



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

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

(11)



1-0031795

(51)^{2013.01} A61K 39/295; A61K 39/12

(13) B

(21) 1-2014-03673

(22) 03/04/2013

(86) PCT/US2013/035088 03/04/2013

(87) WO 2013/152083 10/10/2013

(30) 61/620,175 04/04/2012 US

(45) 25/05/2022 410

(43) 26/10/2015 331A

(73) ZOETIS SERVICES LLC (US)

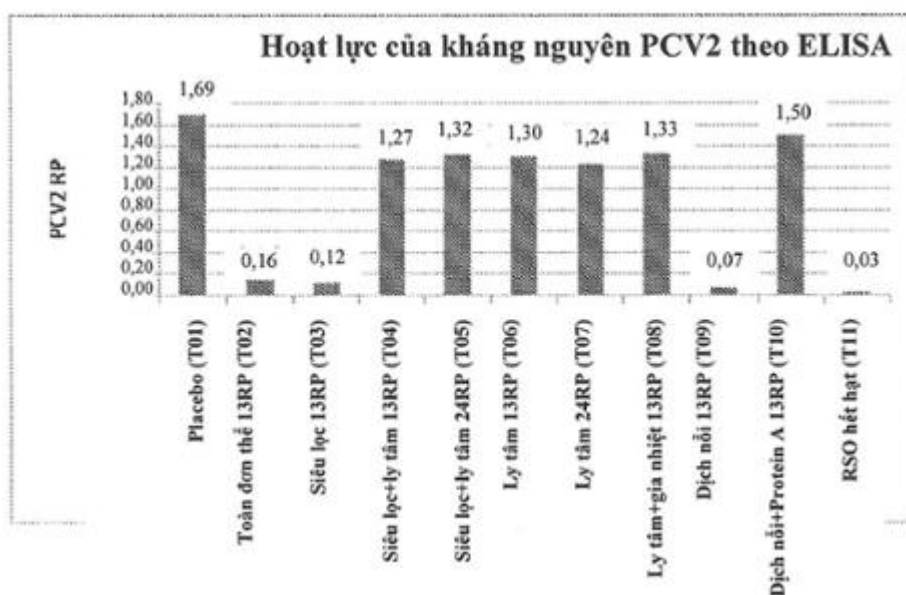
10 Sylvan Way, Parsippany, NJ 07054, United States of America

(72) Gregory P. NITZEL (US); Jeffrey E. GALVIN (US); John Keith GARRETT (US); James R. KULAWIK II (US); Tracy L. RICKER (US); Megan Marie SMUTZER (IN).

(74) Công ty TNHH T&T INVENMARK Sở hữu trí tuệ Quốc tế (T&T INVENMARK CO., LTD.)

(54) CHẾ PHẨM GÂY MIỄN DỊCH ĐA GIÁ, PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ VÀ KIT BAO GỒM CHẾ PHẨM GÂY MIỄN DỊCH NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch đa giá chứa phân hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo) và kháng nguyên circovirus lợn typ 2 (PCV2), trong đó phân hòa tan của chế phẩm M. hyo là hầu như không chứa cả (i) IgG lần (ii) phức hợp miễn dịch gồm kháng nguyên liên kết với globulin miễn dịch. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến kit và phương pháp bảo chế chế phẩm gây miễn dịch này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến circovirut lợn và *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae* hoặc *M. hyo*). Cụ thể, sáng chế đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch đa giá chứa phân hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *M. hyo* và kháng nguyên PCV2 và việc sử dụng nó trong vacxin phòng ngừa bệnh viêm phổi địa phương và hội chứng còi cọc sau cai sữa (Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome: PMWS) cho lợn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh viêm phổi địa phương, còn gọi là bệnh viêm phổi mycoplasma, do *M. hyo* gây ra. Bệnh này là bệnh mạn tính không gây chết, ảnh hưởng đến lợn ở tất cả các độ tuổi. Lợn bị nhiễm chỉ biểu hiện các triệu chứng nhẹ gồm ho và sốt, song bệnh tác động đáng kể đến kinh tế do hiệu quả thức ăn giảm và mức tăng trọng giảm. Bệnh viêm phổi địa phương lây truyền từ lợn sang lợn qua đường mũi bởi các sinh vật sống trong không khí bật ra từ phổi của lợn bị nhiễm. Bệnh nhiễm tiên phát bởi *M. hyo* có thể kèm theo bệnh nhiễm thứ phát bởi các loài mycoplasma khác (*Mycoplasma hyorhinis* và *Mycoplasma flocculare*) cũng như các tác nhân gây bệnh vi khuẩn khác.

M. hyo là vi sinh vật nhỏ không có nhân điển hình, có khả năng sống tự do, mặc dù nó thường được phát hiện liên quan đến các tế bào có nhân điển hình do nó có các nhu cầu tuyệt đối về các sterol và axit béo ngoại sinh. Các nhu cầu này thường đòi hỏi phải sinh trưởng trong môi trường chứa huyết thanh. *M. hyo* được bao bọc bởi màng tế bào, song không có thành tế bào.

Sự kết hợp cơ học của mycoplasma với bề mặt tế bào chủ là cơ sở cho sự phát triển và tồn tại dai dẳng của bệnh viêm phổi địa phương. *M. hyo* nhiễm vào đường hô hấp của lợn, khu trú ở khí quản, phế quản và tiểu phế quản. Mycoplasma tạo ra yếu tố dừng lông mao khiến cho các lông mao lót đường hô hấp dừng rung. Cuối cùng, các lông mao này thoái hóa, khiến cho lợn dễ bị nhiễm các tác nhân gây bệnh thứ cấp. Các tổn thương đặc trưng ở các vùng cổ kết từ tím đến xám được quan sát ở động vật bị nhiễm. Các nghiên cứu ở lợn sát sinh chỉ ra mức độ tổn thương từ 30 đến 80% số lợn. Kết quả từ 37 đàn ở 13 trạng thái chỉ ra rằng 99% số đàn có lợn bị tổn thương viêm

phổi điển hình của bệnh viêm phổi địa phương. Do đó, rất cần có các phương pháp phòng và điều trị hữu hiệu.

Các chất kháng sinh như tiamulin, trimethoprim, tetracyclin và lincomycin có lợi nhất định, song lại đắt tiền và cần phải dùng kéo dài. Ngoài ra, chất kháng sinh chưa được chứng minh là loại bỏ một cách hữu hiệu sự lây lan và tái nhiễm của *M. hyo*. Đôi khi, việc ngăn ngừa bằng cách duy trì đàn lợn không có tác nhân gây bệnh là khả thi song sự tái nhiễm *M. hyo* thường xảy ra. Do hậu quả kinh tế nghiêm trọng của bệnh viêm phổi lợn, vacxin phòng ngừa *M. hyo* đã được tìm kiếm. Các vacxin chứa chế phẩm sinh vật mycoplasma sinh trưởng trong môi trường chứa huyết thanh đã được bán trên thị trường, song phát sinh các vấn đề liên quan đến phản ứng phụ do các thành phần huyết thanh gây ra (như phức hợp miễn dịch hoặc protein đặc hiệu không gây miễn dịch) có mặt trong chất gây miễn dịch. Các nỗ lực khác tạo ra vacxin *M. hyo* đã thành công, song bệnh vẫn lan rộng.

M. hyo và circovirut lợn typ 2 (porcine circovirus type 2: PCV2) là hai tác nhân gây bệnh phổ biến nhất gặp phải trong ngành công nghiệp lợn. Lợn bị nhiễm PCV2 có triệu chứng thường được gọi là hội chứng còi cọc ở lợn sau cai sữa (Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome: PMWS). PMWS được đặc trưng về mặt lâm sàng là hốc hác, da nhợt nhạt, lông thô ráp, khó thở, tiêu chảy và vàng da. Ngoài PMWS, PCV2 liên quan đến một số bệnh nhiễm khác bao gồm bệnh giả dại, hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome: PRRS), bệnh Glasser, bệnh viêm màng não do liên cầu khuẩn, bệnh nhiễm salmonella, bệnh nhiễm *E. coli* sau cai sữa, bệnh viêm gan dinh dưỡng, và bệnh viêm phế quản-phổi mưng mủ. *M. hyo* liên quan đến bệnh viêm phổi địa phương và cũng đã được chỉ ra là một trong số các đồng nhân tố chính trong quá trình phát triển bệnh liên quan đến circovirut lợn (Porcine Circovirus Associated Disease: PCVAD).

Hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRS) là do arterivirut gây ra, virut này có ái lực đặc biệt với các đại thực bào, cụ thể là các đại thực bào được tìm thấy trong phổi (đại thực bào phế nang). Các đại thực bào này tiêu hóa và loại bỏ các vi khuẩn và virut xâm nhập, song không phải là trường hợp của virut PRRS. Trong trường hợp của virut PRRS, nó nhân lên bên trong đại thực bào tạo nhiều virut hơn và tiêu diệt đại thực bào. Khi PRRSV đã đi vào đàn lợn, nó vẫn hiện diện và hoạt động không xác định. Có tới 40% số đại thực bào bị phá hủy, điều này cho phép vi khuẩn và các virut khác sinh sản

và gây hại. Một ví dụ về trường hợp này là mức độ nghiêm trọng của bệnh viêm phổi địa phương gia tăng đáng kể ở các bộ phận đang lớn/kết thúc khi chúng trở nên bị nhiễm virus PRRS. Hơn một nửa số lợn âm tính với virus PRRS ở độ tuổi cai sữa bị nhiễm trước khi đưa ra thị trường.

Cần có chế phẩm gây miễn dịch kết hợp PCV2/M. hyo phòng ngừa cả bệnh nhiễm PCV2 lẫn mycoplasma ở lợn. Tốt hơn, nếu chế phẩm gây miễn dịch đa giá là tương thích với các kháng nguyên khác của lợn, như kháng nguyên virus PRRS. Rất cần có vacxin kết hợp PCV2/M. hyo đơn liều dùng ngay trong một lọ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch đa giá chứa phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo) và kháng nguyên circovirus lợn typ 2 (PCV2), trong đó phần hòa tan của chế phẩm M. hyo là hầu như không chứa cả (i) IgG lẫn (ii) phức hợp miễn dịch gồm kháng nguyên liên kết với globulin miễn dịch. Theo một khía cạnh, phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo đã được xử lý bằng protein-A hoặc protein-G trước khi được thêm vào chế phẩm gây miễn dịch. Theo khía cạnh khác, chế phẩm gây miễn dịch này là ở dạng chế phẩm lỏng dùng ngay.

Theo một phương án, phần hòa tan của chế phẩm M. hyo bao gồm ít nhất một kháng nguyên protein M. hyo. Theo phương án khác, phần hòa tan của chế phẩm M. hyo bao gồm hai hoặc nhiều kháng nguyên protein M. hyo.

Theo một phương án, chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế tạo ra đáp ứng miễn dịch phòng ngừa kháng cả M. hyo lẫn PCV2. Theo một phương án, kháng nguyên PCV2 là ở dạng circovirus typ 1-typ 2 dạng khảm, virus dạng khảm này bao gồm circovirus typ 1 tái tổ hợp bất hoạt ở lợn biểu hiện protein ORF2 của circovirus lợn typ 2. Theo phương án khác, kháng nguyên PCV2 là ở dạng protein ORF2 tái tổ hợp. Theo phương án khác nữa, protein ORF2 tái tổ hợp được biểu hiện từ vector baculovirus.

Theo một số phương án, chế phẩm gây miễn dịch PCV2/M. hyo theo sáng chế còn chứa ít nhất một kháng nguyên bổ sung. Theo một phương án, ít nhất một kháng nguyên bổ sung phòng ngừa vi sinh vật mà có thể gây bệnh ở lợn.

Theo một phương án, vi sinh vật bao gồm vi khuẩn, virus hoặc động vật nguyên sinh. Theo phương án khác, vi sinh vật được chọn từ, nhưng không chỉ giới hạn ở, nhóm bao gồm: virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus: PRRSV), parvovirus ở lợn (porcine parvovirus: PPV),

Haemophilus parasuis, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus hyicus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, vi khuẩn *leptospira*, *Lawsonia intracellularis*, virut cúm ở lợn (swine influenza virus: SIV), kháng nguyên *Escherichia coli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, coronavirut hô hấp ở lợn, virut gây dịch tiêu chảy ở lợn (Porcine Epidemic Diarrhea: PED), rotavirut, virut Torque teno (TTV), virut cực bào ở lợn, virut đường ruột ở lợn, vectơ gây bệnh viêm não-cơ tim, tác nhân gây bệnh Aujesky, dịch tả lợn (Classical Swine fever: CSF) và tác nhân gây bệnh viêm dạ dày-ruột truyền nhiễm ở lợn, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một số phương án, chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo sáng chế còn chứa tá dược. Theo một phương án, tá chất được chọn từ, nhưng không chỉ giới hạn ở, các tá chất sau: tá chất dầu trong nước, tá chất polyme và nước, tá chất nước trong dầu, tá chất nhôm hydroxit, tá chất vitamin E và tổ hợp của chúng. Theo phương án khác, chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo sáng chế còn chứa chất mang dược dụng.

Theo một số phương án, chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo sáng chế tạo ra đáp ứng miễn dịch phòng ngừa cả M. hyo lẫn PCV2 khi được dùng dưới dạng liều duy nhất. Theo các phương án khác, chế phẩm gây miễn dịch này tạo ra đáp ứng miễn dịch phòng ngừa M. hyo, PCV2 và ít nhất một vi sinh vật bổ sung mà có thể gây bệnh ở lợn khi được dùng dưới dạng liều duy nhất. Theo phương án khác nữa, chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo sáng chế tạo ra đáp ứng miễn dịch phòng ngừa cả M. hyo lẫn PCV2 khi được dùng dưới dạng hai liều.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp gây miễn dịch cho lợn kháng M. hyo và PCV2. Phương pháp này bao gồm việc cho lợn sử dụng chế phẩm gây miễn dịch đa giá chứa phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo và kháng nguyên circovirut lợn typ 2 (PCV2), trong đó phần hòa tan của chế phẩm M. hyo là hầu như không chứa cả (i) IgG lẫn (ii) phức hợp miễn dịch gồm kháng nguyên liên kết với globulin miễn dịch. Theo một phương án, phần hòa tan của chế phẩm M. hyo của chế phẩm gây miễn dịch đa giá được dùng chứa ít nhất một kháng nguyên protein M. hyo.

Theo một phương án của sáng chế, chế phẩm gây miễn dịch đa giá được dùng qua đường trong bắp, qua đường trong da, qua đường da hoặc qua đường dưới da. Theo phương án khác của sáng chế, chế phẩm gây miễn dịch đa giá được dùng trong một liều

duy nhất. Theo phương án khác nữa của sáng chế, chế phẩm gây miễn dịch đa giá được dùng dưới dạng hai liều.

Theo phương án khác của sáng chế, chế phẩm gây miễn dịch đa giá PCV2/M. hyo được dùng kết hợp với ít nhất một kháng nguyên bổ sung phòng ngừa vi sinh vật mà có thể gây bệnh ở lợn, như một hoặc nhiều vi sinh vật được mô tả trên đây. Các kháng nguyên khác này có thể được dùng đồng thời với chế phẩm PCV2/M. hyo (tức là dưới dạng các chế phẩm gây miễn dịch đơn lẻ riêng biệt) hoặc kết hợp thành chế phẩm gây miễn dịch dùng ngay.

Theo phương án khác, chế phẩm gây miễn dịch đa giá được dùng cho lợn có kháng thể được tạo ra từ mẹ kháng ít nhất một trong số M. hyo và PCV2. Theo phương án khác nữa, chế phẩm gây miễn dịch đa giá được dùng cho lợn có kháng thể được tạo ra từ mẹ kháng cả M. hyo lẫn PCV2.

Theo một phương án, chế phẩm gây miễn dịch đa giá được dùng cho lợn 3 tuần tuổi hoặc lớn hơn.

Sáng chế còn đề xuất kit. Kit này bao gồm lọ chứa chế phẩm gây miễn dịch đa giá. Chế phẩm gây miễn dịch đa giá này chứa cả kháng nguyên PCV2 lẫn phân hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), trong đó phân hòa tan của chế phẩm M. hyo là hầu như không chứa cả (i) IgG lẫn (ii) phức hợp kháng nguyên/globulin miễn dịch. Theo một phương án, kit này còn chứa cẩm nang hướng dẫn chứa thông tin về cách dùng chế phẩm gây miễn dịch. Theo một phương án, chế phẩm gây miễn dịch đa giá trong lọ được bào chế dưới dạng chế phẩm lỏng dùng ngay.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp bào chế chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo sáng chế. Phương pháp này bao gồm các bước: i) nuôi cấy M. hyo trong môi trường thích hợp trong khoảng thời gian từ 18 đến 144 giờ; ii) tiếp theo làm bất hoạt giống M. hyo; iii) thu hoạch dịch nuôi cấy đã được làm bất hoạt, trong đó dịch nuôi cấy đã được làm bất hoạt chứa chế phẩm toàn tế bào M. hyo chứa cả phân đoạn chất lỏng hòa tan lẫn thành phần tế bào không hòa tan; iv) tách phân đoạn chất lỏng hòa tan ra khỏi thành phần tế bào không hòa tan; v) loại bỏ hầu hết cả IgG lẫn phức hợp kháng nguyên/globulin miễn dịch ra khỏi phân đoạn chất lỏng hòa tan để tạo ra phân hòa tan của chứa chế phẩm toàn tế bào M. hyo; và vi) tiếp theo kết hợp phân hòa tan của chứa chế phẩm toàn tế bào M. hyo với kháng nguyên PCV2.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là đồ thị thể hiện hiệu quả của chế phẩm gây miễn dịch đơn giá M. hyo được bào chế bằng kháng nguyên M. hyo từ các nhóm điều trị khác nhau (T02-T10 được mô tả trong Ví dụ 3) so với thuốc vờ (T01). Kết quả được thể hiện dưới dạng % trị số trung bình bình phương tối thiểu tổn thương phổi.

Fig.2 là đồ thị thể hiện kết quả về hoạt lực của kháng nguyên PCV2 (ELISA đối với kháng nguyên PCV2) của chế phẩm gây miễn dịch M. hyo kết hợp với virus dạng khảm PCV Typ1-Typ2 chết. Virus dạng khảm này được đưa vào chế phẩm gây miễn dịch ở mức ban đầu khoảng $1,6 \leq RP$. Vị trí của mỗi mẫu được thể hiện dưới dạng hoạt lực tương đối (relative potency: RP).

Fig.3 là đồ thị thể hiện kết quả về virus huyết PCV2 (PCR định lượng đối với PCV2) quan sát được với các chế phẩm gây miễn dịch PCV/M. hyo bằng cách sử dụng các nền tá chất khác nhau.

Fig.4 là đồ thị thể hiện kết quả huyết thanh học ELISA (S/P) đối với kháng thể PCV2 quan sát được với các chế phẩm gây miễn dịch PCV/M. hyo bằng cách sử dụng các nền tá chất khác nhau vào các ngày 1, 20 và 42 dùng liều quyết định.

Fig.5 là đồ thị thể hiện mức thải PCV2 qua phân thu được với các nhóm điều trị T02-T04 được mô tả trong Ví dụ 7 so với thuốc vờ (T01). Kết quả được thể hiện dưới dạng số bản sao ADN của PCV2/ml.

Fig.6 là đồ thị thể hiện mức thải PCV2 qua mũi thu được với các nhóm điều trị T02-T04 được mô tả trong Ví dụ 7 so với thuốc vờ (T01). Kết quả được thể hiện dưới dạng số bản sao ADN của PCV2/ml.

Fig.7 (A & B) là các đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm interferon-gama ($IFN-\gamma$) đo đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào (cellular mediated immune: CMI) đặc hiệu với PCV2. Kết quả sau chủng ngừa/trước khi dùng liều quyết định được thể hiện trên Fig.7A, và các kết quả sau tiêm chủng/sau liều quyết định được thể hiện trên Fig.7B. Sự kích thích 5×10^6 tế bào được coi là đáng kể (có ý nghĩa).

Fig.8 thể hiện hiệu quả của M. hyo của các chế phẩm gây miễn dịch thực nghiệm PCV2/M. hyo trong SP-dầu. Điểm số phổi đối với các chế phẩm sử dụng các nhóm điều trị T02-T08 bằng M. hyo so với thuốc vờ (T01) được vẽ thành đồ thị trên Fig.8A. Bảng trên Fig.8B thể hiện sự trái ngược của nhóm điều trị T02-T08 với thuốc vờ.

Fig.9 là biểu đồ tiến trình thể hiện một phương án về quy trình sản xuất được dùng để bào chế kháng nguyên M. hyo đã được xử lý bằng Protein-A tương thích với PCV2.

Fig.10 là bảng thể hiện việc đánh giá tá chất về hoạt tính diệt virus PRRS.

Mô tả vắn tắt các trình tự

SEQ ID NO: 1 là một phương án về trình tự nucleotit mã hóa p46 từ chủng P-5722 của M. hyo;

SEQ ID NO: 2 là một phương án về trình tự axit amin tương ứng với p46 từ chủng P-5722 của M. hyo;

SEQ ID NO: 3 là một phương án về trình tự nucleotit mã hóa p97 từ chủng P-5722 của M. hyo;

SEQ ID NO: 4 là một phương án về trình tự axit amin tương ứng với p97 từ chủng P-5722 của M. hyo;

SEQ ID NO: 5 là một phương án về trình tự hệ gen mã hóa virus dạng khảm PCV1-2;

SEQ ID NO: 6 là một phương án về trình tự nucleotit tương ứng với ORF2 của circovirus lợn;

SEQ ID NO: 7 là một phương án về trình tự axit amin tương ứng với polypeptit ORF2 của circovirus lợn;

SEQ ID NO: 8 là một phương án về trình tự hệ gen mã hóa virus dạng khảm PCV1-2;

SEQ ID NO: 9 là một phương án về trình tự nucleotit tương ứng với ORF2 của circovirus lợn;

SEQ ID NO: 10 là một phương án về trình tự axit amin tương ứng với polypeptit ORF2 của circovirus lợn;

SEQ ID NO: 11 là một phương án về trình tự axit amin tương ứng với polypeptit ORF2 của circovirus lợn;

SEQ ID NO: 12 là một phương án về trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin SEQ ID NO: 11;

SEQ ID NO: 13 là một phương án về trình tự axit amin tương ứng với polypeptit ORF2 của circovirus lợn;

SEQ ID NO: 14 là một phương án về trình tự nucleotit mã hóa trình tự axit amin
SEQ ID NO: 13;

SEQ ID NO: 15 là một phương án về trình tự axit amin tương ứng với polypeptit
ORF2 của circovirut lợn;

SEQ ID NO: 16 là một phương án về trình tự hệ gen của dạng không độc của thể
phân lập virus PRRS Bắc Mỹ có ký hiệu P129;

SEQ ID NO: 17 là một phương án về trình tự nucleotit tương ứng với ORF2 đến
ORF5 của thể phân lập virus PRRS có ký hiệu ISU-55.

SEQ ID NO: 18 là một phương án về trình tự nucleotit tương ứng với ORF6 và
ORF7 của thể phân lập virus PRRS có ký hiệu ISU-55.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất chế phẩm gây miễn dịch đa giá chứa phân hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo) và kháng nguyên circovirut lợn typ 2 (PCV2), trong đó phân hòa tan của chế phẩm M. hyo là hầu như không chứa cả (i) IgG lẫn (ii) phức hợp miễn dịch gồm kháng nguyên liên kết với globulin miễn dịch. Theo một phương án, chế phẩm gây miễn dịch này tạo ra đáp ứng miễn dịch phòng ngừa ở lợn kháng cả PCV2 lẫn M. hyo.

Các tác giả sáng chế ngạc nhiên phát hiện ra rằng phân đoạn không hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo là không gây miễn dịch. Ngược lại, chế phẩm hòa tan M. hyo không chứa IgG là gây miễn dịch và có thể được kết hợp hữu hiệu với kháng nguyên từ các tác nhân gây bệnh khác, như PCV2, mà không cần can thiệp bằng phân tích hoặc miễn dịch học giữa các kháng nguyên. Điều này khiến cho chế phẩm hòa tan M. hyo theo sáng chế trở thành cơ sở hữu hiệu cho các chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo sáng chế, bao gồm cả các chế phẩm trong một lọ dùng ngay. Các tác giả sáng chế cũng ngạc nhiên phát hiện ra rằng việc loại bỏ globulin miễn dịch và cận tế bào không hòa tan giúp tăng cường độ an toàn của vacxin.

Như được sử dụng trong bản mô tả này và yêu cầu bảo hộ, dạng số ít bao gồm số nhiều trừ khi được chỉ rõ. Ví dụ, thuật ngữ “kháng nguyên protein” bao gồm các kháng nguyên protein, bao gồm cả hỗn hợp của chúng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “chứa” có nghĩa là các chế phẩm và phương pháp bao gồm các thành phần được viện dẫn, song không loại trừ các thành phần khác.

Như được xác định trong bản mô tả này, phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo chỉ phân đoạn lỏng hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo sau khi tách thành phần không hòa tan và loại bỏ hầu hết IgG và phức hợp miễn dịch liên kết với kháng nguyên. Phần hòa tan M. hyo có thể còn được chỉ ra trong bản mô tả này là phân đoạn dịch nổi, dịch nổi nuôi cấy hoặc thuật ngữ tương tự. Nó bao gồm các protein hòa tan do M. hyo-biểu hiện (kháng nguyên protein M. hyo) đã được tách hoặc phân lập ra khỏi protein không hòa tan, toàn vi khuẩn, và thành phần tế bào M. hyo không hòa tan khác bằng các phương pháp thông thường, như ly tâm, lọc hoặc kết tủa. Ngoài các protein hòa tan đặc hiệu M. hyo, phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo còn bao gồm các protein khác loại, như các protein dùng trong môi trường nuôi cấy để lên men M. hyo.

Thuật ngữ “kháng nguyên” chỉ hợp chất, chế phẩm hoặc chất gây miễn dịch mà có thể kích thích sự tạo ra kháng thể hoặc đáp ứng tế bào T, hoặc cả hai, ở động vật, bao gồm cả các thành phần được tiêm hoặc hấp thụ vào động vật. Đáp ứng miễn dịch có thể để tạo ra đối với toàn phân tử hoặc một phần của phân tử (ví dụ, epitop hoặc hapten).

Như được xác định trong bản mô tả này, “chế phẩm gây miễn dịch hoặc chế phẩm miễn dịch” chỉ thành phần vật chất chứa ít nhất một kháng nguyên mà tạo ra đáp ứng miễn dịch ở vật chủ thuộc đáp ứng miễn dịch tế bào hoặc đáp ứng miễn dịch có trung gian kháng thể chống lại chế phẩm hoặc vaccin.

Thuật ngữ “đáp ứng miễn dịch” như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ đáp ứng để tạo ra ở động vật. Đáp ứng miễn dịch có thể chỉ tính miễn dịch tế bào (cellular immunity: CMI); tính miễn dịch thể dịch hoặc có thể liên quan đến cả hai. Sáng chế cũng bao hàm đáp ứng được giới hạn ở một phần của hệ miễn dịch. Thông thường, “đáp ứng miễn dịch” bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều hiệu lực sau: tạo ra hoặc hoạt hóa kháng thể, tế bào B, tế bào T giúp, tế bào T ức chế, tế bào T gây độc tế bào và/hoặc tế bào T yd, kháng đặc hiệu kháng nguyên hoặc các kháng nguyên chứa trong chế phẩm hoặc vaccin nghiên cứu. Tốt hơn, nếu vật chủ sẽ biểu hiện đáp ứng miễn dịch điều trị hoặc phòng ngừa sao cho tính chống chịu đợt nhiễm mới được tăng cường và/hoặc mức độ trầm trọng lâm sàng của bệnh là giảm. Sự phòng ngừa như vậy sẽ được chứng minh bởi sự giảm hoặc thiếu các triệu chứng mà thường biểu hiện ở vật chủ bị nhiễm, thời gian phục hồi nhanh hơn và/hoặc hiệu giá virus giảm ở vật chủ bị nhiễm.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "tính gây miễn dịch" nghĩa là khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch ở động vật chủ chống lại kháng nguyên hoặc các kháng nguyên. Đáp ứng miễn dịch này tạo cơ sở cho tính miễn dịch phòng ngừa được kích thích bởi vacxin đối với sinh vật bị nhiễm cụ thể.

“Tá được” như được sử dụng trong bản mô tả này nghĩa là chế phẩm chứa một hoặc nhiều chất tăng cường đáp ứng miễn dịch với (các) kháng nguyên. Cơ chế tác động của tá chất chưa được hiểu một cách đầy đủ. Một số tá chất được tin là tăng cường đáp ứng miễn dịch bằng cách giải phóng từ từ kháng nguyên, trong khi các tá chất khác gây miễn dịch mạnh theo cách riêng của chúng và được tin là có hiệu lực hiệp đồng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "đa giá" có nghĩa là vacxin chứa nhiều hơn một kháng nguyên bất kể từ cùng loài (tức là các thể phân lập khác của *Mycoplasma hyopneumoniae*), từ loài khác (tức là các thể phân lập từ cả *Pasteurella hemolytica* lẫn *Pasteurella multocida*), hoặc vacxin chứa kết hợp các kháng nguyên từ các chủng khác nhau (ví dụ, vacxin chứa các kháng nguyên từ *Pasteurella multocida*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Haemophilus somnus* và *Clostridium*).

Thuật ngữ "lợn" hoặc "lợn con" như được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa là động vật có nguồn gốc từ lợn, trong khi "lợn nái" chỉ con cái ở độ tuổi sinh sản và có khả năng sinh sản. “Lợn cái con” là lợn cái chưa từng mang thai.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "độc" có nghĩa là thể phân lập vẫn giữ được khả năng gây nhiễm ở động vật chủ.

"Vacxin bất hoạt" có nghĩa là vacxin chứa sinh vật gây nhiễm hoặc tác nhân gây bệnh không còn khả năng sao chép hoặc sinh trưởng. Tác nhân gây bệnh này có thể có nguồn gốc vi khuẩn, virus, động vật nguyên sinh hoặc nấm. Việc bất hoạt có thể được thực hiện bằng các phương pháp khác nhau bao gồm làm lạnh-tan băng, xử lý hóa học (ví dụ, xử lý bằng thimerosal hoặc formalin), sóng âm, chiếu xạ, nhiệt hoặc phương pháp thông thường khác bất kỳ đủ để ngăn ngừa sự sao chép hoặc sinh trưởng của sinh vật này trong khi vẫn giữ được tính gây miễn dịch của nó.

Thuật ngữ “biến thể” như được sử dụng trong bản mô tả này chỉ polypeptit hoặc trình tự axit nucleic mã hóa polypeptit, mà có một hoặc nhiều biến đổi axit amin bảo toàn hoặc các cải biến nhỏ khác sao cho polypeptit tương ứng có chức năng hầu như tương đương so với polypeptit kiểu đại.

“Biến đổi bảo toàn” chỉ việc thay gốc axit amin bằng gốc khác tương tự về mặt sinh học, hoặc việc thay nucleotit trong trình tự axit nucleic sao cho gốc axit amin được mã hóa không thay đổi hoặc là gốc khác tương tự về mặt sinh học. Ví dụ về biến đổi bảo toàn bao gồm việc thay thế một gốc kỵ nước, như isoleuxin, valin, leuxin hoặc methionin cho gốc kỵ nước khác, hoặc thay thế một gốc phân cực, như thay arginin cho lysin, axit glutamic cho axit aspartic, hoặc glutamin cho asparagin, v.v.. Thuật ngữ “biến đổi bảo toàn” còn bao gồm việc sử dụng axit amin được thay thế thay cho axit amin gốc không được thay thế với điều kiện kháng thể tạo ra đối với polypeptit được thay thế cũng phản ứng miễn dịch với polypeptit không được thay thế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "chất mang được dùng" và "chất dẫn được dùng" có thể thay thế cho nhau và chỉ chất dẫn lỏng để chứa các kháng nguyên của vaccin có thể được tiêm vào vật chủ mà không gây hiệu lực phụ. Các chất mang được dùng thích hợp đã biết trong lĩnh vực này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, nước vô trùng, nước muối, glucoza, dextroza, hoặc dung dịch đệm. Chất mang có thể bao gồm chất phụ trợ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất pha loãng, chất ổn định (tức là đường và axit amin), chất bảo quản, chất làm ẩm, chất nhũ hóa, chất đệm pH, chất phụ gia tăng cường độ nhớt, chất màu và chất tương tự.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chế phẩm vaccin" chứa ít nhất một kháng nguyên hoặc chất gây miễn dịch trong chất dẫn được dùng hữu ích để tạo ra đáp ứng miễn dịch ở vật chủ. Vaccin có thể được dùng theo liều và bằng các kỹ thuật được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực y học hoặc thú y biết rõ, có xét đến các yếu tố như độ tuổi, giới tính, thể trọng, loài và tình trạng của động vật tiếp nhận và đường dùng. Đường dùng có thể là qua da, qua màng nhầy (ví dụ, qua đường miệng, qua đường mũi, qua đường hậu môn, qua đường âm đạo) hoặc ngoài đường tiêu hóa (nội bì, qua da, trong bắp, dưới da, trong tĩnh mạch hoặc trong màng bụng). Vaccin có thể được sử dụng một mình, hoặc có thể được sử dụng đồng thời hoặc theo thứ tự với các điều trị hoặc liệu pháp khác. Dạng sử dụng có thể bao gồm huyền phù, sirô hoặc còn ngọt, và các chế phẩm để dùng ngoài đường tiêu hóa, dưới da, nội bì, trong bắp hoặc trong tĩnh mạch (ví dụ, thuốc tiêm) như huyền phù hoặc nhũ tương vô trùng. Vaccin có thể được dùng dưới dạng thuốc xịt hoặc trộn vào thức ăn và/hoặc nước hoặc phân phối được dạng hỗn hợp với chất mang, chất pha loãng hoặc tá chất thích hợp như nước vô trùng, nước muối sinh lý, glucoza, hoặc chất tương tự. Vaccin có thể chứa các

chất phụ trợ như chất làm ẩm hoặc nhũ hóa, chất đệm pH, tá dược, chất tạo gel hoặc chất phụ gia tăng cường độ nhớt, chất bảo quản, chất điều vị, chất màu, và chất tương tự, tùy theo đường dùng và chế phẩm mong muốn. Sách được chuẩn, như "Remington's Pharmaceutical Sciences," 1990 có thể được tham khảo để bào chế các chế phẩm thích hợp, mà không cần thực nghiệm nhiều.

"Virus PRRS Bắc Mỹ" có nghĩa là virus PRRS có các đặc tính di truyền liên quan đến thể phân lập virus PRRS Bắc Mỹ, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, virus PRRS phân lập được lần đầu tiên ở Mỹ khoảng trước những năm 1990 (ví dụ, xem Collins, J. E., et al., 1992, J. Vet. Diagn. Invest. 4:117-126); thể phân lập virus PRRS Bắc Mỹ MN-1b (Kwang, J. et al., 1994, J. Vet. Diagn. Invest. 6:293-296); chủng Quebec LAF-exp91 của virus PRRS (Mardassi, H. et al., 1995, Arch. Virol. 140:1405-1418); và thể phân lập virus PRRS Bắc Mỹ VR 2385 (Meng, X.-J et al., 1994, J. Gen. Virol. 75:1795-1801). Các ví dụ khác về chủng virus PRRS Bắc Mỹ sẽ được mô tả trong bản mô tả này. Các đặc tính di truyền chỉ tính tương đồng về trình tự nucleotit hệ gen và tính tương đồng về axit amin giữa các chủng virus PRRS Bắc Mỹ. Các chủng virus PRRS Trung Quốc thường có khoảng 80-93% tương đồng về trình tự nucleotit với các chủng Bắc Mỹ.

"Virus PRRS châu Âu" chỉ chủng virus PRRS bất kỳ có các đặc tính di truyền liên quan đến virus PRRS phân lập được lần đầu tiên ở châu Âu vào năm 1991 (ví dụ, xem Wensvoort, G., et al., 1991, Vet. Q. 13:121-130). Đôi khi, "virus PRRS châu Âu" còn được biết đến trong lĩnh vực này là "virus Lelystad". Ví dụ khác về các chủng virus PRRS châu Âu sẽ được mô tả trong bản mô tả này.

Virus được cải biến di truyền là "giảm độc lực" nếu nó ít độc hơn so với chủng gốc không được cải biến. Một chủng là "ít độc hơn" nếu nó biểu hiện mức giảm có ý nghĩa thống kê ở một hoặc nhiều thông số xác định mức độ nghiêm trọng của bệnh. Các thông số này có thể bao gồm mức virus huyết, sốt, mức độ nghiêm trọng của chứng khó thở, mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng sinh sản, số lượng hoặc mức độ nghiêm trọng của các tổn thương phổi, v.v.

"Dòng gây nhiễm" là hệ gen được phân lập hoặc được nhân dòng của tác nhân gây bệnh (ví dụ, virus) mà có thể được cải biến một cách đặc hiệu và có chủ đích trong phòng thí nghiệm và tiếp theo dùng để tái tạo sinh vật được cải biến di truyền sống. Virus được cải biến di truyền sống được tạo ra từ dòng gây nhiễm có thể được sử dụng

trong vacxin virus sống. Theo cách khác, vacxin virus bất hoạt có thể được bào chế bằng cách xử lý virus sống được tạo ra từ dòng gây nhiễm bằng các tác nhân làm bất hoạt như formalin hoặc dung môi kỵ nước, axit, v.v., bằng cách chiếu ánh sáng cực tím hoặc tia X, bằng cách gia nhiệt, v.v.

Tất cả các vacxin M. hyo hiện có đều được bào chế từ các chế phẩm mycoplasma toàn tế bào chết (bacterin). Ngược lại, sáng chế sử dụng phân hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), trong đó phân hòa tan của chế phẩm M. hyo là hầu như không chứa cả (i) IgG lẫn (ii) phức hợp miễn dịch gồm kháng nguyên liên kết với globulin miễn dịch.

M. hyo có các nhu cầu tuyệt đối về các sterol và axit béo ngoại sinh. Các nhu cầu này thường đòi hỏi M. hyo phải sinh trưởng trong môi trường chứa huyết thanh, như huyết thanh lợn. Việc tách chất không hòa tan ra khỏi phân hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo (ví dụ, bằng cách ly tâm, lọc hoặc kết tủa) không loại bỏ IgG hoặc phức hợp miễn dịch của lợn. Theo một phương án của sáng chế, phân hòa tan của M. hyo được xử lý bằng protein-A hoặc protein-G để hầu như loại bỏ IgG và phức hợp miễn dịch chứa trong dịch nổi nuôi cấy. Theo phương án này, cần hiểu rằng bước xử lý bằng protein A diễn ra sau bước lên men M. hyo. Bước này còn được đề cập trong bản mô tả này là xử lý bằng protein A xuôi dòng. Theo phương án khác, việc xử lý môi trường sinh trưởng bằng protein A ngược dòng (tức là trước khi lên men M. hyo) có thể được sử dụng. Protein A liên kết với phần Fc của IgG. Protein G liên kết chủ yếu với phần Fc của IgG, song cũng có thể liên kết với vùng Fab. Phương pháp tinh chế/loại bỏ IgG tổng số ra khỏi hỗn hợp protein, như dịch nổi nuôi cấy mô, huyết thanh và dịch cổ trướng là được biết rõ trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án, phân hòa tan của chế phẩm M. hyo bao gồm ít nhất một kháng nguyên protein M. hyo. Theo các phương án khác, phân hòa tan của chế phẩm M. hyo chứa hai hoặc nhiều kháng nguyên protein M. hyo.

Theo một phương án, phân đoạn dịch nổi M. hyo chứa một hoặc nhiều kháng nguyên protein đặc hiệu với M. hyo sau: Các protein M. hyo có trọng lượng phân tử khoảng 46kD (p46), 64kD (p64) và 97kD (p97). Theo phương án khác, phân đoạn dịch nổi ít nhất là chứa các protein M. hyo p46, p64 và p97. Protein M. hyo có trọng lượng phân tử 64kD (p64) có thể còn được đề cập trong bản mô tả này là kháng nguyên bề

mặt p65 từ *M. hyo* được mô tả bởi Kim và các đồng tác giả [Infect. Immun. 58(8):2637-2643 (1990)], cũng như trong bằng sáng chế Mỹ số 5,788,962.

Futo và các đồng tác giả mô tả việc nhân dòng và xác định đặc điểm của protein bề mặt 46kD từ *M. hyo*, protein này có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế [J. Bact 177: 1915-1917 (1995)]. Theo một phương án, dịch nổi nuôi cấy *M. hyo* chứa p46 mà các trình tự nucleotit và axit amin tương ứng của nó từ chủng P-5722 lần lượt được nêu trong các SEQ ID NO: 1 và 2. Theo phương án khác, biến thể của các trình tự p46 này có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế, như được mô tả dưới đây.

Zhang và các đồng tác giả mô tả và xác định đặc điểm của protein bám dính p97 của *M. hyo* [Infect. Immun. 63: 1013-1019, 1995]. Ngoài ra, King và các đồng tác giả mô tả protein 124kD Mhp1 từ chủng P-5722 của *M. hyo* và thể hiện số liệu cho thấy rằng Mhp1 và p97 là cùng protein [Vaccine 15:25-35 (1997)]. Các protein p97 này có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế. Theo một phương án, dịch nổi nuôi cấy *M. hyo* chứa p97 mà các trình tự nucleotit và axit amin tương ứng của nó từ chủng P-5722 lần lượt được nêu trong các SEQ ID NO: 3 và 4. Theo phương án khác, biến thể của các trình tự p97 này có thể được sử dụng trong vacxin theo sáng chế, như được mô tả dưới đây.

Dịch nổi nuôi cấy *M. hyo* có thể còn chứa các kháng nguyên protein đặc hiệu với *M. hyo* như, nhưng không chỉ giới hạn ở, các protein có trọng lượng phân tử khoảng 41kD (p41), 42kD (p42), 89kD (p89) và 65kD (p65). Xem Okada et al., 2000, J. Vet. Med. B 47:527-533 và Kim et al., 1990, Infect. Immun. 58(8):2637-2643. Ngoài ra, dịch nổi nuôi cấy *M. hyo* có thể chứa các kháng nguyên protein đặc hiệu với *M. hyo* có trọng lượng phân tử khoảng 102kD (p102) và 216kD (p216). Xem bằng sáng chế Mỹ các số 6,162,435 và 7,419,806 cấp cho Minnion và các đồng tác giả.

Chủng *M. hyo* bất kỳ đều có thể được sử dụng để sản xuất phần hòa tan của chế phẩm *M. hyo* theo sáng chế. Các chủng *M. hyo* thích hợp có thể được thu từ các nguồn thương mại hoặc học viện, bao gồm các nguồn lưu giữ như bộ sưu tập chủng giống kiểu Mỹ (Bộ sưu tập chủng giống kiểu Mỹ: ATCC) (Manassas, Va.) và bộ sưu tập giống NRRL (Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Ill.). Riêng ATCC liệt kê sáu chủng *M. hyo* sau để bán: *M. hyo* ATCC 25095, *M. hyo* ATCC 25617, *M. hyo* ATCC 25934, *M. hyo* ATCC 27714, *M. hyo* ATCC 27715 và *M. hyo* ATCC 25934D. Chủng *M. hyo* được ưu tiên sử dụng trong các phương án của sáng chế

được nhận dạng là chủng P-5722-3, ATCC #55052, lưu giữ vào ngày 30-5-1990 theo các điều luật do Phòng Sáng chế và Nhãn hiệu Hoa Kỳ yêu cầu. Do có sự lây lan của bệnh, các chủng có thể còn được thu bằng cách thu hồi M. hyo từ chất tiết hoặc mô phổi từ lợn bị nhiễm các chủng đã biết gây bệnh viêm phổi do mycoplasma ở lợn.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần lưu ý rằng các biến thể của trình tự M. hyo có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế. Các biến thể này có thể thay đổi về mức tương đồng trình tự tới 10-20% và vẫn giữ được các đặc tính kháng nguyên mà làm cho nó hữu ích trong vacxin. Tốt hơn, nếu biến thể M. hyo có mức tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn là ít nhất 95% so với trình tự hệ gen có chiều dài đầy đủ của chủng M. hyo kiểu đại. Các đặc tính kháng nguyên của vacxin có thể, ví dụ, được ước tính bằng thí nghiệm về liều quyết định như được đề cập trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Hơn nữa, các đặc tính kháng nguyên của kháng nguyên M. hyo đã được cải biến tạo ra mức miễn dịch phòng ngừa ít nhất là 70%, tốt hơn là 80%, tốt hơn là 90% so với protein M. hyo kiểu đại.

Theo một phương án, kháng nguyên p46 hòa tan của M. hyo được đưa vào vacxin theo sáng chế ở nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 1,5 µg/ml đến 10 µg/ml, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 µg/ml đến 6 µg/ml. Cần lưu ý rằng p46 là protein dùng cho thử nghiệm về hoạt lực của M. hyo (xem phần ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây). Theo phương án khác, kháng nguyên M. hyo có thể được đưa vào vacxin với lượng cuối nằm trong khoảng từ 5,5% đến 35% tổng lượng dịch nuôi cấy M. hyo đã được xử lý bằng protein A.

Chế phẩm hòa tan M. hyo theo sáng chế vừa an toàn vừa có hiệu lực kháng M. hyo và thích hợp để dùng dưới dạng liều duy nhất. Ngoài ra, các tác giả sáng chế ngạc nhiên phát hiện ra rằng chế phẩm hòa tan M. hyo có thể được kết hợp hữu hiệu với kháng nguyên từ các tác nhân gây bệnh khác, bao gồm PCV2, mà không có sự ngăn cản miễn dịch giữa các kháng nguyên. Điều này làm cho chế phẩm hòa tan M. hyo trở thành cơ sở hữu hiệu cho các chế phẩm gây miễn dịch đa giá, bao gồm chế phẩm gây miễn dịch kết hợp PCV2/M. hyo theo sáng chế. Kháng nguyên PCV2 có thể được sử dụng đồng thời với chế phẩm M. hyo (tức là dưới dạng các vacxin đơn lẻ riêng biệt), nhưng tốt hơn là được kết hợp thành vacxin một lọ dùng ngay.

Theo một phương án, vaccin PCV2/M. hyo theo sáng chế chứa ít nhất một kháng nguyên bổ sung. Theo một phương án, ít nhất một kháng nguyên bổ sung phòng ngừa vi sinh vật mà có thể gây bệnh ở lợn.

Theo một số phương án, ít nhất một thành phần kháng nguyên bổ sung phòng ngừa vi khuẩn, virus hoặc động vật nguyên sinh mà được biết là gây nhiễm cho lợn. Ví dụ về các vi sinh vật này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các sinh vật sau: virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV), parvovirus ở lợn (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus hyicus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, vi khuẩn leptospira, *Lawsonia intracellularis*, virus cúm ở lợn (SIV), kháng nguyên *Escherichia coli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, coronavirus hô hấp ở lợn, virus gây dịch tiêu chảy ở lợn (PED), rotavirus, Torque teno virus (TTV), virus cự bào ở lợn, virus đường ruột ở lợn, vector gây bệnh viêm não-cơ tim, tác nhân gây bệnh Aujeszky, dịch tủy lợn (CSF) và tác nhân gây bệnh viêm dạ dày-ruột truyền nhiễm ở lợn, hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một phương án, vaccin kết hợp M. hyo/PCV2 theo sáng chế được đề xuất dưới dạng liều duy nhất, dùng ngay trong một lọ vaccin. Vaccin kết hợp dùng ngay này không cần phải trộn các vaccin riêng biệt, nên không có nguy cơ lẫn tạp chất hoặc thao tác bổ sung liên quan đến việc trộn và không cần phải dùng hỗn hợp này trong vòng vài giờ. Tương tự, vaccin hỗn hợp M. hyo/PCV2 một lọ làm giảm chất thải và không gian bảo quản của máy lạnh xuống còn một nửa. Hơn thế nữa, việc dùng một liều loại bỏ được thao tác liên quan đến việc dùng liều thứ hai cho động vật. Cần lưu ý rằng mặc dù hiện có các vaccin kết hợp PCV2/M. hyo, song chúng được bào chế dưới dạng vaccin hai liều dùng ngay (Circumvent®PCVM) hoặc vaccin liều duy nhất hai lọ, đòi hỏi phải dùng đồng thời hai vaccin riêng biệt (ví dụ, Ingelvac CircoFLEX® và Ingelvac MycoFLEX®). Tốt hơn, nếu vaccin kết hợp M. hyo/PCV2 theo sáng chế tương thích với các kháng nguyên khác, như kháng nguyên virus PRRS, sao cho tất cả các kháng nguyên đều được dùng trong một liều duy nhất.

Theo một số phương án, thành phần kháng nguyên PCV2 của vaccin kết hợp M. hyo/PCV2 là ở dạng khả năng circovirus typ 1-typ 2. Virus dạng khả năng này chứa circovirus lợn typ 1 tái tổ hợp bất hoạt biểu hiện protein ORF2 của circovirus lợn typ 2. Circovirus

lợn dạng khảm và phương pháp bào chế nó được mô tả trong WO 03/049703 A2, cũng như trong bằng sáng chế Mỹ các số 7,279,166 và 7,575,752, các tài liệu này được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn.

Theo một phương án, trình tự ADN có chiều dài đầy đủ của hệ gen virus dạng khảm PCV1-2 tương ứng với SEQ ID NO: 5 hoặc biến thể của nó, như được mô tả dưới đây. Theo phương án khác, gen capsit của ORF2 gây miễn dịch của virus dạng khảm PCV1-2 tương ứng với SEQ ID NO: 6. Theo phương án khác, trình tự axit amin của protein ORF2 gây miễn dịch do virus dạng khảm PCV1-2 biểu hiện tương ứng với SEQ ID NO: 7.

Theo phương án khác nữa, trình tự ADN có chiều dài đầy đủ của hệ gen virus dạng khảm PCV1-2 tương ứng với SEQ ID NO: 8. Theo một phương án, gen capsit của ORF2 gây miễn dịch của virus dạng khảm PCV1-2 tương ứng với SEQ ID NO: 9. Theo phương án khác, gen capsit của protein ORF2 gây miễn dịch của virus dạng khảm PCV1-2 tương ứng với SEQ ID NO: 10.

Tuy nhiên, ADN ORF2 của PCV2 và protein của virus dạng khảm PCV1-2 không bị giới hạn ở các trình tự được mô tả trên đây do ADN ORF2 của PCV2 và protein là vùng có tính bảo toàn cao trong các thể phân lập PCV2.

Theo một số phương án, thành phần kháng nguyên PCV2 của vaccin kết hợp M. hyo/PCV2 là ở dạng protein ORF2 tái tổ hợp. Theo một phương án, protein ORF2 tái tổ hợp được biểu hiện từ vector baculovirus. Theo cách khác, các vector biểu hiện đã biết khác có thể được sử dụng, như bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vector parapoxvirus.

Theo một phương án, protein ORF2 của PCV2 tái tổ hợp là protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11, được mã hóa bởi SEQ ID NO: 12 (Số truy cập trong ngân hàng gen. AF086834). Theo phương án khác, protein ORF2 tái tổ hợp là protein có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 13, được mã hóa bởi SEQ ID NO: 14. Theo phương án khác nữa, protein ORF2 tái tổ hợp tương ứng với SEQ ID NO: 15. Theo phương án khác nữa, protein ORF2 của PCV2 tái tổ hợp tương ứng với SEQ ID NO: 7. Theo phương án khác nữa, protein ORF2 của PCV2 tái tổ hợp tương ứng với SEQ ID NO: 10.

Tuy nhiên, sáng chế không được giới hạn ở các trình tự ADN và protein ORF2 cụ thể được mô tả trên đây. Do ADN và protein ORF2 của PCV2 là vùng có tính bảo

toàn cao trong các thể phân lập PCV2, ORF2 của PCV2 có thể là hữu hiệu làm nguồn ADN và/hoặc polypeptit ORF2 của PCV2 khi được sử dụng trong virus dạng khám PCV1-2 hoặc trong protein PCV2 tái tổ hợp.

Ví dụ về thể phân lập PCV2 thích hợp mà từ đó các trình tự ADN và protein ORF2 của PCV2 có thể để tạo ra là thể phân lập PCV2 số 40895 (lưu giữ trong ATCC vào ngày 7-12-2001 và được gán ký hiệu lưu trữ cho sáng chế ATCC số PTA-3914). Trình tự hệ gen (nucleotit) của thể phân lập PCV2 số 40895 là có thể sử dụng với số hiệu lưu giữ trong ngân hàng gen AF264042. Ví dụ khác về thể phân lập PCV2 mà từ đó các trình tự ADN và protein ORF2 của PCV2 có thể được tạo ra bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thể phân lập: Imp.999, Imp.1010-Stoon, Imp.1011-48121 và Imp.1011-48285. Số hiệu lưu giữ trong ngân hàng gen của các trình tự hệ gen tương ứng với các thể phân lập PCV2 này lần lượt là AF055391, AF055392, AF055393 và AF055394.

Trong một số dạng, các phần gây miễn dịch của protein ORF2 của PCV2 được sử dụng làm thành phần kháng nguyên trong chế phẩm. Ví dụ, các dạng hoặc đoạn được cắt ngắn và/hoặc được thay thế của protein ORF2 của PCV2 có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần lưu ý rằng biến thể của trình tự PCV2 có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế. Các biến thể này có thể thay đổi về mức tương đồng trình tự tới 10-20% và vẫn giữ được các đặc tính kháng nguyên mà làm cho nó hữu ích trong vaccin. Tốt hơn, nếu biến thể của PCV2 có mức tương đồng trình tự ít nhất là 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn là ít nhất 95% so với trình tự hệ gen có chiều dài đầy đủ của thể phân lập PCV2 kiểu đại. Các đặc tính kháng nguyên của vaccin có thể, ví dụ, được ước tính bằng thí nghiệm về liều quyết định như được đề cập trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Hơn nữa, các đặc tính kháng nguyên của kháng nguyên PCV2 đã được cải biến tạo ra mức miễn dịch phòng ngừa ít nhất 70%, tốt hơn là 80%, tốt hơn là 90% so với protein ORF2 của PCV2 kiểu đại.

Thành phần kháng nguyên PCV2 được đề xuất trong chế phẩm gây miễn dịch ở mức đưa vào kháng nguyên hữu hiệu tạo ra đáp ứng miễn dịch mong muốn, tức là làm giảm tỷ lệ mắc hoặc giảm mức độ nghiêm trọng của các dấu hiệu lâm sàng do nhiễm PCV2.

Theo một phương án, virus dạng khảm PCV1-2 được đưa vào các chế phẩm theo sáng chế ở mức ít nhất $1,0 \leq RP \leq 5,0$, trong đó RP là đơn vị hoạt lực tương đối xác định được bằng ELISA định lượng kháng nguyên (thử nghiệm hoạt lực *in vitro*) so với vaccin so sánh. Theo phương án khác, virus dạng khảm PCV1-2 được đưa vào chế phẩm theo sáng chế ở nồng độ cuối khoảng 0,5% đến 5% kháng nguyên PCV1-2 đơn nguyên cô 20 lần (20X).

Theo phương án khác, protein tái tổ hợp ORF2 của PCV2 được đưa vào chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế ở mức ít nhất 0,2 µg kháng nguyên/ml chế phẩm gây miễn dịch cuối (µg/ml). Theo phương án khác, protein tái tổ hợp ORF2 của PCV2 được đưa vào ở mức nằm trong khoảng từ 0,2 đến 400 µg/ml. Theo phương án khác nữa, protein tái tổ hợp ORF2 của PCV2 được đưa vào ở mức nằm trong khoảng từ 0,3 đến 200 µg/ml. Theo phương án khác nữa, protein tái tổ hợp ORF2 của PCV2 được đưa vào ở mức nằm trong khoảng từ 0,35 đến 100 µg/ml. Theo phương án khác nữa, protein tái tổ hợp ORF2 của PCV2 được đưa vào ở mức nằm trong khoảng từ 0,4 đến 50 µg/ml.

Theo một phương án, chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế chứa hỗn hợp gồm ít nhất một kháng nguyên hòa tan M. hyo (ví dụ, hai hoặc nhiều), kháng nguyên circovirus lợn typ 2 (PCV2), và kháng nguyên virus PRRS. Theo phương án khác, chế phẩm này tạo ra đáp ứng miễn dịch phòng ngừa ở lợn kháng M. hyo, PCV2 và virus PRRS.

Theo một phương án, vaccin kết hợp M. hyo/PCV2/PRRS theo sáng chế được đề xuất dưới dạng vaccin liều duy nhất trong hai lọ. Ví dụ, theo một số phương án, vaccin kết hợp M. hyo/PCV2 được đề xuất dưới dạng chế phẩm lỏng ổn định trong lọ thứ nhất và virus PRRS được đề xuất ở trạng thái đông khô trong lọ thứ hai. Theo một số phương án, các kháng nguyên lợn bổ sung có thể được thêm vào lọ thứ nhất hoặc lọ thứ hai.

Theo một phương án, thành phần virus PRRS được đề xuất dưới dạng virus sống được cải biến di truyền, được làm đông khô. Trước khi dùng, chất lỏng M. hyo/PCV2 từ lọ thứ nhất có thể được dùng để hydrat hóa lại virus PRRS trong lọ thứ hai để cả ba kháng nguyên có thể được dùng cho động vật trong liều duy nhất. Cần lưu ý rằng mặc dù hiện có các vaccin kết hợp PCV2/M. hyo/PRRS, song chúng được đề xuất dưới dạng vaccin liều duy nhất ba lọ, đòi hỏi phải dùng đồng thời ba vaccin riêng biệt (ví dụ, Ingelvac CircoFLEX®, Ingelvac MycoFLEX® và Ingelvac®PRRSmLV).

Tác nhân gây bệnh PRRS được phân lập lần đầu ở Hà Lan, và được đặt tên là virut Lelystad. Virut này được mô tả trong WO 92/21375 (Stichting Centraal Diegeneeskundig Instituut). Thẻ phân lập của virut PRRS châu Âu được lưu giữ ở Viện Paster tại Paris (Institut Pasteur of Paris), số I-1102. Typ Bắc Mỹ được phân lập hầu như đồng thời với thẻ phân lập của virut typ châu Âu, và được mô tả trong WO-93/03760 (Collins et al.) Thẻ phân lập của virut typ Bắc Mỹ được lưu giữ ở Bộ sưu tập chủng giống kiểu Mỹ (ATCC), số VR-2332.

Các chủng khác nhau đã được phân lập từ cả typ virut châu Âu lẫn typ virut Bắc Mỹ. WO 93/07898 (Akzo) mô tả chủng châu Âu, và vacxin được tạo ra từ đó, lưu giữ ở CNCM (Institut Pasteur), số I-1140. Tương tự, WO 93/14196 (Rhone-Merieux) mô tả chủng mới phân lập được ở Pháp, lưu giữ ở CNCM (Institut Pasteur), số I-1153. Hơn thế nữa, EP0595436 B1 (Solvay) mô tả chủng typ Bắc Mỹ mới, độc hơn so với chủng mô tả ban đầu, và vacxin chứa nó. Chủng này đã được lưu giữ ở ATCC, song số hiệu lưu giữ không được đề cập chi tiết trong bản mô tả này. Ngoài ra, ES2074950 BA (Cyanamid Iberica) và bằng sáng chế đồng dạng GB2282811 B2 mô tả cái gọi là "chủng Tây Ban Nha", chủng này khác với các chủng châu Âu và Bắc Mỹ. "Chủng Tây Ban Nha" này đã được lưu giữ ở Bộ sưu tập chủng giống tế bào động vật châu Âu (European Animal Cell Culture Collection: EACCC), số V93070108.

Các kháng nguyên virut PRRS thích hợp để dùng trong chế phẩm M. hyo/PCV2/PRRS theo sáng chế bao gồm các thẻ phân lập virut PRRS Bắc Mỹ, các chủng virut PRRS Trung Quốc, các chủng virut PRRS châu Âu, cũng như các dạng được cải biến di truyền của các thẻ phân lập/chủng này. Theo một phương án, thành phần kháng nguyên virut PRRS được dùng trong chế phẩm theo sáng chế là virut PRRS Bắc Mỹ.

Theo một số phương án, thành phần kháng nguyên virut PRRS được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là thẻ phân lập virut PRRS Bắc Mỹ có ký hiệu P129 hoặc dạng được cải biến di truyền sống của nó. Tốt hơn, nếu virut PRRS được cải biến di truyền này không thể gây bệnh nhiễm song có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch phòng ngừa hữu hiệu chống bệnh nhiễm virut PRRS kiểu đại.

Virut PRRS được cải biến di truyền để sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế có thể được sản xuất từ dòng gây nhiễm. Việc bào chế dòng ADN bổ trợ gây nhiễm của thẻ phân lập virut PRRS Bắc Mỹ có ký hiệu P129 được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ

số 6,500,662 tài liệu này được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn. Trình tự ADN bổ trợ P129 được bộc lộ trong số truy cập trong ngân hàng gen AF494042 và trong bằng sáng chế Mỹ số 6,500,662.

Theo một phương án, trình tự nucleotit của dạng P129 không độc để sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế được nêu trong SEQ ID NO: 16. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở trình tự này. Trình tự này và trình tự của các dạng P129 không độc khác được mô tả trong PCT/IB2011/055003, nộp ngày 9-11-2011, nội dung của nó (bao gồm đơn nộp vào pha quốc gia Mỹ bất kỳ trên cơ sở đơn này) được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn. Tốt hơn, nếu virus PRRS được cải biến để ngăn ngừa sự giảm điều hòa chức năng qua trung gian interferon.

Theo các phương án khác, thành phần kháng nguyên virus PRRS được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là thể phân lập virus PRRS có ký hiệu ISU-55. Thể phân lập ISU-55 được lưu giữ ở Bộ sưu tập chủng giống kiểu Mỹ (ATCC), với số hiệu lưu giữ VR2430. Trình tự nucleotit của các gen ORF2 đến ORF5 của thể phân lập ISU-55 được nêu trong SEQ ID NO:17. Trình tự nucleotit của các gen ORF6 và ORF7 của thể phân lập ISU-55 được nêu trong SEQ ID NO: 18.

Các thể phân lập virus PRRS Bắc Mỹ thích hợp khác mà có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là ISU-12, được lưu giữ ở ATCC với số hiệu lưu giữ VR2385 [tinh chế vết tan 3 x] và VR2386 [tinh chế không vết tan]. Các thể phân lập virus PRRS Bắc Mỹ thích hợp khác mà có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là: ISU-51, ISU-3927, ISU-1894, ISU-22 và ISU-79, được lưu giữ ở ATCC lần lượt với các số hiệu lưu giữ VR2498, VR2431, VR2475, VR2429 và VR2474. Các dạng được cải biến di truyền của thể phân lập bất kỳ trong số các thể phân lập ISU này có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế. Các thể phân lập ISU này và thể phân lập ISU-55 được mô tả chi tiết trong các bằng sáng chế Mỹ sau cấp cho Paul và các đồng tác giả: US 5,695,766, 6,110,467, 6,251,397, 6,251,404, 6,380,376, 6,592,873, 6,773,908, 6,977,078, 7,223,854, 7,264,802, 7,264,957 và 7,517,976, các tài liệu này được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn.

Theo các phương án khác nữa, thành phần kháng nguyên virus PRRS được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là typ Bắc Mỹ lưu giữ ở Bộ sưu tập chủng giống kiểu Mỹ (ATCC), số VR-2332 hoặc dạng được cải biến di truyền của nó. Ví dụ, virus PRRS có thể là virus sống được cải biến trên cơ sở thể phân lập đã được nhận dạng

ATCC VR2332, thể phân lập này được sử dụng trong INGELVAC® PRRS ATP và INGELVAC® PRRSmLV, từ hãng Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.

Theo các phương án khác nữa, thành phần kháng nguyên virus PRRS được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là thể phân lập virus PRRS châu Âu hoặc virus Lelystad hoặc dạng được cải biến di truyền của chúng. Ví dụ về chủng virus PRRS thích hợp được nhận dạng là thể lưu số I-1102, được mô tả trên đây. Các trình tự nucleotit và axit amin tương ứng với thể lưu I-1102 được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 5,620,691 cấp cho Wensvoort và các đồng tác giả, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn. Việc bào chế dòng gây nhiễm của thể phân lập virus PRRS châu Âu hoặc virus Lelystad được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ số 6,268,199, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn.

Ví dụ khác về thể phân lập virus PRRS thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các thể phân lập được mô tả trên đây. Tương tự, các dạng được cải biến di truyền sống của thể phân lập virus PRRS có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế. Dòng gây nhiễm có thể được sử dụng để tái tạo các sinh vật được cải biến di truyền sống này.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cần lưu ý rằng các biến thể của trình tự virus PRRS có thể được sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế. Các biến thể này có thể thay đổi về mức tương đồng trình tự tới 10-20% và vẫn giữ được các đặc tính kháng nguyên mà làm cho nó hữu ích trong chế phẩm gây miễn dịch. Tốt hơn, nếu biến thể virus PRRS có mức tương đồng trình tự ít nhất 80%, tốt hơn là ít nhất 85%, tốt hơn là ít nhất 90%, thậm chí tốt hơn là ít nhất 95% so với trình tự hệ gen có chiều dài đầy đủ của thể phân lập virus PRRS kiểu đại. Các đặc tính kháng nguyên của chế phẩm gây miễn dịch có thể, ví dụ, được ước tính bằng thí nghiệm về liều quyết định. Hơn nữa, các đặc tính kháng nguyên của kháng nguyên virus PRRS đã được cải biến tạo ra mức miễn dịch phòng ngừa ít nhất 70%, tốt hơn là 80%, tốt hơn là 90% so với kháng nguyên virus PRRS kiểu đại.

Theo một phương án, thành phần kháng nguyên virus PRRS là virus sống được cải biến di truyền mà được đưa vào chế phẩm theo sáng chế ở mức ít nhất $2,1 \leq \text{TCID}_{50} \leq 5,2$, trong đó TCID_{50} là liều gây nhiễm nuôi cấy mô 50% xác định được bằng cách định lượng kháng nguyên (thử nghiệm hoạt lực *in vitro*).

Thành phần kháng nguyên PCV2 của chế phẩm M. hyo/PCV2/PRRS có thể ở dạng circovirut dạng khảm typ-1-typ-2, virut dạng khảm này chứa circovirut lợn typ 1 tái tổ hợp bất hoạt biểu hiện protein ORF2 của circovirut lợn typ 2. Theo phương án khác, thành phần kháng nguyên PCV2 của chế phẩm M. hyo/PCV2/PRRS là ở dạng protein ORF2 tái tổ hợp.

Các kháng nguyên PCV2 thích hợp để sử dụng trong chế phẩm M. hyo/PCV2/PRRS có thể được tạo ra từ thể phân lập bất kỳ trong số các thể phân lập PCV2 được mô tả trên đây, cũng như các thể phân lập PCV2 khác. Các kháng nguyên PCV2 thích hợp để sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các trình tự PCV2 được mô tả trên đây và các biến thể của chúng.

Vaccin theo sáng chế có thể được bào chế theo cách thường được chấp nhận để chứa các chất mang chấp nhận được đối với động vật, kể cả người (nếu áp dụng được), như chất đệm chuẩn, chất ổn định, chất pha loãng, chất bảo quản và/hoặc chất làm hòa tan, và cũng có thể được bào chế để tạo điều kiện thuận lợi cho việc giải phóng ổn định. Các chất pha loãng bao gồm nước, nước muối, dextroza, etanol, glyxerol, và các chất tương tự. Các chất phụ gia để tạo tính đẳng trương bao gồm natri clorua, dextroza, manitol, sorbitol và lactoza, và các chất tương tự. Chất ổn định bao gồm albumin, và các chất tương tự. Các chất dẫn và phụ gia thích hợp khác cho vaccin, bao gồm các chất đặc biệt hữu hiệu trong việc bào chế vaccin sống được cải biến, là đã được biết hoặc hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Ví dụ, xem tài liệu: Remington's Pharmaceutical Science, 18th ed., 1990, Mack Publishing, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn.

Vaccin theo sáng chế có thể còn chứa một hoặc nhiều thành phần điều biến miễn dịch bổ sung như, ví dụ, tá chất hoặc xytokin, và các chất tương tự. Loại tá chất thích hợp để sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế bao gồm: tá chất dầu trong nước, tá chất polyme và nước, tá chất nước trong dầu, tá chất nhôm hydroxit, tá chất vitamin E và tổ hợp của chúng. Một số ví dụ cụ thể về tá chất bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, tá chất Freund đầy đủ, tá chất Freund không đầy đủ, *Corynebacterium parvum*, *Bacillus Calmette Guerin*, gel nhôm hydroxit, glucan, dextran sulfat, sắt oxit, natri alginat, Bacto-Adjuvant, một số polyme tổng hợp như poly axit amin và copolyme axit amin, copolyme khối (CytRx, Atlanta, Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), tá chất AMPHIGEN®, saponin, Quil A

hoặc phân đoạn saponin khác, monophosphoryl lipit A, và tá chất Avridin lipit-amin (N,N-dioctadexyl-N',N'-bis(2-hydroxyetyl)-propandiamin), "REGRESSIN" (Vetrepharm, Athens, Ga.), dầu parafin, hệ tá chất RIBI (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), muramyl dipeptit và các chất tương tự.

Ví dụ không giới hạn về nhũ tương dầu trong nước hữu ích trong vacxin theo sáng chế bao gồm các chế phẩm được cải biến SEAM62 và SEAM 1/2. SEAM62 được cải biến là nhũ tương dầu trong nước chứa 5% (thể tích) squalen (Sigma), 1% (thể tích) chất tẩy rửa SPAN® 85 (ICI Surfactants), 0,7% (thể tích) chất tẩy rửa TWEEN® 80 (ICI Surfactants), 2,5% (thể tích) etanol, 200 µg/ml Quil A, 100 µg/ml cholesterol và 0,5% (thể tích) lexitin. SEAM 1/2 được cải biến là nhũ tương dầu trong nước chứa 5% (thể tích) squalen, 1% (thể tích) chất tẩy rửa SPAN® 85, 0,7% (thể tích) chất tẩy rửa Tween 80, 2,5% (thể tích) etanol, 100 µg/ml Quil A, và 50 µg/ml cholesterol.

Ví dụ khác về tá chất hữu ích trong chế phẩm theo sáng chế là SP-dầu. Như được sử dụng trong bản mô tả này và yêu cầu bảo hộ, thuật ngữ "SP-dầu" chỉ nhũ tương dầu chứa copolyme khối polyoxyetylen-polyoxypropylen, squalan, polyoxyetylen sorbitan monooleat và dung dịch muối đệm. Copolyme khối polyoxyetylen-polyoxypropylen là chất hoạt động bề mặt giúp cho việc tạo huyền phù các thành phần rắn và lỏng. Các chất hoạt động bề mặt này là có bán trên thị trường dưới dạng polyme với tên thương mại Pluronic®. Chất hoạt động bề mặt được ưu tiên là poloxamer 401 có bán trên thị trường với tên thương mại Pluronic® L-121. Nói chung, nhũ tương SP-dầu là hỗn hợp tá chất kích thích miễn dịch chứa từ 1 đến 3% thể tích copolyme khối, từ 2 đến 6% thể tích squalan, tốt hơn là từ 3 đến 6% squalan, và từ 0,1 đến 0,5% thể tích polyoxyetylen sorbitan monooleat, với phần còn lại là dung dịch muối đệm. Theo một phương án, nhũ tương SP-dầu có mặt trong thành phẩm với lượng thể tích từ 1% đến 25%, tốt hơn là từ 2% đến 15%, tốt hơn là từ 5% đến 12% thể tích.

Ví dụ khác về tá chất thích hợp để sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là tá chất AMPHIGEN™ gồm lexitin đã loại dầu được hòa tan trong dầu, thường là parafin lỏng nhẹ.

Ví dụ khác về tá chất hữu ích trong chế phẩm theo sáng chế là các tá chất độc quyền sau: hệ tá chất nhũ tương kép Microsol Diluvac Forte®, tá chất Emunade, và tá chất Xsolve. Cả hai tá chất Emunade và Xsolve đều là nhũ tương dầu khoáng nhẹ trong nước, nhưng Emunade còn chứa alhydrogel, và d,l- α -tocopheryl axetat là một phần của

tá chất XSolve. Ví dụ khác về tá chất thích hợp để sử dụng trong chế phẩm theo sáng chế là tá chất ImpranFLEX™ (tá được nước trong dầu). Ví dụ khác về tá chất thích hợp là tá chất trên cơ sở Carbomer (Carbopol®). Các tá chất Carbopol® được ưu tiên bao gồm polyme Carbopol® 934 và polyme Carbopol®941.

Theo một phương án, tá chất hoặc hỗn hợp tá chất được thêm vào với lượng nằm trong khoảng từ 100 µg đến 10 mg/liều. Theo phương án khác, hỗn hợp tá được/tá được được thêm vào với lượng nằm trong khoảng từ 200 µg đến 5 mg/liều. Theo phương án khác nữa, hỗn hợp tá chất được thêm vào với lượng nằm trong khoảng từ 300 µg đến 1 mg/liều.

Tá được hoặc hỗn hợp tá chất thường có mặt trong chế phẩm theo sáng chế với lượng thể tích nằm trong khoảng từ 1% đến 25%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2% đến 15%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5% đến 12% thể tích.

Các "chất điều biến miễn dịch" khác có thể được đưa vào vaccin bao gồm, ví dụ, một hoặc nhiều interleukin, interferon, hoặc các xytokin đã biết khác. Theo một phương án, tá chất có thể là dẫn xuất cyclodextrin hoặc polyme đa anion, như các chất này lần lượt được mô tả trong bằng sáng chế Mỹ các số 6,165,995 và 6,610,310.

Khía cạnh khác đề cập đến phương pháp bào chế vaccin theo sáng chế. Phương pháp này bao gồm các bước: i) nuôi cấy M. hyo trong môi trường thích hợp trong khoảng thời gian 18-144 giờ; ii) tiếp theo làm bất hoạt giống M. hyo; iii) thu hoạch dịch nuôi cấy đã được làm bất hoạt, trong đó the dịch nuôi cấy đã được làm bất hoạt chứa chế phẩm toàn tế bào M. hyo chứa cả phân đoạn chất lỏng hòa tan lẫn thành phần tế bào không hòa tan; iv) tách phân đoạn chất lỏng hòa tan ra khỏi thành phần tế bào không hòa tan; v) loại bỏ hầu hết cả IgG lẫn phức hợp kháng nguyên/globulin miễn dịch ra khỏi phân đoạn chất lỏng hòa tan để tạo ra phần hòa tan của chứa chế phẩm toàn tế bào M. hyo; và vi) tiếp theo kết hợp phần hòa tan của chứa chế phẩm toàn tế bào M. hyo với kháng nguyên PCV2.

Ví dụ về môi trường thích hợp để nuôi cấy M. hyo là PPLO Broth (Mycoplasma Broth Base), mà khi được bổ sung các chất làm giàu dinh dưỡng, được dùng để phân lập và nuôi cấy Mycoplasma.

Theo một số phương án, giống M. hyo được sinh trưởng cho đến mức sinh trưởng pha loga muộn, sau đó làm bất hoạt giống. Theo một số phương án khác, làm bất hoạt giống bằng cách nâng độ pH (ví dụ, đến 7,8). Điều này xảy ra bằng cách cho giống

sản xuất tiếp xúc với chất làm bất hoạt, như etylenimin hai thành phần (BEI). BEI được tạo ra tại chỗ trong quá trình ủ L-bromoetylamin hydrobromua (BEA) trong giống sản xuất. Tiếp theo, trung hòa độ pH của giống được làm bất hoạt, như bằng cách thêm lượng tương đương của chất trung hòa chất làm bất hoạt trong dung dịch. Theo một số phương án, chất làm bất hoạt là BEI và chất trung hòa là natri thiosulfat. Theo một phương án, độ pH của giống được làm bất hoạt được điều chỉnh đến 7,4 bằng cách thêm thiosulfat.

Theo một số phương án, phân đoạn lỏng hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo được tách từ thành phần tế bào không hòa tan bằng phương pháp thông thường. Theo một phương án, việc tách này được thực hiện nhờ bước lọc. Theo phương án khác, việc tách này được thực hiện nhờ bước ly tâm. Theo phương án khác nữa, việc tách này được thực hiện nhờ bước kết tủa.

Theo một phương án, phân đoạn lỏng hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo đã được trung hòa bất hoạt được xử lý bằng nhựa Protein A để hầu như loại bỏ cả IgG lẫn phức hợp kháng nguyên/globulin miễn dịch chứa trong đó. Theo các phương án khác, nhựa Protein G có thể được sử dụng để hầu như loại bỏ cả IgG lẫn phức hợp kháng nguyên/globulin miễn dịch chứa trong phân đoạn lỏng hòa tan. Phương pháp loại bỏ cả IgG lẫn phức hợp kháng nguyên/globulin miễn dịch nhờ các nhựa Protein A hoặc Protein G là được biết rõ trong lĩnh vực này.

Theo khía cạnh khác, phương pháp bào chế chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo sáng chế bao gồm bước điều chế kháng nguyên M. hyo hòa tan được mô tả trên đây và trộn nó với kháng nguyên PCV2, tá chất thích hợp và một hoặc nhiều chất mang được dùng. Phương pháp này tùy ý bao gồm bước thêm ít nhất một kháng nguyên lợn bổ sung, như kháng nguyên virus PRRS, như được mô tả trên đây.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến kit. “Kit” chỉ nhiều thành phần được nhóm lại với nhau. Theo một phương án, kit theo sáng chế chứa lọ (hoặc vật đựng thích hợp khác) chứa chế phẩm sinh miễn dịch. Chế phẩm sinh miễn dịch này chứa cả kháng nguyên PCV2 lẫn phân hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), trong đó phân hòa tan của chế phẩm M. hyo là hầu như không chứa cả (i) IgG lẫn (ii) phức hợp kháng nguyên/globulin miễn dịch. Tùy ý, kit có thể còn chứa cẩm nang hướng dẫn. Cẩm nang hướng dẫn này chứa thông tin về cách dùng chế phẩm này.

Theo một số phương án, chế phẩm kết hợp M. hyo/PCV2 trong lọ được đề xuất dưới dạng chế phẩm lỏng dùng ngay. Theo các phương án khác, kit chứa lọ thứ hai chứa kháng nguyên virus PRRS. Theo một số phương án, kháng nguyên virus PRRS là ở dạng virus sống được cải biến di truyền mà được đề xuất ở trạng thái đông khô. Trong các trường hợp này, cẩm nang hướng dẫn sẽ bao gồm các hướng dẫn về cách hydrat hóa lại thành phần virus PRRS bằng các thành phần lỏng từ lọ chứa chế phẩm kết hợp M. hyo/PCV2. Cẩm nang hướng dẫn cũng sẽ chứa thông tin về cách dùng chế phẩm ba giá M. hyo/PCV2/PRRS.

Theo một số phương án, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế được dùng cho lợn có kháng thể được tạo ra từ mẹ kháng M. hyo. Theo các phương án khác, chế phẩm sinh miễn dịch theo sáng chế được dùng cho lợn có kháng thể được tạo ra từ mẹ kháng cả M. hyo lẫn PCV2.

Theo một số phương án, chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo sáng chế được dùng cho lợn con 3 tuần tuổi hoặc lớn hơn. Tuy nhiên, hàm ý rằng chế phẩm gây miễn dịch đa giá theo sáng chế có thể được dùng để tiêm chủng lại cho lợn cái con trước khi giao phối. Như đã biết trong lĩnh vực này, lợn cái con là lợn cái chưa từng có thai. Các lợn cái con được tiêm chủng sẽ truyền kháng thể được tạo ra từ mẹ đến các lợn mới sinh còn bú của chúng thông qua sữa non.

Cũng hàm ý rằng vaccin đa giá theo sáng chế có thể được sử dụng để tiêm chủng lại hàng năm cho các đàn giao phối. Tốt hơn, nếu vaccin đa giá theo sáng chế được dùng cho lợn (ví dụ, lợn con hoặc lợn cái con) trong một liều. Theo một phương án, vaccin đa giá theo sáng chế không cần trộn các vaccin đơn giá riêng biệt trước khi dùng, tức là nó được đề xuất dưới dạng chế phẩm dùng ngay trong một lọ. Theo phương án khác, chế phẩm đa giá cần trộn vaccin nhị giá chứa trong lọ thứ nhất với vaccin đơn giá chứa trong lọ thứ hai. Theo một phương án, vaccin đơn giá chứa trong lọ thứ hai chứa kháng nguyên virus PRRS. Tùy ý, các kháng nguyên bổ sung có thể được thêm vào một trong các lọ này.

Theo một số phương án, thời điểm xuất hiện khả năng miễn dịch là từ 2-3 tuần sau khi tiêm chủng vaccin đa giá theo sáng chế. Theo các phương án khác, thời gian miễn dịch là khoảng 17-23 tuần sau khi tiêm chủng vaccin đa giá theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phương pháp sản xuất Mycoplasma hyopneumoniae để kháng nguyên M. hyo có thể kết hợp với PCV2

Lên men và làm bất hoạt M. hyo

Môi trường cho sản xuất giống và sản xuất kháng nguyên được chuẩn bị như sau. Nước cái của sinh vật giống Pleuropneumonia (Pleuropneumonia-like Organism : PPLO) được tạo ra từ tim lợn (BD Biosciences catalog No. 21498) được tạo ra theo hướng dẫn của nhà sản xuất (tức là 21g/L) và dung dịch chiết nấm men được tạo ra ở 21g/L trong USP. Tiếp theo, thêm dung dịch chiết nấm men vào PPLO ở 6,25% và khử trùng hỗn hợp thu được bằng cách gia nhiệt đến 121°C trong ≥ 30 phút. Điều chế cystein hydroclorua ở 90g/L và lọc vô trùng. Dung dịch dextroza được tạo ra bằng cách thêm 450g dextroza/L nước USP tiếp theo khử trùng bằng nhiệt. Để chuẩn bị môi trường cuối, huyết thanh lợn được thêm vào môi trường bazơ ở 10% tiếp theo là cystein ở 0,01% và dextroza ở 1,0%. Cây 10% thể tích giống *M. hyopneumoniae* (chủng P-5722-3) pha loga vào môi trường thu được. Giữ giống này ở 37°C và duy trì pH và dO lần lượt ở 7,0 và 25%. Ở giai đoạn sinh trưởng pha loga muộn, giống được làm bất hoạt bằng etylenimin hai thành phần (BEI), một hợp chất aziridin, được sản xuất từ 2-bromoethylamin hydrobromua. Cụ thể, làm bất hoạt bằng cách nâng độ pH lên 7,8 bằng cách thêm 2-bromoethylaminhydrobromua (BEA) đến nồng độ cuối 4 mM và ủ trong 24 giờ. Trung hòa BEI bằng cách thêm natri thiosulfat theo tỷ lệ mol 1:1 tiếp theo là ủ thêm 24 giờ. Giữ dịch nuôi cấy đã được làm bất hoạt ở 2-8°C cho đến khi thực hiện bước xử lý tiếp theo.

Ví dụ 2: Phương pháp sản xuất circovirut lợn dạng khảm (cPCV)1-2

cPCV1-2 được cấu trúc bằng cách nhân dòng gen capsit gây miễn dịch của circovirut lợn typ 2 (PCV2) vào khung chính hệ gen của circovirut lợn typ 1 không gây bệnh (PCV1). Quy trình cấu trúc dòng ADN dạng khảm được mô tả, ví dụ, trong bằng sáng chế Mỹ số 7,279,166, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn. Nguồn gây nhiễm của virut dạng khảm nhận được từ Tiến sỹ X. J. Meng, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, và được dùng để gây nhiễm vào tế bào Porcine Kidney (PK)-15 sinh trưởng trong môi trường cần thiết tối thiểu (Minimum Essential Trung bình: MEM) có bổ sung 0,05% sản phẩm thủy phân lactalbumin (LAH), 30µg/mL gentamixin sulfat và 5% huyết thanh thai bò. Tế bào PK-

15 nhiễm cPCV1-2 thu được tiếp tục được nhân lên bằng cách cấy chuyển theo bậc thêm bốn lần bằng cách sử dụng cùng môi trường sinh trưởng ngoại trừ 2-3% huyết thanh thai bò. Mẻ cấy chuyển thứ năm được làm đông, làm tan băng và lọc, và dịch tan được dùng để chuẩn bị giống sản xuất và giống hoạt động kế tiếp.

Môi trường dùng để sản xuất giống là giống với môi trường dùng để sản xuất giống sản xuất. Đối với môi trường sinh trưởng, MEM, OptiMEM hoặc môi trường tương đương là các môi trường cơ bản có thể được sử dụng để nuôi cấy dòng tế bào PK-15. Môi trường sinh trưởng có thể được bổ sung lên tới 10% huyết thanh bò, lên tới 0,5% sản phẩm thủy phân lactalbumin, lên tới 0,5% albumin huyết thanh bò, và lên tới 30µg/mL gentamixin. Đối với môi trường cho sự sinh sản của virus, MEM, OptiMEM hoặc môi trường tương đương được sử dụng. Môi trường cho sự sinh sản của virus có thể được bổ sung lên tới 0,5% sản phẩm thủy phân lactalbumin, lên tới 2% huyết thanh bò, lên tới 0,5% albumin huyết thanh bò, và lên tới 30µg/mL gentamixin. Lên tới 5g/L glucoza và lên tới 5mmol/L L-glutamin có thể được thêm vào môi trường sinh trưởng và/hoặc môi trường cho sự sinh sản của virus, nếu cần, để duy trì các tế bào này.

Virus giống gốc cPCV1-2 được thêm vào huyền phù tế bào PK-15 và được hấp phụ trong thời gian lên tới 3 giờ. Pha loãng virus giống trong môi trường sinh trưởng cơ bản để tạo ra mức bội nhiễm (MOI) nằm trong khoảng 0,1 – 0,0001.

Trước hết, cấy giống tế bào PK-15 với virus giống hoạt động khi nuôi cấy tế bào, hoặc khi đạt tới mức nhập dòng 20% đến 50%. Bước cấy chuyển ban đầu này có thể được gọi là “Phương pháp gây nhiễm một bước” để sản xuất lô kháng nguyên, hoặc có thể tiếp tục được dùng để cấy chuyển theo bậc. Để cấy chuyển theo bậc, tế bào PK-15 nhiễm cPCV1-2 tiếp tục được nhân lên tới đợt cấy chuyển 7 với tỷ lệ 1:5-20 để virus sinh sản. Môi trường nuôi cấy chứa huyền phù tế bào bị nhiễm từ đợt cấy chuyển trước đó đóng vai trò nguyên liệu giống cho đợt cấy chuyển tiếp theo. Ủ tế bào nhiễm cPCV1-2 trong 3 đến 14 ngày đối với mỗi đợt cấy chuyển ở $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ khi tế bào đạt tới mức nhập dòng $\geq 90\%$. Virus cPCV1-2 gây ra các thay đổi bệnh lý tế bào quan sát được trong quá trình virus này sao chép. Khi thu hoạch, quan sát thấy vòng tròn tế bào và mảnh vỡ nổi đáng kể. Cũng quan sát thấy rõ môi trường nuôi cấy bị nhiễm vi khuẩn hoặc nấm. Thời gian ủ giữa các lần thu hoạch đối với kháng nguyên cPCV được nêu trong Bảng 1 dưới đây:

Bảng 1: Thời gian tối thiểu và tối đa để thu hoạch kháng nguyên cPCV

Phương pháp	Thời gian tối thiểu và tối đa	Giới hạn nhiệt độ
Gây nhiễm một bước	5 đến 16 ngày	$36 \pm 2^{\circ}\text{C}$
Cấy chuyển theo bậc (MSV + 3 đến MSV + 7)	16 đến 36 ngày	$36 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Dịch nuôi cấy cPCV1-2 được thu hoạch trong bình vô trùng và được lấy mẫu để thử nghiệm mycoplasma bằng phương pháp đã biết. Nhiều mẻ thu hoạch có thể được dẫn từ chai lẫn, bình phản ứng sinh học và bình truyền dịch.

Trước khi làm bất hoạt virus cPCV1-2 thu hoạch được, một hoặc nhiều lô kháng nguyên có thể được cô (ví dụ, lên tới 60X) bằng cách siêu lọc. Có thể rửa thể cô bằng dung dịch muối cân bằng để làm giảm các protein huyết thanh.

Phương pháp làm bất hoạt, giảm độc lực hoặc khử độc virus cPCV1-2 sẽ được mô tả. Sau khi cô kháng nguyên cPCV, thêm *Beta*-propiolacton (BPL) vào thành phần virus cPCV1-2 đã thu gom để thu được nồng độ khoảng 0,2% thể tích. Tiếp theo, khuấy dịch virus đã thu gom này trong ít nhất 15 phút rồi chuyển dịch kháng nguyên đơn thể bất hoạt sang bình vô trùng thứ hai. Duy trì dịch kháng nguyên đã chuyển sang ở $2 - 7^{\circ}\text{C}$, có khuấy liên tục, trong ít nhất 24 giờ. Sau ít nhất 24 giờ, thêm phần BPL bổ sung thứ hai 0,2% thể tích vào huyền phù đã thu gom. Tiếp theo, khuấy các thành phần, chuyển sang bình thứ ba, và duy trì ở $2 - 7^{\circ}\text{C}$, có khuấy liên tục, trong thời gian bổ sung không ít hơn 84 giờ. Nói chung, tổng thời gian làm bất hoạt không ít hơn 108 giờ và không nhiều hơn 120 giờ. Phương pháp làm bất hoạt này được tóm tắt trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2: Phương pháp làm bất hoạt

Chất làm bất hoạt	Nồng độ cuối	Giới hạn nhiệt độ	Thời gian-Giờ (tối thiểu/tối đa)
<i>Beta</i> -propiolacton (BPL)	0,4% thể tích (2 lần bổ sung x 0,2% thể tích)	$2 - 7^{\circ}\text{C}$ (w/khuấy)	108 - 120

Việc làm bất hoạt được kết thúc bằng cách thêm dung dịch natri thiosulfat có nồng độ cuối không quá 0,1M. Điều chỉnh độ pH của lô kháng nguyên đã được làm bất hoạt đến 6,8 bằng NaOH hoặc HCl. Sau khi làm bất hoạt, lấy mẫu từ hỗn hợp để thử mức độ hoàn thành quá trình làm bất hoạt. Chuẩn hóa sản phẩm kháng nguyên cPCV1-2 theo mục tiêu lớn hơn 1,0 RP như đo được bằng ELISA về hoạt lực.

Ví dụ 3: Xử lý xuôi dòng kháng nguyên M. hyo và thử nghiệm phân tích đối với các kháng nguyên đã được xử lý này

Xử lý xuôi dòng kháng nguyên M. hyo:

Dịch lên men đã được làm bất hoạt (điều chế được như được mô tả trên đây trong Ví dụ 1) được xử lý đối với mỗi nhóm được chỉ ra là như sau. Các kháng nguyên M. hyo đã được xử lý này được sử dụng trong Ví dụ 4 dưới đây.

T02: (toàn đơn thể) không được xử lý.

T03: (10X UF cô) cô bằng cách lọc dòng tiếp tuyến bằng màng có ngưỡng trọng lượng phân tử 100 KDa (sợi rỗng). Giảm thể tích cuối đến 10X.

T04 & T05: (10X UF cô và ly tâm) thu gom tế bào mycoplasma cô (từ T03) và rửa một lần bằng PBS bằng cách ly tâm ở ~20000xg (Sorvall model RC5B).

T06 & T07: (10X cô) ly tâm dịch lên men đã được làm bất hoạt ở ~20000xg (Sorvall RC5B) và rửa một lần bằng cách tạo huyền phù lại tế bào trong PBS tiếp theo là ly tâm bổ sung. Giảm thể tích cuối đến 10X.

T08: (10X cô và gia nhiệt) cô và rửa tế bào Mycoplasma thu được ở T06 và gia nhiệt đến 65°C trong 10 phút.

T09: (Dịch nổi không chứa tế bào) dịch nổi thu gom được từ lần ly tâm thứ nhất như được mô tả đối với T06 được lọc vô trùng qua bộ lọc 0,2 micron (Nalgene).

T10: (Dịch nổi không chứa tế bào- xử lý bằng Protein-A) trộn dịch nổi vô trùng (điều chế được ở T09) với nhựa Protein A (Protein A Sepharose, Pharmacia Inc) theo tỷ lệ thể tích 10:1 trong 4 giờ. Loại bỏ nhựa bằng cách lọc vô trùng và bảo quản dịch lọc ở 2-8°C. Quy trình này sử dụng bước xử lý protein A “xuôi dòng” sau lên men để loại bỏ kháng thể và phức hợp miễn dịch. Mặc dù sáng chế không loại trừ bước xử lý protein A ngược dòng, song các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng trong trường hợp của M. hyo, bước xử lý protein A ngược dòng đối với môi trường sinh trưởng cho ra kết quả p46 thấp hơn và không ổn định so với môi trường không được xử lý (số liệu không được thể hiện).

Thử nghiệm phân tích đối với các kháng nguyên đã được xử lý xuôi dòng của M. hyo

Các chế phẩm kháng nguyên M. hyo đã được xử lý xuôi dòng (điều chế được như được mô tả trên đây) được thử nghiệm về sự thu hồi kháng nguyên p46 đặc hiệu với M. hyo, và sự có mặt của kháng thể PCV2. Ngoài ra, các chế phẩm kháng nguyên

M. hyo này được thử nghiệm về sự có mặt của Torque Teno Virut (TTV), bao gồm kiểu gen 1 (g1TTV) và kiểu gen 2 (g2TTV). Kết quả được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Đặc điểm của các kháng nguyên đã được xử lý xuôi dòng của M. hyo

Mẫu điều trị	M. hyo đơn thể	Kháng thể PCV2	qPCR DNA	
	p46 RU/mL	Tỷ lệ S/P	g1TTV	g2TTV
Toàn đơn thể	809	0,248	1,00E+03	1,78E+03
10x UF cô	6666	0,819	1,00E+03	9,94E+03
10x UF cô + ly tâm	614	0,019	0	0
10x cô	763	-0,015	1,90E+02	1,91E+02
10x cô + gia nhiệt	690	-0,012	0	2,07E+02
Dịch nổi không chứa tế bào	719	0,242	4,20E+02	3,23E+03
Dịch nổi không chứa tế bào (Prot A)	826	-0,014	0	2,06E+03

Theo Bảng 3, sự thu hồi kháng nguyên p46 đặc hiệu với M. hyo được chứng minh đối với mỗi chế phẩm kháng nguyên được xử lý xuôi dòng của M. hyo. Ngoài ra, các mẫu điều trị sau loại bỏ thành công kháng thể PCV2: 10X UF cô & ly tâm, 10x ly tâm, 10X ly tâm & gia nhiệt và dịch nổi không chứa tế bào (xử lý bằng Protein-A). Đối với TTV, các mẫu điều trị sau loại bỏ thành công g1TTV: 10X UF cô & ly tâm, 10x ly tâm & gia nhiệt, và dịch nổi không chứa tế bào (xử lý bằng Protein-A). Chỉ duy nhất mẫu điều trị có ký hiệu 10X UF cô & ly tâm loại bỏ g2TTV. Các thể phân lập Torque teno virut, bao gồm các kiểu gen 1 và 2 được mô tả trong US20110150913, tài liệu này được đưa vào bản mô tả này theo cách viện dẫn.

Do đã biết trong lĩnh vực này rằng Protein A liên kết với IgG, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu rằng không chỉ kháng thể PCV2, mà cả các kháng thể lợn khác, bao gồm kháng thể PRRS, kháng thể HPS, và kháng thể SIV sẽ được loại bỏ một cách hữu hiệu nhờ xử lý bằng Protein-A. Điều này khiến cho dịch nổi M. hyo không chứa tế bào được xử lý bằng Protein-A là tương thích không chỉ với kháng nguyên PCV2, mà còn với các kháng nguyên lợn khác do thiếu sự can thiệp miễn dịch giữa các kháng nguyên này. Ngoài ra, việc loại bỏ mảnh vỡ không phải tế bào bào vệ và việc loại bỏ globulin miễn dịch và các phức hợp kháng nguyên/globulin miễn dịch được tin chắc là tạo ra vaccin an toàn.

Ví dụ 4: Bào chế chế phẩm vaccin thực nghiệm M. hyo

Tất cả các vaccin M. hyo thực nghiệm đều có nồng độ cuối của tá chất Amphigen 5%. Ngoài ra, tất cả các vaccin đều được chuẩn hóa với p46 ELISA và bảo

quản bằng thimerosol. Các chế phẩm vaccin thực nghiệm được bào chế với kháng nguyên M. hyo điều chế được theo các mẫu điều trị T02-T10 trên đây. Ngoài ra, mẫu điều trị T01 tương ứng với thuốc vò (không kháng nguyên M. hyo, chỉ có tá chất Amphigen 5%) trong khi mẫu điều trị T11 là đối chứng dương tính tương ứng với vaccin M. hyo trên cơ sở bacterin hết hạn (RespiSure-ONE®, Pfizer Animal Health). Các chế phẩm này được mô tả trong Bảng 4 dưới đây.

Bảng 4: Các chế phẩm vaccin thực nghiệm M. hyo

Mẫu điều trị	Loạt IVP *	p46 đích đơn vị/ds	Kháng nguyên M. Hyo (mL)	Tá dược (mL)	Thể tích chế phẩm (mL)
T01	123639 (Thuốc vò)	Chỉ có Amphigen 5%, không kháng nguyên			
T02	L100211A	452	279,36	250	1000
T03	L100211B	452	6,78	50	200
T04	L100211C	452	73,62	50	200
T05	L100211D	816	132,90	50	200
T06	L100211E	452	59,24	50	200
T07	L100211F	816	106,95	50	200
T08	L100211G	452	65,51	50	200
T09	L100211H	452	62,87	50	200
T10	L100211J	452	54,72	50	200
T11	A827870	Vaccin “RespiSure” hết hạn			

*Investigational Veterinary Product (IVP): Sản phẩm thú y nghiên cứu

Ví dụ 5: Đánh giá hiệu lực *in vivo* của vaccin M. hyo với các kháng nguyên M. hyo từ các quá trình xuôi dòng khác nhau

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá hiệu lực *in vivo* của các vaccin *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. Hyo) với các kháng nguyên M. Hyo từ các quá trình xuôi dòng khác nhau (different downstream process: DSP). Lợn 3 tuần tuổi được tiêm chủng qua đường trong bắp bằng liều duy nhất của các chế phẩm vaccin khác nhau được mô tả trong Bảng 4 trên đây. Mười sáu con được xếp vào mỗi nhóm điều trị. Cho lợn dùng liều quyết định ở 21 ngày sau khi tiêm chủng thể phân lập thực địa M. hyo độc. Mô khám nghiệm lợn ở 28 ngày sau liều quyết định và lấy phổi và tính điểm số tổng hợp phù hợp với bệnh nhiễm M. hyo. Tiêu chuẩn chủ yếu phòng ngừa liệu M. hyo quyết định là điểm số tổng hợp của phổi. Thường được thừa nhận rằng có mối quan hệ giữa kích thước tổn thương phổi do bệnh viêm phổi địa phương gây ra và hiệu lực phụ đối với tốc độ sinh trưởng. Bảng 5 dưới đây thể hiện điểm số tổn thương phổi đối với

các nhóm điều trị tương ứng. Ý nghĩa thống kê được xác định bằng phân tích mô hình hỗn hợp (Mixed Model Analysis) về điểm số phổi đối với mỗi nhóm.

Bảng 5: Kết quả tổn thương phổi

Điều trị	Mô tả	p46 RP Đích/ quan sát được	Trung bình LS chuyển ngược từ % tổn thương phổi	Giới hạn % phổi có tổn thương	Trái ngược	Trị số p	Ý nghĩa
T01	Thuốc vờ (Amphigen 5%)	N/A	11,7	1,2 – 44,3	N/A	N/A	N/A
T02	Toàn đơn thể	13/15,6	1,2	0,1 – 18,5	T01 so với 02	0	Có
T03	Toàn đơn thể UF 10x	13/11,9	0,3	0,0 – 2,8	T01 so với 03	0	Có
T04	UF 10x + ly tâm	13/28,1	5,9	0,0 – 40,5	T01 so với 04	0,1589	Không
T05	UF 10x + ly tâm	24/48,2	3,7	0,0 – 42,3	T01 so với T05	0,0309	Có
T06	10x cô	13/30,4	4,7	0,0 – 23,6	T01 so với 06	0,0388	Có
T07	10x cô	24/57,4	4,6	0,3 – 37,3	T01 so với T07	0,0323	Có
T08	10x Cô + gia nhiệt	13/17,7	4,5	0,3 – 21,7	T01 so với T08	0,0137	Có
T09	Dịch nổi (không tế bào)	13/14,1	1,4	0,0 – 33,0	T01 so với T09	0,0004	Có
T10	Dịch nổi + Prot A	13/12,1	3,1	0,0 – 25,8	T01 so với T10	0,0094	Có
T11	RSO hết hạn	13/12,5	2,2	0,1 – 32,1	T01 so với T11	0,0009	Có

Theo Bảng 5 trên đây, kết quả với các kháng nguyên M. Hyo từ các quá trình xuôi dòng khác nhau chỉ ra rằng tất cả các vacxin thực nghiệm ngoại trừ T04 đều khác biệt đáng kể so với thuốc vờ. Các kết quả tổn thương do M. hyo này được vẽ thành đồ thị trên Fig.1. Như được thể hiện trên Fig.1, T04 cho kết quả không chấp nhận được. Tất cả các nhóm điều trị khác đều khác biệt đáng kể so với thuốc vờ (T01). Điểm số tổng hợp của phổi chỉ ra rằng T02, T03 và T09-T11 cho mức phòng ngừa hữu hiệu nhất đối với liều M. hyo quyết định.

Hoạt lực tương đối của p46 của vacxin thực nghiệm được đánh giá bằng thử nghiệm chất hấp phụ gắn enzym kẹp kháng thể kép (double antibody sandwich enzyme-

linked immunosorbent assay: DAS ELISA). Kết quả DAS ELISA đối với p46 được thể hiện trong Bảng 5 trên đây chỉ ra rằng tất cả các vaccin thực nghiệm đều vượt quá hoạt lực đích. Ngoài ra, hoạt lực tương đối của p46 được duy trì hoặc gia tăng trong quá trình bảo quản vaccin trong thời gian một tháng (số liệu không được thể hiện). Hoạt lực gia tăng theo thời gian đã được quan sát thấy ở các kháng nguyên được ly tâm với ngoại lệ là các kháng nguyên được gia nhiệt. Nói chung, có lẽ “khung” tế bào vỡ ra theo thời gian và giải phóng kháng nguyên p46 liên kết với màng nhiều hơn trong trường hợp của kháng nguyên được ly tâm.

Ví dụ 6: Đánh giá mức độ tương thích của vaccin M. hyo với kháng nguyên PCV2

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá mức độ tương thích của vaccin thực nghiệm M. hyo chứa kháng nguyên M. hyo từ các quá trình xuôi dòng khác nhau với kháng nguyên PCV2. Các chế phẩm vaccin thực nghiệm M. hyo được mô tả trong các Bảng 4 và 5 trên đây. Hoạt lực tương đối của p46 quan sát được đối với các vaccin này được mô tả trong Bảng 5 trên đây. Mỗi vaccin thực nghiệm M. hyo này được kết hợp với kháng nguyên PCV2. Trong ví dụ này, kháng nguyên PCV2 là virus dạng khảm PCV Typ 1-Typ 2 (Fostera PCV) điều chế được như được mô tả trên đây trong Ví dụ 2. Virus dạng khảm này được đưa vào chế phẩm ở mức ban đầu khoảng $1,6 \leq RP$, trong đó RP là đơn vị hoạt lực tương đối xác định được bằng phương pháp định lượng kháng nguyên PCV2 ELISA (thử nghiệm về hoạt lực *in vitro*) so với vaccin so sánh hiệu nghiệm.

Các chế phẩm kết hợp M. hyo/PCV2 thực nghiệm được đánh giá bằng PCV2 ELISA. Kết quả được thể hiện trên Fig.2. Như được thể hiện trên Fig.2, chỉ có các chế phẩm kháng nguyên M. hyo từ các quá trình xuôi dòng sau là tương thích với kháng nguyên PCV2: Siêu lọc & ly tâm (T04 & T05), ly tâm (T06 & T07), ly tâm + gia nhiệt (T08) và dịch nổi được xử lý bằng Protein A (T10). Trong đó, dịch nổi M. hyo được xử lý bằng Protein A là tương thích nhất với kháng nguyên PCV2 so với đối chứng thuốc vờ chứa virus dạng khảm và tá chất Amphigen, song không có kháng nguyên M. hyo. Mức virus PCV dạng khảm trong dịch nổi được xử lý bằng Protein-A là 1,5 RP so với 1,69 RP đối với thuốc vờ. Do đó kết luận được rằng không có hoặc có ở mức không đáng kể sự can thiệp miễn dịch giữa chế phẩm kháng nguyên hòa tan M. hyo được xử lý bằng Protein A và kháng nguyên PCV2 của virus dạng khảm.

Hiệu lực *in vivo* của dịch nổi được xử lý bằng Protein-A được chứng minh trong Ví dụ 5 trên đây cùng với các kết quả được mô tả trong ví dụ này chỉ ra rằng dịch nổi được xử lý bằng Protein-A là cơ sở rất hữu hiệu đối với các chế phẩm kết hợp M. hyo-PCV2.

Ví dụ 7: Đánh giá hiệu lực của PCV2 của vaccin kết hợp PCV2/M. hyo trong một lọ trong các chế phẩm tá chất khác nhau

Nghiên cứu này được thiết kế để đánh giá hiệu lực của PCV2 của vaccin kết hợp PCV2/M. hyo trong một lọ trong các chế phẩm tá chất khác nhau. Trong ví dụ này, kháng nguyên PCV2 là virus dạng khảm PCV Typ 1-Typ 2 chết (Fostera PCV). Virus dạng khảm này được kết hợp với chế phẩm kháng nguyên hòa tan M. hyo là hầu như không chứa IgG (tức là dịch nổi được xử lý bằng Protein A).

Xử lý dịch:

Dịch lên men M. hyo đã được làm bất hoạt (được mô tả trên đây trong Ví dụ 1) được xử lý đối với mỗi nhóm được chỉ định là như sau.

T02-T04: Toàn bộ dịch lên men chứa tế bào *M. hyopneumoniae* sống (được mô tả trên đây) được ly tâm ở ~20000xg (Sorvall RC5B) và thu gom dịch nổi và khử trùng qua bộ lọc 0,2µm. rProtein A Sepharose (số phần 17-5199-03, GE Healthcare) được bao trong cột sắc ký 1L. Sau khi loại bỏ dung dịch đệm bảo quản và xử lý bằng 2 thể tích cột axit axetic 1M, cân bằng nhựa này bằng 5 thể tích cột dung dịch đệm NaPO₄ 50mM/NaCl 1M, pH=7,04. Khoảng 2 lít dịch chứa kháng nguyên *M. hyopneumoniae* đã lọc/làm trong được đưa qua nhựa Protein A ở lưu tốc 100cm/giờ. Thu gom dòng chảy qua và khử trùng qua bộ lọc 0,2µm.

T05: Đây là đối chứng dương tính tương ứng với chế phẩm kiểu Fostera PCV (không kháng nguyên M. hyo). Mức virus dạng khảm trong chế phẩm kiểu Fostera PCV này là xấp xỉ mức bào chế liều gây miễn dịch tối thiểu (Minimum Immunizing Dose: MID). Virus dạng khảm được đưa vào các vaccin thực nghiệm PCV2/M. hyo ở mức bào chế tương tự.

Tất cả các vaccin PCV2/M. hyo thực nghiệm đều được bào chế với các chế phẩm tá chất khác nhau. Các vaccin thực nghiệm này được bào chế với các kháng nguyên M. Hyo được xử lý theo các mẫu điều trị T02-T04 trên đây. Ngoài ra, mẫu điều trị T01 tương ứng với thuốc vờ (nước muối vô trùng).

Tất cả các vacxin đều được chuẩn hóa bằng ELISA đối với p46 và bảo quản bằng thimerosol. Các chế phẩm thực nghiệm này được mô tả trong Bảng 6 dưới đây, trong đó ký hiệu * chỉ kháng nguyên M. Hyo từ giống M. Hyo tổng, dịch nổi được xử lý bằng Protein A và ký hiệu ** chỉ loạt sản phẩm thú y nghiên cứu (IVP).

Bảng 6: Các chế phẩm vacxin thực nghiệm PCV2/M. hyo dùng cho nghiên cứu về hiệu lực của PCV2

Điều trị	Loạt IVP **	Kháng nguyên PCV1-2	Kháng nguyên M. Hyo*	Tá dược	Thành phần khác
T01	87-244-DK (Thuốc vờ)	NA			Nước muối vô trùng
T02	L0411RK08	1,6 RP	7,5 RP	SP-dầu 10%	NA
T03	L0411RK09			Amphigen 5%	
T04	L0611RK03			Amphigen 5% + SLCD 5%	
T05	L0611RK04		NA	SLCD 20%	

Lợn 3 tuần tuổi được tiêm chủng qua đường trong bắp bằng liều duy nhất của các chế phẩm vacxin khác nhau được mô tả trong Bảng 6 trên đây. Mười sáu con được xếp vào mỗi nhóm điều trị. Cho lợn dùng liều quyết định ở 21 ngày sau khi tiêm chủng thể phân lập thực địa PCV2 độc.

Fig.3 là đồ thị thể hiện kết quả virus huyết PCV2 (PCR định lượng PCV2: PCV2 Quantitative PCR) quan sát được với các nền tá chất khác nhau. Cần lưu ý rằng virus huyết PCV2 được dùng làm biến hiệu lực sơ cấp. Kết quả virus huyết PCV2 được thể hiện dưới dạng số bản sao ADN/ml. Như được thể hiện trên Fig.3, tất cả các mẫu điều trị đều có mức virus huyết thấp hơn đáng kể so với thuốc vờ vào ngày 28, 35 và 42 (dùng liều quyết định là vào ngày 21). Tá dược SP-dầu 10% có mức virus huyết thấp hơn đáng kể so với Amphigen 5% vào ngày 28 và 35. Tá dược Amphigen 5% +SLCD 5% có mức virus huyết thấp hơn đáng kể so với Amphigen 5% vào ngày 28 và 35. Nền tá chất SLCD 20% có mức virus huyết thấp hơn đáng kể so với Amphigen 5% vào ngày 28, 35 và 42.

Huyết thanh học PCV2, sự thải PCV2 qua phân, sự thải PCV2 qua mũi, đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào (Cell Mediated Immune: CMI), sự tiêu bạch huyết, và

hóa mô miễn dịch (Immunohistochemistry: IHC) cũng được theo dõi dưới dạng biến hiệu lực thứ cấp. Các kết quả này sẽ được mô tả dưới đây.

Fig.4 là đồ thị thể hiện kết quả PCV2 ELISA vào ngày 1, 20 và 42 của nghiên cứu (dùng liều quyết định là vào ngày 21). Vị trí của mỗi mẫu được thể hiện dưới dạng tỷ lệ mẫu/dương tính (S/P). Như được thể hiện trên Fig.4, SLCD 20% là mẫu điều trị duy nhất khác biệt đáng kể so với thuốc vờ (T01) vào cả ngày 20 lẫn ngày 42. Tương tự, Amphigen 5% là mẫu điều trị duy nhất khác biệt đáng kể so với thuốc vờ vào ngày 20.

Fig.5 là đồ thị thể hiện mức thải PCV2 qua phân thu được với các nhóm điều trị T02-T04 so với thuốc vờ (T01). Kết quả được thể hiện dưới dạng số bản sao ADN của PCV2/ml. Kết quả trên Fig.5 chỉ ra rằng tất cả các nhóm điều trị đều có mức thải qua phân thấp hơn đáng kể so với thuốc vờ vào ngày 42. Ngoài ra, Amphigen 5% & SLCD 5% (T04) có mức thải qua phân thấp hơn đáng kể so với Amphigen 5% (T03) vào ngày 42. Không ghi nhận được sự khác biệt điều trị nào khác.

Fig.6 là đồ thị thể hiện mức thải PCV2 qua mũi thu được với các nhóm điều trị T02-T04 so với thuốc vờ (T01). Kết quả được thể hiện dưới dạng số bản sao ADN của PCV2/ml. Kết quả trên Fig.6 chỉ ra rằng tất cả các nhóm điều trị đều có mức thải qua mũi thấp hơn đáng kể so với thuốc vờ vào ngày 42. Ngoài ra, SLCD 20% (T05) có mức thải qua mũi thấp hơn đáng kể so với Amphigen 5% (T03) vào ngày 42. Không ghi nhận được sự khác biệt điều trị nào khác.

Fig.7 (A & B) là hai đồ thị thể hiện kết quả của thử nghiệm interferon-gama (IFN- γ) đo đáp ứng Miễn dịch qua trung gian tế bào (CMI) đặc hiệu với PCV2. Kết quả về CMI được thể hiện là sau tiêm chủng/trước liều quyết định (Fig.7A), và sau tiêm chủng/sau liều quyết định (Fig.7B). Trong các đồ thị này, sự kích thích 5×10^6 được coi là đáng kể (...). Tất cả các vacxin thực nghiệm PCV2/M. hyo đều có đáp ứng IFN- γ sau tiêm chủng phát hiện được. SP-dầu 10% (T02) cho đáp ứng IFN- γ sau tiêm chủng mạnh nhất. SLCD 20% (T05) tạo ra đáp ứng sớm hơn, son đáp ứng thấp nhất vào ngày 20. Có đáp ứng cao sau liều quyết định, đặc biệt là quan sát thấy ở nhóm thuốc vờ. Ngoài ra, đáp ứng sau liều quyết định là thấp hơn ở các nhóm điều trị lợn được tiêm chủng so với nhóm thuốc vờ.

Bảng 7 dưới đây thể hiện mức tiêu bạch huyết thu được với các nhóm điều trị thực nghiệm trái ngược với thuốc vờ.

Bảng 7: Mô bệnh học (sự tiêu bạch huyết) PCV2

Điều trị	Mức tiêu bạch huyết			Trái ngược với thuốc vờ	
	Dương tính	Âm tính	% đã từng dương tính	Trị số P	Ý nghĩa
Thuốc vờ	9	7	56%	NA	NA
SP-dầu 10%	1	15	6%	0,0059	Có
Amphigen 5%	1	15	6%	0,0059	Có
Amph 5% +SLCD 5%	0	16	0%	0,0008	Có
SLCD 20%	1	15	6%	0,0059	Có

Kết quả trong Bảng 7 trên đây cho thấy rằng tất cả các vaccin đều tạo ra sự phòng ngừa mạnh đối với sự tiêu bạch huyết. Cũng không quan sát thấy các trái ngược điều trị vaccin có ý nghĩa thống kê.

Bảng 8 dưới đây thể hiện hóa mô miễn dịch thu được với các nhóm điều trị thực nghiệm trái ngược với thuốc vờ.

Bảng 8: Mô bệnh học (hóa mô miễn dịch) đối với PCV2

Điều trị	Hóa mô miễn dịch			Trái ngược với thuốc vờ	
	Dương tính	Âm tính	% đã từng dương tính	Trị số P	Ý nghĩa
Thuốc vờ	12	4	75%	NA	NA
SP-dầu 10%	0	16	0%	0,0001	Có
Amphigen 5%	1	15	6%	0,0002	Có
Amph 5% +SLCD 5%	0	16	0%	0,0001	Có
SLCD 20%	0	16	6%	0,0001	Có

Kết quả trong Bảng 8 trên đây cho thấy rằng tất cả các vaccin đều tạo ra sự phòng ngừa mạnh đối với sự khu trú PCV2 như được chứng minh bằng hóa mô miễn dịch. Cũng không quan sát thấy các trái ngược điều trị vaccin có ý nghĩa thống kê.

Kết luận, kết quả trong ví dụ này chứng minh rằng chế phẩm kháng nguyên hòa tan M. hyo không ngăn cản hiệu lực của PCV2. Kết quả này cũng cho thấy rằng tất cả các chế phẩm vaccin thực nghiệm PCV/M. hyo đều có hiệu lực chống lại liều PCV2 quyết định. Ngoài ra, kết quả này chỉ ra rằng có sự khác biệt về số và thống kê nhất định thu được với các chế phẩm tá chất khác nhau, với SP-dầu 10% cho hiệu lực mạnh nhất.

Ví dụ 8: Đánh giá hiệu lực của M. hyo của vaccin kết hợp PCV2/M. hyo trong một lọ với các chế phẩm tá chất khác nhau

Nghiên cứu này được thiết kế để đánh giá hiệu lực của M. hyo của vaccin kết hợp PCV2/M. hyo trong một lọ với các chế phẩm tá chất khác nhau. Kháng nguyên M. hyo được kết hợp với Circovirut lợn (virut chết dạng khảm Typ 1-Typ 2, hoặc PCV1-2) trong một lọ.

Xử lý dịch:

Dịch lên men M. hyo đã được làm bất hoạt (được mô tả trên đây trong Ví dụ 1) được xử lý đối với mỗi nhóm được chỉ định là như sau.

T02-T04: Các nhóm điều trị này là giống như được mô tả đối với các nhóm điều trị T02-T04 trong Ví dụ 7 trên đây.

T05: Nhóm này được bào chế với tế bào M. hyo được làm bất hoạt (M. hyo bacterin) như được mô tả trong Ví dụ 1 trên đây dưới đề mục “Lên men và làm bất hoạt”.

Tất cả các vaccin PCV2/M. hyo thực nghiệm đều được bào chế với các chế phẩm tá chất khác nhau. Các chế phẩm vaccin thực nghiệm này được bào chế với các kháng nguyên M. Hyo được xử lý theo các nhóm điều trị T02-T04. Ngoài ra, nhóm điều trị T01 tương ứng với thuốc vờ (nước muối vô trùng). Nhóm điều trị T05 là đối chứng dương tính tương ứng với vaccin RespiSure® hết hạn, là vaccin trên cơ sở M. hyo bacterin (Pfizer Animal Health).

Các chế phẩm thực nghiệm này được mô tả trong Bảng 9 dưới đây, trong đó ký hiệu * chỉ kháng nguyên M. Hyo từ giống M. Hyo tổng, dịch nổi được xử lý bằng Protein A và ký hiệu ** chỉ loạt sản phẩm thú y nghiên cứu (IVP).

Bảng 9: Các chế phẩm vaccin thực nghiệm PCV2/M. hyo dùng cho nghiên cứu về hiệu lực của M. hyo trong các chế phẩm tá chất khác nhau

Điều trị	Loạt IVP**	Kháng nguyên PCV1-2	Kháng nguyên M. Hyo*	Tá dược	Khác
T01	87-244-DK (Thuốc vờ)	NA			Nước muối vô trùng
T02	L0411RK08	1,6 RP	7,5 RP	SP-dầu 10%	NA
T03	L0411RK09			Amphigen 5%	

Điều trị	Loạt IVP**	Kháng nguyên PCV1-2	Kháng nguyên M. Hyo*	Tá dược	Khác
T04	L0611RK03			Amphigen 5% + SLCD 5%	
T05	A827870	Vaccin “RespiSure” hết hạn			

Lợn 3 tuần tuổi được tiêm chủng qua đường trong bắp bằng liều duy nhất của các chế phẩm vaccin khác nhau được mô tả trong Bảng 9 trên đây. Mười bốn con được xếp vào cả nhóm thuốc vờ lẫn nhóm SP-dầu 10%, 13 con được xếp vào nhóm đối chứng dương tính, và 16 con được xếp vào cả nhóm Amphigen 5% lẫn nhóm Amphigen 5% + SLCD 5%.

Cho lợn dùng liều quyết định ở 21 ngày sau khi tiêm chủng thể phân lập thực địa M. hyo độc. Mở khám nghiệm lợn ở 28 ngày sau liều quyết định và lấy phổi và tính điểm số tổng hợp phù hợp với bệnh nhiễm M. hyo. Bảng 10 dưới đây thể hiện điểm số tổn thương phổi đối với các nhóm điều trị tương ứng. Ý nghĩa thống kê được xác định bằng phân tích mô hình hỗn hợp (Mixed Model Analysis) về điểm số phổi đối với mỗi nhóm.

Bảng 10: Tổn thương phổi do M. hyo

Điều trị	Số con	Tổn thương phổi Trung bình LS	Giới hạn % tổn thương phổi
Thuốc vờ (T01)	14	13,1%	0,1 – 50,5
SP-dầu 10% (T02)	14	4,3%	0,0 – 50,8
Amphigen 5% (T03)	16	4,7%	0,0 – 38,5
Amph 5%+SLCD 5% (T04)	16	12,0%	0,1 – 55,8
RSO hết hạn (T05)	13	2,28%	0,0 – 34,5

Như được chỉ ra trong Bảng 10 trên đây, nhóm thuốc vờ có điểm số tổn thương phổi trung bình là 13,1%, so với các nhóm điều trị SP-dầu 10% và Amphigen 5% có điểm số tổn thương phổi trung bình lần lượt là 4,3% và 4,7%. Cả hai chế phẩm SP-dầu 10% và Amphigen 5% đều cho mức độ tổn thương phổi giảm và/hoặc được ngăn ngừa. Do đó, các vaccin PCV/M. hyo thực nghiệm bào chế với SP-dầu 10% hoặc Amphigen 5% được coi là có *hiệu lực*. Kháng nguyên PCV2 rõ ràng không ngăn cản hiệu lực của M. hyo của các chế phẩm này.

Ngược lại, nhóm Amphigen 5% + SLCD 5% có điểm số tổn thương phổi trung bình là 12,0%, kết quả này không chấp nhận được ở chỗ nó không khác biệt so với

thuốc vờ. Kết quả là, vaccin PCV/M. hyo thực nghiệm bào chế với Amphigen 5% + SLCD 5% được coi là không có *hiệu lực*.

Cần lưu ý rằng do số lợn giảm và khả năng biến đổi cao về việc tính điểm số tổn thương phổi nên không thể kết luận chứng minh được hiệu lực điều trị thông kê trong nghiên cứu này. Do đó, đã quyết định rằng nghiên cứu khác sẽ được thiết kế để thử nghiệm hiệu lực của M. hyo của các chế phẩm thực nghiệm PCV/M. hyo trong SP-dầu 10%. Nghiên cứu lặp lại này được thể hiện trong Ví dụ 9 dưới đây.

Ví dụ 9: Đánh giá hiệu lực của M. hyo của vaccin kết hợp PCV2/M. hyo trong một lọ trong SP-dầu 10%

Nghiên cứu này được thiết kế để đánh giá hiệu lực của phân đoạn M. hyo của bốn vaccin PCV2/M. hyo thực nghiệm (loạt L0711RK11, L0711RK12, L0711RK13 và L0711RK14 trong Bảng 11 dưới đây) bào chế bằng các quy trình sản xuất M. hyo có sử dụng Protein A để loại bỏ IgG so với các vaccin đối chứng bào chế bằng quy trình sản xuất M. hyo chuẩn. mỗi một trong bốn vaccin PCV2/M. hyo này đều chứa SP-dầu 10% làm tá dược.

Xử lý dịch:

T02: Kháng nguyên *M. hyopneumoniae* được làm bất hoạt được mô tả dưới đề mục “Lên men và làm bất hoạt” trong Ví dụ 1 trên đây.

T03 và T04: Bào chế với tế bào *M. hyopneumoniae* được làm bất hoạt như được mô tả dưới đề mục “Lên men và làm bất hoạt” trong Ví dụ 1 trên đây.

T05: Xử lý môi trường bằng Protein A để nuôi cấy *M. hyopneumoniae*. PPLO (được tạo ra từ tim lợn) được điều chế theo hướng dẫn của nhà sản xuất (tức là 21g/L) và dung dịch chiết nấm men được điều chế ở 21g/L theo USP. Thêm dung dịch chiết nấm men vào PPLO ở 6,25% và khử trùng hỗn hợp thu được bằng cách gia nhiệt đến 121°C trong ≥ 30 phút. Điều chế xystein hydroclorua ở 90g/L và lọc vô trùng. Điều chế dung dịch dextroza bằng cách thêm 450g dextroza/lít nước USP tiếp theo là khử trùng bằng nhiệt. Để điều chế môi trường cuối, thêm huyết thanh lợn vào môi trường bazơ 10% tiếp theo là xystein ở 0,01% và dextroza ở 1,0%. Kháng thể trong môi trường PPLO đầy đủ được loại bỏ bằng cách xử lý bằng protein A. Nói vắn tắt, bao một lít rProtein A Sepharose (số phần 17-5199-03 GE Healthcare) trong cột thủy tinh (10 X 11,5cm). Sau khi loại bỏ dung dịch bảo quản, xử lý cột bằng 2 thể tích cột axit axetic 1M. Cân bằng nhựa này bằng 5 thể tích cột 50 mM NaPO₄, dung dịch đệm NaCl 1M (pH=7,0). Nạp 15 lít môi

trường PPLO đầy đủ lên nhựa ở lưu tốc tuyến tính 140cm/giờ. Thu gom dòng chảy qua và khử trùng qua bộ lọc 0,2 micron (Sartorius). Môi trường đã được xử lý này được dùng để tế bào *M. hyopneumoniae* sinh sản như được mô tả dưới đề mục “Lên men và làm bất hoạt” trên đây. Toàn bộ giống đã được làm bất hoạt (chứa tế bào) được bào chế thành vacxin cuối.

T06: Tế bào *M. hyopneumoniae* được làm bất hoạt được điều chế như được mô tả dưới đề mục “Lên men và làm bất hoạt” trong Ví dụ 1 trên đây. Dịch lên men được làm bất hoạt được ly tâm ở ~20000xg (Sorvall RC5B) trong 30 phút và khử trùng dịch nổi qua bộ lọc 0,2µM. Bao 115ml nhựa rProtein A (số phần 12-1279-04, MAbSelect, GE Healthcare) trong cột sắc ký (5x6cm). Sau khi loại bỏ dung dịch đệm bảo quản và xử lý bằng 2 thể tích cột axit axetic 1M, cân bằng nhựa này bằng 5 thể tích cột NaPO₄ 50mM/dung dịch đệm NaCl 1M, pH=7,01. Khoảng 1,2 lít dịch chứa kháng nguyên *M. hyopneumoniae* đã lọc/làm trong được đưa qua nhựa Protein A ở lưu tốc 120cm/giờ. Thu gom dòng chảy qua và khử trùng qua bộ lọc 0,2µM.

T07: Tế bào *M. hyopneumoniae* được làm bất hoạt được điều chế như được mô tả dưới đề mục “Lên men và làm bất hoạt” trong Ví dụ 1 trên đây. Dịch lên men được làm bất hoạt được làm trong bằng cách lọc dòng tiếp tuyến. Nói vắn tắt, bộ lọc polyete sulfon (GE HealthCare, số phần 56-4102-71) có cỡ lỗ danh định 0,2µM được khử trùng bằng dung dịch natri hydroxit 0,5N tiếp theo là rửa kỹ bằng nước USP vô trùng. Dịch nuôi cấy mycoplasma được làm bất hoạt được đưa vào thiết bị ở tốc độ tái tuần hoàn là 14,6L/phút và áp suất qua màng là 2-3,4 PSI. Việc làm trong được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng. Thu gom dịch lọc và bảo quản ở 2-8oC cho đến khi xử lý tiếp. Bao 115ml nhựa rProtein A (số phần 12-1279-04, MAbSelect, GE Healthcare) trong cột sắc ký (5x6cm). Sau khi loại bỏ dung dịch đệm bảo quản và xử lý bằng 2 thể tích cột axit axetic 1M, cân bằng nhựa này bằng 5 thể tích cột NaPO₄ 50mM/dung dịch đệm NaCl 1M, pH = 7,01. Khoảng 2,3 lít dịch chứa kháng nguyên *M. hyopneumoniae* đã lọc/làm trong được đưa qua nhựa Protein A ở lưu tốc 120cm/giờ. Thu gom dòng chảy qua và khử trùng qua bộ lọc 0,2µM.

T08: Tế bào *M. hyopneumoniae* được làm bất hoạt được điều chế như được mô tả dưới đề mục “Lên men và làm bất hoạt” trên đây. Dịch lên men được làm bất hoạt được ly tâm ở ~20000xg (Sorvall RC5B) trong 30 phút và khử trùng dịch nổi qua bộ lọc 0,2µM. Bao 115ml rProtein A Sepharose (số phần 17-5199-03 GE Healthcare) trong cột sắc ký

(5x6cm). Sau khi loại bỏ dung dịch đệm bảo quản và xử lý bằng 2 thể tích cột axit axetic 1M, cân bằng nhựa này bằng 5 thể tích cột NaPO₄ 50mM/dung dịch đệm NaCl 1M, pH=7,01. Khoảng 1,2 lít dịch chứa kháng nguyên *M. hyopneumoniae* đã lọc/làm trong được đưa qua nhựa Protein A ở lưu tốc 120cm/giờ. Thu gom dòng chảy qua và khử trùng qua bộ lọc 0,2µm.

Các chế phẩm vaccin thực nghiệm được bào chế với các kháng nguyên M. Hyo được xử lý theo các mẫu điều trị T02-T08 trên đây. T02, T03 và T04 tương ứng với các đối chứng dương tính. Ngoài ra, mẫu điều trị T01 tương ứng với thuốc vờ (nước muối vô trùng).

Các chế phẩm thực nghiệm này được mô tả trong Bảng 11 dưới đây. Kháng nguyên M. hyo tương ứng với kháng nguyên M. hyo từ giống M. Hyo tổng, dịch nổi được xử lý bằng Protein A. Thông tin trong cột “xử lý bằng Protein A” chỉ dịch nổi M. hyo được xử lý bằng Protein A trước hoặc sau lên men.

Bảng 11: Các chế phẩm vaccin thực nghiệm PCV2/M. hyo dùng cho nghiên cứu về hiệu lực của M. hyo trong tá chất SP-dầu

Điều trị	Loại	Kháng nguyên PCV1-2	Kháng nguyên M. hyo	Xử lý bằng Protein A	Phương pháp làm trong dịch nổi	Tên loại Protein A	Tá dược	Khác
T01	L0311AS11	NA						Nước muối vô trùng
T02	A828718	NA	13	RespiSure One hết hạn			Amphigen	NA
T03	L0711RK09	1,5 RP	7,5 RP	M. hyo không được xử lý bằng Protein A và có PCV-2			SP-dầu 10%	
T04	L0711RK10	NA		M. hyo không được xử lý bằng Protein A và không có PCV-2				
T05	L0711RK11	1,5 RP		Trước	NA	Sepharose		
T06	L0711RK12			Sau	Ly tâm	MABSelect		
T07	L0711RK13			Sau	Lọc	MABSelect		
T08	L0711RK14			Sau	Ly tâm	Sepharose		

Lợn 3 tuần tuổi được tiêm chủng qua đường trong bắp bằng liều duy nhất của các chế phẩm vaccin khác nhau được mô tả trong Bảng 11 trên đây. Có 18 con được xếp vào mỗi nhóm. Cho lợn dùng liều quyết định ở 21 ngày sau khi tiêm chủng thể phân lập thực địa M. hyo độc. Mổ khám nghiệm lợn ở 28 ngày sau liều quyết định và lấy phổi và tính điểm số tổng hợp phù hợp với bệnh nhiễm M. hyo. Fig.8 (A & B) thể hiện điểm số tổn thương phổi đối với các nhóm điều trị tương ứng. Ý nghĩa thống kê được xác định bằng phân tích mô hình hỗn hợp (Mixed Model Analysis) về điểm số phổi đối với mỗi nhóm.

Kết quả về tổn thương phổi trên Fig.8A và 8B chỉ ra rằng trong tất cả các mẫu điều trị, chỉ có hai mẫu (T07 và T08) có 100% số lợn nằm trong danh mục có tổn thương phổi <5%. Cần lưu ý rằng khác biệt thống kê mạnh được quan sát thấy trong nghiên cứu này.

Kết quả trong ví dụ này chứng minh hiệu lực của M. hyo trong chế phẩm thực nghiệm PCV2/M. hyo trong một lọ có sử dụng dịch nổi được xử lý bằng Protein A và sử dụng SP-dầu làm tá được. Ngoài ra, Ví dụ 7 trên đây chứng minh hiệu lực của PCV2 trong chế phẩm PCV2/M. hyo trong một lọ có sử dụng dịch nổi được xử lý bằng Protein A và sử dụng SP-dầu làm tá được. Tóm lại, hiệu lực của cả M. hyo lẫn PCV2 đều được chứng minh trong chế phẩm kết hợp PCV2/M. hyo trong một lọ có sử dụng dịch nổi được xử lý bằng Protein A.

Ví dụ 10: Độ an toàn in vivo trong vaccin thực nghiệm PCV2/M. hyo

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá độ an toàn *in vivo* của các vaccin PCV2-M. hyo thực nghiệm bào chế được ở liều kháng nguyên tối đa trong các chế phẩm tá chất khác nhau ở động vật chủ khi sử dụng ở độ tuổi thấp nhất (3 tuần tuổi). Các nền tá chất khác nhau được đánh giá để xác định nền tá chất nào trong số đó cho profin an toàn chấp nhận được trên cơ sở nhiệt độ, phản ứng ở vị trí tiêm và quan sát lâm sàng. Chế phẩm SLCD 20%/SP-dầu 10% được dùng làm đối chứng dương tính (“không an toàn”) do các vấn đề mô học với các phản ứng ở vị trí tiêm quan sát được bởi nhóm nghiên cứu này và các vấn đề khác.

Xử lý dịch:

Tất cả các vaccin đều được bào chế với kháng nguyên *M. hyopneumoniae* được làm bất hoạt được mô tả dưới đề mục “Lên men và làm bất hoạt” trong Ví dụ 1. Kháng nguyên M. hyo toàn đơn thể được sử dụng do nó được biết là chứa các kháng nguyên

M. hyo hòa tan và không hòa tan, ngoài các globulin miễn dịch và phức hợp miễn dịch mà có thể loại bỏ được sau khi xử lý bằng protein A. Có thể kết luận hợp lý rằng việc loại bỏ mảnh vỡ tế bào không hòa tan và globulin miễn dịch và phức hợp miễn dịch sẽ chỉ làm tăng thêm độ an toàn của chế phẩm vaccin. Dự tính của nghiên cứu này là thử nghiệm một cách nghiêm ngặt độ an toàn của các chế phẩm tá chất khác nhau chứa kháng nguyên PCV2 và kháng nguyên M. hyo. Các kháng nguyên PCV2 và M. hyo được bào chế ở mức giải phóng tối đa để đánh giá thêm độ an toàn. Các chế phẩm thực nghiệm này được mô tả trong Bảng 12 dưới đây. IVP chỉ sản phẩm thú y nghiên cứu (IVP).

Bảng 12: Các chế phẩm vaccin thực nghiệm PCV2/M. hyo dùng để nghiên cứu về độ an toàn

Loại IVP	Kháng nguyên PCV1-2	Kháng nguyên M. Hyo*	Tá dược	Khác	Thể tích vaccin tối thiểu (mL)
87-244-DK (Thuốc vò)	NA			Nước muối vô trùng	NA
L0411RK15	7,8 RP	13 RP	SP-dầu 10%	NA	200
L0411RK16			Amphigen 5%		200
L0611RK05			Amphigen 5% + SLCD 5%		200
L0611RK06			SLCD 20% + SP-dầu 10%		200

* Kháng nguyên M. Hyo = từ giống M. Hyo tổng (kháng nguyên toàn đơn thể).

Các thông số an toàn dùng trong nghiên cứu này là profin nhiệt độ trực tràng và phản ứng ở vị trí tiêm. Kết quả của nghiên cứu này chỉ ra rằng tất cả các nền tá chất đưa ra đều cho profin an toàn chấp nhận được về profin nhiệt độ trực tràng và quan sát lâm sàng (kết quả không được thể hiện). chỉ có SLCD 20% + SP-dầu 10% (tức là đối chứng dương tính) là khác biệt đáng kể so với vaccin thuốc vò và có nhiều phản ứng nghiêm trọng ở vị trí tiêm (kết quả không được thể hiện).

Ví dụ 11: Điều chế kháng nguyên M. hyo được xử lý bằng Protein A dùng cho các nghiên cứu then chốt

Fig.9 là sơ đồ tiến trình thể hiện một phương án về quy trình sản xuất dùng để điều chế kháng nguyên M. hyo được xử lý bằng Protein tương thích với PCV2. Toàn bộ giống M. hyo được làm bất hoạt được làm trong tế bào bằng cách lọc dòng tiếp tuyến.

Nói vắn tắt, bộ lọc polyete sulfon (GE Healthcare, số phần 56-4102-49) có cỡ lỗ danh định $0,45\mu\text{M}$ được khử trùng bằng dung dịch natri hydroxit 0,5N tiếp theo là rửa kỹ bằng nước USP vô trùng. Dịch nuôi cấy mycoplasma được làm bất hoạt được đưa vào thiết bị ở tốc độ tái tuần hoàn là 11,0L/phút và áp suất qua màng là ~ 5 PSI. Việc làm trong được thực hiện ở nhiệt độ trong phòng. Thu gom dịch lọc và bảo quản ở $2-8^{\circ}\text{C}$ cho đến khi xử lý tiếp.

Sau khi làm trong, xử lý dịch chứa kháng nguyên bằng nhựa protein A để làm giảm mức kháng thể. Nói vắn tắt, bao nhựa protein A MAbSelect (GE Healthcare) trong cột thủy tinh tới độ cao 12cm. Cân bằng nhựa này bằng 5 thể tích cột natri phosphat 50mM, dung dịch đệm NaCl 250mM (pH=7,0). Nạp dịch chứa kháng nguyên, tương đương với 10 thể tích cột, lên nhựa ở lưu tốc tuyến tính 100cm/giờ. Thu gom dịch qua cột và lọc vô trùng qua bộ lọc 0,2 micron. Tái tạo cột bằng cách cho 3 thể tích cột dung dịch axetat 25mM có độ Ph=3,7 tiếp theo là 4 thể tích cột dung dịch axit axetic 1M chảy qua. Đo các mức kháng thể kháng PCV2 và kháng nguyên *M. hyopneumoniae* trong dịch kháng nguyên cuối lần lượt bằng ELISA kháng thể đặc hiệu với PCV2 và ELISA định lượng kháng nguyên p46.

Ví dụ 12: Hiệu lực của phân đoạn dạng khảm PCV1-2 sau khi dùng qua đường trong bắp vacxin kết hợp PCV2/M.hyo trong một lọ trong SP-dầu 10%

Nghiên cứu trong ví dụ được thiết kế để đánh giá hiệu lực của phân đoạn virus chết dạng khảm PCV1-2 của vacxin kết hợp PCV2/M.hyo trong một lọ thực nghiệm, dùng một lần cho lợn 21 ± 3 ngày tuổi và dùng liều quyết định bằng thể phân lập PCV2 độc ở khoảng 6 tuần tuổi.

Bốn vacxin nhị giá PCV1-2/M.hyo thực nghiệm ở các mức liều kháng nguyên khác nhau, nhưng cân bằng, và một vacxin M.hyo đơn giá thực nghiệm (đối chứng âm tính) được bào chế với kháng nguyên liều cao nhất. Lô đối chứng kháng nguyên M.hyo được bào chế như được mô tả trong Ví dụ 11 trên đây. Kháng nguyên PCV2 là kháng nguyên cPCV1-2 chết được bào chế như được mô tả trong Ví dụ 2 trên đây. Trước khi làm bất hoạt virus dạng khảm này, lô kháng nguyên PCV2 được cô 20X và rửa thể cô bằng dung dịch muối cân bằng. Các chế phẩm vacxin thực nghiệm cuối được thêm SP-dầu 10%. Các chế phẩm thực nghiệm này được mô tả trong Bảng 13 dưới đây, trong đó có đề xuất liều kháng nguyên (% các lô PCV2 và kháng nguyên M. hyo).

T01: Chế phẩm thực nghiệm (L1211RK11) chứa kháng nguyên M.hyo (14,1%-Cao) mà không có phân đoạn virus chết dạng khả PCV typ1-typ2 (0%). Mẫu này tương ứng với đối chứng âm tính (M.hyo đơn giá).

T02: Chế phẩm thực nghiệm (L1211RK09) chứa virus chết dạng khả PCV typ1-typ2 liều cao (1,375%-Cao) và kháng nguyên M. hyo (14,1%-Cao).

T03: Chế phẩm thực nghiệm (L1211RK15) chứa virus chết dạng khả PCV typ1-typ2 liều cao (0,688%-Trung bình) và kháng nguyên M. hyo (9,4%-Trung bình).

T04: Chế phẩm thực nghiệm (L0112RK03) chứa virus chết dạng khả PCV typ1-typ2 liều cao (0,344%-Thấp) và kháng nguyên M. hyo (4,7%-Thấp).

T05: Chế phẩm thực nghiệm (L1211RK17) chứa virus chết dạng khả PCV typ1-typ2 liều cao (0,172%-Rất thấp) và kháng nguyên M. hyo (2,32%-Rất thấp).

Bảng 13: Thiết kế thực nghiệm

Nhóm	N	CP hoặc IVP ¹	Chủng vaccin				
			Loạt/lô	Liều kháng nguyên (PCV2/M. hyo)	Tá dược	Liều	Đường dùng
T01	24	Thuốc vờ	L1211RK11	Không/Cao	SP-dầu 10%	2mL	IM, bên phải cổ
T02	24	PCV2-M. Hyo	L1211RK09	Cao/Cao			
T03	24	PCV2-M. Hyo	L1211RK15	Trung bình/Trung bình			
T04	24	PCV2-M. Hyo	L0112RK03	Thấp/thấp			
T05	24	PCV2-M. Hyo	L1211RK17	Rất thấp/rất thấp			

¹ IVP = Vaccin virus chết, Circovirus lợn dạng khả Typ 1 – Typ 2 - Dịch chiết vi khuẩn Mycoplasma Hyopneumoniae (M. hyo)

CP = Dịch chiết vi khuẩn Mycoplasma Hyopneumoniae chứa tá chất SP-dầu 10 % (không có phân đoạn Circovirus dạng khả Typ 1 – Typ 2)

IM = Trong bắp

Vào ngày 0 (3 tuần tuổi), liều 2mL duy nhất của vaccin chỉ định được sử dụng bằng cách tiêm bắp bên phải cổ của mỗi lợn tham gia vào nghiên cứu này. Không quan sát thấy hiệu lực phụ sau tiêm. Thu gom mẫu huyết thanh hằng tuần từ tất cả các lợn trước khi dùng liều quyết định. Lợn bất kỳ phát hiện được là có PCV2 trong máu trước khi dùng liều quyết định sẽ được loại ra khỏi nghiên cứu. Vào ngày trước khi dùng liều quyết định, thu gom gạc phân và mẫu huyết thanh. Tiếp theo, cho lợn dùng liều virus

PCV2a quyết định. Việc dùng liều quyết định được thực hiện khoảng 3 tuần sau tiêm (ngày 21). Mỗi lợn được tiêm tổng cộng 3mL virus PCV2a quyết định (thể phân lập #40895, pha loãng trước đến $5,10 \log_{10}$ FAID₅₀/mL) với 2mL trong mũi và 1mL trong bắp vào bên trái cổ. Phần mẫu dự phòng của virus quyết định được tính hiệu giá sau liều quyết định để xác nhận liều quyết định thực tế. Đơn thể không pha loãng được pha loãng trước 2 lần và kết quả hiệu giá ngược đạt tới mức quyết định $5,10 \log_{10}$ FAID₅₀/mL. Trước khi mổ khám xác, thu gom huyết thanh và gạc phân hằng tuần trong giai đoạn quyết định ba tuần. Ở ba tuần sau liều quyết định, gây mê và mổ khám xác tất cả các lợn. Thu gom mẫu huyết thanh và gạc phân, cùng với 4 mô bạch huyết khác nhau. Trong quá trình mổ khám xác, thu gom các phần của ba hạch bạch huyết (khí-phế quản, màng treo ruột, bẹn) và amidan đối với mỗi lợn và nhận dạng riêng rẽ và cố định bằng dung dịch formalin đậm 10%. Kết quả thử nghiệm được nêu dưới đây.

Thử nghiệm về hoạt lực của vaccin

Loạt vaccin PCV/M.hyo L1211RK15 được mô tả trên đây được coi là đối tượng so sánh. Kết quả là, hoạt lực tương đối đối với cả phân đoạn M.hyo lẫn phân đoạn PCV2 được xác định theo đối tượng so sánh. Các kết quả này được nêu trong Bảng 14 dưới đây. Loạt L1211RK11 tương ứng với thuốc vờ (không có phân đoạn PCV2).

Bảng 14: Kết quả về hoạt lực

Loạt	L1211RK15 so sánh	
	Hoạt lực của <i>M. hyo</i>	Hoạt lực của PCV
L1211RK11	1,57	0,00
L1211RK09		2,08
L1211RK15		1,05
L0112RK03		0,56
L1211RK17		0,27

Kết quả đối với mỗi loạt là trung bình của tất cả các lần thử nghiệm lặp lại.

PCV2 trong máu

Sau liều quyết định, so với nhóm thuốc vờ, tất cả các nhóm được tiêm chủng đều có phần trăm số lợn có virus trong máu giảm đáng kể [$P \leq 0,05$], và trên toàn nghiên cứu ít nhất 47% số lợn trong các nhóm điều trị (T02-T05) vẫn âm tính với PCV2 trong máu (Bảng 15 dưới đây). Tương tự, tất cả các nhóm nhóm vaccin đều có số lượng bản sao ADN PCV2 thấp hơn đáng kể ($P=0,0001$) so với nhóm thuốc vờ sau liều quyết định (số liệu không được thể hiện).

Bảng 15: Virut huyết thanh định lượng bằng qPCR – Phần trăm dương tính và ước tính phân đoạn được phòng ngừa

Điều trị	Vaxxin	Dương tính?				Quan sát tổng số	Trị số P
		Dương tính		Âm tính			
		#	%	#	%	Số lượng	
T01	L1211RK11	23	95,8	1	4,2	24	
T02	L1211RK09	2	8,3	22	91,7	24	<0,0001
T03	L1211RK15	7	31,8	15	68,2	22	0,0006
T04	L0112RK03	12	52,2	11	47,8	23	0,0063
T05	L1211RK17	7	29,2	17	70,8	24	0,0004

Thải PCV2 qua phân

Các gạc phân sau liệu quyết định cho thấy 83,3% số lợn trong nhóm thuốc vờ (T01) là dương tính với sự thải PCV2 qua phân. Ngược lại, tất cả các nhóm vaxxin (T02-T05) đều có phần trăm số lợn thải ADN PCV2 phát hiện được bằng PCR giảm đáng kể ($P \leq 0,0061$). Các kết quả này được nêu trong Bảng 16 dưới đây. Tương tự, tất cả các nhóm vaxxin đều có số lượng bản sao ADN PCV2 thấp hơn đáng kể so với nhóm thuốc vờ sau liệu quyết định (số liệu không được thể hiện).

Bảng 16: Thải PCV2 qua phân sau liệu quyết định (ngày >21)

Điều trị	Vaxxin	có thải qua phân?				Quan sát tổng số	Trị số P
		Dương tính		Âm tính			
		#	%	#	%	Số lượng	
T01	L1211RK11	20	83,3	4	16,7	24	
T02	L1211RK09	6	25,0	18	75,0	24	0,0002
T03	L1211RK15	9	40,9	13	59,1	22	0,0049
T04	L0112RK03	10	43,5	13	56,5	23	0,0061
T05	L1211RK17	6	25,0	18	75,0	24	0,0002

Đáp ứng kháng thể kháng huyết thanh

Tất cả các lợn đều có huyết thanh âm tính với PCV2 trước khi tiêm chủng. Lợn trong nhóm thuốc vờ vẫn có huyết thanh âm tính trước khi dùng liệu quyết định. Ngược lại, lợn trong tất cả các nhóm vaxxin ngoại trừ nhóm T05 đều có hiệu giá kháng thể PCV2 tăng đáng kể ($P \leq 0,0287$) vào ngày 20 sau tiêm chủng so với thuốc vờ, chỉ ra đáp

ứng miễn dịch chủ động với PCV2 sau tiêm chủng. Hiệu giá kháng thể PCV2 ELISA antibody được tóm tắt trong Bảng 17 dưới đây. Hiệu giá trước liều quyết định chỉ ra khác biệt đáng kể ($P \leq ,0393$) trong các nhóm T02 và T03 so với nhóm T01 vào các ngày 7-20 và giữa các nhóm T01 và T04 vào ngày 20 ($P \leq ,0287$). Vào các ngày 28 đến 42, tất cả các nhóm vaccin đều có hiệu giá cao hơn đáng kể so với T01 ($P \leq ,0129$; Bảng 17 dưới đây).

Bảng 17: Hiệu giá PCV2 ELISA S/P, So sánh điều trị theo ngày nghiên cứu

Trái ngược	Ngày -1	Ngày 07	Ngày 14	Ngày 20	Ngày 28
T01 so với T02	ns	0,0229	0,0005	0,0001	<0,0001
T01 so với T03	ns	0,0302	0,0393	0,0060	<0,0001
T01 so với T04	ns		ns	0,0287	<0,0001
T01 so với T05	ns		ns	ns	<0,0001
Trái ngược	Ngày 35	Ngày 42			
T01 so với T02	<0,0001	0,0056			
T01 so với T03	<0,0001	0,0024			
T01 so với T04	<0,0001	0,0114			
T01 so với T05	<0,0001	0,0129			

*Khi trái ngược là đáng kể ($\leq 0,05$) thì trị số P được thông báo, các trị số $P > 0,05$ được ký hiệu là ns (không đáng kể)

Tổn thương bạch huyết và khu trú

Khi mổ khám xác, so với nhóm thuốc vờ, tất cả các nhóm được tiêm chủng đều có tổng lượng kháng nguyên PCV2 phát hiện được trong mô giảm đáng kể. Số liệu về sự nhiễm PCV2 trong mô bạch huyết (điểm số IHC) được tóm tắt trong Bảng 18 dưới đây. Như được thấy trong Bảng 18, tất cả các nhóm vaccin đều có điểm số IHC thấp hơn đáng kể so với nhóm thuốc vờ T01.

Bảng 18: Điểm số IHC của PCV2: Nếu các mô bạch huyết hoặc amidan bất thường

Điều trị	LSM	So với L 12111RK11 Trị số P
L1211RK11	0,75	
L1211RK09	0,15	0,0003
L1211RK15	0,30	0,0055
L0112RK03	0,34	0,0106
L1211RK17	0,41	0,0273

* Lợn được coi là bất thường nếu điểm số > 0 ở mẫu mô bạch huyết hoặc amidan bất kỳ.

Tất cả các nhóm được tiêm chủng đều có mức tiêu bạch huyết do PCV2 giảm đáng kể như được thể hiện trong Bảng 19 dưới đây.

Bảng 19: Mức tiêu bạch huyết do PCV2: Nếu các mô bạch huyết hoặc amidan bất thường

Điều trị	LSM	So với L12111RK11 Trị số P
L1211RK11	0,48	
L1211RK09	0,04	0,0053
L1211RK15	0,13	0,0181
L0112RK03	0,08	0,0069
L1211RK17	0,11	0,0116

* Lợn được coi là bất thường nếu điểm số > 0 ở mẫu mô bạch huyết hoặc amidan bất kỳ.

Ngoài ra, tất cả các nhóm được tiêm chủng đều có mức thay thế mô bào giảm đáng kể như được thể hiện trong Bảng 20 dưới đây.

Bảng 20: Mức thay thế mô bào do PCV2: Nếu các mô bạch huyết hoặc amidan bất thường

Điều trị	LSM**	So với L12111RK11 Trị số P
L1211RK11	ND	
L1211RK09	ND	0,0006
L1211RK15	ND	0,0098

Điều trị	LSM**	So với L1211RK11 Trị số P
L0112RK03	ND	0,0098
L1211RK17	ND	0,0173

* Lợn được coi là bất thường nếu điểm số > 0 ở mẫu mô bạch huyết hoặc amidan bất kỳ.

** Phép thử chính xác Fisher được sử dụng do phi hội tụ, do đó trung bình bình phương tối thiểu không được xác định (ND).

Số liệu trong ví dụ này chỉ ra rằng các nhóm vaccin:

Bảo vệ và trợ giúp đáng kể trong việc ngăn ngừa PCV2 trong máu sau liều quyết định;

Trợ giúp đáng kể trong việc ngăn ngừa sự thải PCV2 qua phân sau liều quyết định ở tất cả các lợn được tiêm chủng;

Tạo ra đáp ứng huyết thanh có ý nghĩa thống kê 28 ngày sau tiêm chủng trong các nhóm T02-T05. Ngoài ra, T02 và T03 chứng minh đáp ứng có ý nghĩa thống kê sớm ở 7 ngày sau tiêm chủng so với T01;

Làm giảm đáng kể tổn thương hiển vi (tiêu bạch huyết và thay thế mô bào) ở tất cả các lợn được tiêm chủng; và

Tất cả các vaccin đều chứng tỏ là hữu hiệu và loạt vaccin L1211RK15 được chọn làm đối tượng so sánh.

Ví dụ 13: Hiệu lực của phân đoạn M. hyo sau khi dùng qua đường trong bắp vaccin kết hợp PCV2/M.hyo trong một lọ trong SP-dầu 10%

Mục đích của nghiên cứu trong ví dụ này là đánh giá hiệu lực của phân đoạn *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) của virus chết Circovirus lợn (PCV) dạng khảm Typ 1 – Typ 2 -dịch chiết vi khuẩn *Mycoplasma Hyopneumoniae* (*M. Hyo*), dùng qua đường trong bắp cho lợn 21 ± 3 ngày tuổi và dùng liều quyết định bằng dịch đồng nhất phổi độc của *M. hyopneumoniae* ở 7 tuần sau tiêm chủng.

Bốn vaccin nhĩ giá PCV1-2/M.hyo thực nghiệm ở các mức liều kháng nguyên khác nhau, nhưng cân bằng, và một vaccin PCV2 đơn giá thực nghiệm (đối chứng âm tính) được bào chế với kháng nguyên liều cao nhất. Lô đối chứng kháng nguyên M.hyo được bào chế như được mô tả trong Ví dụ 11 trên đây. Kháng nguyên PCV2 là kháng

nguyên cPCV1-2 chết được bào chế như được mô tả trong Ví dụ 2 trên đây. Trước khi làm bất hoạt virus dạng khản này, lô kháng nguyên PCV2 được cô 20X và rửa thể cô bằng dung dịch muối cân bằng. Các chế phẩm vaccin thực nghiệm cuối được thêm SP-dầu 10%. Các chế phẩm thực nghiệm này được mô tả trong Bảng 21 dưới đây, trong đó có đề xuất liều kháng nguyên (% các lô PCV2 và kháng nguyên M. hyo).

T01: Chế phẩm thực nghiệm (L1211RK10) chứa virus chết dạng khản PCV typ1-typ2 liều cao (1,375%-Cao) mà không có phân đoạn M.hyo (0%). Mẫu này tương ứng với đối chứng âm tính (PCV2 đơn giá).

T02: Chế phẩm thực nghiệm (L1211RK09) chứa virus chết dạng khản PCV typ1-typ2 liều cao (1.375%-Cao) và kháng nguyên M. hyo (14.1%-Cao).

T03: Chế phẩm thực nghiệm (L1211RK15) chứa virus chết dạng khản PCV typ1-typ2 liều cao (0,688%-Trung bình) và kháng nguyên M. hyo (9,4%-Trung bình).

Bảng 21: Thiết kế thực nghiệm

Nhóm	N	CP hoặc IVP ¹	Tiêm chủng				
			Loạt/lô	Liều kháng nguyên RP (PCV2/M. hyo)	Tá được	Liều	Đường dùng
NTX	9	Dự phòng	NA	Không tiêm chủng			
T01	38	Thuốc vờ – PCV2	L1211RK10	Cao/Không	SP-dầu 10%	2mL	IM, bên trái cổ
T02	38	PCV2-M. Hyo	L1211RK09	Cao/Cao			
T03	38	PCV2-M. Hyo	L1211RK15	Trung bình/Trung bình			

¹ IVP = Sản phẩm thú ý nghiên cứu = Vaccin virus chết, Circovirus lợn dạng khản Typ 1 – Typ 2 - Dịch chiết vi khuẩn *Mycoplasma Hyopneumoniae* (M. hyo)

CP = Sản phẩm đối chứng = Phân đoạn chết dạng khản PCV1-2 với SP-dầu 10% (mà không có phân đoạn *M. hyopneumoniae*)

IM = Trong bắp

Vào ngày 0, 123, lợn khỏe mạnh về mặt lâm sàng, dễ mắc bệnh được đưa vào nghiên cứu này ở ba tuần tuổi. Lợn được quay ổ rom và phân ngẫu nhiên vào nhóm dự phòng (NTX) hoặc một trong ba nhóm điều trị (T01-T03); dùng qua đường trong bắp 2mL vaccin PCV1-2/*M. hyopneumoniae* thực nghiệm ở liều gây miễn dịch tối thiểu (MID), vaccin PCV1-2/*M. hyopneumoniae* thực nghiệm ở liều cao hơn không đáng kể so với MID hoặc thuốc vờ chỉ chứa PCV1-2 ở MID. Bảy tuần sau tiêm chủng, gây mê

và mổ khám xác lợn dự phòng để xác nhận không có *M. hyopneumoniae* và cho tất cả các lợn được điều trị dùng liều quyết định hai lần (vào hai ngày liên tiếp) bằng dịch đồng nhất phổi *M. hyopneumoniae* độc sống. Gây mê và mổ khám xác tất cả các con còn lại ở bốn tuần sau liều quyết định. Khi mổ khám xác, tính điểm số phổi về các tổn thương điển hình của *M. hyopneumoniae*. Sau liều quyết định, tổn thương phổi là biến đầu ra sơ cấp. Việc tiêm chủng được coi là hữu hiệu nếu khoảng tin cậy 95% của tỷ lệ giảm nhẹ >0.

Thử nghiệm về hoạt lực của vacxin

Loạt vacxin L1211RK15 PCV/M.hyo được mô tả trên đây được coi là đối tượng so sánh. Kết quả là, hoạt lực tương đối đối với cả phân đoạn M.hyo lẫn phân đoạn PCV2 dùng trong nghiên cứu về hiệu lực của M. hyo này được xác định theo đối tượng so sánh. Các kết quả này được nêu trong Bảng 22 dưới đây. Loạt L1211RK10 tương ứng với thuốc vờ (không có phân đoạn M.hyo).

Bảng 22: Kết quả về hoạt lực

Loạt	L1211RK15 so sánh	
	Hoạt lực của M. hyo ¹	Hoạt lực của PCV ²
L1211RK10	0,00	2,33
L1211RK09	1,48	2,20
L1211RK15	1,00	1,07

Kết quả đối với mỗi loạt là trung bình của tất cả các lần thử nghiệm lặp lại.

¹ Hoạt lực của *M. hyopneumoniae* được thử nghiệm trong năm lần lặp.

² Hoạt lực của PCV được thử nghiệm trong một lần lặp (L1211RK10), hoặc năm lần lặp (L1211RK09, L1211RK15).

Huyết thanh học

Hiệu giá kháng thể M.hyo chỉ ra rằng tất cả các con đều có huyết thanh âm tính với *M. hyopneumoniae* vào ngày 0 và vẫn âm tính trước khi dùng liều quyết định. Tại tất cả các thời điểm sau tiêm chủng (các ngày 21, 47 và 75), T02 và T03 có hiệu giá kháng thể M.hyo trung bình bình phương tối thiểu số học cao hơn đáng kể ($P \leq 0,0004$) so với T01 (số liệu huyết thanh học không được thể hiện).

Tỷ lệ phần trăm toàn bộ phổi có tổn thương

Tần số phân bố điểm số tổn thương phổi đối với mỗi thùy phổi được tính bằng điều trị. Tỷ lệ phần trăm toàn bộ phổi có tổn thương được tính bằng công thức sau: Tỷ lệ phần trăm toàn bộ phổi có tổn thương = $\{(0,10 \times \text{trái sọ}) + (0,10 \times \text{trái giữa}) + (0,25 \times \text{trái đuôi}) + (0,10 \times \text{phải sọ}) + (0,10 \times \text{phải giữa}) + (0,25 \times \text{phải đuôi}) + (0,10 \times \text{phần}$

phụ)). Phép biến đổi căn bậc hai arcsin được áp dụng cho tỷ lệ phần trăm toàn bộ phổi có tổn thương trước khi phân tích. Tỷ lệ phần trăm toàn bộ phổi có tổn thương được phân tích bằng mô hình tuyến tính hỗn hợp. So sánh theo cặp được thực hiện giữa các nhóm điều trị nếu hiệu lực điều trị là đáng kể. Trung bình bình phương tối thiểu biến đổi ngược của tỷ lệ phần trăm toàn bộ phổi có tổn thương và các khoảng tin cậy 95% của chúng được tính cũng như các cực tiểu và cực đại. Các tổn thương phổi được tóm tắt với tỷ lệ giảm nhẹ phân tầng và giới hạn tin cậy 95%. Kết quả về tổn thương phổi được nêu trong Bảng 23 dưới đây.

Bảng 23: Phân tích phần trăm toàn bộ phổi có tổn thương

Tóm tắt trung bình bình phương tối thiểu						
Nhóm	Loại	N	% phổi có tổn thương ¹	Giới hạn	Tỷ lệ giảm nhẹ	
NTX		9	0,1	0,0 đến 0,8		
Nhóm	Loại	N	% phổi có tổn thương ¹	Giới hạn	Trái ngược với T01	95% CI ⁴
T01	L1211RK10	36	6,1 ^b	0,0 đến 32,3		
T02	L1211RK09	36	2,7 ^a	0,0 đến 23,5	40,9	13,3 đến 61,8
T03	L1211RK15	38	2,6 ^a	0,0 đến 49,0	46,9	18,2 đến 68,3

¹. Trung bình bình phương tối thiểu biến đổi ngược

Các nhóm điều trị có cùng chữ cái là không khác biệt đáng kể ở trị số P 0,05.

Các tổn thương phổi có tỷ lệ phần trăm hơi thấp được quan sát thấy ở phổi lợn NTX do sự xuất hiện của *Bordetella* đã biết trong đàn lợn này. Giống vi khuẩn trên gác mô phổi xác nhận một số lợn dương tính với giống *B. bronchiseptica* và giống *M. hyopneumoniae* xác nhận tất cả các lợn NTX đều âm tính với giống *M. hyopneumoniae* trước khi dùng liệu quyết định.

Quy trình này đáp ứng các tiêu chuẩn đánh giá trong đó các tổn thương phổi trung bình bình phương tối thiểu đối với T01 là >4%. Các tổn thương phổi trung bình bình phương tối thiểu đối với T02 và T03 là thấp hơn đáng kể ($P \leq 0,05$) so với T01 và đều đáp ứng các tiêu chuẩn tỷ lệ giảm nhẹ mà khoảng tin cậy 95% >0. Các yêu cầu đánh giá của nghiên cứu này được đáp ứng ở chỗ không có bằng chứng phơi nhiễm *M. hyopneumoniae* trước liệu quyết định. Liệu quyết định là có giá trị ở chỗ điểm số tổn thương phổi trung bình biến đổi ngược ở lợn thuộc nhóm thuốc vò (T01) là >4%.

So với nhóm đối chứng âm tính (T01), các nhóm điều trị T02 và T03 có phần phổi tổn thương giảm đáng kể ($P \leq 0,05$) so với T01. Tỷ lệ giảm nhẹ đối với T02 và T03 so với T01 đáp ứng các tiêu chuẩn quy trình về *hiệu lực*.

Trong các điều kiện của nghiên cứu này, cả hai vaccin (T02 & T03) đều giúp làm giảm nhẹ các tổn thương phổi, biến hiệu lực sơ cấp. Kết quả trong ví dụ này chứng minh hiệu lực đáng kể của M. hyo trong chế phẩm thực nghiệm PCV2/M.hyo trong một lọ.

Ví dụ 14: Đánh giá hoạt tính diệt virus PRRS

Các nghiên cứu trong ví dụ này được thiết kế để đánh giá các nền tá chất khác nhau về hoạt tính diệt virus PRRS. Các tá chất ban đầu tập trung vào tá chất duy nhất (tức là chế phẩm không chứa kháng nguyên PCV hoặc kháng nguyên M. hyo). Việc đánh giá tá chất về hoạt tính diệt virus PRRS được thể hiện trên Fig.10. Việc đánh giá sơ bộ về hoạt tính diệt virus chỉ ra rằng SP-dầu 10%, Carbopol 0,2% và Amphigen 5% không có hoạt tính diệt virus PRRS. Ngược lại, tá chất SLCD 20% rõ ràng là có hoạt tính diệt virus PRRS.

Các nghiên cứu khác được thực hiện để đánh giá các chế phẩm PCV/M. hyo chứa các nền tá chất khác nhau có hoạt tính diệt virus PRRS hay không. Kết quả được thể hiện trong Bảng 24, trong đó ký hiệu * chỉ loại vaccin diệt được PRRSV.

Bảng 24: Kết quả của thử nghiệm diệt virus PRRS với các chế phẩm khác nhau

Loại vaccin dùng trong các nghiên cứu của Ví dụ 7, 8, 10		Hoạt lực			Diệt virus PRRS	
Nghiên cứu	Mô tả	Loại	p46 RP (ru/ds)	PCV2 NVSIL RP	A	B
Ví dụ 7, 8, 10	Nước muối vô trùng (natri clorua 0,9%)	87-244-DK (Thuốc vò)				
Ví dụ 7, 8	cPCV (RP 1,6) + M. Hyo xử lý bằng Protein A (RP 7,5) trong SP-dầu 10%	L0411RK08	7,1	1,29	-0,10	-0,13
Ví dụ 7, 8	cPCV (RP 1,6) + M. Hyo xử lý bằng Protein A (RP 7,5) trong Amphigen 5%	L0411RK09	7,3	1,33	-0,10	+0,14
Ví dụ 7, 8	cPCV (RP 1,6) + M. Hyo xử lý bằng Protein A (RP 7,5) trong Amph 5% + SLCD 5%	L0611RK03	6,9	1,15	-0,36	-0,33
Ví dụ 7	cPCV (RP 1,6) đơn thể trong SLCD 20%	L0611RK04		1,50	-1,86*	-0,50
Ví dụ 8	Loại RespiSure One hết hạn	A827870	12,6			
Ví dụ 10	cPCV (RP 7,8) + M. Hyo Toàn đơn thể (RP 13,3) trong SP-dầu 10%	L0411RK15	14	1,03	-0,32	-0,03

Ví dụ 10	cPCV (RP 7,8) + M. Hyo Toàn đơn thể (RP 13,3) trong Amphigen 5%	L0411RK16	15,5	1,12	-0,36	-0,53
Ví dụ 10	cPCV (RP 7,8) + M. Hyo Toàn đơn thể (RP 13,3) trong Amph 5% + SLCD 5%	L0611RK05	17,5	1,50	-0,54	-0,33
Ví dụ 10	cPCV (RP 7,8) + M. Hyo Toàn đơn thể (RP 13,3) trong SLCD 20% + SP-dầu 10%	L0611RK06	15,9	1,13	-1,93*	-0,99*

*Chỉ Diệt virus (>0,7 log mức hao hụt)

A –GMT đối chứng thử nghiệm diệt virus ~5,53 log/mL

B – GMT đối chứng thử nghiệm diệt virus ~6,42 log/mL

Kết quả nêu trong Bảng 24 trên đây chỉ ra rằng SP-dầu 10% là không có hoạt tính diệt virus PRRS.

Các loại vaccin PCV/M. hyo khác được bào chế bằng cách sử dụng SP-dầu 10% làm tá chất (Bảng 25). Hoạt lực kháng nguyên của các loại vaccin này được so sánh với loại vaccin PCV/M. hyo so sánh (L1211RK15) được mô tả trên đây. Kết quả nêu trong Bảng 25 dưới đây còn chỉ ra rằng SP-dầu 10% là không có hoạt tính diệt virus PRRS. Các trị số của mẫu thử nghiệm trong Bảng 25 đều cao hơn (dấu +) so với đối chứng thử nghiệm diệt virus, chúng có hiệu giá trung bình số học (geometric mean titer: GMT) khoảng $5,9 \pm 0,5$ log/ml.

Bảng 25: Kết quả của thử nghiệm diệt virus với các chế phẩm PCV/M. hyo khác nhau chứa SP-dầu 10%

Loại vaccin được sử dụng		Hoạt lực		Diệt virus PRRS
Mô tả	Loại	p46 (ru/ds) so sánh L1211RK15	PCV2 NVSL so sánh L1211RK15	log ₁₀ TCID ₅₀ /mL
Chất pha loãng vô trùng (nước vô trùng)	1949122	na	na	
cPCV + M. Hyo xử lý bằng Protein A trong SP-dầu 10%	L0912RK12	1,62	2,60	+0,58
cPCV + M. Hyo xử lý bằng Protein A trong SP-dầu 10%	L0912RK10	0,88	1,23	+0,58
cPCV + M. Hyo xử lý bằng Protein A trong SP-dầu 10%	L0912RK11	1,24	2,62	+0,58
cPCV + M. Hyo xử lý bằng Protein A trong SP-dầu 10%	L0912RK08	1,08	1,03	+0,91
cPCV + M. Hyo xử lý bằng Protein A trong SP-dầu 10%	L0912RK09	1,65	2,06	+0,50

GMT đối chứng thử nghiệm diệt virus ~ $5,9 \pm 0,5$ log/ml

Kết quả trong ví dụ này chứng minh rằng SP-dầu 10% là không có hoạt tính diệt virus PRRS. Kết quả trong ví dụ này còn chứng minh rằng chế phẩm PCV/M. hyo chứa SP-dầu 10% là thuộc loại vaccin được coi là không có hoạt tính diệt virus PRRS (Bảng 13 và Bảng 14). Kết luận, chế phẩm PCV/M. hyo chứa SP-dầu 10% được coi là nền hữu hiệu cho hỗn hợp ba giá gồm PCV, M. hyo và virus PRRS.

Ví dụ 15: Bào chế vaccin kết hợp PCV/M. hyo/PRRS

Chế phẩm PCV/M. hyo chứa nền tá chất mà không có hoạt tính diệt virus PRRS (xem các Bảng 24 và 25 trên đây) được đề xuất dưới dạng dùng ngay trong chế phẩm lỏng một lọ. Chế phẩm PCV/M. hyo trong một lọ này sử dụng dịch nổi M. hyo được xử lý bằng Protein A. Cả hiệu lực của M. hyo lẫn PCV2 đều đã được chứng minh trong các chế phẩm PCV2/M. hyo có sử dụng ch nổi M. hyo được xử lý bằng Protein A (xem Ví dụ 7-9). Trong ví dụ này, chế phẩm PCV2/M. hyo nhị giá được kết hợp với kháng nguyên virus PRRS đơn thể.

Theo một phương án, chế phẩm kết hợp PCV/M. hyo trong SP-dầu 10% và tương ứng với một trong số các loại vaccin L0711RK11, L0711RK12, L0711RK13 và L0711RK14 trong Bảng 11 trên đây hoặc L1211RK09, L1211RK15, L0112RK03 và L1211RK17 trong Bảng 13 trên đây được đề xuất dưới dạng dùng ngay trong chế phẩm lỏng một lọ. Kết quả nêu trong Ví dụ 14 trên đây chứng minh rằng SP-dầu 10% là không có hoạt tính diệt virus PRRS. Ví dụ 14 còn chứng minh rằng các chế phẩm PCV2/M. hyo chứa SP-dầu 10% là thuộc loại vaccin được coi là không có hoạt tính diệt virus PRRS. Trong ví dụ này, chế phẩm lỏng PCV2/M. hyo trong một lọ này được dùng để tái hydrat hóa chế phẩm virus PRRS sống được cải biến di truyền đông khô chứa trong lọ thứ hai, sao cho tất cả các kháng nguyên đều chứa trong một lọ duy nhất trước khi được dùng cho lợn có độ tuổi thích hợp (ví dụ, ở 3 tuần tuổi hoặc lớn hơn).

Theo một phương án, virus PRRS virus có trình tự hệ gen tương ứng với SEQ ID NO: 16 hoặc biến thể của nó. Theo phương án khác, virus PRRS dùng trong chế phẩm ba giá là thể phân lập virus PRRS có ký hiệu ISU-55, được lưu giữ ở ATCC với số hiệu lưu giữ VR 2430. Lượng thích hợp của các kháng nguyên tương ứng sẽ được mô tả trong bản mô tả này. Mong muốn là, tất cả các kháng nguyên đều được dùng trong một lọ duy nhất cho lợn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm gây miễn dịch đa giá chứa phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), và kháng nguyên của circovirut typ 2 ở lợn (PCV2), trong đó phần hòa tan của chế phẩm M. hyo chứa các kháng nguyên protein tan đặc hiệu với M.hyo và được tách ra khỏi nguyên liệu tế bào không tan và gần như không chứa cả (i) IgG lẫn (ii) phức hợp miễn dịch được cấu thành từ kháng nguyên liên kết với globulin miễn dịch.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó phần hòa tan của chế phẩm M. hyo đã được xử lý bằng protein-A hoặc protein-G trước khi được thêm vào chế phẩm gây miễn dịch này.
3. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chế phẩm này ở dạng chế phẩm lỏng có sẵn để dùng.
4. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng nguyên PCV2 ở dạng circovirut khảm typ 1 - typ 2, virut khảm này bao gồm PCV1 tái tổ hợp đã bất hoạt biểu hiện protein ORF2 của PCV2.
5. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng nguyên PCV2 ở dạng protein ORF2 tái tổ hợp.
6. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó protein ORF2 tái tổ hợp này được biểu hiện từ vectơ baculovirut.
7. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa ít nhất một kháng nguyên bổ sung mà có tác dụng bảo vệ chống lại vi sinh vật được chọn từ nhóm bao gồm parvovirut ở lợn (PPV), *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus hyicus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma hyosynoviae*, vi khuẩn *leptospira*, *Lawsonia intracellularis*, virut cúm ở lợn (Swine influenza virus - SIV), kháng nguyên *Escherichia coli*, *Brachyspira hyodysenteriae*, coronavirut hô hấp ở lợn, virut gây dịch tiêu chảy ở lợn (Porcine Epidemic Diarrhea - PED), rotavirut, virut Torque teno (Torque teno virus - TTV), virut cự bào ở lợn, virut đường ruột ở lợn, virut gây bệnh viêm não-cơ tim, tác nhân gây bệnh Aujeszky, dịch tả lợn (Classical Swine Fever- CSF) và tác nhân gây bệnh viêm dạ dày-ruột truyền nhiễm ở lợn, hoặc tổ hợp của chúng.

8. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1, 2 hoặc 7, trong đó chế phẩm này còn chứa tá dược.
9. Chế phẩm theo điểm 8, trong đó tá chất được chọn từ nhóm bao gồm tá chất dầu trong nước, tá chất polyme và nước, tá chất nước trong dầu, tá chất nhôm hydroxit, tá chất vitamin E và tổ hợp của chúng.
10. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1, 2 hoặc 7, trong đó chế phẩm này còn chứa chất mang dược dụng.
11. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó chế phẩm này ở dạng liều duy nhất.
12. Chế phẩm theo điểm 7, trong đó chế phẩm này ở dạng liều duy nhất.
13. Kit bao gồm: lọ chứa chế phẩm gây miễn dịch chứa cả kháng nguyên PCV2 và phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), trong đó phần hòa tan của chế phẩm M. hyo chứa các kháng nguyên protein tan đặc hiệu với M.hyo và được tách ra từ nguyên liệu tế bào không tan và gần như không chứa cả (i) IgG lẫn (ii) phức hợp miễn dịch được cấu thành từ kháng nguyên liên kết với globulin miễn dịch.
14. Kit theo điểm 13, trong đó kit này còn bao gồm cảm nang hướng dẫn chứa thông tin về cách dùng chế phẩm gây miễn dịch này.
15. Kit theo điểm 13 hoặc 14, trong đó chế phẩm gây miễn dịch trong lọ được cung cấp ở dạng chế phẩm lỏng có sẵn để dùng.
16. Phương pháp bào chế chế phẩm gây miễn dịch đa giá chứa phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), phương pháp này bao gồm các bước sau:
 - i) nuôi cấy M. hyo trong môi trường thích hợp trong khoảng thời gian từ 18 đến 144 giờ;
 - ii) tiếp theo làm bất hoạt giống M. hyo;
 - iii) thu hoạch dịch nuôi cấy đã được làm bất hoạt, trong đó dịch nuôi cấy đã được làm bất hoạt chứa chế phẩm toàn tế bào M. hyo chứa cả phân đoạn lỏng hòa tan lẫn nguyên liệu tế bào không hòa tan;
 - iv) tách phân đoạn lỏng hòa tan ra khỏi nguyên liệu tế bào không hòa tan; và
 - v) loại bỏ hầu hết IgG và phức hợp kháng nguyên/globulin miễn dịch ra khỏi phân đoạn lỏng hòa tan để tạo ra phần hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo; và

- (vi) tiếp theo kết hợp phân hòa tan của chế phẩm toàn tế bào M. hyo với kháng nguyên PCV2.

Fig.1

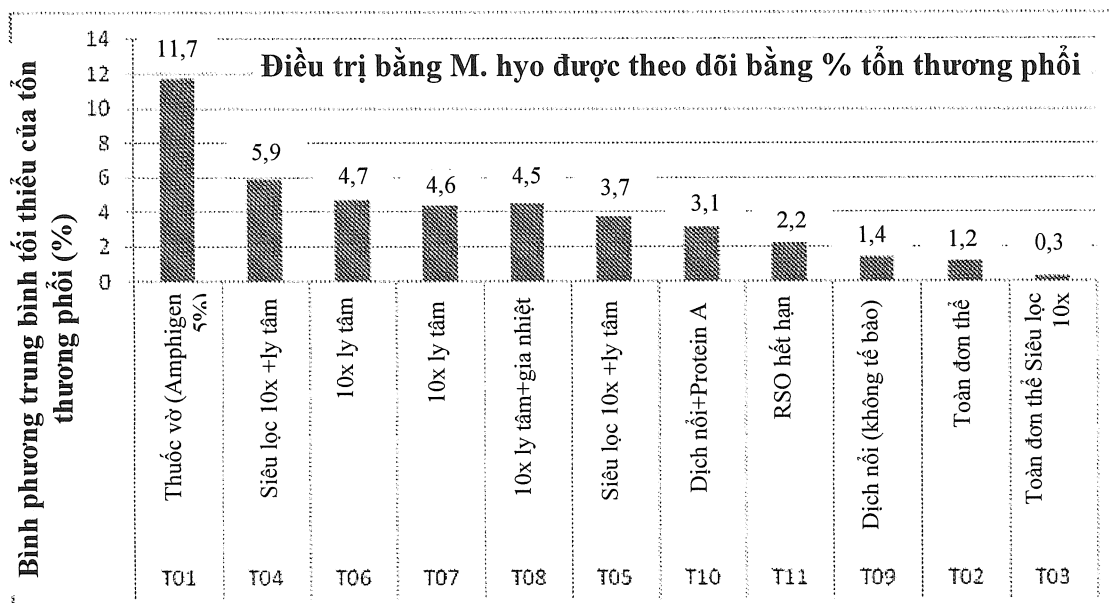


Fig.2

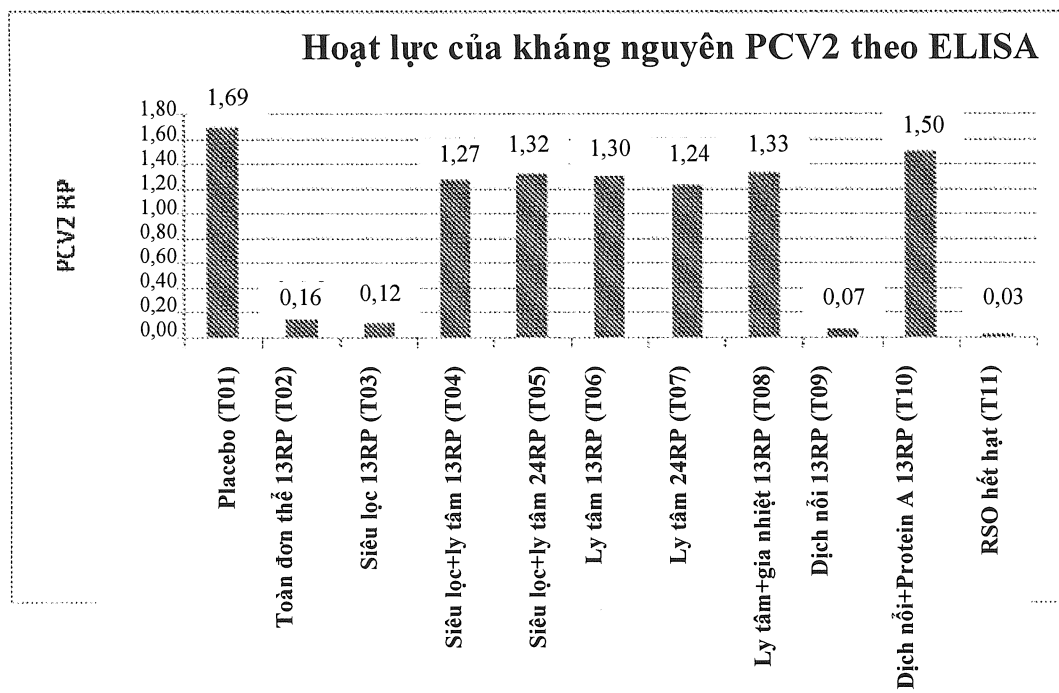


Fig.3

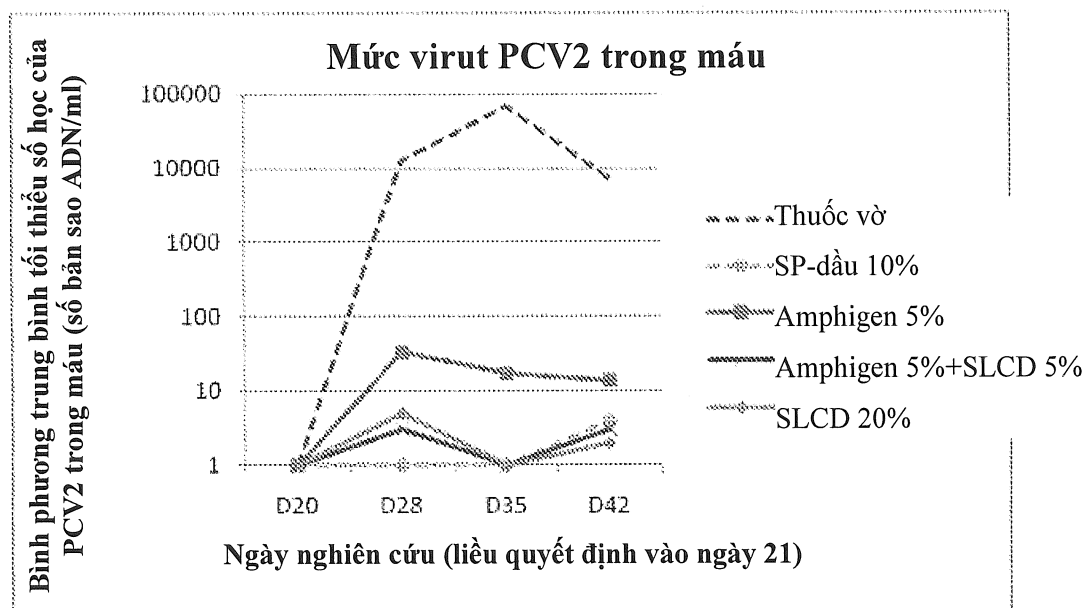


Fig.4

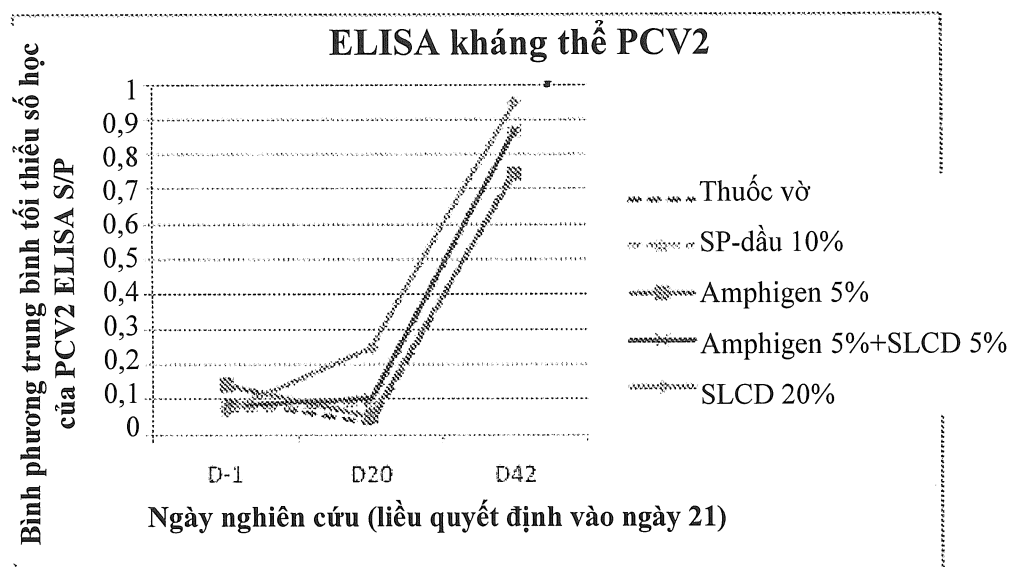


Fig.5

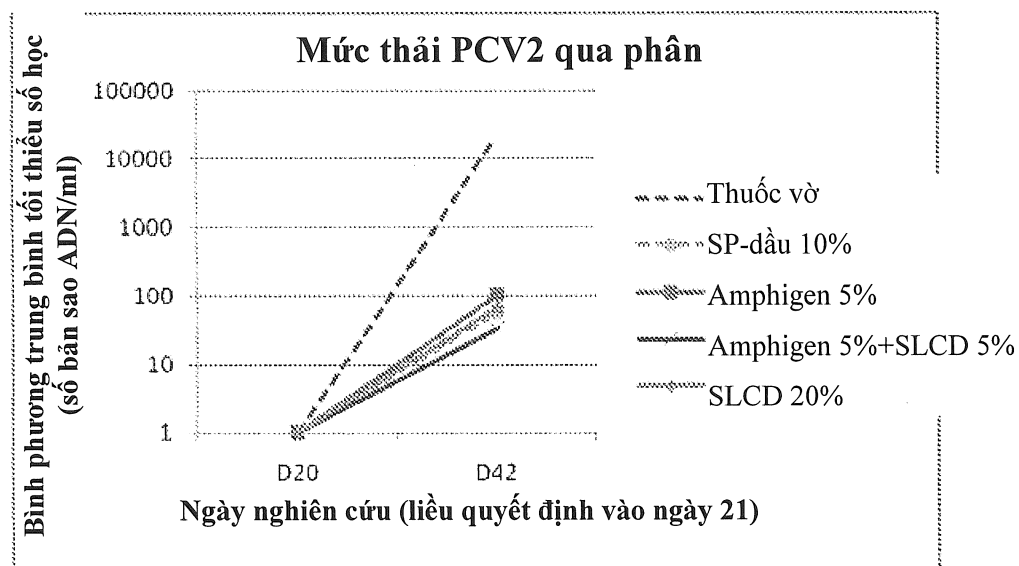


Fig.6

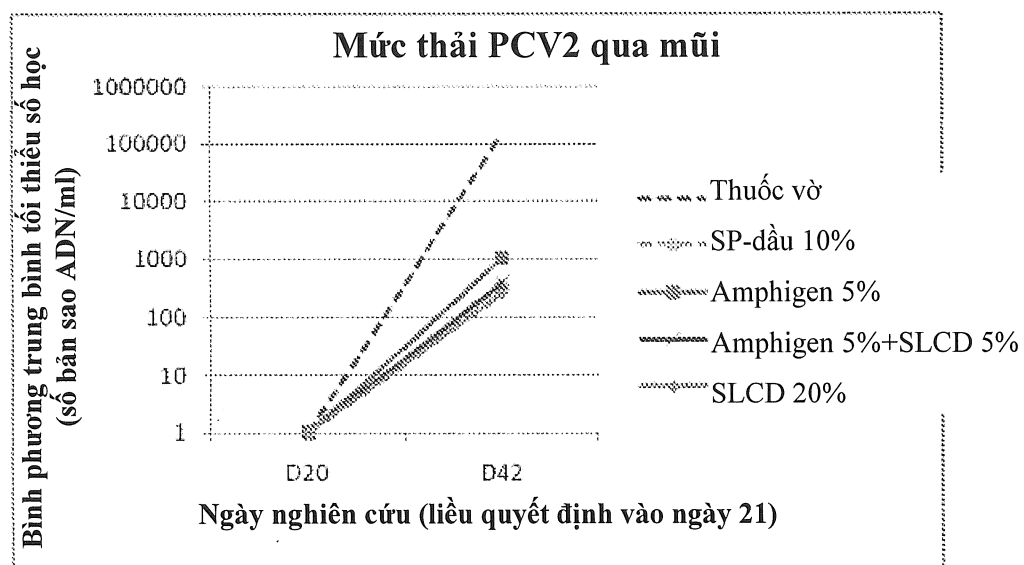


Fig.7A

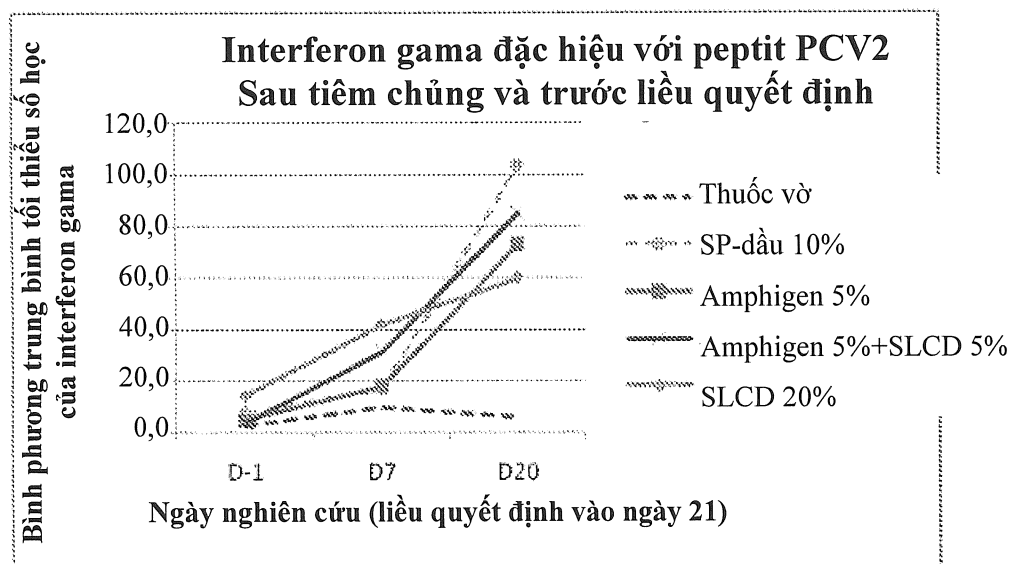


Fig.7B

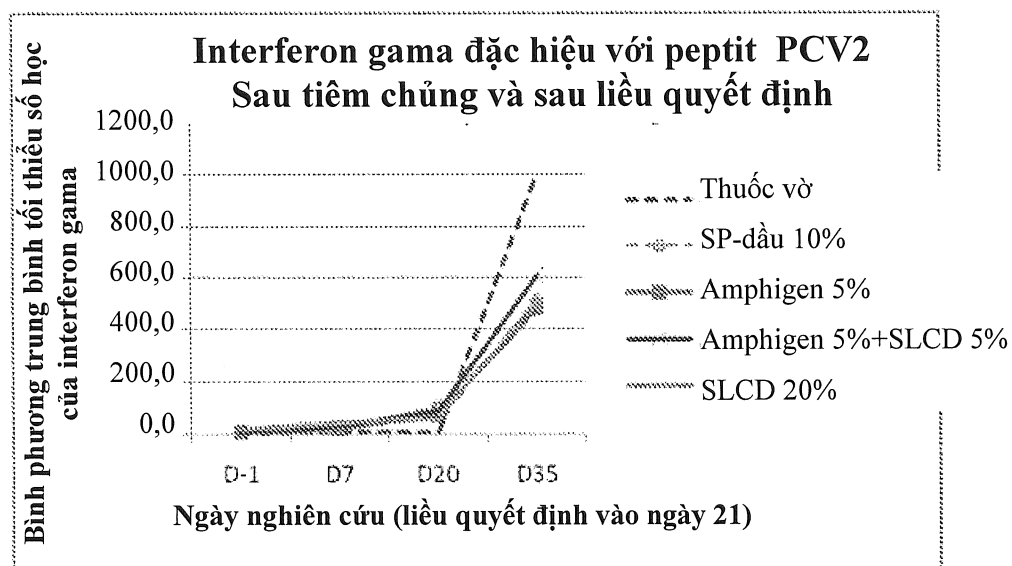


Fig.8A

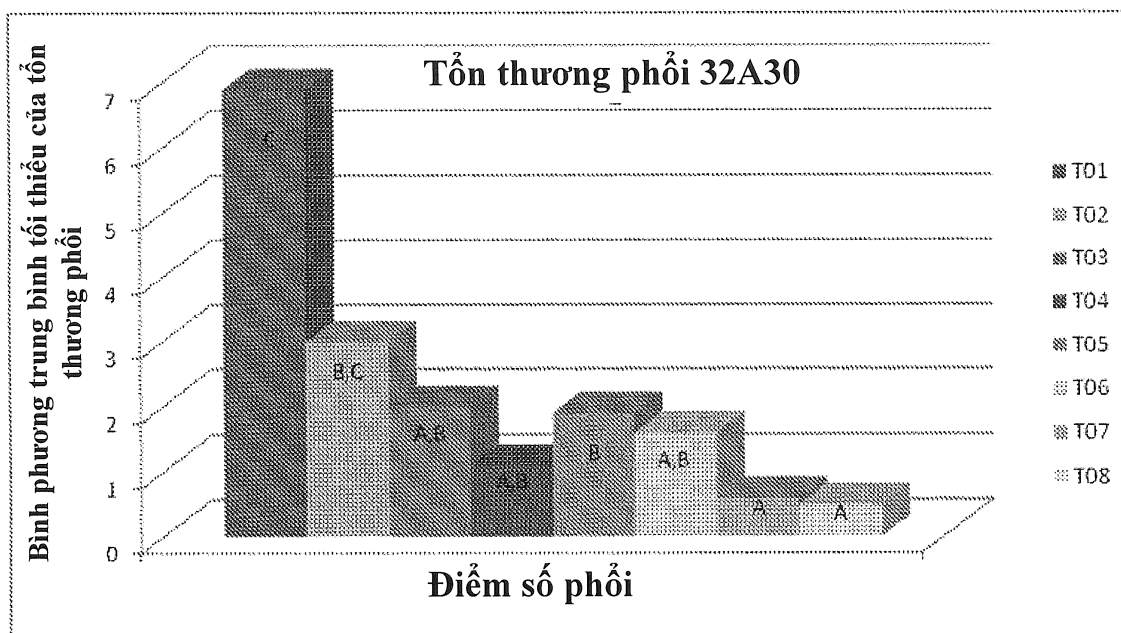


Fig.8B

Trái ngược	Tỷ lệ giảm nhẹ	Khoảng tin cậy 95%
T01 so với T02	41,2	-5,9 đến 76,5
T01 so với T03	64,7	29,4 đến 100
T01 so với T04	76,5	41,2 đến 100
T01 so với T05	73,3	33,3 đến 100
T01 so với T06	62,5	25 đến 100
T01 so với T07	87,5	62,5 đến 100
T01 so với T08	88,2	64,7 đến 100

Fig.9

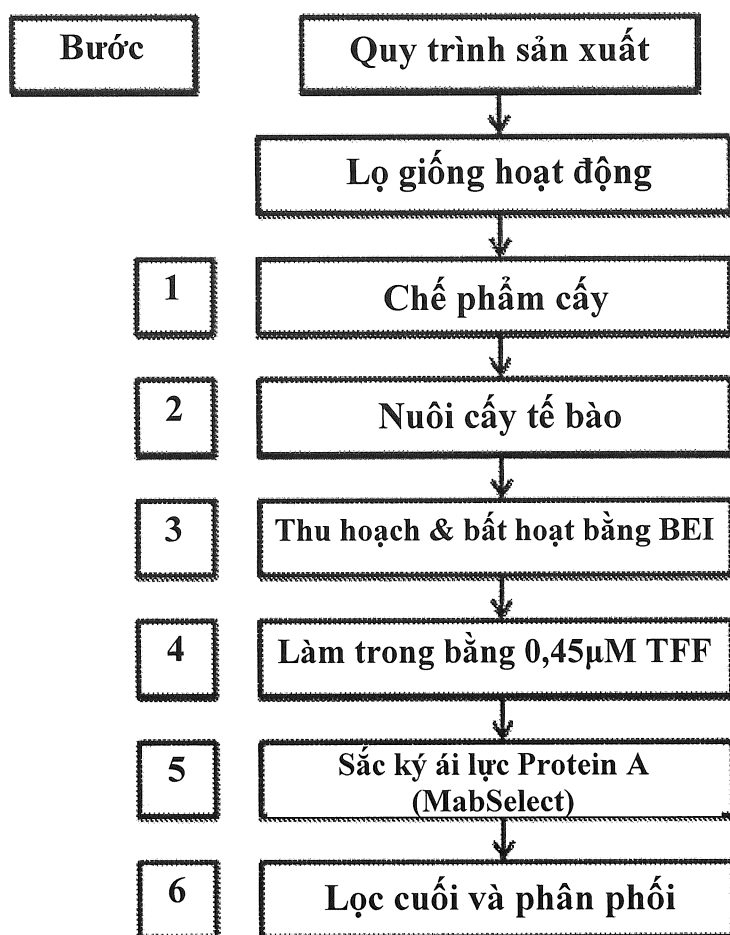


Fig.10

Hoạt tính diệt virus sơ bộ	Khác biệt so với nước			
	Tái hydrat hóa 100%	90/10	90/10	Hoạt tính diệt virus trung bình
	Hiệu giá đông khô	Lỏng (DMEM) 90/10	Lỏng (Ultra) 90/10	
SLCD 20%	0,8	0,7	2,0	1,3
Carbopol 0,2%	0,3	-0,3	0,2	-0,1
SP-dầu 10%	0,2	0,0	0,0	0,0
SP-dầu 10%/Carbopol 0,2%	0,3	-0,2	0,0	-0,1
SLCD 20%/SP-dầu 10%	1,0	0,3	0,7	0,5
SLCD 20%/SP-dầu 10%/Carbopol 0,2%	0,2	0,0	0,5	0,3
Amphigen 5% (từ dung dịch gốc 40%)	1,0	0,7	1,5	1,1
Amphigen 2,5% (từ dung dịch gốc 40%)	NA	-0,2	NA	-0,2
Amphigen 5% (từ dung dịch gốc 20%)	NA	0,8	NA	0,8
Amphigen 2,5% (từ dung dịch gốc 20%)	NA	0,2	NA	0,2
Amphigen 5% (từ dung dịch gốc 40%)	NA	1,3	NA	1,3
Amphigen 2,5% (từ dung dịch gốc 40%)	NA	0,8	NA	0,8
Chỉ ra hoạt tính diệt virus tiềm tàng				

DANH MỤC TRÌNH TỰ

- <110> Pfizer Inc.
Galvin, Jeffrey
Nitzel, Gregory
Garrett, Keith
Kulawik II, James
Ricker, Tracy
Smutzer, Megan
- <120> CHẾ PHẨM GÂY MIỄN DỊCH ĐA GIÁ, PHƯƠNG PHÁP BÀO CHẾ VÀ KIT BAO GỒM CHẾ PHẨM GÂY MIỄN DỊCH NÀY
- <130> PC71912A
- <150> US 61/620,175
<151> 2012-04-04
- <160> 18
- <170> PatentIn version 3.4
- <210> 1
<211> 1260
<212> ADN
<213> Mycoplasma hyopneumoniae
- <400> 1
atgaaaaaaa tgcttagaaa aaaattcttg tattcatcag ctatttatgc aacttcgctt 60
gcatcaatta ttgcatttgt tgcagcaggt tgtggacaga cagaatcagg ttcgacttct 120
gattctaaac cacaagccga gacgctaaaa cataaagtaa gtaatgattc tattcgaata 180
gcactaaccg atccggataa tcctcgatga attagtgtc aaaaagatat tatttcttat 240
gttgatgaaa cagaggcagc aacttcaaca attacaaaa accaggatgc acagaataac 300
tgactcactc agcaagctaa ttaagccca gcaccaaag gatttattat tgcccctgaa 360
aatggaagtg gagttggaac tgctgttaat acaattgtctg ataaaggaat tccgattgtt 420
gcctatgatc gactaattac tggatctgat aaatatgatt ggtatgtttc ttttgataat 480
gaaaaagttg gcgaattaca aggtctttca cttgcagcgg gtctattagg aaaagaagat 540
ggtgcttttg attcaattga tcaaatgaat gaatatctaa aatcacatat gcccgaagag 600
acaatttctt ttataacaat cgcggttcc caagatgata ataactcca atatttttat 660
aatggtgcaa tgaaagtact taaagaatta atgaaaaatt cgggaaataa gataattgat 720
ttatctcctg aaggcgaaaa tgctgtttat gtcccaggat gaaattatgg aactgccggt 780

```

caaagaatcc aatcttttct aacaattaac aaagatccag caggtggtaa taaaatcaaa 840
gctgttggtt caaaaccagc ttctattttc aaaggatttc ttgccccaaa tgatggaatg 900
gccgarcaag caatcaccaa attaaaactt gaaggatttg atacccaaaa aatctttgta 960
actggtcaag attataatga taaagccaaa acttttatca aagacggcga tcaaaatatg 1020
acaatttata aacctgataa agtttttagga aaagttgctg ttgaagttct tcgggtttta 1080
attgcaaaga aaaataaagc atccagatca gaagtcgaaa acgaactaaa agcaaaacta 1140
ccaaatattt catttaaata tgataatcaa acatataaag tgcaaggtaa aaatattaat 1200
acaattttag taagtccagt aattgttaca aaagctaag ttgataatcc tgatgcctaa 1260

```

<210> 2

<211> 419

<212> PRT

<213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 2

```

Met Lys Lys Met Leu Arg Lys Lys Phe Leu Tyr Ser Ser Ala Ile Tyr
1           5           10          15

```

```

Ala Thr Ser Leu Ala Ser Ile Ile Ala Phe Val Ala Ala Gly Cys Gly
          20          25          30

```

```

Gln Thr Glu Ser Gly Ser Thr Ser Asp Ser Lys Pro Gln Ala Glu Thr
      35          40          45

```

```

Leu Lys His Lys Val Ser Asn Asp Ser Ile Arg Ile Ala Leu Thr Asp
      50          55          60

```

```

Pro Asp Asn Pro Arg Trp Ile Ser Ala Gln Lys Asp Ile Ile Ser Tyr
65          70          75          80

```

```

Val Asp Glu Thr Glu Ala Ala Thr Ser Thr Ile Thr Lys Asn Gln Asp
          85          90          95

```

```

Ala Gln Asn Asn Trp Leu Thr Gln Gln Ala Asn Leu Ser Pro Ala Pro
          100         105         110

```

```

Lys Gly Phe Ile Ile Ala Pro Glu Asn Gly Ser Gly Val Gly Thr Ala
      115         120         125

```

Val Asn Thr Ile Ala Asp Lys Gly Ile Pro Ile Val Ala Tyr Asp Arg
 130 135 140

Leu Ile Thr Gly Ser Asp Lys Tyr Asp Trp Tyr Val Ser Phe Asp Asn
 145 150 155 160

Glu Lys Val Gly Glu Leu Gln Gly Leu Ser Leu Ala Ala Gly Leu Leu
 165 170 175

Gly Lys Glu Asp Gly Ala Phe Asp Ser Ile Asp Gln Met Asn Glu Tyr
 180 185 190

Leu Lys Ser His Met Pro Gln Glu Thr Ile Ser Phe Tyr Thr Ile Ala
 195 200 205

Gly Ser Gln Asp Asp Asn Asn Ser Gln Tyr Phe Tyr Asn Gly Ala Met
 210 215 220

Lys Val Leu Lys Glu Leu Met Lys Asn Ser Gly Asn Lys Ile Ile Asp
 225 230 235 240

Leu Ser Pro Glu Gly Glu Asn Ala Val Tyr Val Pro Gly Trp Asn Tyr
 245 250 255

Gly Thr Ala Gly Gln Arg Ile Gln Ser Phe Leu Thr Ile Asn Lys Asp
 260 265 270

Pro Ala Gly Gly Asn Lys Ile Lys Ala Val Gly Ser Lys Pro Ala Ser
 275 280 285

Ile Phe Lys Gly Phe Leu Ala Pro Asn Asp Gly Met Ala Glu Gln Ala
 290 295 300

Ile Thr Lys Leu Lys Leu Glu Gly Phe Asp Thr Gln Lys Ile Phe Val
 305 310 315 320

Thr Gly Gln Asp Tyr Asn Asp Lys Ala Lys Thr Phe Ile Lys Asp Gly
 325 330 335

Asp Gln Asn Met Thr Ile Tyr Lys Pro Asp Lys Val Leu Gly Lys Val
 340 345 350

Ala Val Glu Val Leu Arg Val Leu Ile Ala Lys Lys Asn Lys Ala Ser
 355 360 365

Arg Ser Glu Val Glu Asn Glu Leu Lys Ala Lys Leu Pro Asn Ile Ser
 370 375 380

Phe Lys Tyr Asp Asn Gln Thr Tyr Lys Val Gln Gly Lys Asn Ile Asn
 385 390 395 400

Thr Ile Leu Val Ser Pro Val Ile Val Thr Lys Ala Asn Val Asp Asn
 405 410 415

Pro Asp Ala

<210> 3
 <211> 3324
 <212> ADN
 <213> Mycoplasma hyopneumoniae

<400> 3
 atgagtaaaa aatcaaaaac atttaaaatt ggtttgactg ccggaattgt tggctcttga 60
 gtttttggtc taactgtcgg acttagcagc ttggcaaaat acagatcaga aagtccacga 120
 aagattgcaa atgattttgc cgcaaaagtt tcaacattag ctttttagtcc ttatgctttt 180
 gagactgatt ctgattataa aatagtcaaa aggtgactag ttgattctaa taacaatatt 240
 agaaataaag aaaaagttat tgattccttt tcctttttta ctaaaaacgg tgatcagtta 300
 gaaaaaatta attttcaaga tcctgaatat accaaggcga agataacttt tgagattctt 360
 gaaattatcc ctgatgatgt caatcaaaat ttttaaggtaa aatttcaggc attacaaaaa 420
 cttcataatg gtgatattgc caaatctgat atttatgagc aaacagttgc ttttgccaaa 480
 cagtcaaatc ttttagttgc cgaatttaat ttttcgctta aaaaaattac cgaaaaatta 540
 aatcaacaaa ttgaaaattt atcaacaaaa attacaaatt ttgctgatga aaaaacaagc 600
 agccaaaaag atccctcaac tctaagagct attgacttcc aatacgattt aaatacagcg 660
 cgaaatcctg aggatttaga tataaagctt gctaattatt ttccagtact taaaaattta 720
 ataaacagac taaataatgc tcctgagaat aaattaccta ataatttggg taatatTTTT 780
 gaatttagct ttgcaaaaaga tagttcaact aatcaatatg taagtatcca gaaccaaatt 840

ccttcgctgt ttttaaaagc agatcttagt caaagtgcc gtgaaat ttt agctagccca	900
gatgaagttc agccagttat taacatttta agattaatga aaaaagataa ttcttcttat	960
tttctaaatt ttgaggattt tgtaataat ttaacactga aaaatatgca aaaagaagat	1020
ttaa atgcaa aggg tcaaaa tctttctgcc tatgaatttc tagcagatat taaatctgga	1080
ttttccctg gagacaagag atccagtcac accaaggcag aaattagtaa tcttttaaat	1140
aaaaaagaaa atatttatga ctttggtaaa tacaatggaa aattcaacga ccgtcttaac	1200
tcgccaaatt tagaatatag cctagatgca gcaagcgcaa gtcttgataa aaaagataaa	1260
tcaatagttt taattcccta ccgccttgaa attaaagata aat tttttgc cgatgattta	1320
tatccagata caaaagataa tattctcgta aaagaaggga ttcttaaatt aactggattt	1380
aaaaaaggct caaaaattga tctcccta atcaatcagc aaat ttttaa aaccgaatat	1440
ttaccatttt ttgaaaaagg taaagaagaa caagcaaat tagactatgg taatatctta	1500
aatccatata atactcaact tgccaaagtt gaagttgaag ctct ttttaa aggg aataaa	1560
aaccaagaaa tctatcaagc acttgatgga aattatgcct atgaattcgg ggcctttaa	1620
tccgtgctta attcctgaac agga aaaaatt cagcatcctg aaaaagctga tatccaaaga	1680
tttacaagac atttagaaca agttaaaatt gg tttctaatt cag tttttaa tcaaccacaa	1740
acaacaaaag aacaagtaat ttcaagtctt aaaagtaata act ttttttaa aaatggacat	1800
caagttgcaa gttatttcca ggatttactc accaaggaca aattaacaat ttagagact	1860
ctttatgatc tagcaaaaa atggggacta gaaactaaca gagcacaatt cccaaaagg	1920
gttttccaat atacaaaaga tatttttgca gaagcagata aattaaaatt tttggaattg	1980
aagaaaaagg atccttacaa tcagataaaa gaaattcacc aactttcctt taatatttta	2040
gcccgtaacg atgtaataaa atctgatgga ttttacggag ttttattatt gccc aag	2100
gtaaaaactg aattagaagg caaaaatgag gcgcaaattt ttgaagcgct taaaaagtat	2160
tctttaattg agaactcggc ttttaaaact actat ttttag ataaaaattt acttgaagg	2220
actgatttta aaaccttcgg tgatttttta aaagcatttt tccttaaagc agcccaattt	2280
aataattttg ctcttgagc aaaattagac gataatcttc agtattcatt tgaagctatc	2340
aaaaaagggg aaactacaaa agaaggtaaa agagaagaag tagataaaaa agttaaggaa	2400
ttggataata aaataaaagg tatattgcct cagccccag cagcaaaacc agaagcagca	2460

```

aaaccagtag cggctaaacc agaaacaaca aaaccagtag cagctaaacc tgaagcagct 2520
aaacctgaag cagcaaaacc agtagcggct aaaccagaag cagcaaaacc agtagcggct 2580
aaaccagaag cagcaaaacc agtagcggct aaaccagaag cagcaaaacc agtagcggct 2640
aaaccagaag cagcaaaacc agttgctact aatactggct tttcacttac aaataaacca 2700
aaagaagact atttccaat ggcttttagt tataaattag aatatactga cgaaaataaa 2760
ttaagcctaa aaacaccgga aattaatgta tttttagaac tagttcatca aagcgagtat 2820
gaagaacaag aaataataaa ggaactagat aaaactgttt taaatcttca atatcaattc 2880
caggaagtca aggtaactag tgaccaatat cagaaactta gccaccaat gatgaccgaa 2940
ggatcttcaa atcaaggtaa aaaaagcgaa ggaactccta accaaggtaa aaaagcagaa 3000
ggcgcgcta accaaggtaa aaaagccgaa ggaactccta accaaggga aaaagcagag 3060
ggagcaccta gtcaacaaag cccaactacc gaattaacta attaccttcc tgacttaggt 3120
aaaaaaattg acgaaatcat taataaacaa ggtaaaaatt gaaaaacaga ggttgaacta 3180
atcgaggata atacgctgg agatgctaaa ttgctatact ttatcctaag ggatgattca 3240
aatccggtg atcctaaaaa atcaagtcta aaagttaaaa taacagtaaa acaaagtaat 3300
aataatcagg aaccagaatc taaa 3324

```

```

<210> 4
<211> 1108
<212> PRT
<213> Mycoplasma hyopneumoniae

```

```

<400> 4

```

```

Met Ser Lys Lys Ser Lys Thr Phe Lys Ile Gly Leu Thr Ala Gly Ile
1           5           10           15

```

```

Val Gly Leu Gly Val Phe Gly Leu Thr Val Gly Leu Ser Ser Leu Ala
20           25           30

```

```

Lys Tyr Arg Ser Glu Ser Pro Arg Lys Ile Ala Asn Asp Phe Ala Ala
35           40           45

```

```

Lys Val Ser Thr Leu Ala Phe Ser Pro Tyr Ala Phe Glu Thr Asp Ser
50           55           60

```

```

Asp Tyr Lys Ile Val Lys Arg Trp Leu Val Asp Ser Asn Asn Asn Ile

```

65		70		75		80									
Arg	Asn	Lys	Glu	Lys	Val	Ile	Asp	Ser	Phe	Ser	Phe	Phe	Thr	Lys	Asn
			85						90					95	
Gly	Asp	Gln	Leu	Glu	Lys	Ile	Asn	Phe	Gln	Asp	Pro	Glu	Tyr	Thr	Lys
		100						105					110		
Ala	Lys	Ile	Thr	Phe	Glu	Ile	Leu	Glu	Ile	Ile	Pro	Asp	Asp	Val	Asn
		115					120					125			
Gln	Asn	Phe	Lys	Val	Lys	Phe	Gln	Ala	Leu	Gln	Lys	Leu	His	Asn	Gly
	130					135					140				
Asp	Ile	Ala	Lys	Ser	Asp	Ile	Tyr	Glu	Gln	Thr	Val	Ala	Phe	Ala	Lys
145					150					155					160
Gln	Ser	Asn	Leu	Leu	Val	Ala	Glu	Phe	Asn	Phe	Ser	Leu	Lys	Lys	Ile
			165						170					175	
Thr	Glu	Lys	Leu	Asn	Gln	Gln	Ile	Glu	Asn	Leu	Ser	Thr	Lys	Ile	Thr
		180						185					190		
Asn	Phe	Ala	Asp	Glu	Lys	Thr	Ser	Ser	Gln	Lys	Asp	Pro	Ser	Thr	Leu
	195						200					205			
Arg	Ala	Ile	Asp	Phe	Gln	Tyr	Asp	Leu	Asn	Thr	Ala	Arg	Asn	Pro	Glu
	210					215					220				
Asp	Leu	Asp	Ile	Lys	Leu	Ala	Asn	Tyr	Phe	Pro	Val	Leu	Lys	Asn	Leu
225					230					235					240
Ile	Asn	Arg	Leu	Asn	Asn	Ala	Pro	Glu	Asn	Lys	Leu	Pro	Asn	Asn	Leu
			245						250					255	
Gly	Asn	Ile	Phe	Glu	Phe	Ser	Phe	Ala	Lys	Asp	Ser	Ser	Thr	Asn	Gln
		260						265					270		
Tyr	Val	Ser	Ile	Gln	Asn	Gln	Ile	Pro	Ser	Leu	Phe	Leu	Lys	Ala	Asp
		275					280					285			

Leu Ser Gln Ser Ala Arg Glu Ile Leu Ala Ser Pro Asp Glu Val Gln
 290 295 300

Pro Val Ile Asn Ile Leu Arg Leu Met Lys Lys Asp Asn Ser Ser Tyr
 305 310 315 320

Phe Leu Asn Phe Glu Asp Phe Val Asn Asn Leu Thr Leu Lys Asn Met
 325 330 335

Gln Lys Glu Asp Leu Asn Ala Lys Gly Gln Asn Leu Ser Ala Tyr Glu
 340 345 350

Phe Leu Ala Asp Ile Lys Ser Gly Phe Phe Pro Gly Asp Lys Arg Ser
 355 360 365

Ser His Thr Lys Ala Glu Ile Ser Asn Leu Leu Asn Lys Lys Glu Asn
 370 375 380

Ile Tyr Asp Phe Gly Lys Tyr Asn Gly Lys Phe Asn Asp Arg Leu Asn
 385 390 395 400

Ser Pro Asn Leu Glu Tyr Ser Leu Asp Ala Ala Ser Ala Ser Leu Asp
 405 410 415

Lys Lys Asp Lys Ser Ile Val Leu Ile Pro Tyr Arg Leu Glu Ile Lys
 420 425 430

Asp Lys Phe Phe Ala Asp Asp Leu Tyr Pro Asp Thr Lys Asp Asn Ile
 435 440 445

Leu Val Lys Glu Gly Ile Leu Lys Leu Thr Gly Phe Lys Lys Gly Ser
 450 455 460

Lys Ile Asp Leu Pro Asn Ile Asn Gln Gln Ile Phe Lys Thr Glu Tyr
 465 470 475 480

Leu Pro Phe Phe Glu Lys Gly Lys Glu Glu Gln Ala Lys Leu Asp Tyr
 485 490 495

Gly Asn Ile Leu Asn Pro Tyr Asn Thr Gln Leu Ala Lys Val Glu Val
 500 505 510

Glu Ala Leu Phe Lys Gly Asn Lys Asn Gln Glu Ile Tyr Gln Ala Leu
 515 520 525

Asp Gly Asn Tyr Ala Tyr Glu Phe Gly Ala Phe Lys Ser Val Leu Asn
 530 535 540

Ser Trp Thr Gly Lys Ile Gln His Pro Glu Lys Ala Asp Ile Gln Arg
 545 550 555 560

Phe Thr Arg His Leu Glu Gln Val Lys Ile Gly Ser Asn Ser Val Leu
 565 570 575

Asn Gln Pro Gln Thr Thr Lys Glu Gln Val Ile Ser Ser Leu Lys Ser
 580 585 590

Asn Asn Phe Phe Lys Asn Gly His Gln Val Ala Ser Tyr Phe Gln Asp
 595 600 605

Leu Leu Thr Lys Asp Lys Leu Thr Ile Leu Glu Thr Leu Tyr Asp Leu
 610 615 620

Ala Lys Lys Trp Gly Leu Glu Thr Asn Arg Ala Gln Phe Pro Lys Gly
 625 630 635 640

Val Phe Gln Tyr Thr Lys Asp Ile Phe Ala Glu Ala Asp Lys Leu Lys
 645 650 655

Phe Leu Glu Leu Lys Lys Lys Asp Pro Tyr Asn Gln Ile Lys Glu Ile
 660 665 670

His Gln Leu Ser Phe Asn Ile Leu Ala Arg Asn Asp Val Ile Lys Ser
 675 680 685

Asp Gly Phe Tyr Gly Val Leu Leu Leu Pro Gln Ser Val Lys Thr Glu
 690 695 700

Leu Glu Gly Lys Asn Glu Ala Gln Ile Phe Glu Ala Leu Lys Lys Tyr
 705 710 715 720

Ser Leu Ile Glu Asn Ser Ala Phe Lys Thr Thr Ile Leu Asp Lys Asn
 725 730 735

Leu Leu Glu Gly Thr Asp Phe Lys Thr Phe Gly Asp Phe Leu Lys Ala
740 745 750

Phe Phe Leu Lys Ala Ala Gln Phe Asn Asn Phe Ala Pro Trp Ala Lys
755 760 765

Leu Asp Asp Asn Leu Gln Tyr Ser Phe Glu Ala Ile Lys Lys Gly Glu
770 775 780

Thr Thr Lys Glu Gly Lys Arg Glu Glu Val Asp Lys Lys Val Lys Glu
785 790 795 800

Leu Asp Asn Lys Ile Lys Gly Ile Leu Pro Gln Pro Pro Ala Ala Lys
805 810 815

Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Thr Thr Lys Pro
820 825 830

Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val
835 840 845

Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala
850 855 860

Ala Lys Pro Val Ala Ala Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Ala
865 870 875 880

Lys Pro Glu Ala Ala Lys Pro Val Ala Thr Asn Thr Gly Phe Ser Leu
885 890 895

Thr Asn Lys Pro Lys Glu Asp Tyr Phe Pro Met Ala Phe Ser Tyr Lys
900 905 910

Leu Glu Tyr Thr Asp Glu Asn Lys Leu Ser Leu Lys Thr Pro Glu Ile
915 920 925

Asn Val Phe Leu Glu Leu Val His Gln Ser Glu Tyr Glu Glu Gln Glu
930 935 940

Ile Ile Lys Glu Leu Asp Lys Thr Val Leu Asn Leu Gln Tyr Gln Phe

Gln	Glu	Val	Lys	Val	Thr	Ser	Asp	Gln	Tyr	Gln	Lys	Leu	Ser	His	Pro
				965					970					975	
Met	Met	Thr	Glu	Gly	Ser	Ser	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Ser	Glu	Gly	Thr
			980					985					990		
Pro	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys
		995					1000					1005			
Ala	Glu	Gly	Thr	Pro	Asn	Gln	Gly	Lys	Lys	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	
	1010					1015					1020				
Ser	Gln	Gln	Ser	Pro	Thr	Thr	Glu	Leu	Thr	Asn	Tyr	Leu	Pro	Asp	
	1025					1030					1035				
Leu	Gly	Lys	Lys	Ile	Asp	Glu	Ile	Ile	Lys	Lys	Gln	Gly	Lys	Asn	
	1040					1045					1050				
Trp	Lys	Thr	Glu	Val	Glu	Leu	Ile	Glu	Asp	Asn	Ile	Ala	Gly	Asp	
	1055					1060					1065				
Ala	Lys	Leu	Leu	Tyr	Phe	Ile	Leu	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Ser	Gly	
	1070					1075					1080				
Asp	Pro	Lys	Lys	Ser	Ser	Leu	Lys	Val	Lys	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	
	1085					1090					1095				
Ser	Asn	Asn	Asn	Gln	Glu	Pro	Glu	Ser	Lys						
	1100					1105									

```
<210> 5
<211> 1773
<212> ADN
<213> Circovirut ở lợn

<400> 5
ggtagctccg tggattgttc tccagcagtc ttccaaaatt gcaaagtagt aatcctccga      60
tagagagctt ctacagctgg gacagcagtt gaggagtacc attcctgggg ggcttgattg      120
ctggtaatca aaatactgcg ggccaaaaaa ggaacagtac cccctttagt ctctacagtc      180
```


aatggatacc ggtcacacag tctcagtaga tcatccaag gtaaccagcc ataaaaatca	240
tccaaaacaa caacttcttc tccatgatat ccatcccacc acttatttct actaggcttc	300
cagtaggtgt ccctaggctc agcaaaatta cgggcccact ggctcttccc acaaccgggc	360
gggcccacta tgacgtgtac agctgtcttc caatcacgct gctgcatctt cccgctcact	420
ttcaaaagtt cagccagccc gcggaaatth ctcacatacg ttacaggaaa ctgctcggct	480
acagtcacca aagaccccgt ctccaaaagg gtactcacag cagtagacag gtcgctgcgc	540
ttcccctggg tccgcggagc tccacactcg ataagtatgt ggccttcttt actgcagtat	600
tctttattct gctggctcggg tcctttcgct ttctcgtatg ggcagcgggc accaaaatac	660
cacttcacct tgtaaaaagt ctgcttctta gcaaaattcg caaacccctg gaggtgagga	720
gttctaccct cttccaaacc ttctcgcga caaacaaat aatcaaaaag ggagattgga	780
agctcccgtg ttttgTTTTT ctctcctcg gaaggattat taagggtgaa caccacctc	840
ttatgggggt gcgggcccgt tttcttgctt ggcattttca ctgacgctgc cgaggtgctg	900
ccgctgccga agtgcgctgg taatactaca gcagcgact tctttcactt ttataggatg	960
acgtatccaa ggaggcgta ccgcagaaga agacaccgcc cccgcagcca tcttgccag	1020
atcctccgcc gccgccctg gctcgtccac cccgccacc gctaccgttg gagaaggaaa	1080
aatggcatct tcaacacccg cctctccgc accttcggat atactgtcaa ggctaccaca	1140
gtcagaacgc cctcctgggc ggtggacatg atgagattta atattgacga ctttgttccc	1200
ccgggagggg ggaccaacaa aatctctata ccctttgaat actacagaat aagaaaggtt	1260
aaggttgaat tctggccctg ctccccatc acccagggtg ataggggagt gggctccact	1320
gctgttattc tagatgataa ctttgtaaca aaggccacag ccctaaccta tgacccatat	1380
gtaaactact cctcccgcca tacaatcccc caacccttct cctaccactc ccgttacttc	1440
acacccaaac ctgttcttga ctccaccatt gattacttcc aaccaaataa caaaaggaat	1500
cagcttttga tgaggctaca aacctctaga aatgtggacc acgtaggcct cggcactgcg	1560
ttcgaaaaca gtatatacga ccaggactac aatatccgtg taacctatga tgtacaattc	1620
agagaattta atcttaaaga cccccactt aaaccctaaa tgaataaaaa taaaaaccat	1680
tacgatgtga taacaaaaaa gactcagtaa tttattttat atgggaaaag ggcacagggt	1740
gggtccactg cttcaaatcg gccttcgggt acc	1773

<210> 6
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Circovirut ở lợn

<400> 6
 atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
 cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc ccccccgcc accgctaccg ttggagaagg 120
 aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctacc 180
 acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaatatga cgactttgtt 240
 cccccgggag gggggaccaa caaaatctct ataccctttg aatactacag aataagaaag 300
 gttaagggtt aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgataggg agtgggctcc 360
 actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgaccca 420
 tatgtaaact actcctcccg ccatacaatc cccaaccct tctcctacca ctcccgttac 480
 ttcacacca aacctgttct tgactccacc attgattact tccaacaaa taacaaaagg 540
 aatcagcttt ggatgaggct acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccct aa 702

<210> 7
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Circovirut ở lợn

<400> 7

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
 20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
 35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Arg Thr
 50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val

65		70		75		80									
Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Ile	Ser	Ile	Pro	Phe	Glu	Tyr	Tyr
				85					90					95	
Arg	Ile	Arg	Lys	Val	Lys	Val	Glu	Phe	Trp	Pro	Cys	Ser	Pro	Ile	Thr
			100					105					110		
Gln	Gly	Asp	Arg	Gly	Val	Gly	Ser	Thr	Ala	Val	Ile	Leu	Asp	Asp	Asn
		115					120					125			
Phe	Val	Thr	Lys	Ala	Thr	Ala	Leu	Thr	Tyr	Asp	Pro	Tyr	Val	Asn	Tyr
	130					135					140				
Ser	Ser	Arg	His	Thr	Ile	Pro	Gln	Pro	Phe	Ser	Tyr	His	Ser	Arg	Tyr
145					150					155					160
Phe	Thr	Pro	Lys	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Thr	Ile	Asp	Tyr	Phe	Gln	Pro
				165					170					175	
Asn	Asn	Lys	Arg	Asn	Gln	Leu	Trp	Met	Arg	Leu	Gln	Thr	Ser	Arg	Asn
			180					185					190		
Val	Asp	His	Val	Gly	Leu	Gly	Thr	Ala	Phe	Glu	Asn	Ser	Ile	Tyr	Asp
		195					200					205			
Gln	Asp	Tyr	Asn	Ile	Arg	Val	Thr	Met	Tyr	Val	Gln	Phe	Arg	Glu	Phe
	210					215					220				
Asn	Leu	Lys	Asp	Pro	Pro	Leu	Lys	Pro							
225						230									

<210> 8

<211> 1767

<212> ADN

<213> Circovirut ở lợn

<400> 8

ggtagctccg tggattgttc tccagcagtc ttccaaaatt gcaaagtagt aatcctccga 60

tagagagctt ctacagctgg gacagcagtt gaggagtacc attcctgggg ggcctgattg 120

ctggtaatca aaatactgcg ggccaaaaaa ggaacagtac cccctttagt ctctacagtc 180

aatggatacc ggtcacacag tctcagtaga tcatccaag gtaaccagcc ataaaaatca	240
tccaaaacaa caacttcttc tccatgatat ccatcccacc acttatttct actaggcttc	300
cagtaggtgt cgctaggctc agcaaaatta cgggccact ggctcttccc acaaccgggc	360
gggccacta tgacgtgtac agctgtcttc caatcacgct gctgcatctt cccgctcact	420
ttcaaaagtt cagccagccc gcggaaattt ctcacatacg ttacaggga ctgctcggct	480
acagtcacca aagaccccgt ctccaaaagg gtactcacag cagtagacag gtcgctgcgc	540
ttcccctggt tccgcggagc tccacactcg ataagtatgt ggccttcttt actgcagtat	600
tctttattct gctggctggt tcctttcgct ttctcgatgt ggcagcgggc accaaaatac	660
cacttcacct tgtaaaagt ctgcttctta gcaaaattcg caaacccctg gaggtgagga	720
gttctaccct cttccaaacc ttctctccg caaacaaaat aatcaaaaag ggagattgga	780
agctcccgt tttgttttt ctctctctcg gaaggattat taagggtgaa caccacctc	840
ttatggggtt gcgggcccgt tttctgctt ggcattttca ctgacgctgc cgaggtgctg	900
ccgctgccga agtgcgctgg taatactaca gcagcgact tctttcactt ttataggatg	960
acgtatccaa ggaggcgta ccgcagaaga agacaccgcc cccgcagcca tcttgccag	1020
atcctccgcc gccgccctg gctcgtccac cccgccacc gctaccgttg gagaaggaaa	1080
aatggcatct tcaacaccg cctctccgc accttcggat atactgtcaa ggctaccaca	1140
gtcagaacgc cctcctgggc ggtggacatg atgagattta atattgacga ctttgttccc	1200
ccgggagggg ggaccaacaa aatctctata ccctttgaat actacagaat aagaaaggtt	1260
aaggttgaat tctggccctg ctccccatc acccagggtg ataggggagt gggctccact	1320
gctgttattc tagatgataa ctttgtaaca aaggccacag ccctaaccta tgacccatat	1380
gtaaaactact cctcccgcca tacaatcgcc caacccttct cctaccactc ccgttacttc	1440
acacccaaac ctgttcttga ctccaccatt gattacttcc aaccaaataa caaaaggaat	1500
cagctttgga tgaggctaca aacctctaga aatgtggacc acgtaggcct cggcactgcg	1560
ttcgaacaa gtatatacga ccaggactac aatatccgtg taacctatga tgtacaattc	1620
agagaattta atcttaaaga cccccactt aaaccctaaa tgaataaaaa taaaaaccat	1680
tacgatgtga taacaaaaaa gactcagtaa tttattttat atgggaaaag ggcacagggt	1740
gggtccactg cttcaaatcg gccttcg	1767

<210> 9
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Circovirut ở lợn

<400> 9
 atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga agaagacacc gccccgcag ccatcttggc 60
 cagatcctcc gccgccgcc ctggctcgtc ccccccgcc accgctaccg ttggagaagg 120
 aaaaatggca tcttcaacac cgcctctcc cgcaccttcg gatatactgt caaggctacc 180
 acagtcagaa cgccctcctg ggcggtggac atgatgagat ttaatatga cgactttgtt 240
 cccccgggag gggggaccaa caaatctct atacccttg aatactacag aataagaaag 300
 gttaagggtg aattctggcc ctgctcccc atcaccagg gtgataggg agtgggctcc 360
 actgctgtta ttctagatga taactttgta acaaaggcca cagccctaac ctatgaccca 420
 tatgtaaact actcctccc ccatacaatc gcccaaccct tctcctacca ctcccgttac 480
 ttcacacca aacctgttct tgactccacc attgattact tccaacaaa taacaaaagg 540
 aatcagcttt ggatgaggct acaaacctct agaaatgtgg accacgtagg cctcggcact 600
 gcgttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtgtaaccat gtatgtacaa 660
 ttcagagaat ttaatcttaa agacccccca cttaaaccct aa 702

<210> 10
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Circovirut ở lợn

<400> 10

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
 20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
 35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Arg Thr
 50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val

65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
85 90 95

Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
115 120 125

Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
130 135 140

Ser Ser Arg His Thr Ile Ala Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
145 150 155 160

Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
165 170 175

Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Met Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn
180 185 190

Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Ile Tyr Asp
195 200 205

Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
210 215 220

Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
225 230

<210> 11
<211> 233
<212> PRT
<213> Circovirut ở lợn

<400> 11

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro

20	25	30
Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg		
35	40	45
Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr		
50	55	60
Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val		
65	70	75
Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr		
85	90	95
Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr		
100	105	110
Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn		
115	120	125
Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr		
130	135	140
Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr		
145	150	155
Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro		
165	170	175
Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn		
180	185	190
Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp		
195	200	205
Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe		
210	215	220
Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro		
225	230	

<210> 12
 <211> 713
 <212> ADN
 <213> Circovirut ở lợn

<400> 12
 cagctatgac gstatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
 ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccgttgga 120
 gaaggaaaaa tggcatcttc aacacccgcc tctcccgac cttcggatat actgtggaga 180
 aggaaaaatg gcatcttcaa caccgcctc tcccgcacct tcggatatac tgtgacgact 240
 ttgttcccc ggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
 gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
 gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
 acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc 480
 gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttcaa ccaaataaca 540
 aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
 gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
 tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttaa accctaaatg aat 713

<210> 13
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Circovirut ở lợn

<400> 13

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
 20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
 35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr
 50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val

[illegible]

<210> 14
<211> 713
<212> ADN
<213> Circovirut ở lợn

<400> 14
ccgccatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
ttggccagat cctccgccgc cgcccctggc tcgtccaccc ccgccaccgc taccgttggga 120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacacccgcc tctccgcac cttcggatat actgtcaagg 180

ctaccacagt cacaacgccc tcctgggcgg tggacatgat gagatttaat attgacgact 240
 ttgttcccc gggagggggg accaacaata tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
 gaaagggtta ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
 gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
 acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatccccca acccttctcc taccactccc 480
 gttacttcac acccaaact gttcttgact ccactattga ttacttcaa ccaaataaca 540
 aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
 gcactgcgtt cgaacacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
 tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttga accctaagaa ttc 713

<210> 15

<211> 233

<212> PRT

<213> Circovirut ở lợn

<400> 15

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
 20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
 35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Arg Thr
 50 55 60

Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val
 65 70 75 80

Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95

Arg Ile Lys Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
 100 105 110

Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn

115						120						125					
Phe	Val	Thr	Lys	Ala	Thr	Ala	Leu	Thr	Tyr	Asp	Pro	Tyr	Val	Asn	Tyr		
130			135			140											
Ser	Ser	Arg	His	Thr	Ile	Pro	Gln	Pro	Phe	Ser	Tyr	His	Ser	Arg	Tyr		
145			150			155						160					
Phe	Thr	Pro	Lys	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Thr	Ile	Asp	Tyr	Phe	Gln	Pro		
				165		170								175			
Asn	Asn	Lys	Arg	Asn	Gln	Leu	Trp	Leu	Arg	Leu	Gln	Thr	Ser	Arg	Asn		
			180		185						190						
Val	Asp	His	Val	Gly	Leu	Gly	Thr	Ala	Phe	Glu	Asn	Ser	Ile	Tyr	Asp		
195			200			205											
Gln	Asp	Tyr	Asn	Ile	Arg	Val	Thr	Met	Tyr	Val	Gln	Phe	Arg	Glu	Phe		
210			215			220											
Asn	Leu	Lys	Asp	Pro	Pro	Leu	Lys	Pro									
225		230															

```
<210> 16
<211> 15450
<212> ADN
<213> Virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn
```

[illegible]

aggctctaca agtttatgaa cggggttgct gctggtaccc cattgtcgga cctgtccctg	600
gagtggccgt ttacgccaac tccctacatg tgagtgacaa acctttcccg ggagcaactc	660
atgtgttaac caacctaccg ctcccgaga ggcccaagcc tgaagacttt tgcccttttg	720
agtgtgctat ggctaacgtc tatgacattg gccataacgc cgtcatgtat gtggccagag	780
ggaaagtctc ctggggcccct cgtggcgggg atgaagtga atttgaaacc gtccccgaag	840
agttgaagtt gattgcgaac cgactccaca tctccttccc gccccaccac gcagtggaca	900
tgtctgagtt tgccttcata gccctggga gtggtgtctc cttgcgggtc gagcaccaac	960
acggctgcct tcccgtgat actgtccctg atgggaactg ctggtggtac ttgtttgact	1020
tgctcccacc ggaagttcag aataaagaaa ttgccgtgc taaccaatth ggctatcaaa	1080
ccaagcatgg tgtccatggc aagtacctac agcggaggct gcaagttaat ggtctccgag	1140
cagtgactga tacagatgga cctattgtcg tacagtactt ctctgttagg gagagttgga	1200
tccgccactt cagactggcg gaagaacctt gcctccctgg gtttgaagac ctctcagaa	1260
taagggtaga gcctaatacg tcgccaatgg gtggcaaggg tgaaaaaatc ttccggtttg	1320
gcagtcacaa gtggtacggg gctggaaaga gagcaaggag agcacgctct ggtgcgactg	1380
ccacggtcgc tcaccgcgct ttgcccgtc gcgaagccca gcaggccaag aagctcgagg	1440
ttgccagcgc caacagggtg gagcatctca agtactattc cccgcctgcc gacgggaact	1500
gtggttgga ctgcatttcc gccattacca accggatggt gaattccaaa tttgaaacca	1560
ctcttcccga gagagtgaga cttcagatg actgggctac tgacgaggat cttgtgaata	1620
ccatccaaat cctcaggctc cccgcggcct tggacaggaa cgggtgcttg gctggcgcca	1680
agtacgtgct caagctggaa ggtgagcact ggaccgtctc tgtgaccctt gggatgaccc	1740
cttctttgct ccccttgaa tgtgttcagg gttgttgtga gcataagagc ggtcttggtt	1800
tcccagacgt ggtcgaagtt tccgatttg accctgcctg tcttgaccga cttgctgaga	1860
taatgcactt gcctagcagt gtcattccag ctgctctggc cgagatgtcc gacgacttca	1920
atcgtctggc ttccccggcc gccactgtgt ggactgtttc gcaattcttt gcccgccaca	1980
gaggaggaga gcattctgac cagggtgtgt tagggaaaat tatcaacctt tgtcaggtga	2040
ttgaggaatg ctgctgttcc cggaacaaag ccaaccgggc taccggaag gaggttgagg	2100
caaaagtga ccagtacct cgtggtgcag caagccttgg agaattgctt gccaaagctt	2160
agagggtcgc cccgccgagc gcgacggaca cctcctttga ttggaatgtt gtgcttcctg	2220

gggttgagac ggcgaatcag acaaccaaac agctccatgt caaccagtgc cgcgctctgg 2280
 ttctgtcgt gactcaagag cttttggaca gagactcggc ccctctgacc gccttctcgc 2340
 tgtccaattg ctactaccct gcacaagggtg acgagggtccg tcaccgtgag aggctaaact 2400
 cttgtctctc taagttggag ggggttggtc gtgaggaata tgggctcacg ccaactggac 2460
 ctggcccgcg acccgactg ccgaacgggc tcgacgagct taaagaccag atggaggagg 2520
 atctgctgaa attagtcaac gccagggca cttcagaaat gatggcctgg gcagccgagc 2580
 aggttgatct aaaagcttgg gtcaaaaatt acccacgggtg gacaccgcca cccctccac 2640
 caagagttca gcctcgaaaa acgaagtctg tcaagagctt gctagagaac aagcctgtcc 2700
 ctgctccgcg caggaaggtc agatctgatt gtggcagccc gatthttgatg ggcgacaatg 2760
 ttctaacgg ttgggaagat tcgactgttg gtgggtcccct tgatctttcg gcaccatccg 2820
 agccgatgac acctctgagt gagcctgtac ttatttccag gccagtgaca tctttgagtg 2880
 tgccggcccc agttcctgca ccgcgtagag ctgtgtcccg accgatgacg ccctcgagtg 2940
 agccaattht tgtgtctgca ctgcgacaca aatttcagca ggtggaaaaa gcaaatctgg 3000
 cggcagcagc gccgatgtgc caggacgaac ctttagatth gtctgcatcc tcacagactg 3060
 aatatgaggc ttcccccta acaccaccgc agaacgtggg cattctggag gtaagggggc 3120
 aagaagctga ggaagtctg agtgaaatct cggatattct gaatgatacc aaccctgcac 3180
 ctgtgtcatc aagcagctcc ctgtcaagt ttaagatcac acgccccaaa tactcagctc 3240
 aagccattat cgactcgggc gggccctgca gtgggcacct ccaaaggga aaagaagcat 3300
 gcctccgcat catgcgtgaa gcttgtgatg cggccaagct tagtgaccct gccacgcagg 3360
 aatggcttht tcgcatgtgg gatagggtgg acatgctgac ttggcgcaac acgtctgctt 3420
 accaggcgth tcgcacctta gatggcaggt ttgggttht cccaaagatg atactcgaga 3480
 cgccgccgcc ctaccgtgt gggthtgtga tgttgctca caccctgca cttccgtga 3540
 gtgcagagag cgaccttacc attggttcag tcgccactga agatattcca cgcatcctcg 3600
 ggaaaataga aaataccggt gagatgatca accagggacc cttggcatcc tctgaggaag 3660
 aaccggtata caaccaacct gccaaagact cccgatatc gtcgcggggg tctgacgaga 3720
 gcacagcagc tccgtccgcg ggtacagggt gcgccggctt atthactgat ttgccacctt 3780
 cagacggcgt agatgcggac ggtggggggc cgttgacgac ggtaagaaag aaagctgaaa 3840

ggctcttcga ccaattgagc cgtcagggtt ttaacctcgt ctcccatctc cctgttttct	3900
tctcacacct cttcaaactt gacagtgggt attctccggg tgattggggg tttgcagctt	3960
ttactctatt ttgcctcttt ttgtgttaca gctacccatt cttcggtttc gttcccctct	4020
tgggtgtatt ttctgggtct tctcggcgtg tgcgcatggg ggtttttggc tgctggctgg	4080
cttttgctgt tggcctgttc aagcctgtgt ccgaccagc cggcactgct tgtgagtttg	4140
actcgccaga gtgcaggaac gtccttcatt cttttgagct tctcaaactc tgggaccctg	4200
ttcgcagcct tgttgtgggc cccgtcggtc tcggtcttgc cattcttggc aagttactgg	4260
gcggggcacg ctacatctgg cattttttgc ttaggcttgg cattgttgca gattgtatct	4320
tggctggagc ttatgtgctt tctcaaggta ggtgtaaaaa gtgctgggga tcttgataa	4380
gaactgctcc taatgaaatc gccttcaacg tgttcccttt tacacgtgcg accaggtcgt	4440
cactcatcga cctgtcgat cggttttgtg cgccaacagg catggacccc attttcctcg	4500
ccactgggtg gcgtgggtgc tggaccggcc gaagtcccat tgagcaaccc tctgaaaaac	4560
ccatcgctt cgcccagttg gatgaaaaga ggattacggc tagaactgtg gtcgctcagc	4620
cttatgatcc taatcaagcc gtgaagtgtc tgcgggtgtt acaggcgggt ggggcgatgg	4680
tggccgaggc agtcccaaaa gtggccaaag tttctgctat tccattccga gccccttttt	4740
ttcccaccgg agtgaaagt gatcccgagt gcaggatcgt gggtgacccc gatactttta	4800
ctacagccct ccggtctggt tactctacca caaacctcgt ccttggtgtg ggggactttg	4860
cccagctgaa tggactaaag atcaggcaaa tttccaagcc ttcgggagga ggcccacacc	4920
tcattgctgc cctgcatgtt gcctgctcga tggcgttgca catgcttgct ggggtttatg	4980
taacttcagt ggggtcttgc ggtgccggca ccaacgatcc atggtgcact aatccgtttg	5040
ccgttcctgg ctacggacca ggctctctct gcacgtccag attgtgcatc tccaacatg	5100
gccttaccct gcccttgaca gcacttgtag cgggattcgg tcttcaggaa atcgcttg	5160
tcgttttgat tttcgtttcc atcggaggca tggctcatag gttgagttgt aaggctgata	5220
tgctgtgcat ttacttgca atcgccagct atgtttgggt accccttacc tggttgcttt	5280
gtgtgtttcc ttgttggttg cgctggttct ctttgcaccc cttaccatc ctatggttgg	5340
tgtttttctt gatttctgta aatatgcctt cgggaatctt ggccgtggtg ttattggttt	5400
ctctttggct tttgggacgt tatactaaca ttgctggtct tgtcacccc tatgatattc	5460
atcattacac cagtggcccc cgcggtgttg ccgccttggc taccgcacca gatggaacct	5520

acttggtgctgc cgtccgccgc gctgcgttga ctggctgcac catgctgttc accccgtctc 5580
 agcttgggtc cttcttgag ggcgtttca gaactcgaag gccctcactg aacaccgtca 5640
 atgtggttgg gtcctccatg ggctctggg gagtggtcac catcgacggg aaaattaggt 5700
 gcgtgactgc cgcacatgct cttacgggta attcggctag ggtttccgga gtcggcttca 5760
 atcaaagtct tgactttgat gtgaaagggg acttcgcat agctgattgc ccgaattggc 5820
 aaggagctgc tccaagacc caattctgcg aggacggatg gactggccgt gcctattggc 5880
 tgacatcctc tggcgtcga cccggtgtta ttgggaatgg attcgccttc tgcttcaccg 5940
 cgtgcggcga ttccgggtcc ccagtcatca ccgaagctgg tgagattgtc ggcgttcaca 6000
 caggatcaaa taaacaagga ggtggcatcg tcacgcgcc ttcaggccag ttttgtaacg 6060
 tggcaccat caagctgagc gaattaagt aattctttgc tggaccaag gtcccgtcg 6120
 gtgatgtgaa ggttggcagc cacataatta aagacacgtg cgaagtacct tcagatcttt 6180
 gcgccttgct tgctgcaaaa cctgaactgg agggaggcct ctccaccgtc caacttctgt 6240
 gtgtgttttt cctactgtgg agaattgatg gacatgcctg gacgcccttg gttgctgtgg 6300
 ggtttttcat tctgaatgag gttctcccag ctgtcctggg tcggagtgtt ttctcctttg 6360
 ggatgtttgt gctatcttgg ctacaccat ggtctgcga agttctgatg atcaggcttc 6420
 taacagcagc tcttaacagg aacagatggg cacttgcctt ttacagcctt ggtgcggtga 6480
 ccggttttgt cgcagatctt gcggttaactc aagggcaccc gttgcaggca gtaatgaatt 6540
 tgagcaccta tgccttcctg cctcgatga tggttgtgac ctaccagtc ccagtgattg 6600
 cgtgtggtgt tgtgcaccta cttgcatca ttttgactt gttcaagtac cgcggcctgc 6660
 acaatgttct tgttggtgat ggagcgtttt ctgcagctt cttcttgca tactttgccg 6720
 agggaaagt gaggaagg gtgtcgcaat cctgcggaat gaatcatgag tcattgactg 6780
 gtgccctgc tatgagactc aatgacgagg acttgactt cttacgaaa tggactgatt 6840
 ttaagtgtt tgtttctgcg tccaacatga ggaatgcagc aggccaattc atcaggctg 6900
 cctatgcaaa agcacttaga attgaacttg ccagttggg gcaggttgat aaggttcgag 6960
 gtactttggc caagcttgag gcttttgctg ataccgtggc accccaactc tcgcccgggtg 7020
 acattgttgt tgctcttggc catagcctg ttggcagcat cttcgaccta aaggttggtg 7080
 gtaccaagca tactctcaa gtcattgaga ccagatcct tgccgggtcc aaaatgaccg 7140

tggcgcgcgt cgttgacca accccacgc cccacccgc acccgtgccc atccccctcc	7200
caccgaaagt tctagagaat ggtcccaacg cctgggggga tggggaccgt ttgaataaga	7260
agaagaggcg taggatggaa accgtcggca tctttgtcat ggggtgggaag aagtaccaga	7320
aattttggga caagaattcc ggtgatgtgt ttacgagga ggtccatgac aacacagatg	7380
cgtgggagtg cctcagagtt ggtgaccctg ccgactttaa ccctgagaag ggaactctgt	7440
gtgggcatac tactattgaa gataaggatt acaaagtcta cgcctcccca tctggcaaga	7500
agttcctggt ccccgtaac ccagagagcg gaagagccca atgggaagct gcaaagcttt	7560
ccgtggagca ggcccttggc atgatgaatg tcgacggtga actgacggcc aaagaagtgg	7620
agaaactgaa aagaataatt gacaaacttc agggccttac taaggagcag tgtttaaact	7680
gctagccgcc agcggcttga cccgctgtgg tcgcggcggc ttggttgta ctgagacagc	7740
ggtaaaaata gtcaaatttc acaaccggac ttccacccta gggcctgtga atttaaaagt	7800
ggccagtgag gttgagctga aagacgcggt cgagcacaac caacaccgg ttgcaagacc	7860
ggttgacggt ggtgttggtc tcctgcgttc cgagttcct tcgcttatag atgtcctgat	7920
ctccggtgct gacgcatctc ctaagttact cgctcgtcac gggccgggga acactgggat	7980
cgatggcacg ctttgggact ttgaggccga ggccaccaa gaggaattg cgctcagtg	8040
gcaaataata caggcttggt acattaggcg cggtgacgca cctgaaattg gtctccctta	8100
caagctgtac cctgttaggg gcaaccctga gcgggtaaaa ggagttttac agaatacaag	8160
gtttggagac ataccttaca aaacccccag tgacactggg agcccagtg acgcggctgc	8220
ctgcctcacg cccaatgcca ctccggtgac tgatgggcgc tccgtcttgg ctactaccat	8280
gccctccggt tttgaattgt atgtaccgac cattccagcg tctgtccttg attatcttga	8340
ctctaggcct gactgcccc aacagttgac agagcacggc tgtgaggatg ccgcattgag	8400
agacctctcc aagtatgact tgtccacca aggccttgtt ttacctgggg ttcttcgcct	8460
tgtgcgtaag tacctgtttg cccacgtggg taagtgcgcg cccgttcac ggccttcac	8520
ttaccctgcc aagaattcta tggctggaat aaatgggaac aggtttccaa ccaaggacat	8580
tcagagcgtc cccgaaatcg acgttctgtg cgcacaggcc gtgcgagaaa actggcaaac	8640
tgttaccctt tgtaccctca agaaacagta ttgtgggaag aagaagacta ggacaatact	8700
cggcaccaat aatttcattg cgttggccca ccgggcagcg ttgagtgggt tcacccaggg	8760
cttcatgaaa aaggcgttta actcgcccat cgccctcggg aaaaacaaat ttaaggagct	8820

acagactccg atcttaggca ggtgccttga agctgatctt gcatcctgtg atcgatccac 8880
 acctgcaatt gtccgctggt ttgccgcaa ctttctttat gaacttgcct gtgctgaaga 8940
 gcacctaccg tcgtacgtgc tgaactgctg ccatgacctt ttggtcacgc agtccggcgc 9000
 agtgactaag aggggtggcc tgtcgtctgg cgacccgatc acttctgtgt ctaacaccat 9060
 ttacagcttg gtgatatatg cacagcacat ggtgcttagt tactttaaaa gtggtcaccc 9120
 tcatggcctt ctgttcctac aagaccagct gaagttcgag gacatgctca aagtccaacc 9180
 cctgatcgtc tattcgagc acctcgtgct gtatgccgaa tctcccacca tgccgaacta 9240
 ccactgggtgg gtcgaacatc tgaatttgat gctgggtttt cagacggacc caaagaagac 9300
 agccataacg gactcgccat catttctagg ctgtaggata ataaatggac gccagctagt 9360
 cccaaccgt gacaggatcc tcgcgccct cgcttaccat atgaaggcaa acaatgtttc 9420
 tgaatactac gccgcggcgg ctgcaatact catggacagc tgtgcttggt tagagtatga 9480
 tcctgaatgg tttgaagagc ttgtgggttg gatagcgcat tgcgccgca aggacggcta 9540
 cagctttccc ggcccgcgt tcttcttgtc catgtgggaa aaactcagat ccaatcatga 9600
 ggggaagaag tccagaatgt gcgggtattg cggggccctg gctccgtacg ccactgcctg 9660
 tggcctcgac gtctgtatct accacacca cttccaccag cattgtccag tcacaatctg 9720
 gtgtggccac ccggctggtt ctggttcttg tagtgagtgc aaaccccc tagggaaagg 9780
 cacaagccct ctagatgagg tgtagaaca agtcccgtat aagcctccac ggactgtaat 9840
 catgcatgtg gagcagggtc tcacccctct tgaccaggc agataccaga ctgccgcgg 9900
 attagtctcc gtaggcgtg gcatcagagg aaatgaagt gacctaccag acggtgatta 9960
 tgctagcacc gccctactcc ccacttgtaa agagatcaac atggtcgctg tcgcctctaa 10020
 tgtgttgccg agcagggtca tcatcgttcc gcccggtgct gggaaaacat actggctcct 10080
 tcagcaggtc caggatggtg atgtcattta cacaccgact caccagacca tgctcgacat 10140
 gattagggct ttggggacgt gccggttcaa cgtcccagca ggtgcaacgc tgcaattccc 10200
 tgccccctcc cgtaccggcc cgtgggttcg catcctagcc ggcgggttggt gtcctggtaa 10260
 gaattccttc ttggatgaag cagcgtattg taatcacctt gatgtcttga ggctccttag 10320
 caaaaccacc ctacactgtc tgggagactt caaacaact caccagtggt gttttgattc 10380
 tcattgctat gtttttgaca tcatgcctca gaccagttg aagaccatct ggagattcgg 10440

acagaacatc tgtgatgcc a tccaaccaga ttacaggac aaacttgtgt ccatgggtcaa 10500
 cacaacccgt gtaaccacg tggaaaaacc tgtcaagtat gggcaagtcc tcaccctta 10560
 ccacaggac cgagaggac gcgccatcac aattgactcc agtcaaggcg ccacatttga 10620
 tgtggtcaca ctgcatttgc ccactaaaga ttactcaac aggcaaagag cccttggtgc 10680
 tatcaccagg gcaagacatg ctatcttgt gtatgacca cacaggcaat tgcagagcat 10740
 gtttgatctt cctgcgaagg gcacacccgt caacctgca gtgcaccgtg atgagcagct 10800
 gatcgtactg gatagaaata ataaagaatg cacagttgct caggctctag gcaacggaga 10860
 taaatttagg gccaccgaca agcgcgttgt agattctctc cgccgcattht gtgctgatct 10920
 ggaagggtcg agctctccgc tcccaagggt cgacacacac ttgggatttt atttctcacc 10980
 tgatttgaca cagtttgcta aactcccgggt agacctgca cccactggc ccgtgggtgac 11040
 aaccagaac aatgaaaagt ggccggatcg gctggttgcc agccttcgcc ctgtccataa 11100
 gtatagccgt gcgtgcattg gtgccggcta tatggtgggc ccctcggtgt ttctaggcac 11160
 ccctggggtc gtgtcact acctcacaaa atttgtcaag ggcgaggctc aagtgttcc 11220
 ggagacagtc ttcagcacg gccgaattga ggtggattgc cgggagtatc ttgatgacag 11280
 ggagcgagaa gttgctgagt ccctcccaca tgccttcatt ggcgacgtca aaggcaccac 11340
 cgttggggga tgtcatcatg tcacctcaa ataccttcgc cgcttccttc ccaaggaatc 11400
 agtcgcggta gtcggggttt cgagccccgg gaaagccga aaagcagtgt gcacattgac 11460
 ggatgtgtac ctcccagacc ttgaggccta cctccacca gagactcagt ccaagtgtg 11520
 gaaagttagt ttggacttca aggaagttcg actgatggc ttgaaagaca agacggccta 11580
 tttccaactt gaaggccgt atttcacctg gtatcagctt gcaagctacg cctcgtacat 11640
 ccgtgttcct gtcaactcca cggtgtatct ggaccctgc atgggccctg ccctttgcaa 11700
 cagaagagtt gtcgggtcca ccattgggg agctgacct gcagtcacc cttatgatta 11760
 cggtgctaaa atcatcttgt ctagcgctta ccatggtgaa atgcctcctg gatacaagat 11820
 tctggcgtgc gcggagtct cgctcgacga ccagtcgaag tacaacaca cctggggttt 11880
 tgaatcggat acagcgtatc tgtatgagtt caccggaaac ggtgaggact gggaggatta 11940
 caatgatgcg tttcgtgcgc gccagaaagg gaaaatttat aaggccactg ctaccagcat 12000
 gaagttttat tttccccgg gcccgctcat tgaaccaact ttaggcctga attgaaatga 12060
 aatgggtct atacaaagcc tcttcgacaa aattggccag ctttttgtgg atgctttcac 12120

ggaatTTTTg gtgtccattg ttgatatcat catatTTTTg gccatTTTgt ttggcttcac 12180
 catcgccggg tggctgggtg tcttttgcag cagattgggt tgctccgagg tattccgtgc 12240
 gcgccctgcc attcacctg agcaattaca gaagatccta tgaggccttt ctttctcagt 12300
 gccgggtgga cattcccacc tggggggtaa aacacccttt ggggatgttt tggcaccata 12360
 aggtgtcaac cctgattgat gaaatgggtg cgcgtcgaat gtaccgctc atggataaag 12420
 cagggaagc tgcctggaaa cagggtggga gcgaggctac gctgtctcgc attagtagtc 12480
 tggatgtggg ggctcatttt caacatcttg ccgccattga agccgagacc tgtaaatt 12540
 tggcttctcg actgcccatt ctacacaacc tgcgcatgac aggggtcaaata gtaaccatag 12600
 tgtataatag cactttaaat cagggtgttg ctatTTTTcc aaccctggg tcccggccaa 12660
 agcttcatga ttttcagcaa tggctaatag ctgtacattc ctccatattt tcctctgttg 12720
 cagcttcttg tactcttttt gttgtgctgt ggttgccggg tccaatgcta cgtactgttt 12780
 ttggtttccg ctgggttaggg gcaatTTTTc tttcgaactc atgggtgaatt acacgggtgtg 12840
 tccaccttgc ctacccgac aagcagccgc tgaggctcct gaaccggga ggtctctttg 12900
 gtgcaggata gggcatgacc gatgtgggga ggacgatcac gacgaactgg ggttcatggg 12960
 tccgcctggc ctctccagcg aaagccactt gaccagtgtt tacgcctggg tggcgttcct 13020
 gtccttcagc tacacggccc agttccatcc cgagatattt gggataggga acgtgagtga 13080
 agtttatgtt gacatcaagc accaattcat ctgcgccgtt catgacgggc agaaccac 13140
 cttgcctcgc catgacaata tttcagccgt atttcagacc tactatcaac atcaggctga 13200
 cggcggcaat tggtttcacc tagaatgggt gcgtcccttc ttttcctctt ggttggtttt 13260
 aaatgtttcg tggtttctca ggcgttcgcc tgcaagccat gtttcagttc gagtctttca 13320
 gacatcaaaa ccaacactac cgcagcatca ggctttgttg tcctccagga catcagctgc 13380
 cttaggcatg gcgactcgtc ctttccgacg attcgcaaaa gctctcaatg ccgcacggcg 13440
 atagggacac ctgtgtatat caccatcaca gccaatgtga cagatgagaa ttacttacat 13500
 tcttctgatc tcctcatgct ttcttcttgc ctttctatg cttctgagat gaggtaaaag 13560
 ggattcaagg tggatatttg caatgtgtca ggcatcgtgg ctgtgtgtgt caactttacc 13620
 agctacgtcc aacatgtcaa agagtttact caacgctcct tgggtggcga tcatgtgcgg 13680
 ctgcttcatt tcatgacacc tgagaccatg aggtgggcaa ccgttttagc ctgtcttttt 13740

gccatcctac tggcaatttg aatgttcaag tatgttgggg aaatgcttga ccgctgggctg 13800
ttgctcgcga ttgctttctt tgtggtgtat cgtgccgttc tggtttgctg tgctcggcaa 13860
cgccaacagc agcagcagct ctcatctcca gttgatttat aacttgacgc tatgtgagct 13920
gaatggcaca gattggctgg cagaaaaatt tgattgggcg gtggagactt ttgtcatctt 13980
tcccgtgttg actcacattg tttcctattg tgcactcacc accagccatt tccttgacac 14040
agttggctctg gttactgtgt ccaccgccgg gttttatcac gggcgggtatg tcttgagtag 14100
catctacgcg gtctgtgctc tggctgcgtt gatttgcttc gttattaggc ttgcgaagaa 14160
ctgcatgtcc tggcgctact cttgtaccag atataccaac ttccttctgg acactaaggg 14220
cagactctat cgttggcggg cgcccggtat catagaaaaa aggggtaagg ttgaggtcga 14280
aggctcatctg atcgacctca aaagagtgtg gcttgatggg tccgtggcaa cccctttaac 14340
cagagtttca gcggaacaat ggggtcgtct ctagacgact tttgcatga tagcactgct 14400
ccacaaaagg tgcttttggc gttttccatt acctacacgc cagtaatgat atatgctcta 14460
aaggtaagtc gcggccgact gctagggctt ctgcacctt tgatctttct gaattgtgct 14520
tttaccttcg ggtacatgac attcgcgcac tttcagagca caaatagggt cgcgctcgct 14580
atgggagcag tagttgact tctttggggg gtgtactcag ccatagaaac ctggaaattc 14640
atcacctcca gatgccgttt gtgcttgcta ggccgcaagt acattctggc ccctgcccac 14700
cacgtcgaag gtgcccgagg ctttcatccg attgctggca atgataacca cgcatttgtc 14760
gtccggcgtc ccggctccat tacggttaac ggcacattgg tgcccgggtt gaaaagcctc 14820
gtgttgggtg gcagaaaagc tggttaaacag ggagtggtaa accttgtcaa atatgccaaa 14880
taacaacggc aagcagcaaa agaaaaagaa ggggaatggc cagccagtca accagctgtg 14940
ccagatgctg ggtaaaatca tcgccagca aaaccagtcc agaggcaagg gaccgggcaa 15000
gaaaagtaag aagaaaaacc cggagaagcc ccattttcct ctagcgaccg aagatgacgt 15060
caggcatcac ttcacccctg gtgagcggca attgtgtctg tcgtcgatcc agactgcctt 15120
taaccagggc gctggaactt gtaccctgtc agattcaggg aggataagtt aactgtgga 15180
gttttagtttg ccgacgcatc atactgtgcg cctgatccgc gtcacagcat caccctcagc 15240
atgatgggct ggcattcttt aggcacctca gtgtcagaat tggaagaatg tgtggtggat 15300
ggcactgatt gacattgtgc ctctaagtca cctattcaat tagggcgacc gtgtgggggt 15360
aaaatttaat tggcgagaac catgctggccg caattaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 15420

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

15450

<210> 17

<211> 2352

<212> ADN

<213> Virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn

<400> 17

```

cctatcattg aaccaacttt aggcctgaat tgaaatgaaa tggggtctat gcaaagcctt      60
tttgacaaaa ttggccaact tttcgtggat gctttcacgg agttcttggg gtccattggt      120
gatatcatta tatttttggc cattttgttt ggcttcacca tcgccggttg gctggtgggtc      180
ttttgcatca gattggtttg ctccgcgata ctccgtgcgc gccctgccat tcactctgag      240
caattacaga agatcctatg aggcctttct ttctcagtgc cagggtggaca ttcccacctg      300
gggaattaaa catccttttg ggatgctttg gcaccataag gtgtcaaccc tgattgatga      360
aatggtgtcg cgtcgaatgt accgcatcat ggaaaaagca ggacaggctg cctggaaaca      420
ggtggtgagc gaggctacgc tgtctcgcat tagtagtttg gatgtggtgg ctcactttca      480
gcatcttgcc gccattgaag ccgagacctg taaatatttg gcctctcggc tgcccatgct      540
acacaacctg cgcattgacag ggtcaaatgt aaccatagtg tataatagta ctttgaatca      600
ggtgcttgct attttccaa cccctggttc ccggccaaag cttcatgatt ttcagcaatg      660
gctaatagct gtacattcct ctatatattc ctctgttgca gcttcttgta ctctttttgt      720
tgtgtgtgtg ttgcgggttc caatgctacg tattgctttt ggtttccgct ggtaggggc      780
aatttttctt tcgaactcac agtgaactac acggtgtgtc caccttgccct caccggcaa      840
gcagccacag aggcctacga acctggcagg tctctttggg gcaggatagg gtatgatcgc      900
tgtggggagg acgatcatga tgaactaggg tttgtggtgc cgtctggcct ctccagcgaa      960
ggccacttga ccagtgttta cgcctggttg gcgttcctgt ctttcagtta cacagcccag     1020
ttccatcctg agatattcgg gatagggat gtgagtcaag tttatgttga catcaggcat     1080
caattcattt gcgccgttca cgacgggcag aacgccactt tgcctcgcca tgacaatatt     1140
tcagccgtgt tccagactta ttaccaacat caagtcgacg gcggcaattg gtttcaccta     1200
gaatggctgc gtcccttctt ttcctcttgg ttggttttaa atgtctcttg gtttctcagg     1260
cgttcgcctg caagccatgt ttcagttcga gtcttgacga cattaagacc aacaccaccg     1320
cagcggcagg ctttgctgtc ctccaagaca tcagttgcct taggtatcgc aactcggcct     1380

```

ctgaggcggtt tcgcaaaatc cctcagtgtc gtacggcgat agggacaccc atgtatatta 1440
 ctgtcacagc caatgtaacc gatgagaatt atttgcattc ctctgacctt ctcatgcttt 1500
 cttcttgctt tttctacgct tctgagatga gtgaaaaggg atttaaagt gtatttggca 1560
 atgtgtcagg catcgtggct gtgtgcgtca actttaccag ctacgtccaa catgtcaagg 1620
 aatttaccba acgctccttg gtagtcgacc atgtgcggct gctccatttc atgacacctg 1680
 agaccatgag gtgggcaact gttttagcct gtctttttgc cattctgttg gccatttgaa 1740
 tgtttaagta tgttggggaa atgcttgacc gcgggctatt gctcgtcatt gctttttttg 1800
 tgggtgtatcg tgccgtcttg gtttgttgcg ctgccagcg ccaacagcag caacagctct 1860
 catttacagt tgatttataa cttgacgcta tgtgagctga atggcacaga ttggtttagct 1920
 ggtgaatttg actgggcagt ggagtgtttt gtcatttttc ctgtgttgac tcacattgtc 1980
 tcctatgggtg ccctcaccac cagccatttc cttgacacag tcgggtctggt cactgtgtct 2040
 accgccggct tttccacagg gcggtatgtt ctgagtagca tctacgcggt ctgtgccctg 2100
 gctgcgttga tttgcttctg cattaggttt acgaagaatt gcatgtcctg gcgctactca 2160
 tgtaccagat ataccaactt tcttctggac actaagggca gactctatcg ttggcggtcg 2220
 cctgtcatca tagagaaaag gggtaaaagt gaggtcgaag gtcattctgat cgacctcaag 2280
 agagtgtgct ttgatgggtc cgcggcaacc cctataacca aagtttcagc ggagcaatgg 2340
 ggctgcctt ag 2352

<210> 18
 <211> 886
 <212> ADN
 <213> Virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn

<400> 18
 atgggggtcgt ccttagatga cttctgccat gatagcacgg ctccacaaaa ggtgcttttg 60
 gcgttctcta ttacctacac gccagtgatg atatatgccc taaaagtaag tcgcggccga 120
 ctgctagggc ttctgcacct tttgatcttc ctaaattgtg ctttcacctt cgggtacatg 180
 acattcgtgc actttcagag cacaacaag gtcgcgctca ctatgggagc agtagttgca 240
 ctcttttggg ggggtgtactc agccatagaa acctggaaat tcatcacctc cagatgccgt 300
 ttgtgcttgc taggccgcaa gtacattttg gcccctgccc accacgttga aagtgccgca 360
 ggctttcatc cgatagcggc aaatgataac cagcatttg tcgtccggcg tcccggctcc 420

actacggtta acggcacatt ggtgcccggg ttgaaaagcc tcgtgttggg tggcagaaaa	480
gctgtcaaac agggagtggg aaaccttggt aaatatgcca aataacaacg gcaagcagca	540
gaagaaaaag aagggggatg gccagccagt caatcagctg tgccagatgc tgggtaagat	600
catcgctcag caaaaccagt ccagaggcaa gggaccggga aagaaaaaca agaagaaaaa	660
cccggagaag ccccattttc ctctagcgac tgaagatgat gtcagacatc acttcacctc	720
tggtgagcgg caattgtgtc tgtcgtcaat ccagacagcc tttaatcaag gcgctggaac	780
ttgtaccctg tcagattcag ggaggataag ttacactgtg gagtttagtt tgccgacgca	840
tcatactgtg cgcctgatcc gcgtcacagc gtcaccctca gcatga	886