



(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)



1-0032101

(51)⁷ G01N 33/569; G01N 33/68

(13) B

(21) 1-2016-02236

(22) 18/12/2014

(86) PCT/EP2014/078373 18/12/2014

(87) WO 2015/091736 25/06/2015

(30) 13198615.0 19/12/2013 EP

(45) 25/05/2022 410

(43) 25/10/2016 343A

(73) INTERVET INTERNATIONAL B.V. (NL)

Wim de Koerverstraat 35, NL-5831 AN Boxmeer, Netherlands

(72) BRUDERER, Urs Peter (CH).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÁT HIỆN KHÁNG THỂ KHÁNG VIRUT GÂY DỊCH TẢ
LỢN CỒ ĐIỀN

(57) Sáng chế đề cập đến lĩnh vực chẩn đoán trong thú y, cụ thể là xét nghiệm để phát hiện kháng thể kháng CSFV. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện kháng thể kháng CSFV kiểu đại trong mẫu xét nghiệm, khác biệt ở chỗ phương pháp này bao gồm bước ủ đồng thời với chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của protein CSFV E2. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến kit xét nghiệm chẩn đoán, và sử dụng phương pháp theo sáng chế. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phân biệt giữa động vật bị nhiễm CSFV kiểu đại và động vật đã được chủng ngừa kháng CSFV bằng vacxin (đánh dấu) CSFV, và phương pháp kiểm soát bệnh nhiễm CSFV kiểu đại trong quần thể động vật là lợn, bằng cách sử dụng kết hợp vacxin CSFV (đánh dấu) và kit xét nghiệm chẩn đoán theo sáng chế.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực chẩn đoán trong thú y, cụ thể là xét nghiệm để phát hiện kháng thể kháng CSFV. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện kháng thể kháng CSFV kiểu đại trong mẫu xét nghiệm. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến bộ kit xét nghiệm chẩn đoán, và việc sử dụng phương pháp phát hiện kháng thể kháng CSFV kiểu đại. Ngoài ra sáng chế đề cập đến phương pháp phân biệt giữa động vật bị nhiễm CSFV kiểu đại và động vật đã được tiêm chủng kháng CSFV bằng vacxin CSFV, và phương pháp kiểm soát bệnh nhiễm CSFV kiểu đại trong quần thể động vật là lợn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các xét nghiệm khác nhau đã được biết đối với việc chẩn đoán huyết thanh bệnh nhiễm vi sinh vật, để xác định người hoặc động vật dương tính hay âm tính với vi sinh vật hoặc kháng thể kháng vi sinh vật này. Thông thường, các xét nghiệm này bao gồm các kỹ thuật để phát hiện phức hợp miễn dịch có thể đã được tạo thành, sử dụng kháng thể xác định để tạo ra tính đặc hiệu. Thông thường, xét nghiệm này cũng sẽ có bước khuếch đại cường độ tín hiệu, và một hoặc nhiều bước để rửa trôi thành phần không liên kết, không đặc hiệu hoặc không mong muốn. Việc phát hiện phức hợp miễn dịch có thể theo nhiều cách khác nhau như bằng phương pháp quang học thông qua việc phát hiện sự thay đổi màu, hiện tượng phát huỳnh quang, hoặc thay đổi về cỡ hạt, hoặc theo cách khác, thông qua việc phát hiện kháng nguyên hoặc kháng thể đã được đánh dấu phóng xạ trong phức hợp miễn dịch. Tương tự, dạng vật lý của xét nghiệm này có thể thay đổi nhiều và, ví dụ, có thể sử dụng đĩa vi phiếm, màng, que thăm, chip cảm biến sinh học, chất nền dạng gel, hoặc dung dịch chứa (vi) hạt mang như nhựa mủ, kim loại, hoặc polystyren, v.v..

Việc lựa chọn thiết lập cụ thể của xét nghiệm này thường được xác định theo loại mẫu đầu vào, độ nhạy xét nghiệm mong muốn (xác định chính xác mẫu dương tính), và tính đặc hiệu (phân biệt chính xác giữa mẫu dương tính thật và âm tính thật); các tính chất này phụ thuộc vào cường độ và thời gian đáp ứng miễn dịch, hoặc sự có mặt của vi sinh vật. Ngoài ra, các yêu cầu về khía cạnh kinh tế của xét nghiệm như khả năng áp

dụng của nó trên quy mô lớn và chi phí của nó có thể có tính quyết định đối với việc lựa chọn dạng xét nghiệm cụ thể.

Các xét nghiệm chẩn đoán đã được biết rõ là: thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, khuếch tán miễn dịch, huỳnh quang miễn dịch, kết tủa miễn dịch, sự ngưng kết, tan máu, trung hòa, và “thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym” hoặc ELISA. Đặc biệt đối với việc xét nghiệm quy mô lớn, việc tự động hóa xử lý dịch, đọc và xử lý kết quả, hoặc cả hai, có thể là bắt buộc. Điều này cũng có thể đòi hỏi thay thế dạng thử nghiệm truyền thống bằng dạng thử nghiệm nhỏ gọn hơn và hiện đại hơn như trong AlphaLISA™ (Perkin Elmer).

Các xét nghiệm chẩn đoán được sử dụng nhiều là thử nghiệm miễn dịch enzym, như ELISA. Các thử nghiệm này có thể dễ dàng mở rộng quy mô, và có thể rất nhạy. Ưu điểm khác là khoảng động học của các kết quả của nó vì các mẫu có thể được xét nghiệm trong khoảng pha loãng. Các kết quả được thể hiện bằng đơn vị hấp thụ tùy ý, thường nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2,5 đơn vị mật độ quang (optical density - OD), phụ thuộc vào các tính chất và các thông số cài đặt cho thiết bị kỹ thuật được dùng để đọc kết quả. Thông thường, các mẫu đối chứng dương tính và âm tính thích hợp được bao gồm, và mẫu thường xuyên nhất được xét nghiệm nhiều lần. Việc chuẩn hóa đạt được bằng cách đưa vào (khoảng pha loãng của) mẫu tham chiếu xác định, mẫu này cho phép so sánh điểm số nhất định với các giá trị đã cài đặt trước để nhằm xác định dương tính hoặc âm tính, và cho phép liên hệ với ý nghĩa sinh học, ví dụ: lượng kháng nguyên với hiệu lực, hoặc lượng kháng thể với mức bảo vệ miễn dịch

Nhiều biến thể của thử nghiệm ELISA đã được biết, nhưng thường sử dụng phương pháp cố định kháng nguyên hoặc kháng thể vào pha rắn, ví dụ giếng của đĩa vi phiếm. Khi kháng thể được cố định, thử nghiệm này được gọi là ELISA ‘bắt giữ’ hoặc ‘bánh kẹp’. Sau đó, mẫu xét nghiệm được thêm vào, cho phép phối tử (ví dụ, kháng nguyên hoặc kháng thể cần phát hiện) liên kết. Sau đó, phần tử phát hiện (kháng thể, kháng nguyên, hoặc thành phần liên kết khác) được thêm vào, phần tử này được liên hợp với chất đánh dấu, ví dụ với enzym có thể gây ra phản ứng tạo màu, mà có thể đọc được bằng máy quang phổ. Các loại chất đánh dấu khác có thể sử dụng hiện tượng phát quang, hiện tượng phát huỳnh quang, hoặc tính phóng xạ. Việc sử dụng phần tử phát hiện đã được đánh dấu nhằm mục đích khuếch đại cường độ tín hiệu để làm tăng độ

nhạy của xét nghiệm, tuy nhiên, nó cũng có thể đưa vào tín hiệu nền, làm giảm tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu.

Trong một biến thể của quy trình ELISA, tính đặc hiệu của thử nghiệm được cải thiện bằng cách đưa vào liên kết cạnh tranh, trong trường hợp này thử nghiệm được gọi là 'ELISA cạnh tranh', 'ức chế', 'can thiệp', hoặc 'phong bế'. Trong thử nghiệm này, thành phần trong mẫu xét nghiệm (kháng thể hoặc kháng nguyên) sẽ cạnh tranh với kháng thể/kháng nguyên phát hiện đã được đánh dấu để liên kết với phân tử (kháng nguyên hoặc kháng thể) đã được cố định trên pha rắn. Điều này làm giảm tín hiệu màu cực đại, là một cách rất nhạy để xác định sự có mặt hoặc đo nồng độ thành phần cạnh tranh. Kết quả có thể được thể hiện dưới dạng tỷ lệ phần trăm ức chế tín hiệu ELISA cực đại.

Do tính linh hoạt và độ nhạy của chúng, nên ELISA thường được sử dụng, ví dụ trong dịch tễ học, chương trình kiểm soát bệnh lây nhiễm, hoặc để xác nhận hiệu quả của chiến dịch chủng ngừa. Việc sử dụng ELISA này cũng mở rộng sang lĩnh vực chăm sóc sức khỏe động vật, ví dụ để theo dõi các biện pháp tiêu diệt và kiểm soát các bệnh nhiễm khuẩn thích hợp hơn. Quan trọng trong trường hợp này là mức độ nhạy và đặc hiệu thích hợp của xét nghiệm chẩn đoán, do sai sót trong vấn đề này có thể gây hậu quả nghiêm trọng theo một trong hai kiểu: trường hợp dương tính giả có thể gây ra sự cách ly hoặc chọn lọc động vật không cần thiết, và trường hợp âm tính giả có thể gây ra sự lan tràn mầm bệnh do vận chuyển động vật mang mầm bệnh không bị phát hiện qua biên giới. Một ví dụ về việc sử dụng ELISA này là trong việc kiểm soát bệnh phải khai báo OIE, như bệnh tả lợn cổ điển (classical swine fever - CSF) ở lợn.

CSF, còn được biết là bệnh tả lợn hoặc bệnh sốt lợn, là bệnh thường gây tử vong ở lợn, xuất hiện trên toàn thế giới. Nó được gây ra bởi virus gây dịch tả lợn cổ điển (classical swine fever virus - CSFV), còn được biết là virus gây bệnh tả lợn, có mức độ lây nhiễm cao. Bệnh này gây ra nhiều đau đớn cho động vật, và tổn thất kinh tế đáng kể đối với các lĩnh vực phụ thuộc vào việc chăn nuôi lợn thương mại và các sản phẩm của chúng.

CSFV thuộc họ Flaviviridae, và chi Pestivirus. Các virus Pestivirus khác đã được biết rõ là virus gây bệnh biên giới (border disease virus - BDV), gây nhiễm cho cừu và lợn, và virus gây bệnh tiêu chảy virus ở bò (bovine viral diarrhoea virus - BVDV), gây nhiễm cho gia súc, cừu và lợn. Mức bảo vệ chéo đáng kể xuất hiện giữa các virus có họ

hàng. Virion CSF tương đối nhỏ và có vỏ bọc, và chứa bộ gen virus ARN sợi đơn, dương, khoảng 12,3 kb. Bộ gen này được dịch mã thành một polyprotein lớn chứa khoảng 4000 axit amin, mà được tự tách bằng nhiều protein virus phi cấu trúc. Quá trình này tạo ra các glycoprotein vỏ bọc virus cấu trúc chính: Erns, E1 và E2. Để xem lại về virus và bệnh của nó, xem: Moennig (2000, *Vet. Microbiol.*, vol. 73, trang 93).

Tiêu chuẩn vàng để phát hiện kháng thể kháng CSFV là xét nghiệm trung hòa virus. Tuy nhiên vì khó khăn và vất vả, xét nghiệm kiểu ELISA được sử dụng để sàng lọc và phát hiện nhanh, và nhiều xét nghiệm thương mại là sẵn có để phát hiện kháng nguyên CSFV hoặc kháng thể CSFV. Các xét nghiệm này được đánh giá trong Blome et al. (2006, *Rev. Sci. Tech. (Int. Off. Epiz.)*, vol. 25, trang 1025). Xét nghiệm đối với kháng nguyên CSFV phát hiện virus nguyên vẹn hoặc các protein (vỏ bọc) của virus cụ thể, như Erns hoặc E2. Tương tự, xét nghiệm đối với kháng thể CSFV phát hiện kháng thể virus, E2 hoặc Erns. Việc phát hiện kháng thể ở động vật đích nhạy hơn so với phát hiện kháng nguyên hoặc virus, do kháng thể có mặt ở động vật trong thời gian dài hơn, tạo ra cửa sổ thời gian rộng hơn cho việc phát hiện. Ngoài ra, do phản ứng chéo giữa các virus Pestivirus, các xét nghiệm chẩn đoán đối với CSFV dựa trên sự phát hiện kháng nguyên hoặc kháng thể -Erns là không đáng tin cậy ở các vùng có tỷ lệ hiện hành của BVD và/hoặc BVDV cao. Do đó trọng tâm hiện nay đối với chẩn đoán CSFV là dựa trên sự phát hiện kháng thể kháng protein E2 của CSFV. Để xem lại: Schroeder et al. (2012, *Rev. Sci. Tech. (Int. Off. Epiz.)*, vol. 31, trang 997).

Protein CSFV E2 (trước đây được gọi là glycoprotein E1, hoặc gp51-54) được mã hóa từ vị trí axit amin (aa) 690 của polyprotein CSFV. Protein CSFV E2 thành thực có độ dài khoảng 370 aa, đó là độ dài không có trình tự tín hiệu đầu cùng N khoảng 22 aa mà chồng lên đầu cùng C của E1, nhưng bao gồm vùng xuyên màng đầu cùng C khoảng 40 aa (Ganges et al., 2005, *vaccine* vol. 23, p. 3741). Trên E2, miền A trội miễn dịch nằm giữa các vị trí axit amin 766 và 866 của polyprotein (van Rijn et al., 1993, *J. of Gen. Virol.*, vol. 74, p. 2053). Bên trong miền đó, một epitop tế bào B mạch thẳng đã được phát hiện ra là làm cho kháng thể trung hòa virus: epitop TAVSPTTLR (SEQ ID NO: 1). Epitop này nằm trong polyprotein CSFV ở các vị trí axit amin 829 - 837, tương ứng với aa 140-148 của trình tự aa E2, và được bảo tồn tốt trong các chủng CSFV, nhưng không phản ứng chéo với kháng thể BVDV hoặc BVD (Lin et al., 2000, *J. of Virol.*, vol. 74, p. 11619).

Nhiều xét nghiệm kháng thể E2 thương mại đã được phát triển sử dụng tính đặc hiệu của epitop này: PrioCHECK® CSFV Ab 2.0 (trước đây được đặt tên là Ceditest® CSFV 2.0) (đều là của: Prions AG, Schlieren-Zurich, Thụy Sĩ), và IDEXX CSFV Ab Test® (IDEXX Europe B.V., Hoofddorp, Hà Lan). Các xét nghiệm này là các xét nghiệm ELISA cạnh tranh sử dụng protein CSFV E2 được cố định. Khi kháng thể E2 bất kỳ có mặt trong mẫu xét nghiệm, chúng liên kết với CSFV E2 đã được cố định, và vì vậy cạnh tranh với kháng thể chỉ thị đã đánh dấu, là kháng thể đơn dòng được liên hợp enzym đặc hiệu với epitop TAVSPTTLR của CSFV E2 kiểu đại; kháng thể đơn dòng đã đánh dấu được dùng làm chỉ thị trong các bộ kit này được gọi là V2 (Prionics) hoặc A18 (IDEXX), và có tính đặc hiệu giống như kháng thể đơn dòng WH303 được sử dụng bởi Lin et al. (2000, nêu trên).

Vaccine kháng CSF là đã biết và đang được sử dụng thường xuyên ở các nước, mà tại đó CSFV là bệnh địa phương. Vì vaccine CSFV bất hoạt là không khả thi, từ nhiều năm nay các vaccine virus nhược độc sống đã được sử dụng; vaccine hiệu quả nhất là dựa trên chủng Trung Quốc hoặc chủng C. Vaccine này đã có hồ sơ theo dõi đáng tin cậy từ nhiều năm sử dụng, và cũng là vaccine nhược độc sống duy nhất được cấp phép ở Liên minh châu Âu, mặc dù chỉ là cho các vaccine khẩn cấp trong trường hợp bùng phát dịch CSF. Chương trình kiểm soát chính phủ đối với CSF (ví dụ, EU Council Directive 2001/89/EC) thường được hỗ trợ bởi hệ thống các hạn chế thương mại cấm vận chuyển lợn có huyết thanh dương tính với kháng thể kháng CSFV.

Tuy nhiên, một số nước có thể thường xuyên bị tái nhiễm từ nguồn CSFV tự nhiên ở lợn hoang dã và lợn rừng. Do đó, đôi khi dịch CSF vẫn xảy ra, và nhiều con lợn – cả bị nhiễm và không bị nhiễm - đều bị loại bỏ. Điều này gây ra nhiều mối quan tâm về đạo đức cũng như chi phí đáng kể. Ngoài ra, lợn được chủng ngừa khẩn cấp có thể không được xuất khẩu, do chúng đã có huyết thanh dương tính. Điều này gây ra sự quá đông ở các chuồng và tổn thất thêm về kinh tế.

Do đó, các nỗ lực tập trung vào việc phát triển vaccine mà cho phép “phân biệt huyết thanh của động vật bị nhiễm với động vật đã được chủng ngừa” hoặc: DIVA. Nguyên tắc cơ bản của loại xét nghiệm phân biệt này là việc chủng ngừa động vật đích bằng vaccine có chức năng ‘đánh dấu’ dương tính hoặc âm tính có thể được phân biệt về mặt huyết thanh với sự nhiễm vi sinh vật kiểu đại ở động vật. Ví dụ, vaccine đánh dấu có thể thiếu một hoặc nhiều kháng nguyên có mặt trong vi sinh vật kiểu đại. Sau đó đích bị

nhễm sẽ trở nên dương tính huyết thanh với kháng nguyên đó trong khi các động vật chủng ngừa vẫn âm tính huyết thanh với kháng nguyên đó.

Một nhóm vaccin DIVA đã được phát triển để sử dụng kháng lại CSF dựa trên tiểu đơn vị virus như E2 và/hoặc Erns. Tuy nhiên các vaccin này bảo vệ kém hơn, và có sự khởi phát tính miễn dịch chậm hơn so với vaccin virus nguyên vẹn.

Ngoài ra, trong phác đồ không chủng ngừa và dập dịch CSFV, cách duy nhất vaccin đánh dấu CSFV này được cho phép trên thị trường là kết hợp với xét nghiệm chẩn đoán đi kèm đáng tin cậy.

Trong nỗ lực kết hợp vào một vaccin tác dụng bảo vệ mạnh và sớm, cũng như khả năng DIVA, vaccin CSFV nhược độc sống chủng C hiện hành được biến đổi bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp bởi Kortekaas et al. (2010, J. of Virol. (2010, J. of Virol. Methods, vol. 163, p. 175), nhờ đó chúng tập trung vào epitop TAVSPTTLR trong miền A của protein CSFV E2. Một số axit amin trong epitop này được gây đột biến hoặc được loại bỏ, sau đó virus CSFV đột biến được đưa vào quá trình tiến hóa virus cưỡng ép. Thu được các virus đột biến sống được có các đột biến khác nhau của epitop TAVSPTTLR.

Trong một loạt vFlc-ΔPT của các thể đột biến CSFV chủng C của E2, một thể đột biến được chọn để tiếp tục nghiên cứu, được đặt tên: vFlc-ΔPTa1. Virus này có phiên bản đột biến của epitop TAVSPTTLR của E2, bằng cách thay thế một, và làm mất hai axit amin, epitop tương ứng với epitop TAVSPTTLR gốc sau đó trở thành: TAGSTLRTE (SEQ ID NO: 2). Virus đột biến này thể hiện khả năng sống tốt, và gây ra đáp ứng kháng thể mạnh kháng lại E2. Ngoài ra, kháng thể thử kháng E2 đột biến không còn nhận biết E2 kiểu đại của virus chủng C bố mẹ. Do đó nó được coi là ứng viên lý tưởng cho vaccin đánh dấu CSFV sống hữu hiệu cho phép DIVA

Virus đột biến vFlc-ΔPTa1 sau đó được kiểm tra về hiệu quả vaccin trong động vật đích (Kortekaas et al., 2011, Vet. Microbiol., vol. 147, p. 11), tại đó nó đã được phát hiện ra là tạo ra mức độ bảo vệ gần với của chủng mẹ, và ngăn ngừa hiệu quả sự thải virus gây nhiễm. Tuy nhiên, các tác giả sáng chế thất vọng khi thấy rằng huyết thanh từ lợn được chủng ngừa bằng virus đột biến này không thể phân biệt được một cách rõ ràng với huyết thanh từ lợn được chủng ngừa bằng virus chủng C bố mẹ. Điều này là do virus đột biến E2 cảm ứng ở lợn các kháng thể cho điểm dương tính giả cường độ trung gian đến hoàn toàn trong E2 ELISA. Do đó không thể đưa ra thị trường vaccin đánh dấu DIVA mới, vì thiếu xét nghiệm kháng thể CSFV có khả năng phân biệt đáng tin cậy.

Khi cố gắng khắc phục các điểm dương tính giả trong E2 ELISA trên mẫu huyết thanh từ lợn được chủng ngừa bằng vacxin đánh dấu, Kortekaas và cộng sự (2011, nêu trên) đã xem xét một số sửa đổi đối với ELISA, như: biến đổi các peptit được sử dụng bằng cách sử dụng dự đoán cấu trúc bậc ba; sử dụng kháng thể đơn dòng mới cho phép phân biệt tốt hơn; thay đổi ELISA sử dụng các kháng thể phong bế khác nhau, do điều này đã chứng minh hiệu quả đối với các thử nghiệm khác (Holinka et al., 2009, *Virology*, vol. 384, p. 106); và: thay đổi giá trị ngưỡng cho kết quả đọc được, trong khi vẫn giữ được độ nhạy chấp nhận được. Tất cả các phương pháp này đều được phát hiện là không có hiệu quả khắc phục hiện tượng dương tính giả.

Như được chỉ ra, các kết quả của Holinka và cộng sự (2009, nêu trên) không thể hiện các kết quả dương tính giả trong E2 ELISA tương tự, khi xét nghiệm huyết thanh từ lợn đã được chủng ngừa bằng yếu tố đánh dấu CSF tái tổ hợp khác. Tuy nhiên các kết quả của họ không thể được xem là có ý nghĩa: một mặt vì họ xét nghiệm gộp mà không phải từng mẫu huyết thanh, và mặt khác vì kết quả đọc của họ nằm trong khoảng phát hiện dưới cùng (nằm trong khoảng từ 0,100 đến 0,350 đơn vị OD; xem Holinka et al., 2009, nêu trên; Fig. 3A), tại đó tỷ lệ tín hiệu so với nhiễu quá bất lợi để tạo cơ sở cho xét nghiệm chẩn đoán quy mô lớn đáng tin cậy.

Ví dụ tốt hơn là công bố bởi Reimann và cộng sự (2010, *Vet. Microbiol.*, vol. 142, p. 45), những người đã tạo ra vacxin CSF tái tổ hợp giống của Holinka et al., bằng cách thay thế epitop TAVSPTTLR từ CSFV E2 bằng trình tự tương ứng từ BVDV E2. Phù hợp với các kết quả của Kortekaas và cộng sự (2011, nêu trên), Reimann và cộng sự cũng đã phát hiện ra các kháng thể phản ứng chéo trong huyết thanh của lợn được chủng ngừa bằng virus E2 đột biến của chúng, liên kết với epitop E2 không được biến đổi. Vì vậy cũng trong trường hợp này, điểm dương tính giả thu được, và xét nghiệm DIVA không thể được phát triển. Để giải quyết vấn đề này, Reimann và cộng sự đề nghị điều chỉnh thích hợp các giá trị ngưỡng đánh đổi với độ nhạy, hoặc biến đổi trình tự khung virus đột biến để làm giảm điểm dương tính giả.

Vì vậy, các đột biến khác nhau đối với epitop TAVSPTTLR đã được phát hiện ra là gây ra các vấn đề giống nhau đối với vacxin đánh dấu CSFV dựa trên epitop đột biến này: trong trường hợp vacxin CSFV dựa trên virus vFlc- Δ PTa1, các đột biến đối với epitop TAVSPTTLR làm thay đổi 6 trong số 9 axit amin trong locut đó. Tương tự,

với Reimann et al. (2010, nêu trên), (2010, nêu trên), thử nghiệm 5 axit amin khác nhau trong số 9 axit amin ở locut tương ứng của protein E2, vấn đề này cũng xảy ra.

Do đó, vấn đề về điểm dương tính giả ở ELISA đối với kháng thể CSFV E2 kiểu đại trong huyết thanh thu được từ động vật được chủng ngừa bằng vaccin (đánh dấu) CSFV chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của protein CSFV E2, do đó có bản chất chung, và cho đến hôm nay, vẫn chưa được khắc phục. Trong đánh giá gần đây về các ứng viên vaccin CSF, Eblé và cộng sự (2013, Vet. Microbiol., vol. 162, p. 437) xác nhận tình trạng này, đối với CSFV, sự kết hợp tối ưu của vaccin CSFV và xét nghiệm DIVA tương ứng vẫn chưa sẵn có.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó mục tiêu của sáng chế là khắc phục các nhược điểm của giải pháp đã biết, và đáp ứng nhu cầu trong lĩnh vực bằng cách làm giảm các kết quả dương tính giả trong các xét nghiệm chẩn đoán đối với kháng thể kháng CSFV kiểu đại, khi thử nghiệm các mẫu từ động vật đã được chủng ngừa bằng vaccin CSFV có đột biến trong epitop TAVSPTTLR của CSFV E2.

Bất ngờ phát hiện ra là mục tiêu này có thể đạt được, và do đó có thể khắc phục các nhược điểm của giải pháp đã biết, bằng xét nghiệm chẩn đoán được cải tiến cho kháng thể CSFV kiểu đại, mà cho phép DIVA. Sự cải tiến này liên quan đến biến đổi bước ủ trong xét nghiệm chẩn đoán đối với kháng thể CSFV E2 kiểu đại, trong đó mẫu xét nghiệm được ủ với chất mang đã được cố định chứa epitop TAVSPTTLR của CSFV E2, và bây giờ bao gồm ủ đồng thời với chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2. Biến đổi này được phát hiện ra là làm giảm hoàn toàn các kết quả dương tính giả, chỉ bằng một biến đổi giới hạn với quy trình của xét nghiệm chẩn đoán hiện nay đối với kháng thể CSFV E2.

Phương pháp chẩn đoán được biến đổi này có nhiều hiệu quả có lợi: hiệu quả chính là biến đổi này có thể được kết hợp toàn bộ vào quy trình xét nghiệm hiện nay. Do đó, bước ủ bổ sung là không cần thiết, và phương pháp xét nghiệm được cải tiến này không cần nhiều thời gian hơn so với trước đây. Đây là ưu điểm đáng kể khi xem xét số lượng rất lớn mẫu xét nghiệm tiềm năng có thể cần được xét nghiệm trong thời gian ngắn, ví dụ, khi có dịch CSF bùng phát trong một khu vực.

Ngoài ra hiện không còn cần tạo ra các thay đổi mạnh mẽ đối với vacxin CSFV tương ứng hoặc đối với xét nghiệm chẩn đoán gốc. Ngược lại, hiện có thể sử dụng thiết lập cơ bản của CSFV E2 ELISA hiện nay để phát hiện kháng thể CSFV E2 kiểu đại trong các mẫu từ động vật được chủng ngừa bằng vacxin CSFV. Điều này cho phép dựa vào các xét nghiệm chẩn đoán CSFV đã được thiết lập với độ tin cậy đã được chứng minh của chúng, và các hồ sơ về tính đặc hiệu và độ nhạy đã được xây dựng tốt.

Với biến đổi này, xét nghiệm chẩn đoán CSFV hiện nay có thể được dùng để phân biệt hiệu quả giữa động vật bị nhiễm và được chủng ngừa, và vì vậy sáng chế đề xuất xét nghiệm chẩn đoán được cải tiến cho CSFV kiểu đại, cho phép sàng lọc DIVA, và có thể được dùng làm chẩn đoán đi kèm cho vacxin (đánh dấu) CSFV, để kiểm soát sự xuất hiện CSFV trong quần thể động vật dễ bị nhiễm bệnh.

Bước quan trọng đối với các hiệu quả có lợi này là việc xác định bởi tác giả sáng chế về nguyên nhân thất bại trong việc phân biệt giữa được chủng ngừa kháng CSFV với bị nhiễm CSFV kiểu đại, hoặc vacxin chủng C.

Nguyên nhân này đã được phát hiện ra là vacxin (đánh dấu) CSFV chứa E2 có epitop TAVSPTTLR đột biến, cảm ứng các kháng thể mà có thể liên kết đặc hiệu không chỉ với epitop E2 đột biến của vacxin, mà còn liên kết— và với ái lực cao tương đương — với epitop TAVSPTTLR không được biến đổi của E2 ở CSFV kiểu đại, và ở vacxin chủng C. Điều này gây ra điểm dương tính giả khi xét nghiệm các mẫu huyết thanh của động vật được chủng ngừa về tình trạng nhiễm CSFV kiểu đại. Ngược lại, các kháng thể sinh ra do nhiễm CSFV kiểu đại, hoặc chủng ngừa bằng vacxin chủng C, hoặc kháng thể đơn dòng kháng epitop TAVSPTTLR E2 kiểu đại (ví dụ: V2 (Prionics), A18 (IDEXX), hoặc WH303 (Lin et al., 2000, nêu trên)) được phát hiện ra là không có ái lực đáng kể đối với protein E2 có epitop TAVSPTTLR đột biến của vacxin CSFV. Đó là lý do tại sao việc ủ đồng thời với chất mang chứa epitop TAVSPTTLR của protein CSFV E2 kiểu đại đã không giải quyết được vấn đề về điểm dương tính giả đối với vacxin có epitop TAVSPTTLR đột biến.

Hiện nay vẫn chưa biết tại sao hiện tượng này xảy ra và xảy ra như thế nào. Tuy nhiên, không bị ràng buộc vào lý thuyết hoặc mô hình bất kỳ giải thích các quan sát này, tác giả sáng chế suy đoán là có ảnh hưởng của dạng ba chiều của epitop TAVSPTTLR của CSFV E2; dạng 3D này bị thay đổi khi gây đột biến trình tự axit amin mạch thẳng của nó. Điều này cảm ứng các kháng thể kháng epitop E2 đột biến, các kháng thể này

rõ ràng vẫn có thể liên kết đặc hiệu với epitop TAVSPTTLR kiểu đại của CSFV E2. Các kháng thể này có phản ứng chéo trong xét nghiệm chẩn đoán dựa trên protein CSFV E2 kiểu đại, gây ra điểm dương tính giả đặc biệt cao.

Xem xét nguyên nhân của vấn đề điểm xét nghiệm dương tính giả, tác giả sáng chế đã tìm thấy một cách thức bất ngờ để giải quyết vấn đề này, và có thể đưa giải pháp vào một bước của quy trình của xét nghiệm chẩn đoán E2 đã được thiết lập: bước ủ mẫu xét nghiệm với chất mang đã được cố định chứa epitop TAVSPTTLR của protein CSFV E2, và ngoài ra: ủ đồng thời với chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của protein CSFV E2. Việc này đã giải quyết được vấn đề về điểm dương tính giả.

Việc biến đổi phương pháp chẩn đoán có thể dưới hình thức ủ đồng thời là bất ngờ, vì quy trình này thường được cho là phá vỡ sự liên kết đúng và hoàn toàn của kháng thể CSFV E2 trong mẫu xét nghiệm với chất mang được giữ cố định chứa epitop TAVSPTTLR của CSFV E2, và do đó thường không được xem xét bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Do đó theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện kháng thể kháng virus gây dịch tả lợn cổ điển (classical swine fever virus - CSFV) kiểu đại trong mẫu xét nghiệm, theo đó mẫu này cũng có thể chứa kháng thể kháng epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2, phương pháp này bao gồm bước ủ mẫu xét nghiệm này với chất mang đã được cố định chứa epitop TAVSPTTLR của CSFV E2, khác biệt ở chỗ phương pháp này bao gồm việc ủ đồng thời trong bước này với chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1:

Các kết quả phân tích bằng cách ELISA phong bế đối với kháng thể CSFV E2 trong các mẫu được mô tả bởi Kortekaas et al., 2011 (nêu trên): được so sánh là các phân tích bằng xét nghiệm thương mại tiêu chuẩn, và phân tích bằng phương pháp theo sáng chế.

Đường nét đứt biểu diễn các kết quả từ các mẫu của lợn được chủng ngừa bằng vaccin CSFV chủng C, các mẫu 'CS'; đường nét liền biểu diễn các kết quả từ các mẫu của lợn được chủng ngừa bằng vaccin đánh dấu dựa trên virus vFlc-ΔPTa1, các mẫu 'VS'.

Thanh màu xám nằm ngang thể hiện số điểm ngưỡng trong các xét nghiệm khác nhau, để giải thích các mẫu là dương tính, nghi ngờ, hoặc âm tính với kháng thể CSFV E2 kiểu đại.

Fig. 1A: Các kết quả so sánh: là sự sao chép Fig. 4A từ Kortekaas et al., 2011 (nêu trên). E2 ELISA được dùng là PrioCHECK® CSFV Ab 2.0 (Prionics).

Fig. 1B: Các kết quả xét nghiệm lại của các mẫu từ Kortekaas et al., 2011 (nêu trên), sử dụng E2 ELISA thương mại khác, IDEXX CSFV Ab Test® (IDEXX).

Fig. 1C: Các kết quả xét nghiệm lại của các mẫu từ Kortekaas et al., 2011 (nêu trên) sử dụng phương pháp phát hiện theo sáng chế: việc ủ đồng thời được đưa vào một bước của IDEXX CSFV Ab Test.

Fig. 2:

Các kết quả từ phân tích kháng thể CSFV trên 400 mẫu hiện trường âm tính. Xét nghiệm được tiến hành theo quy trình với IDEXX CSFV Ab Test® (IDEXX), với biến đổi là ủ đồng thời trong phương pháp theo sáng chế. Các kết quả được thể hiện bằng giá trị trung bình của tỷ lệ phần trăm ức chế ELISA được phát hiện trên mỗi đĩa vi phiếm, với kết quả cho tất cả các mẫu được kết hợp, và một kết quả cho tất cả các đĩa đã kết hợp. Các trị số cao nhất và thấp nhất được biểu thị bằng hình kim cương đen, được nổi bằng thanh màu đen, và giá trị trung bình bằng hình kim cương màu ghi.

Fig. 3:

Các kết quả phân tích của hơn 400 mẫu từ lợn bị gây nhiễm thực nghiệm bằng CSFV, và được lấy mẫu ở 2, 3, hoặc 4 tuần sau khi chủng ngừa. Không phải từ mọi động vật, có sẵn ba mẫu. Phương pháp phát hiện hoặc là phương pháp theo sáng chế, được thể hiện bằng ‘Inv.’; hoặc là ELISA thương mại (IDEXX CSFV Ab Test), được thể hiện bằng ‘Comm.’. Các phân loại: âm tính, nghi ngờ, và dương tính là dựa vào tỷ lệ phần trăm ức chế ELISA đo được, và được gán theo chương trình tính điểm của ELISA thương mại, tương ứng là ức chế ELISA ít hơn 30%, 30-40%, hoặc cao hơn 40%.

Mô tả chi tiết sáng chế

“Phương pháp phát hiện” theo sáng chế là phương pháp in vitro, được áp dụng cho mẫu xét nghiệm, để xác định trị số hoặc tính chất (thường được gọi là ‘yếu tố đánh dấu sinh học’) của mẫu xét nghiệm, sau đó kết quả của xét nghiệm có thể được diễn giải để cho ý nghĩa nhất định với kết quả của nó. Sự diễn giải này là dựa trên việc so sánh

kết quả thu được cho mẫu xét nghiệm sử dụng phương pháp này, với trị số tham chiếu hoặc của phép đo trước đây, và chứng minh trị số đo được là có hay vắng mặt, hoặc tăng hay giảm.

Theo sáng chế, trị số đo được là sự có mặt định tính và định lượng của kháng thể đặc hiệu với epitop TAVSPTTLR của protein CSFV E2 kiểu đại.

Phương pháp theo sáng chế có thể là xét nghiệm chẩn đoán ở một trong các dạng đã biết rõ khác nhau, ví dụ như: thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, thử nghiệm khuếch tán miễn dịch, thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch, thử nghiệm kết tủa miễn dịch, thử nghiệm ngưng kết, thử nghiệm tan máu, thử nghiệm trung hòa, “thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym” (enzyme-linked immune-sorbent assay - ELISA), hoặc AlphaLISA™.

Một số tài liệu mô tả các xét nghiệm chẩn đoán khác nhau sẵn có và các tính chất đặc hiệu của chúng; ví dụ: J. Huebner: Antibody-antigen interactions and measurements of immunologic reactions (Chương 9 trong: Pier, Lyczak và Wetzler (eds): Immunology, infection, and immunity, ASM Press, Washington D.C., 2004, ISBN: 1555812465, trang 207–232); ‘Antibodies: A Laboratory Manual’ (eds.: Harlow và Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988, ISBN-10: 0879693142); và: ‘Immunoassays: A Practical Approach’ (J. P. Gosling edt., Oxford University press, 2000, ISBN-10: 0199637105).

Rất nhiều công ty thương mại có thể cung cấp vật liệu và chất phản ứng cho xét nghiệm chẩn đoán, hoặc bộ kit chẩn đoán đầy đủ, hoặc có thể cung cấp dịch vụ thí nghiệm và phân tích.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ có khả năng tạo ra và tối ưu hóa quy trình, vật liệu, và các điều kiện cho phương pháp theo sáng chế.

Như cũng đã được biết trong lĩnh vực này, “kháng thể” là các protein globulin miễn dịch, và thường là tồn tại ở 5 nhóm. Đối với mẫu xét nghiệm, các kháng thể thường sẽ thuộc loại IgG hoặc IgM, và là kháng thể nguyên vẹn. Tuy nhiên, các kháng thể khác có thể được sử dụng làm chất phản ứng trong phương pháp theo sáng chế, ví dụ như làm kháng thể thứ cấp, hoặc làm kháng thể được đánh dấu, không cần phải là globulin miễn dịch nguyên vẹn, ví dụ kháng thể chuỗi đơn, hoặc một phần của globulin miễn dịch; và cũng có thể ở dạng khác: cấu trúc (tổng hợp) của các phần này, miễn là các phần kháng thể vẫn chứa vị trí liên kết kháng nguyên. Các đoạn con đã được biết rõ của globulin

miễn dịch là: đoạn Fab, Fv, scFv, dAb, hoặc Fd, miền Vh, hoặc các multime của các đoạn hoặc miền này.

Kháng thể để sử dụng làm chất phản ứng trong các xét nghiệm chẩn đoán thường được sản xuất bằng cách gây miễn dịch (quá mức) động vật cho bằng kháng nguyên đích, và thu gom kháng thể được sản sinh từ huyết thanh của động vật này. Các động vật cho đã được biết rõ là thỏ và dê. Ví dụ khác là gà con mà có thể sản sinh nồng độ cao kháng thể trong lòng đỏ trứng, được gọi là IgY. Theo cách khác, kháng thể có thể được sản xuất in vitro, ví dụ bằng công nghệ kháng thể đơn dòng đã được biết rõ từ các môi trường nuôi cấy tế bào lympho B đã được làm bất tử (tế bào lai), và các hệ thống sản xuất quy mô công nghiệp đã được biết đối với các kháng thể này. Kháng thể hoặc đoạn của nó cũng có thể được biểu hiện tự thân trong hệ biểu hiện tái tổ hợp, thông qua sự biểu hiện của các gen chuỗi nặng và/hoặc nhẹ Ig đã tách dòng. Tất cả các kỹ thuật này đã được biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực.

Theo sáng chế và trong toàn bộ bản mô tả này, kháng thể sẽ được gọi theo đích mà chúng kháng lại; ví dụ: kháng thể kháng CSFV được gọi là ‘kháng thể CSFV’, và ‘kháng thể E2’ là các kháng thể kháng protein E2 còn được gọi là kháng thể kháng E2, v.v.

Như đã được biết trong lĩnh vực này, kháng thể “kháng” lại đích nhất định là kháng thể đặc hiệu với epitop trên đích đó, do đó đích là phân tử hoặc thực thể cụ thể. Kháng thể (hoặc đoạn của kháng thể này) là đặc hiệu với epitop nếu nó có khả năng liên kết chọn lọc với epitop đó.

Dù sự tương tác giữa kháng thể và đích là đặc hiệu và/hoặc chọn lọc hay không, có thể dễ dàng được đánh giá bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ, tính đặc hiệu của các kết quả của thử nghiệm miễn dịch dựa trên tác dụng ức chế có thể được xác định bằng cách thể hiện tác dụng ức chế tương quan với nồng độ kháng nguyên hoặc kháng thể được dùng trong thử nghiệm này. Bằng cách sử dụng, ví dụ, thử nghiệm liên kết cạnh tranh, có thể xác định được cần có bao nhiêu kháng nguyên để ức chế 50% kháng thể liên kết với kháng nguyên được phủ này (Bruderer et al., 1990, J. of Imm. Meth., vol. 133, p. 263). Ví dụ về trường hợp này: sử dụng protein CSFV E2 kiểu đại, và kháng thể (đơn dòng) đặc hiệu epitop TAVSPTLLR.

Rất thích hợp trong trường hợp xét nghiệm miễn dịch chẩn đoán, là khi kháng thể thể hiện khả năng liên kết dương tính giả, dẫn đến các kết quả dương tính giả của xét

nghiệm chẩn đoán này. Điều này có thể do khả năng liên kết tương đối mạnh với epitop khác với epitop mà kháng thể được tạo ra để kháng lại, hoặc do khả năng liên kết đặc hiệu với epitop khởi nguồn của nó, nhưng lại nằm trên đích khác so với đích khởi nguồn.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật thử nghiệm miễn dịch sẽ biết cách để phân biệt các kết quả dương tính thật và giả, ví dụ bằng cách xác nhận kết quả với một loại xét nghiệm chẩn đoán khác, hoặc xác nhận kết quả với mẫu xét nghiệm từ thời điểm khác.

Bằng phương pháp theo sáng chế, sự giảm đáng kể điểm dương tính giả có thể đạt được khi thử nghiệm với kháng thể kháng protein E2 của CSFV kiểu đại. Như đã nêu và được minh họa trong bản mô tả này, sự giảm điểm dương tính giả đã đạt tới 5 lần (ví dụ, từ tác dụng ức chế ELISA hơn 50%, xuống ức chế nhỏ hơn 10%), và làm giảm đến 100% số lượng động vật được coi là dương tính CSFV một cách không chính xác.

Trong các xét nghiệm khác nhau sử dụng phương pháp theo sáng chế, tất cả huyết thanh từ lợn bị nhiễm CSFV kiểu đại đã đủ điều kiện là dương tính, dựa trên các kết quả xét nghiệm, từ khoảng 3 tuần sau nhiễm, trong khi không có huyết thanh nào từ động vật được chủng ngừa nhắc lại bằng vaccin dựa trên vFlc- Δ PTa1 trở nên dương tính sau khi chủng ngừa lần thứ ba, cho đến khi đo ở thời điểm cuối cùng.

Phương pháp theo sáng chế cũng được xét nghiệm trên số lượng lớn khoảng 900 mẫu xét nghiệm từ bộ sưu tập của Viện thú y trung ương (Lelystad, Hà Lan), chứa kháng thể CSFV cao, thấp, âm tính, hoặc nghi ngờ, cũng như nhiều huyết thanh chứa kháng thể BVD hoặc BVDV, và thậm chí một số trường hợp nhiễm kết hợp của CSFV, BVD, và/hoặc BVDV. Bằng phương pháp theo sáng chế, gần như toàn bộ các mẫu có thể được xác định chính xác, với tính đặc hiệu và độ nhạy tốt, xem các ví dụ sau đây.

Thực tế là, khi xét nghiệm tập hợp 900 mẫu, độ nhạy tăng được quan sát thấy cho thậm chí hầu hết các mẫu được xét nghiệm khi áp dụng ử đồng thời với phương pháp theo sáng chế. Điều này có nghĩa là tỷ lệ phần trăm ức chế quan sát được trong ELISA phong bế đối với kháng thể CSFV E2 kiểu đại là cao hơn đối với một số mẫu khi áp dụng phương pháp theo sáng chế, so với việc áp dụng ELISA phong bế kháng thể CSFV E2 thương mại tiêu chuẩn. Việc này dẫn đến 5 mẫu trước đó đã được chỉ ra là nghi ngờ bây giờ được đánh giá dương tính, và hai mẫu âm tính trước đó bây giờ được đánh giá là nghi ngờ (xem ví dụ 2.3, và bảng 2).

Theo sáng chế virus gây dịch tả lợn cổ điển “kiểu đại” dùng để chỉ CSFV vì nó xảy ra trong tự nhiên. Điều này không có nghĩa là tất cả CSFV kiểu đại này đều giống nhau, vì nhiều biến đổi trong thành phần gen và các đặc điểm sinh học có thể hiểu được hoặc đã được biết đến. Tuy nhiên, thuật ngữ này dự định loại trừ để sử dụng theo sáng chế, các CSFV là kết quả của sự can thiệp của con người, như bằng cách biến đổi, hoặc gây đột biến, ví dụ bằng cách cấy chuyển lặp lại hoặc bằng cách làm thích ứng axit nucleic của nó bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp.

Theo sáng chế “virus gây dịch tả lợn cổ điển” hoặc “CSFV” thường đề cập đến các virus thuộc chi phân loại Pestivirus, có các đặc điểm đã được biết rõ của CSFV. Nó cũng bao gồm CSFV được phân loại thêm từ đó theo cách bất kỳ, ví dụ như phân loài, chủng, thể phân lập, kiểu gen, kiểu huyết thanh, huyết thanh hình, nhóm huyết thanh, biến thể, hoặc kiểu phụ và tương tự. CSFV này có chung các đặc điểm đặc trưng của các thành viên thuộc họ phân loại của chúng như đặc trưng bộ gen, đặc trưng cơ thể, đặc trưng hiển vi điện tử, và các đặc trưng về sinh hóa, cũng như đặc trưng sinh học như sinh lý, miễn dịch, hoặc tập tính gây bệnh. Bên cạnh phân loại huyết thanh, các phương pháp xác định khác có thể dựa trên thử nghiệm giải trình tự nucleotit hoặc PCR, như đã biết trong lĩnh vực.

Đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này là mặc dù loài virus mà là đối tượng của sáng chế hiện đang được đặt tên là CSFV, đây là phân loại có thể bị thay đổi vì nhận thức mới dẫn đến phân loại lại thành nhóm phân loại mới hoặc khác. Tuy nhiên, vì điều này không làm thay đổi vi sinh vật liên quan hoặc các đặc điểm đặc trưng của nó, mà chỉ tên khoa học hoặc phân loại của nó thay đổi, các sinh vật được phân loại lại này vẫn nằm trong phạm vi sáng chế.

Về nguyên tắc, “mẫu xét nghiệm” để sử dụng trong phương pháp theo sáng chế có thể là loại mẫu chứa kháng thể bất kỳ, ví dụ mẫu huyết tương hoặc huyết thanh được tạo ra từ mẫu máu toàn phần của động vật. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết rõ các kỹ thuật và vật liệu cần thiết để thu được và tạo ra mẫu huyết tương hoặc huyết thanh này từ động vật.

Được ưu tiên là mẫu huyết thanh, do sạch hơn, và có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật phòng thí nghiệm tiêu chuẩn, ví dụ bao gồm các bước: đông tụ, ly tâm, và bất hoạt bổ thể.

Tùy ý mẫu xét nghiệm có thể được xử lý hoặc tinh chế thêm, ví dụ, để cải thiện cường độ tín hiệu, hoặc để làm giảm tín hiệu nền. Ví dụ kháng thể có thể được tách ra. Các kỹ thuật đã được biết rõ để tinh chế kháng thể là, ví dụ, kết tủa các kháng thể này bằng cách sử dụng axit caprilic, hoặc amoni sulphat, hoặc sử dụng kỹ thuật sắc ký ái lực.

Theo sáng chế, thuật ngữ “bao gồm” (cũng như các biến đổi về ngữ pháp của nó) như được sử dụng trong bản mô tả, dùng để chỉ tất cả các phần tử, và trong sự kết hợp có thể bất kỳ có thể hiểu được theo sáng chế, được bao hàm bởi hoặc bao gồm trong phần mô tả, đoạn văn, điểm, v.v., mà trong đó thuật ngữ này được sử dụng, ngay cả khi các phần tử hoặc các kết hợp này không được nêu rõ ràng; và không đề cập đến việc loại trừ (các) phần tử hoặc kết hợp bất kỳ trong số này. Do đó, phần mô tả, đoạn văn, điểm bất kỳ, v.v. cũng có thể đề cập đến một hoặc nhiều phương án trong đó thuật ngữ “bao gồm” (hoặc các biến đổi của nó) được thay thế bằng thuật ngữ như “gồm” hoặc “chủ yếu gồm”.

“Epitop TAVSPTTLR của CSFV E2” đề cập đến epitop đã được biết rõ trong miền A của protein CSFV E2 có tên gọi đó, và là epitop mạch thẳng dài 9 axit amin. Sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này là tên gọi “TAVSPTTLR” được đặt cho epitop này chính là trình tự axit amin của epitop này khi được thể hiện theo mã IUPAC một chữ cái tiêu chuẩn, trong đó Threonin được đặt là T, Alanin là A, v.v.

Epitop TAVSPTTLR của CSFV E2 được bảo tồn trong CSFV kiểu đại (Lin et al., 2000, nêu trên), và trình tự axit amin của nó được trình bày trong bản mô tả là SEQ ID NO: 1.

Theo sáng chế, epitop TAVSPTTLR “đột biến” của CSFV E2, có trình tự axit amin của nó khác biệt ở ít nhất một vị trí so với SEQ ID NO: 1. Đột biến này có thể bao gồm một hoặc nhiều thay đổi, và có thể là đột biến gắn xen, đột biến mất đoạn, hoặc đột biến thay thế của axit amin, hoặc kết hợp của chúng.

Ví dụ về epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2, để sử dụng trong phương pháp theo sáng chế là epitop tương ứng có mặt trong protein E2 của virus CSFV đột biến như vFlc-ΔPTa1, tại đó epitop này là: TAGSTLRTE (SEQ ID NO: 2). Ví dụ khác là CSFV tái tổ hợp như được mô tả bởi Reimann et al. (2010, nêu trên), ví dụ virus pA/CP7_E1E2alf_TLA, tại đó epitop tương ứng là: TLANKDTLA (SEQ ID NO: 3).

Epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2, để sử dụng trong phương pháp theo sáng chế, có thể thu được từ nhiều nguồn, hoặc tự nhiên hoặc tổng hợp. Thuận tiện nhất là đưa đột biến vào epitop TAVSPTTLR của CSFV E2 bằng can thiệp của con người, như bằng biến đổi, hoặc gây đột biến, ví dụ, bằng cách làm thích hợp trình tự nucleotit mã hóa nhờ công nghệ ADN tái tổ hợp, sau đó biểu hiện protein (ví dụ protein CSFV E2, hoặc một phần của nó) chứa epitop đột biến trong hệ biểu hiện tái tổ hợp in vitro.

Theo sáng chế, “ủ” dùng để chỉ việc cho phép liên kết giữa kháng thể và epitop đặc hiệu của nó. Việc này sẽ đòi hỏi các điều kiện phản ứng mà có lợi cho việc tạo thành các tương tác phân tử này, và sẽ bao gồm việc sử dụng các chất đệm, nhiệt độ và thời gian chính xác. Vật liệu và phương pháp ủ theo sáng chế được mô tả trong sổ tay đã được biết rõ, và trong các hướng dẫn được cung cấp bởi nhà cung cấp các xét nghiệm thương mại.

“Chất mang”, theo ngữ cảnh của sáng chế dùng để chỉ cấu trúc đại phân tử mà có thể mang và trình diện epitop của protein CSFV E2. Theo nguyên tắc, cấu trúc bất kỳ có thể là thích hợp, miễn là epitop này có thể tiếp cận được để liên kết với kháng thể. Chất mang có thể có nguồn gốc sinh học hoặc vô cơ, tự nhiên hoặc tổng hợp, lớn hoặc nhỏ, và có thể ví dụ là hạt kim loại, polyme, protein, hoặc carbohydrat. Epitop này có thể được gắn bằng liên kết cộng hóa trị, hoặc bằng liên kết không cộng hóa trị, bao gồm loại bất kỳ trong số tương tác ion, tĩnh điện, thủy động lực, hoặc phân tử. Epitop được chứa trong hoặc trên chất mang, và vì vậy có thể là một phần của nó, ví dụ là thành phần nằm bên trong protein, hoặc là protein dung hợp. Chất mang cũng có thể chứa các phân tử hoặc nhóm khác, như khi protein chứa epitop là lipo- hoặc glycoprotein, hoặc thể tiếp hợp, v.v.. Phương pháp gắn epitop vào chất mang đã được biết rõ trong lĩnh vực, và có thể bao gồm các kỹ thuật hóa sinh hoặc ADN tái tổ hợp.

Theo sáng chế, protein là chuỗi phân tử của các axit amin. Protein này có thể là protein tự nhiên hoặc thành thực, tiền protein hoặc tiền protein bất hoạt (pro-protein), hoặc đoạn gây miễn dịch của protein. Không kể những cái khác: peptit, oligopeptit và polypeptit được bao hàm trong định nghĩa protein.

Chất mang theo sáng chế “được cố định”, nghĩa là: được gắn vào pha rắn, bằng liên kết cộng hóa trị hoặc không cộng hóa trị như bằng cách hấp phụ hoặc phủ hoặc tương tự. Điều này không ngụ ý rằng bản thân pha rắn là bất động. Về nguyên tắc, pha rắn có thể là giả đỡ rắn bất kỳ, miễn là nó cho phép thực hiện phương pháp để phát hiện

theo sáng chế, và có thể có kích thước, hình hoặc dạng khác nhau, ví dụ tấm, hạt, màng v.v..

Phương pháp và vật liệu để cố định chất mang vào pha rắn đã được biết rõ trong lĩnh vực này, và có thể, ví dụ, bao gồm việc sử dụng chất đệm cacbonat và trị số pH bazơ. Theo cách khác, việc cố định có thể là, ví dụ, nhờ phản ứng hóa học gây ra sự liên kết cộng hóa trị, hoặc nhờ biotinyl hóa chất mang và liên kết với giá đỡ rắn được phủ avidin.

Tốt hơn là pha rắn là giếng của đĩa vi phiếm, hoặc hạt mang để sử dụng trong thử nghiệm AlphaLISA.

Theo sáng chế “ủ đồng thời” chỉ ra là chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 được ủ cùng với chất mang đã được cố định chứa epitop TAVSPTTLR của CSFV E2 và mẫu xét nghiệm. Trong thực tế, điều này sẽ có nghĩa là chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 có mặt trong hỗn hợp ủ mà được sử dụng trong bước ủ chất mang đã được cố định chứa epitop TAVSPTTLR của CSFV E2 và mẫu xét nghiệm, trong ít nhất là một phần đáng kể thời gian cần thiết cho việc ủ đó. Lượng thời gian mà là ‘một phần đáng kể’ phụ thuộc vào chi tiết của quy trình cụ thể cho thử nghiệm chẩn đoán được sử dụng. Ví dụ, các hướng dẫn của nhà sản xuất của xét nghiệm IDEXX CSFV Ab chỉ ra khoảng thời gian cho bước ủ mẫu thử và protein E2 đã được cố định là 2 giờ hoặc qua đêm (12 - 18 giờ).

Theo sáng chế, ‘một phần đáng kể thời gian’ dùng để chỉ ít nhất 25% thời gian cho bước ủ chất mang đã được cố định chứa epitop TAVSPTTLR của CSFV E2 và mẫu xét nghiệm. Tốt hơn là 50% thời gian, tốt hơn nữa là 75, 90, 95, 99, hoặc 100% thời gian, theo thứ tự ưu tiên.

Việc ủ đồng thời này làm cho phương pháp theo sáng chế khác với việc ủ mà được xem là ủ sơ bộ, ủ sơ bộ sử dụng bước thêm và riêng biệt để ủ mẫu xét nghiệm và chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến, và việc đó được thực hiện trước khi ủ với chất mang đã được cố định chứa epitop TAVSPTTLR của CSFV E2. Việc ủ sơ bộ này là lựa chọn chuẩn với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này khi tối ưu hóa quy trình ủ, vì nó cho phép khả năng kiểm soát tốt để làm giảm phản ứng liên kết không mong muốn bất kỳ. Tuy nhiên tác giả sáng chế bất ngờ phát hiện ra là các bước ủ này có thể được kết hợp một cách có lợi vào một bước dưới dạng ủ đồng thời, mà không có ảnh hưởng bất lợi đến tính đặc hiệu và tính chọn lọc của xét nghiệm.

Như đã mô tả, một trong các ưu điểm nổi bật là việc ủ đồng thời không đòi hỏi thêm thời gian cho thử nghiệm chẩn đoán cần được thực hiện. Ưu điểm khác là quy trình cơ bản của E2 ELISA thương mại chuẩn có thể được sử dụng mà không cần các sửa đổi đáng kể về thành phần xét nghiệm hoặc quy trình của nó.

Theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, việc phát hiện là bằng thử nghiệm miễn dịch enzym, tốt hơn nữa là bằng ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym).

ELISA đã được biết rõ, và nhiều loại khác nhau về dạng và quy trình là đã biết. Ưu điểm chung là chúng tạo ra các kết quả nhanh và đáng tin cậy, và có thể dễ dàng mở rộng quy mô.

Theo phương án được ưu tiên của phương pháp theo sáng chế, ELISA này là ELISA phong bế gián tiếp. Như đã biết trong lĩnh vực, điều này hàm ý rằng kháng thể của mẫu xét nghiệm cạnh tranh với kháng thể phát hiện đã được đánh dấu để liên kết với epitop đã được cố định. Càng nhiều kháng thể có trong mẫu xét nghiệm, nó liên kết càng nhiều với epitop đã được cố định, và càng ít kháng thể đã đánh dấu có thể giữ lại, dẫn đến sự giảm (ức chế) mức liên kết tối đa với chất đánh dấu.

Quy trình điển hình cho phương pháp theo sáng chế, trong đó việc phát hiện là bằng ELISA phong bế gián tiếp, có thể bao gồm một số hoặc tất cả các bước liên tục:

- phủ chất mang chứa epitop TAVSPTTLR của CSFV E2 vào pha rắn,
- ủ đồng thời mẫu xét nghiệm và chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2, với chất mang đã phủ, sau đó rửa,
- ủ với kháng thể thứ cấp đã đánh dấu, sau đó rửa,
- tạo màu phản ứng, và
- đọc các kết quả.

Một số bước có thể được thực hiện riêng, hoặc bởi một bên khác. Ví dụ, khi được sử dụng làm xét nghiệm thương mại, nhà cung cấp thương mại có thể tạo ra pha rắn được phủ sẵn, sẵn sàng để sử dụng trong bước ủ đồng thời với mẫu xét nghiệm.

Tùy ý quy trình này có thể bao gồm thêm một hoặc nhiều bước để phong bế các phản ứng liên kết dương tính giả. Thông thường, việc này bao gồm ủ với lượng dư protein không đặc hiệu trong chất đệm được sử dụng để ủ và/hoặc các bước rửa, ví dụ sữa tách kem hoặc albumin huyết thanh.

ELISA có thể được tối ưu hóa thêm bằng cách làm thích ứng chất phản ứng và các bước xử lý của nó, như nhiệt độ và thời gian của các bước ủ; tính đặc hiệu và loại kháng thể hoặc kháng nguyên được sử dụng để cố định hoặc phát hiện; lượng và phương pháp cố định được sử dụng; và thành phần của chất đệm ủ và rửa được sử dụng.

Các tài liệu tham khảo chung về thử nghiệm miễn dịch enzyme có trong nhiều công bố, trong số các tài liệu khác trong sách giáo khoa phòng thí nghiệm chuẩn, như: ‘The Immunoassay Handbook (xuất bản lần 4: Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques’; D. G. Wild ed., 2013, ISBN-10: 0080970370); và: ‘The ELISA Guidebook’ (Methods in Molecular Biology, vol. 149, J. R. Crowther, Humana Press, 2000, ISBN-10: 0896037282). Các tài liệu khác là sách hướng dẫn từ nhà cung cấp thương mại như: “Technical guide for ELISA”, KPL Inc., Gaithersburg, MD, USA, 2013; và: “Assay guidance manual” bởi Eli Lilly & Co., chương: Immunoassay methods, K. Cox et al., May 2012.

Theo phương án được ưu tiên khác, ELISA theo sáng chế gần như tương tự với ELISA thương mại cho kháng thể CSFV E2, ví dụ: với PrioCHECK® CSFV Ab 2.0 ELISA, trước đây có tên là Ceditest® CSFV 2.0 ELISA, đều sẵn có từ Prionics AG (Schlieren-Zurich, Thụy Sĩ), hoặc với IDEXX CSFV Ab Test, sẵn có từ IDEXX Europe B.V. (Hoofddorp, Hà Lan). ‘Gần như tương tự’ theo khía cạnh này dùng để chỉ quy trình và vật liệu được sử dụng cho các xét nghiệm thương mại này.

Các quy trình thay thế cho phương pháp theo sáng chế cũng có thể được suy ra. Ví dụ phương pháp theo sáng chế có thể được thiết lập dựa trên các đặc điểm của quy trình của thử nghiệm AlphaLISA, đã được biết rõ trong lĩnh vực. Trong thử nghiệm này, không cần các bước rửa và mặc dù thử nghiệm có thể được thực hiện thủ công, AlphaLISA tự động hóa được ưu tiên hơn.

Đặc trưng của quy trình AlphaLISA là kháng nguyên (ở đây: chất mang chứa epitop TAVSPTTLR của CSFV E2) và kháng thể (ở đây: kháng thể (đơn dòng) đặc hiệu với epitop TAVSPTTLR của CSFV E2) được liên kết với hạt chất mang, và sự liên kết của chúng có thể phát hiện được bởi sự phát sáng.

Chất mang chứa epitop TAVSPTTLR của CSFV E2 có thể, ví dụ, được biotinyl hóa và được cố định trên hạt nhận được phủ avidin, và được sử dụng cùng với kháng thể đã được liên hợp với hạt cho. Sau đó một bước trong thử nghiệm AlphaLISA này bao gồm ủ đồng thời hạt nhận đã được phủ chất mang chứa epitop TAVSPTTLR của

CSFV E2 với mẫu xét nghiệm và chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2. Dạng ngược lại (chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 được phủ), hoặc dạng trung gian, trong đó cả hai chất mang được phủ, có thể được chấp nhận như nhau. Sau đó, bước tiếp theo có thể là ủ với hạt cho được phủ kháng thể, và cuối cùng là đọc kết quả.

Do đó, theo phương án của phương pháp theo sáng chế, việc phát hiện là bằng xét nghiệm chẩn đoán có các đặc trưng của AlphaLISA®.

Phương pháp theo sáng chế có lợi nhất để xét nghiệm các mẫu thu được từ động vật dễ bị nhiễm CSFV. Chúng là các động vật khác nhau thuộc họ lợn.

Do đó, theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, mẫu xét nghiệm này thu được từ động vật là lợn.

Theo sáng chế, “lợn” dùng để chỉ động vật thuộc họ Suidae, và tốt hơn là động vật thuộc chi Sus, ví dụ: lợn hoang hoặc lợn nhà, lợn trưởng thành, lợn thiến, lợn rừng, lợn hươu, hoặc lợn lòi. Nó cũng bao gồm lợn được thể hiện bằng tên bất kỳ để chỉ giới tính hoặc độ tuổi của chúng như: lợn nái, lợn lòi đực, lợn thiến, lợn nái tơ, lợn sữa, hoặc lợn con.

Ứng dụng có lợi khác của phương pháp theo sáng chế là xét nghiệm các mẫu của động vật là lợn đã được chủng ngừa kháng CSFV bằng vaccin đánh dấu CSFV.

Như đã biết rõ và được mô tả ở trên, kháng nguyên trong vaccin đánh dấu khác biệt về mặt kháng nguyên với kháng nguyên kiểu đại mà nó dựa trên, ví dụ thiếu epitop, hoặc có phiên bản khác của epitop so với phiên bản kiểu đại. Thông thường, kháng nguyên trong vaccin đánh dấu được làm thích hợp hoặc được biến đổi bằng các kỹ thuật hóa sinh hoặc ADN tái tổ hợp, và kết quả là đáp ứng kháng thể kháng kháng nguyên được biến đổi của vaccin đánh dấu có thể được phân biệt với đáp ứng kháng thể với kháng nguyên kiểu đại không được biến đổi. Điều này sẽ cho phép “phân biệt về mặt huyết thanh giữa động vật bị nhiễm và động vật được chủng ngừa” hoặc: DIVA.

Do đó, theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, mẫu xét nghiệm thu được từ động vật là lợn đã được chủng ngừa kháng CSFV bằng vaccin đánh dấu CSFV.

Ứng dụng đặc biệt được ưu tiên của phương pháp theo sáng chế trở nên rõ ràng khi vaccin (đánh dấu) CSFV chứa kháng nguyên CSFV là protein CSFV E2 mà khác với E2 kiểu đại bởi đột biến trong epitop TAVSPTTLR của CSFV E2. Như được mô tả ở trên, trong các mẫu của động vật được chủng ngừa bằng vaccin này, các điểm số

đương tính giả được phát hiện khi sử dụng xét nghiệm chẩn đoán hiện nay cho kháng thể CSFV. Tuy nhiên phương pháp theo sáng chế chỉ thể hiện các điểm số dương tính thật. Điều này ảnh hưởng lớn đến ngành thú y và kinh tế chăn nuôi lợn.

Do đó, theo một phương án được ưu tiên của phương pháp theo sáng chế, mẫu xét nghiệm thu được từ động vật là lợn đã được chủng ngừa kháng CSF bằng vaccin CSFV chứa protein CSFV E2 chứa epitop TAVSPTTLR đột biến.

Như được mô tả ở trên, về nguyên tắc, nhiều dạng của epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 có thể được hiểu là để sử dụng trong việc ủ đồng thời cho phương pháp theo sáng chế. Tuy nhiên, phương pháp này được sử dụng có lợi nhất trong trường hợp epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 được sử dụng trong bước ủ đồng thời là giống như trong vaccin CSFV đánh dấu.

Do đó, theo phương án của phương pháp theo sáng chế, epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 mà được chứa trong chất mang để sử dụng trong bước ủ đồng thời cho phương pháp theo sáng chế, là giống như epitop TAVSPTTLR đột biến có mặt trong protein CSFV E2 của vaccin đánh dấu CSFV.

Mối quan tâm khác là đối với epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 trong vaccin đánh dấu CSFV: vaccin này vẫn phải cảm ứng được đáp ứng miễn dịch hiệu quả kháng lại CSFV ở động vật đích, mặc dù có đột biến ở epitop TAVSPTTLR.

Theo sáng chế, tốt hơn là có sự phù hợp giữa một mặt là epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 trong vaccin đánh dấu CSFV được sử dụng để chủng ngừa cho động vật mà mẫu xét nghiệm thu được từ đó để được xét nghiệm trong phương pháp theo sáng chế, và mặt khác là epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 được chứa trong chất mang để sử dụng trong bước ủ đồng thời cho phương pháp theo sáng chế.

Do đó, theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2, chứa trong chất mang để sử dụng trong bước ủ đồng thời, là giống như epitop TAVSPTTLR đột biến chứa trong protein CSFV E2 của vaccin CSFV được sử dụng để chủng ngừa cho động vật là lợn mà từ đó thu được mẫu xét nghiệm.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hoàn toàn có thể xác định epitop TAVSPTTLR đột biến nào cho phép vaccin đánh dấu CSFV chứa protein CSFV E2 chứa epitop đột biến này, là chất gây miễn dịch hiệu quả.

Ví dụ, bằng cách theo dõi đáp ứng miễn dịch sau khi chủng ngừa, hoặc sau khi gây nhiễm, ví dụ bằng cách theo dõi các dấu hiệu lâm sàng về bệnh ở động vật đích,

châm điểm lâm sàng, các thông số huyết thanh, hoặc bằng cách phân lập lại mầm bệnh, và so sánh các kết quả này với đáp ứng được quan sát thấy trong mô hình động vật được chủng ngừa bằng giả dược.

NB: Vì CSFV có khả năng lây nhiễm cao, và là bệnh phải khai báo ở nhiều nước, việc sử dụng trong phòng thí nghiệm hoặc trong chăn nuôi của các mẫu có thể chứa CSFV gây nhiễm (kiểu đại hoặc được làm nhược độc) phải được thực hiện với các khuyến cáo an toàn sinh học thích hợp, phù hợp với các hướng dẫn quốc gia hoặc quốc tế.

Ví dụ về vaccin CSFV chứa protein CSFV E2 có epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 mà có thể được làm phù hợp với chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 để dùng trong bước ủ đồng thời cho phương pháp theo sáng chế, đã được biết trong lĩnh vực này và được mô tả trên đây. Ví dụ từ Kortekaas et al. (2010, nêu trên); một ví dụ là CSFV đột biến được đặt tên vFlc- Δ PTa1, có protein CSFV E2 chứa epitop TAVSPTTLR đột biến có trình tự axit amin: TAGSTLRTE, như được trình bày trong SEQ ID NO: 2.

Ví dụ khác là từ Reimann et al. (2010, nêu trên): CSFV đột biến được gọi là pA/CP7_E1E2alf_TLA, có protein CSFV E2 chứa epitop TAVSPTTLR đột biến có trình tự axit amin: TLANKDTLA, như được trình bày trong SEQ ID NO: 3.

Do đó theo phương án của phương pháp theo sáng chế, epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 được chứa trong chất mang để sử dụng trong bước ủ đồng thời, có trình tự axit amin: TAGSTLRTE (SEQ ID NO: 2).

Theo phương án thay thế của phương pháp theo sáng chế, epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 được chứa trong chất mang để sử dụng trong bước ủ đồng thời, có trình tự axit amin: TLANKDTLA (SEQ ID NO: 3).

Theo phương án khác, mẫu xét nghiệm theo sáng chế thu được từ động vật là lợn đã được chủng ngừa bằng vaccin CSFV như đã mô tả trong Kortekaas et al. (2011, nêu trên), như vaccin dựa trên CSFV đột biến được đặt tên: vFlc- Δ PTa1, như đã mô tả trên đây.

Do đó, theo phương án khác của phương pháp theo sáng chế, vaccin CSFV là dựa trên virus vFlc- Δ PTa1.

Hai phương án khác nhau của chất mang được mô tả để sử dụng trong phương pháp theo sáng chế là: chất mang chứa epitop TAVSPTTLR của CSFV E2, được sử

dụng để cố định vào pha rắn, và chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2, được sử dụng để ủ đồng thời. Các chất mang này có thể có các dạng khác nhau, và các chất mang cho epitop TAVSPTTLR đột biến và kiểu đại có thể là loại giống nhau hoặc khác nhau; chúng cũng có thể là thực thể riêng biệt, hoặc có thể là cùng một thực thể, ví dụ một chất mang chứa cả hai loại epitop TAVSPTTLR.

Theo phương án của phương pháp theo sáng chế, một trong số chất mang đã được cố định chứa epitop TAVSPTTLR của CSFV E2 hoặc chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 là protein, hoặc cả hai chất mang đều là protein.

Các protein này có thể giống hoặc khác nhau.

Theo phương án được ưu tiên của phương pháp theo sáng chế, một trong số chất mang đã được cố định chứa epitop TAVSPTTLR của CSFV E2 hoặc chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 là protein CSFV E2, hoặc cả hai chất mang đều là protein CSFV E2.

Ngoài việc có epitop TAVSPTTLR kiểu đại hoặc đột biến, phần còn lại của chất mang protein CSFV E2 cũng có thể khác nhau về trình tự axit amin; vài ví dụ về CSFV E2 được mô tả trong tài liệu, và trình tự của chúng có sẵn từ cơ sở dữ liệu công cộng như GenBank™.

Khi chất mang đã được cố định chứa epitop TAVSPTTLR của CSFV E2 là protein CSFV E2, nó tạo cơ hội tốt nhất để phát hiện kháng thể kháng CSFV từ mẫu xét nghiệm.

Tương tự, khi chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 là protein CSFV E2, nó tạo cơ hội tốt nhất để bắt giữ kháng thể phản ứng chéo bất kỳ có thể có trong mẫu xét nghiệm của động vật, và nếu không, các kháng thể này có thể gây ra các kết quả dương tính giả. Đó là vì protein CSFV E2 sẽ tạo ra dạng 3D của epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 gần nhất với dạng tự nhiên của epitop này.

Do đó, theo phương án được ưu tiên của phương pháp theo sáng chế, cả hai chất mang đều là protein CSFV E2 thành thực đầy đủ.

Tuy nhiên, như đã biết trong lĩnh vực, vùng xuyên màng đầu cùng C, và thực tế là nửa đầu cùng C của E2 ít liên quan hơn đến việc liên kết với kháng thể (van Rijn et al., 1994, J. of Virology, vol. 68, p. 3934; Chang et al., 2010, Virut Res., vol. 149, p. 183). Do đó, người có hiểu biết thông thường trong lĩnh vực này sẽ có khả năng phát triển và tối ưu hóa phương pháp phát hiện kháng thể CSFV kiểu đại theo sáng chế, trong

đó một, hoặc không có chất mang nào là protein E2 thành thực đầy đủ, mà chỉ là một phần của nó – với điều kiện là bản thân epitop TAVSPTTLR (đột biến) vẫn có mặt -, vẫn cho phép phát hiện tốt kháng thể CSFV kiểu đại, và làm giảm tốt các điểm số dương tính giả, trong ngữ cảnh của phương pháp theo sáng chế.

Việc sử dụng protein CSFV, hoặc một phần của nó, làm chất mang chứa epitop TAVSPTTLR (đột biến) của CSFV E2 trong phương pháp theo sáng chế, có thể được tối ưu hóa thêm bằng cách thay đổi lượng và các điều kiện của bước ủ đồng thời. Ví dụ tác giả sáng chế đã biểu hiện protein CSFV E2 có epitop TAVSPTTLR đột biến trong hệ vector biểu hiện baculovirus đã được biết rõ, tinh chế protein, và sử dụng protein E2 đã biểu hiện tái tổ hợp cho các thử nghiệm ủ đồng thời.

Độ tinh khiết và lượng protein E2 đã biểu hiện có thể được đánh giá, ví dụ bằng điện di gel SDS, nhuộm protein, và định lượng bằng phép đo mật độ quang. Phương pháp thay thế là định lượng trong Elisa, sử dụng kháng thể liên kết với E2, qua epitop khác với TAVSPTTLR, và các mẫu tham chiếu có nồng độ đã biết.

Phụ thuộc vào độ tinh khiết của protein, lượng chất mang protein E2 chứa epitop TAVSPTTLR (đột biến) được lựa chọn để đạt được sự phát hiện tối ưu các kháng thể CSFV kiểu đại, trong khi làm giảm tối ưu điểm số dương tính giả. Như minh họa trong bản mô tả này, thường ít hơn 2 μg protein E2 được yêu cầu cho mỗi giếng của đĩa vi phẩm 96 giếng. Lượng 1 μg hoặc thậm chí 0,5 μg mỗi giếng cũng hiệu quả.

Như được mô tả, các xét nghiệm chẩn đoán thương mại hiện nay với kháng thể CSFV kiểu đại đã thiết lập độ tin cậy của chúng dựa trên một lượng dữ liệu xét nghiệm khổng lồ để xác định hồ sơ về độ nhạy và tính đặc hiệu của chúng. Việc này được duy trì bằng bộ mẫu tham chiếu dương tính và âm tính chuẩn được công nhận trên phạm vi quốc tế. Độ tin cậy trong việc kết hợp của các mẫu xét nghiệm và các mẫu tham chiếu này là cơ sở để cấp phép lưu hành cho chúng, và để sử dụng chúng trong việc cấp giấy chứng nhận xuất khẩu được kiểm soát bởi Chính phủ đối với các động vật đã xét nghiệm bằng các xét nghiệm này.

Để phương pháp theo sáng chế đạt được sự tích hợp đầy đủ các trị số tham chiếu và các điểm số xét nghiệm trước đó của các xét nghiệm đã thiết lập này, việc điều chỉnh thêm quy trình xét nghiệm cho phù hợp có thể được thực hiện. Cụ thể là các điều kiện ủ trong quy trình xét nghiệm có thể được điều chỉnh để thích ứng với thành phần bổ sung

trong bước ủ đồng thời, trong đó epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 được đưa vào.

Tác giả sáng chế đã phát hiện ra là nếu không điều chỉnh thích hợp các điều kiện ủ của bước này, phương pháp theo sáng chế vẫn hoạt động, và vẫn có hiệu quả cao trong việc làm giảm điểm số âm tính giả; tuy nhiên khi xét nghiệm các mẫu chuẩn đã thiết lập sử dụng phương pháp theo sáng chế, thì điểm số OD chính xác thu được có thể lệch với các kết quả trước đó đối với các chuẩn đó, hoặc là cao hoặc thấp hơn. Điều này là do việc bổ sung hợp chất khác có thể đòi hỏi một thể tích chất lỏng nhất định được bổ sung vào hỗn hợp ủ, nó có thể gây ra sự pha loãng chất đệm ủ và các thành phần có thể chứa trong hỗn hợp này, như muối, chất ổn định, chất tẩy rửa hoặc tác nhân phong bế, dẫn đến sai lệch so với số điểm tiêu chuẩn.

Do đó theo một phương án, phương pháp theo sáng chế bao gồm bước điều chỉnh thích hợp các điều kiện ủ của bước bao gồm ủ đồng thời với chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2, để thích ứng với việc bổ sung chất mang này.

Có vài cách mà “việc điều chỉnh thích hợp” này có thể được thực hiện. Cách trực tiếp nhất là hấp thụ dung dịch chứa chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 vào chất đệm ủ để dùng trong phương pháp theo sáng chế, theo đó chất đệm ủ là ở nồng độ tăng so với nồng độ cuối cùng của nó khi được sử dụng trong phương pháp này. Ví dụ, khi kết hợp các thể tích như nhau của dung dịch chứa chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2, và chất đệm ủ, thì chất đệm ủ có thể được cung cấp dưới dạng dung dịch gốc ở nồng độ gấp 2 lần nồng độ sử dụng cùng của nó. Cũng có thể cần phải hiệu chỉnh đối với muối hoặc chất đệm bất kỳ đã có trong dung dịch chứa chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2. Nguyên tắc này được áp dụng một cách dễ dàng cho các tỷ lệ thể tích khác và các nồng độ tương ứng cho dung dịch gốc của chất đệm ủ.

Theo cách khác, dung dịch đã trộn trước để sử dụng ngay có thể được tạo ra từ chất đệm ủ đã chứa chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2, trong đó chất đệm ủ là ở nồng độ sử dụng cuối cùng của nó.

Các ví dụ trước dựa trên việc tạo ra chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 trong dung dịch. Tuy nhiên, vì điều này có thể không tối ưu cho sự ổn định của protein, một phương án khác là tạo ra protein chứa epitop đột biến của CSFV E2 trong đồ đựng riêng ở dạng đông khô, bên cạnh đồ đựng chất đệm ủ ở nồng độ sử

dụng cuối. Khi protein này sau đó được hoàn nguyên với chất đệm ủ ngay trước khi sử dụng, điều này không ảnh hưởng đến tính ổn định của protein, và việc hoàn nguyên này không làm thay đổi (thấy rõ) nồng độ của chất đệm ủ.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể tạo ra và tối ưu hóa các kết hợp khác để đạt được dung dịch tương tự.

Như được mô tả, cách ưu tiên hơn để áp dụng phương pháp theo sáng chế là sử dụng kit xét nghiệm chẩn đoán, bao gồm các thành phần khác nhau cần thiết để sử dụng phương pháp này.

Do đó khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến kit xét nghiệm chẩn đoán để thực hiện phương pháp theo sáng chế.

Theo sáng chế, “kit xét nghiệm chẩn đoán” đề cập đến kit gồm các phần để thực hiện phương pháp theo sáng chế. Kit này bao gồm một hoặc nhiều thành phần để sử dụng phương pháp, cụ thể là: chất mang chứa epitop TAVSPTTLR của CSFV E2 được cố định vào pha rắn, và chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2. Các thành phần này nên nằm trong dạng và đồ đựng thuận tiện, tùy ý với các chất đệm để pha loãng và ủ mẫu, phong bế, hoặc rửa, và tùy ý các hướng dẫn về cách thực hiện phương pháp, và cách đọc và hiểu kết quả.

Theo một phương án, kit có thể bao gồm đồ đựng có nhiều giếng, như đĩa vi phẩm. Giếng của đồ đựng có thể được xử lý để chứa một hoặc nhiều thành phần để sử dụng trong phương pháp theo sáng chế.

Theo phương án được ưu tiên của kit xét nghiệm chẩn đoán theo sáng chế, protein CSFV E2 có epitop TAVSPTTLR được cố định vào giếng của đĩa vi phẩm.

Các hướng dẫn được bao gồm tùy ý trong kit xét nghiệm chẩn đoán theo sáng chế, có thể ví dụ được viết trên hộp chứa các thành phần của kit; có thể nằm trên tờ hướng dẫn sử dụng trong hộp đó; hoặc có thể xem được, hoặc tải về từ, trang web internet của nhà phân phối kit, v.v..

Theo sáng chế, kit xét nghiệm chẩn đoán cũng có thể cung cấp các phần được nêu (liên quan đến kinh doanh thương mại), ví dụ trên trang web internet, để sử dụng kết hợp trong thử nghiệm bao gồm phương pháp theo sáng chế.

Theo một phương án, kit xét nghiệm theo sáng chế có thể dựa trên một trong các kit xét nghiệm thương mại đã biết đối với kháng thể CSFV E2 kiểu đại, nghĩa là gần như giống với, ví dụ, PrioCHECK® CSFV Ab 2.0 (Prionics), hoặc IDEXX CSFV Ab

Test® (IDEXX), với biến đổi để thích ứng với việc ủ đồng thời với thành phần bổ sung. Biến đổi này có thể liên quan đến các hướng dẫn cho người sử dụng đã được sửa đổi, để cung cấp các hướng dẫn về việc ủ đồng thời. Ngoài ra, kit này có thể cung cấp thêm đồ đựng chứa chế phẩm đông khô chứa chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2, để được tạo huyền phù lại, ví dụ, trong chất đệm ủ. Theo cách khác, kit xét nghiệm có thể bao gồm đồ đựng chứa dung dịch gốc của chất đệm ủ ở nồng độ cao hơn so với nồng độ sử dụng cuối cùng của nó, và đồ đựng chứa dung dịch chứa chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2, để sử dụng với dung dịch gốc chất đệm ủ trong bước ủ đồng thời. Một số phương án khác để kết hợp các thành phần của kit xét nghiệm chẩn đoán theo sáng chế có thể được hiểu rõ được bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Do đó, các phương án này nằm trong phạm vi của sáng chế.

Do đó theo một phương án, kit xét nghiệm theo sáng chế bao gồm đồ đựng chứa chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 cho bước ủ đồng thời trong phương pháp theo sáng chế, hoặc trong kit xét nghiệm chẩn đoán theo sáng chế.

Việc sử dụng này giúp phát hiện kháng thể CSFV kiểu đại trong mẫu xét nghiệm động vật, đặc biệt là đối với mẫu từ động vật đã được chủng ngừa kháng CSF bằng vaccin CSFV chứa protein CSFV E2 chứa epitop TAVSPTTLR đột biến. Việc sử dụng này giúp làm giảm điểm số dương tính giả bất kỳ, như đã mô tả.

Theo một phương án, việc sử dụng theo sáng chế đề cập đến sử dụng chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2. Tốt hơn là chất mang này là protein, và tốt hơn là protein này là protein CSFV E2, và tốt hơn là protein CSFV E2 là protein thành thực đầy đủ.

Ứng dụng có lợi khác của phương pháp phát hiện theo sáng chế là ứng dụng của nó vào phương pháp DIVA để chủng ngừa và phát hiện CSFV. Điều này cho phép phân biệt giữa động vật được chủng ngừa kháng CSFV và động vật bị nhiễm CSFV. Chỉ với phương pháp theo sáng chế, và nhờ đó triệt tiêu các điểm số dương tính giả, việc phân biệt về mặt huyết thanh theo cách này là khả thi, khi việc chủng ngừa là bằng cách sử dụng vaccin kháng CSF chứa protein CSFV E2 chứa epitop TAVSPTTLR đột biến.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp phân biệt giữa động vật bị nhiễm CSFV kiểu đại và động vật được chủng ngừa kháng CSFV bằng

vacxin CSFV, trong đó vacxin này chứa protein CSFV E2 chứa epitop TAVSPTTLR đột biến, và phương pháp này bao gồm bước sử dụng phương pháp phát hiện theo sáng chế, hoặc bao gồm bước sử dụng kit xét nghiệm chẩn đoán theo sáng chế.

Phương pháp phân biệt theo sáng chế là phương pháp chẩn đoán in vitro, sử dụng mẫu xét nghiệm động vật như được mô tả ở trên. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng phương pháp phân biệt theo sáng chế như thế này, bao gồm các kết quả về điểm số chẩn đoán cho các mẫu xét nghiệm được điều tra. Cụ thể là việc phát hiện kháng thể protein CSFV E2, bằng sự có mặt hoặc vắng mặt của chúng, hoặc nồng độ của chúng ở trị số tuyệt đối, hoặc trị số tương đối so với trị số của mẫu đối chứng.

Đầu vào cho phương pháp này là mẫu xét nghiệm từ đối tượng; đối tượng này tốt hơn là lợn; mẫu xét nghiệm tốt hơn là mẫu máu, tốt hơn nữa là mẫu huyết thanh hoặc huyết tương.

Để thực hiện việc phân biệt sau cùng giữa động vật bị nhiễm và được chủng ngừa, điểm số xét nghiệm cần được diễn giải là dương tính hoặc âm tính; trong thực tế điều này có nghĩa là: trên hoặc dưới ngưỡng nhất định. Việc này có thể được thực hiện một cách thuận lợi bằng cách đưa vào xét nghiệm nhiều mẫu tham chiếu chuẩn được xét nghiệm cùng với các mẫu xét nghiệm. Việc này được mô tả trong phần ví dụ. Mẫu tham chiếu dương tính và âm tính có thể được tạo ra ở động vật, hoặc có thể thu được từ một số viện, và phòng thí nghiệm chuẩn, ví dụ Phòng thí nghiệm chuẩn cộng đồng cho CSF, ở Đại học thú y, Hannover, Đức.

Sau khi tính điểm mẫu xét nghiệm là dương tính, âm tính, hoặc nghi ngờ, điểm này có thể được ngoại suy để chẩn đoán cho động vật cho mẫu xét nghiệm là dương tính, âm tính, hoặc nghi ngờ nhiễm CSFV kiểu đại.

Trong trường hợp động vật được chẩn đoán dương tính (hoặc nghi ngờ), thì – phù hợp với quy định của chính phủ – động vật này có thể được xử lý bằng cách chủng ngừa và/hoặc được cách ly, hoặc bị tiêu hủy theo cách có trách nhiệm.

Do đó theo một phương án của phương pháp phân biệt theo sáng chế, phương pháp này cũng bao gồm một hoặc nhiều bước được chọn từ bước sau:

- bước thu mẫu xét nghiệm
- bước diễn giải các kết quả xét nghiệm thu được, bằng cách so sánh với các kết quả của mẫu tham chiếu dương tính và âm tính.

- bước so sánh các kết quả xét nghiệm thu được của mẫu này với trị số ngưỡng được xác định trước,
- bước chấm điểm mẫu là dương tính, âm tính, hoặc nghi ngờ chứa kháng thể kháng CSFV kiểu đại,
- bước chẩn đoán mẫu cho là dương tính, âm tính hoặc nghi ngờ nhiễm CSFV kiểu đại, hoặc
- bước (khuyến nghị) xử lý động vật cho mẫu, dựa trên kết quả dương tính hoặc nghi ngờ từ việc chẩn đoán tình trạng nhiễm CSFV kiểu đại, bằng cách chủng ngừa, cách ly, và/hoặc tiêu hủy.

Theo một hoặc nhiều phương án được ưu tiên, mẫu này là mẫu huyết thanh, hoặc: các kết quả xét nghiệm là điểm số tỷ lệ phần trăm ức chế ELISA.

Theo phương án được ưu tiên, mẫu xét nghiệm thu được từ động vật là lợn đã được chủng ngừa kháng CSF bằng vaccin CSFV chứa protein CSFV E2 chứa epitop TAVSPTTLR đột biến.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp in vitro để chẩn đoán tình trạng nhiễm CSFV, phương pháp này bao gồm bước sử dụng phương pháp phát hiện theo sáng chế, hoặc bao gồm bước sử dụng kit xét nghiệm chẩn đoán theo sáng chế, và trong đó sự có mặt của kháng thể kháng CSFV kiểu đại được xác định tương quan với điểm số của mẫu tham chiếu dương tính và âm tính.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, phương pháp phát hiện theo sáng chế, hoặc kit xét nghiệm chẩn đoán theo sáng chế, được sử dụng để trừ tận gốc bệnh CSFV, hoặc trong chương trình kiểm soát quốc gia, như chẩn đoán đồng hành, cùng với việc chủng ngừa bằng vaccin CSFV.

Với việc kết hợp này phương pháp DIVA cho CSFV có thể được ứng dụng, cho phép phân biệt giữa động vật bị nhiễm với động vật đã được chủng ngừa.

Do đó, theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm soát bệnh nhiễm CSFV kiểu đại trong quần thể động vật là lợn, bằng cách sử dụng kết hợp vaccin CSFV chứa protein CSFV E2 chứa epitop TAVSPTTLR đột biến, và kit xét nghiệm chẩn đoán theo sáng chế.

Vì sáng chế giúp làm giảm mạnh điểm số dương tính giả, mẫu (huyết thanh) từ động vật đã được chủng ngừa hiện có thể được xác định một cách tin cậy là âm tính với kháng thể kháng CSFV kiểu đại. Chỉ động vật dương tính thật cần được chọn ra, và

được áp dụng các biện pháp kiểm soát và cách ly thích hợp trong ngữ cảnh của chương trình kiểm soát, dập dịch, hoặc trừ tận gốc.

Do đó việc sử dụng kết hợp vaccin CSFV và phương pháp chẩn đoán cho phép thay thế chính sách dập dịch không mong muốn và rất tốn kém bằng chương trình trừ tận gốc CSFV dựa trên vaccin có cấu trúc, làm giảm đau đớn cho động vật và chi phí kinh tế.

“Quản thể động vật là lợn” có thể được lấy dưới dạng nhóm ở cấp địa phương (trang trại), khu vực, hoặc thậm chí quốc gia. Chi tiết và quy trình để “sử dụng kết hợp” sẽ phụ thuộc vào quy trình chủng ngừa được quy định cho vaccin CSFV (đánh dấu) cụ thể cần được sử dụng. Hiệu quả của việc sử dụng kết hợp cũng sẽ phụ thuộc vào các nhu cầu và lý do để sàng lọc, hoặc thậm chí vào quy định cụ thể của chính phủ cần được tuân thủ.

Một số ví dụ: trong trường hợp chủng ngừa thông thường, lợn sẽ được chủng ngừa kháng CSFV một lần hoặc hai lần lúc còn non, và được chủng ngừa tăng cường ví dụ, ở khoảng cách hàng năm. Các động vật này có thể được xét nghiệm bất cứ khi nào nghi ngờ bệnh nhiễm CSFV kiểu đại xuất hiện. Theo cách khác: lợn để xuất khẩu đã được chủng ngừa, có thể được xét nghiệm ngay trước ngày định xuất khẩu của chúng. Ngoài ra: trong trường hợp nghi ngờ nhiễm CSFV hoặc trong trường hợp có dịch CSFV, việc chủng ngừa và xét nghiệm có thể được thực hiện trong khoảng thời gian ngắn, theo tuần, thậm chí có thể theo ngày. Các phương án này, và phương án khác có thể hiểu được với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, đều nằm trong phạm vi của sáng chế.

Trong thực tế, khi mẫu có điểm số dương tính hoặc âm tính với kháng thể CSFV kiểu đại, việc xác nhận có thể đạt được bằng cách xét nghiệm lại mẫu từ cùng một đích, nhưng từ thời điểm khác, hoặc bằng cách xét nghiệm các động vật khác từ cùng một đàn hoặc khu vực. Theo cách khác, kết quả có thể được xác nhận bằng cách sử dụng kỹ thuật khác, và loại mẫu khác, ví dụ bằng cách phát hiện virus trong máu, mô, nước mũi, hoặc phân bằng xét nghiệm trung hòa virus, hoặc bằng cách phát hiện axit nucleic virus. (ví dụ, bằng PCR)

Sáng chế hiện sẽ tiếp tục được mô tả bằng các ví dụ, không giới hạn, sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Xét nghiệm mẫu của lợn:

1.1. Mẫu xét nghiệm:

Các mẫu xét nghiệm được sử dụng trong ví dụ 1 thu được từ Viện thú y trung ương (Lelystad, Hà Lan), và được mô tả trong Kortekaas et al., 2011 (nêu trên). Nói ngắn gọn: lợn huyết thanh âm tính 8 tuần tuổi được chủng ngừa bằng vacxin CSFV sống: dựa trên virus chủng C hoặc virus vFlc-ΔPTa1. Các mẫu máu được lấy qua nhiều tuần. Huyết thanh được chuẩn bị để xét nghiệm. Ở thời điểm 28 ngày sau khi chủng ngừa, các động vật được gây nhiễm thử bằng CSFV kiểu đại.

1.2. Xét nghiệm ELISA của giải pháp đã biết:

Như được mô tả bởi Kortekaas et al., 2011 (nêu trên), huyết thanh lợn thu được được xét nghiệm bằng cách sử dụng ELISA thương mại: PrioCHECK® CSFV Ab 2.0 (Prionics). Quy trình này được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất, nói ngắn gọn: sử dụng các đĩa vi phiếm đã được phủ, và chất đệm mẫu của kit được pha chế. Các mẫu đối chứng được thêm vào các giếng cụ thể, và các mẫu xét nghiệm (huyết thanh lợn) được thêm vào các giếng khác. Tiếp theo, các đĩa được ủ, rửa, và dạng liên hợp được pha chế. Các đĩa lại được ủ và rửa, và cuối cùng chất phản ứng tạo màu được thêm vào, được ủ và sau đó dừng lại. Tiếp theo, các đĩa được đọc bằng cách đo OD. Tỷ lệ phần trăm ức chế ELISA được tính toán dựa trên chuẩn dương tính. Các kết quả được mô tả trong Fig. 1A, là các kết quả so sánh, gần như giống Fig.4A của Kortekaas et al., 2011 (nêu trên). Đối với ELISA này, giới hạn để phân biệt dương tính/âm tính là khả năng ức chế 40%.

Từ các kết quả này, rõ ràng là: cả mẫu huyết thanh của lợn đã được chủng ngừa bằng chủng C (đường nét đứt), cũng như các mẫu từ lợn đã được chủng ngừa bằng vacxin đánh dấu virus vFlc-ΔPTa1 (đường liền nét), đáp ứng dương tính theo thời gian; tức là gây ra khả năng ức chế 40% hoặc cao hơn. Do đó không thể có sự phân biệt rõ ràng giữa động vật được chủng ngừa bằng vacxin chủng C hoặc bằng vacxin CSFV đánh dấu (tức là virus vFlc-ΔPTa1).

1.3. Xét nghiệm lại các mẫu của giải pháp đã biết:

Các mẫu huyết thanh này của Kortekaas et al. 2011 (nêu trên) sau đó được xét nghiệm lại bằng cách sử dụng ELISA thương mại khác đối với các kháng thể CSFV E2: IDEXX CSFV Ab Test® (IDEXX), theo hướng dẫn của nhà sản xuất, và với quy trình gần như giống với quy trình của Prionics ELISA được mô tả ở trên.

Các kết quả được thể hiện trên Fig. 1B, và thanh ngang màu ghi biểu thị giới hạn phân biệt dương tính/âm tính trong xét nghiệm này, theo đó: âm tính là khả năng ức chế 30% hoặc thấp hơn; dương tính là khả năng ức chế 40% hoặc cao hơn; điểm số nằm trong khoảng khả năng ức chế từ 30 đến 40% là mẫu nghi ngờ. Các kết quả mà tại đó mức độ ức chế là trị số âm tính, thể hiện các mẫu có các trị số OD cao hơn của đối chứng âm tính. Đây có thể được coi là các trị số ức chế 0%.

Rõ ràng từ đồ thị, và tương tự với các kết quả trong Prionics ELISA, gần như toàn bộ các mẫu phản ứng dương tính theo thời gian; chỉ một con vật được chủng ngừa bằng vaccin đánh dấu (lợn số 3161) vẫn âm tính hoàn toàn. Hai mẫu từ lợn số 3163 và 3164 có trị số tăng đột biến ở thời điểm 42 hoặc 49 ngày sau khi chủng ngừa, điều này có thể liên quan đến phản ứng gây nhiễm; các mẫu không thể được xét nghiệm lại vì thiếu nguyên liệu.

1.4. Các protein E2

Protein E2 được tạo ra để sử dụng trong bước ủ đồng thời cho phương pháp theo sáng chế, từ gen E2 của virus CSFV từ chủng C và từ virus vFlc-ΔPTa1. Ban đầu, trình tự nucleotit của gen E2 của chúng đã được tối ưu hóa codon để biểu hiện trong hệ biểu hiện tế bào côn trùng-Baculovirus, mặc dù chỉ sử dụng các đột biến câm. Tiếp theo ADN theo trình tự đã tối ưu hóa được tổng hợp hóa học và được tách dòng vào plasmid pFastBac® (Life technologies), sau trình tự khởi động polyhedrin. Catxet biểu hiện được chuyển bằng chuyển vị đặc hiệu vị trí vào ADN bacmid tái tổ hợp và được khuếch đại trong vi khuẩn khả nạp DH10Bac Escherichia coli. Tiếp theo, ADN bacmid được phân lập, và được sử dụng để chuyển nhiễm tế bào côn trùng Sf9. Baculovirus tái tổ hợp thu được từ dịch nổi chuyển nhiễm được sử dụng để gây nhiễm tế bào côn trùng Sf9 mới. Baculovirus được phân lập và được sử dụng để gây nhiễm tế bào côn trùng Sf21 được nuôi cấy trong bình phản ứng sinh học 2 L. Cả hai protein E2 đều được biểu hiện trong các môi trường nuôi cấy của bình phản ứng sinh học này, chủ yếu trong dịch nổi. Dịch nổi được thu gom, và protein E2 được phân lập bằng sắc ký cột ái lực, trên cột Sepharose đã được kết hợp với kháng thể đơn dòng đặc hiệu epitop TAVSPTTLR. Protein E2 đã tinh chế được thu hoạch từ cột, và được định lượng bằng ELISA ức chế.

Bằng cách sử dụng điện di gel SDS, protein E2 đã biểu hiện và tinh chế được đặc trưng ở: dải đơn khoảng 80 kDa quan sát được, ở độ tinh khiết khoảng 80%. E2 sau đó được định lượng trong Elisa, tiếp theo việc cân các mẫu chuẩn. Protein CSFV E2 được

biểu hiện tái tổ hợp có epitop TAVSPTTLR đột biến có thể thu được thông thường dưới dạng dung dịch gốc tinh chế khoảng 800 µg/ml.

1.5. Phát hiện bằng phương pháp theo sáng chế:

Phương pháp phát hiện kháng thể kháng CSFV kiểu đại trong mẫu xét nghiệm theo sáng chế được áp dụng trên các mẫu của Kortekaas et al., 2011 (nêu trên) đã mô tả trên đây.

Quy trình này chủ yếu dựa trên quy trình đối với IDEXX ELISA, có thêm bước ủ đồng thời. Nói ngắn gọn: kit xét nghiệm IDEXX CSF Ab được sử dụng theo các hướng dẫn của nhà sản xuất, ngoại trừ: chất pha loãng mẫu tiêu chuẩn của kit được thay bằng dạng đậm đặc 2x. Sau đó 25 µl (nửa thể tích quy định trong quy trình của kit xét nghiệm) của dung dịch pha loãng mẫu 2x này được ủ đồng thời trong các giếng được phủ E2 với 50 µl mẫu huyết thanh và 25 µl dung dịch protein CSFV E2 có epitop TAVSPTTLR đột biến được biểu hiện bởi Baculovirut, sao cho khoảng 1 µg E2/giếng có mặt.

Protein CSFV E2 có epitop TAVSPTTLR đột biến mà được sử dụng trong các bước ủ đồng thời này là E2 được chứa trong virut vacxin vFlc-ΔPTa1.

Các kết quả thu được được thể hiện trên Fig. 1C, và minh họa cho sự khác biệt với các kết quả của cùng xét nghiệm mà không có bước ủ đồng thời (Fig. 1B); hoặc với xét nghiệm tương tự, mà không có bước ủ đồng thời (Fig. 1A). Tất cả các mẫu từ lợn được chủng ngừa bằng chủng C đều phản ứng dương tính, trong khi tất cả các mẫu từ lợn được chủng ngừa vacxin đánh dấu đều phản ứng âm tính. Không phát hiện được tác dụng của việc chủng ngừa tăng cường, và thậm chí các trị số tăng đột biến quan sát được ở lợn số 3163 và 3164 là dưới ngưỡng. Theo cách này, xét nghiệm DIVA hữu hiệu cuối cùng cũng đã khả thi đối với vacxin CSFV sống nhược độc.

Khi xét nghiệm này được lặp lại bằng cách sử dụng protein E2 từ CSFV kiểu đại cho bước ủ đồng thời (không được thể hiện trong bản mô tả này), các kết quả này đều khác: tất cả các mẫu có điểm số âm tính, ngay cả các mẫu từ lợn được chủng ngừa bằng chủng C. Do đó, đây không phải là lựa chọn hữu ích.

Việc đưa vào bước ủ đồng thời cũng được thực hiện trong quy trình cơ bản của PrioCHECK® CSFV Ab 2.0 ELISA (Prionics). Các kết quả gần như giống như vậy được quan sát thấy: sự giảm rất hữu hiệu các kết quả dương tính giả, chỉ để lại các mẫu dương tính đúng có điểm số dương tính (ở đây là: khả năng ức chế ELISA trên 40%).

1.6. Tổng kết các kết quả từ việc xét nghiệm lại các mẫu của các giải pháp trước đây:

Các kết quả của các xét nghiệm như được mô tả ở trên được trình bày trong bảng 1. Điều này cho thấy xếp loại mà động vật được chủng ngừa từ xét nghiệm Kortekaas 2011 (nêu trên) đã nhận được, khi được xét nghiệm về khả năng dương tính/nghi ngờ với kháng thể CSFV là khác nhau, phụ thuộc vào phương pháp phát hiện kháng thể E2 được sử dụng. Rõ ràng, chỉ bằng cách sử dụng bước ủ đồng thời với chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2, động vật được chủng ngừa bằng vacxin CSFV chứa protein CSFV E2 chứa epitop TAVSPTTLR đột biến, có thể được phân biệt rõ ràng với động vật bị nhiễm CSFV kiểu đại hoặc được chủng ngừa bằng chủng C.

Bảng 1: Số lượng động vật từ xét nghiệm Kortekaas 2011, chấm điểm nghi ngờ hoặc dương tính với kháng thể CSFV bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau để phát hiện kháng thể CSFV E2.

Phương pháp phát hiện kháng thể CSFV E2	Được chủng ngừa kiểu đại	Được chủng ngừa vacxin đánh dấu
Prionics ELISA	4/4	5/5
IDEXX ELISA	4/4	4/5
IDEXX ELISA + ủ đồng thời với E2 kiểu đại	0/4	0/5
IDEXX ELISA + ủ đồng thời với E2 đột biến	4/4	0/5

Ví dụ 2: Thiết lập tính đặc hiệu và độ nhạy của xét nghiệm.

Để xác định là tính đặc hiệu và độ nhạy của phương pháp theo sáng chế ít nhất tương đương với ELISA kháng thể CSFV E2 thương mại chuẩn, lượng lớn mẫu (khoảng 900) được xét nghiệm bằng cách sử dụng một trong các phương pháp theo sáng chế. Các mẫu sẵn có bởi Dr. W.L. Loeffen, từ bộ sưu tập của Phòng Virut học, Viện thú y trung ương, Lelystad, Hà Lan, và bao gồm nhóm trên 400 huyết thanh lợn hiện trường âm tính CSFV từ Hà Lan, nhóm trên 400 mẫu từ lợn bị nhiễm CSFV thử nghiệm mà đã được lấy mẫu qua vài tuần, và nhóm khoảng 80 mẫu huyết thanh lợn từ có nguồn gốc hỗn tạp; nhóm cuối cùng này chứa huyết thanh dương tính và âm tính, từ lợn đã được chủng ngừa kháng hoặc bị nhiễm CSFV, cũng như lợn bị nhiễm chủng BVDV, hoặc BDV, cũng như một số bệnh nhiễm trùng kết hợp.

Để sử dụng phương pháp theo sáng chế, tất cả các mẫu được xét nghiệm bằng cách sử dụng quy trình và vật liệu của kit xét nghiệm IDXX CSF Ab, sử dụng các đĩa

đã được phủ trước, mẫu đối chứng dương tính và âm tính, thể liên hợp kháng thể đơn dòng A18, cơ chất phản ứng tạo màu, dung dịch dừng, và dung dịch rửa. Sự sai khác chỉ là chất pha loãng mẫu được thay thế bằng phiên bản đậm đặc 2x của chất pha loãng đó, được sử dụng bằng nửa thể tích theo quy trình xét nghiệm; nửa thể tích còn lại được tạo ra bằng cách thêm dung dịch chứa protein CSFV E2 có epitop TAVSPTTLR đột biến, cụ thể là protein E2 chứa trong virus vFlc-ΔPTa1. Các mẫu đối chứng được xét nghiệm hai lần, mẫu xét nghiệm một lần.

Diễn giải các kết quả ức chế ELISA là giống như đối với ELISA thương mại: âm tính là ở khả năng ức chế là 30% hoặc thấp hơn; dương tính là ở khả năng ức chế là 40% hoặc cao hơn; điểm số của khả năng ức chế nằm trong khoảng từ 30% đến 40% là mẫu nghi ngờ.

2.1. Các mẫu hiện trường âm tính CSFV:

Nhóm huyết thanh hiện trường âm tính thường có điểm số về khả năng ức chế ELISA nằm trong khoảng từ -20% đến 0%. Các kết quả được thể hiện trên Fig. 2. Điểm số trung bình từ 413 mẫu là: $-11\% \pm 5,2\%$. Điều này phù hợp với mong đợi: tất cả các mẫu có điểm số thấp hơn nhiều so với trị số ngưỡng đối với trường hợp nghi ngờ/dương tính (khả năng ức chế ELISA 30%), và việc sử dụng phương pháp phát hiện, và phương pháp phân biệt, đều theo sáng chế không tạo ra điểm số dương tính giả bất kỳ từ các mẫu âm tính đúng.

2.2. Các mẫu thí nghiệm dương tính CSFV:

Phân tích nhóm trên 400 mẫu dương tính CSFV được lấy theo thời gian, đã chứng minh độ nhạy của phương pháp theo sáng chế là tốt. Các kết quả được biểu diễn trên Fig.3, và thể hiện rằng đặc biệt ở các lần đầu sau gây nhiễm, phương pháp theo sáng chế cung cấp các kết quả cho phép nhiều mẫu được phân loại là dương tính hơn và ít mẫu được phân loại là nghi ngờ hoặc âm tính hơn so với ELISA kháng thể CSFV E2 thương mại. Dễ thấy nhất là ở 14 ngày sau gây nhiễm, và vẫn phân nào ở 21 ngày sau nhiễm.

Do đó điều này chứng minh rằng độ nhạy của các phương pháp theo sáng chế, trong việc phát hiện chính xác các trường hợp dương tính đúng, ít nhất là tốt như ELISA kháng thể CSFV E2 thương mại, hoặc nói cách khác, việc đưa bước ủ đồng thời vào một bước của ELISA kháng thể CSFV E2 hiện nay không ảnh hưởng bất lợi đến độ nhạy của xét nghiệm.

2.3. Mẫu trộn:

Một nhóm gồm khoảng 80 mẫu thuộc nhiều loại khác nhau được xét nghiệm bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế, để so sánh các kết quả này với kết quả từ ELISA thương mại chuẩn. Các mẫu khác nhau là từ các panen đã biết như ‘Erns workshop’, ‘panen tham chiếu CSFV EU’, và ‘panen tham chiếu Pestivirus’ nội bộ CVI Lelystad.

Các mẫu và mã của chúng được liệt kê trong bảng 2, cùng với các kết quả của việc phát hiện kháng thể kháng CSFV E2, bằng cách sử dụng phương pháp theo sáng chế (được biểu thị trong cột ‘Sáng chế’), hoặc bằng cách sử dụng ELISA kháng thể CSFV E2 thương mại (được biểu thị trong cột ‘Thương mại’). Cột được đánh số mẫu chỉ nhằm mục đích tham khảo: các mẫu 1 - 54 là huyết thanh từ các mẫu hiện trường của động vật bị nhiễm các chủng CSFV khác nhau, hoặc được chủng ngừa kháng CSFV; các mẫu được lấy ở các ngày khác nhau sau khi gây nhiễm (dpi) hoặc các ngày sau khi chủng ngừa (dpv); các mẫu 55-60 là trường hợp âm tính đúng; các mẫu số 61-67 là huyết thanh từ các trường hợp nhiễm BVDV; mẫu 68 từ trường hợp nhiễm BDV; và các mẫu 69-76 từ các trường hợp nhiễm kết hợp.

Các kết quả được thể hiện dưới dạng điểm số tỷ lệ phần trăm ức chế ELISA, và được xếp loại theo bảng tính điểm của ELISA thương mại.

Rõ ràng từ các kết quả trong bảng 2, đối với phần lớn mẫu được xét nghiệm, các kết quả thu được bằng cách sử dụng các phương pháp theo sáng chế tạo ra điểm số về tỷ lệ phần trăm ức chế ELISA có tính phân biệt hơn so với ELISA thương mại. Chỉ trong hai trường hợp kết quả nhờ sử dụng phương pháp theo sáng chế lệch theo hướng tiêu cực, so với ELISA thương mại: các mẫu 23 và 75. Không biết liệu có lỗi trong khi thực hiện xét nghiệm hay không. Do đó, phương pháp theo sáng chế ít nhất là nhạy bằng ELISA thương mại đối với kháng thể CSFV E2.

Điều này có thể có hệ quả đáng kể, vì đối với một số mẫu ELISA thương mại và phương pháp theo sáng chế làm phát sinh các xếp loại khác nhau. Ví dụ là: mẫu số: 8, 25, 28, 38, và 45, được xếp loại là ‘ngghi ngờ’ bởi ELISA thương mại, nhưng theo các phương pháp của sáng chế cần được xếp loại là ‘dương tính’ với kháng thể CSFV E2. Tương tự, mẫu số 37 cần thay đổi về xếp loại từ âm tính sang nghi ngờ.

Chỉ với hai mẫu, số 23 và 75, kết quả của phương pháp theo sáng chế là âm tính, mặc dù điểm số bởi ELISA kháng thể E2 thương mại là dương tính. Lỗi thí nghiệm, ở một trong các xét nghiệm, có thể là nguyên nhân.

Bảng 2: Các kết quả phát hiện của kháng thể CSFV E2 trong tập hợp mẫu trộn, được thể hiện bằng tỷ lệ phần trăm ức chế ELISA.

#	Loại/nguồn gốc mẫu	Sáng chế	Thương mại	#	Loại/nguồn gốc mẫu	Sáng chế	Thương mại
1	pr 83-01 / Denissen 49 dpi / CSFV	105	94	39	CSF D29	95	76
2	pr 86-01 / Alfort 120 dpi / CSFV	105	94	40	CSF D18	75	56
3	pr 96-16 / cedipect 28 dpi / CSFV	69	48	41	CSF D20	77	61
4	pr 96-16 / cedipect 28 dpi / CSFV	81	51	42	CSF0123, 14dpi	45	41
5	pr 96-16 / cedipect 28 dpi / CSFV	61	53	43	CSF0277, 17dpi	86	69
6	pr. 96-04 / v. Zoelen 46 dpi / CSFV	96	77	44	CSF0650, 20dpi	76	52
7	pr 95-05 / E2-vacc. 35 dpi / CSFV	95	84	45	CSF0902, 21dpi	49	34
8	pr 95-05 / E2-vacc. 35 dpi / CSFV	48	31	46	CSF0123, 20dpi	73	53
9	pr 95-05 / E2-vacc. 35 dpi / CSFV	76	56	47	CSF0277, 25dpi	79	62
10	pr 96-05 / Bergen 28 dpi / CSFV	89	72	48	CSF0902, 26dpi	85	62
11	pr 96-05 / Bergen 28 dpi / CSFV	77	56	49	CSF0573, 26dpi	74	56
12	pr 96-05 / Bergen 35 dpi / CSFV	76	61	50	CSF0104, 29dpi	89	69
13	pr 96-04 v. Zoelen 27 dpi / CSFV	76	52	51	CSF0695, 33dpi	81	71
14	pr 96-04 v. Zoelen 27 dpi / CSFV	89	68	52	CSF0573, 33dpi	85	69
15	pr 96-04 v. Zoelen 27 dpi / CSFV	76	48	53	CSF0123, 43dpi	95	84
16	pr 96-06 / Henken 28 dpi / CSFV	77	50	54	CSF0104, 77dpi	94	87
17	pr 96-06 / Henken 28 dpi / CSFV	78	53	55	pr 90-07 / te Breteler / BVDV	8	-7
18	pr 96-06 / Henken 28 dpi / CSFV	82	56	56	pr. 83-04 / Borgers / BVDV	6	24
19	pr 96-06 / Henken 28 dpi / CSFV	86	62	57	pr. 83-04 / Borgers / BVDV	2	-13
20	pr 98-04 / Cedipect 49 dpv / CSFV	74	59	58	pr. 83-04 / den Otter / BVDV	12	0
21	pr 98-04 / Cedipect 49 dpv / CSFV	88	71	59	pr 83-04 / Kossink / BVDV	1	-5
22	pr 98-04 / Cedipect 49 dpv / CSFV	96	83	60	pr 83-04 / Poels / BVDV	20	29
23	pr 98-04 / Cedipect 49 dpv / CSFV	7	48	61	BVD D69	0	18
24	pr 98-04 / Cedipect 49 dpv / CSFV	82	64	62	BVD D34	15	-6
25	pr 98-08 / isolat 97-01 (Melis) 14 dpi / CSFV	52	38	63	BVD D69	1	2
26	pr 98-08 / isolat 97-01 (Melis) 18 dpi / CSFV	74	63	64	BVD 10421/96, 34dpi	-11	0
27	pr 98-08 / isolat 97-01 (Melis) 15 dpi / CSFV	23	10	65	BVD NADL/Osloss, 179dpi	3	2
28	pr 98-08 / isolat 97-01 (Melis) 18 dpi / CSFV	51	37	66	BVD Arnsberg, 69dpi	-8	-2
29	pr 98-08 / isolat 97-01 (Melis) 14 dpi / CSFV	6	16	67	BVD II Giessen, 64dpi	-5	-7
30	pr 98-08 / isolat 97-01 (Melis) 18 dpi / CSFV	12	4	68	BD "F"	-9	1
31	pr 98-08 / isolat 97-01 (Melis) 18 dpi / CSFV	72	47	69	pr 94-13 / strain "F" / BDV	9	-1
32	pr 98-08 / isolat 97-01 (Melis) 18 dpi / CSFV	79	55	70	pr 94-13 / strain "F" / BDV	58	45
33	CSF D33	79	67	71	pr 94-13 / strain "F" / BDV	85	75
34	CSF D14	36	24	72	pr 97-17 / veld CSFV-BVDV	3	15
35	CSF D21	41	27	73	pr 97-17 / veld CSFV-BVDV	12	29
36	CSF D26	87	61	74	pr 97-17 / veld CSFV-BVDV / CSFV 28 dpi	83	73
37	CSF D15	39	25	75	pr 97-17 / veld CSFV-BVDV / CSFV 28 dpi	14	41
38	CSF D21	58	38	76	BD+CSF D20	80	56

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phát hiện kháng thể kháng virus gây dịch tả lợn cổ điển (classical swine fever virus - CSFV) kiểu đại trong mẫu xét nghiệm, trong đó mẫu này cũng có thể chứa kháng thể kháng epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2, trong đó phương pháp này bao gồm bước ủ mẫu xét nghiệm này với chất mang đã được cố định chứa epitop TAVSPTTLR của CSFV E2, khác biệt ở chỗ, phương pháp này bao gồm bước ủ đồng thời trong bước nêu trên với chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc phát hiện là bằng ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym).
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó mẫu xét nghiệm thu được từ động vật là lợn mà đã được chủng ngừa kháng CSF bằng vaccin CSFV chứa protein CSFV E2 chứa epitop TAVSPTTLR đột biến.
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2, được chứa trong chất mang để sử dụng trong bước ủ đồng thời, là giống với epitop TAVSPTTLR đột biến được chứa trong protein CSFV E2 của vaccin CSFV được sử dụng để chủng ngừa cho động vật là lợn mà mẫu xét nghiệm thu được từ động vật này.
5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 được chứa trong chất mang để sử dụng trong bước ủ đồng thời có trình tự axit amin: TAGSTLRTE (SEQ ID NO: 2).
6. Phương pháp theo điểm 4 hoặc 5, trong đó vaccin CSFV dựa trên virus vFlc-ΔPTa1.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó một trong số chất mang được cố định chứa epitop TAVSPTTLR của CSFV E2 hoặc chất mang chứa

epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2 là protein CSFV E2, hoặc trong đó cả hai chất mang đều là protein CSFV E2.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, bao gồm việc điều chỉnh các điều kiện ủ của bước bao gồm ủ đồng thời với chất mang chứa epitop TAVSPTTLR đột biến của CSFV E2, để thích hợp với việc bổ sung chất mang này.

9. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó phương pháp này được ứng dụng để phân biệt giữa động vật bị nhiễm CSFV kiểu dại và động vật đã được chủng ngừa kháng CSFV bằng vaccin CSFV, trong đó vaccin này chứa protein CSFV E2 chứa epitop TAVSPTTLR đột biến.

Fig. 1A:

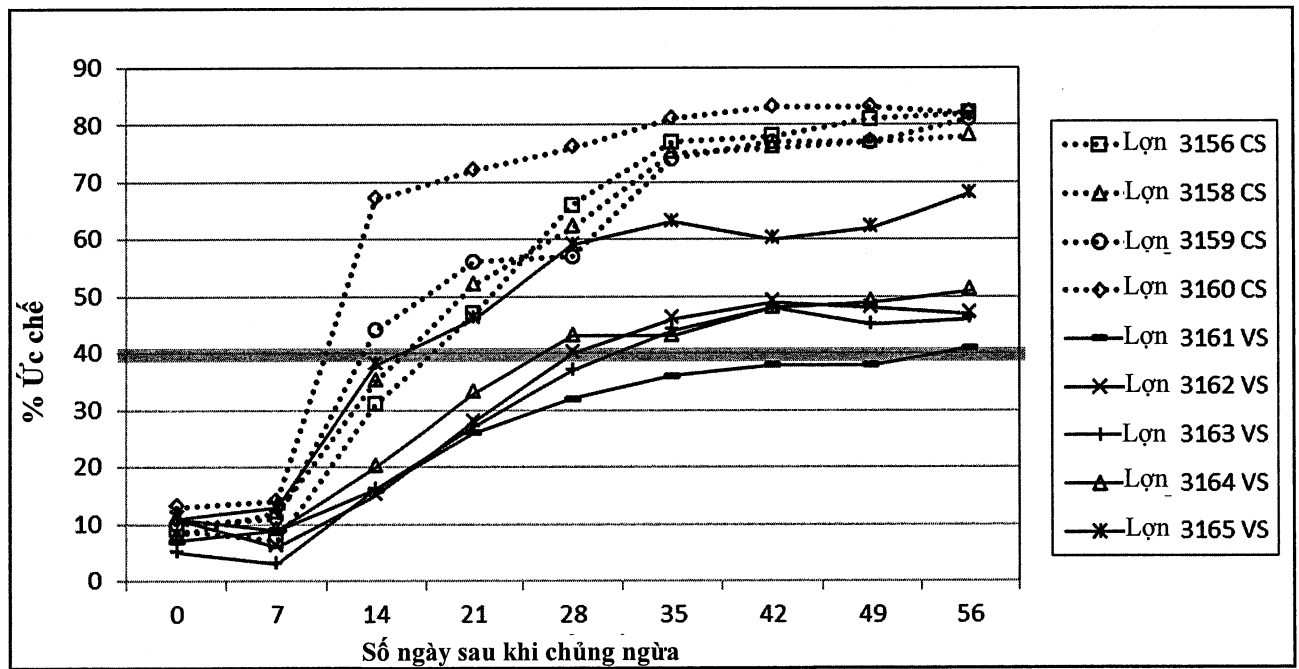


Fig 1 B:

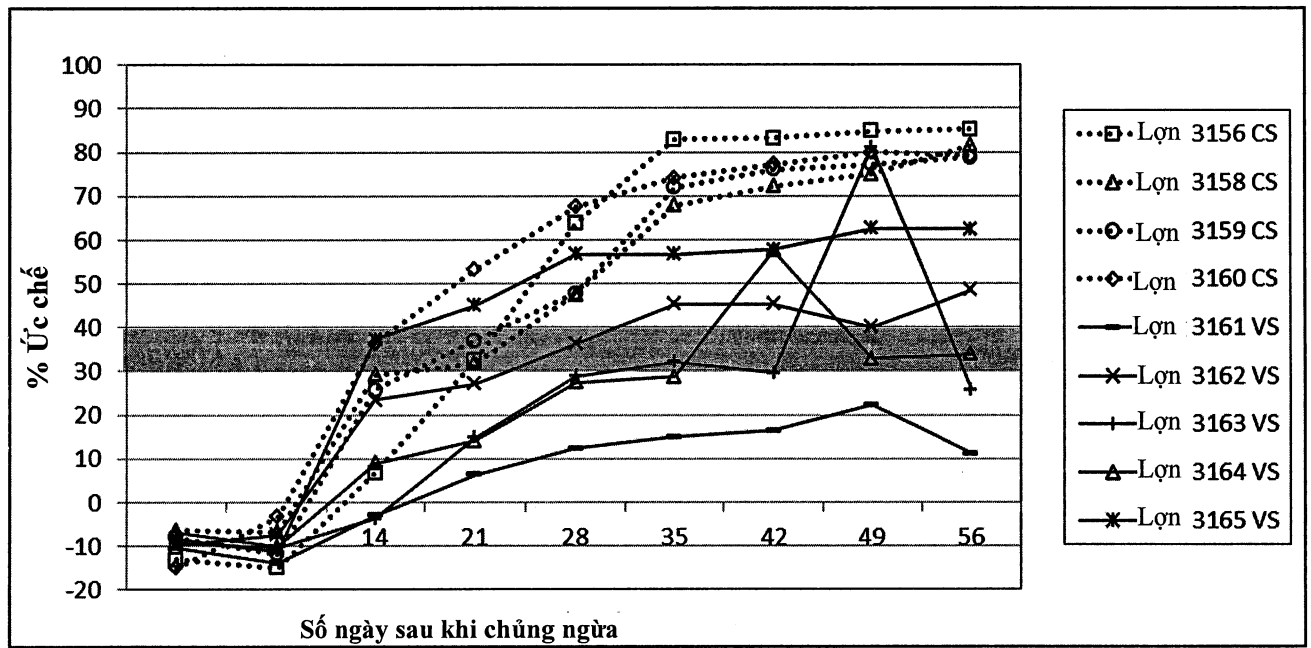


Fig 1 C

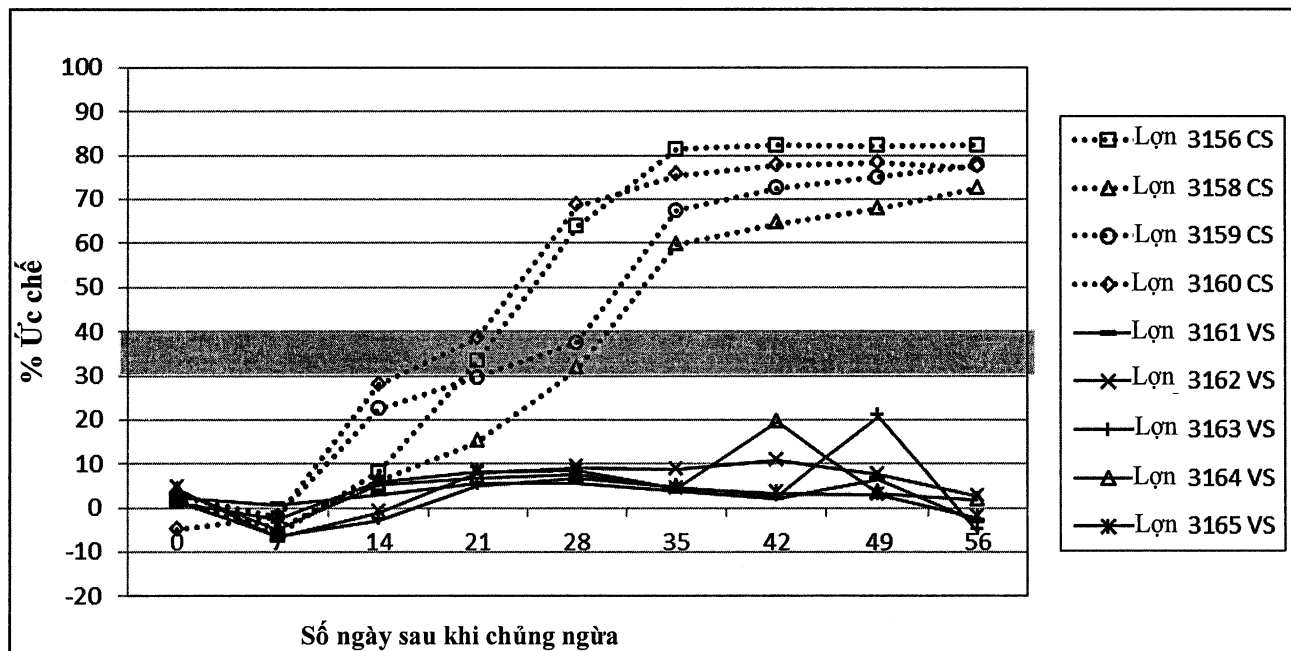


Fig. 2

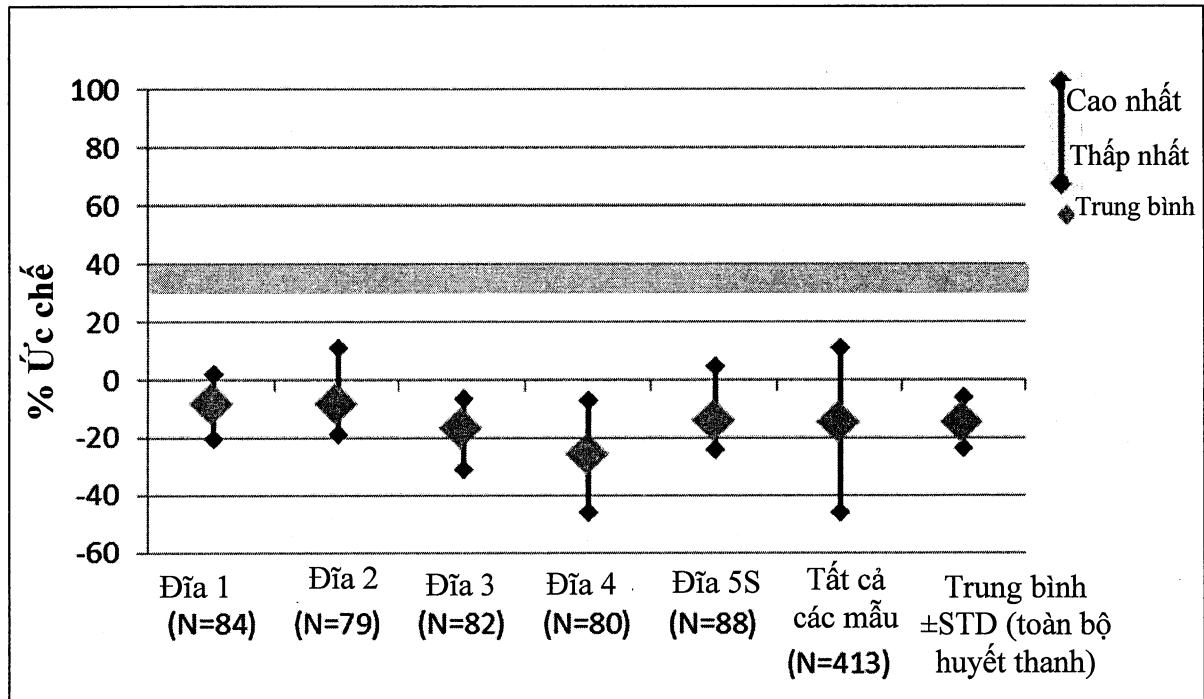
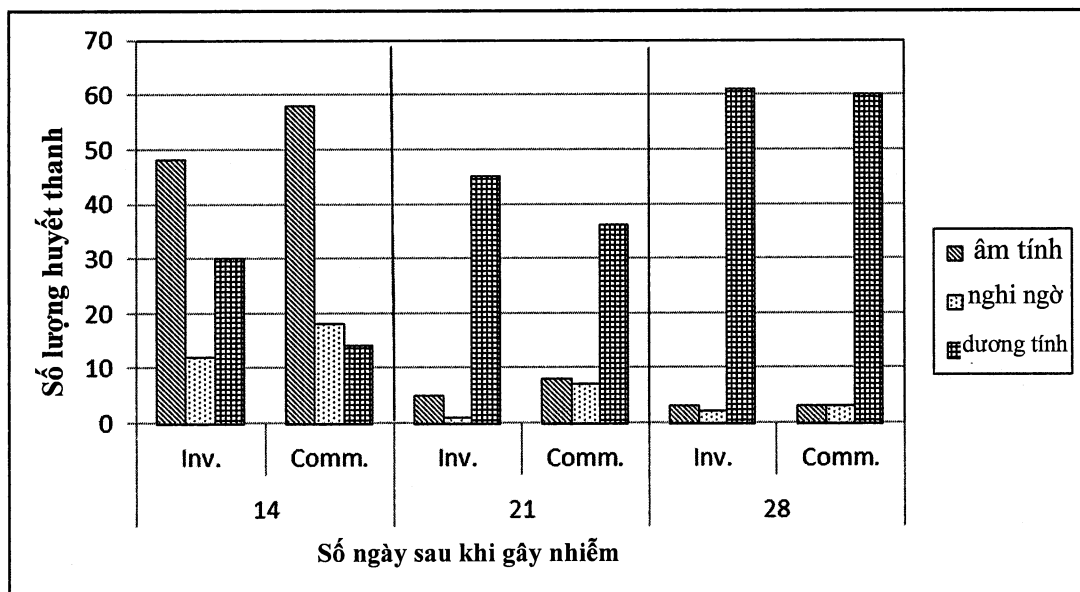


Fig. 3



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Intervet International BV
 <120> Phương pháp phát hiện kháng thể kháng virus gây dịch tả lợn cổ điển
 <130> 23678
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Dịch tả lợn cổ điển

<400> 1
 Thr Ala Val Ser Pro Thr Thr Leu Arg
 1 5

<210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> epitop TAVSPTTLR đột biến từ protein CSFV E2

<400> 2
 Thr Ala Gly Ser Thr Leu Arg Thr Glu
 1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> epitop TAVSPTTLR đột biến từ protein CSFV E2

<400> 3
 Thr Leu Ala Asn Lys Asp Thr Leu Ala
 1 5