



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0028482

(51)⁷ A61K 39/02; A61P 31/04; A61P 31/14; (13) B
A61K 39/12

(21) 1-2016-02010 (22) 02/12/2014
(86) PCT/EP2014/076243 02/12/2014 (87) WO 2015/082465 11/06/2015
(30) 13195529.6 03/12/2013 EP
(45) 25/06/2021 399 (43) 25/11/2016 344A
(73) INTERVET INTERNATIONAL B.V. (NL)
Wim de Koerverstraat 35, NL-5831 AN Boxmeer, Netherlands
(72) DREXLER, Christa (DE); JACOBS, Antonius Arnoldus Christiaan (NL).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) VACXIN NGỪA VIRUT HỘI CHỨNG RỐI LOẠN SINH SẢN VÀ HÔ HẤP Ở LỢN (PRRS) VÀ VI KHUẨN LAWSONIA INTRACELLULARIS Ở LỢN

(57) Sáng chế đề cập đến vacxin cho lợn, cụ thể là vacxin chứa hỗn hợp virus hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS) sống đã được làm giảm độc lực và kháng nguyên *Lawsonia intracellularis* đã được làm bất hoạt, để bảo vệ lợn khỏi bị lây nhiễm virus PRRS và vi khuẩn *Lawsonia intracellularis*. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp bảo vệ lợn khỏi bị lây nhiễm virus PRRS và vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* bằng cách sử dụng vacxin này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nói chung, sáng chế đề cập đến lĩnh vực chăm sóc sức khỏe cho lợn. Lợn dễ nhiễm nhiều vi sinh vật gây bệnh. Việc kiểm soát lây nhiễm thường được thực hiện bằng cách quản lý chuồng trại và kiểm soát việc cung cấp thức ăn, xử lý bằng dược phẩm như thuốc kháng virus và thuốc kháng sinh, hoặc xử lý phòng bệnh sử dụng vaccin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

WO2007/116032 bộc lộ vaccin phối hợp bao gồm virus PRRS sống và kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumonia* để sử dụng trong việc chủng ngừa cho lợn được miễn *Mycoplasma hyopneumonia*.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất các biện pháp thuận tiện, an toàn và hiệu quả để quản lý sức khỏe cho lợn.

Để đáp ứng mục đích nêu trên, sáng chế đề xuất vaccin mới để phối hợp bảo vệ cho lợn khỏi bị lây nhiễm các vi sinh vật gây bệnh khác nhau, vaccin này chứa hỗn hợp virus gây PRRS (porcine reproductive and respiratory syndrome - hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn) sống đã được làm giảm độc lực và kháng nguyên *Lawsonia intracellularis* đã được làm bất hoạt. Virus PRRS và vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* đều gây ra nhiều tổn thất về kinh tế do tác động xấu đến sức khỏe lợn. Mặc dù cả hai loại thuốc vi sinh vật cũng như các vaccin là đã biết và có bán ngoài thị trường, nhưng không sẵn có vaccin hỗn hợp thích hợp cho việc bảo vệ kết hợp chống lại sự lây nhiễm hoặc bệnh lâm sàng từ các thể gây bệnh này, trong đó vaccin có hiệu quả, có chất lượng tốt (ví dụ, ổn định, không có sự can thiệp kháng nguyên) và đồng thời an toàn để sử dụng cho các động vật con. Thông thường, như đã biết, không phải tất cả hỗn hợp kháng nguyên được dự tính hoặc được đề xuất có thể tạo ra vaccin hỗn hợp an toàn và hiệu quả. Thực tế, độ ổn định,

tính an toàn và hiệu quả của vaccin hỗn hợp không phải lúc nào cũng ổn định, ngay cả khi các vaccin đơn (đơn giá) là an toàn và hiệu quả.

Cần hiểu rằng thuật ngữ “hỗn hợp” không bao gồm các kháng nguyên được tạo ra ở dạng kết hợp của virus PRRS sống và vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt, chỉ sau khi dùng cho động vật theo sáng chế, ví dụ, bằng cách tiêm hai vaccin riêng biệt tại một vị trí tiêm.

Ủy ban phụ trách các sản phẩm thú y thuộc Cơ quan đánh giá dược phẩm châu Âu (EMA) đã công bố tài liệu “Note for guidance: requirements for combined veterinary products” (EMA, 2000, CVMP/IWP/52/97-FINAL), nêu rằng (trang 2/6) “việc phát triển vaccin hỗn hợp không đơn giản. Mỗi hỗn hợp phải được phát triển và nghiên cứu một cách riêng rẽ về chất lượng, tính an toàn và hiệu quả”. Ủy ban này còn cho rằng một vaccin hỗn hợp tốt được tìm kiếm thường gồm độ ổn định và tính tương hợp giữa các thành phần riêng rẽ trong vaccin hỗn hợp, bao gồm, ví dụ chất bảo quản, chất phụ gia và chất ổn định, chất làm bất hoạt và tá dược. Trên trang 3, ở đoạn đầu tiên đã nêu “Trong vaccin hỗn hợp, việc có mặt nhiều hơn một thành phần có thể thường gây ra sự tương tác, dẫn đến đáp ứng đối với các thành phần riêng rẽ giảm hoặc tăng, so với khi (các) thành phần cụ thể được dùng riêng.....Các tương tác này thường có bản chất miễn dịch, nhưng cũng có thể do các yếu tố khác ít có tác động trực tiếp đến hệ miễn dịch gây ra”, và cả “khi tá dược được dùng để tăng thêm đáp ứng miễn dịch cho vaccin hỗn hợp, có thể xuất hiện các vấn đề cụ thể.”

Bộ y tế và dịch vụ nhân sinh Hoa Kỳ, Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ, Trung tâm đánh giá và nghiên cứu chế phẩm sinh học Hoa Kỳ, đã công bố tài liệu “Guidance for Industry, for the evaluation of combination vaccines for preventable diseases: Production, Testing and Clinical Studies” vào tháng 4 năm 1997, trong tài liệu hướng dẫn này (trang 3, phần “Tính tương hợp của các thành phần”) có đoạn nêu rằng “Thử nghiệm đã cho thấy việc kết hợp các vaccin đơn giá có thể tạo ra hỗn hợp mới kém an toàn và hiệu quả hơn so với mong muốn. Đôi khi, các thành phần của vaccin đã được làm bất hoạt có thể tác động bất lợi đến một hoặc nhiều thành phần hoạt tính”, điều này cho thấy, cụ thể là vaccin đã được làm

bất hoạt có thể tác động xấu đến hiệu quả của vaccin sống, ví dụ như khi kết hợp vaccin ho gà sống và vaccin virus bại liệt đã được làm bất hoạt mà dẫn đến vaccin có hiệu lực ho gà giảm. Đã chỉ ra rằng các thành phần bổ sung bất kỳ trong vaccin có thể ảnh hưởng nhiều đến độ an toàn và hiệu lực của thành phẩm khi so sánh với các vaccin riêng rẽ.

Tổ chức y tế thế giới (WHO) đã khai giảng một khóa học trực tuyến gọi là “Vaccine Safety Basics”, trong đó Môđun 2 đề cập đến vaccin hỗn hợp. Phần này bắt đầu bằng đoạn “Vaccin hỗn hợp được cấp phép trải qua nhiều thử nghiệm kỹ lưỡng trước khi được phê duyệt bởi cơ quan có thẩm quyền quốc gia để đảm bảo rằng các sản phẩm này an toàn, hiệu quả, và chất lượng có thể chấp nhận được”. Phần này cũng nêu rằng “Do đó, đối với tất cả các hỗn hợp, nhà sản xuất phải đánh giá hiệu lực của mỗi thành phần kháng nguyên, hiệu quả của các thành phần vaccin khi được kết hợp để kích thích tính miễn dịch, nguy cơ có thể phục hồi độc tính, và phản ứng với các thành phần vaccin khác.”

Ngoài vaccin này, sáng chế còn đề cập đến phương pháp bảo vệ lợn khỏi bị lây nhiễm virus PRRS và vi khuẩn *Lawsonia intracellularis*, phương pháp này bao gồm bước cho lợn dùng vaccin nêu trên.

Các định nghĩa

Vaccin là thành phần bảo vệ chống lại sự lây nhiễm vi sinh vật gây bệnh sau khi chủng ngừa, nghĩa là thành phần này bảo vệ hoặc làm giảm sự lây nhiễm vi sinh vật, hoặc ngăn ngừa hoặc làm giảm bệnh lâm sàng do sự lây nhiễm, thường là bằng cách can thiệp vi sinh vật này, ví dụ qua kháng thể, trong chủ thể được chủng ngừa. Do đó, việc chủng ngừa ngăn ngừa, hoặc ít nhất là làm giảm bớt, mức độ lây nhiễm và/hoặc ngăn ngừa, hoặc ít nhất là làm giảm bớt, mức độ của bệnh lâm sàng do sự lây nhiễm này.

Kháng nguyên đã được làm bất hoạt của vi khuẩn kiểu đại là chất hoặc hợp chất bất kỳ, không phải là vi khuẩn sống được hiểu theo cách thông thường, chống lại đáp ứng miễn dịch học, sao cho vi khuẩn độc hại tương ứng hoặc một hoặc nhiều yếu tố độc hại của nó sẽ được chấp nhận bởi hệ miễn dịch của chủ thể là kết quả của

đáp ứng miễn dịch, và cuối cùng là làm mất tác dụng ít nhất một phần. Các ví dụ điển hình của kháng nguyên đã được làm bất hoạt của vi khuẩn kiểu đại là vi khuẩn toàn phần đã bị tiêu diệt (thuật ngữ “toàn phần” không ngoại trừ các tế bào vi khuẩn này bị phá vỡ, ít nhất một phần, trong quy trình làm chết, hoặc phần chiết hoặc dịch treo mô cơ thể của vi khuẩn tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt thực sự được đưa ra làm kháng nguyên trong vaccin “vi khuẩn tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt”), nhóm con của vi khuẩn như protein biểu hiện bề mặt, và các độc tố. Hai loại sau có thể hoặc không thể được biểu hiện tái tổ hợp. Đối với *Lawsonia intracellularis*, một số loại kháng nguyên đã được làm bất hoạt đã biết trong lĩnh vực này, và ví dụ, đã biết từ WO2009/144088 (vi khuẩn tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt, các ví dụ 1 và 2), WO2005/070958 (các nhóm con) và WO97/20050 (tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt).

Virut sống đã được làm giảm độc lực là virut có khả năng sao chép được hiểu theo cách thông thường, nhưng không có khả năng gây ra tập hợp đầy đủ các triệu chứng bệnh mà thường kết hợp với vật đối chứng gây bệnh độc hại (thường là kiểu đại). Thông thường, virut sống không sao chép trong chủ thể đích, hoặc sao chép ở tốc độ không có hại đáng kể cho tế bào chủ, hoặc không gây ra phản ứng có hại cho chủ thể. Đối với virut PRRS, một số vaccin đã biết trong lĩnh vực này gồm virut sống đã được làm giảm độc lực được dẫn xuất từ virut kiểu đại mà đã được làm giảm độc lực bằng cách đi qua nhiều lần trong dòng tế bào chủ đã được nuôi cấy in vitro, như ví dụ Porcilis® PRRS (MSD Animal Health), Ingelvac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim), Amervac-PRRS (Hipra Laboratories), Pyrsvac-183® (Hipra Laboratories) và Foster® PRRS (Zoetis). Trong lĩnh vực này, các virut PRRS sống đã được làm giảm độc lực khác được mô tả, ví dụ, trong tài liệu *Veterinary Microbiology*, volume 138, issues 1–2, 2 July 2009, Pages 34–40; *Veterinary Immunology and Immunopathology*, volume 106, issues 3–4, 15 July 2005, Pages 309–319 và trong tài liệu *Vaccine*, volume 26, issues 29–30, 4 July 2008, Pages 3594–3600.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một phương án, vaccin là để bảo vệ lợn khỏi bị lây nhiễm virut PRRS và vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* sau khi dùng một mũi tiêm duy nhất. Dễ dàng

thấy rằng lợn được bảo vệ chống lại cả hai mầm gây bệnh nêu trên ngay sau khi dùng một mũi tiêm vaccin duy nhất này. Phương án này không loại trừ việc tiếp tục chủng ngừa sau đó, ví dụ 6 đến 12 tháng sau lần chủng ngừa lần đầu tiên để khôi phục mức độ bảo vệ. Việc chủng ngừa sau đó này khác với sự chủng ngừa tăng cường trong phác đồ chủng ngừa cơ bản-tăng cường, trong đó khả năng bảo vệ chỉ thu được sau khi chủng ngừa tăng cường. Trong phác đồ chủng ngừa cơ bản-tăng cường, hai mũi tiêm thường cách nhau 2-3 tuần.

Theo một phương án, vaccin chứa tá dược. Đã phát hiện ra rằng các loại tá dược thường được sử dụng để cải thiện đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên đã được làm bất hoạt, không tác động xấu đến virus PRRS sống đã được làm giảm độc lực, mà cũng không tăng quá mức khả năng phản ứng đối với kháng nguyên khác, mặc dù WHO đã cảnh báo rõ ràng về tác động và khả năng phản ứng của các tá dược này trong bài giảng Khái niệm cơ bản về độ an toàn của vaccin - Vaccine Safety Basics (xem ở trên) trên trang 1, hai dòng cuối (phần “Vaccin hỗn hợp”) của bài giảng này. Theo phương án khác, tá dược chứa dầu khoáng, như, ví dụ, dầu hydrocacbon no mà có thể thu được từ ExxonMobil® (Marcol® 52).

Theo phương án khác nữa, kháng nguyên *Lawsonia intracellularis* đã được làm bất hoạt bao gồm vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt, tốt hơn là ở lượng sao cho vaccin này chứa kháng nguyên *Lawsonia intracellularis* tương ứng với 1×10^7 vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* mỗi liều. Lượng kháng nguyên cao hơn, mà không loại trừ trong phương án này, có thể tác động tích cực đến mức độ bảo vệ và thời gian miễn dịch.

Liên quan đến lượng PRRSv trong vaccin, theo một phương án, vaccin chứa $4,0 \log_{10}$ (4 đơn vị $10 \log$) TCID₅₀ virus PRRS đã được làm giảm độc lực mỗi liều. Việc nạp kháng nguyên cao hơn, mà không loại trừ trong phương án này, có thể tác động tích cực đến mức độ bảo vệ và thời gian miễn dịch.

Sáng chế sẽ được giải thích chi tiết hơn dựa vào phần ví dụ và hình vẽ sau.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 mô tả nghiên cứu về vaccin hỗn hợp virus PRRS và *Lawsonia*

Fig. 1 thể hiện thân nhiệt sau khi thử thách

Fig. 2 thể hiện mức tăng cân trung bình tính theo ngày (average daily weight gain - ADWG) sau khi thử thách

Fig. 3 thể hiện huyết thanh học virus PRRS sau khi thử thách

Fig. 4 thể hiện huyết thanh học *Lawsonia* sau khi thử thách

Fig. 5 thể hiện virus PRRS trong máu sau khi thử thách

Ví dụ 2 mô tả nghiên cứu thứ hai về vaccin hỗn hợp virus PRRS và *Lawsonia*.

Ví dụ 1

Thiết kế thử nghiệm

Lợn nái con (23 con) sinh ra từ năm con lợn nái được sử dụng trong thử nghiệm này. Khi lợn con được khoảng hai tuần tuổi thì chúng được chủng ngừa như sau:

- Nhóm thứ nhất (nhóm 1, gồm 8 con) được chủng ngừa (IM) bằng vaccin Porcilis® PRRS được làm khô lạnh (có sẵn từ MSD Animal Health, Boxmeer, The Netherlands) được hòa tan bằng cách sử dụng Diluvac Forte® (MSD Animal Health). Liều đơn chứa lượng đã tính toán gồm 4 log₁₀ TCID₅₀ virus trong 2 ml (liều tiêm) và được đưa vào bên phải của cổ.
- Nhóm thứ hai (nhóm 2, gồm 9 con) được chủng ngừa bằng cùng loại vaccin PRRS được hòa tan trong vaccin *Lawsonia intracellularis* dùng ngay (xem WO 2009/127684, ví dụ 2 đối với các kháng nguyên: tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt, trong thử nghiệm này được tạo chế phẩm trong nhũ tương dầu trong nước, chứa 12,5% thể tích/thể tích (= thể tích dầu trên tổng thể tích vaccin) dầu khoáng Marcol® 52 (ExxonMobil), 0,75% trọng lượng/thể tích vitamin E axetat và 0,80% Polysorbate 80 (Tween 80; Sigma Aldrich) và nước để tiêm). Các vaccin được trộn ở nhiệt độ trong phòng và để đến 30 phút trước khi dùng. Liều đơn chứa lượng đã tính toán gồm 4 log₁₀ TCID₅₀ virus và 2x10⁷ tế bào vi khuẩn trong 2 ml (liều tiêm) và được đưa vào bên phải của

cổ.

- Các con lợn con ở nhóm thứ ba (nhóm 3, gồm 6 con) không được chủng ngừa nhưng được dùng làm đối chứng không thử thách vacxin. Mức độ lây nhiễm thử thách được kiểm tra 4 tuần sau khi chủng ngừa sử dụng virus thử thách PRRS còn tính độc theo đường mũi.

Sau khi chủng ngừa và thử thách, quan sát các dấu hiệu lâm sàng hằng ngày của tất cả lợn con. Đo thân nhiệt một ngày trước và vào ngày gây nhiễm và hằng ngày sau đó trong mười ngày. Cân nặng được xác định vào ngày trước khi thử thách, mười ngày sau khi thử thách và một ngày trước khi kết thúc thử nghiệm (ngày 27 sau khi thử thách). Thu các mẫu máu ở thời điểm thử thách và ba, năm, bảy, mười, 14, 21 và 28 ngày sau đó.

Quy trình thử nghiệm

Xét nghiệm thú y

Vào ngày trước khi chủng, lợn con được khám sức khỏe tổng quát.

Quan sát các dấu hiệu lâm sàng

Tất cả lợn được quan sát dấu hiệu lâm sàng hằng ngày tính từ ngày thu nhận. Tiến hành ghi lại các phản ứng toàn thân có thể xuất hiện ở từng cá thể bắt đầu từ ngày thử thách như không ngon miệng, miễn cưỡng vận động, xu hướng muốn nằm nghỉ, bơ phờ hoặc buồn ngủ, run rẩy, lông dựng đứng và có thể phù nề, đặc biệt là quanh mắt, nôn và tiêu chảy hoặc hô hấp nhanh và thở bằng bụng.

Đo thân nhiệt

Thân nhiệt của tất cả động vật được đo một ngày trước ngày thử thách và vào ngày thử thách và hằng ngày sau đó trong 10 ngày (cùng thời điểm trong ngày).

Đo cân nặng

Cân nặng của lợn con được đo vào ngày trước khi thử thách, 10 và 27 ngày sau khi thử thách.

Lấy mẫu máu

Việc lấy mẫu máu của tất cả lợn nái được tiến hành vào ngày trước khi chủng ngừa để xác nhận tình trạng âm tính. Vào thời điểm thử thách và ba, năm, bảy, mười, 14, 21 và 28 ngày sau đó, tiến hành lấy các mẫu máu từ các con lợn này. Các mẫu huyết thanh được xét nghiệm về khả năng có mặt của virus PRRS và khả năng có mặt của kháng thể đặc hiệu PRRSV và kháng thể đặc hiệu *Lawsonia*.

*Kết quả**Dấu hiệu lâm sàng*

Không quan sát thấy phản ứng lâm sàng nào sau khi chủng ngừa hoặc sau khi thử thách trong suốt thời gian thử nghiệm. Trừ khi trong thực tế dầu khoáng là tá dược gây khó chịu, đặc biệt là cho lợn, mà có thể dẫn đến các phản ứng phụ nghiêm trọng cục bộ, nhưng dường như việc sử dụng tá dược này vẫn an toàn đối với vaccin tổng hợp mới. Đối với các tá dược bất kỳ có tính dịu nhẹ hơn, thì độ an toàn được hiểu là không tạo ra vấn đề bất kỳ.

Thân nhiệt

Thân nhiệt trung bình trước khi thử thách đo được một ngày trước ngày thử thách và vào ngày thử thách được tính toán cho mỗi nhóm. Fig. 1 thể hiện mức tăng thân nhiệt trung bình cho đến ngày 10 pc (post challenge - sau khi thử thách) so với thân nhiệt trung bình trước khi thử thách. Vào ngày 2 pc, các con lợn con trong nhóm đối chứng không được chủng ngừa có thân nhiệt trung bình chỉ tăng 1°C. Vào tất cả thời điểm khác sau khi thử thách, không đo được sự tăng nhiệt độ ở cả nhóm lợn con được chủng ngừa và nhóm lợn con không được chủng ngừa.

Cân nặng và mức tăng cân

Khi bắt đầu thử nghiệm, lợn con được chia ngẫu nhiên vào các nhóm, không tính theo trọng lượng ban đầu và giống đực giống cái. Như có thể thấy trên Fig. 2, vaccin hỗn hợp dùng cho nhóm 2 có xu hướng tạo ra ADWG (average daily weight gain - tăng trọng lượng trung bình hằng ngày) giống như vaccin PRRSV đơn, cao hơn nhóm đối chứng.

Huyết thanh học PRRSV

Chỉ các con lợn được nhận vacxin PRRS dương tính tại thời điểm thử thách. Như có thể thấy trên Fig. 3 (các kết quả được thể hiện dưới dạng tỷ lệ “mẫu so với dương tính hoặc S/P”, sử dụng IDEXX PRRS X3 ELISA), hiệu giá kháng PRRS dường như không bị ảnh hưởng xấu bởi các kháng nguyên Lawsonia. Ngược lại, dường như có tác dụng tích cực ngoài mong đợi đối với hiệu giá kháng PRRS vì ở mỗi thời điểm độ chuẩn PRRS có giá trị cao hơn ở động vật được tiêm vacxin hỗn hợp. Nghĩa là, các kháng nguyên Lawsonia vì một số nguyên nhân nào đó chưa được biết đến, tăng cường phản ứng miễn dịch chống lại virus PRRS sống.

Huyết thanh học Lawsonia intracellularis

Fig. 4 thể hiện kết quả phân tích huyết thanh học Lawsonia. Như có thể được thấy, động vật ở nhóm 1 cho kết quả âm tính trong suốt thử nghiệm. Ở nhóm 2, 80-90% số động vật có mức chuyển hóa huyết thanh tốt, so với mức chuyển hóa tương ứng với động vật được bảo vệ khi thử thách bằng Lawsonia độc hại.

Virut PRRSV trong máu sau khi thử thách

Thông thường như đã biết, lượng virus trong máu là tiêu chí chính thể hiện tác dụng bảo vệ chống lại sự lây nhiễm virus PRRS, và bệnh lâm sàng do virus này gây ra. Các kết quả được thể hiện trên Fig. 5. Cả nhóm 1 và 2 đều có lượng virus trong máu giảm ở mức cao và tương đương nhau.

Ví dụ 2

Thiết kế thử nghiệm

Nghiên cứu này được tiến hành để xác nhận rằng vacxin hỗn hợp theo sáng chế không phụ thuộc vào loại tá dược và chủng PRRS sống được dùng. Do đó, các tá dược thay thế như Diluvac Forte (có thể thu được từ MDS Animal Health, Boxmeer, The Netherlands) và Carbopol (có thể thu được ở dạng Carbopol 974P của Lubrizol, Cleveland, Ohio, USA) được sử dụng. Chủng PRRSv thay thế là chủng typ 2 (thay cho chủng typ 1 được sử dụng ở ví dụ 1) có mặt trong vacxin thương mại Prime Pac PRRS (có thể thu được từ Merck Animal Health, Millsboro,

Delaware, USA).

Thế hệ con của một số lợn nái được sử dụng để phân chia 15 con lợn con thành 3 nhóm điều trị, mỗi nhóm gồm năm con lợn con. Ở khoảng 1 tuần tuổi, lợn con của các nhóm 1 và 2 được chủng ngừa vaccin Lawsonia đã được bất hoạt được làm khô lạnh (các kháng nguyên giống như được sử dụng trong ví dụ 1, nhưng giờ được làm khô lạnh và do đó kết hợp với chất ổn định làm khô lạnh) được hoàn nguyên trong Diluvac Forte (DF) hoặc Carbopol (0,8% trọng lượng/thể tích) như được liệt kê ở bảng 1 dưới đây. Vaccin được dùng trong cơ (intramuscular - IM) ở phía cổ bên trái. Ở khoảng 5 tuần tuổi, lợn con được tiêm (lại) hai chủng PRRSV sống khác nhau và các kháng nguyên Lawsonia, được kết hợp trong một vaccin bằng cách hoàn nguyên các kháng nguyên trong DF hoặc Carbopol (0,8% trọng lượng/thể tích). Vaccin PRRSV Typ 2 Prime Pac PRRS được hòa tan chứa lượng $10^{4,5}$ TCID₅₀ virus trong 2 ml và vaccin PRRSV Typ 1 Porcilis PRRS được hòa tan chứa lượng $10^{4,0}$ TCID₅₀ virus trong 2 ml. Đối với lần chủng ngừa thứ hai, các vaccin được dùng trong cơ (IM) ở phía cổ bên phải. Lợn con thuộc nhóm 3 không được chủng ngừa và được dùng làm đối chứng không được chủng ngừa.

Bảng 1: Phác đồ chủng ngừa

Nhóm	Chủng lần thứ nhất	Chủng lần thứ hai
1	Lawsonia, được làm khô lạnh được hoàn nguyên trong DF, 2ml	Vaccin hỗn hợp của Lawsonia, được làm khô lạnh và PRRSV sống typ 2 trong DF, 2 ml
2	Lawsonia, được làm khô lạnh được hoàn nguyên trong Carbopol, 2 ml	Vaccin hỗn hợp của Lawsonia, được làm khô lạnh và PRRSV sống typ 1 trong carbopol, 2 ml
3	-	-

Sau khi chủng ngừa lần thứ nhất, quan sát các dấu hiệu lâm sàng của lợn con hằng ngày. Lấy các mẫu máu của tất cả lợn con trước khi chủng ngừa lần thứ nhất,

trước khi chủng ngừa lần thứ hai, và ở thời điểm hai, bốn và sáu tuần sau khi chủng ngừa lần thứ hai. Kiểm tra các mẫu huyết thanh đối với các kháng thể chống lại virus PRRS và *Lawsonia intracellularis*.

Kết quả

Không quan sát thấy phản ứng lâm sàng nào trong suốt thời gian thử nghiệm. Tất cả động vật là âm tính đối với các kháng thể chống lại *Lawsonia* và PRRS vào ngày chủng ngừa lần thứ hai. Sáu tuần sau khi chủng ngừa lần thứ hai, tất cả động vật, ngoại trừ đối chứng, là dương tính đối với các kháng thể đặc hiệu *Lawsonia* và PRRSv. Điều này chứng minh rằng vacxin hỗn hợp là an toàn và dẫn đến hiện tượng miễn dịch chủ động chống lại *Lawsonia intracellularis* và virus PRRS.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vacxin chứa hỗn hợp tá dược, virus PRRS sống đã được làm giảm độc lực và kháng nguyên *Lawsonia intracellularis* đã được làm bất hoạt, trong đó kháng nguyên *Lawsonia intracellularis* đã được làm bất hoạt chứa vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt.
2. Vacxin chứa hỗn hợp tá dược, virus PRRS sống đã được làm giảm độc lực và kháng nguyên *Lawsonia intracellularis* đã được làm bất hoạt để sử dụng trong việc bảo vệ lợn khỏi bị lây nhiễm virus PRRS và vi khuẩn *Lawsonia intracellularis*, trong đó kháng nguyên *Lawsonia intracellularis* đã được làm bất hoạt chứa vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt.
3. Vacxin chứa hỗn hợp tá dược, virus PRRS sống đã được làm giảm độc lực và kháng nguyên *Lawsonia intracellularis* đã được làm bất hoạt để sử dụng trong việc bảo vệ lợn chống lại bệnh lâm sàng do lây nhiễm virus PRRS và vi khuẩn *Lawsonia intracellularis*, trong đó kháng nguyên *Lawsonia intracellularis* đã được làm bất hoạt chứa vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt.
4. Vacxin theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, tá dược này chứa dầu khoáng.
5. Vacxin để sử dụng theo điểm 2 hoặc 3, khác biệt ở chỗ, tá dược này chứa dầu khoáng.
6. Vacxin theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, vacxin này chứa kháng nguyên *Lawsonia intracellularis* tương ứng với 1×10^7 vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* trong mỗi liều.
7. Vacxin để sử dụng theo điểm 2 hoặc 3, khác biệt ở chỗ, vacxin này chứa kháng nguyên *Lawsonia intracellularis* tương ứng với 1×10^7 vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* trong mỗi liều.
8. Vacxin theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, vacxin này chứa $4,0 \log_{10}$ TCID₅₀ virus PRRS đã được làm bất hoạt trong mỗi liều.

9. Vacxin để sử dụng theo điểm 2 hoặc 3, khác biệt ở chỗ, vacxin này chứa 4,0 log₁₀ TCID₅₀ virus PRRS đã được làm bất hoạt trong mỗi liều.

Fig.1

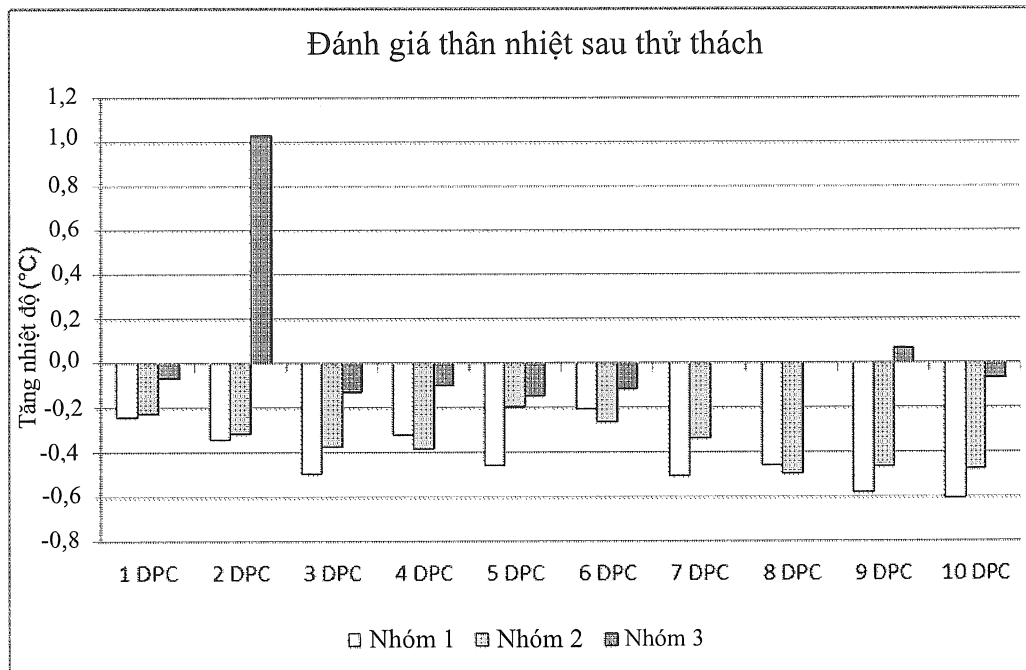


Fig. 2

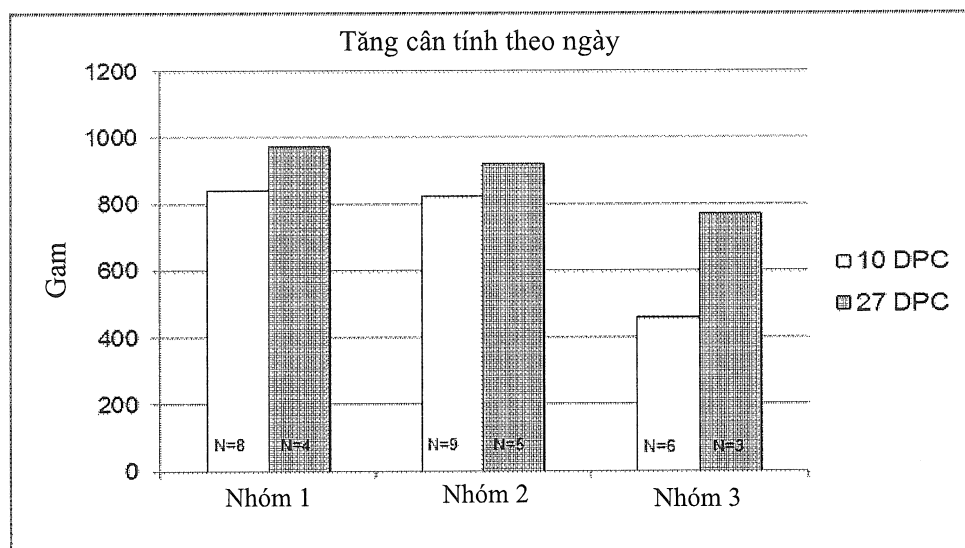


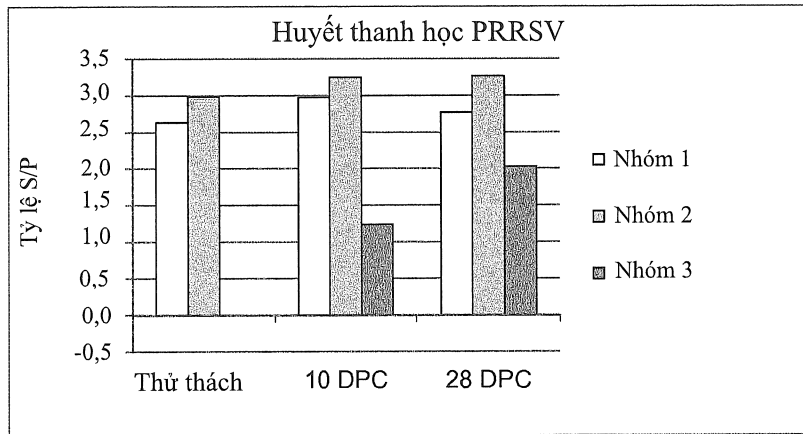
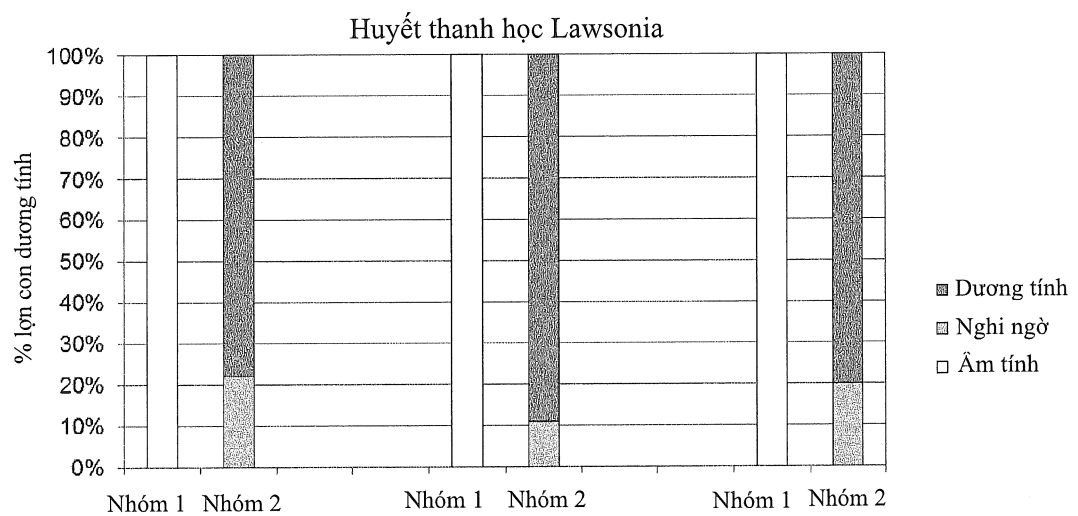
Fig. 3**Fig. 4**

Fig. 5

