



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

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

(11)



1-0030404

(51)⁷ A61K 39/02; C12R 1/35; C12N 1/20; (13) B
A61K 39/00

(21) 1-2015-02130

(22) 20/12/2013

(86) PCT/US2013/076803 20/12/2013

(87) WO2014/105671 03/07/2014

(30) 61/747,026 28/12/2002 US

(45) 25/12/2021 405

(43) 26/10/2015 331A

(73) BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH (DE)

Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim am Rhein, Germany

(72) JORDAN, Dianna M. Murphy (US); MARTINSON, Brian Thomas (US);

MUEHLENTHALER, Christine Margaret (US); NEUBAUER, Axel (DE); IYER, Arun V. (IN).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) CHẾ PHẨM GÂY MIỄN DỊCH CHỨA BACTERIN

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch chứa: a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis* và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; và b) chất mang được dùng. Hơn nữa, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch chứa a) một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae*; và b) một hoặc nhiều thành phần của hệ tế bào nhân chuẩn. Hơn nữa, sáng chế cũng đề xuất chế phẩm gây miễn dịch thu được bằng phương pháp bao gồm các bước: a) nuôi cấy vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae* trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh; b) thu nhận kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma; và c) bổ sung chất mang được dùng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch chứa kháng nguyên mycoplasma. Cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch chứa: a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis* và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; và b) chất mang được dụng. Hơn nữa, sáng chế còn đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch chứa a) một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae*; và b) một hoặc nhiều thành phần của hệ tế bào nhân chuẩn. Hơn nữa, sáng chế cũng đề xuất chế phẩm gây miễn dịch thu được bằng phương pháp bao gồm các bước: a) nuôi cấy vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae* trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh; b) thu nhận kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma; và c) bổ sung chất mang được dụng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi khuẩn thuộc chi *Mycoplasma* thuộc họ *Mollicutes* và đại diện nhóm sinh vật mà có nguồn gốc từ dòng Firmicutes. *Mollicutes* là sinh vật tự sao chép nhỏ nhất, mà khác về mặt cấu trúc với vi khuẩn nhân thực khác ở chỗ chúng thiếu vách tế bào. Bề mặt của màng đơn của chúng được cho là bề mặt chung then chốt trong việc làm trung gian sự thích ứng và sự sống trong trường hợp vật chủ có khả năng miễn dịch, phức tạp. Hơn nữa, *Mollicutes* có hệ gen nhỏ và số lượng con đường chuyển hoá hạn chế. Do đó, các thành viên thuộc chi *Mycoplasma* cũng đã được mô tả là “sinh vật tự sao chép tối thiểu”. Tuy nhiên, mặc dù có tính đơn giản rõ ràng, số lượng lớn vi khuẩn mycoplasma là mầm bệnh của người và nhiều loại động vật. Trái với vi khuẩn gây bệnh khác, ở đó tính độc hại chủ yếu được xác định theo độc tố, invasin và huỷ tế bào tố, vi khuẩn mycoplasma gây bệnh dường như không có nhân tố độc hại cơ bản thông thường này (Chambaud, I. et al, 2001, *Nucleic Acids Res.* 29: 2145-2153, Fraser et al, 1995, *Science* 270: 397-403). Hiện nay, hiểu biết về các cơ chế phân tử và các tác

quan mà cho phép mycoplasma gây bệnh gây ra tổn hại, chứng viêm và bệnh cho tế bào vật chủ vẫn còn rất ít.

Vi khuẩn mycoplasma gây bệnh chủ yếu gây ra bệnh viêm phổi không điển hình, bệnh lây nhiễm sinh dục niệu và chứng viêm khớp ở người và ở động vật (Blanchard, A., and G. F. Browning (eds.). 2005. *Mycoplasmas: Molecular biology, pathogenicity and strategies for control*. Horizon Bioscience, Wymondham U.K.; Kobisch M. and Friis N.F. 1996, *Swine mycoplasmoses*, Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epiz. 15, 1569-1605). Các tác giả sáng chế đã biết được rằng sự hoạt hoá lại hoặc sự làm trầm trọng các triệu chứng lặp lại và chuyển theo cách từ từ thành bệnh mạn tính và do đó cùng với sự chẩn đoán sớm và điều trị sớm, việc ngăn ngừa hoặc điều trị sự trầm trọng hoặc sự hoạt hoá lại là quan trọng. *M. hyopneumoniae* là tác nhân gây bệnh của bệnh viêm phổi ở động vật. Ở lợn, nó là một trong số các bệnh phổ biến nhất và quan trọng nhất đối với kinh tế do sự tăng trọng giảm và hiệu quả chăn nuôi kém. Bệnh này gây ra các thương tổn ở phổi, ho mạn tính, bộ lông xỉn, sự sinh trưởng chậm và vẻ bề ngoài chậm phát triển kéo dài vài tuần. Các thương tổn ở phổi, cụ thể là ở đỉnh bụng và thùy tim, được đặc trưng bởi sự tăng sản của tế bào biểu mô và sự kết tụ quanh mạch và quanh phế quản gia tăng của tế bào đơn nhân. *M. hyorhinis*, mycoplasma phổ biến khác của đường hô hấp của lợn, có thể gây ra chứng đa viêm thanh mạc và chứng viêm khớp ở lợn. Thông thường, *M. hyosynoviae* được định vị ở amidan và có thể gây ra bệnh viêm khớp, dẫn đến các tổn hại về kinh tế. *M. hyosynoviae* được phân lập từ khớp và các mẫu họng/amidan và có thể cảm ứng các kháng thể trong máu và dịch khớp. *M. bovis* được cho là một trong số các vi khuẩn gây bệnh nhiều hơn của Mycoplasma và gây ra các tổn hạn kinh tế đáng kể trên toàn thế giới. Vi khuẩn mycoplasma gây ra dấu hiệu lâm sàng trầm trọng ở gia súc thuộc tất cả các lứa tuổi. *M. bovis* là mầm bệnh Mycoplasma thường xuyên nhất được phát hiện gây ra bệnh viêm phổi, viêm vú và viêm khớp ở gia súc và vai trò của nó đối với nguyên nhân gây bệnh có liên quan đến bệnh viêm tai, viêm giác kết mạc, viêm màng hoạt dịch và rối loạn sinh sản ở bò cái và bò đực.

Bởi vì mycoplasma thiếu vách tế bào, nên chúng không bị tác động bởi nhiều thuốc kháng sinh thông thường như penixilin hoặc thuốc kháng sinh beta-lactam khác mà tạo đích tổng hợp vách tế bào. Các chất điều trị đối với sự lây nhiễm mycoplasma

mà có ứng dụng trong thực tế là một số thuốc kháng sinh như thuốc kháng sinh được tạo thành từ phân tử vòng lớn hoặc được tạo thành từ quinolon mới hoặc được tạo thành từ tetracyclin, nhưng các thuốc kháng sinh này có tác dụng hết sức bất lợi như sự xuất hiện của các chủng kháng thuốc, mà dẫn đến sự lây nhiễm mycoplasma trở nên trầm trọng đồng thời không đạt được các tác dụng điều trị thích đáng và trở thành nguyên nhân chuyển thành bệnh mạn tính.

Hơn nữa, việc dùng vaccin là phương pháp hữu hiệu để phòng trừ sự lây nhiễm mycoplasma. Hiệu quả của vaccin kháng lại vài vi khuẩn mycoplasma đã được mô tả trước đây. Công bố đơn quốc tế số WO2009058833 (A2) mô tả chủng vi khuẩn *Mycoplasma bovis* độc hại được giảm độc lực dùng để chủng ngừa. Hơn nữa, công bố đơn quốc tế số WO2009126356 (A2) mô tả chế phẩm gây miễn dịch kháng *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tuy nhiên, cần có các vaccin tổ hợp hữu hiệu mà tạo ra sự bảo vệ chống lại nhiều mầm bệnh. Rất mong muốn có được các vaccin tổ hợp như vậy để làm giảm thiểu số lần gây miễn dịch được đòi hỏi để có được sự bảo vệ chống lại nhiều mầm bệnh, để làm giảm chi phí sử dụng thuốc và để làm tăng sự chấp nhận và tỷ lệ tiêm chủng. Tuy nhiên, vấn đề về sự can thiệp kháng nguyên làm phức tạp thêm cho sự phát triển của các vaccin nhiều thành phần. Cụ thể là, sự can thiệp kháng nguyên dùng để chỉ tình trạng mà khi dùng nhiều loại kháng nguyên thường dẫn đến đáp ứng với một số kháng nguyên liên quan bị giảm so với đáp ứng miễn dịch được quan sát khi các kháng nguyên này được dùng theo cách riêng rẽ.

Do đó, có nhu cầu đối với các vaccin tổ hợp hữu hiệu mà tạo ra sự bảo vệ kháng lại nhiều mầm bệnh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế giải quyết các vấn đề đang tồn tại trong kỹ thuật hiện nay và tạo ra tiến bộ khác biệt so với kỹ thuật hiện nay. Nói chung, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra chế phẩm gây miễn dịch chứa: a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae* và một hoặc nhiều kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyopneumoniae* và *M. hyorhinis*, và các tổ hợp của chúng; và b) chất mang được dùng.

Hơn nữa, sáng chế còn đề xuất chế phẩm gây miễn dịch chứa: a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis* và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; và b) chất mang được dụng.

Có lợi là, các dữ liệu thử nghiệm được đề xuất bởi sáng chế bộc lộ hiệu quả của chế phẩm gây miễn dịch được đề xuất trong bản mô tả này và không có sự can thiệp kháng nguyên. Cụ thể là, sau khi dùng chế phẩm gây miễn dịch bao gồm kháng nguyên của *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae*, nhận thấy không có sự can thiệp kháng nguyên đối với hiệu quả của *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae*.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch chứa a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis*; một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; b) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*; và c) chất mang được dụng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi các khía cạnh của sáng chế được mô tả, cần phải lưu ý rằng như được sử dụng trong bản mô tả này và trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, các giới từ không xác định và xác định số ít "một" bao gồm cả các giới từ số nhiều, trừ khi có chỉ định một cách rõ ràng khác. Do đó, ví dụ việc tham chiếu đến “một kháng nguyên” bao gồm nhiều kháng nguyên, việc tham chiếu đến “tế bào” là tham chiếu đến một hoặc nhiều tế bào và các dạng tương đương của nó đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết đến, và v.v.. Trừ khi có chỉ định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa như được hiểu theo cách thông thường bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế thuộc về. Mặc dù các phương pháp và vật liệu bất kỳ tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và vật liệu được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong thực hành hoặc thử nghiệm sáng chế, các phương pháp, thiết bị và vật liệu được ưu tiên giờ đây sẽ được mô tả. Tất cả các tài liệu công bố được kể đến trong bản mô tả này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn nhằm mục đích mô tả và bộc lộ các dòng tế bào, vector và các phương pháp luận như được báo cáo trong các tài liệu công bố này mà có thể được sử dụng theo sáng chế. Không có nội dung bất kỳ nào trong bản

mô tả này được hiểu như là sự thừa nhận rằng sáng chế không được quyền để lùi ngày tháng bộc lộ này do sáng chế ưu tiên.

Thuật ngữ "chế phẩm gây miễn dịch" dùng để chỉ chế phẩm mà bao gồm ít nhất một kháng nguyên, gây ra đáp ứng miễn dịch ở vật chủ mà trong đó chế phẩm gây miễn dịch được dùng. Đáp ứng miễn dịch này có thể là đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và/hoặc kháng thể với chế phẩm gây miễn dịch của sáng chế. Vật chủ cũng được mô tả như "đối tượng". Tốt hơn là, bất kỳ trong số các vật chủ hoặc đối tượng được mô tả hoặc được kể đến trong bản mô tả này là động vật.

Thông thường, thuật ngữ "đáp ứng miễn dịch" bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở một hoặc nhiều trong số các tác dụng sau đây: tạo ra hoặc hoạt hoá kháng thể, tế bào B, tế bào T hỗ trợ, tế bào T ngăn chặn và/hoặc tế bào T độc tế bào và/hoặc tế bào T gama-delta, hướng một cách đặc hiệu đến kháng nguyên hoặc các kháng nguyên được bao gồm trong chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế. Tốt hơn là, vật chủ sẽ thể hiện đáp ứng miễn dịch bảo vệ hoặc đáp ứng điều trị.

Thuật ngữ "đáp ứng miễn dịch bảo vệ" được thể hiện bởi việc giảm hoặc không có mặt các dấu hiệu lâm sàng thường được biểu hiện bởi vật chủ bị lây nhiễm, thời gian phục hồi nhanh chóng hơn và/hoặc khoảng thời gian lây nhiễm giảm hoặc độ chuẩn mầm bệnh trong mô hoặc dịch thể hoặc dịch bài tiết của vật chủ bị lây nhiễm là giảm.

Trong trường hợp trong đó vật chủ thể hiện đáp ứng miễn dịch bảo vệ như khả năng kháng sự lây nhiễm mới sẽ được tăng cường và/hoặc mức độ trầm trọng về mặt lâm sàng của bệnh giảm, chế phẩm gây miễn dịch được mô tả như "vacxin".

Thuật ngữ "sự lây nhiễm" hoặc "bị lây nhiễm" dùng để chỉ sự lây nhiễm của đối tượng bởi mầm bệnh, nghĩa là *M. hyorhinis* hoặc *M. hyorhinis* và *M. hyosynoviae* hoặc *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae*.

Thuật ngữ "đáp ứng điều trị" được thể hiện bởi việc giảm và/hoặc điều trị khỏi các dấu hiệu lâm sàng thường được biểu hiện bởi vật chủ khi vật chủ này đã bị lây nhiễm với mầm bệnh (ví dụ mycoplasma) mà thường gây ra dấu hiệu hoặc các dấu hiệu lâm sàng này.

Thuật ngữ "mycoplasma" đã được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. "Mycoplasma" dùng để chỉ vi khuẩn, ví dụ như được mô tả trong ấn phẩm: Blanchard, A., and G. F. Browning (eds.). 2005. *Mycoplasmas: Molecular biology, pathogenicity and strategies for control*. Horizon Bioscience, Wymondham U.K.; Kobisch M. and Friis N.F. 1996, *Swine mycoplasmoses*, Rev. Sci.Tech. Off. Int. Epiz. 15, 1569-1605. Vi khuẩn có thể được phân loại dựa vào các đặc tính hoá sinh và vi sinh vật của chúng cũng như hình thái học của chúng. Các tiêu chí phân loại này đã được biết đến trong lĩnh vực này. Nói chung, sự lây nhiễm mycoplasma được kết hợp với các dấu hiệu lâm sàng được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "mycoplasma" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ *M. hyorhinis* hoặc *M. hyorhinis* và *M. hyosynoviae* hoặc *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae*. Trình tự hệ gen hoàn chỉnh của *M. hyorhinis* được đưa ra theo cách ví dụ bởi Liu, W. et al., *J. Bacteriol.* 2010, vol. 192 (21), 5844-45 doi: 10.1128/JB.00946-10. Epub 2010 Aug 27 hoặc bởi Calcutt MJ et al., 2012, *J. Bacteriol.* Vol. 194 (7), 1848 doi: 10.1128/JB.00033-12. Thẻ phân lập của *M. hyosynoviae* được lưu trữ mẫu ở Cơ quan sưu tập giống và mô của Hoa Kỳ với số truy cập ATCC 25591 hoặc ATCC 27095. Thẻ phân lập của *Mycoplasma hyopneumoniae* được lưu trữ mẫu ở Cơ quan sưu tập giống và mô của Hoa Kỳ với số truy cập ATCC 25095, ATCC 25617, và ATCC 25934. ADN hệ gen của *Mycoplasma hyopneumoniae* chủng J được lưu trữ ở bộ sưu tập giống và mô của Hoa Kỳ với số truy cập ATCC 25934D.

Thuật ngữ "kháng nguyên" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thành phần mà gây ra đáp ứng miễn dịch ở vật chủ với chế phẩm gây miễn dịch hoặc vaccin quan tâm bao gồm kháng nguyên hoặc thành phần có hoạt tính về mặt miễn dịch của nó. Kháng nguyên hoặc thành phần có hoạt tính về mặt miễn dịch có thể là vi sinh vật nguyên vẹn (ở dạng bất hoạt hoặc sống được cải biến) hoặc mảnh bất kỳ hoặc phân đoạn của nó, mà nếu được dùng cho vật chủ, có thể gây ra đáp ứng miễn dịch ở vật chủ. Kháng nguyên có thể là hoặc có thể bao gồm sinh vật sống hoàn chỉnh ở dạng ban đầu của nó hoặc như sinh vật được giảm độc lực trong vaccin sống được cải biến (MLV). Kháng nguyên còn có thể bao gồm các yếu tố thích hợp của các sinh vật này (vaccin có cấu trúc dưới đơn vị) nhờ đó các

yếu tố này được tạo ra bằng cách phá huỷ sinh vật nguyên vẹn hoặc môi trường nuôi cấy sinh trưởng của các sinh vật này và các bước tinh chế tiếp theo thu được trong (các) cấu trúc mong muốn, hoặc bằng các quy trình tổng hợp được cảm ứng bằng việc thao tác thích hợp hệ thích hợp tương tự, nhưng không hạn chế ở vi khuẩn, côn trùng, động vật có vú hoặc các loài khác và tùy ý bằng việc phân lập tiếp theo và quy trình tinh chế hoặc bằng việc cảm ứng các quy trình tổng hợp này ở động vật cần dùng vaccin bằng việc hợp nhất trực tiếp vật liệu di truyền bằng cách sử dụng được phẩm thích hợp (dùng vaccin polynucleotit). Kháng nguyên có thể bao gồm sinh vật nguyên vẹn được bất hoạt bằng các phương pháp thích hợp trong vaccin chết (killed vaccine - KV). Nếu sinh vật là vi khuẩn, thì vaccin chết được gọi là bacterin.

Thuật ngữ "chất mang được dụng" bao gồm bất kỳ hoặc tất cả dung môi, môi trường phân tán, chất bao, chất làm ổn định, chất pha loãng, chất bảo quản, chất chống vi khuẩn và chống nấm, chất đẳng trương, chất làm chậm sự hấp phụ, tá dược, chất kích thích miễn dịch, và các tổ hợp của chúng.

Theo một khía cạnh của sáng chế, một hoặc nhiều kháng nguyên là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Một hoặc nhiều kháng nguyên bất hoạt nguyên vẹn có thể là bacterin bất hoạt nguyên vẹn được chọn từ nhóm bao gồm: *M. hyorhinis*; *M. hyosynoviae*; *M. hyopneumoniae*; *M. hyorhinis* và *M. hyosynoviae*; và *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae*.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch bao gồm a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis*; và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; và b) chất mang được dụng, trong đó kháng nguyên *M. hyorhinis*; *M. hyosynoviae*; hoặc *M. hyorhinis* và *M. hyosynoviae* là bacterin bất hoạt nguyên vẹn.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch bao gồm a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis*; một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae* và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae* b) chất mang được dụng, trong đó kháng nguyên *M. hyorhinis*; *M. hyosynoviae*; và/hoặc *M. hyopneumoniae* là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Khía cạnh này của sáng chế bao gồm rằng kháng nguyên *M. hyorhinis* là bacterin bất hoạt nguyên vẹn hoặc kháng nguyên

M. hyopneumoniae là bacterin bất hoạt nguyên vẹn hoặc kháng nguyên *M. hyosynoviae* là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Tuy nhiên, khía cạnh này của sáng chế cũng bao gồm rằng tất cả kháng nguyên trong chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế là bacterin bất hoạt nguyên vẹn, nghĩa là kháng nguyên *M. hyorhinis* và *M. hyosynoviae* hoặc *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* và kháng nguyên *M. hyosynoviae* là bacterin bất hoạt nguyên vẹn.

Phương pháp bất hoạt thông thường bất kỳ có thể được sử dụng đối với mục đích của sáng chế. Do đó, sự bất hoạt có thể được thực hiện bằng việc xử lý hoá học và/hoặc vật lý mà đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các phương pháp bất hoạt được ưu tiên bao gồm việc bổ sung etylenimin nhị phân mạch vòng (BEI) bao gồm việc bổ sung dung dịch chứa 2-bromoetylenamin hydrobromit (BEA), mà đã được đóng vòng thành etylenimin mạch vòng (BEI). Các chất bất hoạt hoá học khác được ưu tiên bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở Triton X-100, natri deoxycholat, Cetyltrimetylamonium bromua, β -Propiolacton, Thimerosal, Phenol và Formaldehyt (Formalin). Tuy nhiên, sự bất hoạt cũng có thể bao gồm bước làm trung hoà. Chất làm trung hoà được ưu tiên bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở natri thiosulfat, natri bisulfit và tương tự.

Các điều kiện bất hoạt formalin được ưu tiên bao gồm nồng độ formalin nằm trong khoảng từ 0,02% (thể tích) đến 2,0% (thể tích), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,1% (thể tích) đến 1,0% (thể tích), vẫn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,15% (thể tích) đến 0,8% (thể tích), thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,16% (thể tích) đến 0,6% (thể tích), và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,2% (thể tích) đến 0,4% (thể tích). Thời gian ủ phụ thuộc vào sức kháng của các loài mycoplasma. Nói chung, quy trình bất hoạt được thực hiện cho đến khi không có sự sinh trưởng mycoplasma nào có thể được phát hiện trong hệ nuôi cấy thích hợp.

Theo một khía cạnh của sáng chế, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin, tốt hơn là bằng cách sử dụng nồng độ như được mô tả trên đây. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch bao gồm a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis*; và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; và b) chất mang được dụng, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên là

bacterin bất hoạt nguyên vẹn và trong đó một hoặc nhiều bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin. Theo khía cạnh khác, chế phẩm gây miễn dịch còn bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*. Khía cạnh này của sáng chế bao gồm rằng kháng nguyên *M. hyorhinis* là bacterin bất hoạt bằng formalin hoặc kháng nguyên *M. hyopneumoniae* là bacterin bất hoạt bằng formalin hoặc kháng nguyên *M. hyosynoviae* là bacterin bất hoạt bằng formalin. Tuy nhiên, khía cạnh này của sáng chế cũng bao gồm rằng tất cả kháng nguyên mycoplasma trong chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế là bacterin bất hoạt bằng formalin, nghĩa là kháng nguyên *M. hyorhinis* và *M. hyosynoviae* hoặc kháng nguyên *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae* là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Thành phần bacterin bất hoạt của sáng chế có thể được hợp nhất vào trong liposom bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết như các kỹ thuật được mô tả trong ấn phẩm: *Nature*, 1974, 252, 252-254 hoặc *Journal of Immunology*, 1978, 120, 1109-13. Theo phương án khác của sáng chế, thành phần bacterin bất hoạt của sáng chế có thể được tiếp hợp với hợp chất sinh học thích hợp như polysacarit, peptit, protein hoặc tương tự hoặc tổ hợp của chúng.

Theo khía cạnh khác, chế phẩm gây miễn dịch được đề xuất theo đây hữu hiệu trong việc điều trị và/hoặc phòng các dấu hiệu lâm sàng do *M. hyorhinis* gây ra ở đối tượng cần điều trị và/hoặc phòng này. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch bao gồm a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis*; và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; và b) chất mang được dùng, trong đó chế phẩm gây miễn dịch hữu hiệu trong việc điều trị và/hoặc phòng các dấu hiệu lâm sàng do *M. hyorhinis* gây ra ở đối tượng cần điều trị và/hoặc phòng này. Theo khía cạnh khác, chế phẩm gây miễn dịch còn bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*. Theo khía cạnh khác, một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn của loài mycoplasma như được mô tả trên đây.

Theo khía cạnh khác, chế phẩm gây miễn dịch như được kê xuất kèm theo đây và mà cũng bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae* hữu hiệu trong việc điều trị và/hoặc phòng các dấu hiệu lâm sàng do *M. hyopneumoniae* gây ra

ở đối tượng cần điều trị và/hoặc phòng này. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch bao gồm a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis*; một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; b) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*; và c) chất mang được dụng, trong đó chế phẩm gây miễn dịch hữu hiệu trong việc điều trị và/hoặc phòng các dấu hiệu lâm sàng do *M. hyopneumoniae* gây ra ở đối tượng cần điều trị và/hoặc phòng này. Theo khía cạnh khác, chế phẩm gây miễn dịch hữu hiệu trong việc điều trị và/hoặc phòng các dấu hiệu lâm sàng do *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae* gây ra ở đối tượng cần điều trị và/hoặc phòng này. Theo khía cạnh khác, một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn của loài mycoplasma như được mô tả trên đây.

Thuật ngữ “điều trị và/hoặc phòng bệnh” dùng để chỉ việc làm giảm bớt tỷ lệ mắc phải sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể trong đàn hoặc giảm mức trầm trọng của các dấu hiệu lâm sàng do sự lây nhiễm mycoplasma gây ra hoặc kết hợp với sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể. Do đó, thuật ngữ “điều trị và/hoặc phòng bệnh” cũng dùng để chỉ việc giảm số lượng động vật trong đàn mà trở nên bị lây nhiễm với vi khuẩn mycoplasma cụ thể (= làm giảm bớt tỷ lệ mắc phải sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể) hoặc với việc giảm mức trầm trọng của dấu hiệu lâm sàng thường kết hợp với hoặc do sự lây nhiễm mycoplasma gây ra trong nhóm động vật mà là động vật đã được dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm gây miễn dịch được đề xuất trong bản mô tả này khi so với nhóm động vật mà là động vật không được dùng chế phẩm gây miễn dịch.

Thuật ngữ “điều trị và/hoặc phòng bệnh” thường bao gồm việc cho đối tượng hoặc đàn đối tượng cần điều trị/phòng bệnh này hoặc có thể có lợi từ việc điều trị/phòng bệnh này dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm gây miễn dịch của sáng chế. Thuật ngữ “điều trị” dùng để chỉ việc dùng lượng hữu hiệu của chế phẩm gây miễn dịch khi đối tượng hoặc ít nhất một số động vật của đàn đã bị lây nhiễm với mycoplasma và trong đó động vật thể hiện một số dấu hiệu lâm sàng do sự lây nhiễm mycoplasma gây ra hoặc kết hợp với sự lây nhiễm mycoplasma này. Thuật ngữ “phòng bệnh” dùng để chỉ việc dùng của đối tượng trước lây nhiễm bất kỳ của đối tượng với mycoplasma hoặc ít nhất trong đó động vật hoặc không có động vật nào trong nhóm động vật không thể hiện dấu hiệu lâm sàng bất kỳ do sự lây nhiễm mycoplasma gây ra hoặc kết hợp với sự lây nhiễm mycoplasma.

Thuật ngữ “lượng hữu hiệu” như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là, nhưng không chỉ giới hạn ở lượng kháng nguyên, mà gây ra hoặc có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch ở đối tượng. Lượng hữu hiệu này có khả năng làm giảm tỷ lệ mắc phải sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể trong đàn hoặc làm giảm mức trầm trọng của dấu hiệu lâm sàng của sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể.

Tốt hơn là, các dấu hiệu lâm sàng được giảm bớt về tỷ lệ mắc phải hoặc mức trầm trọng ít nhất 10%, tốt hơn nữa là ít nhất 20%, vẫn tốt hơn nữa là ít nhất 30%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 40%, vẫn tốt hơn nữa là ít nhất 50%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 60%, vẫn tốt hơn nữa là ít nhất 70%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 80%, vẫn tốt hơn nữa là ít nhất 90%, và tốt nhất là ít nhất 95% khi so với đối tượng mà không được điều trị hoặc được điều trị bằng chế phẩm gây miễn dịch mà sẵn có trước sáng chế nhưng sau đó bị lây nhiễm bởi vi khuẩn mycoplasma cụ thể.

Thuật ngữ “dấu hiệu lâm sàng” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ các dấu hiệu lây nhiễm của đối tượng từ vi khuẩn mycoplasma. Dấu hiệu lâm sàng của việc lây nhiễm phụ thuộc và mầm bệnh được chọn. Các ví dụ đối với dấu hiệu lâm sàng này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở suy hô hấp, viêm đa thanh mạc (như chứng viêm phúc mạc, viêm màng phổi, viêm màng ngoài tim), bệnh viêm khớp (què và khớp bị sưng), viêm tai, bộ lông bị xù xì, sốt nhẹ, suy nhược, chứng thèm ăn giảm và nhiễm trùng huyết. Tuy nhiên, các dấu hiệu lâm sàng cũng bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các dấu hiệu lâm sàng mà có thể quan sát một cách trực tiếp từ động vật sống. Các ví dụ đối với các dấu hiệu lâm sàng mà có thể quan sát một cách trực tiếp từ động vật sống bao gồm chảy nước mũi và mắt, hôn mê, ho, thở khò khè, thở mạnh, sốt cao, tăng hoặc giảm trọng lượng, mất nước, tiêu chảy, sưng khớp, què quặt, hao mòn, da xanh, sinh trưởng kém, tiêu chảy và tương tự.

Việc giảm về tỷ lệ mắc phải hoặc mức trầm trọng của các dấu hiệu lâm sàng do sự lây nhiễm mycoplasma gây ra hoặc kết hợp với sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể ở đối tượng có thể đạt được bằng việc cho đối tượng cần giảm này dùng một hoặc nhiều liều chế phẩm gây miễn dịch của sáng chế. Như được chứng minh bằng ví dụ 2 và 3, chế phẩm gây miễn dịch như được đề xuất trong bản mô tả này đã được chứng minh là hữu hiệu sau khi cho đối tượng dùng liều đơn. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề

xuất chế phẩm gây miễn dịch bao gồm a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis*; và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; và b) chất mang được dụng, trong đó chế phẩm gây miễn dịch hữu hiệu trong việc điều trị và/hoặc phòng các dấu hiệu lâm sàng do *M. hyorhinis* gây ra ở đối tượng cần điều trị và/hoặc phòng này sau khi dùng liều đơn. Liều đơn này chỉ được dùng một lần. Theo khía cạnh khác, chế phẩm gây miễn dịch còn bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*. Theo khía cạnh khác, một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn của loài mycoplasma như được mô tả trên đây.

Hơn nữa, đã được thể hiện rằng một liều chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm *M. hyopneumoniae* là cũng hữu hiệu sau khi dùng liều đơn của chế phẩm gây miễn dịch. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch bao gồm a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis*; một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; b) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*; và c) chất mang được dụng, trong đó chế phẩm gây miễn dịch hữu hiệu trong việc điều trị và/hoặc phòng các dấu hiệu lâm sàng do *M. hyopneumoniae* gây ra ở đối tượng cần điều trị và/hoặc phòng này sau khi dùng liều đơn. Liều đơn này chỉ được dùng một lần. Theo khía cạnh khác, chế phẩm gây miễn dịch hữu hiệu trong việc điều trị và/hoặc phòng các dấu hiệu lâm sàng do *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae* gây ra ở đối tượng cần điều trị và/hoặc phòng này. Theo khía cạnh khác, một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn của loài mycoplasma như được mô tả trên đây.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm gây miễn dịch được tạo ra cho việc dùng liều đơn của chế phẩm gây miễn dịch. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch bao gồm a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis*; và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; và b) chất mang được dụng, trong đó chế phẩm gây miễn dịch được tạo ra cho việc dùng liều đơn của chế phẩm gây miễn dịch. Chế phẩm gây miễn dịch cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*, trong đó chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis* và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; b) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*; và c) chất mang được dụng, được tạo ra hoặc được đề xuất cho việc dùng liều đơn.

Theo khía cạnh khác, một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma có thể là bacterin bất hoạt nguyên vẹn của loài mycoplasma như được mô tả trong bản mô tả này. Hơn nữa, chế phẩm gây miễn dịch hữu hiệu trong việc điều trị và/hoặc phòng các dấu hiệu lâm sàng do *M. hyorhinis* hoặc *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae* gây ra ở đối tượng cần điều trị và/hoặc phòng này sau khi dùng liều đơn của kháng nguyên mycoplasma, mỗi liều phụ thuộc vào nếu chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae* hoặc không. Có lợi là, các dữ liệu thử nghiệm được đề xuất bởi sáng chế bộc lộ rằng việc dùng liều đơn của chế phẩm gây miễn dịch của sáng chế kích thích một cách tin cậy và hữu hiệu sự đáp ứng miễn dịch bảo vệ. Cụ thể là, đáp ứng kháng thể có thể đo được đã được thể hiện đối với *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae*.

Như được kể đến trên đây, thuật ngữ đối tượng hoặc vật chủ như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến động vật, tốt hơn là đến động vật có vú như chuột nhắt, chuột cống, chuột lang, chuột hamster, lợn, cừu, chó, mèo, ngựa, khỉ hoặc gia súc và còn tốt hơn là đến con người.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch bao gồm a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis*; và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; và b) chất mang được dụng, trong đó chế phẩm gây miễn dịch hữu hiệu trong việc điều trị và/hoặc phòng các dấu hiệu lâm sàng do *M. hyorhinis* gây ra ở lợn. Theo khía cạnh khác, chế phẩm gây miễn dịch hữu hiệu trong việc điều trị và/hoặc phòng các dấu hiệu lâm sàng do *M. hyorhinis* gây ra ở lợn. Khi chế phẩm gây miễn dịch còn bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*, theo khía cạnh khác, nó là hữu hiệu trong việc điều trị và/hoặc phòng các dấu hiệu lâm sàng do *M. hyopneumoniae* gây ra ở lợn. Theo khía cạnh khác, chế phẩm gây miễn dịch, mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae* hữu hiệu trong việc điều trị và/hoặc phòng các dấu hiệu lâm sàng do *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae* gây ra ở lợn. Một lần nữa, một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma có thể là bacterin bất hoạt nguyên vẹn của loài mycoplasma như được mô tả trên đây.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, chế phẩm gây miễn dịch là vaccin. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch bao gồm a) một hoặc

nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis*; và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; và b) chất mang được dụng, trong đó chế phẩm gây miễn dịch là vaccin. Vaccin này cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*. Vaccin theo sáng chế, khi được dùng cho đối tượng cần dùng này, có cùng các đặc tính lợi ích như được mô tả đối với chế phẩm gây miễn dịch.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chất mang được dụng được chọn từ nhóm bao gồm dung môi, môi trường phân tán, chất phủ, chất làm ổn định, chất pha loãng, chất bảo quản, chất chống vi khuẩn và chống nấm, chất đẳng trương, chất làm chậm sự hấp phụ, tá dược, chất kích thích miễn dịch, và các tổ hợp của chúng. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch bao gồm a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis*; và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; và b) chất mang được dụng, trong đó chất mang được dụng được chọn từ nhóm bao gồm dung môi, môi trường phân tán, chất phủ, chất làm ổn định, chất pha loãng, chất bảo quản, chất chống vi khuẩn và chống nấm, chất đẳng trương, chất làm chậm sự hấp phụ, tá dược, chất kích thích miễn dịch, và các tổ hợp của chúng. Như được kể đến trên đây, vaccin cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*. Hơn nữa, một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của loài mycoplasma có thể được đề xuất như bacterin bất hoạt nguyên vẹn như được mô tả trên đây.

“Tá dược” như được sử dụng trong bản mô tả này, có thể bao gồm nhôm hydroxit và nhôm phosphat, saponin ví dụ, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), nhũ tương nước trong dầu, nhũ tương dầu trong nước, nhũ tương nước trong dầu trong nước. Nhũ tương có thể được tạo thành cụ thể là dầu parafin dạng lỏng nhẹ (European Pharmacopea type); dầu isoprenoid như squalan hoặc squalen; dầu thu được từ sự oligome hoá của alken, cụ thể là isobuten hoặc decen; este của axit hoặc của rượu chứa nhóm alkyl mạch thẳng, cụ thể hơn nữa là dầu thực vật, etyl oleat, propylen glycol di-(caprylat/caprat), glyxeryl tri-(caprylat/caprat) hoặc propylen glycol dioleat; este của axit béo mạch nhánh hoặc rượu, cụ thể là este của axit isostearic. Dầu được sử dụng trong tổ hợp với chất nhũ tương để tạo thành nhũ tương. Chất nhũ tương tốt hơn là chất hoạt động bề mặt không ion, cụ thể là este của sorbitan, manit (ví dụ,

anhydromannitololeat), glycol, polyglyxerol, propylen glycol và axit oleic, isostearic, ricinoleic hoặc hydroxystearic, mà tùy ý được etoxyl hoá và khối copolyme polyoxypropylen-polyoxyetylen, cụ thể là các sản phẩm Pluronic, đặc biệt là L121. Xem ấn phẩm: Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, pp51-94 (1995) and Todd et al., *Vaccine* 15:564-570 (1997). Ví dụ, có thể sử dụng nhũ tương SPT được mô tả ở trang 147 của ấn phẩm: "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" được xuất bản bởi M. Powell and M. Newman, Plenum Press, 1995, và nhũ tương MF59 được mô tả ở trang 183 của cùng ấn phẩm này. Các tá dược thích hợp khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, hệ tá dược RIBI (Ribi Inc.), co-polyme khối (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monophosphoryl lipid A, tá dược Avridin lipid-amin, độc tố khoang ruột không ổn định nhiệt từ *E. coli* (tái tổ hợp hoặc theo cách khác), độc tố gây bệnh dịch tả, IMS 1314 hoặc muramyl dipeptit trong số nhiều chất khác. Trong số các copolyme của anhydrit maleic và dẫn xuất alkenyl, các copolyme EMA (Monsanto), mà là các copolyme của anhydrit maleic và etylen, được bao gồm. Sự hoà tan của các polyme này trong nước dẫn đến dung dịch axit mà sẽ được làm trung hoà, tốt hơn là đến độ pH sinh lý, để thu được dung dịch tá dược mà trong đó chế phẩm gây miễn dịch, tạo miễn dịch hoặc tự bản thân vacxin được hợp nhất vào.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chất mang được dụng là tá dược được chọn từ nhóm bao gồm nhôm hydroxit, nhôm phosphat, saponin, nhũ tương nước trong dầu, nhũ tương dầu trong nước, nhũ tương nước trong dầu trong nước, polyme của axit acrylic hoặc metacrylic, copolyme anhydrit maleic và dẫn xuất alkenyl, hệ tá dược RIBI, copolyme khối, SAF-M, monophosphoryl lipid A, Avridin lipid-amin, độc tố khoang ruột không ổn định nhiệt từ *E. coli* (tái tổ hợp hoặc theo cách khác), độc tố dịch tả, IMS 1314, muramyl dipeptit, và các tổ hợp của chúng. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch bao gồm a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis*; và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; và b) chất mang được dụng, trong đó chất mang được dụng là tá dược được chọn từ nhóm bao gồm nhôm hydroxit, nhôm phosphat, saponin, nhũ tương nước trong dầu, nhũ tương dầu trong nước, nhũ tương nước trong dầu trong nước, polyme của axit acrylic

hoặc metacrylic, copolyme anhydrit maleic và dẫn xuất alkenyl, hệ tá dược RIBI, copolyme khối, SAF-M, monophosphoryl lipid A, Avridin lipid-amin, độc tố khoang ruột không ổn định nhiệt từ *E. coli* (tái tổ hợp hoặc theo cách khác), độc tố dịch tả, IMS 1314, muramyl dipeptit, và các tổ hợp của chúng. Vaccin này cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*. Hơn nữa, một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của loài mycoplasma có thể được đề xuất như bacterin bất hoạt nguyên vẹn như được mô tả trên đây.

Ví dụ khác về tá dược là hợp chất được chọn từ polyme của axit acrylic hoặc metacrylic và copolyme của anhydrit maleic và dẫn xuất alkenyl. Các hợp chất tá dược có lợi là các polyme của axit acrylic hoặc metacrylic mà được liên kết ngang, đặc biệt là với polyalkenyl ete của đường hoặc đa rượu. Các hợp chất này là đã được biết đến bởi thuật ngữ carbome (Phameuropa Vol. 8, No. 2, June 1996). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng có thể tham chiếu đến patent Mỹ số 2,909,462 mà mô tả các polyme acrylic được liên kết ngang với hợp chất được polyhydroxyl hoá có ít nhất 3 nhóm hydroxyl, tốt hơn là không nhiều hơn 8 nguyên tử hydro của ít nhất ba hydroxyl được thay thế bằng các gốc béo không no có ít nhất 2 nguyên tử cacbon. Các gốc được ưu tiên là các gốc chứa từ 2 đến 4 nguyên tử cacbon, ví dụ vinyl, allyl và các nhóm không no về mặt etylen khác. Các gốc không no có thể chứa các phần tử thế khác, như metyl. Các sản phẩm được bán dưới tên CARBOPOL®; (BF Goodrich, Ohio, USA) là thích hợp một cách đặc biệt. Chúng là các polyme của axit acrylic được liên kết ngang với polyalkenyl ete hoặc divinyl glycol hoặc được liên kết ngang với allyl sucroza hoặc với allylpentaerythritol. Trong số chúng, có thể được kể đến là CARBOPOL® 974P, 934P và 971P. Được ưu tiên nhất là việc sử dụng CARBOPOL® 971P.

Tốt hơn là, tá dược được bổ sung vào với lượng khoảng từ 100µg đến 10mg/liều. Thậm chí tốt hơn nữa là, tá dược được bổ sung vào với lượng nằm trong khoảng từ 100µg đến 10mg/ liều. Vẫn tốt hơn nữa là tá dược được bổ sung vào với lượng nằm trong khoảng từ 500µg đến 5mg/ liều. Vẫn tốt hơn nữa là tá dược được bổ sung vào với lượng nằm trong khoảng từ 750µg đến 2,5mg/ liều. Tốt nhất là, tá dược được bổ sung vào với lượng khoảng 1mg/ liều.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chất mang được dụng là nhũ tương nước trong dầu trong nước hoặc carbome. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch bao gồm a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis*; và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; và b) chất mang được dụng, trong đó chất mang được dụng là nhũ tương nước trong dầu trong nước hoặc carbome. Vaccin này cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*. Hơn nữa, kháng nguyên của loài mycoplasma có thể được đề xuất như bacterin bất hoạt nguyên vẹn như được mô tả trên đây.

Theo một khía cạnh của sáng chế, nhũ tương nước trong dầu trong nước là Montanide ISA207 VG hoặc CARBOPOL®. Montanide ISA207 VG là tá được gồm có oleic este của manitol khan trong dầu không khoáng và được thiết kế để đạt được nhũ tương vaccin nước trong dầu trong nước. Montanide ISA207 VG là đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có thể được sử dụng mà không gặp phải khó khăn hơn nữa. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch bao gồm a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis*; và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; và b) chất mang được dụng, trong đó chất mang được dụng là Montanide ISA207 VG hoặc CARBOPOL®. Như được kể đến trên đây, vaccin này cũng có thể bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*. Hơn nữa, kháng nguyên của loài mycoplasma có thể được đề xuất như bacterin bất hoạt nguyên vẹn như được mô tả trên đây.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm gây miễn dịch thu được bằng phương pháp bao gồm các bước: a) nuôi cấy vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae* trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh; b) thu được một hoặc nhiều kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma; và c) bổ sung chất mang được dụng.

Thuật ngữ "nuôi cấy" là đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Thuật ngữ này đề cập đến việc nhân giống tế bào trong môi trường nuôi cấy bên ngoài sinh vật. Cụ thể là, thuật ngữ "nuôi cấy" đề cập đến việc nhân giống tế bào bên ngoài sinh vật trong hệ tế bào.

Thuật ngữ "hệ tế bào" là đã được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Cụ thể là, thuật ngữ "hệ tế bào" là hệ nuôi cấy tế bào *in vitro* đối với việc nuôi cấy vi sinh vật, như ví dụ vi khuẩn mycoplasma. Hệ tế bào này bao gồm tế bào chủ và môi trường nuôi cấy tế bào thích hợp cho việc nhân giống tế bào bên ngoài sinh vật. Cụ thể là, tế bào chủ có thể hoặc có thể không dễ bị lây nhiễm với vi khuẩn mycoplasma. Tế bào chủ có thể có mặt như tế bào sống, ở dạng bất hoạt hoặc như mảnh tế bào. Tốt hơn là, tế bào chủ dễ bị lây nhiễm với vi khuẩn mycoplasma. Tế bào chủ mà có thể được sử dụng để thực hiện phương pháp như được mô tả trong bản mô tả này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở tế bào biểu mô thận chó Madin-Darby (MDCK) (ví dụ Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells như được lưu trữ với bộ sưu tập giống chuẩn Hoa Kỳ dưới số truy cập ATCC CCL-34 hoặc ATCC CRL-2285) hoặc tế bào McCoy (ví dụ như được lưu trữ với bộ sưu tập giống chuẩn Hoa Kỳ dưới số truy cập ATCC CRL-1696). Môi trường nuôi cấy tế bào thích hợp là đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và có bán sẵn trên thị trường. Chúng có thể bao gồm chất dinh dưỡng, muối, nhân tố sinh trưởng, thuốc kháng sinh, huyết thanh (ví dụ huyết thanh bào thai bò) và chất chỉ thị độ pH (ví dụ phenol đỏ).

Thuật ngữ "hệ tế bào nhân chuẩn" bao gồm tế bào nhân chuẩn sơ cấp và tế bào nhân chuẩn có nguồn gốc từ sinh vật đa bào như thực vật hoặc động vật. Hơn nữa, hệ tế bào nhân chuẩn bao gồm sinh vật đơn bào nhân chuẩn (cũng được gọi là vi sinh vật), ví dụ vi khuẩn hoặc nấm bao gồm nấm men. Tuy nhiên, sẽ được hiểu rằng, tế bào nhân chuẩn là khác với vi khuẩn mycoplasma.

Thuật ngữ "huyết thanh giảm" dùng để chỉ lượng huyết thanh giảm mà được bổ sung vào để nuôi cấy vi khuẩn mycoplasma trong hệ tế bào nhân chuẩn so với lượng huyết thanh mà được sử dụng để nuôi cấy vi khuẩn mycoplasma của cùng loài trong hệ nuôi cấy không chứa tế bào. Lượng huyết thanh dùng cho việc nuôi cấy vi khuẩn mycoplasma trong hệ tế bào nhân chuẩn so với lượng huyết thanh dùng cho việc nuôi cấy vi khuẩn mycoplasma trong hệ nuôi cấy không chứa tế bào được giảm ít nhất 10%, tốt hơn là ít nhất 20%, tốt hơn nữa là ít nhất 30%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 40%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 50%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 60%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 70%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 80%, thậm chí tốt hơn nữa là ít

nhất 90%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 95%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 96%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 97%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 98%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 99%, tốt nhất là 100%. Do đó, sẽ phải được hiểu rằng, theo sáng chế, vi khuẩn mycoplasma tốt nhất là được nuôi cấy trong hệ tế bào nhân chuẩn thiếu huyết thanh bất kỳ.

Thuật ngữ “hệ nuôi cấy không chứa tế bào” như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ hệ nuôi cấy mà không bao gồm tế bào bất kỳ ngoại trừ vi khuẩn mycoplasma.

Lượng huyết thanh được ưu tiên dùng cho việc nuôi cấy vi khuẩn mycoplasma trong hệ tế bào nhân chuẩn bao gồm nồng độ huyết thanh nằm trong khoảng từ 0 đến 10% (thể tích), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 9% (thể tích), vẫn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 8% (thể tích), thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 7% (thể tích), thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 6% (thể tích), và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 2 đến 5% (thể tích).

Lượng huyết thanh được ưu tiên dùng cho việc nuôi cấy vi khuẩn mycoplasma trong hệ tế bào nhân chuẩn bao gồm tế bào MDCK bao gồm nồng độ huyết thanh nằm trong khoảng từ 0 đến 6% (thể tích), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 5% (thể tích), vẫn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 2 đến 4% (thể tích), thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 2 đến 3% (thể tích), và tốt nhất là bằng khoảng 2% (thể tích).

Lượng huyết thanh được ưu tiên dùng cho việc nuôi cấy vi khuẩn mycoplasma trong hệ tế bào nhân chuẩn bao gồm tế bào McCoy bao gồm nồng độ huyết thanh nằm trong khoảng từ 0 đến 10% (thể tích), tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 9% (thể tích), vẫn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 2 đến 8% (thể tích), thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3 đến 7% (thể tích), thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 4 đến 6% (thể tích), và tốt nhất là bằng khoảng 5% (thể tích).

Theo một khía cạnh của sáng chế, phải được hiểu rằng tế bào nhân chuẩn của hệ tế bào nhân chuẩn có thể được lây nhiễm với vi khuẩn mycoplasma. Việc lây nhiễm này dẫn đến sự nhân giống vi khuẩn mycoplasma trong hệ tế bào nhân chuẩn. Việc lây nhiễm của tế bào nhân chuẩn bởi vi khuẩn mycoplasma và các điều kiện của khoảng thời gian sau ủ cũng đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh

vực này. Tuy nhiên, tốt hơn là sau gây nhiễm, tế bào được ủ trong khoảng thời gian đến 21 ngày, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ hai ngày đến mười bốn ngày, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ hai ngày đến tám ngày, vẫn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ ba đến năm ngày. Các điều kiện ủ được ưu tiên bao gồm nhiệt độ nằm trong khoảng từ 32 đến 42°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 34 đến 40°C, vẫn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 35 đến 39°C, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 36 đến 38°C, và tốt nhất là khoảng 37°C. Các điều kiện ủ được ưu tiên cũng bao gồm nồng độ CO₂ nằm trong khoảng từ 2% đến 8%, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3% đến 7% thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 4% đến 6%, và tốt nhất là khoảng 5%. Tốt hơn là, tế bào nhân chuẩn được quan sát sau khi gây nhiễm đối với các thay đổi đặc trưng, như xu hướng mật độ tế bào, giảm khả năng sống bao gồm tác dụng huỷ bào trong khoảng thời gian sau lây nhiễm và sự thay đổi màu của môi trường do sự thay đổi độ pH.

Thuật ngữ “thu được” bao gồm việc thu nhận, phân lập, tinh chế và/hoặc bào chế (ví dụ bất hoạt và/hoặc trộn) kháng nguyên.

Thuật ngữ “thu nhận” dùng để chỉ việc thu gom hoặc thu hồi kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma từ hệ tế bào nhân chuẩn được gây nhiễm. Phương pháp thông thường bất kỳ đã được biết đến trong lĩnh vực này có thể được sử dụng để thu hồi kháng nguyên mycoplasma, ví dụ phương pháp chia tách bất kỳ. Các phương pháp đã được biết đến trong lĩnh vực này bao gồm việc ly tâm hoặc lọc, như bằng cách sử dụng màng bán thấm có kích cỡ lỗ nhất định.

Thuật ngữ “phân lập” bao gồm bước phân lập kháng nguyên mycoplasma. Các phương pháp dùng cho việc phân lập kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma từ hệ tế bào nhân chuẩn được lây nhiễm là đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các phương pháp này bao gồm các phương pháp vật lý và/hoặc hoá học, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chu kỳ đông lạnh tan băng, xử lý bằng siêu âm và tương tự.

Các phương pháp dùng để “tinh chế” kháng nguyên từ thể phân lập là đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ bằng các phương pháp được mô tả trong Phương pháp tinh chế protein – phương pháp thực tiễn

(*E.L.V. Harris and S. Angel, eds., IRL Press at Oxford University Press*). Các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sự chia tách bằng ly tâm và/hoặc lọc, kết tủa, sắc ký ngoại cỡ (lọc gel), sắc ký ái lực, sắc ký kim loại chelat, sắc ký cộng hoá trị sắc ký trao đổi ion, sắc ký tương tác kỵ nước và tương tự. Kháng nguyên có thể thu được ở dạng tinh khiết được tinh chế hoặc không có hoặc hầu như không có vật liệu tế bào khác hoặc môi trường nuôi cấy v.v. Sau khi phân lập và/hoặc tinh chế, kháng nguyên thể hiện độ tinh khiết ít nhất 80%, tốt hơn là từ 80% đến 90%, tốt hơn nữa là từ 90% đến 97%, tốt nhất là lớn hơn 97% đến dạng tinh khiết tuyệt đối mà không có sự nhiễm bất kỳ.

Theo khía cạnh khác, “thu được” như được sử dụng trong bản mô tả này cũng có thể bao gồm bước hoàn thiện tương tự việc bổ sung chất đệm, làm bất hoạt, bước làm trung hoà và tương tự.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch, mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* và các tổ hợp bất kỳ của chúng, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinitis*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyosynoviae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyopneumoniae*, trong đó một

hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinitis* và *M. hyopneumoniae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinitis* và *M. hyosynoviae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae*, và *M. hyosynoviae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh.

Một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được làm bất hoạt, tốt hơn là bất kỳ trong số các phương pháp như được mô tả trên đây. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được làm bất hoạt, tốt hơn là bằng bất kỳ trong số các phương pháp như được mô tả trên đây. Do đó, theo khía cạnh khác sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch được tạo ra bằng phương pháp bao gồm các bước a) nuôi cấy vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinitis*, *M. hyopneumoniae*,

M. hyosynoviae, và các tổ hợp bất kỳ của chúng trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh; b) thu được một hoặc nhiều kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma trong đó bước thu được bao gồm việc làm bất hoạt một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma; và c) bổ sung chất mang được dụng. Bước làm bất hoạt có thể được thực hiện bằng bất kỳ trong số các phương pháp như được mô tả trên đây. Theo một khía cạnh, việc làm bất hoạt dẫn đến bacterin bất hoạt nguyên vẹn của vi khuẩn mycoplasma. Tốt hơn là, việc làm bất hoạt của vi khuẩn mycoplasma được thực hiện bằng formalin sao cho kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn bằng formalin. Theo một khía cạnh, kháng nguyên mycoplasma bất hoạt là bacterin bất hoạt nguyên vẹn của *M. hyorhinis*, bacterin bất hoạt nguyên vẹn của *M. hyopneumoniae*, bacterin bất hoạt nguyên vẹn của *M. hyosynoviae*, bacterin bất hoạt nguyên vẹn của *M. hyorhinis* và *M. hyosynoviae* hoặc bacterin bất hoạt nguyên vẹn của *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae*, hoặc bacterin bất hoạt nguyên vẹn của *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae* hoặc bacterin bất hoạt nguyên vẹn của *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae*. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma nằm trong chế phẩm gây miễn dịch là bacterin bất hoạt nguyên vẹn, tốt hơn là bacterin nguyên vẹn được bất hoạt bằng formalin.

Theo một khía cạnh, kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó huyết thanh không chứa huyết thanh của lợn. Đối với vi khuẩn mycoplasma, *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae* là mầm bệnh của lợn, huyết thanh của lợn có thể bao gồm các thành phần mà có thể cản trở với kháng nguyên mycoplasma của chế phẩm của sáng chế, sao cho việc sử dụng huyết thanh không phải của lợn hoặc không có huyết thanh là khía cạnh được ưu tiên của sáng chế. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch thu được bằng phương pháp bao gồm a) nuôi cấy vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* và các tổ hợp bất kỳ của chúng trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh; b) thu được kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma; và c) bổ sung chất mang được dụng, trong đó hệ tế bào nhân chuẩn không chứa huyết thanh của lợn.

Như được kể đến trên đây, hệ tế bào nhân chuẩn có thể bao gồm tế bào của dòng tế bào MDCK hoặc dòng tế bào McCoy. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề

xuất phương pháp tạo ra chế phẩm gây miễn dịch, trong đó phương pháp này bao gồm các bước a) nuôi cấy vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* và các tổ hợp bất kỳ của chúng trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh; b) thu được kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma; và c) bổ sung chất mang được dụng, trong đó hệ tế bào nhân chuẩn bao gồm dòng tế bào MDCK hoặc dòng tế bào McCoy.

Theo khía cạnh khác, kháng nguyên mycoplasma của chế phẩm gây miễn dịch được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó kháng nguyên mycoplasma này có tính gây miễn dịch gia tăng so với cùng kháng nguyên thu được từ mycoplasma được nuôi cấy trong hệ nuôi cấy không chứa tế bào.

Thuật ngữ “tính gây miễn dịch gia tăng” như được sử dụng trong bản mô tả này, có nghĩa rằng sự đáp ứng miễn dịch do chế phẩm gây miễn dịch gây ra bao gồm kháng nguyên quan tâm được gia tăng như so với chế phẩm gây miễn dịch tham chiếu bao gồm cùng kháng nguyên, trong đó kháng nguyên của chế phẩm gây miễn dịch tham chiếu được tạo ra gồm vi khuẩn mycoplasma được nuôi cấy trong hệ nuôi cấy không chứa tế bào.

Thuật ngữ “gia tăng” có nghĩa rằng đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và/hoặc kháng thể được gia tăng ít nhất 10%, tốt hơn là ít nhất 20%, tốt hơn nữa là ít nhất 30%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 40%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 50%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 75%, tốt nhất là ít nhất 100% như so với đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và/hoặc kháng thể được gây ra bởi chế phẩm gây miễn dịch tham chiếu bao gồm cùng kháng nguyên, trong đó kháng nguyên của chế phẩm gây miễn dịch tham chiếu được tạo ra gồm có vi khuẩn mycoplasma được nuôi cấy trong hệ nuôi cấy không chứa tế bào. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rõ cách để đo đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và/hoặc kháng thể. Cụ thể là, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ biết rõ cách so sánh đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào của chế phẩm gây miễn dịch quan tâm với đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào tham chiếu hoặc đáp ứng miễn dịch qua trung gian kháng thể của chế phẩm gây miễn dịch quan tâm với đáp ứng miễn dịch qua trung gian kháng thể của chế phẩm tham chiếu, nhưng không có đáp ứng miễn dịch qua trung

gian tế bào nào của chế phẩm gây miễn dịch quan tâm với đáp ứng miễn dịch qua trung gian kháng thể của tham chiếu hoặc ngược lại. Hơn nữa, đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào có thể được đo, ví dụ bằng cách đo sự hoạt hoá của tế bào T độc tế bào bằng chế phẩm gây miễn dịch/kháng nguyên quan tâm. Đáp ứng miễn dịch qua trung gian kháng thể có thể được đo, ví dụ bằng cách đo lượng kháng thể đặc hiệu kháng nguyên, được sinh ra do nguyên nhân cho động vật dùng chế phẩm gây miễn dịch bao gồm kháng nguyên. Đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và/hoặc kháng thể có thể được đo, ví dụ bằng cách sử dụng mô hình chuột nhắt, mô hình mèo, mô hình gia súc hoặc mô hình lợn. Tuy nhiên, các thử nghiệm như được mô tả trong ví dụ 4 và 5 sẽ được sử dụng làm thử nghiệm tham chiếu để phát hiện đáp ứng miễn dịch kháng lại *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae*.

Thuật ngữ “cùng kháng nguyên” có nghĩa là bản chất của kháng nguyên là giống nhau. Do đó, nếu kháng nguyên mycoplasma của chế phẩm gây miễn dịch được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh là bacterin bất hoạt nguyên vẹn của *M. hyorhinis*, thì cùng kháng nguyên có nghĩa là kháng nguyên mycoplasma của hệ không chứa tế bào cũng là bacterin bất hoạt nguyên vẹn của *M. hyorhinis*. Hơn nữa, nếu kháng nguyên mycoplasma của chế phẩm gây miễn dịch được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh được tạo ra hoặc được tinh chế theo phương pháp đặc hiệu, thì cùng kháng nguyên có nghĩa là kháng nguyên mycoplasma của hệ không chứa tế bào được tạo ra hoặc được tinh chế theo cùng phương pháp.

Có lợi là, các dữ liệu thử nghiệm được đề xuất bởi sáng chế bộc lộ rằng kháng nguyên mycoplasma được tạo ra bằng phương pháp được mô tả trên đây có tính gây miễn dịch gia tăng so với kháng nguyên thu được từ vi khuẩn mycoplasma được nuôi cấy trong hệ nuôi cấy không chứa tế bào. Cụ thể là, vacxin *M. hyorhinis* được tạo thành dựa trên MDCK thể hiện sự khởi phát chuyển hoá kiểu huyết thanh sớm hơn, số lượng lợn dương tính với kiểu huyết thanh lớn hơn và độ chuẩn kiểu huyết thanh cao hơn.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch thu được bằng phương pháp bao gồm a) nuôi cấy vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* và các tổ hợp bất kỳ của

chúng trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh; b) thu được kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma; và c) bổ sung chất mang được dụng, trong đó chế phẩm gây miễn dịch có tính gây miễn dịch gia tăng so với chế phẩm gây miễn dịch bao gồm cùng kháng nguyên thu được từ mycoplasma được nuôi cấy trong hệ nuôi cấy không chứa tế bào. Theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng các phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó chế phẩm gây miễn dịch có tính gây miễn dịch gia tăng so với chế phẩm gây miễn dịch bao gồm cùng kháng nguyên thu được từ mycoplasma được nuôi cấy trong hệ nuôi cấy không chứa tế bào. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyosynoviae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó chế phẩm gây miễn dịch có tính gây miễn dịch gia tăng so với chế phẩm gây miễn dịch bao gồm cùng kháng nguyên thu được từ mycoplasma được nuôi cấy trong hệ nuôi cấy không chứa tế bào. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyopneumoniae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh trong đó chế phẩm gây miễn dịch có tính gây miễn dịch gia tăng so với chế phẩm gây miễn dịch bao gồm cùng kháng nguyên thu được từ mycoplasma được nuôi cấy trong hệ nuôi cấy không chứa tế bào. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó chế phẩm gây miễn dịch có tính gây miễn dịch gia tăng so với chế phẩm gây miễn dịch bao gồm cùng kháng nguyên thu được từ mycoplasma được nuôi cấy trong hệ nuôi cấy không chứa tế bào. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt, tốt hơn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis* và *M. hyosynoviae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó chế phẩm gây miễn dịch có tính gây miễn dịch gia tăng so với chế phẩm gây miễn dịch bao gồm cùng kháng nguyên thu được từ mycoplasma được nuôi cấy trong hệ nuôi cấy không chứa tế bào. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn

giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt, tốt hơn là, bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó chế phẩm gây miễn dịch có tính gây miễn dịch gia tăng so với chế phẩm gây miễn dịch bao gồm cùng kháng nguyên thu được từ mycoplasma được nuôi cấy trong hệ nuôi cấy không chứa tế bào. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt, tốt hơn là, bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, và *M. hyosynoviae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó chế phẩm gây miễn dịch có tính gây miễn dịch gia tăng so với chế phẩm gây miễn dịch bao gồm cùng kháng nguyên thu được từ mycoplasma được nuôi cấy trong hệ nuôi cấy không chứa tế bào. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin

bất hoạt bằng formalin. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt, tốt hơn là, bacterin bất hoạt bằng formalin.

Theo khía cạnh khác, kháng nguyên mycoplasma được toạ ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó chế phẩm gây miễn dịch bao gồm các thành phần của tế bào nhân chuẩn của hệ tế bào nhân chuẩn.

Thuật ngữ “các thành phần của tế bào nhân chuẩn” bao gồm tế bào nguyên vẹn và mảnh của tế bào nhân chuẩn. Thuật ngữ “mảnh” bao gồm phần bất kỳ của tế bào nhân chuẩn như các phần của màng tế bào hoặc các hạt cơ quan trong tế bào như toàn bộ hoặc các phần của nó. Tuy nhiên, thuật ngữ mảnh cũng bao gồm phần bất kỳ của tế bào nhân chuẩn bao gồm lipit, protein, đường, ADN, ARN và tương tự cũng như các tổ hợp của chúng. Hơn nữa, các thành phần của tế bào nhân chuẩn và kháng nguyên mycoplasma có thể là trong chế phẩm gây miễn dịch theo cách riêng biệt hoặc được gắn vào với nhau hoặc tổ hợp của chúng.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch thu được bằng phương pháp bao gồm a) nuôi cấy vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* và các tổ hợp bất kỳ của chúng trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh; b) thu được kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma; và c) bổ sung chất mang được dụng, trong đó chế phẩm gây miễn dịch bao gồm các thành phần của tế bào nhân chuẩn của hệ tế bào nhân chuẩn. Theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó chế phẩm gây miễn dịch bao gồm các thành phần của tế bào nhân chuẩn của hệ tế bào nhân chuẩn. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên

vện. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyosynoviae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó chế phẩm gây miễn dịch bao gồm các thành phần của tế bào nhân chuẩn của hệ tế bào nhân chuẩn. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyopneumoniae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh trong đó chế phẩm gây miễn dịch bao gồm các thành phần của tế bào nhân chuẩn của hệ tế bào nhân chuẩn. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó chế phẩm gây miễn dịch bao gồm các thành phần của tế bào nhân chuẩn của hệ tế bào nhân chuẩn. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên

mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt, tốt hơn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis* và *M. hyosynoviae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh trong đó chế phẩm gây miễn dịch bao gồm các thành phần của tế bào nhân chuẩn của hệ tế bào nhân chuẩn. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt, tốt hơn là, bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó chế phẩm gây miễn dịch bao gồm các thành phần của tế bào nhân chuẩn của hệ tế bào nhân chuẩn. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt, tốt hơn là, bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis*, *M.*

hyopneumoniae, và *M. hyosynoviae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó chế phẩm gây miễn dịch bao gồm các thành phần của tế bào nhân chuẩn của hệ tế bào nhân chuẩn. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt, tốt hơn là, bacterin bất hoạt bằng formalin.

Theo khía cạnh khác, kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó các thành phần của tế bào nhân chuẩn được gắn vào kháng nguyên mycoplasma.

Thuật ngữ “được gắn vào” dùng để chỉ sự tương tác bất kỳ, kết hợp, gắn kết, dính bám hoặc liên kết của các thành phần này của tế bào nhân chuẩn với kháng nguyên mycoplasma. Do đó, thuật ngữ được gắn vào bao gồm các tương tác bất kỳ bao gồm các liên kết gián tiếp hoặc trực tiếp, không thuận nghịch hoặc thuận nghịch, vật lý và hoá học, tĩnh điện và/hoặc cộng hoá trị. Do đó, sẽ được hiểu rằng các thành phần của tế bào nhân chuẩn ví dụ có thể được gắn kết với kháng nguyên mycoplasma. Tuy nhiên, sẽ phải được hiểu rằng các thành phần của tế bào nhân chuẩn cũng có thể được liên kết với kháng nguyên mycoplasma. Việc liên kết này có thể được tạo ra bằng vài phương pháp cũng đã được biết đến đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này như xử lý formaldehyt và tương tự.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch thu được bằng phương pháp bao gồm a) nuôi cấy vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* và các tổ hợp bất kỳ của chúng trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh; b) thu được kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma; và c) bổ sung chất mang được dụng, trong đó các thành phần của tế bào nhân chuẩn được gắn vào kháng nguyên mycoplasma. Theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất

hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó các thành phần của tế bào nhân chuẩn được gắn vào kháng nguyên mycoplasma. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyosynoviae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó các thành phần của tế bào nhân chuẩn được gắn vào kháng nguyên mycoplasma. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyopneumoniae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh trong đó các thành phần của tế bào nhân chuẩn được gắn vào kháng nguyên mycoplasma. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong

bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó các thành phần của tế bào nhân chuẩn được gắn vào kháng nguyên mycoplasma. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt, tốt hơn là, bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis* và *M. hyosynoviae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó các thành phần của tế bào nhân chuẩn được gắn vào kháng nguyên mycoplasma. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt, tốt hơn là, bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó các thành phần của tế bào nhân chuẩn được gắn vào kháng nguyên mycoplasma. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn

nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt, tốt hơn là, bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, và *M. hyosynoviae*, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh, trong đó các thành phần của tế bào nhân chuẩn được gắn vào kháng nguyên mycoplasma. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Hơn nữa, theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin. Theo khía cạnh khác, tất cả các kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt, tốt hơn là, bacterin bất hoạt bằng formalin.

Một lần nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* và các tổ hợp bất kỳ của chúng, trong đó một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là thu được từ hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh. Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae*; và một hoặc nhiều thành phần của hệ tế bào nhân chuẩn. Theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis*; và một hoặc nhiều

thành phần của hệ tế bào nhân chuẩn. Theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyosynoviae*; và một hoặc nhiều thành phần của hệ tế bào nhân chuẩn. Theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyopneumoniae*; và một hoặc nhiều thành phần của hệ tế bào nhân chuẩn. Theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae*; và một hoặc nhiều thành phần của hệ tế bào nhân chuẩn. Theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis* và *M. hyosynoviae*; và một hoặc nhiều thành phần của hệ tế bào nhân chuẩn. Theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae*; và một hoặc nhiều thành phần của hệ tế bào nhân chuẩn. Theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch mà bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, và *M. hyosynoviae*; và một hoặc nhiều thành phần của hệ tế bào nhân chuẩn. Theo khía cạnh khác một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp gây miễn dịch cho đối tượng, bao gồm bước cho đối tượng cùng bất kỳ trong số các chế phẩm gây miễn dịch như được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "gây miễn dịch" đề cập đến việc gây miễn dịch chủ động bằng việc cho đối tượng cần được gây miễn dịch dùng chế phẩm gây miễn dịch, nhờ đó gây ra đáp ứng miễn dịch kháng lại kháng nguyên được bao gồm trong chế phẩm gây miễn dịch.

Tốt hơn là, việc gây miễn dịch dẫn đến việc làm giảm bớt tỷ lệ mắc phải sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể trong đàn hoặc làm giảm mức trầm trọng của các dấu hiệu lâm sàng do sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể gây ra hoặc kết hợp với sự lây nhiễm mycoplasma.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp gây miễn dịch cho đối tượng bằng bất kỳ trong số các chế phẩm gây miễn dịch được đề xuất trong bản mô tả này, bao gồm việc cho đối tượng dùng chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế.

Chế phẩm gây miễn dịch bao gồm: a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae* và một hoặc nhiều kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyopneumoniae* và *M. hyorhinis* và tổ hợp của chúng; và b) chất mang được dụng.

Theo khía cạnh khác, chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế bao gồm: a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis* và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; và b) chất mang được dụng. Theo khía cạnh khác, chế phẩm gây miễn dịch cũng bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*.

Nếu chế phẩm gây miễn dịch được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh như được mô tả trong bản mô tả này, thì chế phẩm gây miễn dịch nói chung thường có thể bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* và tổ hợp bất kỳ của chúng như được xác định hơn nữa trong bản mô tả này. Theo khía cạnh khác được xác định trên đây, chế phẩm gây miễn dịch có thể bao gồm một hoặc nhiều thành phần của hệ tế bào nhân chuẩn ngoài một hoặc nhiều kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo khía cạnh khác, một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được sử dụng để gây miễn dịch cho đối tượng cần gây miễn dịch là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Khía cạnh này của sáng chế bao gồm rằng một trong số các kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Tuy nhiên, khía cạnh này của sáng chế cũng bao gồm rằng tất cả kháng nguyên trong chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế là bacterin bất hoạt nguyên vẹn, nghĩa là kháng nguyên *M. hyorhinis*, kháng nguyên *M. hyosynoviae* và/hoặc kháng nguyên *M. hyopneumoniae* là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Tốt hơn là, việc dùng dẫn đến làm giảm bớt tỷ lệ mắc phải sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể trong đàn hoặc giảm mức trầm trọng của dấu hiệu lâm sàng do sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể gây ra hoặc kết hợp với sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể.

Theo khía cạnh khác, việc gây miễn dịch của đối tượng cần gây miễn dịch này bằng chế phẩm gây miễn dịch như được đề xuất trong bản mô tả này, dẫn đến việc ngăn ngừa sự lây nhiễm của đối tượng bởi sự lây nhiễm mycoplasma. Thậm chí tốt hơn nữa là, việc gây miễn dịch dẫn đến đáp ứng miễn dịch hữu hiệu kéo dài kháng lại sự lây nhiễm mycoplasma. Cần hiểu rằng khoảng thời gian kéo dài sẽ không nhiều hơn 2 tháng, tốt hơn là không nhiều hơn 3 tháng, tốt hơn nữa là không nhiều hơn 4 tháng, tốt hơn nữa là không nhiều hơn 5 tháng, tốt hơn nữa là không nhiều hơn 6 tháng. Cần phải hiểu rằng việc gây miễn dịch có thể là không hữu hiệu ở tất cả các đối tượng được gây miễn dịch. Tuy nhiên, thuật ngữ này đòi hỏi rằng tỷ lệ đáng kể đối tượng của đàn là được gây miễn dịch một cách hữu hiệu.

Tốt hơn là, đàn đối tượng được khảo sát trong ngữ cảnh này mà thông thường, nghĩa là không có việc gây miễn dịch, sẽ phát triển dấu hiệu lâm sàng thường do sự lây nhiễm mycoplasma gây ra hoặc kết hợp với sự lây nhiễm mycoplasma. Nếu đối tượng của đàn được gây miễn dịch một cách hữu hiệu có thể được xác định mà không gặp phải khó khăn nào bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Tốt hơn là, việc gây miễn dịch sẽ hữu hiệu nếu dấu hiệu lâm sàng ít nhất 33%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90% đối tượng của đàn được đưa ra được giảm bớt tỷ lệ mắc phải hoặc mức trầm trọng ít nhất 10%, tốt hơn nữa là ít nhất 20%, vẫn tốt hơn nữa là ít nhất 30%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 40%, vẫn tốt hơn nữa là ít nhất 50%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 60%, vẫn tốt hơn nữa là ít nhất 70%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 80%, vẫn tốt hơn nữa là ít nhất 90%, và tốt nhất là ít nhất 95% khi so với đối tượng mà không được gây miễn dịch hoặc được gây miễn dịch bằng chế phẩm gây miễn dịch mà sẵn có trước sáng chế nhưng sau đó bị lây nhiễm bởi vi khuẩn mycoplasma cụ thể.

Theo một khía cạnh của sáng chế, đối tượng được chọn từ danh mục gồm có lợn, gia súc, mèo và chó. Do đó, theo một khía cạnh, phương pháp gây miễn dịch cho đối tượng được đề xuất, bao gồm việc cho đối tượng dùng chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế, trong đó đối tượng được chọn từ danh mục gồm có lợn, gia súc, mèo và chó.

Theo một khía cạnh của sáng chế, chế phẩm gây miễn dịch được dùng một lần. Do đó, theo khía cạnh khác, phương pháp gây miễn dịch cho đối tượng được đề xuất, bao gồm việc cho đối tượng dùng chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế, trong đó chế phẩm gây miễn dịch là hữu hiệu trong việc làm giảm bớt tỷ lệ mắc phải sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể trong đàn hoặc làm giảm mức trầm trọng của dấu hiệu lâm sàng do sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể gây ra hoặc kết hợp với sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể sau khi cho đối tượng này dùng liều đơn của chế phẩm gây miễn dịch. Cần phải hiểu rằng liều đơn này chỉ được dùng một lần. Như được thể hiện trong các ví dụ 2 và 3, chế phẩm gây miễn dịch như được đề xuất trong bản mô tả này đã được chứng minh là hữu hiệu sau khi cho đối tượng cần gây miễn dịch này dùng liều đơn.

Do đó, khi phương pháp này bao gồm việc dùng một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis*, chế phẩm gây miễn dịch là hữu hiệu trong việc làm giảm bớt tỷ lệ mắc phải sự lây nhiễm *M. hyorhinis* trong đàn hoặc làm giảm mức trầm trọng dấu hiệu lâm sàng do sự lây nhiễm *M. hyorhinis* gây ra hoặc kết hợp với sự lây nhiễm *M. hyorhinis*. Khi phương pháp này bao gồm việc dùng một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*, thì theo khía cạnh khác, nó là hữu hiệu trong việc làm giảm bớt tỷ lệ mắc phải sự lây nhiễm *M. hyopneumoniae* trong đàn hoặc làm giảm mức trầm trọng của dấu hiệu lâm sàng do sự lây nhiễm *M. hyopneumoniae* gây ra hoặc kết hợp với sự lây nhiễm *M. hyopneumoniae*. Một lần nữa, một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma sẽ được dùng bằng phương pháp theo sáng chế có thể là bacterin bất hoạt nguyên vẹn của loài mycoplasma như được mô tả trên đây.

Tốt hơn là, liều đơn có tổng thể tích nằm trong khoảng từ 0,5ml đến 2,5ml, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,6ml đến 2,0ml, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,7ml đến 1,75ml, vẫn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,8ml đến 1,5ml, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,9ml đến 1,25ml, với liều đơn 1,0ml là được ưu tiên nhất.

Tuy nhiên, chế phẩm gây miễn dịch có thể được dùng hai lần hoặc vài lần, với liều thứ nhất được dùng trước khi dùng liều thứ hai (liều cao hơn). Tốt hơn là, liều thứ hai được dùng ít nhất 15 ngày sau liều thứ nhất. Tốt hơn nữa là, liều thứ hai được dùng nằm trong khoảng từ 15 đến 40 ngày sau liều thứ nhất. Thậm chí tốt hơn nữa là, liều

thứ hai được dùng ít nhất 17 ngày sau liều thứ nhất. Vẫn tốt hơn nữa là, liều thứ hai được dùng nằm trong khoảng từ 17 và 30 ngày sau liều thứ nhất. Thậm chí tốt hơn nữa là, liều thứ hai được dùng ít nhất 19 ngày sau liều thứ nhất. Vẫn tốt hơn nữa là, liều thứ hai được dùng nằm trong khoảng từ 19 đến 25 ngày sau liều thứ nhất. Tốt nhất là, liều thứ hai được dùng ít nhất 21 ngày sau liều thứ nhất. Theo khía cạnh được ưu tiên về chế độ dùng hai lần, liều thứ nhất và thứ hai của chế phẩm gây miễn dịch được dùng với cùng lượng. Tốt hơn là, mỗi liều với lượng được ưu tiên được xác định trên đây, với liều 1ml đối với liều thứ nhất và thứ hai là được ưu tiên nhất. Ngoài chế độ liều thứ nhất và thứ hai, phương án khác bao gồm các liều tiếp theo hơn nữa. Ví dụ, liều thứ ba, thứ tư hoặc thứ năm có thể được dùng theo cách khía cạnh này. Tốt hơn là, các chế độ liều thứ ba, thứ tư và thứ năm tiếp theo được dùng với cùng lượng như liều thứ nhất, với khoảng thời gian giữa liều thứ nhất là phù hợp với khoảng thời gian giữa liều thứ nhất và thứ hai được kể đến trên đây.

Tốt hơn là, chế phẩm gây miễn dịch được dùng theo cách cục bộ hoặc theo hệ thống. Các đường dùng thích hợp thường được sử dụng là dùng qua đường miệng hoặc ngoài đường tiêu hoá, như trong mũi, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong màng bụng, dưới da, cũng như việc xông. Tuy nhiên, phụ thuộc vào bản chất và phương thức tác dụng của hợp chất, chế phẩm gây miễn dịch cũng có thể được dùng bằng các đường khác.

Thông thường, khi kháng nguyên vi khuẩn như vi khuẩn mycoplasma là chế phẩm gây miễn dịch được sử dụng chứa khoảng từ 10^3 đến 10^{10} đơn vị tạo khuẩn lạc (CFU) kháng nguyên vi khuẩn/liều, tốt hơn là khoảng từ 10^4 đến 10^9 CFU kháng nguyên vi khuẩn/ liều, tốt hơn nữa là từ 10^5 đến 10^6 CFU kháng nguyên vi khuẩn/ liều. Nếu bacterin bất hoạt được sử dụng trong chế phẩm gây miễn dịch, thì trị số CFU dùng để chỉ lượng vi khuẩn mycoplasma trước khi bất hoạt.

Ví dụ, chế phẩm gây miễn dịch của sáng chế bao gồm kháng nguyên của *M. hyopneumoniae* tốt hơn là được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 10^2 đến 10^{10} CFU/ liều, tốt hơn là khoảng từ 10^3 đến 10^9 CFU/ liều, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^8 CFU/ liều, tốt nhất là với lượng nằm trong khoảng từ 10^5 đến 10^7 CFU/ liều. Chế phẩm gây miễn dịch của sáng chế bao gồm

kháng nguyên của *M. hyorhinis* tốt hơn là được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 10^2 đến 10^{10} CFU/ liều, tốt hơn là khoảng từ 10^3 đến 10^9 CFU/ liều, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^8 CFU/ liều, tốt nhất là với lượng nằm trong khoảng từ 10^5 đến 10^7 CFU/ liều. Chế phẩm gây miễn dịch của sáng chế bao gồm kháng nguyên của *M. hyosynoviae* tốt hơn là được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 10^2 đến 10^{10} CFU/ liều, tốt hơn là khoảng từ 10^3 đến 10^9 CFU/liều, thậm chí tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^8 CFU/ liều, tốt nhất là với lượng nằm trong khoảng từ 10^5 đến 10^7 CFU/ liều.

Do đó, theo khía cạnh khác, phương pháp gây miễn dịch cho đối tượng được đề xuất, bao gồm việc cho đối tượng dùng chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế, trong đó chế phẩm gây miễn dịch là hữu hiệu trong việc làm giảm bớt tỷ lệ mắc phải sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể trong đàn hoặc làm giảm mức trầm trọng của các dấu hiệu lâm sàng do sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể gây ra hoặc kết hợp với sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể sau khi cho đối tượng này dùng liều đơn của chế phẩm gây miễn dịch, trong đó liều đơn bao gồm từ 10^2 đến 10^{10} CFU/vi khuẩn mycoplasma/liều.

Theo một khía cạnh của sáng chế, phương pháp gây miễn dịch cho đối tượng cần gây miễn dịch này dẫn đến sự cải thiện về tham số hiệu quả được chọn từ nhóm bao gồm khoảng thời gian nhiễm trùng máu ngắn hơn, lượng vi khuẩn ít hơn, hoặc các tổ hợp của chúng, khi so với đối tượng của nhóm đối chứng không được gây miễn dịch của cùng loài.

Thuật ngữ “khoảng thời gian nhiễm trùng máu ngắn hơn” có nghĩa rằng khoảng thời gian nhiễm trùng máu ở đối tượng mà được gây miễn dịch bằng chế phẩm gây miễn dịch được rút ngắn ít nhất 10%, tốt hơn nữa là ít nhất 20%, vẫn tốt hơn nữa là ít nhất 30%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 40%, vẫn tốt hơn nữa là ít nhất 50%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 60%, vẫn tốt hơn nữa là ít nhất 70%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 80%, vẫn tốt hơn nữa là ít nhất 90%, và tốt nhất là ít nhất 100% khi so với đối tượng mà không được gây miễn dịch hoặc được gây miễn dịch bằng chế phẩm gây miễn dịch mà sẵn có trước sáng chế nhưng sau đó bị lây nhiễm bởi vi khuẩn mycoplasma cụ thể. Sẽ được hiểu rằng khoảng thời gian nhiễm trùng máu được xác

định về số lượng đại diện của đối tượng trong mỗi nhóm (nhóm không được gây miễn dịch và được gây miễn dịch) trước khi so sánh của nó.

Thuật ngữ “lượng vi khuẩn thấp” có nghĩa rằng lượng vi khuẩn với vi khuẩn mycoplasma kiểu hoang dại ở đối tượng mà bị lây nhiễm với vi khuẩn mycoplasma kiểu hoang dại là được giảm ở đối tượng ít nhất 10%, tốt hơn nữa là ít nhất 20%, vẫn tốt hơn nữa là ít nhất 30%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 40%, vẫn tốt hơn nữa là ít nhất 50%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 60%, vẫn tốt hơn nữa là ít nhất 70%, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 80%, vẫn tốt hơn nữa là ít nhất 90%, và tốt nhất là ít nhất 100% sau khi gây miễn dịch bằng chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế khi so với đối tượng mà không được gây miễn dịch hoặc được gây miễn dịch bằng chế phẩm gây miễn dịch mà là sẵn sẵn có trước sáng chế nhưng sau đó bị lây nhiễm với vi khuẩn mycoplasma cụ thể. Sẽ được hiểu rằng “lượng vi khuẩn” được xác định theo số lượng đại diện của đối tượng trong mỗi nhóm (nhóm không được gây miễn dịch và được gây miễn dịch) trước khi so sánh của nó.

Do đó, theo khía cạnh khác, phương pháp gây miễn dịch cho đối tượng được đề xuất, bao gồm việc cho đối tượng dùng chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế gây miễn dịch đối tượng cần gây miễn dịch này dẫn đến sự cải thiện về tham số hiệu quả được chọn từ nhóm bao gồm khoảng thời gian nhiễm trùng máu ngắn hơn, lượng vi khuẩn ít hơn, hoặc các tổ hợp của chúng, khi so với đối tượng của nhóm đối chứng không được gây miễn dịch của cùng loài.

Theo một khía cạnh của sáng chế, phương pháp là thích hợp đối với đối tượng có khoảng ba tuần tuổi. Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp gây miễn dịch cho đối tượng, bao gồm việc cho đối tượng dùng chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế, trong đó phương pháp là thích hợp đối với đối tượng có khoảng ba tuần tuổi.

Có lợi là, các dữ liệu thử nghiệm được đưa ra bởi sáng chế bộc lộ hiệu quả của chế phẩm gây miễn dịch ở lợn có khoảng ba tuần tuổi.

Tốt hơn là, đối tượng này được gây miễn dịch nằm trong khoảng từ 1 ngày tuổi đến 21 ngày tuổi, tốt hơn nữa là, đối tượng này sẽ được gây miễn dịch nằm trong khoảng từ 1 ngày tuổi đến 10 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1

ngày tuổi đến 9 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 ngày tuổi đến 8 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 ngày tuổi đến 7 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 ngày tuổi đến 6 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 ngày tuổi đến 5 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 ngày tuổi đến 4 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 ngày tuổi đến 3 ngày tuổi, thậm chí tốt hơn nữa là 1 hoặc 2 ngày tuổi và tốt nhất là 1 ngày tuổi.

Do đó, theo một khía cạnh, phương pháp gây miễn dịch cho đối tượng được đề xuất, bao gồm việc cho đối tượng dùng chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế, gây miễn dịch cho đối tượng cần gây miễn dịch, trong đó đối tượng này sẽ được gây miễn dịch nằm trong khoảng từ 1 ngày tuổi đến 21 ngày tuổi.

Sáng chế cũng đề cập đến bất kỳ trong số các chế phẩm gây miễn dịch được đề xuất trong bản mô tả để sử dụng bất kỳ trong số các phương pháp như được mô tả trong bản mô tả này, ví dụ trong việc sử dụng để điều trị và/hoặc phòng sự lây nhiễm mycoplasma ở đối tượng, hoặc trong việc sử dụng gây nhiễm đối tượng kháng lại sự lây nhiễm mycoplasma.

Chế phẩm gây miễn dịch bao gồm a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae* và một hoặc nhiều kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* và tổ hợp của chúng; và b) chất mang được dùng.

Theo khía cạnh khác, chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế bao gồm: a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis* và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; và b) chất mang được dùng. Theo khía cạnh khác, chế phẩm gây miễn dịch cũng bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*.

Nếu chế phẩm gây miễn dịch được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh như được mô tả trong bản mô tả này, thì chế phẩm gây miễn dịch nói chung có thể bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* và tổ hợp bất kỳ của chúng như được xác định hơn nữa trong bản mô tả này. Theo khía cạnh khác được xác định trên đây, chế phẩm gây miễn dịch có thể bao gồm một hoặc nhiều thành phần của hệ tế bào nhân chuẩn ngoài một hoặc nhiều kháng nguyên của

vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo khía cạnh khác, một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được sử dụng để gây miễn dịch cho đối tượng cần gây miễn dịch này là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Khía cạnh này của sáng chế bao gồm rằng một trong số các kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Tuy nhiên, khía cạnh này của sáng chế cũng bao gồm rằng tất cả các nguyên trong chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế là bacterin bất hoạt nguyên vẹn, nghĩa là kháng nguyên *M. hyorhinis*, kháng nguyên *M. hyosynoviae* và/hoặc kháng nguyên *M. hyopneumoniae* là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Tốt hơn là, việc sử dụng này dẫn đến việc làm giảm bớt tỷ lệ mắc phải sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể trong đàn hoặc làm giảm mức trầm trọng của các dấu hiệu lâm sàng do sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể gây ra hoặc kết hợp với sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng chế phẩm gây miễn dịch như được mô tả trong bản mô tả này để điều trị và/hoặc phòng sự lây nhiễm mycoplasma ở đối tượng hoặc gây miễn dịch đối tượng kháng lại sự lây nhiễm mycoplasma.

Chế phẩm gây miễn dịch bao gồm a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae* và một hoặc nhiều kháng nguyên được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* và tổ hợp của chúng; và b) chất mang được dụng.

Theo khía cạnh khác, chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế bao gồm: a) một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis* và một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae*; và b) chất mang được dụng. Theo khía cạnh khác, chế phẩm gây miễn dịch cũng bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*.

Nếu chế phẩm gây miễn dịch được tạo ra trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh như được mô tả trong bản mô tả này, thì chế phẩm gây miễn dịch nói chung có thể bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma được

chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* và tổ hợp bất kỳ của chúng như được xác định hơn nữa trong bản mô tả này. Theo khía cạnh khác được xác định trên đây, chế phẩm gây miễn dịch có thể bao gồm một hoặc nhiều thành phần của hệ tế bào nhân chuẩn ngoài một hoặc nhiều kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* và tổ hợp bất kỳ của chúng.

Theo khía cạnh khác, một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma được sử dụng để gây miễn dịch cho đối tượng cần gây miễn dịch này là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Khía cạnh này của sáng chế bao gồm rằng một trong số các kháng nguyên mycoplasma là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Tuy nhiên, khía cạnh này của sáng chế cũng bao gồm rằng tất cả các kháng nguyên trong chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế là bacterin bất hoạt nguyên vẹn, nghĩa là kháng nguyên *M. hyorhinis*, kháng nguyên *M. hyosynoviae* và/hoặc kháng nguyên *M. hyopneumoniae* là bacterin bất hoạt nguyên vẹn. Bacterin bất hoạt nguyên vẹn có thể thu được bằng phương pháp làm bất hoạt như được mô tả trong bản mô tả này. Tốt hơn là, bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.

Tốt hơn là, việc sử dụng này dẫn đến việc làm giảm bớt tỷ lệ mắc phải sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể trong đàn hoặc làm giảm mức trầm trọng của các dấu hiệu lâm sàng do sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể gây ra hoặc kết hợp với sự lây nhiễm mycoplasma cụ thể.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế. Chúng sẽ không làm giới hạn phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ theo cách bất kỳ.

Ví dụ 1

Nuôi cấy vi khuẩn mycoplasma lần lượt trong tế bào MDCK hoặc tế bào McCoy.

A. Nuôi cấy *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* và *M. hyopneumoniae* trong tế bào MDCK
M. hyorhinis:

Trypsin hoá tế bào MDCK trong bình thót cổ hợp dòng T75 và nuôi cấy thứ cấp trong 5 bình thót cổ T150 (chia tách 1:10) bằng cách sử dụng MEM + 5% FBS.

Ủ các bình thót cổ ở $37^{\circ}\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ cho đến khi quan sát được khoảng từ 95 đến 100% lớp đơn hợp dòng. Gạn môi trường và rửa nhẹ bình thót cổ hai lần bằng 1xPBS. Sau đó, thêm từ 4 đến 5ml *M. hyorhinis* vào mỗi bình thót cổ (MOI=10-100). Cho phép các bình thót cổ lây nhiễm ở cùng điều kiện ủ như trên đây trong không ít hơn 2 giờ. Sau khoảng thời gian lây nhiễm, thêm đủ lượng môi trường lây nhiễm (MEM + 2% FBS), làm ấm sơ bộ đến khoảng 37°C , vào mỗi bình thót cổ đến tổng thể tích 60ml trong mỗi bình thót cổ. Sau đó, cho phép ủ bình thót cổ cho đến khi đạt được >90% CPE (khoảng từ 3 đến 7 ngày). Sau đó, gom huyền phù tế bào từ mỗi bình thót cổ và gom cùng với nhau (lần cấy chuyển = n). Vật liệu được gom lại này được sử dụng để lây nhiễm bình thót cổ mới từ 95 đến 100% tế bào MDCK hợp dòng theo cùng cách như sự lây nhiễm trước (lần cấy chuyển = n + 1), làm gia tăng số lượng bình thót cổ được sử dụng để đạt được thể tích cuối cùng đủ theo yêu cầu (cấy chuyển = n + 2, cấy chuyển = n + 3, v.v).

M.hyosynoviae

M. hyosynoviae được nuôi cấy theo cùng cách như *M. hyorhinis* với vài biến đổi: môi trường lây nhiễm chứa DMEM + 2% FBS + 1% dung dịch arginin; *M.hyosynoviae* thường không thể hiện CPE, do đó, sự thay đổi màu và độ đục của môi trường là chỉ thị then chốt để thực hiện nuôi cấy thứ cấp cho bước tiếp theo.

M.hyopneumoniae

M.hyopneumoniae được nuôi cấy theo cùng cách như *M. hyorhinis*. Phụ thuộc vào chủng được sử dụng cho sự lây nhiễm, CPE có thể có mặt hoặc có thể không có mặt. Do đó, sự thay đổi màu và vẩn đục của môi trường có thể được sử dụng như vật chỉ thị để nuôi cấy thứ cấp cho bước tiếp theo.

B. Điều kiện nuôi cấy đối với *M. hyorhinis*, *M.hyosynoviae* và *M.hyopneumoniae* trong tế bào McCoy

M. hyorhinis:

Tế bào McCoy được sinh trưởng ở dạng nuôi cấy huyền phù trong bình thót cổ khuấy trong EMEM được cải biến được bổ sung 10% FBS. Tế bào được nuôi cấy thứ cấp bằng cách cấy bình thót cổ mới sao cho để có số lượng cuối cùng bằng

từ 10^5 đến 10^6 tế bào/ml. Đối với *M. hyorhinis*, 500ml tế bào ở từ 10^5 đến 10^6 tế bào/ml trong bình thót cổ 3L được cấy bằng 1ml từ 10^7 đến 10^8 CFU. Sau đó, ủ bình thót cổ ở 37°C với sự có mặt của 5% CO_2 trên đĩa khuấy từ tính trong từ 3 đến 7 ngày. Sự sinh trưởng của mycoplasma được xác định bằng sự thay đổi độ pH axit có thể nhìn thấy và sự gia tăng vẩn đục. Sự sinh trưởng của mycoplasma cũng được đánh giá bằng thử nghiệm PFU để xác định số lượng.

M.hyosynoviae

M.hyosynoviae được nuôi cấy theo cách tương tự như *M. hyorhinis*. Cấy năm trăm ml tế bào ở nồng độ từ 10^5 đến 10^6 tế bào/ml trong bình thót cổ 3L bằng 1ml từ 10^5 đến 10^7 CFU. Sau đó, ủ bình thót cổ ở 37°C với sự có mặt của 5% CO_2 trên đĩa khuấy từ tính trong khoảng 2 tuần. Sự thay đổi độ pH và sự gia tăng vẩn đục được sử dụng để xác định sự sinh trưởng ngoài thử nghiệm PFU để xác định số lượng.

M.hyopneumoniae

M.hyopneumoniae được nuôi cấy theo cách tương tự như *M. hyorhinis* và *M.hyosynoviae*. Cấy năm trăm ml tế bào ở từ 10^5 đến 10^6 tế bào/ml trong bình thót cổ 3L bằng 1ml từ 10^5 đến 10^7 CFU. Sau đó, ủ bình thót cổ ở 37°C với sự có mặt của 5% CO_2 trên đĩa khuấy từ tính trong khoảng 2 tuần. Sự thay đổi độ pH và sự gia tăng vẩn đục có thể được sử dụng để xác định sự sinh trưởng ngoài thử nghiệm PFU để xác định số lượng.

C. Nuôi cấy các loài mycoplasma bằng các kiểu huyết thanh khác nhau

Để đánh giá nếu các loài mycoplasma có thể được nuôi cấy trong các huyết thanh có nguồn gốc khác nhau, tế bào MDCK được lây truyền *M. hyorhinis* và lần lượt được nuôi cấy trong huyết thanh bào thai bò, huyết thanh của lợn, huyết thanh của thỏ, huyết thanh của gà hoặc huyết thanh của ngựa. Việc nuôi cấy *M. hyorhinis* trong tế bào MDCK được thực hiện như được mô tả trên đây (5% huyết thanh dùng cho sự sinh trưởng tế bào và 2% dùng cho sự lây nhiễm). Để thử nghiệm nếu các loài mycoplasma có thể được nuôi cấy trong các kiểu huyết thanh khác nhau, tế bào MDCK được lây nhiễm *M. hyorhinis* và được thu nhận ở bốn ngày sau lây nhiễm/phương pháp tiêu chuẩn. Thử nghiệm CCU (đơn vị thay đổi màu) được thực

hiện để xác định độ chuẩn sống của *M. hyorhinitis*. Hơn nữa, qPCR (phản ứng chuỗi polymeraza thời gian thực định lượng) được thực hiện để xác định tổng hàm lượng hệ gen của *M. hyorhinitis*.

Bảng 1: Nuôi cấy *M. hyorhinitis* với các kiểu huyết thanh khác nhau

Kiểu huyết thanh	qPCR log (gc/ μ l)	CCU50 (log/ml)
Huyết thai bào thai bò	6,15	8,00
Huyết thanh của lợn	6,06	8,50
Huyết thanh của thỏ	6,11	8,33
Huyết thanh của gà	6,31	8,00
Huyết thanh của ngựa	6,49	9,00

Bảng 1 thể hiện rằng độ chuẩn được đo bằng thử nghiệm CCU hoặc qPCR là tương tự đối với các kiểu huyết thanh khác nhau. Hơn nữa, các dữ liệu thẩm tách western (không được thể hiện) hỗ trợ các dữ liệu này. Do đó, *M. hyorhinitis* có thể được nuôi cấy trong tế bào MDCK không kể đến kiểu huyết thanh mà được sử dụng cho việc nuôi cấy.

Ví dụ 2

Tạo ra vacxin.

Khi đời cấy chuyển cuối cùng đủ để thu nhận (>90% CPE có mặt), một chu kỳ kết đông-tan bằng đơn lẻ được thực hiện trên tất cả các bình thót cổ bằng cách đặt chúng vào trong máy làm đông lạnh <-60°C trong >2 giờ, làm tan một cách nhanh chóng ở 37°C, gom và nhóm phần tan và hút bằng pipet lên và xuống vài lần để tạo đồng nhất. Thông thường, từ 10 đến 20% glyxerol được thêm vào huyền phù này và cho phép tạo đồng nhất. Sau đó, huyền phù này được phân ước thành các thể tích thử nghiệm. Dung dịch gốc được giữ ở <-60°C cho đến khi cần thiết.

Thể tích thích hợp của dung dịch gốc trên đây được làm bất hoạt bằng 0,2% formalin. Lượng formalin dư được làm trung hoà bằng natri bisulfite tại thời gian pha

trộn vaccin. Pha trộn vaccin với tá dược Montanide™ ISA 207 VG hoặc với tá dược Carbopol®. Lưu trữ vaccin ở từ 2 đến 7°C.

Ví dụ 3

Đánh giá hiệu quả của vaccin.

Hiệu quả của vaccin được đánh giá dựa trên khả năng gây đáp ứng kháng thể (cũng như độ chuẩn bằng ELISA) sau khi dùng ở lợn.

Chăm sóc động vật

Động vật có sức khoẻ tốt và trạng thái dinh dưỡng tốt trước khi nghiên cứu được bắt đầu. Trước quy trình ngẫu nhiên hoá và ghi chép, việc kiểm tra sức khoẻ được thực hiện. Không có việc dùng thuốc nào được sử dụng trong suốt thời gian nghiên cứu. Khẩu phần ăn là thích hợp đối với lứa tuổi, tình trạng bệnh và loài động vật thử nghiệm theo quy trình thao tác tiêu chuẩn thuận lợi. Nước được dùng tự do trong suốt quá trình nghiên cứu.

Đánh giá hiệu quả của vaccin *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae* sau khi dùng ở lợn.

M. hyorhinis:

Lợn thông thường ở 6 tuần $\pm$ 5 ngày tuổi được dùng liều 2ml (từ 7,1 đến 7,3 log₁₀ CCU/liều) cho tất cả các động vật vào D0 và một lần nữa vào D21, trong cơ, vaccin *M. hyorhinis*. *M. hyorhinis* được nuôi cấy trong tế bào MDCK như được mô tả trên đây. Vaccin được bổ sung tá dược với Montanide ISA207VG hoặc CARBOPOL®. PBS được sử dụng làm giả dược. Quan sát lợn hàng ngày đối với sức khoẻ tổng thể. Lấy mẫu máu trước khi dùng vaccin ở D0, 7, 14, 21, 28, 35 và 42. Huyết thanh được thử nghiệm đối với kháng thể đặc hiệu *M. hyorhinis* bằng BIVI R&D Indirect ELISA. Đối với BIVI R&D ELISA, tỷ lệ S/P >0,200 được xem là dương tính.

Như được thể hiện trong bảng 2, *M. hyorhinis* ELISA cho biết sự đáp ứng kháng thể mạnh. 6/6 (100%) động vật được dùng vaccin *M. hyorhinis*-MDCK + Montanide ISA207VG là dương tính hai tuần sau liều thứ nhất (D14). Tất cả động vật vẫn còn dương tính đến D42, với liều cao trong độ chuẩn được ghi chép một tuần sau

liều thứ hai (D28). Động vật được dùng vaccin với *M. hyorhinis*-MDCK + Carbopol cũng thể hiện sự đáp ứng kháng thể.

Bảng 2: Kết quả *M. hyorhinis* ELISA

	Pre	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42
<i>M. hyorhinis</i> MDCK + Montanide ISA207VG	0,00	0,003	0,043	0,972	1,123	1,340	1,152	1,133
<i>M. hyorhinis</i> MDCK + CARBOPOL®	0,002	0,018	0,059	0,095	0,122	0,354	0,375	0,409
Giả dược (PBS)	0,001	0,005	0,011	0,015	0,021	0,031	0,057	0,070

Các kết quả tương tự đối với sự đáp ứng kháng thể sau khi dùng vaccin đã thu được bằng cách sử dụng *M. hyorhinis* được nuôi cấy trong tế bào McCoy (các dữ liệu không được thể hiện). Tương tự, các kết quả tương tự đối với sự đáp ứng kháng thể sau khi dùng vaccin đạt được ở lợn 3 tuần $\pm$ 5 ngày tuổi, các dữ liệu không được thể hiện. Các kết quả tương tự thu được sau khi dùng liều đơn, các dữ liệu không được thể hiện.

M. hyopneumoniae

Lợn thông thường ở 6 tuần $\pm$ 5 ngày tuổi được dùng liều 2ml (từ 8,0 đến 8,5 log₁₀ CCU/liều) cho tất cả các động vật vào D0 và một lần nữa vào D21, trong cơ, vaccin *M. hyopneumoniae*. Vaccin được bổ sung tá dược với Montanide ISA207VG. PBS được sử dụng làm giả dược. Quan sát lợn hàng ngày đối với sức khỏe tổng thể. Gom máu trước khi dùng vaccin ở D0, 7, 14, 21, 28, 35 và 42 để thử nghiệm bằng IDEXX ELISA thương mại đối với sự có mặt của kháng thể *M. hyopneumoniae*. Đối với IDEXX ELISA, tỷ lệ S/P >0,400 được cho là dương tính.

Như được thể hiện trong bảng 3, *M. hyopneumoniae* ELISA cho biết sự đáp ứng kháng thể mạnh. Đối với động vật được dùng vaccin *M. hyopneumoniae* MDCK + ISA207, 3/6 (50%) động vật là dương tính vào D14 và 5/6 (83,3%) vào D21 với 6/6 (100%) dương tính vào D28, 35 và 42.

Bảng 3: Kết quả *M. hyopneumoniae* IDEXX ELISA

	Pre	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42
<i>M. hyopneumoniae</i> MDCK +Montanide ISA207VG	-0,024	-0,022	0,034	0,601	0,949	1,775	1,986	1,895
Giả dược (PBS)	-0,019	0,011	-0,021	-0,015	-0,025	-0,025	0,016	0,016

Các kết quả tương tự thu được sau khi dùng liều đơn, dữ liệu không được thể hiện.

Ví dụ 4

Hiệu quả của vaccin thu được từ vi khuẩn mycoplasma được nuôi cấy trong dòng tế bào nhân chuẩn đối lại vaccin thu được từ vi khuẩn mycoplasma được nuôi cấy trong hệ không chứa tế bào.

54 động vật CD/CD ở 8 tuần $\pm$ 5 ngày tuổi được chia thành sáu nhóm. Mỗi nhóm V1 và V2 lần lượt nhận thể phân lập MHRN001 bất hoạt của *M. hyorhinis* được nuôi cấy trong tế bào MDCK và CM (môi trường phức hệ; như môi trường được tạo thành chủ yếu từ proteoza pepton chứa huyết thanh của lợn và dịch chiết nấm men hoặc môi trường được tạo thành chủ yếu từ Friis); Nhóm V3 và V4 lần lượt nhận thể phân lập MHRN002 bất hoạt của *M. hyorhinis* được nuôi cấy trong tế bào MDCK và CM. Tất cả vaccin được bổ sung tá dược Montanide ISA207VG; liều 2x2ml và đường dùng là tiêm trong cơ với một liều được dùng vào D0 và liều thứ hai vào D21. Nhóm CC (nhóm đối chứng) nhận giả dược không chứa kháng nguyên (PBS) theo cùng cách. Nhóm SC (đối chứng nghiêm ngặt) không nhận điều trị trong suốt quá trình nghiên cứu, phục vụ như động vật đối chứng nghiêm ngặt. Vào D42,

43 và 44, lợn trong các nhóm từ V1 đến V4 và CC được thử thách với *M. hyorhinis* độc. Liều và đường dùng lần lượt là 40ml trong màng bụng, 15ml trong tĩnh mạch và 15ml trong mũi. Lấy máu hàng tuần từ D0 đến khi kết thúc nghiên cứu (D58) để thử nghiệm ELISA đặc hiệu *M. hyorhinis*. Đối với R&D *M. hyorhinis* ELISA, tỷ lệ S/P > 0,200 được cho là dương tính. Trong nghiên cứu ví dụ được biểu thị trong bảng 4, toàn bộ số lợn trong nhóm SC vẫn âm tính trong suốt quá trình nghiên cứu, cho biết việc thiếu sự phơi nhiễm với *M. hyorhinis*. Các nhóm từ V1 đến V4 và CC âm tính vào D0 và 7. Tuy nhiên, các kết quả huyết thanh thay đổi rất lớn giữa vacxin được tạo thành chủ yếu từ CM và được tạo thành chủ yếu từ MDCK. Khi so sánh với vacxin được tạo thành chủ yếu từ CM, vacxin được tạo thành chủ yếu từ MDCK thể hiện sự khởi phát sớm hơn về việc chuyển hoá huyết thanh, số lượng lớn lợn dương tính với huyết thanh và độ chuẩn huyết thanh cao hơn.

Bảng 4: Kết quả *M. hyorhinis* ELISA

Tỷ lệ S/P trung bình <i>M. hyorhinis</i> ELISA theo nhóm									
Nhóm	D0	D7	D14	D21	D28	D35	D42	D49	D58
MHRN001 -	-0,002	0,010	0,199	0,482	0,916	0,971	0,929	1,056	0,991
MHRN001 - CM (V2)	0,001	0,009	0,031	0,081	0,395	0,401	0,370	0,793	0,770
MHRN002 -	0,004	0,014	0,157	0,424	0,981	1,023	0,953	1,097	1,086
MHRN002 - CM (V4)	0,003	0,011	0,017	0,047	0,298	0,299	0,263	0,704	0,608
Giả dược (CC)	0,004	0,004	0,009	0,023	0,021	0,029	0,031	0,262	0,433
Đối chứng nghiêm ngặt (SC)	-0,003	-0,002	-0,003	0,005	0,008	0,015	0,021	0,031	0,060

Hơn nữa, các thử nghiệm độ chuẩn được thực hiện để hỗ trợ rằng vaccin được tạo thành chủ yếu từ nuôi cấy tế bào dẫn đến các kết quả huyết thanh tốt hơn so với vaccin từ vi khuẩn mycoplasma được nuôi cấy trong hệ không chứa tế bào.

M. hyorhinis lần lượt được nuôi cấy trong tế bào McCoy như được mô tả trên đây hoặc được nuôi cấy trong CM (môi trường phức hệ).

Vaccin được tạo thành với kháng nguyên McCoy bằng cách sử dụng kháng nguyên không pha loãng ("McCoy + toàn bộ ISA"), 1:10 kháng nguyên ("McCoy + 1:10 ISA") và 1:100 kháng nguyên ("McCoy + 1:100 ISA") được trộn theo tỷ lệ 1:1 với tá dược Montanide ISA207VG. Vaccin sử dụng kháng nguyên có nguồn gốc CM được tạo thành cũng theo cách nêu trên.

Lợn (ba tuần tuổi tại thời điểm dùng vaccin) được dùng vaccin với liều đơn 2mL được dùng IM vào Ngày 0.

Kết quả trung bình của nhóm tất cả là "âm tính" trước khi thử thách (từ D0 đến D21), đầy đủ và 1:10 McCoy thể hiện các đáp ứng có xu hướng về phía dương tính. Ở một tuần sau thử thách (D28), tất cả các nhóm dùng vaccin là đáp ứng với việc loại trừ CM 1:100.

Dựa vào bảng 5, rõ ràng rằng mỗi kiểu kháng nguyên (McCoy, CM) thể hiện tác dụng hiệu chuẩn tiêu chuẩn (toàn phần $>1:10 > 1:100$). Hơn nữa, dựa vào bảng 5, rõ ràng rằng việc dùng vaccin "McCoy + toàn bộ ISA" và "McCoy + 1:10 ISA" có điểm số trung bình cao hơn so với kháng nguyên "CM + toàn bộ ISA" và kết quả này duy trì cho đến khi kết thúc ở D42. Về mặt kỹ thuật, chỉ có các nhóm với dương tính ($S/P \geq 0,200$) các kết quả trung bình sau thử thách là các nhóm "McCoy + toàn bộ ISA" và "McCoy + 1:10 ISA". Do đó, vaccin đầy đủ McCoy và pha loãng 1:10 thể hiện sự đáp ứng huyết thanh cao hơn so với vaccin đầy đủ CM cả trước thử thách và sau thử thách. Thậm chí hơn nữa, các động vật được dùng vaccin McCoy 1:100 vẫn thể hiện sự đáp ứng có thể phân biệt được với giả dược (không dùng vaccin) và các nhóm CM 1:100 (đáp ứng CM 1:100 hoặc thiếu CM 1:100, là tương tự với không dùng vaccin).

Bảng 5: Kết quả *M. hyorhinis* ELISA

Tỷ lệ S/P trung bình <i>M. hyorhinis</i> ELISA theo nhóm							
Nhóm	DO	D7	D14	D21	D28	D35	D42
McCoy + ISA đầy đủ	0,002	0,012	0,032	0,117	0,312	0,298	0,325
McCoy + ISA 1:10	0,000	0,005	0,065	0,107	0,291	0,193	0,221
McCoy + ISA 1:100	0,001	0,001	-0,001	0,000	0,145	0,118	0,150
CM + ISA đầy đủ	0,002	0,009	0,011	0,034	0,190	0,163	0,190
CM + ISA 1:10	-0,001	0,017	0,003	0,014	0,114	0,132	0,176
CM + ISA 1:100	-0,002	0,000	-0,002	0,001	0,019	0,043	0,093
Giả dược: PBS + ISA	-0,001	0,002	-0,002	-0,002	0,021	0,039	0,081
Đối chứng nghiêm ngặt	-0,002	-0,001	-0,002	-0,002	-0,002	0,008	0,024

Ví dụ 5

Hiệu quả của vaccin đa hoá trị bao gồm kháng nguyên của *M. hyosynoviae*, *M. hyopneumoniae* và *M. hyorhinis*.

Trong nghiên cứu này, 15 động vật CD/CD ở 11 tuần $\pm$ 5 ngày tuổi được dùng liều đơn 2mL, IM, của vaccin tổ hợp *Mycoplasma* nguyên mẫu (prototype) hoá trị ba. Vaccin này gồm có *M. hyorhinis* bất hoạt, *M. hyopneumoniae* bất hoạt và *M. hyosynoviae* bất hoạt. Tất cả các chủng mycoplasma được nuôi cấy trong tế bào MDCK. Vaccin được bổ sung tá dược Montanide ISA207VG. Thu mẫu máu hàng tuần từ Ngày 0 đến Ngày 28. Hàm lượng kháng thể trong huyết thanh cũng được kiểm tra bằng *M. hyorhinis* BIVI R&D ELISA và *M. hyopneumoniae*

IDEXX ELISA. Không có thử nghiệm huyết thanh nào đối với *M. hyosynoviae* tại thời điểm tiến hành nghiên cứu này.

M. hyorhinis ELISA cho biết sự đáp ứng kháng thể mạnh hai tuần sau khi dùng vaccin (D14), với 11/15 (73,3%) lợn dương tính và 15/15 (100%) dương tính vào ngày D21.

Kết quả *M. hyopneumoniae* IDEXX ELISA cho biết rằng bốn con lợn dương tính ($S/P > 0,400$) đối với các kháng thể *M. hyopneumoniae* vào ngày D0. Nếu bốn con lợn này được loại trừ, thì năm con lợn khác được chuyển hoá kiểu huyết thanh với *M. hyopneumoniae* trước ngày D28. Ba trong số năm con lợn dương tính vào ngày D21.

Bảng 4: Kết quả *M. hyorhinis* ELISA

Tỷ lệ S/P trung bình theo nhóm <i>M. hyorhinis</i> ELISA				
D0	D7	D14	D21	D28
0,043	0,050	0,406	0,873	0,866

Bảng 5: Kết quả *M. hyopneumoniae* IDEXX ELISA

Tỷ lệ S/P trung bình theo nhóm <i>M. hyopneumoniae</i> IDEXX ELISA				
D0	D7	D14	D21	D28
0,294	0,255	0,259	0,287	0,421

Các kết quả đối với *M. hyorhinis* cho thấy không có sự can thiệp bởi các phân đoạn còn lại trong vaccin. Ngoài ra, hàm lượng kháng nguyên *M. hyorhinis* được trộn trong vaccin tổ hợp được sử dụng trong nghiên cứu này là đủ để gây ra sự đáp ứng kháng thể có thể đo sau khi dùng liều đơn 2mL. Các kết quả *M. hyopneumoniae* thể hiện một số sự chuyển hoá kiểu huyết thanh. Hàm lượng trộn ở mức cao đối với phân đoạn này có thể là có lợi để làm tăng sự chuyển hoá kiểu huyết thanh trong các nghiên cứu khác. Tuy nhiên, các kết quả từ các phân đoạn *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae* cho thấy không có sự can thiệp bởi các loài này.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm gây miễn dịch bao gồm: a) bacterin chứa một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyorhinis* và bacterin chứa một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyosynoviae* trong đó ít nhất một bacterin của vi khuẩn *M. hyorhinis* và *M. hyosynoviae* được nuôi cấy đồng thời trong hệ tế bào nhân chuẩn chứa tế bào MDCK hoặc tế bào McCoy được sinh trưởng trong môi trường không chứa huyết thanh lợn; b) một hoặc nhiều thành phần của tế bào MDCK hoặc tế bào McCoy được thu nhận từ dịch nuôi cấy đồng thời vi khuẩn *M. hyorhinis* và *M. hyosynoviae* ở a); và c) chất mang được dụng.
2. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm gây miễn dịch này còn bao gồm bacterin bao gồm một hoặc nhiều kháng nguyên của *M. hyopneumoniae*.
3. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 1 hoặc 2, trong đó bacterin đã nêu là bacterin bất hoạt trong formalin hoặc etylenimin nhị phân (BEI).
4. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó chế phẩm gây miễn dịch này thu được bằng phương pháp bao gồm các bước: a) nuôi cấy đồng thời vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae*, và tổ hợp bất kỳ của chúng, trong hệ tế bào nhân chuẩn giảm huyết thanh và hệ tế bào không chứa huyết thanh lợn; b) thu nhận vi khuẩn mycoplasma đã nuôi cấy này ở dạng bacterin chứa các kháng nguyên mycoplasma; và c) thu nhận một hoặc nhiều thành phần của tế bào MDCK hoặc tế bào McCoy được thu nhận từ dịch nuôi cấy đồng thời các vi khuẩn *M. hyorhinis* và/hoặc *M. hyosynoviae* ở b); và d) bổ sung chất mang được dụng.
5. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 4, trong đó bacterin đã nêu chứa kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis* và/hoặc *M. hyopneumoniae*.
6. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó bacterin đã nêu chứa tổ hợp gồm các kháng nguyên mycoplasma của *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae* hoặc các kháng nguyên của *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae*.

7. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó các thành phần đã nêu của tế bào nhân chuẩn được gắn với kháng nguyên mycoplasma trong bacterin và/hoặc một hoặc nhiều kháng nguyên là bacterin bất hoạt nguyên vẹn.
8. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 7, trong đó bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin hoặc etylenimin nhị phân (binary ethylenimine - BEI).
9. Chế phẩm gây miễn dịch chứa: a) một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* và tổ hợp bất kỳ của chúng; và b) một hoặc nhiều thành phần của tế bào nhân chuẩn sơ cấp và/hoặc tế bào nhân chuẩn bắt nguồn từ thực vật hoặc động vật mà được nuôi cấy đồng thời với ít nhất một trong số các vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* và tổ hợp bất kỳ của chúng ở a).
10. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 9, trong đó kháng nguyên mycoplasma là kháng nguyên của *M. hyorhinis* và/hoặc *M. hyopneumoniae*.
11. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 9 hoặc điểm 10, trong đó kháng nguyên mycoplasma là kháng nguyên của *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae* hoặc kháng nguyên của *M. hyorhinis* và *M. hyopneumoniae* và *M. hyosynoviae*.
12. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, trong đó một hoặc nhiều thành phần của tế bào nhân chuẩn sơ cấp và/hoặc tế bào nhân chuẩn bắt nguồn từ thực vật hoặc động vật bao gồm tế bào MDCK hoặc tế bào McCoy hoặc một hoặc nhiều thành phần của nó.
13. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 12, trong đó một hoặc nhiều thành phần của tế bào nhân chuẩn sơ cấp và/hoặc tế bào nhân chuẩn bắt nguồn từ thực vật hoặc động vật bao gồm huyết thanh.
14. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 13, trong đó chế phẩm gây miễn dịch này không chứa huyết thanh của lợn.
15. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 14, trong đó các thành phần của tế bào nhân chuẩn được gắn vào kháng nguyên mycoplasma và/hoặc một hoặc nhiều kháng nguyên là bacterin bất hoạt nguyên vẹn.

16. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 15, trong đó bacterin bất hoạt nguyên vẹn là bacterin bất hoạt bằng formalin.
17. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 16, trong đó chế phẩm gây miễn dịch này có khả năng gây miễn dịch gia tăng so với chế phẩm gây miễn dịch chứa cùng kháng nguyên mycoplasma thu được từ *mycoplasma* được nuôi cấy trong hệ nuôi cấy không chứa tế bào.
18. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 17, trong đó chế phẩm gây miễn dịch này được bào chế để dùng đơn liều.
19. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 18, trong đó chất mang được dụng được chọn từ nhóm bao gồm dung môi, môi trường phân tán, chất bao, chất làm ổn định, chất pha loãng, chất bảo quản, chất chống vi khuẩn và chống nấm, chất đẳng trương, chất làm chậm sự hấp phụ, tá dược, chất kích thích miễn dịch và các tổ hợp của chúng.
20. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 19, trong đó chất mang được dụng là tá dược được chọn từ nhóm bao gồm nhôm hydroxit, nhôm phosphat, saponin, nhũ tương nước trong dầu, nhũ tương dầu trong nước, nhũ tương nước trong dầu trong nước, polyme của axit acrylic hoặc axit metacrylic, copolyme của anhydrit maleic và dẫn xuất alkenyl, copolyme khối, monophosphoryl lipit A, avridin lipit-amin, độc tố khoang ruột không ổn định nhiệt từ *E. coli*, độc tố tả, IMS 1314, muramyl dipeptit, carbome và các tổ hợp của chúng.
21. Chế phẩm gây miễn dịch bao gồm: a) một hoặc nhiều kháng nguyên mycoplasma của vi khuẩn mycoplasma được chọn từ nhóm bao gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* và tổ hợp bất kỳ của chúng; và b) một hoặc nhiều thành phần của tế bào nhân chuẩn sơ cấp và/hoặc tế bào nhân chuẩn bắt nguồn từ thực vật hoặc động vật mà được nuôi cấy đồng thời với ít nhất một vi khuẩn *mycoplasma* được chọn từ nhóm gồm *M. hyorhinis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyosynoviae* và tổ hợp bất kỳ của chúng ở a), trong đó một hoặc nhiều thành phần của tế bào nhân chuẩn sơ cấp và/hoặc tế bào nhân chuẩn bắt nguồn từ thực vật hoặc động vật bao gồm tế bào MDCK hoặc tế bào McCoy hoặc một hoặc nhiều thành phần của nó.