh tế bào lympho	0	0	0	0	0	0	0	++	++

- số lượng noãn nang được đào thải:

Bảng 16 và 17 cho thấy kết quả của số lượng noãn nang được đào thải của các nhóm được đưa vào thử nghiệm tính độc lần lượt bằng *Emeria acervulina* và *Emeria tenella*.

Bảng 16: Kết quả đào thải sau thử nghiệm tính độc bằng chủng EA

Nhóm	B	D	F	H
Mean (X 10 E 8)	3,44	3,33	3,30	2,71
Độ lệch chuẩn	0,50	0,67	0,89	0,27

Bảng 17: Kết quả đào thải sau thử nghiệm tính độc bằng chủng ET

Nhóm	C	E	G	I
Mean (X 10 E 8)	1,49	1,20	1,11	0,95
Độ lệch chuẩn	0,23	0,27	0,42	0,13

Đối với cả hai chủng, các nhóm được tiêm chủng bằng vaccin chứa tá được trên cơ sở O1 cho thấy mức đào thải là thấp hơn mức quan sát được trên các nhóm được tiêm chủng bằng vaccin chứa tá được của giải pháp kỹ thuật hiện có (CFA). Điều tương tự quan sát được khi sự so sánh với các nhóm được tiêm chủng bằng vaccin không chứa tá được (các nhóm D và E).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tá dược vacxin mà 100% khối lượng của tá dược vacxin này chứa từ 10% đến 95% dầu khoáng bao gồm:

- từ 0,05% khối lượng dầu khoáng đến 10% khối lượng dầu khoáng của chuỗi hydrocarbon có ít hơn 16 nguyên tử carbon;
- từ 0,05% khối lượng dầu khoáng đến 5% khối lượng dầu khoáng của chuỗi hydrocarbon có nhiều hơn 28 nguyên tử carbon;
- và có tỷ lệ P/N, tương ứng với tỷ lệ giữa số lượng theo khối lượng của chuỗi hydrocarbon thuộc loại parafin và số lượng theo khối lượng của chuỗi hydrocarbon thuộc loại naphten, là từ 2,5 đến 3,

dùng trong sản xuất chế phẩm vacxin có mục đích để phòng ngừa bệnh trùng cầu.

2. Vacxin dùng để phòng ngừa bệnh trùng cầu, trong đó vacxin này bao gồm tá dược theo điểm 1 và ít nhất một kháng nguyên.

3. Vacxin theo điểm 2, trong đó khác biệt ở chỗ, vacxin này ở dạng nhũ tương thuộc loại nước-trong-dầu (W/O).

4. Vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 2 đến 3, trong đó khác biệt ở chỗ kháng nguyên là protein tái tổ hợp chứa trình tự *Eimera Acervulina* 3-1.