



(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)



1-0033955

(51)⁸ C12N 7/04; A61K 39/12; G01N 33/569; (13) B
G01N 33/535; A61K 39/00; C12N 15/85

(21) 1-2018-02896

(22) 29/12/2016

(86) PCT/KR2016/015504 29/12/2016

(87) WO/2017/116177 06/07/2017

(30) 10-2015-0191298 31/12/2015 KR

(45) 25/11/2022 416

(43) 25/07/2019 376A

(73) Republic of Korea (Animal and Plant Quarantine Agency) (KR)
177, Hyeoksin 8-ro, Gimcheon-si, Gyeongsangbuk-do, 39660, Korea (South)

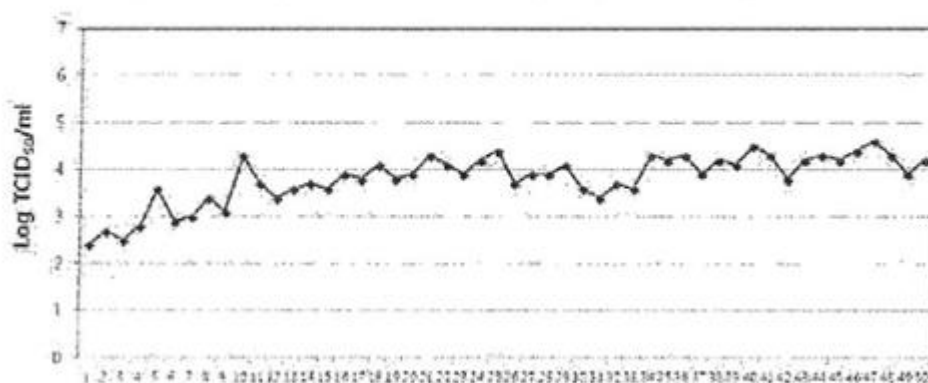
(72) Dong Jun AN (KR); Sung In IM (KR); Se Eun CHOE (KR); In Soo CHO (KR); Hye Young JEOUNG (KR); Jae Young SONG (KR); Jae Jo KIM (KR); Gyoo Ha HAN (KR); Bang Hun HYUN (KR); Byoung Han KIM (KR).

(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) CHŨNG VACXIN CHỈ THỊ SỐNG CỦA VIRUT SỐT LỌN ĐƯỢC LÀM GIẢM ĐỘC LỰC VÀ CHẾ PHẨM VACXIN DÙNG QUA ĐƯỜNG MIỆNG CHỨA CHŨNG VACXIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vacxin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực và chế phẩm vacxin dùng qua đường miệng chứa chủng vacxin này. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến chủng vacxin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực (C-P50 được làm giảm độc lực CSFV Bems) thu được bằng cách nuôi cấy luân phiên và liên tục chủng vacxin virus sốt lợn thông thường Flc-LOM-BEerns trong tế bào; chế phẩm vacxin dùng qua đường miệng chứa chủng vacxin này; và phương pháp phân biệt bằng huyết thanh học giữa lợn bị nhiễm virus sốt lợn từ bên ngoài và lợn được tiêm chủng vacxin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực. Đặc biệt là, chế phẩm vacxin theo sáng chế có thể được bào chế thành dạng liều mỗi và dễ dàng dùng cho lợn và nhờ đó giải quyết được vấn đề của vacxin ngừa virus sốt lợn thông thường là chỉ được sử dụng ở dạng tiêm và vì vậy khó có thể dùng cho lợn rừng và lợn đen hung dữ được nuôi.

(A) Hàm lượng virus cho mỗi lần cấy chuyển sử dụng tế bào CPK



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực và chế phẩm vaccin dùng qua đường miệng chứa chủng vaccin này. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực (C-P50 được làm giảm độc lực CSFV Berns) thu được bằng cách nuôi cấy luôn phiên và liên tục chủng vaccin virus sốt lợn thông thường Flc-LOM-Berns trong tế bào; chế phẩm vaccin dùng qua đường miệng chứa chủng vaccin này; và phương pháp phân biệt bằng huyết thanh học giữa lợn bị nhiễm virus sốt lợn từ bên ngoài và lợn được tiêm vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virus sốt lợn cổ điển (classical swine fever virus - CSFV) là virus ARN có kích thước nằm trong khoảng từ 40 nm đến 50 nm thuộc họ *Flaviviridae*. Ngoài ra, virus này là loại virus thuộc chi *Pestivirus* và chứa gen 12,3 kb từ ARN chuỗi đơn có nghĩa dương và protein được tổng hợp từ khoảng 3.900 axit amin.

Các triệu chứng của lợn bị nhiễm virus sốt lợn cổ điển thay đổi tùy theo thể trạng, độ tuổi của lợn và loại virus. Tuy nhiên, các triệu chứng thường bao gồm chán ăn đi kèm sốt cao, tiêu chảy hoặc táo bón, xanh tím da và chân sau khập khiễng hoặc loạn choạng, v.v.. Ngoài ra, do virus này dễ lây và hầu hết lợn bị nhiễm virus đều bị chết bất kể độ tuổi nào, cho nên chúng được xếp vào loại bệnh truyền nhiễm nguy hiểm nhất ở vật nuôi theo Luật kiểm soát bệnh truyền nhiễm ở vật nuôi Hàn Quốc. Ngoài ra, bệnh sốt lợn cổ điển là bệnh nguy hiểm làm cản trở việc xuất khẩu và nhập khẩu ở các nước bùng phát dịch bởi vì bệnh này nằm trong mục tiêu các bệnh cần xóa bỏ của tổ chức thú y thế giới (World Organization for Animal Health- OIE).

Virus sốt lợn cổ điển lây nhiễm sang các cá thể khác qua phân, nước tiểu, nước mắt và nước mũi của lợn bị nhiễm bệnh, nhưng có thể cũng bị lây qua các vật trung gian như giày, quần áo và trang thiết bị của con người. Đa phần virus thường tấn công hệ tiêu hóa và hệ hô hấp, sinh trưởng trong các tế bào amidan, hạch và cơ quan bạch huyết và gây ngộ độc máu. Trong trường hợp nhiễm cấp tính, các triệu chứng có thể bao gồm sốt

cao, phát ban da, chán ăn, táo bón, tiêu chảy, giảm bạch cầu, tê liệt ở lưng, chết và tương tự. Ngoài ra, nếu lợn cái đang mang thai bị nhiễm bệnh, thì virus lây cho bào thai qua nhau thai, và tùy thuộc vào tuổi của bào thai, có thể xuất hiện các triệu chứng như tái hấp thụ, sảy thai, chết non và con yếu và các triệu chứng tương tự. Ngoài ra, phân của lợn mắc bệnh có thể gây lây nhiễm thứ cấp do chúng giải phóng một lượng lớn virus.

Thời gian ủ bệnh của virus sốt lợn cổ điển thường kéo dài từ 6 đến 11 ngày, nhưng cũng có thể lên đến 20 đến 30 ngày. Do đó, cần phải ngăn chặn sự lây lan của virus bằng cách chẩn đoán sớm, bởi vì nguy cơ lây lan là rất cao trong khi vận chuyển và trước khi xuất hiện các triệu chứng lâm sàng.

Mặc dù các đợt bùng phát dịch virus sốt lợn cổ điển không xảy ra ở Mỹ và Nhật Bản, tuy nhiên nó vẫn thường xảy ra ở nhiều nước Châu Âu ở các con lợn nuôi bị lây nhiễm từ lợn rừng. Các đợt bùng phát dịch liên tục xảy ra ở các nước Đông Nam Á hoặc Đông Bắc Á và Trung Quốc, và tổ chức thú y thế giới (OIE) sẽ chỉ công nhận một nước hết dịch sốt lợn cổ điển (classical swine fever - CSF) khi không có bùng phát dịch trong hơn một năm mà không sử dụng vaccin. Tuy nhiên, nếu vaccin chứa chỉ thị chẩn đoán để phân biệt sốt lợn cổ điển và phương pháp chẩn đoán được thương mại hóa ở các nước phù hợp và có hiệu quả vượt trội, thì OIE khuyến cáo sử dụng vaccin và các phương pháp này, đồng thời công nhận các nước này là nước không có dịch sốt lợn cổ điển.

Vaccin dùng cho virus sốt cổ điển được sử dụng ở Hàn Quốc là chủng LOM, chủng này là vaccin sống được làm giảm độc lực được sử dụng từ năm 1976, và chỉ được sản xuất bởi các nhà sản xuất trong nước và toàn bộ đều được sử dụng trong nước dưới sự tài trợ của chính phủ, và việc sử dụng các chủng vaccin khác bị cấm theo chính sách quốc gia. Để thương mại hóa vaccin sốt lợn mới, ủy ban xóa bỏ sốt lợn có vốn tư cá nhân ra quyết định, và sau đó tiểu ban gồm các chuyên gia kỹ thuật sẽ tiếp tục xem xét vaccin này, yêu cầu chính sách được xác định hoàn toàn dựa trên các thử nghiệm lâm sàng từ bên ngoài, và sau đó, được tiếp tục xem xét bởi hệ thống chuyển đổi chủng vaccin của chính phủ. Vaccin LOM dùng cho bệnh sốt lợn cổ điển hiện nay được sử dụng sau khi trải qua hệ thống trên, vaccin này đã được sử dụng trong 40 năm và đã xóa bỏ sốt lợn trong nước nhờ khả năng đáp ứng miễn dịch vượt trội. Tuy nhiên, các chuyên gia và người nuôi lợn vẫn luôn lo ngại về khả năng gây bệnh và độ an toàn của vaccin LOM.

Một trường hợp tiêu biểu về việc vaccin LOM này có vấn đề về độ an toàn là,

năm 2002, Hàn Quốc trở thành nước hết dịch sốt lợn cổ điển CSF và theo chính sách không tiêm vaccin năm 2002, sau đó dịch sốt lợn đã bùng phát trở lại khắp cả nước vào năm 2002 và 2003, cho nên vaccin LOM lại được dùng cho lợn khắp Hàn Quốc, và lý do trường hợp này là tiêu biểu là vì tại thời điểm đó, xuất hiện nhiều trường hợp sảy thai và chết non ở lợn nái mang thai. Ngoài ra, vào năm 2004, ở đảo Jeju, khu vực không được tiêm vaccin sốt lợn cổ điển từ năm 1999, các sản phẩm máu sấy khô được sử dụng làm thức ăn bổ sung đã vô tình bị nhiễm chủng vaccin LOM sốt lợn cổ điển và được phân phối, và do đó, lợn ở 150 trang trại trong tổng số 300 trang trại ở đảo Jeju có triệu chứng rất giống với triệu chứng của bệnh sốt lợn cổ điển, và thậm chí khi tiến hành giải phẫu các con lợn này, người ta đã thấy được các cơ quan của chúng xuất hiện các triệu chứng tổn thương đặc thù. Do đó, đã có tranh cãi nổi lên về khả năng gây bệnh của chủng vaccin LOM cho đến khi lợn nhiễm bệnh ở đảo Jeju được loại bỏ hoàn toàn năm 2009. Gần đây, vào năm 2014, các con lợn cái đang mang thai được tiêm chủng với vaccin LOM sốt lợn cổ điển, và tiếp tục, lại là một sự phân phối nhầm lẫn ở đảo Jeju, và kết quả là, các bào thai bị sảy/chết non bị lây truyền dọc chủng vaccin LOM, và do đó, cần đặt câu hỏi về độ an toàn của vaccin này.

Ngoài ra, đối với vaccin LOM, có một vấn đề xảy ra là rất khó để phân biệt bằng huyết thanh học chủng vaccin LOM này, tức là, phân biệt kháng thể từ lợn bị nhiễm chủng kiểu dại và kháng thể từ lợn bị nhiễm chủng vaccin LOM. Do đó, để giải quyết vấn đề này, các nỗ lực đã được thực hiện để tạo ra các chủng vaccin chỉ thị sống của virut sốt lợn cổ điển ở dạng vaccin DIVA (differentiating infection in vaccinated animals - phân biệt việc nhiễm bệnh ở các động vật được tiêm vaccin).

Theo đó, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu phát triển vaccin sống ở lợn được làm giảm độc lực và theo đó hướng tới việc loại bỏ bệnh sốt lợn bằng cách giảm bệnh sốt lợn trong nước và có thể cung cấp và sử dụng vaccin chỉ thị sốt lợn được làm giảm độc lực trên toàn thế giới nếu được OIE công nhận là có hiệu quả vượt trội. Ngoài ra, các tác giả còn thực hiện các nghiên cứu mở rộng để điều chế chế phẩm vaccin ở dạng liều mồi để vaccin có thể được dùng qua đường miệng cho lợn rừng và lợn đen được nuôi, các con lợn này rất khó tiêm bởi vì bản tính của chúng khá hung dữ và khó có thể giữ bằng tay.

Kết quả là, các tác giả của sáng chế đã phát hiện ra rằng, khi chủng vaccin của virut sốt lợn cổ điển, được đặt tên là Flc-LOM-BErns bằng cách thế gen Erns của CSFV

(Classical Swine Fever Virus - Virut sốt lợn cổ điển) bằng gen Erns của BVDV (virut gây bệnh tiêu chảy ở bò) (xem Công bố sơ bộ đơn sáng chế Hàn Quốc số 2010-0121288), được sinh trưởng bằng cách nuôi cấy luân phiên hoặc liên tục trong các tế bào nhất định thuộc các loại khác nhau, không chỉ làm tăng hiệu giá virut và tăng hiệu quả vaccin, mà còn làm giảm các tác dụng phụ như sảy thai/chết non ở lợn cái đang mang thai bởi vì virut này đã được làm giảm độc lực so với chủng vaccin Flc-LOM-Berns thông thường. Ngoài ra, các tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng, chủng vaccin được làm giảm độc lực có thể phân biệt bằng huyết thanh học giữa lợn được tiêm vaccin được làm giảm độc lực và lợn bị nhiễm virut từ bên ngoài, qua đó, hoàn thiện sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật cần giải quyết

Mục đích của sáng chế là đề xuất chủng vaccin chỉ thị sống của virut sốt lợn được làm giảm độc lực, C-P50 được làm giảm độc lực SFV Berns, thu được bằng cách nuôi cấy luân phiên hoặc liên tục chủng vaccin virut sốt lợn Flc-LOM-Berns trong tế bào.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất chế phẩm vaccin dùng qua đường miệng chứa chủng vaccin chỉ thị sống của virut sốt lợn được làm giảm độc lực và chất mang được dùng.

Một mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp điều chế chủng vaccin chỉ thị sống của virut sốt lợn được làm giảm độc lực bằng cách nuôi cấy thứ cấp theo trình tự và liên tục chủng vaccin Flc-LOM-Berns trong tế bào CPK (cloned porcine kidney cell - tế bào thận lợn tách dòng), tế bào BK (bovine kidney cell - tế bào thận bò), tế bào PK (porcine kidney cell - tế bào thận lợn), và tế bào CPK (cloned porcine kidney cell - tế bào thận lợn tách dòng), theo đó, virut sinh trưởng cho đến khi đạt hiệu giá cuối cùng nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{6,0}$ đến $1 \times 10^{7,0}$ TCID₅₀/ml.

Một mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp phân biệt giữa lợn bị nhiễm virut sốt lợn từ bên ngoài và lợn được tiêm vaccin chỉ thị sống của virut sốt lợn được làm giảm độc lực bằng cách sử dụng kỹ thuật hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym cạnh tranh (competitive enzyme-linked immunosorbent assay - C-ELISA).

Giải pháp kỹ thuật

Để đạt được các mục đích trên, sáng chế đề xuất chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực thu được bằng cách nuôi cấy luân phiên hoặc liên tục chủng vaccin virus sốt lợn Flc-LOM-BERns trong tế bào.

Sáng chế còn đề xuất chế phẩm vaccin dùng qua đường miệng chứa chủng vaccin chỉ thị sống vừa virus sốt lợn được làm giảm độc lực và chất mang được dụng.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực bao gồm các bước: (a) tiêm vaccin Flc-LOM-BERns vào tế bào CPK (cloned porcine kidney cell - tế bào thận lợn tách dòng) và nuôi cấy thứ cấp liên tục, để virus sinh trưởng cho đến khi đạt hiệu giá nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{3,0}$ đến $1 \times 10^{4,0}$ TCID₅₀/ml; (b) tiêm virus đã sinh trưởng trong bước (a) vào tế bào BK (bovine kidney cell - tế bào thận bò, lại tiếp tục nuôi cấy thứ cấp liên tục, để virus sinh trưởng cho đến khi đạt hiệu giá nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{4,0}$ đến $1 \times 10^{5,0}$ TCID₅₀/ml; (c) tiêm virus đã sinh trưởng trong bước (b) vào tế bào PK (porcine kidney cell - tế bào thận lợn), rồi lại tiếp tục nuôi cấy thứ cấp liên tục, để virus sinh trưởng cho đến khi đạt hiệu giá nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{5,0}$ đến $1 \times 10^{6,0}$ TCID₅₀/ml; và (d) tiêm virus đã sinh trưởng trong bước (c) vào tế bào CPK (cloned porcine kidney cell - tế bào thận lợn tách dòng), rồi lại tiếp tục nuôi cấy thứ cấp liên tục, để virus sinh trưởng cho đến khi đạt hiệu giá nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{6,0}$ đến $1 \times 10^{7,0}$ TCID₅₀/ml.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất phương pháp phân biệt giữa lợn bị nhiễm virus sốt lợn từ bên ngoài và lợn đã tiêm vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực thu được bằng cách nuôi cấy luân phiên và liên tục chủng vaccin virus sốt lợn Flc-LOM-BERn trong tế bào, bao gồm các bước: (a) thêm đồng thời mẫu thử và kháng thể được đánh dấu bằng enzym vào đĩa có bám kháng nguyên của virus sốt lợn sao cho kháng thể và kháng thể được đánh dấu enzym trong mẫu thử phản ứng cạnh tranh với nhau; (b) thêm chất hiện màu vào đĩa trong bước (a) để thúc đẩy phản ứng enzym với kháng thể được đánh dấu enzym; (c) đo độ hấp thụ sau phản ứng enzym ở bước (b); (d) tính giá trị %PC sử dụng độ hấp thụ được đo trong bước (c); và (e) đánh giá kết quả, nếu giá trị %PC được tính trong bước (d) lớn hơn giá trị ngưỡng định trước thì lợn bị nhiễm virus sốt lợn từ bên ngoài, và nếu giá trị này nhỏ hơn giá trị ngưỡng thì lợn đã được tiêm vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực làm chất tạo đáp ứng miễn dịch chống lại virus sốt lợn từ bên

ngoài và virus sốt lợn được làm giảm độc lực, trong việc điều chế vaccin sống được làm giảm độc lực và/hoặc vaccin chỉ thị sống cho virus sốt lợn.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực làm chế phẩm bảo vệ chống lại sự lây nhiễm của virus sốt lợn từ bên ngoài, trong việc điều chế vaccin sống được làm giảm độc lực và/hoặc vaccin chỉ thị sống cho virus sốt lợn.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực làm chế phẩm phòng ngừa, ngăn chặn hoặc bảo vệ chống lại tình trạng sảy thai, chết non hoặc lây truyền dọc qua bào thai ở lợn nái mang thai gây ra bởi virus sốt lợn từ bên ngoài, trong việc điều chế vaccin sống được làm giảm độc lực và/hoặc vaccin chỉ thị sống cho virus sốt lợn.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực làm chế phẩm dùng để phân biệt giữa lợn bị nhiễm virus sốt lợn từ bên ngoài và lợn đã được tiêm vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực, trong việc điều chế vaccin sống được làm giảm độc lực và/hoặc vaccin chỉ thị sống cho virus sốt lợn.

Lợi ích của sáng chế

Độ an toàn của chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực, C-P50 được làm giảm độc lực CSFV Berns theo sáng chế được tăng lên, bởi vì chúng đã loại bỏ được các tác dụng phụ, chẳng hạn như sảy thai/chết non ở lợn nái mang thai, là vấn đề của các chủng vaccin virus sốt lợn thông thường.

Ngoài ra, chế phẩm vaccin dùng qua đường miệng theo sáng chế có thể được bào chế thành dạng liều mỗi và dễ dàng dùng cho lợn và nhờ đó giải quyết được vấn đề của vaccin virus sốt lợn thông thường là chỉ được sử dụng ở dạng tiêm và vì vậy khó có thể dùng cho lợn rừng và lợn đen hung dữ được nuôi.

Ngoài ra, phương pháp phân biệt bằng huyết thanh học theo sáng chế có khả năng phân biệt các kháng nguyên và kháng thể của lợn bị nhiễm virus sốt lợn từ bên ngoài với lợn được tiêm vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực, C-P50 được làm giảm độc lực CSFV Berns, và do đó, phương pháp này có hiệu quả vượt trội trong việc phân biệt việc nhiễm bệnh ở các con vật được tiêm vaccin (DIVA).

Mô tả vắn tắt hình vẽ

FIG. 1 là hình ảnh thể hiện sự sinh trưởng của virus Flc-LOM-BErns sử dụng PLA (kỹ thuật liên kết peroxidaza) (A: CPK- 15 tế bào (tế bào bình thường), B: được phản ứng với kháng thể đặc hiệu virus sốt lợn cổ điển (CSFV)- và kháng thể đặc hiệu BVDV Erns).

FIG. 2 là hình ảnh thể hiện sự sinh trưởng của virus Flc-LOM-BErns sử dụng RT-PCR (A: chỉ thị kích thước ADN, B: dương tính với chủng vaccine chỉ thị sống).

FIG. 3 là biểu đồ thể hiện hiệu giá virus khi virus Flc-LOM-BErns được nuôi cấy thứ cấp theo trình tự và liên tục trong tế bào CPK, tế bào BK, tế bào PK và tế bào CPK.

FIG. 4 là biểu đồ thể hiện hiệu giá virus khi virus Flc-LOM-BErns được nuôi cấy thứ cấp liên tục trong chỉ một tế bào duy nhất (FIG. 4a: được nuôi cấy thứ cấp liên tục trong tế bào CPK đến 50 lần cấy chuyển, FIG. 4b: được nuôi cấy thứ cấp liên tục trong tế bào CPK đến 20 lần cấy chuyển và trong tế bào BK từ 21 đến 50 lần cấy chuyển, FIG. 4c: được nuôi cấy thứ cấp liên tục trong tế bào CPK đến 20 lần cấy chuyển và trong tế bào PK từ 21 đến 50 lần cấy chuyển, và FIG. 4d: được nuôi cấy thứ cấp liên tục trong tế bào CPK đến 20 lần cấy chuyển và trong tế bào BK từ 21 đến 30 lần cấy chuyển và trong tế bào PK từ 31 đến 50 lần cấy chuyển).

FIG. 5 là sơ đồ thể hiện phương pháp phân biệt giữa lợn bị nhiễm virus sốt lợn từ bên ngoài và lợn đã được tiêm vaccine chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực (C-P50 được làm giảm độc lực CSFV BErns) sử dụng kỹ thuật C-ELISA.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi được chỉ ra khác, tất cả thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng ở đây có ý nghĩa như được hiểu thông thường bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế. Nhìn chung, các danh pháp được sử dụng trong bản mô tả này đã được biết đến rộng rãi và thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật.

Theo một phương án của sáng chế, để điều chế một chủng vaccine chỉ thị sống của virus sốt lợn mới đảm bảo độ ổn định và hiệu giá cao, chủng virus Flc-LOM-BErns thông thường (Công bố sơ bộ của đơn sáng chế Hàn Quốc số 2010-0121288, số ký gửi là KCTC12304BP) được nuôi cấy thứ cấp theo trình tự và liên tục trong tế bào CPK (cloned porcine kidney cell - tế bào thận lợn tách dòng), tế bào BK (bovine kidney cell - tế bào thận bò), tế bào PK (porcine kidney cell - tế bào thận lợn) và tế bào CPK. Kết quả là, thu được hiệu giá virus là khoảng $1 \times 10^{6.5}$ TCID₅₀/ml, và vì vậy, chủng vaccine chỉ thị

sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực được đặt tên là C-P50 được làm giảm độc lực CSFV BErns. Ngoài ra, đã xác nhận được rằng C-P50 được làm giảm độc lực CSFV BErns tạo ra các kháng thể ở lợn được tiêm vaccin, có hiệu quả trong việc chống lại sự xâm nhiễm virus từ bên ngoài. Vì vậy, có thể kết luận rằng vaccin này có vai trò như vaccin virus sốt lợn cổ điển. Hơn nữa, tỷ lệ sảy thai/chết non và lây truyền dọc qua bào thai ở lợn nái mang thai cũng giảm đáng kể so với vaccin thông thường.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực (C-P50 được làm giảm độc lực SFV Berns) thu được bằng cách nuôi cấy luân phiên và liên tục chủng vaccin virus sốt lợn Flc-LOM-BErns trong tế bào.

Chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực theo sáng chế được đặt tên là C-P50 được làm giảm độc lực CSFV BErns, được lưu trữ ở Viện nghiên cứu Sinh học và Công nghệ sinh học Hàn Quốc, được chấp nhận vào 8/12/2015, và có số đăng ký là KCTC18431P.

Theo sáng chế, chủng vaccin Flc-LOM-BErns được sử dụng để tạo ra vaccin C-P50 được làm giảm độc lực CSFV BErns không chỉ gồm chủng vaccin có số đăng ký KCTC12304BP, còn bao gồm chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn cổ điển được điều chế theo công bố đơn sáng chế sơ bộ Hàn Quốc số 2010-0121288, tức là, bằng cách thay thế gen CSFV (Classical Swine Fever Virus - Virus sốt lợn cổ điển) bằng gen Erns của BVDV (virus gây bệnh tiêu chảy ở bò). Vaccin Flc-LOM-BErns được sản xuất theo phương pháp này có vấn đề là hiệu giá thấp và ít được làm giảm độc lực.

Ngoài ra, theo sáng chế, việc nuôi cấy luân phiên và liên tục ở tế bào được thực hiện được thực hiện bằng cách nuôi cấy thứ cấp theo trình tự và liên tục trong tế bào CPK (cloned porcine kidney cell - tế bào thận lợn tách dòng), tế bào BK (bovine kidney cell - tế bào thận bò), tế bào PK (porcine kidney cell - tế bào thận lợn), và tế bào CPK (cloned porcine kidney cell - tế bào thận lợn tách dòng), nhưng không chỉ giới hạn ở trình tự nêu trên. Chủng vaccin thu được bằng cách nuôi cấy luân phiên và liên tục ở tế bào có hiệu giá nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{6,0}$ đến $1 \times 10^{7,0}$ TCID₅₀/ml, tốt hơn là $1 \times 10^{6,5}$ TCID₅₀/ml.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin dùng qua đường miệng chứa chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực, C-P50 được làm giảm độc lực CSFV Berns và chất mang được dùng.

Loại chất mang được dùng không bị giới hạn cụ thể, nhưng chất mang rắn thường được sử dụng để dùng thuốc qua đường miệng, ví dụ manitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, natri sacarin, bột tan, xenluloza, glucoza, sucroza, magie carbonat và các chất tương tự có thể được sử dụng. Cụ thể, nếu chế phẩm vaccin dùng qua đường miệng được điều chế thành dạng liều mỗi để có thể cho lợn ăn một cách dễ dàng, bột cho lợn ăn có thể là chất mang và chất dính (tinh bột bão hòa), chất tạo vị và các chất tương tự khác cũng có thể được thêm vào.

Nếu chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực được dùng ở dạng tiêm thông thường, thì nó có thể được tiêm vào cơ của lợn, là những đối tượng cần tiêm, hoặc được tiêm vào khu vực xung quanh để hàm lượng virus tối thiểu được tiêm vào là $1 \times 10^{3,0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ hoặc nhiều hơn, và tốt hơn là được tiêm một lần trong một khoảng thời gian nhất định, tùy theo thể trọng và tình trạng sức khỏe của lợn, là những đối tượng cần được tiêm cần tiêm (ngay cả khi tiêm một lần, kháng thể thúc đẩy phản ứng miễn dịch chống lại chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực).

Nếu chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực được dùng ở dạng mồi, thì dạng mồi này chứa hàm lượng virus tối thiểu là $1 \times 10^{5,0} \text{TCID}_{50}/2\text{ml}$ hoặc nhiều hơn được dùng cho lợn cần dùng chủng vaccin này, trước khi ăn, và tốt hơn là được dùng một lần trong một khoảng thời gian nhất định, tùy theo thể trọng và tình trạng sức khỏe của lợn cần dùng chủng vaccin này (ngay cả khi dùng một lần, kháng thể thúc đẩy phản ứng miễn dịch chống lại chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực).

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp điều chế chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn, C-P50 được làm giảm độc lực CSFV Berns (tốt hơn là, chủng vaccin được đăng ký theo số ký gửi là KCTC18431P), phương pháp này bao gồm các bước:

(a) tiêm vaccin Flc-LOM-BErs (tốt hơn là, chủng vaccin được đăng ký theo số ký gửi là KCTC12304BP) vào tế bào CPK (cloned porcine kidney cell - tế bào thận lợn tách dòng) và nuôi cấy thứ cấp liên tục để sinh trưởng virus đến hiệu giá nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{3,0}$ đến $1 \times 10^{4,0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, tốt hơn là, $1 \times 10^{3,5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$; (b) tiêm virus đã sinh trưởng trong bước (a) vào tế bào BK (bovine kidney cell - tế bào thận bò) và nuôi cấy thứ cấp liên tục để virus sinh trưởng cho đến khi đạt hiệu giá nằm trong khoảng từ

$1 \times 10^{4,0}$ đến $1 \times 10^{5,0}$ TCID₅₀/ml, tốt hơn là, $1 \times 10^{4,5}$ TCID₅₀/ml; (c) tiêm virus đã sinh trưởng trong bước (b) vào tế bào PK (porcine kidney cell - tế bào thận lợn) và nuôi cấy thứ cấp liên tục để virus sinh trưởng cho đến khi đạt hiệu giá nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{5,0}$ đến $1 \times 10^{6,0}$ TCID₅₀/ml, tốt hơn là, $1 \times 10^{5,5}$ TCID₅₀/ml; và (d) tiêm virus đã sinh trưởng trong bước (c) vào tế bào CPK (cloned porcine kidney cell - tế bào thận lợn tách dòng) và nuôi cấy thứ cấp liên tục để virus sinh trưởng cho đến khi đạt hiệu giá nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{6,0}$ đến $1 \times 10^{7,0}$ TCID₅₀/ml, tốt hơn là, $1 \times 10^{6,5}$ TCID₅₀/ml.

Ngoài ra, theo sáng chế, để tăng hiệu giá chủng vacxin một cách có hiệu quả, phương pháp còn có thể bao gồm bước xác định sự có mặt của vi khuẩn gây hư hỏng, virus gây hư hỏng hoặc hỗn hợp của chúng, và loại bỏ chúng trước khi thực hiện bước (a), trước khi thực hiện bước (b), trước khi thực hiện bước (c), và trước khi thực hiện bước (d). Vi khuẩn gây hư hỏng có thể là mycoplasma và virus gây hư hỏng có thể là virus canine parainfluenza -virus gây bệnh viêm phế quản ở chó. Tốt hơn là thực hiện kiểm tra mycoplasma và canine parainfluenza đối với tất cả các tế bào được dùng trong nuôi cấy thứ cấp liên tục và thực hiện kiểm tra mycoplasma và canine parainfluenza đối với chủng vacxin trong mỗi bước.

Ngoài ra, theo sáng chế, việc nuôi cấy thứ cấp liên tục trong bước (a) có thể được thực hiện cho đến khi virus sinh trưởng ít nhất 20 lần cấy chuyển (tốt hơn là, 20 lần), việc nuôi cấy thứ cấp liên tục trong bước (b) có thể được thực hiện cho đến khi virus sinh trưởng ít nhất là hơn 10 lần cấy chuyển (tốt hơn là, 10 lần), việc nuôi cấy thứ cấp liên tục trong bước (c) có thể được thực hiện cho đến khi virus sinh trưởng ít nhất là hơn 10 lần cấy chuyển (tốt hơn là, 10 lần), và việc nuôi cấy thứ cấp liên tục trong bước (d) có thể được thực hiện cho đến khi virus sinh trưởng ít nhất là hơn 10 lần cấy chuyển (tốt hơn là, 10 lần).

Theo một phương án của sáng chế, kỹ thuật C-ELISA được thực hiện trên mẫu huyết thanh lợn sử dụng protein tái tổ hợp Erns của virus sốt lợn và kháng thể đơn dòng của nó, rồi đo độ hấp thụ và tính %PC và so sánh với giá trị ngưỡng. Kết quả là, các mẫu huyết thanh của lợn bị nhiễm virus sốt lợn từ bên ngoài cho kết quả dương tính, và các mẫu huyết thanh của lợn được tiêm vacxin C-P50 được làm giảm độc lực CSFV Berns theo sáng chế cho kết quả âm tính, từ đó có thể xác định rằng việc phân biệt bằng huyết thanh học giữa lợn bị nhiễm virus sốt lợn từ bên ngoài và lợn được tiêm vacxin C-P50 được làm giảm độc lực CSFV Berns theo sáng chế là có thể thực hiện được.

Ngoài ra, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp phân biệt bằng huyết thanh học giữa lợn bị nhiễm virus sốt lợn từ bên ngoài và lợn được tiêm vắc xin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực, C-P50 được làm giảm độc lực CSFV Berns, (tốt hơn là, chủng vắc xin được lưu trữ theo số ký gửi KCTC18431P) bao gồm các bước:

(a) thêm đồng thời mẫu thử và kháng thể được đánh dấu bằng enzym vào đĩa bám kháng nguyên của virus sốt lợn để kháng thể và kháng thể được đánh dấu bằng enzym trong mẫu thử phản ứng cạnh tranh với nhau;

(b) thêm chất hiện màu vào đĩa ở bước (a) để thúc đẩy phản ứng enzym với kháng thể được đánh dấu bằng enzym;

(c) đo độ hấp thụ sau khi phản ứng enzym ở bước (b);

(d) tính giá trị %PC sử dụng độ hấp thụ được đo ở bước (c); và

(e) đánh giá kết quả, nếu giá trị %PC được tính trong bước (d) lớn hơn giá trị ngưỡng định trước thì lợn bị nhiễm virus sốt lợn từ bên ngoài, và nếu giá trị này nhỏ hơn giá trị ngưỡng thì lợn đã được dùng vắc xin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực.

Theo sáng chế, giá trị %PC trong bước (d) có thể được tính bằng phương trình 1 dưới đây, và giá trị ngưỡng định trước trong bước (e) có thể là 20.

[Phương trình 1]

Tỷ lệ cạnh tranh của đối chứng dương (%PC) = $\frac{[(\text{Độ hấp thụ trung bình của đối chứng âm (NC)} - \text{Độ hấp thụ của mẫu thử (OD)}) / \text{Độ hấp thụ trung bình của đối chứng âm (NC)}] \times 100}{1}$

Ngoài ra, enzym của kháng thể được đánh dấu bằng enzym là enzym đánh dấu cho phép định tính và định lượng sự tạo thành của phức hệ kháng nguyên-kháng thể được tạo ra, và, ví dụ, như β -glucuronidaza, β -D-glucosidaza, ureaza, peroxidaza, alkaline phosphatase, acetylcholinesterase, glycosyl oxidase, hexokinase, malat dehydrogenase, glucozo-6-phosphat dehydrogenase, invertase và các chất tương tự có thể được sử dụng, và tốt hơn là, peroxidaza có thể được sử dụng, nhưng không chỉ giới hạn ở đó. Enzym này có thể được liên hợp với kháng thể bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Ngoài ra, chất hiện màu có thể là chất để enzym liên hợp với kháng thể, và có thể thay đổi tùy theo loại enzym. Tuy nhiên, theo sáng chế, HRP (peroxidaza cải ngựa)-liên hợp kháng thể được sử dụng, và do đó, TMB (tetramethylbenzidine), là chất cho HRP

được sử dụng.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây sáng chế sẽ được mô tả chi tiết bằng các ví dụ. Tuy nhiên, nên hiểu rằng, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sẽ hiểu được rằng, các ví dụ được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa, và không có mục đích giới hạn phạm vi của sáng chế. Do đó, phạm vi của sáng chế sẽ được xác định bởi bộ yêu cầu bảo hộ kèm theo và tương đương.

Ví dụ 1: Điều chế chủng vacxin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực C-P50 được làm giảm độc lực CSFV BErns

Đầu tiên, chủng virus Flc-LOM-Berns (số ký gửi là KCTC12304BP) được điều chế bằng phương pháp được mô tả trong đơn sáng chế Hàn quốc đang xét nghiệm số 2010-0121288. Để tăng hiệu giá và làm giảm độc lực của virus Flc-LOM-Berns, các tế bào thích hợp để nuôi cấy thứ cấp virus được khảo sát nghiên cứu. Kết quả là tiến hành thử nghiệm một vài lần, virus chỉ thị sống của virus sốt lợn thu được trong suốt quá trình chuyển nhiễm và nuôi cấy thứ cấp trong các tế bào CPK (tế bào thận lợn tách dòng) có hiệu quả hơn so với trong tế bào PK (tế bào thận lợn) và tế bào BK (tế bào thận bò), và do đó, các tế bào CPK được chọn làm tế bào đầu tiên để nuôi cấy thứ cấp.

Để tiếp tục tăng hiệu giá của virus Flc-LOM-Berns, đầu tiên phải loại bỏ mycoplasma gây hư hỏng cho virus Flc-LOM-Berns đã điều chế bằng phương pháp sau đây. Đầu tiên, cho MRA (Mycoplasma removal agent – chất loại bỏ mycoplasma, MPbio, đăng ký số. 3050044, kích thước đơn vị 5 ml (50 µg/ml)) tại nồng độ 0,5 µg/ml vào các tế bào và virus với mycoplasma gây hư hỏng, và nuôi cấy. Tức là, với bình thót cổ 25cm², nếu 10 ml môi trường nuôi cấy được sử dụng thì 0,1 mL dung dịch MRA được thêm vào. Mỗi lần, khi thay môi trường nuôi cấy hoặc cấy chuyển, MRA lại được thêm vào môi trường nuôi cấy tại nồng độ 0,5 µg/ml và được nuôi cấy cho mỗi lần. Với mỗi 4 lần cấy chuyển liên tục, tiến hành PCR để xác nhận mức độ nhiễm mycoplasma. Sau 4 lần cấy chuyển liên tục, MRA không được thêm vào nữa và các tế bào được nuôi cấy cho đến khi 4 hoặc 5 lần cấy chuyển. Sau đó, mức độ nhiễm mycoplasma được xác nhận bằng cách thực hiện phản ứng PCR để xác định có tái nhiễm mycoplasma.

Virus gây bệnh viêm phế quản ở chó (canine parainfluenza) gây hỏng cho chủng

virut Flc-LOM-BERns cũng được loại bỏ bằng cách sử dụng kháng huyết thanh tăng miễn dịch. Để tạo ra kháng huyết thanh tăng miễn dịch, virut canine parainfluenza được trộn với tá dược Freund không hoàn toàn cùng với dầu khoáng và được tiêm vào thỏ 6 lần với lượng khoảng 2 ml 1 tuần trong tổng số 6 tuần để tạo ra kháng huyết thanh tăng miễn dịch. Sau đó, kháng huyết thanh tăng miễn dịch được trộn với virut gây hồng với tỷ lệ 1:1 và được ủ trong 1 giờ tại 37°C trong tủ cấy. Sau đó, các tế bào được tạo ra được rửa hai lần với PBS, và hỗn hợp dung dịch gồm virut và kháng huyết thanh được sử dụng để làm nhạy hóa tế bào trong tủ cấy 37°C trong 2 giờ, và sau đó loại bỏ hỗn hợp dung dịch mà được sử dụng để làm nhạy hóa. Các tế bào được làm nhạy lên đến 4 lần cấy chuyển liên tiếp bằng phương pháp nuôi cấy tế bào từ 3 đến 5 ngày trong môi trường nuôi cấy thích hợp. Đối với mỗi lần gây làm nhạy, kháng huyết thanh được trộn mới và được sử dụng để làm nhạy hóa, và dịch nổi virut được thu hồi sau mỗi lần cấy chuyển được cho đi qua đến kiểm tra gen virut canine parainfluenza.

Khi chuyển nhiễm tế bào CPK, bắt buộc phải loại bỏ virut chỉ thị sống gây bệnh sốt lợn trong 10 lần cấy chuyển ra khỏi tế bào, và tiến hành các thử nghiệm cần thiết đối với tế bào PK và BK trước khi sử dụng chúng.

Sau đó, các tế bào được nuôi cấy trong khoảng 24 giờ để cho phép nuôi cấy một lớp tế bào CPK đến khoảng 80%, và sau đó loại bỏ dịch nổi nuôi cấy tế bào, rửa ba lần với PBS, được nhiễm chủng virut Flc-LOM-BERns (số ký gửi: KCTC12304BP), và được làm nhạy trong 1 giờ trong tủ cấy CO₂ 37°C. Sau đó, loại bỏ dung dịch được dùng để làm nhạy hóa, bổ sung thêm môi trường nuôi cấy, và sau đó để cho virut sinh trưởng trong tủ cấy CO₂ 37°C trong 72 giờ, và thu lấy dịch nổi.

Do không có tác động gây bệnh tế bào (CPE), sự sinh trưởng của virut được xác nhận bằng cách tiến hành thử nghiệm huỳnh quang (fluorescent assay - FA), kỹ thuật liên kết peroxidaza (PLA), và RT-PCR.

Xác định bằng thử nghiệm huỳnh quang

Là một chất phản ứng, kháng thể đơn dòng đặc hiệu E2 sốt lợn, kháng thể đơn dòng đặc hiệu virut sốt lợn và kháng thể đa dòng đặc hiệu kháng IgG chuột được đánh dấu bằng FITC (lấy từ thỏ, dê), và kháng thể đơn dòng đặc hiệu BVDV (bovine viral diarrhea virus-virut gây bệnh tiêu chảy ở bò) Erns và kháng thể đơn dòng kháng IgG dê được đánh dấu bằng FITC được chuẩn bị.

Đầu tiên, kháng thể đơn dòng đặc hiệu E2 sốt lợn hoặc kháng thể đa dòng đặc hiệu, và kháng thể đơn dòng đặc hiệu BVDV (bovine viral diarrhea virus- virus gây bệnh tiêu chảy ở bò) Erns được pha loãng với PBS tới nồng độ được sử dụng, được phản ứng với các 15 tế bào PK trong 40 phút tại 37°C, được rửa 3 đến 5 lần với PBS, và sau đó, (kháng thể đơn dòng) kháng FITC chuột hoặc (kháng thể đa dòng) kháng FITC thỏ và FITC dê được pha loãng 200 lần và được phản ứng tại 37°C trong 40 phút. Sau đó, các tế bào được rửa 3 đến 5 lần với PBS và được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Kết quả là, virus Flc-LOM-BErns phản ứng đặc hiệu với kháng thể đơn dòng kháng CSFV E2 và kháng thể đơn dòng kháng BVDV Erns, và quan sát được hiện tượng phát huỳnh quang màu xanh trong tế bào chất.

Xác định bằng PLA (kỹ thuật liên kết peroxidaza)

Là một chất phản ứng, kit ABC (Vector PK-4000), kháng thể đơn dòng đặc hiệu virus sốt lợn, kháng thể đơn dòng đặc hiệu BVDV (virus gây bệnh tiêu chảy ở bò) Erns, kháng thể kháng IgG chuột được biotin hóa, và DAB (3,3'-diaminobenzidine) được chuẩn bị.

Đầu tiên, kháng thể đơn dòng đặc hiệu virus sốt lợn và kháng thể đơn dòng đặc hiệu BVDV (virus gây bệnh tiêu chảy ở bò) Erns được pha loãng với PBS đến nồng độ cần sử dụng, phản ứng với 15 tế bào PK trong 40 phút tại 37°C, và rửa 3 đến 5 lần với PBS, và sau đó, kháng thể kháng IgG chuột đã biotin hóa được pha loãng và phản ứng tại 37°C trong 40 phút (* kháng thể kháng IgG chuột đã biotin hóa trong kit ABC là PBS 10mL + một giọt dung dịch *kháng thể kháng IgG chuột đã biotin hóa (sản phẩm khác) được pha loãng 200 lần). Sau khi phản ứng, các kháng thể được rửa từ 3 đến 5 lần với PBS, và dung dịch AB được phản ứng tại 37°C trong 40 phút (*dung dịch AB là PBS 10mL + 2 giọt dung dịch A + 2 giọt dung dịch B * Nó được chuẩn bị từ trước bởi vì nó phải phản ứng trong từ 20 đến 40 phút tại nhiệt độ phòng) và được rửa từ 3 đến 5 lần với PBS, và sau đó dung dịch cơ chất DAB được cho vào và phản ứng tại nhiệt độ phòng trong 10 phút (*10X DAB là 0,6g DAB + 100mL DW *dung dịch cơ chất DAB là 10X DAB 1mL + PBS 9mL + H₂O₂(1000X) 10μL).

Sau đó, các kháng thể được rửa 3 lần với nước pha loãng và được quan sát dưới kính hiển vi. Kết quả (FIG.1) cho thấy rằng virus Flc-LOM-BErns phản ứng đặc hiệu với kháng thể đơn dòng kháng CSFV E2 và kháng thể đơn dòng kháng BVDV Erns, và do

đó quan sát thấy khu vực xung quanh các tế bào được nhuộm màu nâu.

Xác định bằng RT-PCR

Là một chất phản ứng, kit chẩn đoán kháng nguyên virus sốt lợn (RT-PCR trộn sẵn, được sản xuất bởi Median Diagnostics) và bộ kit tách ARN được chuẩn bị.

Sau đó, tách ARN virus sử dụng bộ kit tách ARN, và ARN được thêm vào RT-PCR trộn sẵn và sau đó tiến hành RT-PCR, tiếp theo là đổ gel để xác định kích thước bằng (mỗi có trong RT-PCR trộn sẵn, và vùng 5'NCR được khuếch đại đến kích thước 421 bp) (FIG. 2).

Ví dụ 1-2: Nuôi cấy thứ cấp liên tục trong tế bào BK, tế bào PK, và tế bào CPK

Để tăng hiệu giá của virus được nuôi cấy trong tế bào CPK trong ví dụ 1-1 và đã sinh trưởng trong tới 20 lần cấy chuyển, tế bào BK được nuôi cấy liên tục từ 21 lần cấy chuyển đến 30 lần cấy chuyển trong cùng điều kiện nuôi cấy như trong ví dụ 1-1, và kết quả là, hiệu giá tăng từ $1 \times 10^{1.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ đến $1 \times 10^{3.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ và đạt đến $1 \times 10^{4.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Sau đó, một lần nữa cho tế bào PK sinh trưởng từ 31 lần cấy chuyển đến 40 lần cấy chuyển trong cùng điều kiện nuôi cấy như trong ví dụ 1-1, và kết quả là, hiệu giá tăng từ $1 \times 10^{1.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ đến $1 \times 10^{4.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ và đạt đến $1 \times 10^{5.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Cuối cùng, quay trở lại các tế bào CPK, cho tế bào CPK sinh trưởng từ 41 lần cấy chuyển đến 50 lần cấy chuyển trong cùng điều kiện nuôi cấy như trong ví dụ 1-1, và kết quả là, hiệu giá tăng từ $1 \times 10^{1.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ đến $1 \times 10^{5.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ và đạt đến $1 \times 10^{6.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Ngoài ra, như trong ví dụ 1-1, thử nghiệm mycoplasma và virus canine parainfluenza được tiến hành với mỗi lần nuôi cấy tế bào và được sử dụng chỉ khi kết quả thí nghiệm ra âm tính. Do đó, đã xác định được rằng đã thu được hiệu giá cao đủ để được sử dụng làm vacxin (FIG. 3).

Theo đó, khi virus được nuôi cấy liên tục và lần lượt trong các tế bào khác nhau, hiệu giá virus cao hơn so với hiệu giá virus được nuôi cấy liên tục trong một loại tế bào duy nhất. Theo ví dụ so sánh, khi virus được nuôi cấy thứ cấp liên tục chỉ trong tế bào CPK lên đến 50 lần cấy chuyển, hiệu giá lớn nhất vẫn giữ ở mức $1 \times 10^{4.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ (FIG. 4a), khi virus được nuôi cấy thứ cấp liên tục trong tế bào BK từ 21 lần cấy chuyển đến 50 lần cấy chuyển, hiệu giá lớn nhất giữ ở mức $1 \times 10^{4.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ (FIG. 4b), và khi virus được nuôi cấy thứ cấp liên tục trong tế bào PK từ 21 lần cấy chuyển đến 50 lần cấy

chuyển, hiệu giá lớn nhất giữ ở mức $1 \times 10^{4.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ (Fig. 4b). Tiếp theo, khi virus được nuôi cấy trong tế bào CPK lên đến 20 lần cấy chuyển và được nuôi cấy trong tế bào BK lên đến 30 lần cấy chuyển, tiếp tục lại được nuôi cấy thứ cấp trong tế bào PK từ 31 lần cấy chuyển đến 50 lần cấy chuyển, hiệu giá lớn nhất là $1 \times 10^{5.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ (Fig. 4d), nhưng nó không đạt được $1 \times 10^{6.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$.

Do đó, xác định được rằng hiệu giá virus đặc biệt được khuếch đại đến $1 \times 10^{6.5} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, khi virus được nuôi cấy liên tục và lần lượt trong tế bào CPK, tế bào BK, tế bào PK và tế bào CPK, và chủng vaccine của virus sốt lợn đã khuếch đại được đặt tên là CP50 được làm giảm độc lực CSFV BErns (số ký gửi KCTC18431P).

Ví dụ điều chế: Chế phẩm dạng mồi

Chủng vaccine có hiệu giá từ $1 \times 10^3 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ đến $1 \times 10^6 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, được điều chế trong suốt quá trình điều chế chủng vaccine C-P50 được làm giảm độc lực CSFV BErns trong ví dụ 1, được điều chế thành dạng mồi có thể dùng qua đường miệng cho lợn tại mỗi hiệu giá. Các thành phần của dạng mồi được điều chế theo cách trong đó 85% trọng lượng là bột thức ăn cho lợn, 14% trọng lượng là chất kết dính (tinh bột bảo hòa) và 1% trọng lượng là chất tạo vị táo được chọn làm thành phần của dạng mồi thông qua ba thử nghiệm vị ngon và mặt ngoài của chế phẩm được phủ lớp dầu cọ. Tiến hành sấy khô chế phẩm tại 56°C trong 5 giờ và tại nhiệt độ phòng trong 1 ngày. Để điều chế dạng mồi, bột thức ăn cho lợn được đặt vào khuôn ép để tạo ra dạng mồi hình vuông, và cho 2 ml vaccine chỉ thị sống nêu trên vào trống hộp đóng gói vinyl và hộp được đậy kín lại. Điều này cho phép vinyl tách ra khi lợn rùng, lợn nuôi, lợn đen hoặc lợn nuôi thông thường nhai sao cho dạng mồi và vaccine có thể được tiêu thụ cùng lúc.

Ví dụ 2: Thử nghiệm về hiệu quả của chủng vaccine chỉ thị sống của virus sốt lợn, C-P50 được làm giảm độc lực CSFV BErns

Ví dụ 2-1: thực hiện thử nghiệm trung hòa để đo kháng thể virus sốt lợn được tạo ra trong lợn *in vivo*

Khi lợn được tiêm trong cơ sử dụng ống tiêm có chủng vaccine C-P50 được làm giảm độc lực CSFV BErns (số ký gửi KCTC18431P) thu được trong ví dụ 1, hoặc được dùng qua đường miệng cùng với dạng mồi như trong ví dụ điều chế, thử nghiệm trung hòa kết hợp với peroxidaza (thử nghiệm liên kết trung hòa peroxidaza-NPLA) được sử

dụng để nghiên cứu tỷ lệ hình thành kháng thể chống lại chủng vaccin sốt lợn ở lợn.

Đầu tiên, là một chất phản ứng, kit ABC (Vectơ PK-4000), kháng thể đơn dòng đặc hiệu virus sốt lợn, kháng thể đơn dòng đặc hiệu BVDV (virus gây bệnh tiêu chảy ở bò) Erns, kháng thể kháng IgG chuột được biotin hóa, và DAB được chuẩn bị.

Sau đó, huyết thanh lợn làm đối chứng âm được ủ với chủng vaccin và huyết thanh lợn được ủ với chủng vaccin được pha loãng liên tiếp 2 lần trong đĩa 96 giếng cho mỗi bước sử dụng 50µl môi trường (môi trường alpha-MEM) chỉ cho các kháng sinh được thêm vào. Sau khi pha loãng, 50 µl virus sốt lợn dùng cho thử nghiệm trung hòa có hiệu giá $1 \times 10^2 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ được thêm vào trong các giếng chứa huyết thanh lợn đã pha loãng. Sau khi làm nhạy hóa tại 37°C trong 60 phút, thêm tế bào PK vào các giếng và ủ trong 3 ngày tại 5% CO₂, tại 37°C, sau đó tiến hành nhuộm PLA.

Kháng thể đơn dòng đặc hiệu virus sốt lợn được pha loãng với PBS đến nồng độ cần sử dụng, được phản ứng với các 15 tế bào PK trong 40 phút tại 37°C, và được rửa từ 3 đến 5 lần với PBS, và sau đó, kháng thể kháng IgG chuột được biotin hóa được pha loãng và được phản ứng tại 37°C trong 40 phút (* kháng IgG chuột đã biotin hóa trong kit ABC là PBS 10mL + một giọt dung dịch *kháng IgG chuột đã biotin hóa (sản phẩm khác) được pha loãng 200 lần).

Sau khi phản ứng, các kháng thể được rửa từ 3 đến 5 lần với PBS, và dung dịch AB được phản ứng tại 37°C trong 40 phút (*dung dịch AB là PBS 10mL + 2 giọt dung dịch A + 2 giọt dung dịch B * Nó được chuẩn bị từ trước bởi vì nó phải phản ứng trong từ 20 đến 40 phút tại nhiệt độ phòng) và được rửa từ 3 đến 5 lần với PBS, và sau đó dung dịch cơ chất DAB được tải và phản ứng tại nhiệt độ phòng trong 10 phút (*10X DAB là 0,6g DAB + 100mL DW *dung dịch cơ chất DAB là 10X DAB 1mL + PBS 9mL + H₂O₂(1000X) 10µL).

Sau đó, các kháng thể được rửa 3 lần với nước pha loãng và được quan sát dưới kính hiển vi. Kết quả là, đối với các tế bào trong giếng mà trong đó virus sốt lợn sinh trưởng, khu vực xung quanh các tế bào được nhuộm màu nâu, và hiệu giá kháng thể được tính toán bằng cách đọc các giếng không bị nhuộm. Theo tổ chức thú y thế giới (IEO), quy định rằng khi hiệu giá kháng thể virus sốt lợn trong lợn *in vivo* là lớn hơn hoặc bằng 10 lần theo phương pháp thử nghiệm trung hòa, chúng được xếp vào loại dương tính với kháng thể sốt lợn, là khi hiệu giá vượt quá 32 lần, lợn có thể được bảo vệ nếu chúng bị nhiễm virus sốt lợn.

Theo kết quả của thử nghiệm, đối với mỗi cá thể lợn con được chủng ngừa vaccin với chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực bằng cách tiêm trong cơ với mỗi hiệu giá, trước khi tiêm vaccin, chúng âm tính với kháng thể, và sau 1 tuần hoặc 1 lần tiêm vaccin, đã phát hiện ra rằng hiệu giá tăng lên khoảng 2 đến 8 lần trong $1 \times 10^{1.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, tăng khoảng 4 đến 16 lần trong $1 \times 10^{2.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, và tăng khoảng từ 16 đến 32 lần trong $1 \times 10^{3.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Sau 2 tuần tiêm vaccin, đã phát hiện ra rằng hiệu giá tăng lên khoảng 128 lần trong $1 \times 10^{1.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, tăng lên khoảng 128 đến 256 lần trong $1 \times 10^{2.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, và tăng lên khoảng 256 đến 512 lần trong $1 \times 10^{3.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ (bảng 1).

Ngoài ra, chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực được điều chế thành các dạng môi, và những cá thể lợn con được chủng ngừa vaccin với chủng bằng cách dùng qua đường miệng là âm tính với kháng thể trước khi chủng ngừa vaccin. Cho đến 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần và 4 tuần chủng ngừa vaccin, hiệu giá kháng thể là lượng khoảng $1 \times 10^{3.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ và $1 \times 10^{4.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ chứng tỏ là âm tính. Trong số những cá thể được chủng ngừa vaccin bằng cách dùng qua đường miệng cho thấy âm tính với kháng thể trong 1 tuần và 2 tuần sau khi chủng ngừa vaccin với hiệu giá là $1 \times 10^{5.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, nhưng tại 3 tuần, có 2 cá thể cho thấy là âm tính và 5 cá thể cho thấy là dương tính trong số 7 cá thể, và tại 4 tuần, toàn bộ 7 cá thể tạo ra kháng thể gấp từ 16 đến 64 lần. Ngoài ra, trong số những cá thể được tiêm vaccin, toàn bộ 7 cá thể đều cho thấy hiệu giá kháng thể gấp 16 đến 64 lần tại 3 tuần chủng ngừa vaccin trong $1 \times 10^{6.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ (bảng 2).

Ví dụ 2-2: tiến hành tiêm chủng

Trong ví dụ 2-1, việc tiêm chủng được tiến hành để xem liệu kháng thể được tạo ra trong lợn là do chủng vaccin được cung cấp thông thường bằng tiêm trong cơ hoặc dùng qua đường miệng trong ví dụ 2-1 thể hiện chức năng của nó.

Virus sốt lợn được tiêm chủng là YC11WC (chủng Yeoncheon), $1 \times 10^{5.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ được tiêm bằng cách tiêm trong cơ với hàm lượng là 2ml và tiêm trong mũi với hàm lượng là 2ml. Chủng Yeoncheon hiện đã được phân lập từ lợn rừng vào năm 2011, và cũng được phát hiện ra là tác nhân gây bệnh giống như virus thuộc kiểu gen 2.1b, chẳng hạn như dịch virus sốt lợn trong nước được xảy ra vào những năm 2000.

Theo kết quả quan sát lâm sàng sau khi tiêm chủng, từ việc quan sát trong 21 ngày sau khi tiêm chủng ở những cá thể lợn con được tiêm vaccin với chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực bằng cách tiêm trong cơ đối với mỗi hiệu giá, phát hiện ra rằng không quan sát thấy trường hợp tử vong nào trong suốt toàn bộ thời gian quan sát. Tuy nhiên, trong các nhóm được tiêm với hiệu giá là $1 \times 10^{1.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ và $1 \times 10^{2.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, xuất hiện đáp ứng sốt, chán ăn, giảm bạch cầu và tương tự, chứng tỏ rằng chúng không hoàn toàn được bảo vệ. Ngoài ra, trong nhóm được tiêm với hiệu giá là $1 \times 10^{3.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ hoặc cao hơn, không quan sát thấy triệu chứng lâm sàng nào cụ thể cũng như hiện tượng tử vong sau khi tiêm vaccin (bảng 1).

Theo đó, đã xác định được rằng, khi các cá thể được tiêm với hiệu giá là $1 \times 10^{1.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, kháng thể được tạo ra, tuy nhiên liều dùng ngoài đường tiêu hóa nhỏ nhất có thể bảo vệ khỏi virus là $1 \times 10^{3.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ hoặc cao hơn khi chúng bị nhiễm.

Ngoài ra, 3 cá thể trong nhóm đối chứng âm xuất hiện triệu chứng lâm sàng (triệu chứng về thần kinh, đáp ứng sốt, giảm bạch cầu, chán ăn, tê liệt ở lưng, nốt đỏ trên cơ thể, v.v.) sau khi thử thách, và lần lượt chết sau 12 ngày, 14 ngày, và 18 ngày thử thách. Thậm chí sau khi mổ xác để khám nghiệm, 3 cá thể trong nhóm đối chứng âm xuất hiện xuất huyết lá lách, xuất huyết thận, xuất huyết hạch bạch huyết màng treo ruột. Tổ chức thú y thế giới (IEO) có quy định rằng nếu hiệu giá kháng thể sốt lợn là lớn hơn hoặc bằng 10 lần trong lợn *in vivo* theo phương pháp thử nghiệm trung hòa, nó có thể bảo vệ chống lại virus ngay cả khi chúng bị nhiễm với virus sốt lợn.

Trong khi đó, theo quan sát trong 21 ngày khi thử thách tiêm với các thể lợn con được tiêm vaccin với chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực được điều chế dưới dạng môi cho mỗi hiệu giá, phát hiện ra rằng nhóm được tiêm với hiệu giá $1 \times 10^{5.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ rõ ràng được bảo vệ khỏi virus sốt lợn mà không xuất hiện triệu chứng lâm sàng và hiện tượng tử vong nào. Tuy nhiên nhóm không được tiêm với hiệu giá là $1 \times 10^{3.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ và $1 \times 10^{4.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ thấy xuất hiện các triệu chứng lâm sàng bao gồm đáp ứng sốt, chán ăn, giảm bạch cầu, tê liệt ở lưng, triệu chứng về thần kinh, nốt đỏ trên cơ thể và hiện tượng tương tự. Tương tự, trong nhóm không được tiêm với hiệu giá $1 \times 10^{3.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, có 4 cá thể bị chết trong số 7 cá thể, và trong nhóm không được tiêm với hiệu giá là $1 \times 10^{4.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$, có 2 cá thể bị chết trong số 7 cá thể (bảng 2).

Kết quả cuối cùng liên quan đến tỷ lệ hình thành kháng thể, tỷ lệ thử thách và sự

khác biệt về huyết thanh ở lợn được tiêm vaccin virus sốt lợn được làm giảm độc lực theo sáng chế (C-P50 được làm giảm độc lực CSFV BErns) bằng cách tiêm trong cơ hoặc dùng qua đường miệng như được trình bày trong bảng 3.

Bảng 1: Đánh giá việc tạo ra hiệu giá kháng thể có nồng độ nhỏ nhất tạo ra và hiệu quả bảo vệ sau khi tiêm cho lợn con chủng vaccin chỉ thị sống virus sốt lợn với mỗi hiệu giá bằng cách tiêm trong cơ

Nhóm	TCID ₅₀ /ml/ liều	Lợn số	Hiệu giá kháng thể sốt lợn			Quan sát sau 21 ngày thử thách	
			Trước khi tiêm vaccin	1 tuần sau khi tiêm vaccin	2 tuần sau khi tiêm vaccin	Triệu chứng lâm sàng	Tử vong
1	1x10 ¹	1-1	<2	2	8	F/A/L	Không áp dụng được
		1-2	<2	2	8	F/A/L	Không áp dụng được
		1-3	<2	4	16	A/L	Không áp dụng được
		1-4	<2	8	16	F/A	Không áp dụng được
		1-5	<2	4	8	A/L	Không áp dụng được
2	1x10 ²	2-1	<2	8	16	F/L	Không áp dụng được
		2-2	<2	16	64	Không áp dụng được	Không áp dụng được
		2-3	<2	4	8	F/L	Không áp dụng được
		2-4	<2	8	32	Không áp dụng được	Không áp dụng được
		2-5	<2	16	64	Không áp dụng được	Không áp dụng được

3	1×10^3	3-1	<2	16	256	Không áp dụng được	Không áp dụng được
		3-2	<2	32	128	Không áp dụng được	Không áp dụng được
		3-3	<2	16	256	Không áp dụng được	Không áp dụng được
		3-4	<2	16	64	Không áp dụng được	Không áp dụng được
		3-5	<2	32	128	Không áp dụng được	Không áp dụng được

F: sốt cao 40°C, A: chán ăn, L: giảm bạch cầu, R: tê liệt ở lưng, C: triệu chứng về thần kinh, D: tiêu chảy, S: nốt đỏ trên cơ thể

Bảng 2: Đánh giá việc tạo ra hiệu giá kháng thể có nồng độ nhỏ nhất tạo ra và hiệu quả bảo vệ sau khi tiêm cho lợn con chủng vaccin chỉ thị sống virus sốt lợn với mỗi hiệu giá được điều chế theo dạng môi

Nhóm	TCID ₅₀ /ml/liều	Lợn số.	Hiệu giá kháng thể sốt lợn					Quan sát sau 21 ngày thử thách	
			Trước khi tiêm vaccin	1 tuần sau khi tiêm vaccin (7 ngày)	2 tuần sau khi tiêm vaccin (14 ngày)	3 tuần sau khi tiêm vaccin (21 ngày)	4 tuần sau khi tiêm vaccin (28 ngày)	Triệu chứng lâm sàng	Tử vong
1	1×10^3	1-1	<4	<4	<4	<4	<4	F/A/L/R	1/1
		1-2	<4	<4	<4	<4	<4	F/A/L/C	1/1
		1-3	<4	<4	<4	<4	<4	F/A/L/R/D	0/1
		1-4	<4	<4	<4	<4	<4	F/A/L/S	0/1
		1-5	<4	<4	<4	<4	<4	F/A/L/S	1/1
		1-6	<4	<4	<4	<4	<4	F/A/L/R	1/1
		1-7	<4	<4	<4	<4	<4	F/A/L/R/D	0/1

2	1×10^4	2-1	<4	<4	<4	<4	4	F/A/L/C	0/1
		2-2	<4	<4	<4	<4	8	F/A/L/C	0/1
		2-3	<4	<4	<4	<4	<4	F/A/L/S/D	1/1
		2-4	<4	<4	<4	<4	<4	F/A/L/S/R	0/1
		2-5	<4	<4	<4	<4	8	F/A/L/R/C	0/1
		2-6	<4	<4	<4	<4	4	F/A/L/R/S	0/1
		2-7	<4	<4	<4	<4	<4	F/A/L/R/C	1/1
3	1×10^5	3-1	<4	<4	<4	16	32	Không áp dụng được	0/1
		3-2	<4	<4	<4	8	32	Không áp dụng được	0/1
		3-3	<4	<4	<4	4	16	Không áp dụng được	0/1
		3-4	<4	<4	<4	16	64	Không áp dụng được	0/1
		3-5	<4	<4	<4	4	32	Không áp dụng được	0/1
		3-6	<4	<4	<4	8	32	Không áp dụng được	0/1
		3-7	<4	<4	<4	16	32	Không áp dụng được	0/1
4	1×10^6	4-1	<4	<4	8	64	128	Không áp dụng được	0/1
		4-2	<4	<4	8	32	256	Không áp dụng được	0/1
		4-3	<4	<4	8	64	256	Không áp dụng được	0/1
		4-4	<4	<4	16	64	128	Không áp dụng được	0/1
		4-5	<4	<4	8	32	256	Không áp dụng được	0/1

		4-6	<4	<4	<4	32	64	Không áp dụng được	0/1
		4-7	<4	<4	8	64	128	Không áp dụng được	0/1

F: sốt cao 40°C, A: chán ăn, L: giảm bạch cầu, R: tê liệt ở lưng, C: triệu chứng về thần kinh, D: tiêu chảy, S: nốt đỏ trên cơ thể

Bảng 3

Đường dùng vaccin	Lượng vaccin	Số lần tiêm vaccin	Ngày mà kháng thể được tạo ra sau khi tiêm vaccin	Hiệu giá kháng thể	Tỷ lệ bảo vệ chống lại thử thách tiêm chủng
Tiêm trong cơ	1×10^3 TCID ₅₀ /ml/liều	Một lần	14 ngày	64-256 lần	100%
Dùng qua đường miệng	1×10^5 TCID ₅₀ /ml/liều	Một lần	28 ngày	16-64 lần	100%

Ví dụ 3: Phân biệt bằng huyết thanh học

Các điều kiện C-ELISA dùng để phân biệt huyết thanh nhiễm virus sốt lợn từ bên ngoài được sử dụng protein tái tổ hợp Erns của virus sốt lợn và kháng thể đơn dòng. ELISA đối với Erns của virus sốt lợn là kit ELISA dùng để phát hiện huyết thanh nhiễm virus sốt lợn từ bên ngoài, và do vùng Erns trên chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được thay thế bằng vùng BVDV Erns, không phát hiện ra kháng thể Erns nào trong số các cá thể được tiêm với chủng vaccin chỉ thị sống. Tuy nhiên, do kháng thể Erns sốt lợn được sinh ra trong cá thể bị nhiễm virus sốt lợn bên ngoài, ELISA Erns sốt lợn sử dụng nguyên lý mà khi vaccin chỉ thị sống sốt lợn được sử dụng chỉ có huyết thanh nhiễm virus bên ngoài được phát hiện là dương tính.

Nồng độ phủ protein tái tổ hợp, yếu tố pha loãng huyết thanh, nồng độ huyết thanh thứ cấp, và ngưỡng giới hạn được xác định sử dụng huyết thanh nhiễm virus từ bên ngoài và huyết thanh được tiêm vaccin chỉ thị sống, và huyết thanh âm tính.

Tiến hành ELISA đối với Erns của virus sốt lợn như sau (FIG. 5). Đầu tiên,

protein tái tổ hợp Erns của virus sốt lợn được phủ lên trên đĩa polysorb, đĩa này là đĩa ELISA, tại nồng độ 0,0125 µg/giếng theo lượng là 100 µl mỗi giếng và được phản ứng trong tủ cấy 37°C trong 1 giờ. Sau phản ứng, đĩa được rửa 3 lần với PBST (0,1% Tween 20), cho thêm kháng thể đơn dòng Erns virus sốt lợn liên hợp với HRP (C-Erns 1) tại nồng độ 5 µg/giếng theo lượng là 100 µl một giếng và phản ứng trong tủ cấy 37°C trong 1 giờ.

Sau phản ứng, đĩa được rửa 3 lần với PBST (0,1% Tween 20), chất hiện màu (TMB) được thêm vào để kiểm tra màu trong 10 phút, và đo giá trị OD với đầu đọc ELISA tại 450 nm. Tính toán giá trị %PC để xác định âm tính và dương tính theo phương trình là $\%PC = (NC-OD)/NC * 100$, và khi giá trị % PC lớn hơn hoặc bằng 20, nó được xác định là dương tính.

Kết quả là, 84 cá thể lợn âm tính với hiệu giá kháng thể virus sốt lợn thể hiện kết quả âm tính đối với tất cả các cá thể, và đối với 31 cá thể lợn được tiêm với chủng C-P50 được làm giảm độc lực CSFV Berns theo sáng chế cho thấy các kết quả âm tính với tất cả các cá thể (bảng 4). Ngược lại, trong 75 cá thể lợn được tiêm với chủng vacxin LOM và 43 cá thể lợn được tiêm với virus sốt lợn từ bên ngoài cho thấy dương tính với tất cả các cá thể (bảng 4). Do đó, nó được xác nhận rằng lợn được tiêm với C-P50 được làm giảm độc lực CSFV Berns theo sáng chế có thể đóng vai trò phân biệt lây nhiễm trong động vật được tiêm vacxin.

Bảng 4

Phân biệt bằng huyết thanh học sử dụng kit C-ELISA đối với Erns của virus sốt lợn

Huyết thanh lợn cho mỗi nhóm	Số lượng lợn	Phân biệt bằng huyết thanh (ELISA đối với CSFV Erns)
Lợn âm tính với hiệu giá kháng thể sốt lợn	84	Tất cả các cá thể đều cho thấy âm tính
Lợn được tiêm chủng P50(KCTC18431P) được làm giảm độc lực CSFV Berns	31	Tất cả các cá thể đều cho thấy âm tính
Lợn được tiêm vacxin LOM	75	Tất cả các cá thể đều cho thấy dương tính
Lợn được tiêm với virus sốt lợn bên ngoài	43	Tất cả các cá thể đều cho thấy dương tính

Ví dụ 4: Tiến hành RT-PCR trong các cơ quan với lây truyền dọc qua bào thai

Thử nghiệm sau đây được thực hiện để xác định liệu virus được lây truyền dọc từ

lợn nái mang thai cho thai nhi, khi các lợn nái được tiêm với vaccin C-P50 được làm giảm độc lực CSFV BErns theo sáng chế (số ký gửi là KCTC18431P), chủng vaccin LOM tồn tại và chủng vaccin Flc-Lom-Berns tồn tại trong giai đoạn mang thai sớm hoặc giữa thai kì.

Đầu tiên, hai lợn nái mang thai được tiêm chủng trong giai đoạn mang thai sớm và giữa thai kì được lựa chọn ngẫu nhiên cho mỗi nhóm tiêm vaccin, và tiến hành mổ xác lợn con được sinh từ lợn nái, và mổ xác bào thai sảy thai/chết non để xác định sự có mặt của virus bằng cách thu lấy lá lách, thận, tim, hạch hạnh nhân, hạch bạch huyết màng treo ruột, phổi và mô não, là những cơ quan quan trọng, và được khuếch đại với RT-PCR.

Đầu tiên, là một chất phản ứng, kit chẩn đoán kháng nguyên sốt lợn (RT-PCR trộn sẵn, được sản xuất bởi Median Diagnostics) và kit tách ARN được chuẩn bị. Sau đó, các cơ quan khác nhau được tạo huyền phù, và để tách ARN tổng số ra khỏi dịch lỏng huyền phù kit tách ARN được sử dụng để tách ARN virus. Sau đó, ARN được thêm vào RT-PCR trộn sẵn và sau đó tiến hành RT-PCR, sau đó đổ gel vào để xác định kích thước băng (mỗi có sẵn trong RT-PCR trộn sẵn, và vùng 5'NCR được khuếch đại đến 421 bp).

Kết quả là, tỷ lệ sảy thai/sinh non là 50% trong suốt quá trình mang thai do vaccin LOM, và nhóm được tiêm với chủng vaccin Flc-Lom-BErns cho thấy tỷ lệ sảy thai/chết non là 10%, xác nhận rằng virus được làm giảm độc lực nhiều. Ngược lại, nhóm được tiêm chủng với chủng vaccin C-P50 được làm giảm độc lực CSFV BErns theo sáng chế cho thấy không có tỷ lệ sảy thai/chết non, xác nhận rằng virus đã được làm giảm độc lực (bảng 5, bảng 6).

Ngoài ra, tỷ lệ lây truyền dọc từ lợn nái mang thai cho lợn con là 50% ở nhóm được tiêm chủng với chủng vaccin LOM, và là 20% ở nhóm được tiêm chủng với chủng vaccin Flc-Lom-Berns. Ngoài ra, nhóm được tiêm chủng với chủng vaccin C-P50 được làm giảm độc lực CSFV BErns theo sáng chế cho thấy tỷ lệ là 10%, tiếp tục cho thấy độ ổn định vượt trội (bảng 5, bảng 6).

Bảng 5

	Chủng vaccin (LOM)	Virus Flc-Lom-BErns (KCTC12304BP)	C-P50 được làm giảm độc lực CSFV BErns (KCTC18431P)
--	--------------------------	--------------------------------------	---

Tỷ lệ sảy thai/chết non khi được tiêm vaccin trong suốt thời gian mang thai	50%	10%	0%
Tỷ lệ lây truyền độc từ lợn nái mang thai sáng lợn con	50%	20%	10%

Bảng 6

Nhóm	Thời điểm tiêm vaccin	Lợn số	Tỷ lệ sảy thai/sinh non (số lượng sảy thai/sinh non trên tổng số lợn sống sót	Số lượng lợn được tiêm vaccin/số lượng sảy thai/sinh non	Lây truyền độc qua bào thai (bào thai lây truyền độc/tổng số lượng lợn sống sót
LOM	Giai đoạn mang thai sớm (35-45 ngày)	L-1	4/11	2/4	7/11
		L-2	1/9	0/1	NT
		L-3	2/11	1/2	NT
		L-4	1/10	0/1	0/10
		L-5	1/8	0/1	NT
	Giữa thai kì (60-70 ngày)	L-6	0/6	-	NT
		L-7	3/9	2/3	7/9
		L-8	2/7	1/2	NT
		L-9	2/12	0/2	NT
		L-10	3/10	2/3	6/10

Virut Flc- Lom-BErns (KCTC1230 4BP)	Giai đoạn mang thai sớm (35-45 ngày)	F-1	1/12	0/1	NT
		F-2	2/10	0/2	0/10
		F-3	0/10	-	0/10
		F-4	0/8	-	NT
		F-5	0/11	-	NT
	Giữa thai kì (60-70 ngày)	F-6	2/7	1/2	4/7
		F-7	1/9	0/1	NT
		F-8	2/10	0/2	NT
		F-9	1/9	0/1	NT
		F-10	1/13	0/1	4/13
C-P50 được làm giảm độc lực CSFV BErns (KCTC1843 1P)	Giai đoạn mang thai sớm (35-45 ngày)	CP-1	0/9	-	NT
		CP-2	1/13	0/1	NT
		CP-3	1/11	0/1	NT
		CP-4	0/9	-	0/9
		CP-5	1/12	0/1	0/12
	Giữa thai kì (60-70 ngày)	CP-6	2/7	0/2	NT
		CP-7	3/9	0/3	0/9
		CP-8	2/11	0/2	NT
		CP-9	1/10	0/1	1/10
		CP-10	2/12	0/2	NT

Mặc dù các phần cụ thể của sáng chế đã được mô tả chi tiết, nó sẽ trở nên rõ ràng với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật mà những kỹ thuật cụ thể này chỉ đơn thuần là phương án được ưu tiên và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở đó. Do đó, phạm vi thực của sáng chế sẽ được xác định bằng yêu cầu bảo hộ đính kèm và những cái tương đương của chúng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực, thu được bằng cách nuôi cấy luân phiên và liên tục chủng vaccin virus sốt lợn Flc-LOM-Berns ở tế bào, trong đó việc nuôi cấy luân phiên và liên tục ở tế bào được thực hiện bằng cách nuôi cấy thứ cấp tuần tự và liên tục trong tế bào CPK (tế bào thận lợn tách dòng), tế bào BK (tế bào thận bò), tế bào PK (tế bào thận lợn), và tế bào CPK (tế bào thận lợn tách dòng).
2. Chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực theo điểm 1, trong đó chủng vaccin của virus sốt lợn Flc-LOM-Berns là chủng vaccin được lưu giữ có số đăng ký là KCTC12304BP.
3. Chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực theo điểm 1, trong đó chủng vaccin chỉ thị sống có hiệu giá nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{6,0}$ đến $1 \times 10^{7,0}$ TCID₅₀/ml.
4. Chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực theo điểm 1, trong đó chủng vaccin chỉ thị sống là chủng vaccin được lưu giữ có số đăng ký là KCTC18431P.
5. Chế phẩm vaccin ngừa virus sốt lợn dùng qua đường miệng chứa chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4 và chất mang được dùng.
6. Chế phẩm vaccin ngừa virus sốt lợn dùng qua đường miệng theo điểm 5, trong đó chế phẩm được bào chế thành dạng liều môi.
7. Phương pháp điều chế chủng vaccin chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực bao gồm các bước:
 - (a) tiêm vaccin Flc-LOM-Berns vào tế bào CPK (tế bào thận lợn tách dòng) và nuôi cấy thứ cấp liên tục, để virus sinh trưởng cho đến khi đạt hiệu giá nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{3,0}$ đến $1 \times 10^{4,0}$ TCID₅₀/ml;
 - (b) tiêm virus đã sinh trưởng trong bước (a) vào tế bào BK (tế bào thận bò) và tiếp tục nuôi cấy thứ cấp liên tục, để virus sinh trưởng cho đến khi đạt hiệu giá nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{4,0}$ đến $1 \times 10^{5,0}$ TCID₅₀/ml;
 - (c) tiêm virus đã sinh trưởng trong bước (b) vào tế bào PK (tế bào thận lợn), và tiếp tục nuôi cấy thứ cấp liên tục, để virus sinh trưởng cho đến khi đạt hiệu giá nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{5,0}$ đến $1 \times 10^{6,0}$ TCID₅₀/ml; và

(d) tiêm virus đã sinh trưởng trong bước (b) vào tế bào CPK (tế bào thận lợn tách dòng) một lần nữa và tiếp tục nuôi cấy thứ cấp liên tục, để virus sinh trưởng cho đến khi đạt hiệu giá nằm trong khoảng từ $1 \times 10^{6,0}$ đến $1 \times 10^{7,0}$ TCID₅₀/ml.

8. Phương pháp điều chế chủng vaccine chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực theo điểm 7, trong đó phương pháp này còn bao gồm thêm bước phát hiện và loại bỏ vi khuẩn gây hư hỏng, virus gây hư hỏng hoặc hỗn hợp của chúng trước khi thực hiện mỗi bước trong số các bước từ (a) đến (d).

9. Phương pháp điều chế chủng vaccine chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực theo điểm 8, trong đó vi khuẩn gây hư hỏng là mycoplasma, và virus gây hư hỏng là virus gây bệnh viêm phế quản ở chó.

10. Phương pháp điều chế chủng vaccine chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực theo điểm 7, trong đó chủng vaccine Flc-LOM-Berns trong bước (a) là chủng vaccine được lưu giữ có số đăng ký là KCTC12304BP.

11. Phương pháp điều chế chủng vaccine chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực theo điểm 7, trong đó việc nuôi cấy thứ cấp liên tục trong bước (a) có thể được thực hiện cho đến khi virus sinh trưởng ít nhất 20 lần cấy chuyển, việc nuôi cấy thứ cấp liên tục trong bước (b) có thể được thực hiện cho đến khi virus sinh trưởng ít nhất là hơn 10 lần cấy chuyển, việc nuôi cấy thứ cấp liên tục trong bước (c) có thể được thực hiện cho đến khi virus sinh trưởng ít nhất là hơn 10 lần cấy chuyển, và việc nuôi cấy thứ cấp liên tục trong bước (d) có thể được thực hiện cho đến khi virus sinh trưởng ít nhất là hơn 10 lần cấy chuyển.

12. Phương pháp điều chế chủng vaccine chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực theo điểm 7, trong đó chủng vaccine chỉ thị sống là chủng vaccine được lưu giữ có số đăng ký là KCTC18431P.

1/4

Fig. 1

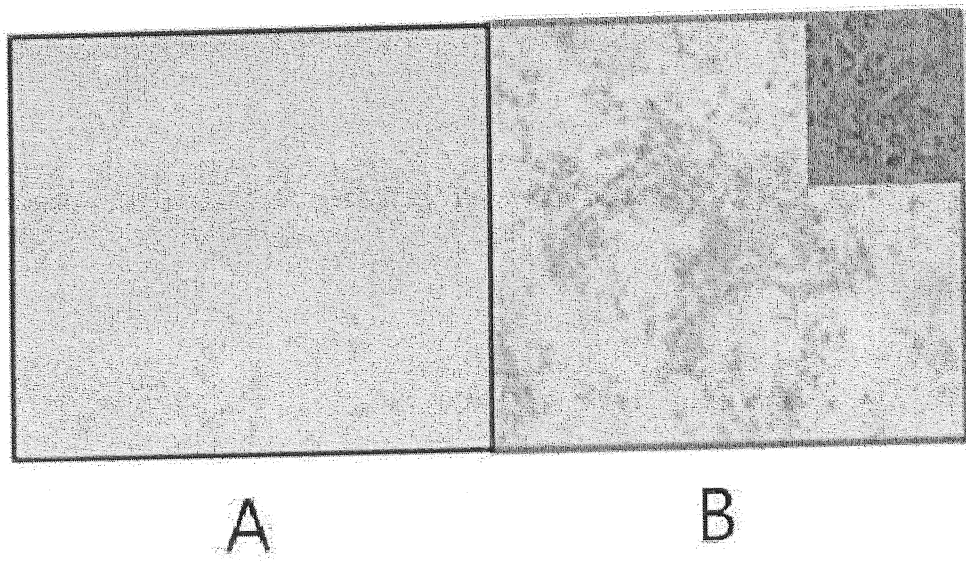


Fig. 2

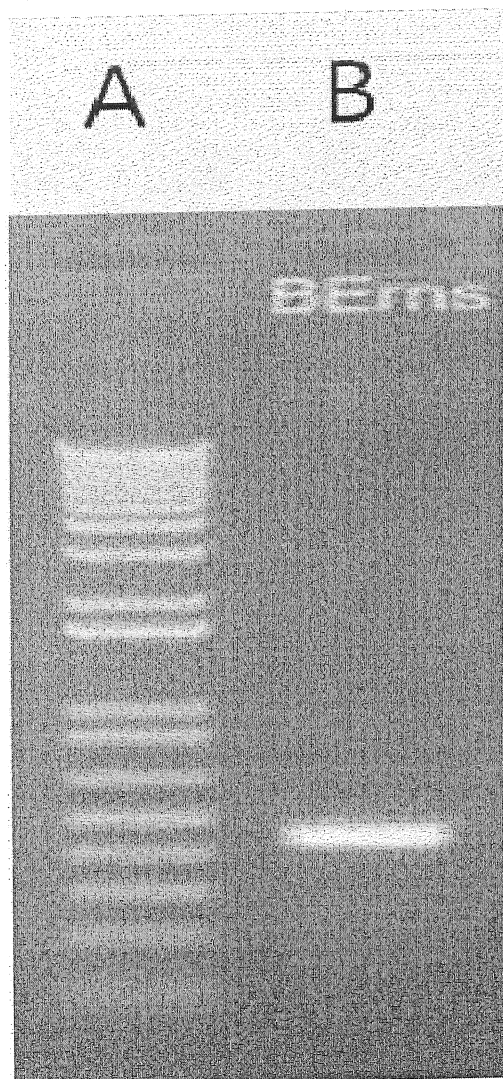


Fig. 3

Phương pháp loại bỏ sai sót và tăng hàm lượng chọn lọc chủng chỉ thị sống của virus sốt lợn được làm giảm độc lực

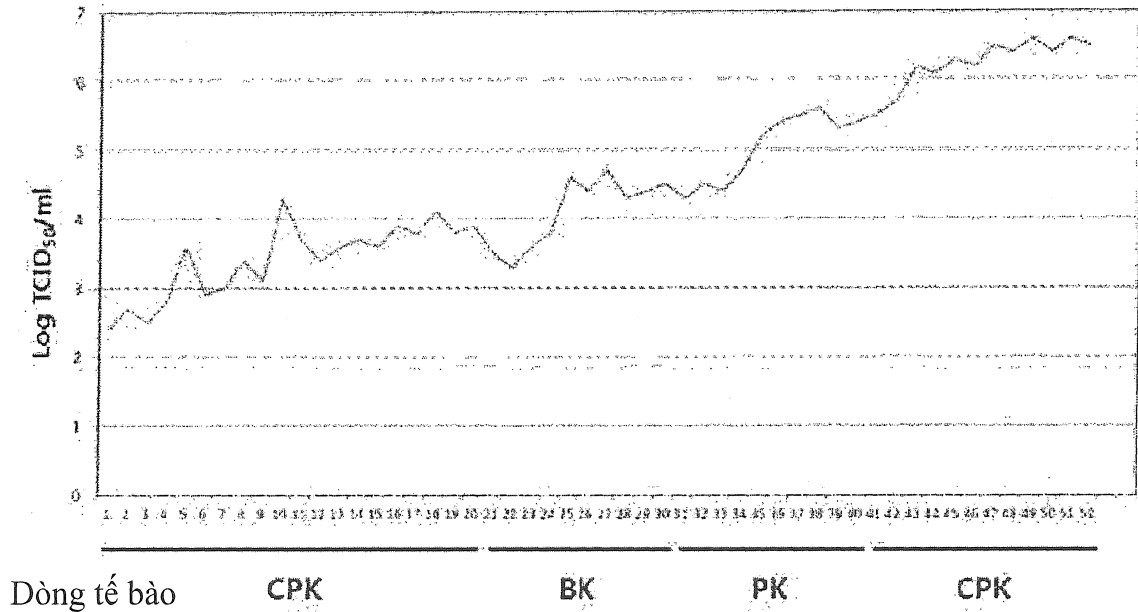


Fig. 4a

(A) Hàm lượng virus cho mỗi lần cấy chuyển sử dụng tế bào CPK

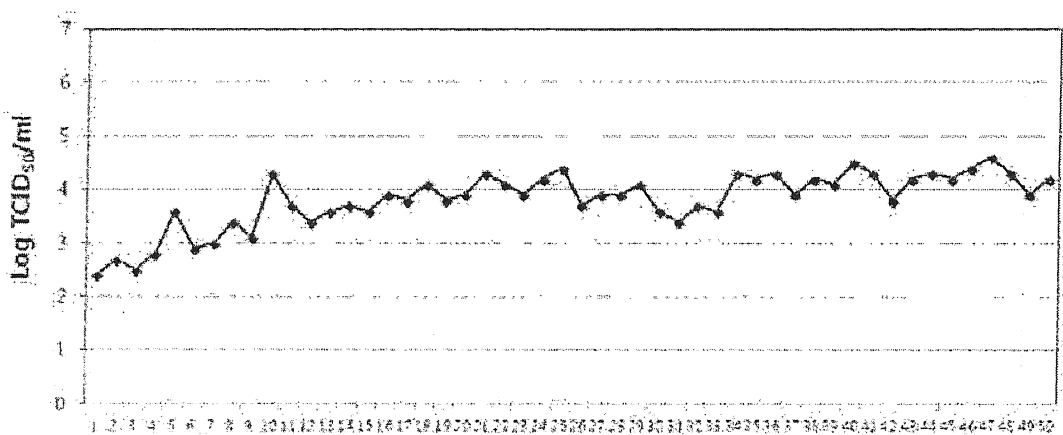


Fig. 4b

(B) Hàm lượng virus cho mỗi lần cấy chuyển sử dụng tế bào BK

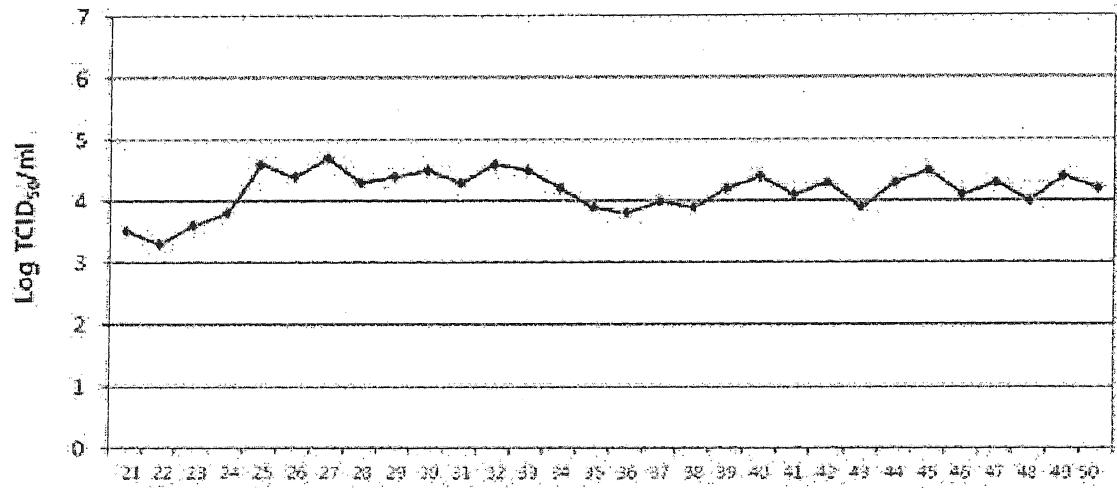


Fig. 4c

(C) Hàm lượng virus cho mỗi lần cấy chuyển sử dụng tế bào PK

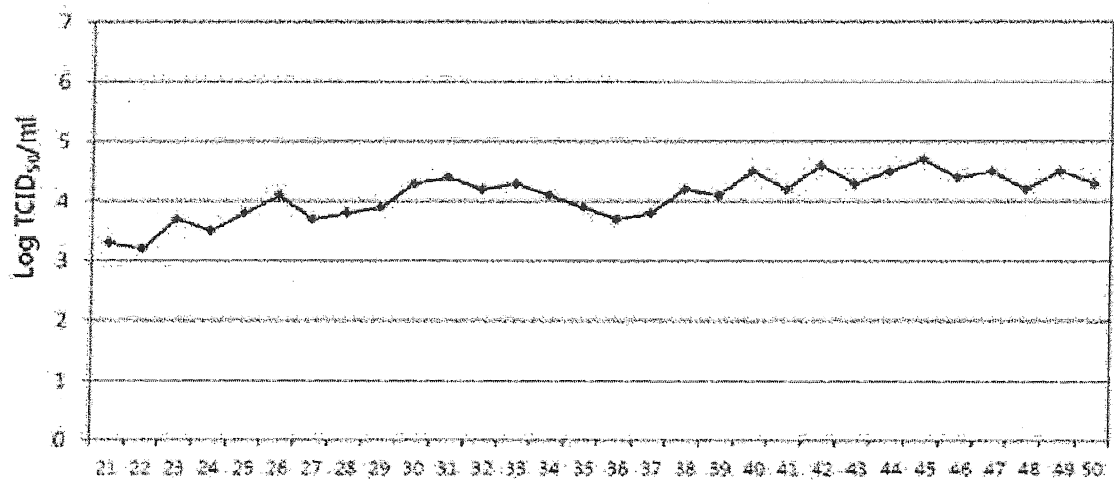


Fig. 4d

(D) Hàm lượng virut cho mỗi lần cấy chuyển sử dụng tế bào PK

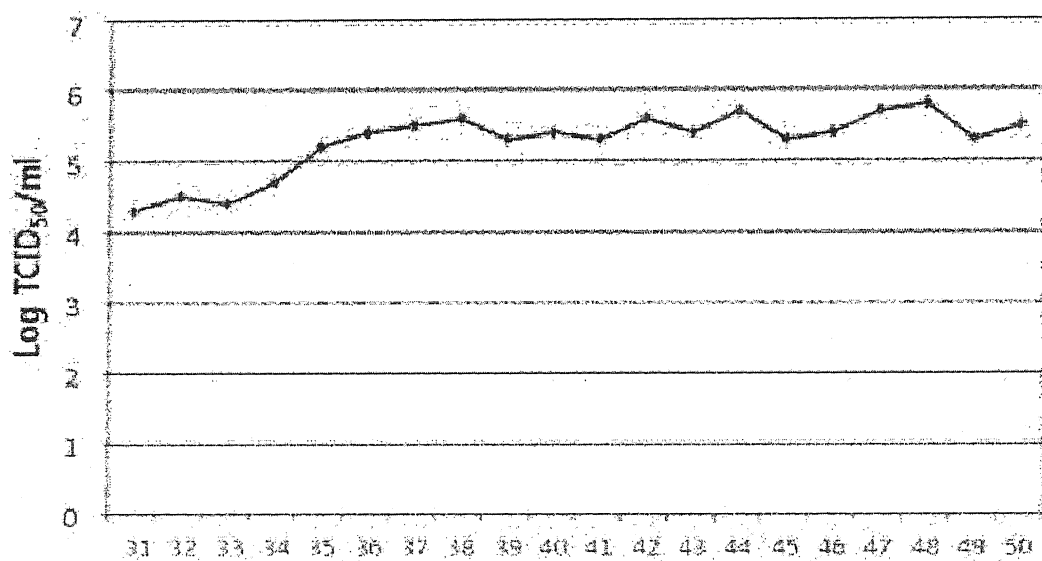


Fig. 5

Bước 1: Phủ protein CSFV Erns (0,0125μg protein CSFV Erns trên mỗi giếng)

Phong bế: trong PBST (0,1% Tween 20) + 5% huyết thanh ngựa ở 37°C trong 2 giờ)

↓ rửa PBST 3 lần

Bước 2: Liên kết huyết thanh lợn (sử dụng huyết thanh lợn được pha loãng 10x)

Phản ứng: trong PBST (0,1% Tween 20) + 2,5% huyết thanh ngựa ở 37°C trong 1 giờ)

↓ rửa PBST 3 lần

Bước 3: Liên kết kháng thể kháng C-Erns 1 (5μg C-Erns 1 mAb trên mỗi giếng)

Phản ứng: trong PBST (0,1% Tween 20) + 2,5% huyết thanh ngựa ở 37°C trong 1 giờ)

↓ rửa PBST 3 lần

Bước 4: Ủ TMB (nhiệt độ phòng, 10 phút) và đọcHiện màu: Sử dụng máy đọc ELISA: đo OD₄₅₀

↓

% Tính PC: giá trị ngưỡng %PC = 20

(1) Nhiễm CSFV kiểu đại: %PC ≥ 20

(2) Dùng chủng C-P50 được làm giảm độc lực CSFV: %PC < 20

* bước 2 & 3 có thể được thực hiện đồng thời