



(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)



1-0026455

(51)⁷ A61K 39/12; C12N 15/01; C07K 14/18 (13) B

(21) 1-2012-03778

(22) 18/05/2011

(86) PCT/EP2011/002624 18/05/2011

(87) WO2011/144360 24/11/2011

(30) 10 2010 017 006.2 18/05/2010 DE; 10075205.4 18/05/2010 EP; 10075206.2

18/05/2010 EP; 10075207.0 18/05/2010 EP; 10075759.0 17/12/2010 EP; 10075760.8
17/12/2010 EP; 11159207.7 22/03/2011 EP

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/03/2013 300A

(73) RIEMSER PHARMA GMBH (DE)

An der Wiek 7, 17493 Greifswald - Insel Riems, Germany

(72) BEER, Martin (DE); BLOME, Sandra (DE); LEIFER, Immanuel (DE).

(74) CÔNG TY LUẬT TRÁCH NHIỆM HỮU HẠN AMBYS HÀ NỘI (AMBYS
HANOI)

(54) VACXIN CHỈ THỊ ĐỂ ĐIỀU TRỊ DỰ PHÒNG BỆNH SỐT LỌN CỔ ĐIỂN,
PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA VACXIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vacxin chỉ thị để điều trị dự phòng bệnh sốt lợn cổ điển bao gồm virus sốt lợn cổ điển sống giảm độc được biến đổi. Trình tự axit amin virus của epitop TAV của protein E2 bao gồm trình tự khác với trình tự của virus sốt lợn cổ điển kiểu dại. Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm chứa vacxin chỉ thị này và phương pháp sản xuất vacxin chỉ thị để ngăn ngừa bệnh sốt lợn cổ điển bằng cách sử dụng áp lực kháng thể chọn lọc.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vaccin chỉ thị để điều trị dự phòng bệnh sốt lợn cổ điển bao gồm virus sốt lợn cổ điển sống giảm độc được biến đổi. Trong một phương án theo sáng chế, vaccin chỉ thị khác biệt ở chỗ trình tự nucleotit của virus, mà mã hóa epitop TAV, và/hoặc trình tự axit amin của epitop TAV, bao gồm trình tự khác với trình tự của virus sốt lợn gây bệnh, để có thể phân biệt chủ thể thể hiện bị nhiễm virus sốt lợn gây bệnh với chủ thể được chủng ngừa bằng vaccin chỉ thị theo sáng chế bằng phương pháp phân tích huyết thanh và/hoặc phân tích gen.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh sốt lợn cổ điển (Classical swine fever: CSF) là bệnh dịch ở động vật xảy ra trên toàn thế giới và có ảnh hưởng đáng kể về mặt chính trị và kinh tế (Vandeputte và Chappuis, 1999). Bệnh sốt lợn cổ điển, cũng đã được biết đến là bệnh dịch tả lợn hoặc bệnh dịch lợn, là một trong các loại bệnh phải được thông báo toàn quốc, ở mức độ EU cũng như đến Tổ chức sức khỏe động vật thế giới (World Organization for Animal Health: OIE) ở Paris khi xuất hiện ở bất kỳ giai đoạn nào. Bệnh sốt lợn cổ điển do virus ARN có vỏ bọc nhỏ thuộc giống *Pestivirus* trong họ *Flaviviridae* gây ra. Vật chủ tự nhiên của virus sốt lợn chỉ là các loại lợn đã thuần hóa và lợn hoang dại (ví dụ lợn rừng châu Âu).

Liên minh Châu Âu đã có những nỗ lực để loại trừ bệnh CSF bằng biện pháp khắc nghiệt mà không chủng ngừa dự phòng, đã bị cấm từ năm 1990. Dù bị cấm, việc chủng ngừa vẫn không phải là sự lựa chọn được chấp nhận về mặt pháp lý làm sự chủng ngừa dự phòng trong trường hợp xuất hiện bệnh sốt lợn. Trong trường hợp đó nên chủng ngừa theo kế hoạch chủng ngừa dự phòng, đã được liên minh châu Âu phê chuẩn (xem điều 19 trong chỉ thị của hội đồng châu Âu 2001/89/EC). Cho đến nay, Rumani là nước duy nhất tiến hành chủng ngừa dự phòng. Lý do của hạn chế này nằm ở các hạn chế về kỹ thuật vaccin chỉ thị có sẵn ở thời điểm hiện tại, như các hạn chế về hiệu quả vaccin, cộng thêm các rào cản thương mại về động vật được chủng ngừa thông thường (hạn chế ở thị trường quốc gia). Hiệu quả của

vacxin chỉ thị đã được cấp phép không thể so sánh được với vacxin sống đã biến đổi, mà thể hiện các ưu điểm đáng kể, và dù sao đi nữa các vacxin đã bất hoạt hoặc vacxin tiểu đơn vị vẫn không phù hợp để chủng ngừa dự phòng do bắt đầu miễn dịch chậm và cần phải chủng ngừa lại.

Xem xét sự mở rộng của liên minh châu Âu đến các nước Đông Âu và cả sự toàn cầu hóa ngày càng tăng, các chiến lược mới cho khả năng chủng ngừa dự phòng đã được thảo luận, mà sẽ đóng vai trò quan trọng trong việc tránh việc loại bỏ động vật trên quy mô lớn và các tổn thất kinh tế liên quan (Leifer và các đồng tác giả., 2009). Do đó có nhu cầu đáng kể về vacxin có hiệu quả cao mà cho phép phân biệt về mặt huyết thanh giữa các động vật được chủng ngừa và không được chủng ngừa và hơn nữa thể hiện tất cả các ưu điểm của vacxin sống bị biến đổi truyền thống.

Do việc tạo ra vacxin chỉ thị đầu tiên, mà dựa trên glycoprotein E2 của virus CSF bị giới hạn về khả năng sử dụng và có một số hạn chế về điều kiện lưu giữ, chi phí, hiệu quả, nên vẫn còn nhu cầu lớn về các vacxin chỉ thị mới. Các thành phần khác nhau cho các vacxin này đã được nghiên cứu kỹ, như vacxin ADN, peptit gây miễn dịch, vacxin vectơ, đột biến xóa bỏ và virus sốt khảm (Beer và các đồng tác giả., 2007; Dong và Chen, 2007). Hầu hết các thành phần của vacxin chỉ thị này đều thể hiện nhược điểm rằng chúng được sản xuất ra qua các phương pháp biến đổi gen hiện đại. Do người tiêu dùng lo ngại về các sản phẩm biến đổi gen, ngoài quy trình sử dụng phức tạp, vacxin biến đổi gen thể hiện các nhược điểm đáng kể.

Các vacxin truyền thống nhằm chống lại CSFV bao gồm vacxin sống đã biến đổi. Các vacxin này có hiệu quả cao sau khi đưa vào riêng lẻ nhưng không cho ra sự khác biệt giữa các động vật đã được chủng ngừa và đã bị nhiễm trên cơ sở tiểu sử huyết thanh học. Nhiều vacxin này dựa trên chủng virus truyền thống “C” hoặc bắt nguồn từ đó (còn gọi là “vacxin chủng C”). Hơn nữa, còn có các vacxin dựa trên chủng virus Nhật Bản “hoàn toàn âm tính với chuột lang (guinea pig exultation-negative - GPE-)”, chủng “Thiverval” và chủng “Mexican PAV”, tất cả chúng đều được sử dụng ở địa phương và quốc tế (Blome và các đồng tác giả, 2006; Greiser-Wilke & Moennig, 2004; van Oirschot, 2003). Có dữ liệu mở rộng về việc sử dụng vacxin dựa trên chủng C. Đã biết rằng sau khi chủng ngừa bốn ngày, có thể thể hiện

được sự bảo vệ hoàn toàn cho động vật chống lại sự cảm nhiễm CSFV độc hại. Hơn nữa, sau khi chủng ngừa bảy ngày, cho ra được sự bảo vệ hoàn toàn từ sự truyền dọc virut cảm nhiễm trong các động vật mang (de Smit và các đồng tác giả., 2001).

Nhược điểm đáng kể của các vaccin sống biến đổi đã biết là không có khả năng phân biệt về mặt huyết thanh một cách xác thực giữa các động vật đã chủng ngừa và bị nhiễm. Do vậy, mục đích của sáng chế đề xuất vaccin sống đã biến đổi mà có khả năng phân biệt giữa các động vật đã chủng ngừa và bị nhiễm.

Trong lĩnh vực vaccin chỉ thị, vaccin được gọi là tiểu đơn vị đã được biết đến trong lĩnh vực, mà dựa trên glycoprotein E2 tái tổ hợp của CSFV. Các thử nghiệm phân biệt cho các vaccin này là thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (Enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA), trong đó các kháng thể được định hướng chống lại glycoprotein E^{ms} được sử dụng để phát hiện ra sự nhiễm virut CSF. Lúc này, chỉ có một vaccin tiểu đơn vị E2 được bán trên thị trường, tuy nhiên, việc cấp phép bị trì hoãn trong một vài tháng (xem báo cáo EMA về vaccin tiểu đơn vị E2).

Bất kể việc các sản phẩm này không thể đưa ra thị trường, thì các hệ này vẫn thể hiện các nhược điểm sinh học tiềm ẩn. Một nhược điểm là cần ít nhất hai lần chủng ngừa ngoài đường tiêu hóa trước khi tạo được sự bảo vệ hoàn toàn, khiến cho các vaccin này hoàn toàn không tương hợp với “việc chủng ngừa bầy”, trong đó các động vật được cho dùng một liều đơn các bầy vaccin. Hơn nữa, việc vận động chủng ngừa dự phòng chỉ hợp lý khi việc bảo vệ chống lại CSFV kiểu đại trong các thử nghiệm khác nhau sử dụng vaccin tiểu đơn vị E2, không thu được sự bảo vệ hoàn toàn từ sự truyền dọc. Nhược điểm khác của hệ này ở chỗ kháng thể nhằm chống lại E^{ms} glycoprotein được sử dụng cho sự phân biệt về mặt huyết thanh học và độ nhạy và đặc trưng của các hệ thử nghiệm đó chỉ ở mức độ vừa phải (Floegel-Niesmann, 2003).

Vaccin CSF sống giảm độc đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật nhưng hiện nay vẫn gặp trở ngại do các nhược điểm khác nhau. Hầu hết các vaccin đã bộc lộ trong tình trạng kỹ thuật đều bao gồm ADN lạ và được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp kỹ thuật di truyền, ngoài ra còn biết đến là kỹ thuật ADN tái tổ hợp, do đó có liên quan đến các vấn đề đánh giá rủi ro nghiêm trọng về môi trường

cho sản phẩm. Các biến thể CSFV khác đã được biết đến trong đó các axit amin bị thay thế hoặc loại khỏi epitop TAV kiểu đại (WO 2010/074575 A2). Tuy nhiên, các gốc axit amin và/hoặc nucleotit bị biến đổi trong sáng chế chưa được bộc lộ hoặc đề xuất trong giải pháp kỹ thuật đã biết.

Đã có nhiều bước chuyển được sử dụng để sinh ra biến thể virus, mà có thể sử dụng làm vaccin, dù cho sức ép kháng thể vẫn chưa sử dụng trước đây. Do đó nhiều bước chuyển canh trường nhiễm virus để sinh ra các biến thể như bộc lộ trong tình trạng kỹ thuật bị giới hạn bằng cách hướng dẫn một số lớn các bước chuyển canh trường và cả thiếu sự kiểm soát epitop để biến đổi (Hulst và các đồng tác giả).

Kortekaas và các đồng tác giả mô tả vaccin CSFV sống giảm độc, ổn định về mặt di truyền, có khả năng phân biệt về mặt huyết thanh học giữa động vật bị nhiễm với động vật được chủng ngừa. Chủng C đột biến bị biến đổi gen bằng cách sử dụng sự tiếp cận đích, trong đó sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp để thực hiện sự xóa bỏ trong protein E2 của CSFV. Các đột biến khác thu được sau đó ở các vị trí khác nhau trong hệ gen của virus thông qua nhiều cách để tạo ra các chủng thể hiện sự sinh trưởng được tăng cường. Các chủng mô tả trong Kortekaas và các đồng tác giả là virus được thiết kế về mặt di truyền, mà có nhược điểm đáng kể do quá trình nhận phức tạp để giải phóng các sản phẩm biến đổi gen vào môi trường.

Holinka và các đồng tác giả mô tả chủng CSFV sống giảm độc chỉ thị kháng nguyên kép “FlagT4vn” mà thu được bằng cách kết hợp hai yếu tố quyết định di truyền của thể giảm độc. FlagT4v chứa chỉ thị di truyền dương, epitop Flag tổng hợp, được đưa vào thông qua việc chèn 19mer vào trong glycoprotein E1; và chỉ thị âm được tạo ra từ các biến đổi vị trí liên kết của kháng thể đơn dòng epitop WH303 (mAbWH303) trong glycoprotein E2. Việc sử dụng FlagT4v trong mũi hoặc trong cơ bảo vệ lợn chống lại chủng CSFV Brescia gây hại ở thời điểm sớm sau khi chủng ngừa (2 hoặc 3 ngày), và ở thời điểm muộn (28 ngày). Đáp ứng kháng thể gây ra FlagT4v trong lợn phản ứng mạnh với epitop Flag nhưng không ngăn chặn liên kết của mAbWH303 peptit tổng hợp mà thể hiện epitop WH303. Vaccin bộc lộ trong Holinka liên quan đến virus được thiết kế về mặt di truyền mà thể hiện ADN lạ trong hệ gen của nó (trình tự Flag-Tag thêm vào trình tự vector và chỉ thị). Điều

này thể hiện nhược điểm lớn so với sáng chế, mà không thể hiện ADN lạ hoặc tái tổ hợp.

Tài liệu WO 2007/143442 A2 mô tả ảnh hưởng của các đột biến trong WH303 epitop của CSFV E2, mà thay đổi trình tự axit amin của Brescia CSFV độc hướng dẫn về trình tự axit amin tương đồng của NALD chủng BVDV. Các động vật bị nhiễm các biến thể virus được bảo vệ khi được cảm nhiễm bằng virus Brescia độc sau khi chủng ngừa 3 ngày và 21 ngày. Sự biến đổi ở vị trí này trong epitop WH303 cũng cho phép phát triển thử nghiệm chuẩn đoán để phân biệt sự chủng ngừa giữa các động vật bị nhiễm bệnh. Bất kể các tác động này, sự đột biến được đưa vào bằng cách sử dụng kỹ thuật di truyền, do đó đưa vật liệu di truyền lạ vào vaccin virus.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập trên đây bộc lộ vaccin mà đã được thiết kế thông qua kỹ thuật di truyền tái tổ hợp để tạo ra các chủng virus. Như đã mô tả trên đây, vaccin được thiết kế bằng kỹ thuật di truyền phải chịu các mối bận tâm về an toàn cho môi trường và do đó bị cản trở bởi các phương thức chấp nhận phức tạp và sự lo ngại của công chúng, do đó gây ra nhược điểm đáng kể cho việc sử dụng chúng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do các vấn đề kỹ thuật trong các giải pháp kỹ thuật đã biết, sáng chế đề xuất vaccin chỉ thị cho lợn đã thuần hóa và lợn kiểu đại mà tạo ra sự bảo vệ cho lợn chống lại virus sốt lợn cổ điển, mà có khả năng tạo ra sự khác biệt giữa các động vật được chủng ngừa và bị nhiễm, tốt hơn được tạo ra bằng các kỹ thuật thông thường. Theo một phương án ưu tiên, vaccin chỉ thị không được tạo ra thông qua kỹ thuật biến đổi di truyền tái tổ hợp.

Vấn đề này được giải quyết bằng các đặc điểm trong số các điểm yêu cầu bảo hộ độc lập. Các phương án ưu tiên của sáng chế được đề xuất bằng các điểm yêu cầu bảo hộ phụ thuộc.

Do đó, sáng chế đề cập đến vaccin chỉ thị để điều trị dự phòng bệnh sốt lợn cổ điển bao gồm virus sốt lợn cổ điển sống giảm độc được biến đổi.

Theo một phương án ưu tiên, sáng chế đề xuất vacxin chỉ thị để điều trị dự phòng bệnh sốt lợn cổ điển bao gồm virus sốt lợn cổ điển sống giảm độc được biến đổi, khác biệt ở chỗ, trình tự axit amin của virus của epitop TAV của protein E2 bao gồm một trình tự khác với trình tự của virus sốt lợn cổ điển kiểu dại, trong đó trình tự axit amin của virus thể hiện ít nhất một phép thay thế sau:

- thay thế axit amin 830 bằng valin,
- thay thế axit amin 833 bằng serin,
- thay thế axit amin 839 bằng glyxin.

Theo một phương án ưu tiên, vacxin chỉ thị của sáng chế, khác biệt ở chỗ, virus đã biến đổi không thể hiện trình tự của axit nucleic tái tổ hợp.

Theo một phương án ưu tiên, vacxin chỉ thị của sáng chế, khác biệt ở chỗ, trình tự nucleotit của virus thể hiện một hoặc nhiều phép thay thế sau đây:

- thay thế ở vị trí nucleotit 2862 bằng T,
- thay thế ở vị trí nucleotit 2870 bằng T,
- thay thế ở vị trí nucleotit 2889 bằng G.

Theo một phương án ưu tiên, vacxin chỉ thị của sáng chế, khác biệt ở chỗ, trình tự axit amin của virus thể hiện một hoặc nhiều phép thay thế sau đây:

- thay thế axit amin 426 trong protein E^{RNS} bằng valin,
- thay thế axit amin 576 trong protein E1 bằng histidin,
- thay thế axit amin 583 trong protein E1 bằng axit glutamic,
- thay thế axit amin 951 trong protein E2 bằng isoleuxin.

Theo một phương án ưu tiên, vacxin chỉ thị của sáng chế, khác biệt ở chỗ, trình tự nucleotit của virus thể hiện một hoặc nhiều phép thay thế sau đây:

- thay thế ở vị trí nucleotit 1649 bằng G,
- thay thế ở vị trí nucleotit 2099 bằng C,
- thay thế ở vị trí nucleotit 2122 bằng G,
- thay thế ở vị trí nucleotit 3225 bằng T.

Theo phương án ưu tiên, vacxin chỉ thị của sáng chế, khác biệt ở chỗ, trình tự axit amin của virus của epitop TAV bao gồm trình tự SEQ ID NO. 3 hoặc SEQ ID NO. 4.

Theo một phương án ưu tiên, vaccin chỉ thị của sáng chế, khác biệt ở chỗ, trình tự nucleotit của virus bao gồm trình tự SEQ ID NO. 1.

Trong phương án khác, vaccin chỉ thị theo sáng chế, khác biệt ở chỗ, chủ thể được điều trị bằng vaccin như đã mô tả trong bản mô tả có thể tạo ra sự khác biệt so với chủ thể bị nhiễm virus sốt lợn gây bệnh qua phân tích các mẫu sinh học thu được từ các chủ thể đã nói bằng cách sử dụng phương pháp phân tích huyết thanh và/hoặc hệ gen.

Trong phương án khác, vaccin chỉ thị theo sáng chế, khác biệt ở chỗ, phương pháp phân tích hệ gen dựa trên phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction: PCR), tốt hơn là PCR thời gian thực, trong đó sử dụng đoạn môi và/hoặc mẫu dò mà nhận diện trình tự nucleotit của virus đã biến đổi và/hoặc gây bệnh.

Trong phương án khác, vaccin chỉ thị theo sáng chế, khác biệt ở chỗ, phương pháp phân tích huyết thanh dựa trên thử nghiệm miễn dịch enzyme (enzyme immunoassay: EIA), tốt hơn là thử nghiệm hấp thu miễn dịch liên kết với enzyme (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA), do đó sử dụng kháng thể mà liên kết một cách đặc hiệu với epitop TAV biến đổi và/hoặc gây bệnh.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến vaccin chỉ thị, tốt hơn như đã mô tả trong bản mô tả, thu được bằng cách tạo ra các biến thể virus thuộc các chủng virus sốt lợn gây bệnh hoặc đã biết khác bằng cách sử dụng áp lực kháng thể.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chủng vaccin virus sốt lợn cổ sống giảm độc được biến đổi, tốt hơn như mô tả trong bản mô tả, bao gồm sinh ra các biến thể lần tròn của virus thuộc các chủng virus sốt lợn gây bệnh hoặc đã biết khác bằng cách sử dụng áp lực kháng thể.

Theo một phương án ưu tiên, phương pháp sản xuất như mô tả trong bản mô tả, khác biệt ở chỗ, phương pháp bao gồm:

- cấy chuyển nhiều lần tế bào, tốt hơn là tế bào thận phôi lợn, dễ nhiễm với virus sốt lợn gây bệnh trong giống nuôi cấy tế bào, và
- sử dụng đồng thời các kháng thể được định hướng chống lại epitop TAV của protein E2 của virus sốt lợn gây bệnh và/hoặc huyết thanh thô đã được chủng ngừa Peptit CTAVSPITLRTEVVK đa dòng.

Sáng chế đề cập thêm đến được phẩm bao gồm vaccin chỉ thị như mô tả trong bản mô tả cùng với chất mang được dụng.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến vaccin chỉ thị như mô tả trong bản mô tả để sử dụng làm thuốc trong điều trị phòng bệnh (chủng ngừa), tốt hơn thông qua cách tiêm hoặc sử dụng qua đường uống, cho bệnh sốt lợn cổ điển.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị dự phòng (chủng ngừa) bệnh sốt lợn cổ điển bao gồm sử dụng vaccin chỉ thị như mô tả trên đây cho chủ thể, tốt hơn là lợn, tốt hơn là tiêm trong cơ hoặc sử dụng qua đường uống.

Tình trạng chung khác trong đó bệnh sốt lợn cổ điển đòi hỏi sự chủng ngừa đáp ứng lại với việc phát hiện ra sự nhiễm trường virus trong quần thể lợn. Khi các con lợn bị nhiễm bệnh, sao cho virus sốt lợn cổ điển có mặt ở lợn kiểu đại hoặc lợn nuôi, đòi hỏi sự chủng ngừa dự phòng ở vùng xung quanh và/hoặc lân cận với vùng quần thể lợn. Sau đó thực hiện chủng ngừa trong từ 1 đến 2 năm cho tất cả các con lợn trong vùng xung quanh đó, dù cho là lợn kiểu đại hoặc lợn đã thuần hóa, để tránh sự bùng phát hoặc sự nhiễm virus sốt lợn trên quy mô lớn. Vaccin chỉ thị theo sáng chế phù hợp lý tưởng cho việc chủng ngừa dự phòng trong trường hợp phát hiện ra hoặc bùng phát sốt lợn, vaccin chỉ thị dễ dàng sử dụng được qua đường uống một cách nhanh chóng và hiệu quả, ngoài cách tiêm, và cho phép phân biệt được giữa các động vật bị nhiễm trường virus (gây sốt) và được chủng ngừa.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện việc so sánh trình tự.

Fig.2 thể hiện phân tích huỳnh quang miễn dịch gián tiếp.

Fig.3 thể hiện VNT với chủng CSFV Rösraht.

Fig.4 thể hiện Idexx E2-ELISA với huyết thanh lợn từ nghiên cứu 06/10 động vật.

Mô tả chi tiết sáng chế

Việc phát triển vaccin theo sáng chế không những dựa trên phương pháp biến đổi di truyền mà còn dựa trên nguyên tắc rằng virus sẽ tự biến đổi theo cách phù hợp khi đưa vào dưới áp lực kháng thể chọn lọc. Do đó, sáng chế đề cập đến

vacxin sống đã biến đổi không phải về mặt di truyền mà cho ra sự bảo vệ chống lại CSFV độc, mà thể hiện tất cả các yêu cầu đối với vacxin chỉ thị (dễ nhận thấy về mặt huyết thanh học và di truyền học). Vacxin chỉ thị được thiết kế bằng cách sử dụng áp lực kháng thể chọn lọc vào các chủng C khác nhau trong giống nuôi cấy tế bào. Các biến thể sinh ra tốt hơn có ba sự trao đổi axit amin trong E2 epitop TAV và hai sự trao đổi bù trong protein E1. Sự ổn định của các biến thể phù hợp này được xác nhận bằng nhiều hơn mười lần cấy chuyển giống nuôi cấy tế bào trong trống lẫn và ví dụ bằng sự chủng ngừa trong cơ cho lợn dẫn đến bảo vệ hoàn toàn chống lại chủng cảm nhiễm độc tính cao. Hơn nữa, có thể thu được DIVA trực tiếp bằng kỹ thuật huyết thanh và/hoặc di truyền, ví dụ bằng hệ nhuộm huỳnh quang miễn dịch cụ thể và bằng phản ứng chuỗi polymeraza phiên mã ngược thời gian thực (real-time reverse transcription polymerase chain reaction: rRT-PCR). Hơn nữa, có thể thu được DIVA gián tiếp bằng cách tối ưu hóa E2-ELISAs thương mại (ví dụ bằng cách thay đổi giá trị ngắt) hoặc bằng cách phát triển hệ ELISA peptit đặc hiệu TAV. Nhờ đó, cho ra vacxin chỉ thị sống biến đổi không về mặt di truyền chống lại CSFV.

Việc sản xuất vacxin theo sáng chế như sau:

Lựa chọn các biến thể lẫn trộn “Riems” chủng C có trong tự nhiên trong hệ giống nuôi cấy tế bào (tế bào thận phôi lợn IFN) thông qua cấy chuyển các virus chủng C trong khi sử dụng kháng thể đặc hiệu E2-TAV và huyết thanh thử được chủng ngừa peptit CTAVSPITLRTEVVK đa dòng.

Các kháng thể được sử dụng, ngoài các kháng thể có trong huyết thanh thử đa dòng đã xử lý peptit, nhận ra epitop TAV trong protein E2 của virus CSF một cách rõ ràng, và thông qua sự liên kết với epitop này làm trung hòa virus CSF (chủng C). CSFV thể hiện tỷ lệ biến đổi cao do đặc trưng ARN của chúng. Dưới sức ép lựa chọn của việc đưa ra các kháng thể trung hòa, virus, mà bị biến đổi epitop mà kháng thể liên kết vào (trong trường hợp này, là epitop TAV) được lựa chọn, nhờ đó virus kiểu đại không thay đổi bị trung hòa. Thông qua nhiều lần cấy chuyển với các nồng độ và hỗn hợp huyết thanh thử và kháng thể khác nhau, có thể chọn được các thể phân lập virus đột biến khác nhau.

Đầu tiên chọn các virus có phép thay thế trong epitop TAV. Thông qua việc cấy chuyển thêm các virus này dưới các loại áp lực kháng thể khác nhau tách được một thể phân lập khác, mà thể hiện hai phép thay thế trong epitop TAV và một phép thay thế bù đơn trong protein E1 (sự tương tác giữa E1 và E2 là quan trọng cho cấu trúc virus). Các virus này được để dưới áp lực kháng thể khác, mà dẫn đến việc phân lập được các virus có ba phép thay thế trong epitop TAV ngoài hai phép thay thế bù trong protein E1. Virus tạo thành (“Riems” chủng C Q7, “Riems” chủng C S10 và “Riems” chủng C O11) thể hiện các phép thay thế trong protein E2 ở các vị trí 2862, 2870 và 2889, 3225, ngoài các thay đổi protein E1 ở các vị trí 2099 và 2122, ngoài phép thay thế trong protein E^{RNS} ở vị trí 1649.

Bảng 1: Thông tin khác về biến thể lẫn trộn TAV

Vị trí trong hệ gen	Thay thế nucleotit (chủng C thành biến thể lẫn trộn)	Axit amin	Protein	Thay thế axit amin (dẫn đến sự trao đổi axit amin từ chủng C thành biến thể lẫn trộn)
1649	A bằng G	426	E ^{RNS}	Isoleuxin bằng valin
2099	T bằng C	576	E1	Tyrosin bằng histidin
2122	T bằng G	583	E1	Axit aspartic bằng axit glutamic
2862	C bằng T	830	E2 (Epitop TAV)	Alanin bằng valin
2870	C bằng T	833	E2 (Epitop TAV)	Prolin với serin
2889	A bằng G	839	E2 (Epitop TAV)	Axit glutamic bằng Glyxin
3225	C bằng T	951	E2	Threonin bằng isoleuxin

Các thay đổi trong trình tự nucleotit cho phép hệ RT-PCR thời gian thực có thể khác biệt giữa các biến thể (Q7, S10, O11) và các thể phân lập trên đồng ruộng.

Sự thay đổi trình tự axit amin cho phép sự khác biệt giữa các biến thể (Q7, S10, O11) và các thể phân lập trên đồng ruộng trên cơ sở liên kết kháng thể, nhờ đó các kháng thể sử dụng để trung hòa (kháng thể A18) không còn liên kết với các biến thể này nữa nhưng lại liên kết với tất cả các thể phân lập trên đồng ruộng nhờ

epitop TAV bảo tồn cao trong CSFV. Kháng thể sinh ra dựa vào trình tự peptit TAV biến đổi (thể hiện các đột biến theo sáng chế) có thể cũng được sử dụng để tạo sự khác biệt giữa virus và vaccine tiêm vào, nhờ đó kháng thể nhằm chống lại các biến thể sẽ liên kết với vaccine virus biến đổi theo sáng chế và giúp nhận diện rõ ràng các động vật đã chủng ngừa, nhưng sẽ không liên kết với các thể phân lập trên đồng ruộng.

Bảng 2: Trình tự theo sáng chế

SEQ ID NO	Chủng	ADN/protein	Trình tự 5'-3'
SEQ ID NO. 1	Q7/S10/O11	ADN	CGGGTGTTCATAGAGTGCACAG TAGTGAGCTCAACGACTCTGA GAACAGGAGTGGTAAAGA
SEQ ID NO. 2	Chủng C	ADN	CGGGTGTTCATAGAGTGCACAG CAGTGAGCCCAACGACTCTGA GAACAGAAGTGGTAAAGA
SEQ ID NO. 3	B5/2	protein	TAVSSTTLRTGVVK
SEQ ID NO. 4	Q7/S10/O11	protein	TVVSSTTLRTGVVK
SEQ ID NO. 5	Chủng C	protein	TAVSPITTLRTEVVK

Sáng chế đề cập đến virus sốt lợn biến đổi có thể bao gồm bất kỳ hoặc toàn bộ các tổ hợp có thể nào của các đột biến và phép thay thế đã bộc lộ trong bản mô tả. Ví dụ và thử nghiệm đề xuất trong bản mô tả thể hiện các chủng virus được sinh ra mà chỉ thể hiện tập con của tất cả các phép thay thế liệt kê trong bảng 1. Các chủng virus này thể hiện hiệu quả bảo vệ ngoài khả năng sử dụng làm chỉ thị, nhờ đó thực hiện được mục đích của sáng chế. Các chủng ưu tiên theo sáng chế là đề cập đến các chủng bao gồm các tập con của các phép thay thế đã bộc lộ, ngoài các chủng thể hiện tất cả các phép thay thế đã bộc lộ.

Bất ngờ là các tổ hợp của một hoặc nhiều biến đổi gen cụ thể (thu được thông qua quy trình tự nhiên là kết quả của áp lực kháng thể) sẽ cho ra các đặc tính có lợi cho vaccine chỉ thị như mô tả trong bản mô tả. Trong tình trạng kỹ thuật đã

phát hiện ra một số sự biến đổi tương tự, nhưng những thứ chưa biết trong tình trạng kỹ thuật sẽ làm cho sự biến đổi còn lại theo sáng chế sẽ cho ra sự bảo vệ có hiệu quả cụ thể khỏi sự nhiễm CSFV. Các tổ hợp đáng chú ý của chúng tạo ra bộ các đặc tính đã mô tả mà làm cho sáng chế có khả năng tạo ra vacxin có thể tạo ra sự khác biệt giữa các động vật bị nhiễm bệnh và được chủng ngừa.

Chưa biết được rằng các áp lực chọn lọc được sử dụng trong sáng chế thông qua việc xử lý bằng kháng thể sẽ dẫn đến các biến đổi chính xác đã mô tả trong bản mô tả. Các tổ hợp biến đổi gen như mô tả trong bản mô tả hoạt động cùng với nhau, cho ra hiệu quả hợp lực của các đột biến bù mà giữ lại được cấu trúc protein, trong khi cho phép phần còn lại biến đổi và vì vậy cho ra các đặc tính chỉ thị là mục đích của sáng chế.

Thuật ngữ kỹ thuật di truyền đề cập đến sự biến đổi gen hoặc các thao tác trên hệ gen của sinh vật, ví dụ bằng cách đưa vật liệu axit nucleic lạ, như ADN hoặc ARN, hoặc trình tự axit nucleic tổng hợp vào hệ gen của chủ thể. Kỹ thuật này cũng đã được biết đến như kỹ thuật ADN tái tổ hợp.

Thuật ngữ virus giảm độc đề cập đến virus đã bị biến đổi, theo bất kỳ cách nào, để virus này không độc và/hoặc ít độc hơn so với virus kiểu dại (gây bệnh). Ví dụ các triệu chứng của bệnh ít xuất hiện ở chủ thể bị nhiễm virus giảm độc hơn so với ở chủ thể bị nhiễm virus kiểu dại.

Thuật ngữ áp lực kháng thể hoặc áp lực kháng thể chọn lọc theo sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể trong lúc nuôi cấy tế bào, tốt hơn qua nhiều con đường, nhằm vào một hoặc nhiều epitop đặc hiệu của virus. Các kháng thể này có thể là bất kỳ loại kháng thể đã biết nào trong tình trạng kỹ thuật, cả đơn hoặc đa dòng, hoặc có thể có trong huyết thanh động vật được xử lý với peptit quan tâm, ví dụ epitop đích. Các kháng thể này thường được gọi là kháng thể trung hòa. Dưới áp lực chọn lọc của các kháng thể trung hòa đề xuất, virus, mà bị biến đổi trong epitop mà kháng thể liên kết vào (trong trường hợp này, là epitop TAV) được chọn lọc nhờ vào ưu điểm phát triển của chúng, khi kháng thể không còn liên kết với epitop đã nói nữa và do đó không còn cho ra hiệu quả giới hạn hoặc trung hòa, nhờ đó virus kiểu dại chưa bị biến đổi bị kháng thể trung hòa sau đó bị bất lợi về sự chọn lọc trong cạnh tranh.

Các virus này, mà chịu biến đổi trong epitop mà kháng thể liên kết (trong trường hợp này, là epitop TAV), thường được đề cập đến là biến thể lẫn lộn. Các biến thể này là đối tượng của sáng chế, và cụ thể về mặt di truyền học và huyết thanh học của virus kiểu đại.

Thuật ngữ nhiều bước chuyển đề cập đến hoạt động cấy chuyển trong giống nuôi cấy tế bào (cũng biết đến là nuôi cấy lại hoặc phân chia tế bào) qua một số lần, qua đó chuyển được một số ít tế bào vào trong lọ mới, tốt hơn với môi trường mới, hoặc bằng cách pha loãng giống nuôi cấy tế bào thành môi trường mới, qua một số lần để giống nuôi cấy tế bào tiếp tục phát triển mà không tác động đến mật độ cao của tế bào trong canh trường.

Về vacxin chỉ thị, sáng chế có thể cũng đề cập đến nhóm các sáng chế thống nhất được kết hợp lại bằng một khái niệm đơn về sáng chế. Vacxin chỉ thị, chính bản thân virus và dược phẩm chứa chúng, việc sử dụng chúng trong điều trị cho động vật để chủng ngừa và các phương pháp sản xuất ra virus đều theo khái niệm chung của sáng chế. Vacxin chỉ thị sáng tạo và mới được mô tả trong bản mô tả đều có khả năng và hợp nhất được tất cả các khía cạnh của sáng chế, để các phương án khác nhau mô tả trong bản mô tả đều nằm trong một sáng chế thống nhất.

Khi trình tự nucleotit được đề xuất trong sáng chế, các danh sách trình tự nhằm bao gồm cả trình tự ADN và ARN tương ứng. Dù cho một số trình tự nucleotit được đề xuất là trình tự ADN, trình tự ARN tương ứng (ví dụ khi hệ gen virus thể hiện phân tử ARN) cũng có trong sáng chế. Trình tự nucleotit theo sáng chế cũng bao gồm trình tự bổ sung của danh sách đã liệt kê của chúng, ví dụ trình tự bổ sung có thể thông qua liên kết bắt cặp bazơ Watson-Crick bằng trình tự đã liệt kê. Sự bổ sung tương ứng bằng trình tự ARN và/hoặc ADN không đòi hỏi nỗ lực sáng chế để biến đổi trình tự này từ trình tự khác và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dễ dàng thực hiện.

Quy trình sử dụng vacxin virus theo sáng chế, chế phẩm theo sáng chế như dược phẩm, chế phẩm miễn dịch, kháng nguyên hoặc vacxin hoặc chế phẩm trị liệu, có thể qua con đường ngoài đường tiêu hóa, như phương pháp sử dụng trong da, trong cơ hoặc dưới da. Việc sử dụng này có thể gây ra đáp ứng miễn dịch toàn thân, hoặc đáp ứng miễn dịch thể dịch hoặc qua trung gian tế bào. Vacxin theo sáng

chế có thể cũng được sử dụng qua đường uống, như được hợp nhất vào thức ăn động vật, có khả năng gây miễn dịch một cách đơn giản và hiệu quả trên quần thể lớn, ví dụ ở lợn rừng châu Âu.

Phương pháp sử dụng ưu tiên là sử dụng dưới da hoặc trong cơ, tốt hơn bằng cách tiêm hoặc sử dụng qua đường uống.

Tổng quát hơn, chế phẩm vaccin virus theo sáng chế hoặc chế phẩm trị liệu có thể được bào chế theo các kỹ thuật chuẩn mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực dược hoặc thú y đã biết.

Lượng hữu hiệu trị liệu của các chế phẩm này có thể được đưa vào trong các liều lượng và bằng các kỹ thuật mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực dược hoặc thú y biết rõ dựa vào việc xem xét các yếu tố như độ tuổi, giới tính, cân nặng, loài và tình trạng bệnh lý của chủ thể cụ thể và con đường sử dụng. Chế phẩm này có thể được đưa vào một mình, hoặc có thể được vào cùng hoặc theo sau các chế phẩm, ví dụ, theo sau các chế phẩm sinh miễn dịch, kháng nguyên hoặc vaccin hoặc chế phẩm trị liệu "khác" qua đó đề xuất chế phẩm đa trị hoặc "pha trộn" hoặc kết hợp theo sáng chế và phương pháp sử dụng chúng. Một lần nữa, các thành phần và cách sử dụng (sử dụng theo sau hoặc cùng), cũng như liều lượng có thể được xác định dựa vào việc xem xét các yếu tố như độ tuổi, giới tính, cân nặng, loài và tình trạng bệnh lý của chủ thể cụ thể và đường sử dụng.

Ví dụ về các chế phẩm theo sáng chế bao gồm chế phẩm lỏng để dùng qua vòi phun, ví dụ dùng qua đường uống, qua mũi, hậu môn, âm đạo, qua đường miệng, trong dạ dày, v.v., như huyền phù, si rô hoặc còn ngọt; và chế phẩm dùng ngoài đường tiêu hóa, dưới da, trong da, trong cơ hoặc trong tĩnh mạch (ví dụ, dùng bằng cách tiêm) như huyền phù hoặc nhũ tương vô trùng.

Trong các chế phẩm này, các biến thể CSFV có thể được trộn với chất mang, chất làm loãng hoặc tá dược được dùng như nước vô trùng, nước muối sinh lý, glucoza hoặc chất tương tự. Các chế phẩm này có thể cũng được làm khô lạnh. Các chế phẩm này có thể chứa chất hỗ trợ như chất thẩm ướt hoặc chất nhũ hóa, chất tạo đệm pH, chất phù trợ, chất keo hóa hoặc chất tăng cường độ nhớt, chất bảo quản,

chất tạo mùi vị, chất màu hoặc chất tương tự, phụ thuộc vào con đường sử dụng và chế phẩm mong muốn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: So sánh trình tự. A) So sánh trình tự nucleotit ở vùng epitop TAV giữa các biến thể Q7, S10, O11 và thể phân lập trên đồng ruộng chủng C. B) So sánh trình tự axit amin ở vùng epitop TAV giữa các biến thể Q7, S10, O11 và thể phân lập trên đồng ruộng chủng C.

Fig.2: Phân tích huỳnh quang miễn dịch gián tiếp. A) Phân tích các thể đột biến lần trốn E2, B5/2 cây chuyển 2 (virus tiền thân cho Q7, S10 và O11, chỉ thể hiện 2 phép thay thế trong epitop TAV). B) Phân tích virus chủng C.

Fig.3: Ba tuần sau khi chủng ngựa, tất cả các động vật, ngoại trừ một con trong nhóm S10 và một con trong nhóm O11, thể hiện các kháng thể trung hòa. 7 ngày sau khi nhiễm bệnh các động vật đã được chủng ngựa thể hiện tải lượng VNT là 640 hoặc lớn hơn. Tải lượng thấp nhất là 320, được thể hiện ở một động vật trong nhóm đã chủng ngựa thể đột biến TAV. Các động vật đối chứng không được chủng ngựa thể hiện không có tải lượng trong VNT chống lại Rösraht.

Fig.4: Các động vật được chủng ngựa chủng C thể hiện kết quả dương tính trong E2-ELISA sau khi chủng ngựa 21 ngày. 7 ngày sau khi nhiễm bệnh, tất cả các động vật đã chủng ngựa đều thể hiện kết quả dương tính rõ ràng trong ELISA. Nhóm đối chứng không được chủng ngựa thể hiện không thể phát hiện ra kháng thể sau khi nhiễm.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Thiết kế thử nghiệm và phương pháp thử nghiệm

Chủng ngựa cho thỏ bằng cách sử dụng peptit TAV

Hai con thỏ từ 8 đến 10 tuần tuổi (thể ở tai là 304 và 305) được chủng ngựa theo sơ đồ sau, bằng cách sử dụng peptit CTAVSPTTLRTEVVK tiếp hợp hemoxyanin bám lỗ khoá (keyhole limpet hemocyanin: KLH)- để sinh ra huyết thanh trung hòa chủng C đa dòng. Việc chủng ngựa được thực hiện như sau bằng 6 lần tăng cường, mỗi lần kéo dài hàng tháng.

Phân lập biến thể lần trốn E2 của virus “Riems” chủng C

Để tạo ra áp lực kháng thể để sinh ra các đột biến cho virus “Riems” chủng C trong glycoprotein E2, virus được xử lý bằng các kháng thể khác nhau để chống lại epitop TAV của protein E2, bằng cách sử dụng các nồng độ khác nhau. Các tế bào đã nhiễm sau đó được ủ và để qua một thời gian. Các kháng thể được sử dụng trong thử nghiệm là kháng thể đặc hiệu E2 đơn dòng, có bán trên thị trường cho thử nghiệm CSFV ELISA đặc hiệu E2.

Kháng thể:

A18I (IDEXX)

A18B (Bommeli)

A18C (Ceditest)

HC34 (CRL, Hannover)

WH303 và WH 211 (Weybridge, Anh)

Việc ủ các giống nuôi cấy virus được thực hiện như sau. Sử dụng các nồng độ và hỗn hợp kháng thể khác nhau cho các lượng virus khác nhau. Ủ trong khoảng thời gian từ 2 đến 6 phút ở nhiệt độ trong phòng. Đưa huyền phù virus-kháng thể vào đĩa nuôi cấy tế bào với sự sinh trưởng tế bào hợp lưu và sau đó ủ. Trong thời gian này, virus được hấp thụ vào tế bào (tế bào PK15) trong thời gian từ 1 đến 2 giờ ở nhiệt độ 37°C. Cuối cùng bổ sung môi trường nuôi cấy tế bào vào và ủ các đĩa trong thời gian 72 giờ ở nhiệt độ 37°C và COT 5%.

Sau thời gian 72 giờ, tách riêng phần nổi trên bề mặt giống nuôi cấy tế bào ra và lưu giữ. Sau đó cố định các đĩa này và nhuộm bằng cách sử dụng nhuộm huỳnh quang miễn dịch và sử dụng kháng thể C16 (đặc hiệu cho protein NS3 của CSFV). Sau đó cấy chuyển phần dịch nổi trong giống nuôi cấy tế bào từ các lỗ dương tính yếu dưới áp lực kháng thể khác như mô tả trên đây. Phần dịch nổi trong giống nuôi cấy tế bào từ các lỗ bằng tế bào dương tính đơn hoặc mảng tế bào được nhuộm đơn sau đó được cấy chuyển dưới áp lực kháng thể rất yếu hoặc không có áp lực kháng thể để tăng tải lượng virus cho từ 1 đến 2 lần cấy chuyển. Lựa chọn các phần dịch nổi trong giống nuôi cấy tế bào khác nhau để giải trình tự trong vùng E1 và E2.

Việc kiểm soát virus biến thể lẫn trốn được thực hiện bằng cách sử dụng nhuộm miễn dịch huỳnh quang với kháng thể C16 hoặc kháng thể A18 sử dụng để

tạo biến thể lẫn trộn. Các biến thể lẫn trộn mà thể hiện sự thay đổi trong epitop TAV không thể nhuộm được bằng cách sử dụng kháng thể A18 nữa.

Lịch sử cây chuyển

Bảng 3: Lịch sử cây chuyển của virut lẫn trộn “Riems” chủng C

Biến thể O11		Biến thể Q7		Biến thể S10	
Cây chuyển	Thay thế	Cây chuyển	Thay thế	Cây chuyển	Thay thế
SP867/2+ A18(B)/HC34 (0,2mg/ml)					
D5+ A18 (B, C)	2870				
16P1+ A18(B,I,C) je 0,25mg/ml (50µl)+ 50µl 305	2870 2122				
B1A1+0,25mg/ml A18(C,B,I) (100µl) + 100µl 305					
B5/2	2870, 2122, 2889, 3225				
B5/2-P2 (không áp lực)					
B5/2-P3 (không áp lực)					
B5/2-P3+0,1mg A18(I)+50µl 304					
B5/2-P3* +0,1mg A18 (I) +50ml 305					
C32+ 50µl A18 (I) + 50µl 305					
CB32-P2 (-)	2870, 2122, 2889, 3225, 2862, 2099				
CB32-P3 +A18(I,C) mỗi 50µl, +305(25)					
Z2+A18(I,C) 50µl, +304/305 25µl					

F8 +304/305 30µl					
G18 + 304 30µl					
H15 (-)		H15 (-)	2870, 2122, 2889, 3225, 2862, 2099	H15 +304 50µl	2870, 2122, 2889, 3225, 2862, 2099
I16 +A18(I,C) 50µl +10µl HC34 +304 25µl		I15 A18(I,C) 30µl +304 30µl +HC34 15µl		I14 A18(I,C) 30µl +304 30µl +HC34 15µl	
K12 (-)		O4 +A18 (I 50µl, B 25µl) +304/305 25µl		N2 +A18(C 30µl, I 50µl) +304 50µl +305 25µl +HC34 15µl	
L7 (-)		P4 +305 50µl		O6 +A18 (I 50µl, B 25µl) +304/305 25µl	
N17 (-)		Q7		Q6 +A18 (I 50µl, B 25µl) +304 50µl	
O11	2870, 2122, 2889, 3225, 2862, 2099			R9 +A18 I 50µl + 304 50µl	
				S10	

Đặc điểm của các biến thể lần trốn B5/2, I16, Q7, S10 và O11

Các biến thể lần trốn đã phân lập được giải trình tự trong vùng protein E1 và E2. Thực hiện việc nhuộm huỳnh quang miễn dịch khác nhau bằng cách sử dụng kháng thể A18-idexx, A18-bommeli, A18-ceditest và kháng thể C16. Các biến thể lần trốn được cấy chuyển trong cả hai bình chứa giống nuôi cấy tế bào (toàn bộ)

ngoài các canh trường chai lăn (roller) (Q7, S10, O11) và sau đó được giải trình tự, được nhuộm khác nhau và được chuẩn độ.

RT-PCR thời gian thực đặc hiệu Q7

Để thử nghiệm đặc tính di truyền của virus, và từ đó thử nghiệm một trong các đặc tính chỉ thị của vaccine, phát hiện ra ARN virus sau khi chủng ngừa bằng các biến thể lăn trốn ARN bằng cách sử dụng các đoạn mồi và đầu dò, mà có khả năng phân biệt các biến thể lăn trốn bằng các thể phân lập trên đồng ruộng “Riems” chủng C và CSFV.

Nghiên cứu ở động vật 27/09 – Thử nghiệm đáp ứng miễn dịch của các thể đột biến Riems chủng C B5/2-P6 và I16-P2

Trong nghiên cứu ở động vật này, mỗi con lợn con trong số ba con lợn con được chủng ngừa với 2ml dịch huyền phù virus (phần nổi trên giống nuôi cấy tế bào) thông qua cách sử dụng trong cơ. Việc phân nhóm các động vật được thực hiện như sau: nhóm A (B5/2), nhóm B (I16) và nhóm Riems chủng C đối chứng (vaccine sốt lợn do virus Riems). Thử nghiệm huyết thanh học về đáp ứng miễn dịch được thực hiện cho mỗi nhóm.

Nghiên cứu ở động vật 06/10 – Thử nghiệm các biến thể lăn trốn Q7, S10 và O11

Các nghiên cứu ở động vật sau đây được thực hiện để thử nghiệm xem biến thể lăn trốn nào có triển vọng nhất trong các con lợn được nhận về sự không có các tác động nguy hiểm và hiệu quả sau khi đưa vào trong cơ.

21 con lợn con từ 8 đến 9 tuần tuổi (khoảng từ 15 đến 20kg) được sử dụng trong thử nghiệm này. Mỗi con lợn con được chủng ngừa $2 \times 10^{5,0}$ KID₅₀/ml, trong cơ.

5 nhóm được thử nghiệm:

Nhóm 1 (5 con lợn): các thể đột biến của biến thể chủng C Q7-P7 ($10^{5,0}$ KID₅₀/ml)

Nhóm 2 (5 con lợn): các thể đột biến của biến thể chủng C S10-P8 ($10^{5,0}$ KID₅₀/ml)

Nhóm 3 (5 con lợn): các thể đột biến của biến thể chủng O11-P8 ($10^{5,0}$ KID₅₀/ml)

Nhóm 4 (3 con lợn): vaccine sốt lợn do virus Riems (virus sống)

Nhóm 5 (3 con lợn): nhóm đối chứng chưa chủng ngừa

Gây miễn dịch và lấy mẫu máu:

0 ngày sau khi chủng ngừa Lấy mẫu máu (EDTA và huyết thanh), gây miễn dịch

7 ngày sau khi chủng ngừa Lấy mẫu máu (EDTA)

14 ngày sau khi chủng ngừa Lấy mẫu máu (EDTA và huyết thanh)

21 ngày sau khi chủng ngừa Lấy mẫu máu (EDTA và huyết thanh)

Hàng ngày thu dữ liệu về nhiệt độ cơ thể và các triệu chứng lâm sàng.

Cảm nhiễm:

28 ngày sau khi chủng ngừa Lấy mẫu máu (EDTA và huyết thanh), mẫu lấy từ mũi

Cảm nhiễm bằng chủng KSPV độc Koslov ($1 \times 10^{6.5}$ KID₅₀)

4 ngày sau khi gây nhiễm Lấy mẫu máu (EDTA và huyết thanh), mẫu lấy từ mũi

7 ngày sau khi gây nhiễm Lấy mẫu máu (EDTA và huyết thanh), mẫu lấy từ mũi

10 ngày sau khi gây nhiễm Lấy mẫu máu (EDTA và huyết thanh), mẫu lấy từ mũi

14 ngày sau khi gây nhiễm Lấy mẫu máu (EDTA và huyết thanh), mẫu lấy từ mũi

21 ngày sau khi gây nhiễm Lấy mẫu máu (EDTA và huyết thanh), mẫu lấy từ mũi

28 ngày sau khi gây nhiễm Lấy mẫu máu (EDTA và huyết thanh), mẫu lấy từ mũi

Nghiên cứu ở động vật 24/10 – Thử nghiệm các biến thể lần trốn S10 và O11; bảo vệ sau khi chủng ngừa qua đường uống

Để thử nghiệm hiệu quả khi dùng qua đường uống, thực hiện thử nghiệm trên động vật như sau. Sử dụng 15 con lợn con làm động vật thử nghiệm, từ 8 đến 10 tuần tuổi (khoảng từ 15 đến 20kg).

Nhóm 1 (6 con lợn): thể đột biến A biến thể chủng C S10

Nhóm 2 (6 con lợn): thể đột biến B biến thể chủng O11

Nhóm 3 (3 con lợn): nhóm đối chứng bị nhiễm (chưa chủng ngừa)

Gây miễn dịch và lấy mẫu máu:

0 ngày sau khi chủng ngừa Lấy mẫu máu (EDTA và huyết thanh), mẫu lấy từ mũi

14 ngày sau khi chủng ngừa	Lấy mẫu máu
28 ngày sau khi chủng ngừa	Lấy mẫu máu (EDTA và huyết thanh), mẫu lấy từ mũi
4 ngày sau khi gây nhiễm	Lấy mẫu máu (EDTA và huyết thanh), mẫu lấy từ mũi
7 ngày sau khi gây nhiễm	Lấy mẫu máu (EDTA và huyết thanh), mẫu lấy từ mũi
10 ngày sau khi gây nhiễm	Lấy mẫu máu (EDTA và huyết thanh), mẫu lấy từ mũi
14 ngày sau khi gây nhiễm	Lấy mẫu máu (EDTA và huyết thanh), mẫu lấy từ mũi
21 ngày sau khi gây nhiễm	Lấy mẫu máu
28 ngày sau khi gây nhiễm	Lấy mẫu máu

Hàng ngày thu dữ liệu về nhiệt độ cơ thể và các triệu chứng lâm sàng.

Kết quả thử nghiệm

Chủng ngừa cho thử bằng TAV-peptit

Cả hai huyết thanh thử (304 và 305) đều dương tính trong thử nghiệm E2-ELISA có thể mua được trên thị trường sau khi xử lý tăng cường lần thứ ba (khoảng 12 tuần sau lần chủng ngừa thứ nhất). Trong thử nghiệm trung hòa virus cả hai mẫu huyết thanh thử nghiệm đều dương tính sau khi tăng cường lần thứ ba khoảng sau ba tuần. Tải lượng trong thử nghiệm trung hòa là thấp và giảm thêm sau khi chủng tăng cường từ lần thứ 4 đến lần thứ 6.

Bảng 4: Đặc điểm của huyết thanh thử 304 và 305 sau khi chủng ngừa TAV-peptit

Huyết thanh	E2 ELISA IDEXX Tỷ lệ ức chế theo %	NT Alfort	Ghi chú
304	6	<5	1. Gây miễn dịch
305	10	<5	
304	28	<5	1. Tăng cường
305	19	<5	
304	45	<5	2. Tăng cường
305	26	<5	
304	87	5	3. Tăng cường
305	60	<5	
304	90	10	4. Tăng cường
305	77	5	

304	Không thực hiện	5	2 tuần sau 5. Tăng cường
305	Không thực hiện	<5	
304	Không thực hiện	7,5	1 tuần sau 6. Tăng cường
305	Không thực hiện	<5	
304	Không thực hiện	<5	3 tuần sau 6. Tăng cường
305	Không thực hiện	<5	

Phân lập biến thể lần trốn E2 của virus “Riems” chủng C

Ở các chủng C Riems với kháng thể đặc hiệu E2 dẫn đến, chỉ sau một ít lần cấy chuyển, phân lập các biến thể lần trốn mà thể hiện một phép thay thế trong vùng E2 ở vị trí 2870. Yếu tố quan trọng cho sự phân tách các biến thể khác là cũng xuất hiện sự thay đổi bổ sung trong protein E1 ở vị trí 2122, ví dụ như trong 16P1 tách ra. Nếu cả hai sự thay đổi xuất hiện đồng thời, khi đó chỉ đòi hỏi một ít lần cấy chuyển trong áp lực kháng thể và huyết thanh để phân tách các biến thể khác mà thể hiện thêm phép thay thế ở vị trí 2889 trong protein E2. Một số biến thể lần trốn này thể hiện thêm sự thay đổi ở vị trí 3225 trong protein E2. Ví dụ về biến thể lần trốn này là thể phân lập B5/2.

Sự thể hiện dưới dạng giản đồ cho epitop TAV của biến thể B5/2:

C-Stamm kiểu đại: CTAVSPTTLRTEVVK

Thể đột biến B5/2: CTAVSSTTLRTGVVK

Cấy chuyển thêm thể phân lập B5/2 dưới áp lực kháng thể dẫn đến tách được thể phân lập CB32. Thể phân lập ra này thể hiện thêm phép thay thế khác ở protein E2 (nucleotit 2862), thêm vào phép thay thế bổ sung trong protein E1 ở vị trí 2899. CB32 tách ra từ hỗn hợp các biến thể B5/2 và một biến thể mới với phép thay thế bổ sung. Để phân tách các biến thể mới mà thể hiện phép thay thế bổ sung, CB32 tách ra được cấy chuyển qua nhiều lần cấy chuyển dưới áp lực kháng thể. Từ lần cấy chuyển H15 sau đó và nối tiếp vào, các thể phân lập Q7, S10 và O11 được phân lập.

Xem Fig.1 về sự so sánh trình tự epitop TAV của thể đột biến S10, O11 và Q7. Xem bảng 1 về việc xem xét phép thay thế nucleotit và axit amin trong các biến thể lần trốn đã phân lập.

Xác định đặc tính các biến thể lần trốn B5/2, I16, Q7, S10 và O11

Thực hiện thử nghiệm các biến thể lẫn trộn về sự liên kết các kháng thể đặc hiệu E2 khác nhau bằng cách sử dụng miễn dịch huỳnh quang.

Bảng 5: Nhuộm miễn dịch huỳnh quang gián tiếp cho các biến thể lẫn trộn E2 đã lựa chọn với phép thay thế trong protein E2

Thể đột biến E2	C16 CSF-NS3B	A18Bommeli CSF-E2
SN1	dương tính	âm tính
16P1	dương tính	âm tính
25P3	dương tính	âm tính
60P3	dương tính	âm tính
12P5	dương tính	âm tính
34P5	dương tính	dương tính
50P5	dương tính	âm tính
51P5	dương tính	âm tính
5P6	dương tính	âm tính
48P6	dương tính	âm tính
59P7	dương tính	âm tính
60P7	dương tính	âm tính
C-Stamm	dương tính	dương tính
Alfort	dương tính	dương tính

Trong hầu hết các trường hợp, phép thay thế axit amin đơn trong epitop TAV có khả năng cho ra dấu hiệu âm tính khi sử dụng miễn dịch huỳnh quang với kháng thể A18Bommeli. Biến thể lẫn trộn với hai sự đột biến TAV (như B5/2) cũng thể hiện các kết quả âm tính với cả kháng thể A18Bommeli và A18C (Fig.2).

Bảng 7: Nhuộm miễn dịch huỳnh quang cho các lần cấy chuyển cụ thể của các biến thể lẫn trộn E2 khác nhau, thể hiện ba phép thay thế trong epitop TAV

Thể đột biến E2	A18 Idexx 1:400	A18 Bommeli 1:250	A18 Ceditest 1:500	303 1:100	211 1:100	C16 1:90
I16-P3	-	-	-	-	-	+++
Q7-P8	-	-	-	-	-	+++
O11-P7	-	-	-	-	-	+++
S10-P8	-	-	-	1 khuẩn lạc	-	+++
Chủng C	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Tất cả các thể phân lập ra được thử nghiệm đều thể hiện dấu hiệu âm tính cho các cây chuyển đã lựa chọn cho nhuộm A18. Tuy nhiên, ở lần cấy chuyển thứ 8 của thể phân lập ra S10, có thể nhuộm được một khuẩn lạc nhỏ bằng cách sử dụng kháng thể WH303. Điều này hỗ trợ cho tính ổn định cao của các phép thay thế trong epitop TAV. Các thử nghiệm về sự ổn định khác được thực hiện cho các thể phân lập ra Q7, S10 và O11, bằng cách sử dụng canh trường chai lần thêm qua 10 lần cấy chuyển nữa.

Bảng 8: Sự nhuộm khác nhau cho các lần cấy chuyển lựa chọn với kháng thể A18 (idexx và bommeli và WH303 (VLA). Kháng thể đặc hiệu NS3 C16 (EURL) được dùng cho mục đích đối chứng

Mẫu	Q7-P10	Q7-P14	Q7-P16	S10-P10	S10-P14	S10-P16	O11-P10	Chủng C	Kháng thể
Idexx	-	-	-	-	(+; EZ)	(+; EZ)	-	+++	Idexx
Bommeli	-	-	-	-	-	-	-	+++	Bommeli
WH 303	-	-	-	-	-	-	-	+++	WH 303
C16	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	C16
O11-P14	-	-	-	+++	-	-	-	-	
O11-P16	-	(+; EZ)	(+; EZ)	+++	-	-	-	-	
Antikörper	Idexx	Bommeli	WH303	C16					

EZ = một số tế bào đơn lẻ

Ở lần cấy chuyển thứ 10, không có biến thể virus nào thể hiện sự hồi biến, vì vậy chỉ có thể nhuộm bằng C16. Biến thể Q7 âm tính bằng Tất cả các lần nhuộm cho đến lần cấy chuyển thứ 14, qua đó trong lần cấy chuyển thứ 16 cũng không thể được phát hiện ra với kháng thể C16. Các phát hiện này được xác nhận bằng cách sử dụng RT-PCR thêm vào phương thức PCR giải trình tự. Do đó rõ ràng rằng không có virus ở lần cấy chuyển thứ 16, vì vậy cũng có thể loại trừ được lỗi cấy chuyển. Tuy nhiên một số tế bào có thể được nhuộm trong lần cấy chuyển thứ 14 và 16 của thể phân lập ra S10 bằng cách sử dụng kháng thể A18 (idexx). Bằng thể đột biến O11, thực hiện 16 lần cấy chuyển trước khi một số tế bào đơn có thể được nhuộm bằng cách sử dụng kháng thể A18 (bommeli) và WH303. Các kết quả thể hiện tính ổn định cao về đặc tính huyết thanh học của vacxin virus như mô tả trong bản mô tả.

Xác định đặc tính các biến thể lần trốn qua giải trình tự E1 và E2

Bảng 9: Giải trình tự các thể phân lập ra sớm thể hiện phép thay thế trong epitop TAV của protein E2

Thể đột biến	Giải trình tự ban đầu	Giải trình tự lần cấy chuyển thứ 10
48P6	Thay thế ở vị trí 2870	Thay thế ở vị trí 2870
2SNTP1	Thay thế ở vị trí 2870	Thay thế ở vị trí 2870
59P7	Thay thế ở vị trí 2870	Thay thế ở vị trí 2870
60P7	Thay thế ở vị trí 2870	Thay thế ở vị trí 2870
5P6b	Thay thế ở vị trí 2870	Thay thế ở vị trí 2870
D9	Thay thế ở vị trí 2870	Thay thế ở vị trí 2870
E51	Thay thế ở vị trí 2870	Thay thế ở vị trí 2870
E52	Thay thế ở vị trí 2870	Thay thế ở vị trí 2870
16P1	Thay thế ở vị trí 2870, Thay thế ở vị trí 2122	Thay thế ở vị trí 2870, Thay thế ở vị trí 2122

Phép thay thế ở vị trí 2870 được giữ lại trong tất cả các thể phân lập ra sau 10 lần cấy chuyển, mà dường như rất ổn định. Điều này giúp đưa ra kết luận rằng không có tác động lớn đến cấu trúc protein, để sự hồi biến ngược trình tự kiểu dại không có lợi.

Bảng 10: Giải trình tự các thể phân lập với 3 phép thay thế trong E2 epitop TAV

Thể đột biến E2	Chuẩn độ virus/ml	Phép thay thế E ^{RNS}	Phép thay thế E1	Phép thay thế E2	Thể đột biến ổn định
I16-P3	10 ^{5.25}	1649	2099 2122	2862 (80%) 2870 2889 3225	I16-P24 1649, (1657,1878) 2122, 2870, 2889
Q7-P8	10 ⁵	1649	2099 2122	2862 2870 2889 3225	Q7-P17 1649,2099,2122 2862, 2870, 2889, 3225
O11-P7	10 ⁵	1649	2099 2122	2862 2870 2889 3225	O11-P14 1649,2099,2122 2862, 2870, 2889, 3225
S10-P8	10 ⁵	1649	2099 2122	2862 2870 2889 3225	S10-P15 1649,2099,2122 2862, 2870, 2889, 3225

Các thay đổi trong trình tự của các thể phân lập ra O11, S10 và Q7 là ổn định cho tất cả các lần cấy chuyển thử nghiệm (14-17).

Bảng 11: Giải trình tự các thể phân lập ra Q7, S10 và O11 sau nhiều lần cấy chuyển khác nhau trong canh trường chai lần

Mẫu	Q7-P10	Q7-P14	Q7-P16	S10-P10	S10-P14	S10-P17	O11-P9	O11-P14	O11-P16
Protein E1	2099	2099	không	2099	2099	2099	không phát hiện	2099	2099
	2122	2122	Đã giải trình tự	2122	2122	2122	không phát hiện	2122	2122
Protein E2	2862			2862	2862	2862	2862	2862	2862
	2870			2870	2870	2870	2870	2870	2870
	2889			2889	2889	2889	2889	2889	2889

Tất cả các lần cấy chuyển virus đã giải trình tự của ba biến thể có các phép thay thế trong protein E1 và E2 bị giảm do áp lực miễn dịch. Lần cấy chuyển Q7 thứ 16 không thể giải trình tự được, có khả năng do không còn virus trong phần dịch nổi giống nuôi cấy tế bào (xem trên đây). Trong trường hợp xuất hiện virus hồi biến, dựa trên các phép nhuộm khác nhau trong Fig.2 không thể loại trừ được, chúng chỉ có thể được phát hiện ra bằng cách giải trình tự là tỷ lệ xác định. Tuy nhiên phần lớn các virus không hồi biến và vẫn bị thay thế. Không thể phát hiện ra các virus hồi biến đơn lẻ bằng cách giải trình tự.

RT-PCR thời gian thực đặc hiệu Q7

Để phân biệt giữa các động vật được chủng ngừa và bị nhiễm, sử dụng hệ RT-PCR. Do epitop TAV được bảo tồn cao trong tất cả các virus CSF, phép thay thế trong epitop TAV được sử dụng làm cơ sở cho các đoạn mồi và đầu dò trong thử nghiệm PCR thời gian thực.

Bảng 13: RT-PCR thời gian thực được sử dụng để kiểm soát tải virus. Các hệ PCR sau được sử dụng: CSF Mix 1 (đặc hiệu CSFV, nhận ra tất cả các chủng), Q7-TAV (đặc hiệu cho các biến thể) và hỗn hợp TAV-chủng C (có thể phát hiện ra chủng C kiểu đại, với độ nhạy rất thấp). Kết quả được đưa ra là giá trị Ct (chu kỳ ngưỡng).

Hệ mẫu	Q7-P10	Q7-P14	Q7-P16	S10-P10	S10-P14	S10-P17	O11-P9	O11-P14	O11-P16
CSF Mix1	21,2	20,4	Không phát hiện	20,5	19,2	20,1	20,1	19,5	20,1
Chủng C TAV-Mix	36,5	35,7	37,8	34,9	31,2	30,2	35,8	33,6	33
Q7-TAV rRT-PCR	22,4	21,9	27,3	21,4	20,9	21	20,9	20,2	21,6

Tải lượng virus được xác định bằng cách sử dụng RT-PCR thời gian thực. Hệ CSF-Mix 1 nhận ra tất cả các chủng CSFV và không phân biệt được giữa chủng C kiểu đại và các biến thể lần tròn mới. Hệ Q7-TAV nhận ra tất cả ba biến thể lần

trón một cách cụ thể. Hệ TAV chủng C chỉ nhận ra chủng C kiểu đại (không nhận ra biến thể lần trón), bằng giá trị Ct khoảng 14.

Mức giảm rất nhỏ về sự khác biệt ở giá trị TCt giữa hệ Q7-TAV RT-PCR và hệ TAV chủng C với việc tăng số lần cấy chuyển cho thấy bằng chứng rõ ràng về số hồi biến rất nhỏ sau số lần cấy chuyển cao. Thông thường, sự khác biệt giữa hai hệ về giá trị 14 Ct thể hiện tỷ lệ đột biến với hồi biến khoảng 1:8000, do đó giá trị Ct của 10 thể hiện tỷ lệ là 1:1000.

Nghiên cứu ở động vật 27/09 – Thử nghiệm đáp ứng miễn dịch của các thể đột biến Riems chủng C B5/2-P6 và I16-P2

Sự chủng ngừa trong cơ được thực hiện với 3 con lợn con, do đó mỗi con lợn được nhận 2ml huyền phù virus (phần dịch nổi giống nuôi cấy tế bào). Nhóm A được xử lý với B5/2, nhóm B được xử lý với I16 và nhóm đối chứng được xử lý với vacxin sốt lợn Riems. Các nghiên cứu này đưa ra sự phân tích đáp ứng miễn dịch sau khi chủng ngừa, thử nghiệm các đặc tính chỉ thị cho sự chủng ngừa sau đáp ứng miễn dịch biến đổi (ELISA) và thử nghiệm các đặc tính của virus trong các động vật được chủng ngừa (đặc tính ổn định di truyền và đặc tính tái bản).

Sự chuẩn độ ngược các virus sử dụng cho ra các kết quả sau:

B5/2-P6: Tải lượng virus $10^{4,25}$ virus/ml

I16-P2: Tải lượng virus $10^{4,75}$ virus/ml

Sự dung nạp của động vật với vacxin

Các con lợn được xử lý thể hiện không quan sát được các triệu chứng bệnh sau khi chủng ngừa (không sốt hoặc không có triệu chứng bệnh). Số lượng bạch cầu không tăng trên mức bình thường trong 7 ngày đầu tiên sau khi chủng ngừa.

Virus không thể phân lập ra từ máu. ARN tách ra từ mẫu máu sau khi chủng ngừa 4 ngày và 7 ngày được sử dụng để phân tích RT-PCR. Tuy nhiên sản phẩm PCR không phù hợp để giải trình tự sau đó. Điều này thể hiện tỷ lệ tái bản rất thấp của virus trong động vật.

Nghiên cứu ở động vật 06/10 – Thử nghiệm các biến thể lần trón Q7, S10 và O11

Việc chuẩn độ ngược thể hiện các nồng độ virus sau, mà được dùng trong thử nghiệm:

Q7-P8	$10^{4,0}$ KID ₅₀ /ml
S10-P8	$10^{4,25}$ KID ₅₀ /ml
O11-P7	$10^{4,25}$ KID ₅₀ /ml
Vaccin sốt lợn chũng C	$10^{2,25}$ KID ₅₀ /ml

Sau khi chủng ngừa, không thấy có sự thay đổi nhiệt độ cơ thể cũng như không có các triệu chứng sốt lợn điển hình.

Phân tích lâm sàng sau khi cảm nhiễm

Bệnh sốt được xác định khi nhiệt độ cơ thể $>40^{\circ}\text{C}$ trong ít nhất hai ngày liên tục.

5 nhóm thử nghiệm:

Nhóm 1 (5 con lợn): các biến đổi của biến thể chủng C Q7-P7 ($10^{5,0}$ KID₅₀/ml)

Nhóm 2 (5 con lợn): các biến đổi của biến thể chủng C S10-P8 ($10^{5,0}$ KID₅₀/ml)

Nhóm 3 (5 con lợn): các thể đột biến của biến thể chủng C O11-P8 ($10^{5,0}$ KID₅₀/ml)

Nhóm 4 (3 con lợn): vaccin sốt lợn do virus Riemser (virus sống)

Nhóm 5 (3 con lợn): nhóm đối chứng chưa chủng ngừa

Trong nhóm 1 phép đo nhiệt độ tăng rời rạc giữa ngày thứ 3 và ngày thứ 13 sau khi cảm nhiễm, tuy nhiên điều này không ảnh hưởng đến bất kỳ sự không khỏe mạnh có thể nhìn thấy được nào khác trong động vật. Chỉ có động vật số 4 thể hiện sốt trong 4 ngày.

Nhóm 2 thể hiện sự tăng nhiệt độ rời rạc trong 3 động vật xử lý, trong đó động vật số 9 thể hiện sự tăng nhiệt độ đáng kể.

Trong nhóm 3 chỉ có động vật số 14 thể hiện sự tăng nhiệt độ cơ thể cùng với sốt vào ngày thứ 4 và ngày thứ 5 sau khi cảm nhiễm.

Các động vật trong nhóm 4 không thể hiện bị sốt, trong đó đo được sự tăng nhiệt độ trong 2 động vật xử lý.

Tất cả các động vật trong nhóm 5 thể hiện bị sốt trong thời gian giữa ngày thứ 2 và 7 sau khi nhiễm. Do có các triệu chứng sốt lợn đáng kể, tất cả các động vật trong nhóm 5 đều bị giết sau khi nhiễm bệnh 7 ngày. Triệu chứng chung nhất là các

tác động đến hệ thần kinh trung ương (liệt nhẹ và mất điều hòa chân sau, tiêu chảy, viêm màng kết và mơ màng). Một động vật thể hiện có ổ tụ huyết trên da.

Virut không thể phân lập ra được từ nước mũi của các động vật đã chủng ngừa, do đó các động vật đối chứng không được chủng ngừa được thử nghiệm dương tính sau khi nhiễm 7 ngày.

Kết quả RT-PCR cho các mẫu huyết thanh

Kết quả RT-PCR thể hiện rằng sau khi nhiễm 14 ngày chỉ thu được các dấu hiệu rất yếu từ các động vật đã chủng ngừa khi thử nghiệm trong sự có mặt của virut gây bệnh có hại. Tuy nhiên, các động vật đối chứng không được chủng ngừa thể hiện dấu hiệu dương tính mạnh bằng các giá trị Ct dương là 30 hoặc nhỏ hơn sau khi nhiễm 3 ngày. Giá trị Ct từ các động vật không được chủng ngừa giảm xuống 17 sau 7 ngày.

Kết quả RT-PCR từ nước mũi

Kết quả RT-PCR từ các động vật đã chủng ngừa chỉ có âm tính. Tuy nhiên, các động vật đối chứng không được chủng ngừa thể hiện dấu hiệu dương tính mạnh bằng các giá trị Ct ở giữa 25 và 28 sau khi nhiễm 7 ngày.

Thử nghiệm trung hòa virut bằng CSFV Alfort

Thử nghiệm trung hòa virut thể hiện rằng các động vật (cả được chủng ngừa hoặc không được chủng ngừa) có thể hiện kháng thể mà có khả năng trung hòa virut độc hay không. Tất cả các nhóm được chủng ngừa đều thể hiện kháng thể trung hòa sau khi chủng ngừa 21 ngày. Sau khi nhiễm 7 ngày, tải lượng thử nghiệm trung hòa virut với Alfort là 640 ND₅₀ hoặc lớn hơn, trong tất cả các nhóm được chủng ngừa. Một động vật trong nhóm được chủng ngừa O11 và một động vật trong nhóm đối chứng chủng C thể hiện tải lượng là 480. Các động vật đối chứng không được chủng ngừa thể hiện không có tải lượng virut với Alfort trong VNT.

Thử nghiệm trung hòa virut (Virus neutralisation test: VNT) bằng CSFV Rösraht

Xem Fig.3 cho VNT với Rösraht chủng CSFV.

Ba tuần sau khi chủng ngừa tất cả các động vật, ngoại trừ một con trong nhóm S10 và một con trong nhóm O11, thể hiện các kháng thể trung hòa. 7 ngày sau khi gây nhiễm, nói chung các động vật đã được chủng ngừa thể hiện tải lượng

VNT là 640 hoặc lớn hơn. Tải lượng thấp nhất là 320, được thể hiện ở một động vật trong nhóm đã chủng ngừa đột biến TAV. Các động vật đối chứng không được chủng ngừa thể hiện không có tải lượng trong VNT đối với Rösraht.

E2-ELISA (idexx)

E2-ELISA là kit ELISA có bán trên thị trường cho thử nghiệm sự có mặt của sốt lợn cổ điển. Trung bình, các động vật được chủng ngừa chủng C thể hiện kết quả dương tính trong E2-ELISA sau khi chủng ngừa 21 ngày. Các động vật được chủng ngừa bằng thể đột biến TAV cũng thể hiện kết quả dương tính sau 7 ngày trong idexx E2-ELISA. Nhóm đối chứng không được chủng ngừa thể hiện không thể phát hiện ra kháng thể sau khi nhiễm.

Xem Fig.4 cho Idexx E2-ELISA với huyết thanh lợn.

Trong E2-ELISA, các kết quả cho thể đột biến TAV trước khi nhiễm là dương tính, nhưng không mạnh, trong khi sau khi nhiễm các kết quả trở nên dương tính mạnh, mà thể hiện hiệu quả tăng cường mạnh. Các động vật đối chứng đã chủng ngừa chủng C thể hiện dương tính mạnh trong E2-ELISA trước khi nhiễm.

Kết quả về các động vật được chủng ngừa bằng thể đột biến TAV có thể so sánh với các động vật được chủng ngừa với nhóm đối chứng chủng C. Sự phân lập virus sau khi nhiễm thể hiện âm tính và kết quả RT-PCR không đáng tin hoặc dương tính yếu, mà cũng được thể hiện trong nhóm đối chứng chủng C. Tất cả các động vật thể hiện tải lượng cao trong thử nghiệm trung hòa virus với Alfort thêm vào Rösraht. Tất cả các động vật đã chủng ngừa đều thể hiện sự bảo vệ hoàn toàn chống lại Koslov chủng virus gây bệnh sau khi chủng ngừa trong cơ bốn tuần.

Nghiên cứu ở động vật 24/10 – Thử nghiệm các biến thể lần trốn S10 và O11; sự bảo vệ sau khi chủng ngừa qua đường uống

Để thử nghiệm hiệu quả khi dùng qua đường uống, thực hiện thử nghiệm trên động vật sau. Sử dụng 15 con lợn con làm động vật thử nghiệm, từ 8 đến 10 tuần tuổi (khoảng từ 15 đến 20kg).

Liều lượng chủng ngừa và thiết kế thử nghiệm:

Nhóm 1 (6 con lợn): các thể đột biến A biến thể chủng C S10 (10^5 KID₅₀/ml)

Nhóm 2 (6 con lợn): các thể đột biến B biến thể chủng C O11 (10^4 KID₅₀/ml)

Nhóm 3 (3 con lợn): nhóm đối chứng bị nhiễm (chưa chủng ngừa)

Nhóm 1: Tất cả các động vật trong nhóm này đều được bảo vệ hoàn toàn trước khi cảm nhiễm. Không phát hiện ra triệu chứng bị bệnh. Tất cả các động vật đều thể hiện kháng thể trung hòa, mà có thể phát hiện ra bằng cả thử nghiệm VNT và ELISA.

Nhóm 2: Các động vật trong nhóm 2 thể hiện sự pha trộn giữa bảo vệ và nhiễm bệnh. 2 động vật thể hiện các triệu chứng bị bệnh, như sốt cao và các triệu chứng sốt lợn điển hình khác. Các động vật bị ảnh hưởng bị tiêm thuốc cho chết. Các động vật được bảo vệ thể hiện kháng thể trung hòa, có thể phát hiện ra được bằng cả hai thử nghiệm VNT và ELISA.

Nhóm 3: Tất cả các động vật đều bị nhiễm và đều thể hiện triệu chứng bị bệnh. Các động vật bị ảnh hưởng bị tiêm thuốc cho chết.

Nghiên cứu sự chủng ngừa qua đường uống thể hiện rằng sự chủng ngừa qua đường uống, cụ thể bằng cách sử dụng thể đột biến S10, dẫn đến bảo vệ có hiệu quả khỏi sự nhiễm. Thử phân lập O1 cũng thể hiện các kết quả có lợi, xét về liều lượng chủng ngừa được giảm so với lượng virus đưa vào S10.

Tài liệu tham khảo:

Chỉ thị của hội đồng châu Âu 2001/89/EC vào ngày 23 tháng 10 năm 2001 về biện pháp chung để kiểm soát bệnh sốt lợn cổ điển (2001): Official Journal of the European Communities L 316, 5-35.

Kỹ thuật chuẩn đoán và vacxin cho bệnh lở mồm long móng, bệnh sốt lợn cổ điển, bệnh cúm gà và danh sách các bệnh quan trọng khác của tổ chức thú y thế giới (2003a): Báo cáo của ủy ban khoa học về sức khỏe động vật và quyền lợi động vật thông qua vào ngày 24-25 tháng 4 năm 2003, 1-150.

Báo cáo đánh giá thử nghiệm phân biệt bệnh sốt lợn cổ điển mới (2003/265/EC) (2003b).

Quyết định hội đồng vào ngày 23 tháng 11 năm 2006 đưa ra các kế hoạch trừ diệt bệnh sốt lợn cổ điển cho lợn hoang và chủng ngừa dự phòng cho các con lợn đó và các con lợn đang phải chống lại bệnh đó ở Rumani (2006/802/EC) (2006): Công báo Official Journal của Liên minh Châu Âu L329, 34-37.

Beer, M, Reimann, I, Hoffmann, B, Depner, K (2007): Vacxin chỉ thị mới chống lại bệnh sốt lợn cổ điển. *Vacxin* 25 (30): 5665-5670.

Blome, S, Meindl-Bohmer, A, Loeffen, W, Thuer, B, Moennig, V (2006): Đánh giá triệu chứng của bệnh sốt lợn cổ điển và hiệu quả của vacxin. *Rev Sci Tech* 25 (3): 1025-1038.

de Smit, AJ, Bouma, A, Van Gennip, HG, de Kluijver, EP, Moormann, RJ (2001): Virut chủng C khảm (chỉ thị) tạo ra sự bảo vệ chống lại virut sốt lợn cổ điển độc (classical swine fever virus: CSFV) là làm giảm sự truyền CSFV giữa các con lợn đã chủng ngừa. *Vacxin* 19 (11-12): 1467-1476.

Dong, XN, Chen, YH (2007): Chiến lược vacxin chỉ thị và vacxin chỉ thị CSFV tham gia. *Vacxin* 25 (2): 205-230.

Floegel-Niesmann, G (2003): Vacxin chỉ thị và thử nghiệm chuẩn đoán hướng dẫn cho bệnh sốt lợn cổ điển. *Dev Biol (Basel)* 114, 185-191.

Greiser-Wilke, I, Moennig, V (2004): Chủng ngừa chống lại virut sốt lợn cổ điển: các hạn chế và chiến lược mới. *Anim Health Res Rev* 5 (2): 223-226.

Leifer, I, Lange, E, Reimann, I, Blome, S, Juanola, S, Duran, JP, Beer, M (2009): Thành phần vacxin chỉ thị sống đã biến đổi CP7_E2alf giúp dễ dàng khởi phát sự bảo vệ chống lại nhiễm virut sốt lợn cổ điển cảm nhiễm gây chết sau khi chủng ngừa trong cơ và qua đường uống. *Vacxin*.

Van Oirschot, JT (2003): Vacxin học cho bệnh sốt lợn cổ điển: từ phòng thí nghiệm đến cánh đồng. *Vet Microbiol* 96 (4): 367-384.

Vandeputte, J, Chappuis, G (1999): Sốt lợn cổ điển: thử nghiệm ở Châu Âu và hướng dẫn cho khu vực nhiễm. *Rev Sci Tech* 18 (3): 638-647.

Kỹ thuật chuẩn đoán và vacxin cho bệnh lở mồm long móng, sốt lợn cổ điển, cúm gà và danh sách các bệnh quan trọng khác của tổ chức thú y thế giới: Ủy ban Châu Âu, Tổng giám đốc Hội bảo vệ sức khỏe và người tiêu dùng; 2003 p. 1-150.

Koenig P, Lange E, Reimann I, Beer M. CP7_E2alf: chủng cho vacxin chỉ thị có hiệu quả và an toàn để chủng ngừa qua đường uống cho lợn kiểu đại chống lại virut sốt lợn cổ điển (Classical swine fever virus: CSFV). *Vacxin* 2007 Apr 30;25(17):3391-9.

Floegel-Niesmann G. Vacxin chỉ thị cho bệnh sốt lợn cổ điển (Classical swine fever: CSF). Thử nghiệm III. Đánh giá của các ELISA phân biệt. *Vet Microbiol* 2001 Nov 8;83(2):121-36.

D. Luetticken, C. Drexler, N. Visser and V. Kaden, Sự phù hợp cho vacxin chỉ thị CSF để sử dụng trên cánh đồng, báo cáo của Hội nghị chuyên đề OIE về bệnh sốt lợn cổ điển U.K., July 9–10 (1998).

J.T. van Oirschot, Diva: Vacxin làm giảm sự truyền virus, *J Biotechnol* 73 (2–3) (1999), pp. 195–205.

A. Uttenthal, M.F. Le Potier, L. Romero, G.M. DeMia and G. Floegel-Niesmann, Vacxin chỉ thị cho bệnh sốt lợn cổ điển (classical swine fever: CSF). Thử nghiệm I. Nghiên cứu cảm nhiễm trong lợn đã cai sữa, *Vet Microbiol* 83 (2) (2001), trang 85–106.

K.R. Depner, A. Bouma, F. Koenen, D. Klinkenberg, E. Lange and H. de Smit và các đồng tác giả., Vacxin chỉ thị cho bệnh sốt lợn cổ điển (classical swine fever: CSF). Thử nghiệm II: Nghiên cứu cảm nhiễm ở lợn mang thai, *Vet Microbiol* 83 (2) (2001), trang 107–120.

A.J. de Smit, H.G. van Gennip, G.K. Miedema, P.A. van Rijn, C. Terpstra and R.J. Moormann, Virus sốt lợn cổ điển (classical swine fever: CSF) tái tổ hợp bắt nguồn từ chủng vacxin Trung Quốc (chủng C) của virus CSF giữ lại được các đặc điểm độc tính và sinh miễn dịch của chúng, *Vacxin* 18 (22) (2000), pp. 2351–2358.

Yan Li và các đồng tác giả, RT-PCR được đưa vào đa thành phần để phát hiện ra và phân biệt virus kiểu đại của vacxin chủng C của virus sốt lợn cổ điển.

Y. Qi, và các đồng tác giả, Thể hiện đặc điểm của kháng thể đáp ứng lại epitop trung hòa trên glycoprotein E2 của virus sốt lợn cổ điển.

Jian-Jun Zhao và các đồng tác giả, Đánh giá RT-PCR thời gian thực đa thành phần về chất lượng và phát hiện sự khác nhau của virus kiểu đại và virus sốt lợn cổ điển.

Susana Mendoza và các đồng tác giả, Sự phân biệt về kháng nguyên của PAV250 chủng vacxin sốt lợn cổ điển từ các chủng khác, bao gồm các chủng trên cánh đồng từ Mehycó.

J. Kortekaas và các đồng tác giả, Thiết kế hợp lý virus vacxin chủng C cho bệnh sốt lợn cổ điển có khả năng phân biệt giữa các động vật bị nhiễm và được chủng ngừa, 2009.

L.G. Holinka và các đồng tác giả: Phát triển vacxin sốt lợn cổ điển chỉ thị kháng nguyên bị làm sống giảm độc, Virology, 2009.

Hulst và các đồng tác giả, Cây chuyển virus sốt lợn cổ điển trong các tế bào thận lợn đã nuôi cấy

Lựa chọn các biến thể virus liên kết với Heparan Sulfat nhờ sự trao đổi axit amin đơn trong Protein Erns có vỏ bọc, Journal of Virology, Oct. 2000, p. 9553–9561 Vol. 74, No. 20.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vacxin chỉ thị để điều trị dự phòng bệnh sốt lợn cổ điển bao gồm virus sốt lợn cổ điển sống giảm độc được biến đổi, khác biệt ở chỗ, trình tự axit amin virus của epitop TAV trong protein E2 chứa trình tự khác với trình tự trong virus sốt lợn cổ điển kiểu đại, trong đó trình tự axit amin của virus thể hiện ít nhất một trong các phép thay thế sau đây so với virus “Riems” chủng C:

- thay thế axit amin 830 bằng valin,
- thay thế axit amin 833 với serin,
- thay thế axit amin 839 bằng glyxin.

2. Vacxin chỉ thị theo điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ, virus đã biến đổi không thể hiện các trình tự axit nucleic tái tổ hợp.

3. Vacxin chỉ thị theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ, trình tự nucleotit của virus thể hiện một hoặc nhiều phép thay thế sau đây so với virus “Riems” chủng C:

- thay thế ở vị trí nucleotit 2862 bằng T,
- thay thế ở vị trí nucleotit 2870 bằng T,
- thay thế ở vị trí nucleotit 2889 bằng G.

4. Vacxin chỉ thị theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ, trình tự axit amin của virus thể hiện một hoặc nhiều phép thay thế sau đây so với virus “Riems” chủng C:

- thay thế axit amin 426 trong protein E^{RNS} bằng valin,
- thay thế axit amin 576 trong protein E1 bằng histidin,
- thay thế axit amin 583 trong protein E1 bằng axit glutamic,
- thay thế axit amin 951 trong protein E2 bằng isoleuxin.

5. Vacxin chỉ thị theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ, trình tự nucleotit của virus thể hiện một hoặc nhiều phép thay thế sau đây so với virus “Riems” chủng C:

- thay thế ở vị trí nucleotit 1649 bằng G,
- thay thế ở vị trí nucleotit 2099 bằng C,

- thay thế ở vị trí nucleotit 2122 bằng G,
- thay thế ở vị trí nucleotit 3225 bằng T.

6. Vacxin chỉ thị theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ, trình tự axit amin virus của epitop TAV bao gồm trình tự SEQ ID NO. 3 hoặc SEQ ID NO. 4.

7. Vacxin chỉ thị theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ, trình tự nucleotit của virus bao gồm trình tự SEQ ID NO. 1.

8. Vacxin chỉ thị theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó vacxin này có thể thu được bằng cách tạo ra các biến thể virus lẫn trốn thuộc các chủng virus sốt lỵ gây bệnh hoặc đã biết khác bằng cách sử dụng áp lực kháng thể.

9. Phương pháp sản xuất chủng vacxin virus sốt lỵ cổ điển sống giảm độc được biến đổi, tốt hơn là theo các điểm từ 1 đến 8, bao gồm bước tạo ra biến thể lẫn trốn của các chủng virus sốt lỵ gây bệnh hoặc đã biết khác bằng cách sử dụng áp lực kháng thể.

10. Phương pháp theo điểm 9, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm:

- cấy chuyển nhiều lần các tế bào, tốt hơn là tế bào thận của phôi lợn bị nhiễm virus sốt lỵ gây bệnh, trong giống nuôi cấy tế bào, và
- sử dụng đồng thời các kháng thể được định hướng chống lại epitop TAV của protein E2 của virus sốt lỵ gây bệnh và/hoặc huyết thanh thô đã được chủng ngừa bằng peptit CTAVSP^TTLRTEVVK đa dòng.

11. Dược phẩm chứa vacxin chỉ thị theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8 và chất mang dược dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> RIEMSER ARZNEIMITTEL AG
 Martin, BEER
 Immanuel, LEIFER
 Sandra, BLOME

<120> VACXIN CHỈ THỊ ĐỂ ĐIỀU TRỊ DỰ PHÒNG BỆNH SỐT LỌN CỎ ĐIỀN, PHƯƠNG
 PHÁP SẢN XUẤT VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA VACXIN NÀY

<130> XII 76/11

<150> DE 10 2010 017 006.2

<151> 2010-05-18

<150> EP 10075207.0

<151> 2010-05-18

<150> EP 10075205.4

<151> 2010-05-18

<150> EP 10075206.2

<151> 2010-05-18

<150> EP 10075759.0

<151> 2010-12-17

<150> EP 10075760.8

<151> 2010-12-17

<150> EP 11159207.7

<151> 2011-03-22

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 60

<212> ADN

<213> Flavivirus sp.

<400> 1

cgggtgcat agagtgcaca gtagtgagct caacgactct gagaacagga gtggtaaaga
 60

<210> 2

<211> 60

<212> ADN

<213> Flavivirus sp.

<400> 2

cgggtgcat agagtgcaca gcagtgagcc caacgactct gagaacagaa gtggtaaaga
 60

<210> 3

<211> 14

<212> PRT

<213> Flavivirus sp.

<400> 3

Thr Ala Val Ser Ser Thr Thr Leu Arg Thr Gly Val Val Lys
 1 5 10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT

<213> Flavivirus sp.

<400> 4

Thr Val Val Ser Ser Thr Thr Leu Arg Thr Gly Val Val Lys
 1 5 10

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Flavivirus sp.

<400> 5

Thr Ala Val Ser Pro Thr Thr Leu Arg Thr Glu Val Val Lys
 1 5 10

Fig. 1

A

Trình tự nucleotit Q7/S10/O11

```

      CGGGTGT CATAGAGTGCACAGTAGTGAGCTCAACGACTCTGAGAACAGGAGTGGTAAAGA
      |||||
2841 CGGGTGT CATAGAGTGCACAGCAGTGAGCCCAACGACTCTGAGAACAGAAGTGGTAAAGA 2900

```

Trình tự nucleotit chủng C

B

Trình tự axit amin Q7/S10/O11

```

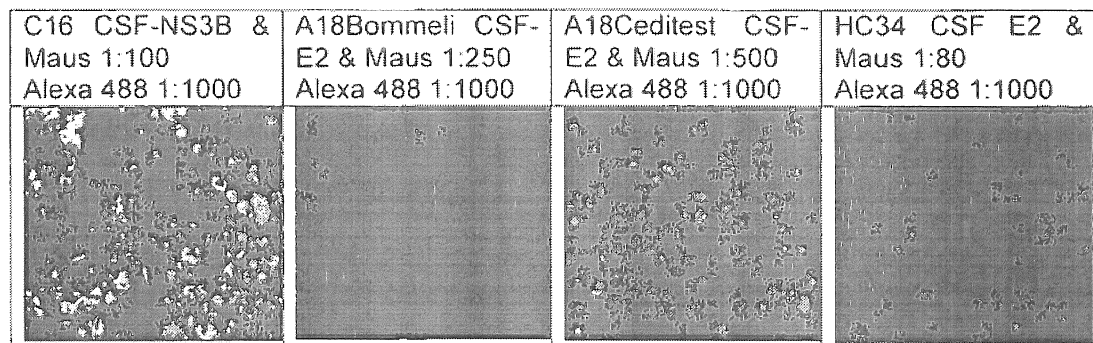
TVVSSTTLRTGVVK
| | | | | | | |
TAVSPTTLRTEVVK

```

Trình tự axit amin chủng C

Fig. 2

A



B

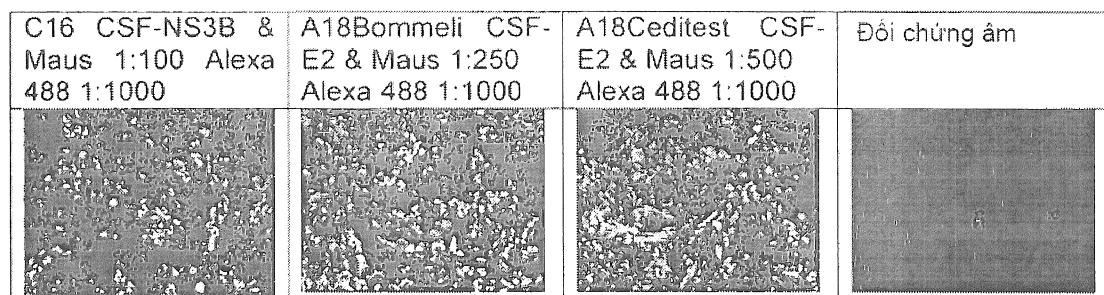


Fig. 3

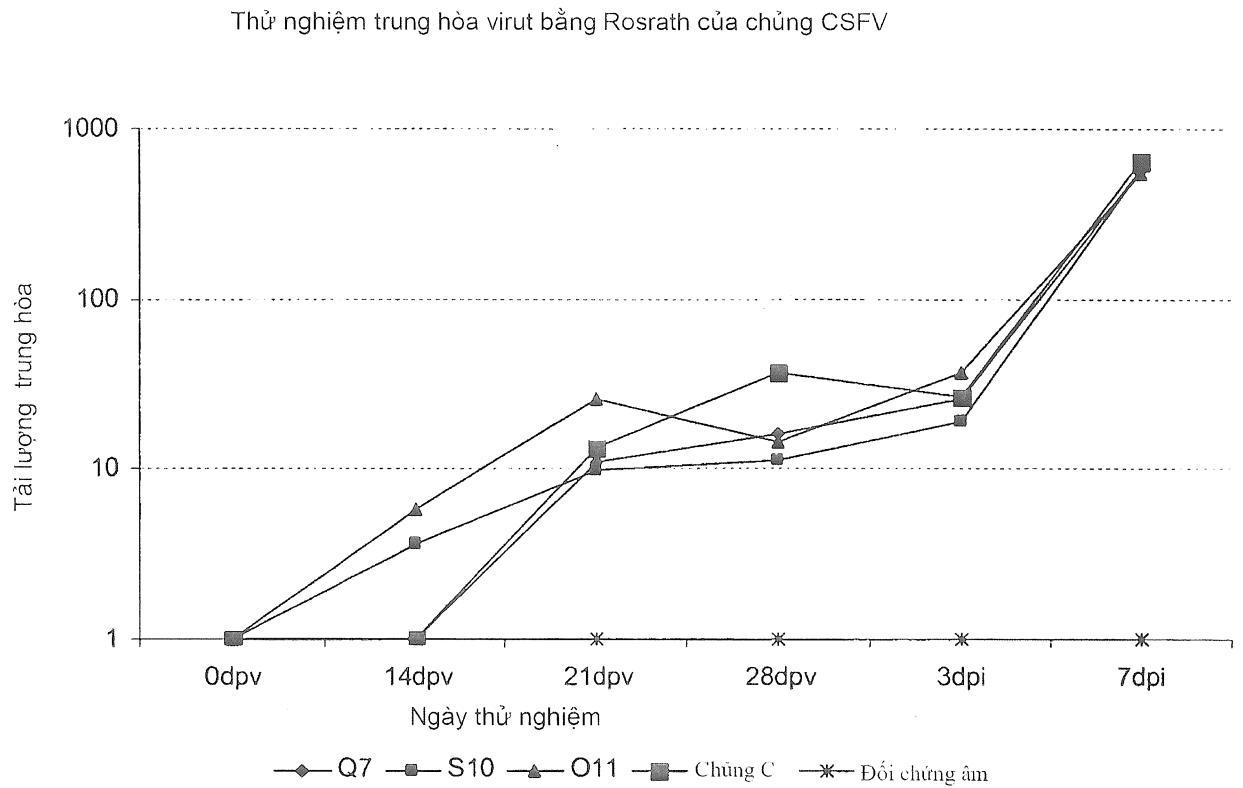


Fig. 4

