



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

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



1-0036467

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

-
- (21) 1-2019-03104 (22) 22/12/2017
(86) PCT/EP2017/084376 22/12/2017 (87) WO 2018/115435 28/06/2018
(30) 16206789.6 23/12/2016 EP; 17157828.9 24/02/2017 EP
(45) 25/07/2023 424 (43) 25/09/2019 378A
(73) INTERVET INTERNATIONAL B.V. (NL)
Wim de Körverstraat 35, 5831 AN Boxmeer, Netherlands
(72) JANSEN, Theodorus (NL); WITVLIET, Maarten, Hendrik (NL).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)
-

(54) VACXIN KẾT HỢP CHO LỢN VÀ PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ VACXIN KẾT HỢP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến vacxin kết hợp cho lợn chứa kháng nguyên không sao chép từ circovirus typ 2 ở lợn (PCV2) và virus sống gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV); vacxin kết hợp này được bào chế dưới dạng nhũ tương dầu trong nước, và có tá chất là squalan và vitamin E axetat. Vacxin kết hợp này đã được phát hiện ra là có hiệu quả miễn dịch kháng tất cả các mầm bệnh: PCV2 và PRRSV.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực vaccin thú y, cụ thể là vaccin kết hợp cho lợn. Cụ thể là, sáng chế đề cập đến vaccin kết hợp chứa kháng nguyên không sao chép từ circovirus typ 2 ở lợn và virus sống gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn. Sáng chế còn đề cập đến kit chứa các thành phần bao gồm vaccin kết hợp nêu trên, và phương pháp sản xuất và sử dụng vaccin kết hợp nêu trên.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Ngành chăn nuôi lợn tập trung hiện nay phụ thuộc nhiều vào các sản phẩm thuốc thú y để giữ cho lợn khỏe mạnh và cho phép hoạt động kinh tế. Bên cạnh việc tối ưu hóa thức ăn và hệ thống quản lý trang trại, nhiều phương pháp điều trị khác nhau thường xuyên được sử dụng: dược phẩm như hormon hoặc kháng sinh, và việc chủng ngừa kháng lại các mầm bệnh từ vi khuẩn hoặc virus. Một số bệnh nổi bật nhất mà ảnh hưởng đến lợn từ lúc nhỏ trở đi bị gây ra bởi vi khuẩn như: *Mycoplasma hyopneumoniae* và *Lawsonia intracellularis*; và bởi virus như circovirus typ 2 ở lợn và virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn.

Mycoplasma hyopneumoniae (Mhyo) là tác nhân chính gây ra bệnh suyễn ở lợn, một bệnh hô hấp mãn tính ở lợn xảy ra trên toàn thế giới. Đặc biệt là lợn con rất dễ mắc bệnh truyền nhiễm cao này. Vi khuẩn này tương đối nhỏ, không có thành tế bào, và thuộc chi Mollicutes. Vi khuẩn này sống ký sinh trên hoặc trong tế bào chủ.

Bệnh về phổi do Mhyo chủ yếu là bệnh lý qua trung gian miễn dịch dẫn đến đông đặc phổi. Vi khuẩn này cư trú và làm tổn thương biểu mô có lông rung của phổi dẫn đến làm mất hoạt động của lông rung. Tùy thuộc vào điều kiện chuồng trại và áp lực của môi trường, hậu quả khó giải quyết nhất của bệnh này là nó mở đường cho các nhiễm trùng thứ phát khác trong hệ hô hấp của lợn do các mầm bệnh từ vi khuẩn và virus khác. Điều này dẫn đến tình trạng được gọi là: bệnh hô hấp phức hợp trên lợn (PRDC) với biểu hiện là các tổn thương phổi nghiêm trọng. Bên cạnh sự khó chịu gây ra cho lợn, bệnh suyễn và PRDC gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi lợn do

giảm tốc độ tăng trưởng và giảm tỷ lệ chuyển hóa thức ăn, cũng như tăng chi phí cho việc chăm sóc thú y và sử dụng kháng sinh.

Lawsonia intracellularis (Lawsonia) gây ra bệnh ruột tăng sinh, còn được biết là bệnh viêm hồi tràng, là một bệnh đường ruột phổ biến ở lợn sau cai sữa trên toàn thế giới. Tổn thương đặc trưng của bệnh này là sự tăng sinh của các tế bào ruột chưa trưởng thành trong các hốc ruột hồi tràng, các tế bào này chứa vi khuẩn gây bệnh. Việc loại bỏ vi khuẩn khỏi các tế bào ruột giải quyết được các tổn thương tăng sinh kèm theo này. Các tổn thương mô có thể được xác nhận là dương tính với Lawsonia bằng việc quan sát thấy các vi khuẩn hình dấu phẩy, dài 1,5 - 2,5 μm trong các tế bào ruột, cũng như bên trong đại thực bào ruột. Vi khuẩn này có thể được phát hiện bằng PCR trong các ca lâm sàng hoặc cận lâm sàng. Các ca lâm sàng thường xuất hiện trong giai đoạn lợn choai-vỗ béo.

Vi khuẩn Lawsonia được mô tả lần đầu tiên vào năm 1995 (McOrist et al., Int. J. Syst. Bact., vol. 45, p. 820-825). Vi khuẩn này là trực khuẩn gram âm, ký sinh nội bào bắt buộc, không di động và thuộc họ Desulfovibrionaceae.

Circovirus typ 2 ở lợn (PCV2) có liên quan đến hội chứng còi cọc sau cai sữa (PMWS) được quan sát thấy ở lợn con. Các dấu hiệu lâm sàng và bệnh lý đã được công bố vào năm 1996 bao gồm suy mòn tiến triển, khó thở, thở nhanh, và đôi khi là hoàng đản hoặc vàng da. Tác nhân mới này được gọi là PCV2 để phân biệt với PCV đã biết mà là chất gây nhiễm tự nhiên các tế bào PK-15.

PCV2 là một loại virus rất nhỏ, không có màng bọc và thuộc chi Circovirus. Virus này chứa một bộ gen ADN chuỗi đơn dạng vòng với hai gen chính. Gen ORF2 mã hóa protein vỏ capsit của virus chứa khoảng 233 axit amin. Các protein PCV2 ORF2 được biểu hiện tái tổ hợp tạo nên các hạt giả virus mà có hiệu quả cao để làm vacxin tiêu đơn vị.

Virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV) được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1987, và đã trở thành đại dịch vào đầu các năm 1990. Nó là virus ARN nhỏ, có màng bọc, thuộc chi Arterivirus mà chứa bộ gen ARN chuỗi đơn dương. Virus này gây thiệt hại đáng kể cho ngành chăn nuôi lợn do nó gây ra rối loạn sinh sản và chậm phát triển. Giống với Mhyo, PRRSV đóng một vai trò quan trọng trong bệnh PRDC đa nhân tố. Các triệu chứng lâm sàng là sảy thai và thai bị chết lưu hoặc bị chết khô, và tai và âm hộ bị xanh tím. Ở lợn sơ sinh, virus này gây suy hô hấp kèm theo khả

năng nhiễm các bệnh nhiễm trùng đường hô hấp thứ phát gia tăng như bệnh Glässer (gây ra bởi *Haemophilus parasuis*). Tuy nhiên các bệnh nhiễm trùng cận lâm sàng cũng phổ biến. Virut này dễ biến đổi: ngoài biến thể châu Âu (typ 1) và biến thể Bắc Mỹ (typ 2), hiện giờ có kiểu gen thứ ba: biến thể có khả năng gây bệnh cao đã xuất hiện ở Trung Quốc vào năm 2000, và hiện đang gây dịch bệnh nghiêm trọng ở lợn tại châu Á.

Vaccin thương mại kháng mỗi mầm bệnh nêu trên đang có hiện nay:

Nhiều loại vaccin thương mại kháng Mhyo hiện có bán trên thị trường và được sử dụng thường xuyên trong phần lớn các hoạt động chăn nuôi lợn thương mại. Các vaccin này thường bao gồm các chất kháng nguyên không sao chép như protein tiểu đơn vị và/hoặc vaccin vi khuẩn (nghĩa là, vi khuẩn bị giết, nguyên vẹn hoặc không), mà thường được sử dụng bằng cách tiêm ngoài đường tiêu hóa. Một số ví dụ là: RespiSure™ (Zoetis), Ingelvac™ M. hyo (Boehringer Ingelheim), và M+Pac™ (Merck Animal Health).

Vaccin kháng *Lawsonia* hiện có bán trên thị trường, ví dụ như Enterisol™ Ileitis (Boehringer Ingelheim Vetmedica, USA) là vaccin sống nhược độc, và Porcilis™ Ileitis (Merck Animal Health, USA) là vaccin vi khuẩn có tá chất.

Vaccin chống nhiễm trùng do PCV2 có thể dựa trên virut PCV2 bị bất hoạt nguyên vẹn như Circovac™ (Merial), hoặc dựa trên virut PCV1/PCV2 khả năng bắt hoạt (Suvaxyn™ PCV, Zoetis). Phổ biến hơn là các vaccin tiểu đơn vị chứa protein PCV2 ORF2 được biểu hiện tái tổ hợp, ví dụ, từ hệ biểu hiện dựa trên tế bào côn trùng-baculovirus. Các ví dụ của vaccin này bao gồm: Porcilis™ PCV (MSD Animal Health), và Ingelvac CircoFlex™ (Boehringer Ingelheim).

Vaccin kháng PRRSV dựa trên virut bất hoạt đã được mô tả và có bán trên thị trường. Tuy nhiên, các vaccin dựa trên virut sống nhược độc được coi là có hiệu quả hơn. Các ví dụ của vaccin này bao gồm: Porcilis™ PRRS (MSD Animal Health), Ingelvac PRRS™ MLV (Boehringer Ingelheim), và Foster™ PRRS (Zoetis).

Để hạn chế áp lực cho lợn, chi phí và công sức của người chăm sóc, một số vaccin lợn đã được bào chế dưới dạng vaccin kết hợp. Các ví dụ là: Foster™ PCV MH (Zoetis) và Porcilis PCV Mhyo (MSD Animal Health) mà kết hợp các kháng nguyên từ PCV2 và Mhyo.

Đơn sáng chế số WO 2013/152086 (Zoetis) mô tả vaccin kết hợp 3 giá cho lợn, kết hợp các kháng nguyên từ PCV2 và Mhyo với PRRSV sống, tuy nhiên vaccin được

mô tả này lại chưa có trên thị trường. Do đó có mối quan tâm trong lĩnh vực này về vaccin kết hợp hiệu quả cho lợn để kháng các bệnh có liên quan ở lợn.

Một thành phần quan trọng của vaccin chứa kháng nguyên không sao chép là tá chất. Tá chất có tác dụng kích thích miễn dịch đối với kháng nguyên không sao chép, mà nếu không có tá chất này, kháng nguyên này sẽ không gây miễn dịch. Điều này sẽ kích hoạt các con đường khác nhau của hệ miễn dịch, các cơ chế cơ bản vẫn chưa được hiểu rõ. Trong các vaccin thú y, nhiều hợp chất có thể được sử dụng làm tá chất, ví dụ: dầu khoáng như Bayol™ hoặc Markol™, Montanide™ hoặc dầu parafin; dầu không phải dầu khoáng như squalen, squalan, hoặc dầu thực vật như etyl-oleat; muối nhôm như nhôm hydroxit, hoặc nhôm photphat; peptit như dimethylglyxin hoặc tuftsin; các thành phần vách của tế bào vi khuẩn như lipit A và muramyl dipeptit; các polyme (tổng hợp) như pluronic, dextran, carbomer, pyran, hoặc saponin; xytokin; và chất kích thích của thụ thể giống Toll như oligodeoxynucleotit kích thích miễn dịch chứa nhóm CpG không methyl hóa; v.v.

Vấn đề chính phải vượt qua trong việc bào chế các vaccin kết hợp có tá chất, là ngăn cản sự tương tác giữa các thành phần vaccin khác nhau mà sẽ ảnh hưởng tiêu cực đến đáp ứng miễn dịch hoặc độ an toàn hoặc sự ổn định của vaccin. Tương tác này có thể, ví dụ, xảy ra giữa chính các kháng nguyên, ví dụ, vì một số kháng nguyên là các sản phẩm khá thô, như vaccin vi khuẩn của *Mhyo* và của *Lawsonia*. Tá chất cũng có thể gây cản trở hoặc thậm chí phá hủy kháng nguyên của vaccin. Tương tác bất lợi như vậy đặc biệt dễ xảy ra khi sự kết hợp bao gồm vi sinh vật sống. Điều này cũng được công nhận bởi các cơ quan đăng ký cấp giấy phép lưu hành sản phẩm, ví dụ: USDA thi hành quy định 9CFR 113.35 để phát hiện hoạt tính diệt virus trong vaccin bất hoạt chứa virus sống.

Các vấn đề tiềm ẩn này trong việc phát triển các vaccin kết hợp phức tạp nói chung đã được nhận ra; xem ví dụ công bố của EMEA: "Note for guidance: requirements for combined veterinary products" (EMA, 2000, CVMP/IWP/52/97- FINAL); và công bố của Bộ Y tế và Dịch vụ Nhân sinh, Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ, Trung tâm đánh giá và nghiên cứu sinh học, từ tháng 4 năm 1997: "Guidance for Industry, for the evaluation of combination vaccines for preventable diseases: Production, Testing and Clinical Studies", Docket No. 97N-0029. Các công bố này cảnh

báo về các tác dụng gây cản trở hiệu quả và độ an toàn của vaccin, khi kết hợp các kháng nguyên và các tá chất.

Do vậy là rất khó để phát triển vaccin kết hợp mà gây ra đáp ứng miễn dịch hiệu quả kháng lại sự kết hợp của các kháng nguyên không sao chép và vi sinh vật có khả năng nhân lên, cụ thể là đối với các kết hợp phức tạp liên quan tới nhiều loài gây bệnh. Ngoài ra, vaccin kết hợp nên an toàn khi sử dụng trên động vật, nghĩa là, không gây ra các phản ứng phụ đáng kể như sốt, sưng tại chỗ, ăn không ngon miệng, v.v. Nhiều đặc điểm thực tế cũng có liên quan như: vaccin kết hợp lý tưởng cần có khả năng sản xuất kinh tế, đủ ổn định trong quá trình bào chế và bảo quản, và cho phép các phương pháp kiểm tra hiệu lực đối với từng kháng nguyên, khi có mặt các kháng nguyên còn lại.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó mục tiêu của sáng chế là khắc phục một hoặc nhiều hạn chế trong phần tình trạng kỹ thuật, và đáp ứng nhu cầu trong lĩnh vực bằng việc cung cấp vaccin kết hợp hiệu quả và an toàn cho lợn kháng lại bệnh có liên quan đến tình trạng nhiễm PCV2 và PRRSV.

Không may là, sự kết hợp thẳng kháng nguyên không sao chép từ PCV2, và virus PRRS sống trong chế phẩm tá chất hiện có không thành công. Ví dụ: chế phẩm tá chất mà được sử dụng cho một số vaccin lợn khác là Xsolve™ (trước đây được gọi là: Microsol-Diluvac Forte™; MSD Animal health). Chế phẩm này chứa hỗn hợp của các tá chất dầu khoáng nhẹ và vitamin E axetat, với chất nhũ hoá Tween™ 80. Chế phẩm này được sử dụng ví dụ cho: Porcilis PCV (chứa kháng nguyên PCV2 ORF2), Porcilis Ileitis (chứa vaccin vi khuẩn Lawsonia), và Circumvent PCV-M G2 (chứa các kháng nguyên của PCV2 và Mhyo)

Tuy nhiên vaccin kết hợp chứa các kháng nguyên không sao chép từ Mhyo, Lawsonia, và PCV2 với PRRSV sống trong Xsolve, không có hiệu quả ổn định. Điều này chủ yếu do tác dụng diệt virus trong thành phần PRRSV sống. Ngoài ra, Xsolve, giống như các tá chất khác chứa dầu khoáng, gây ra các phản ứng chứng ngứa tương đối mạnh. Mặc dù các nhược điểm này nằm trong giới hạn chấp nhận được, vẫn mong muốn có sự cải thiện.

Tương tự, sự kết hợp của 4 kháng nguyên nêu trên trong tá chất đã biết là Amphigen™ (Zoetis) cũng cho thấy tác dụng diệt virus trên PRRSV. Amphigen chứa dầu khoáng làm tá chất và lexithin làm chất nhũ hoá.

Ngoài ra, tá chất Emunade (dầu khoáng + nhôm hydroxit) có tác dụng diệt virus đối với PRRSV sống.

Một trong số các chế phẩm tá chất được mô tả trong WO 2013/152086 ('086) được cho là không có tác dụng diệt virus đáng kể đối với PRRSV sống: dung dịch pha loãng 10% của chế phẩm được gọi là "dầu SP". Tá chất này có bán trên thị trường với tên Metastim™. Không may là thành phần chính xác của chế phẩm đã được thử nghiệm này không được bộc lộ, nhưng phạm vi thành phần được ưu tiên của dầu SP được đưa ra trong đoạn nằm trong các trang 24-25 của đơn '086. Việc sử dụng dầu SP này với độ pha loãng 10% trong vacxin do đó có nghĩa là vacxin được thử nghiệm này bao gồm: 0,1- 0,3% thể tích/thể tích Pluronic™, 0,3 - 0,6% thể tích/thể tích squalan, và 0,01 - 0,05% thể tích/thể tích Tween 80.

'086 cũng đề xuất một số tá chất "phù hợp" khác ('086, trang 25, dòng 7 đến 15), trong đó có Amphigen và Xsolve. Tuy nhiên trong thực tế các chất này hóa ra không phù hợp; điều mà cũng rõ ràng từ Fig. 10 của '086,

Một tá chất vacxin đã biết khác là AS03™ (GSK), mà chứa 2,1% khối lượng/thể tích squalen và 2,4% khối lượng/thể tích vitamin E, với 1,0% khối lượng/thể tích Tween 80 làm chất nhũ hoá. Tuy nhiên, tá chất này được mô tả để sử dụng cho người, và đối với kháng nguyên từ một loài gây bệnh duy nhất, virus cúm người bị bất hoạt chủ yếu. Ngoài ra, việc sử dụng AS03 có mối liên hệ khoa học với nguy cơ sốc phản vệ tăng và với việc gây ra các rối loạn tự miễn.

Ngoài ra, mặc dù vacxin một giá Porcilis™ Mhyo được bào chế trong dung dịch hoà tan của vitamin E axetat, tuy nhiên, khi được kết hợp với kháng nguyên PCV2 tá chất và dạng bào chế khác biệt hoàn toàn được phát hiện ra là tối ưu: vacxin kết hợp hai giá Porcilis PCV Mhyo có tá chất là Emunade™, hỗn hợp dầu khoáng và nhôm-hydroxit, và các kháng nguyên cần phải được kết hợp theo cách đặc biệt, như được mô tả trong WO 2016/091998.

Dòng vacxin ProSystem™ (Merck Animal Health) là dòng vacxin lợn, chứa nhiều kháng nguyên không sao chép từ các loài vi khuẩn khác nhau. Các vacxin này là các chế phẩm nước, có tá chất là gel nhôm hydroxit. Chúng được cấp phép để tạo huyền phù lại các vacxin đông khô cho lợn với các virus sống nhược độc như virus gây viêm dạ dày ruột truyền nhiễm và Rotavirus.

Một khác biệt nữa liên quan đến dạng bào chế và các tá chất được sử dụng, là vaccin kết hợp 3 giá 3Flex™ (Boehringer Ingelheim). Vaccin này được bán trên thị trường dưới dạng ba lọ riêng biệt với các kháng nguyên không sao chép từ Mhyo, và PCV2 được kết hợp với PRRSV sống. Chúng được trộn tại chỗ để tạo thành chế phẩm nước với tá chất được gọi là Impranflex™ mà chứa Carbopol.

Trong vô số các lựa chọn, các tác giả sáng chế không có chỉ dẫn về kiểu dạng bào chế nào và loại tá chất nào dùng để phát triển vaccin kết hợp mà an toàn và ổn định, và có hiệu quả kháng lại bệnh liên quan đến sự nhiễm PCV2 và PRRSV.

Bất ngờ phát hiện ra là mục tiêu này có thể được đạt được, và do đó, một hoặc nhiều nhược điểm của giải pháp kỹ thuật đã biết có thể được khắc phục, bằng cách cung cấp vaccin kết hợp cho lợn, chứa kháng nguyên không sao chép từ PCV2 và PRRSV sống, nhờ đó vaccin này được bào chế dưới dạng nhũ tương dầu trong nước và có tá chất là squalan và vitamin E axetat.

Vaccin kết hợp thuộc loại này và có thành phần này được phát hiện ra là không có tác dụng diệt virus đối với PRRSV sống, và có hiệu quả trong việc bảo vệ lợn kháng lại bệnh nhiễm trùng do PCV2 và PRRSV. Vaccin này còn an toàn cho động vật đích, có thể được sản xuất một cách kinh tế, ổn định trong quá trình bào chế và bảo quản, và cho phép kiểm tra hiệu lực tất cả các kháng nguyên trong vaccin thành phẩm.

Người ta không biết chính xác lý do tại sao chế phẩm cụ thể này và lựa chọn tá chất cụ thể này lại tốt hơn cho việc kết hợp các kháng nguyên này. Mặc dù các tác giả sáng chế không muốn bị ràng buộc bởi lý thuyết hoặc mô hình bất kỳ mà có thể giải thích cho các phát hiện này, họ suy đoán rằng sự kết hợp cụ thể của squalan và vitamin E axetat, trong chế phẩm dầu trong nước, cung cấp đúng mức kích thích miễn dịch từ các kháng nguyên này, để có hiệu quả kháng lại các bệnh có liên quan của chúng. Chế phẩm này không gây ra phản ứng phụ khi chủng ngừa đáng kể, và bảo vệ PRRSV sống khỏi tác dụng diệt virus đáng kể của tá chất và các kháng nguyên còn lại.

Điều này hoàn toàn không thấy được trong giải pháp kỹ thuật đã biết, vì không có vaccin kết hợp nào khác chứa các kháng nguyên này. Một số tá chất được mô tả cho các vaccin kết hợp cho lợn khác cũng không hữu ích cho sự kết hợp cụ thể này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Do đó theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến vaccin kết hợp chứa kháng nguyên không sao chép từ circovirus typ 2 ở lợn (PCV2) và virus sống gây hội chứng rối loạn

hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV), khác biệt ở chỗ vacxin này là nhũ tương dầu trong nước chứa squalan và vitamin E axetat.

“Vacxin kết hợp” là vacxin chứa các kháng nguyên từ nhiều hơn một loài vi sinh vật.

“Vacxin” được biết rõ là chế phẩm có tác dụng y học. Vacxin chứa thành phần có hoạt tính miễn dịch và chất mang dược dụng. Ở đây ‘thành phần có hoạt tính miễn dịch’ này là một hoặc nhiều phân tử kháng nguyên: kháng nguyên không sao chép từ PCV2 và PRRSV sống. Các kháng nguyên này được nhận diện bởi hệ miễn dịch của lợn đích, và gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ. Đáp ứng này có thể có nguồn gốc từ hệ miễn dịch bẩm sinh và/hoặc từ hệ miễn dịch mắc phải của đích, và có thể thuộc loại tế bào và/hoặc dịch thể.

Nói chung, vacxin có hiệu quả trong việc làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh nhiễm trùng, ví dụ như bằng cách làm giảm số lượng các mầm bệnh, hoặc rút ngắn thời gian sao chép của mầm bệnh ở động vật chủ.

Ngoài ra, hoặc cũng có thể là kết quả của vacxin, vacxin thường hiệu quả trong việc làm giảm hoặc cải thiện các triệu chứng (lâm sàng) của bệnh mà có thể bị gây ra bởi bệnh nhiễm trùng hoặc sự sao chép này, hoặc bởi phản ứng của động vật đối với bệnh nhiễm trùng hoặc sự sao chép đó.

Vacxin kết hợp theo sáng chế cảm ứng đáp ứng miễn dịch bảo vệ trên lợn đích, tác dụng của đáp ứng này là ngăn chặn hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh nhiễm trùng do PCV2 và PRRSV. Vacxin kết hợp này còn ngăn chặn hoặc làm giảm một hoặc nhiều dấu hiệu của bệnh mà có liên quan đến sự nhiễm trùng hoặc sự nhân lên này. Điều này chuyển thành tác động tích cực đến các tham số kinh tế như: chuyển hoá thức ăn, lượng cân nặng gia tăng trung bình hàng ngày, chất lượng con thịt, và kích thước và chất lượng của các lứa đẻ. Các tác dụng được quan sát thấy của vacxin kết hợp theo sáng chế là:

đối với PCV2: làm giảm tải lượng virus trong máu và các mô bạch huyết; ở lợn vỗ béo: làm giảm tỷ lệ tử vong và sự sụt cân;

và đối với PRRSV: đối với lợn vỗ béo: làm giảm bệnh đường hô hấp với bệnh viêm phổi kẽ hoại tử, dẫn đến cải thiện sự phát triển và chuyển hoá thức ăn. Đối với lợn giống: làm giảm truyền virus qua nhau thai, và cải thiện sự thất bại trong sinh sản như:

để non, và thai chết lưu hoặc thai chết khô, và tình trạng yếu ớt và bệnh đường hô hấp sau cai sữa ở lợn con sống sót.

Đối với các bệnh nhiễm PCV2 và PRRSV, sự cảm ứng tác dụng bảo vệ miễn dịch và do đó hiệu lực của vaccin kết hợp theo sáng chế, có thể được phát hiện về mặt huyết thanh vì sự gia tăng nồng độ trong huyết thanh của các kháng thể đặc hiệu mầm bệnh dễ dàng phát hiện được bằng cách sử dụng các kỹ thuật dựa trên ELISA.

Vaccin kết hợp theo sáng chế thông thường cũng có thể được gọi là vaccin ‘kháng’ PCV2 và PRRSV; hoặc là vaccin PCV2 và PRRSV.

Chi tiết và mức độ ưu tiên của vaccin kết hợp theo sáng chế sẽ được mô tả dưới đây.

“Chất mang được dụng” theo sáng chế là dung dịch nước có độ tinh khiết cao và tốt hơn là vô trùng, ví dụ như: nước, dung dịch nước muối sinh lý, hoặc dung dịch nước muối đệm phosphat. Chất mang này có thể chứa thêm các chất phụ gia, như các chất ổn định hoặc các chất bảo quản.

Thuật ngữ "chứa" (cũng như các biến thể “bao gồm”, “được bao gồm”) như được sử dụng ở đây, được dự định đề cập đến tất cả các thành phần, và trong sự kết hợp có thể bất kỳ có thể hiểu được theo sáng chế, mà được bao hàm hoặc bao gồm trong phần văn bản, đoạn văn, yêu cầu bảo hộ, v.v., trong đó thuật ngữ này được sử dụng, ngay cả khi các thành phần hoặc sự kết hợp này không được trích dẫn chính xác; và không loại trừ bất kỳ trong số (các) thành phần hoặc kết hợp này.

Do đó phần văn bản, đoạn văn bản, yêu cầu bảo hộ, v.v. bất kỳ này, cũng có thể đề cập đến một hoặc nhiều phương án trong đó thuật ngữ "chứa" (hoặc biến thể của nó) được thay thế bởi các thuật ngữ như "bao gồm" hoặc "chủ yếu bao gồm".

“Kháng nguyên” đề cập đến các phân tử có thể gây ra đáp ứng miễn dịch trong các điều kiện thích hợp. Kháng nguyên có thể được tạo ra bằng cách tổng hợp hoặc thu được từ nguồn sinh học, ví dụ như chúng có thể là vi sinh vật hoặc một phần của vi sinh vật đó.

Kháng nguyên “không sao chép” đề cập đến các phân tử như protein, hydrat cacbon, lipid hoặc axit nucleic, hoặc là các hỗn hợp phức tạp của chúng, độ tinh khiết cao hơn hoặc thấp hơn. Khi được tạo ra từ vi sinh vật, kháng nguyên không sao chép này có thể là vi sinh vật nguyên vẹn nhưng bị giết (nghĩa là, không sao chép), hoặc có thể là một phần của vi sinh vật đó như dịch chiết, phân đoạn, dịch đồng nhất, hoặc dịch

nghiên bằng sóng âm. Kháng nguyên không sao chép còn có thể là sản phẩm dựa trên axit nucleic, hoặc sản phẩm tái tổ hợp, như vector biểu hiện hoặc protein được biểu hiện, hoặc sản phẩm của hệ biểu hiện in vitro. Tất cả các kháng nguyên này đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Trong sáng chế, PRRSV có thể sao chép được.

“PRRSV sống” đề cập đến PRRSV sống mà thích hợp để sử dụng làm thành phần của vacxin, nghĩa là, có mức độ gây bệnh giảm, còn được biết là nhược độc hoặc sống được cải biến.

“Nhược độc” trong sáng chế được định nghĩa là gây ra mức độ tổn thương thấp hơn, và/hoặc có tỷ lệ nhiễm trùng hoặc sao chép giảm. Tất cả đều là so với PRRSV “kiểu hoang” hoặc chưa được cải biến.

Việc làm nhược độc PRRSV có thể đạt được trên in vitro, ví dụ bằng cách cấy chuyển qua động vật thí nghiệm hoặc trong nuôi cấy và chọn lọc tế bào, hoặc thông qua công nghệ ADN tái tổ hợp, tất cả đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Mặc dù việc gọi virus là đang “sống” là không đúng về mặt sinh học, đó lại là cách phổ biến để chỉ virus không bị bất hoạt. Do đó, trong sáng chế, thuật ngữ “sống” khi đề cập tới PRRSV, chỉ virus PRRS mà có khả năng sao chép trong các điều kiện thích hợp, ví dụ ở động vật hoặc tế bào chủ thích hợp.

“Circovirus typ 2 ở lợn” và “virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn” đều được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này là các virus, thuộc các họ và chi tương ứng của chúng. Các virus này gây ra các bệnh như được mô tả trong các sách nổi tiếng như: "The Merck veterinary manual" (10th ed., 2010, C.M. Kahn ed., ISBN: 091191093X), hoặc: "Diseases of Swine", 10th ed., Zimmerman ed., Wiley-Blackwell, Ames, IA., USA, ISBN: 081382267X.

Mỗi mầm bệnh này biểu hiện các đặc điểm đặc trưng của các thành viên trong nhóm phân loại của nó như đặc điểm hình thái, bộ gen và sinh hóa, cũng như các đặc điểm sinh học như hoạt tính sinh lý, miễn dịch hoặc bệnh học.

Như đã biết trong lĩnh vực này, sự phân loại vi sinh vật là loài cụ thể dựa trên sự kết hợp của các đặc điểm này. Do vậy sáng chế cũng bao gồm PCV2 hoặc PRRSV mà được phân loại tiếp từ đó theo cách bất kỳ, ví dụ như phân loài, chủng, thể phân lập, kiểu gen, biến thể, kiểu phụ hoặc phân nhóm và tương tự.

Rõ ràng với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này là, mặc dù PCV2 hoặc PRRSV trong sáng chế hiện nay có thể được gán cho loài cụ thể, nghĩa là sự phân loại có thể thay đổi theo thời gian khi các hiểu biết mới có thể dẫn đến việc phân loại lại vào nhóm phân loại mới hoặc nhóm phân loại khác. Tuy nhiên, vì điều này không làm thay đổi bản thân vi sinh vật, hoặc nguồn kháng nguyên của nó, mà chỉ làm thay đổi tên khoa học và sự phân loại của nó, các vi sinh vật được phân loại lại như vậy vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế.

PCV2 và PRRSV được sử dụng trong sáng chế có thể thu được từ nhiều nguồn khác nhau, ví dụ như thể phân lập thực địa từ lợn trong hoang dã hoặc trong trang trại, hoặc từ các phòng thí nghiệm, các viện (lưu trữ), hoặc trường đại học (thú y) khác nhau.

“Nhũ tương dầu trong nước” là chế phẩm được biết rõ, bao gồm pha nước bên ngoài mà có chứa pha dầu được phân tán bên trong. Bằng cách lựa chọn loại và nồng độ chất nhũ hoá thích hợp, nhũ tương này có thể được tạo thành. Quy trình và thiết bị để điều chế nhũ tương dầu trong nước để sử dụng làm vacxin được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, và ví dụ, được mô tả trong các sổ tay ví dụ như: “Remington: the science and practice of pharmacy” (2000, Lippincot, USA, ISBN: 683306472), và: “Veterinary vaccinology” (P. Pastoret et al. ed., 1997, Elsevier, Amsterdam, ISBN 0444819681).

Trong sáng chế, pha nước bên ngoài chứa kháng nguyên không sao chép từ PCV2, và PRRSV sống trong chất mang được dụng; và pha dầu chứa squalan và vitamin E axetat làm các tá chất.

Vacxin kết hợp theo sáng chế được phát hiện ra là rất hiệu quả, an toàn và ổn định, khi được bào chế dưới dạng nhũ tương dầu trong nước.

Các phương án và các mức độ ưu tiên để sản xuất nhũ tương dầu trong nước cho vacxin kết hợp theo sáng chế sẽ được mô tả ở dưới đây.

“Squalan” là hợp chất hóa học có số CAS là 111-01-3. Một số tên gọi khác là: dầu gan cá mập hydro hóa, hexametyltetracosan, hoặc perhydrosqualen. Chất này không bị nhầm lẫn với squalen (có số CAS là 111-02-4) mà là dầu C30 không bão hòa đa và có khả năng chuyển hóa như một hợp chất của chu trình cholesterol. Tuy nhiên, squalan là dạng đã hydro hóa hoàn toàn của squalen và do đó không dễ bị oxy hóa. Do vậy, mặc dù squalan là dầu không khoáng, và được vận chuyển từ vị trí tiêm, nó không có khả năng chuyển hóa.

Ban đầu tiền chất thành squalan được thu từ gan cá mập, nhưng do các mối quan tâm về môi trường, việc thu gom này đã chuyển sang các nguồn tự nhiên khác, như dầu oliu, hoặc phương pháp tổng hợp hóa học. Do vậy được bao hàm trong định nghĩa về squalan là các dạng tự nhiên, tổng hợp hoặc bán tổng hợp, hoặc các hỗn hợp của chúng. Squalan có bán trên thị trường với nhiều độ tinh khiết khác nhau, ví dụ như: từ nguồn rau quả, từ Worlee (Squalan, rau quả), hoặc Croda (Pripure Squalane); hoặc nguồn tổng hợp, ví dụ từ Kuraray (Squalane-PE). Trong sáng chế, độ tinh khiết cao của squalan được ưu tiên hơn: tốt hơn là tinh khiết trên 75%, tốt hơn nữa là tinh khiết hơn 80, 90, hoặc thậm chí hơn 95%, theo thứ tự ưu tiên.

“Vitamin E axetat” là hợp chất hóa học có số CAS là 58-95-7. Một số tên gọi khác là: tocopheryl axetat, hoặc alpha-tocopherol-axetat. Vitamin E axetat là axetat este của vitamin E (tocopherol), và có thể thu được từ các nguyên liệu thực vật như hạt, quả hạch, trái cây hoặc lá, hoặc từ thịt mỡ, nhưng cũng có thể được sản xuất tổng hợp. Do đó, được bao hàm trong định nghĩa về vitamin E axetat là các dạng tự nhiên, tổng hợp hoặc bán tổng hợp, hoặc các hỗn hợp của chúng. Vitamin E axetat có bán trên thị trường với các độ tinh khiết khác nhau.

Trong sáng chế, kháng nguyên không sao chép từ PCV2 tốt hơn là: protein ORF2.

Mỗi kháng nguyên trong vaccin kết hợp theo sáng chế có thể thuộc một typ duy nhất, hoặc có thể thuộc nhiều typ, ví dụ từ một hoặc từ nhiều hơn một chủng của mầm bệnh tương ứng.

Squalan trong vaccin kết hợp theo sáng chế có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 9% khối lượng/thể tích của vaccin. Tốt hơn là, squalan có mặt với lượng nằm trong khoảng 2 đến 7% khối lượng/thể tích, hoặc thậm chí 2 đến 5% khối lượng/thể tích của vaccin, theo thứ tự ưu tiên.

Tốt nhất: squalan có mặt với lượng khoảng 3,4% khối lượng/thể tích của vaccin.

Do đó, trong một phương án của vaccin kết hợp theo sáng chế, vaccin chứa squalan với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 9% khối lượng/thể tích.

Theo sáng chế, “khoảng” chỉ ra là một số có thể thay đổi trong khoảng $\pm 25\%$ xung quanh giá trị được chỉ định của nó. Tốt hơn là “khoảng” có nghĩa là $\pm 20\%$ xung quanh giá trị của nó, tốt hơn nữa là “khoảng” có nghĩa là $\pm 15, 12, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2\%$ xung quanh giá trị của nó, hoặc thậm chí “khoảng” có nghĩa là $\pm 1\%$ xung quanh giá trị của nó, theo thứ tự ưu tiên.

Vitamin E axetat trong vacxin kết hợp theo sáng chế có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 10% khối lượng/thể tích của vacxin. Tốt hơn là, vitamin E axetat có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 8% khối lượng/thể tích, hoặc thậm chí từ 3 đến 5% khối lượng/thể tích của vacxin, theo thứ tự ưu tiên.

Tốt nhất: vitamin E axetat có mặt với lượng nằm trong khoảng 4% khối lượng/thể tích của vacxin.

Do đó, trong một phương án của vacxin kết hợp theo sáng chế, vacxin này chứa vitamin E axetat với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 10% khối lượng/thể tích.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra là việc sử dụng squalan và vitamin E axetat với các lượng này trong vacxin kết hợp theo sáng chế là có lợi trong việc tăng cường đáp ứng miễn dịch kháng từng mầm bệnh: PCV2 và PRRSV, và tạo ra sự ổn định. Tuy nhiên bất ngờ là, điều này không gây ra các phản ứng phụ do chủng ngừa đáng kể bất kỳ khi được sử dụng cho lợn đích, và cũng không gây ra tác dụng diệt virus đáng kể bất kỳ trên PRRSV sống.

Vitamin E axetat để sử dụng trong vacxin kết hợp theo sáng chế tốt hơn là DL-alpha-tocopherol-axetat, mà là raxemat của hóa chất có số CAS là: 7695-91-2.

Trong phương án của vacxin kết hợp theo sáng chế, các kháng nguyên là:

Đối với kháng nguyên không sao chép từ PCV2: protein ORF2 thu được từ hệ biểu hiện tái tổ hợp, hoặc được phân phối và biểu hiện nhờ hạt replicon; hạt replicon là hạt alphavirus khiếm khuyết, được phát triển bởi AlphaVax. PCV2 mẹ của trình tự ORF2 được biểu hiện, có thể là bất kỳ trong số các typ huyết thanh a, b, c, hoặc d của PCV2, hoặc có thể từ thể khảm từ một hoặc nhiều typ huyết thanh này.

Đối với PRRSV: virus sống nhược độc là từ một hoặc nhiều kiểu gen, ví dụ như typ 1, typ 2 và/hoặc typ 3. Tốt hơn là: PRRSV sống là dạng nhược độc từ chủng DV hoặc chủng Nebraska.

Trong phương án của vacxin theo sáng chế, chất mang được dụng là nước. Tốt hơn là nước có độ tinh khiết cao, như nước cất 2 lần, nước được vi lọc, hoặc nước thẩm thấu ngược. Tốt hơn nữa là: nước này là nước để tiêm, và là tiệt trùng và gần như không chứa các chất gây sốt.

Đặc điểm thuận tiện của các vacxin dựa trên nhũ tương dầu trong nước, là ở chỗ các kháng nguyên thường nằm trong pha nước. Điều này có nghĩa là pha dầu có thể được điều chế và nhũ hóa trong nước riêng, sử dụng các phương pháp và kỹ thuật không

thích hợp cho việc duy trì chất lượng hoặc khả năng tồn tại của các kháng nguyên trong vaccin. Ví dụ, bằng cách sử dụng kỹ thuật nhũ hóa năng lượng cao ở nhiệt độ cao. Kỹ thuật này tạo ra nhũ tương dầu theo sáng chế, mà là nhũ tương dầu trong nước của squalan, vitamin E axetat và polysorbate 80 trong nước.

Để bào chế vaccin kết hợp theo sáng chế, pha nước với các kháng nguyên, và nhũ tương dầu với các tá chất được kết hợp bằng cách trộn nhẹ ở nhiệt độ phòng.

Sự kết hợp hai chế phẩm gây ra sự pha loãng của mỗi chế phẩm này. Kết quả là mỗi chế phẩm này cần được điều chế dưới dạng chế phẩm trung gian trong đó nồng độ của các thành phần khác nhau là lớn hơn nồng độ của nó sẽ có trong vaccin thành phẩm, theo một hệ số bằng với độ pha loãng sẽ được áp dụng. Thông thường pha nước và nhũ tương dầu có thể được trộn với tỷ lệ thể tích bất kỳ trong khoảng từ 10:90 đến 90:10.

Vaccin kết hợp theo sáng chế tốt hơn là chứa cả pha nước và nhũ tương dầu như được mô tả, ở tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng từ 20:80 đến 80:20.

Do đó trong một phương án, vaccin kết hợp theo sáng chế được bào chế từ hỗn hợp của pha nước và nhũ tương dầu, ở tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng 20:80 đến khoảng 80:20.

Tốt hơn là tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng từ 30:70 đến khoảng 70:30; nằm trong khoảng từ 40:60 đến khoảng 60:40; hoặc thậm chí tỷ lệ thể tích là khoảng 50:50, theo thứ tự ưu tiên.

Rõ ràng là, khi tỷ lệ kết hợp của pha nước và nhũ tương dầu là 50:50, mỗi chế phẩm trong hai chế phẩm này nên bao gồm các thành phần khác nhau của nó với lượng hoặc nồng độ cao hơn hai lần so với mong muốn trong chế phẩm vaccin thành phẩm mà được bào chế bằng cách kết hợp hai chế phẩm trung gian.

Trong một phương án được ưu tiên, nhũ tương dầu theo sáng chế được điều chế bằng cách sử dụng chất nhũ hoá có giá trị HLB (cân bằng ưa nước-ưa lipid) trong khoảng từ 8 đến khoảng 20; chất nhũ hoá được ưu tiên là polysorbate 80.

Polysorbate 80 là hóa chất có số CAS là 9005-65-6, còn được đặt tên: polyoxyetylen sorbitan monooleat. Nó có giá trị HLB là 14, và được bán rộng rãi trên thị trường, ví dụ như Tween 80.

Tốt hơn là polysorbate 80 có mặt trong vaccin kết hợp theo sáng chế với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến khoảng 5% khối lượng/thể tích của vaccin. Tốt hơn là, polysorbate 80 có mặt với lượng nằm trong khoảng từ 0,3 đến 3% khối lượng/thể tích,

0,5 đến 2,5%, hoặc thậm chí 1 đến 2% khối lượng/thể tích của vacxin, theo thứ tự ưu tiên.

Tốt nhất: polysorbate 80 có mặt với lượng là khoảng 1,6% khối lượng/thể tích của vacxin.

Do đó, trong một phương án, vacxin kết hợp theo sáng chế chứa polysorbate 80 với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến khoảng 5% khối lượng/thể tích.

Nhũ tương dầu theo sáng chế, có thể được điều chế ở bất kỳ quy mô nào và sử dụng thiết bị làm đồng nhất phù hợp bất kỳ, như từ: Silverson, Ultra Turrax™, hoặc thiết bị phản ứng Dispax (IKA). Người có kiến thức trung bình có thể thực hiện và tối ưu hóa quá trình nhũ hóa này để kiểm soát kích thước của các hạt của pha phân tán (ở đây là: các tá chất trong dầu). Cùng với việc lựa chọn về loại và nồng độ của chất nhũ hoá, quá trình này kiểm soát các tính chất được lý của nhũ tương, và cả độ ổn định của nó. Các tham số chính của chính quá trình nhũ hóa là: năng lượng đầu vào (công suất và số vòng trên phút), nhiệt độ, thời gian, và số chu kỳ lặp lại. Chi tiết về các phương án của quá trình nhũ hóa được trình bày phía dưới.

Kích thước của các hạt của pha phân tán tốt hơn là tương đối nhỏ. Khi đường kính của các hạt của pha phân tán dưới khoảng 1 micromet, các nhũ tương này thường được gọi là “nhũ tương có đường kính hạt dưới micromet”.

Trong phương án của nhũ tương dầu trong nước của vacxin kết hợp theo sáng chế, nhũ tương này là một nhũ tương có đường kính hạt dưới micromet.

Thiết bị để đo kích thước hạt 1 micromet hoặc nhỏ hơn thường sẵn có, ví dụ như bằng phép đo nhiễu xạ laze. Thông thường kích thước hạt được thể hiện bằng nanomet (nm), và ở dạng kích thước hạt trung bình, còn được biết là đường kính trung vị, được biểu thị bằng D50 của hàm phân bố kích thước hạt tích lũy.

Theo sáng chế, kích thước hạt được biểu thị bằng nm của D50, như được xác định bằng cách sử dụng Mastersizer™ (Malvern Instruments). Các phép đo kích thước hạt có thể được thực hiện trong nhũ tương dầu (cô đặc) hoặc trong vacxin kết hợp; chỉ số khúc xạ hạt của pha dầu theo sáng chế là 1,48. Báo cáo phân tích kích thước Malvern Mastersizer thể hiện D50 là D(0,50). Tất cả các điều này đã được biết rõ đối với một người có kiến thức trung bình.

Có nhiều cách sẵn có để sản xuất nhũ tương có đường kính hạt dưới micromet như vậy, thường bằng cách sử dụng quá trình nhũ tương hóa năng lượng cao, ví dụ như

sử dụng: máy đồng hóa áp suất cao, các thiết bị roto-stato, máy trộn, sóng siêu âm, màng vi xốp, hoặc thiết bị vi ống.

Quy trình được ưu tiên hơn để nhũ hóa năng lượng cao theo sáng chế, là sử dụng máy đồng hóa áp suất cao, tốt hơn là Microfluidiser™ (Microfluidics). Thông thường là 3 đường dẫn ở áp suất nằm trong khoảng từ 500 đến 1500 bar (nghĩa là, từ 7000 đến 22000 psi) là đủ.

Nhũ tương được điều chế theo cách này thường có các hạt của pha phân tán có D50 bằng 500 nm hoặc thấp hơn, và có phân bố kích thước hẹp; theo sáng chế, pha phân tán là các giọt chứa các tá chất dầu.

Thông thường nhũ tương có các hạt có kích thước rất mịn này của pha phân tán, được điều chế qua nhiều bước. Theo cách này, nhũ tương dầu tương đối thô ban đầu được điều chế bằng cách trộn năng lượng thấp, tiếp theo là một hoặc nhiều bước xử lý năng lượng cao sau đó để làm giảm hơn nữa kích thước hạt.

Tiếp theo, nhũ tương dầu ‘được vi lỏng hóa’ này, chứa các tá chất và chất nhũ hoá trong nước sau đó được kết hợp với pha nước chứa các kháng nguyên, để bào chế vaccin kết hợp theo sáng chế.

Do đó, trong phương án của nhũ tương dầu trong nước có kích thước hạt dưới micromet của vaccin kết hợp theo sáng chế, các giọt dầu có D50 bằng 500 nm hoặc nhỏ hơn; tốt hơn là D50 bằng 250 nm hoặc nhỏ hơn. Tốt hơn là: D50 bằng 150 nm hoặc nhỏ hơn.

Vì sự đồng nhất và chất lượng của sản phẩm, không chỉ đường kính hạt trung vị, mà cả khoảng kích thước hạt, còn được biết là phân bố kích thước, có thể được theo dõi và kiểm soát một cách thuận lợi. Phân bố kích thước của các giọt dầu trong nhũ tương dầu trong nước có kích thước hạt dưới micromet của vaccin kết hợp theo sáng chế tốt hơn là tương đối hẹp. Chỉ số về phân bố kích thước hạt là D90 của phân bố kích thước hạt tích lũy.

Do đó, trong phương án của nhũ tương dầu trong nước có kích thước hạt dưới micromet của vaccin kết hợp theo sáng chế, các giọt dầu có D90 dưới 900 nm, tốt hơn là D90 dưới 500 nm, 400 nm, hoặc thậm chí dưới 300 nm, theo thứ tự ưu tiên. Tốt nhất: D90 bằng khoảng 250 nm.

Một trong các lợi ích của nhũ tương có kích thước hạt nhỏ và phân bố kích thước hạt nhỏ như vậy, là nhũ tương này sau đó có thể được khử trùng bằng cách lọc, mà

không bị hao hụt đáng kể nguyên liệu. Điều này do các máy lọc khử trùng thông thường có kích thước lỗ khoảng 0,2 micromet. Sự khử trùng bằng máy lọc như vậy khắc phục được sự cần thiết phải có các phương pháp khử trùng khác mà có thể làm tổn hại đến chất lượng của các thành phần trong nhũ tương dầu, như bằng: đun nóng, hóa chất, hoặc bức xạ.

Tùy theo các hoàn cảnh sử dụng dự kiến của vaccin kết hợp theo sáng chế, ví dụ như các điều kiện thực địa, hoặc đặc điểm của loài đích, có thể tốt hơn nếu tối ưu hóa vaccin. Điều này là nằm trong khả năng của người có kiến thức trung bình, và thường bao gồm việc tinh chỉnh hiệu quả, độ an toàn, hoặc sự ổn định của vaccin.

Vaccin kết hợp theo sáng chế chứa kháng nguyên không sao chép từ PCV2, và PRRSV sống, ở lượng mà có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ trên lợn đích kháng các bệnh có liên quan của chúng, như được mô tả ở trên.

Người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật của sáng chế có khả năng xác định hiệu quả của vaccin kết hợp theo sáng chế, ví dụ bằng cách theo dõi đáp ứng miễn dịch sau chủng ngừa hoặc sau khi gây nhiễm, ví dụ bằng cách theo dõi các dấu hiệu bệnh trên vật chủ, điểm số lâm sàng, hoặc bằng cách tái phân lập mầm bệnh, và so sánh các kết quả này với đáp ứng gây nhiễm-chủng ngừa được thấy trên động vật được chủng ngừa giả.

Như là một dấu hiệu, lượng kháng nguyên được sử dụng trong vaccin kết hợp theo sáng chế có thể được dựa trên lượng được sử dụng trong vaccin kết hợp hoặc một giá tương ứng của các kháng nguyên này. Ví dụ như, vaccin kết hợp theo sáng chế có thể chứa trong mỗi mililit: PCV2: 1 - 50 μ g ORF2; và PRRSV: 10^3 - 10^6 TCID₅₀. Phương pháp định lượng các kháng nguyên này đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật, và cũng có thể dựa vào phương pháp định lượng dựa trên ELISA theo các tiêu chuẩn cụ thể.

Vaccin kết hợp theo sáng chế có thể được kết hợp thuận lợi với một hoặc nhiều kháng nguyên khác, có khả năng sao chép hoặc không sao chép, nguyên vẹn hoặc đã bị phá vỡ. Tuy nhiên sự kết hợp này tốt hơn là được thực hiện một cách thận trọng để đảm bảo sự ổn định và hiệu quả của toàn bộ vaccin kết hợp, và khả năng tồn tại của các thành phần vaccin có khả năng sao chép. Các lựa chọn như vậy nằm trong khả năng thông thường của người có kiến thức trung bình.

Do đó, trong một phương án vacxin kết hợp theo sáng chế có chứa ít nhất một kháng nguyên bổ sung.

Kháng nguyên bổ sung này là dạng nhược độc của vi sinh vật gây bệnh cho lợn, hoặc là kháng nguyên không sao chép thu được từ vi sinh vật gây bệnh cho lợn. Vi sinh vật này có thể là virus, vi khuẩn, ký sinh trùng, nấm, rickettsia, động vật nguyên sinh và/hoặc ký sinh trùng bất kỳ gây bệnh cho lợn.

Các ví dụ về các vi sinh vật gây bệnh cho lợn này là: virus pseudorabies, virus parvo trên lợn, virus dịch tả lợn, virus cúm lợn, virus gây bệnh lở mồm long móng, virus gây tiêu chảy cấp trên lợn, virus viêm dạ dày ruột truyền nhiễm, coronavirus gây các bệnh về phổi ở lợn, virus gây bệnh viêm dạ dày phỏng nước, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Lawsonia intracellularis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Brachyspira*, *E.coli*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Salmonella*, *Clostridia*, *Pasteurella*, *Erysipelothrix*, *Leptospira*, *Bordetella*, *Toxoplasma*, *Isospora*, và *Trichinella*.

Kháng nguyên bổ sung được ưu tiên hơn là một hoặc nhiều trong số: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Lawsonia intracellularis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, và virus cúm lợn.

Do đó trong phương án được ưu tiên hơn, vacxin kết hợp theo sáng chế còn chứa kháng nguyên không sao chép từ *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo).

Trong một phương án được ưu tiên khác, vacxin kết hợp theo sáng chế còn chứa kháng nguyên không sao chép từ *Lawsonia intracellularis* (Lawsonia).

Các kháng nguyên không sao chép từ Mhyo và Lawsonia tốt hơn là vacxin vi khuẩn.

Theo sáng chế, “vacxin vi khuẩn” là chế phẩm chứa vi khuẩn bị bất hoạt (bị giết), trong đó vi khuẩn bị bất hoạt có thể là toàn bộ tế bào nguyên vẹn, hoặc có thể đã bị hư hại đến một mức độ nào đó bởi sự bất hoạt, hoặc hỗn hợp của chúng, ví dụ như trong toàn bộ môi trường nuôi cấy bị bất hoạt.

Vacxin vi khuẩn Mhyo hoặc Lawsonia tốt hơn là môi trường nuôi cấy tế bào nguyên vẹn bị giết. Vacxin vi khuẩn Mhyo tốt hơn là từ chủng 11 hoặc chủng J. NB: Mhyo trước đây được gọi là *M. suis* pneumoniae.

Lượng kháng nguyên được sử dụng trong vacxin kết hợp theo sáng chế có thể là: của Mhyo: 2 - 20% khối lượng/thể tích là môi trường nuôi cấy Mhyo đậm đặc bất hoạt;

và/hoặc của Lawsonia: các tế bào nguyên vẹn bị bất hoạt trong khoảng 1×10^7 đến 1×10^{10} tế bào.

Các tác dụng được quan sát thấy của vaccin kết hợp theo sáng chế là:

Đối với Mhyo: ngăn ngừa hoặc làm giảm tổn thương phổi gây ra bởi Mhyo, như đông đặc phổi, và bệnh hô hấp mãn tính;

Đối với Lawsonia: làm giảm sự cư trú và thải virus vào phân bởi Lawsonia, và làm giảm các dấu hiệu của bệnh viêm hồi tràng kèm theo tăng sản ruột, bệnh ruột xuất huyết ở lợn, hoặc bệnh đa u tuyến ruột lợn;

Đối với Lawsonia, hiệu lực của vaccin kết hợp theo sáng chế, có thể được phát hiện về mặt huyết thanh bởi sự gia tăng các mức nồng độ huyết thanh của các kháng thể đặc hiệu Lawsonia, dễ dàng phát hiện được bằng cách sử dụng các kỹ thuật dựa trên ELISA.

Đối với Mhyo, phương pháp đo hiệu lực vaccin đáng tin cậy nhất là sự giảm điểm số tổn thương phổi sau khi nhiễm Mhyo. Các tổn thương này thường được tính điểm trong quá trình mổ tử thi bằng cách đánh giá bằng mắt thường sự đông đặc phổi, dựa trên thang điểm Goodwin (Goodwin et al., 1969, J. Hyg. Camb., vol. 67, p. 465-476); thang điểm này chạy từ 0 đến tối đa 55 điểm/động vật đối với phổi bị nhiễm bệnh hoàn toàn.

Vaccin kết hợp theo sáng chế có thể được kết hợp thuận lợi với dược chất như kháng sinh, hormon, và/hoặc thuốc chống viêm.

Vaccin kết hợp theo sáng chế có thể chứa thêm các tá dược, để tối ưu hóa hiệu quả hoặc sự ổn định của vaccin, như các chất ổn định hoặc các chất bảo quản. Các ví dụ về các chất ổn định là: sữa bột, gelatin, abumin huyết thanh, sorbitol, trehaloza, các axit amin, spermidin, dextran hoặc polyvinyl pyrrolidon. Các ví dụ về các chất bảo quản là: thimerosal, merthiolat, các hợp chất phenolic, hoặc gentamicin.

Khi các kháng nguyên được sử dụng trong vaccin kết hợp theo sáng chế được lựa chọn cụ thể, vaccin kết hợp này có thể được sử dụng làm vaccin mà được gọi là vaccin đánh dấu. Điều này có nghĩa là tính miễn dịch gây ra bởi vaccin kháng một trong số các mầm bệnh này, có thể được phân biệt bằng một số phương pháp phát hiện với đáp ứng miễn dịch sẽ xảy ra khi gây nhiễm động vật đích bằng mầm bệnh kiểu hoang. Điều này còn được biết là DIVA: “phân biệt động vật bị nhiễm bệnh với động vật được chủng

ngừa”. Vacxin này do đó có ‘chất đánh dấu’ dương tính hoặc âm tính so với sự nhiễm khuẩn hoang.

Do đó, trong một phương án, vacxin kết hợp theo sáng chế là vacxin đánh dấu.

Trong một phương án, vacxin kết hợp này là dành cho lợn.

Thuật ngữ “lợn” đề cập đến động vật thuộc họ Suidae, và ưu tiên hơn là các động vật thuộc chi Sus, mà cũng được gọi là lợn. Các ví dụ là: lợn hoang dã hoặc lợn nhà, lợn, lợn rừng, lợn hươu, hoặc lợn bươu. Thuật ngữ này cũng bao gồm lợn được gọi bởi tên tùy ý, ví dụ như đề cập đến giới tính hoặc tuổi của chúng như: lợn nái, lợn chúa, lợn lòi đực, lợn rừng, lợn thỉn, lợn cái con, lợn con cai sữa, hoặc lợn con.

Ngoài ra, thuật ngữ lợn đề cập đến lợn thuộc loại bất kỳ như loại làm giống hoặc loại vỗ béo, và các dòng bố mẹ thuộc loại bất kỳ trong các loại này.

Các phương án bổ sung hoặc thêm nữa của vacxin kết hợp theo sáng chế là có thể hiểu được, và hoàn toàn có thể đạt được đối với người có kiến thức trung bình. Các các phương án thêm nữa này cũng có thể được sử dụng trong một hoặc nhiều sự kết hợp với các phương án đã được mô tả.

Do đó trong phương án của vacxin kết hợp theo sáng chế, một, nhiều, hoặc toàn bộ các các điều kiện áp dụng, được chọn từ nhóm bao gồm:

- vacxin kết hợp chứa squalan với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 9% khối lượng/thể tích; tốt hơn là squalan được chứa với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 5% khối lượng/thể tích;
- vacxin kết hợp chứa vitamin E axetat với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 10% khối lượng/thể tích; tốt hơn là vitamin E axetat được chứa với lượng nằm trong khoảng từ 3 – 5% khối lượng/thể tích;
- vitamin E axetat tốt hơn là DL-alpha-tocopherol-axetat;
- vacxin kết hợp được bào chế từ hỗn hợp của pha nước và nhũ tương dầu, ở tỉ lệ thể tích khoảng 20:80 đến khoảng 80:20;
- vacxin kết hợp chứa polysorbate 80 với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 0,1 đến khoảng 5% khối lượng/thể tích; tốt hơn là polysorbate 80 được chứa với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 2% khối lượng/thể tích;
- nhũ tương dầu trong nước này là dạng nhũ tương có đường kính hạt dưới micromet; tốt hơn là các giọt dầu có D50 bằng 500 nm hoặc nhỏ hơn.

- vacxin kết hợp chứa ít nhất một kháng nguyên bổ sung; tốt hơn là một hoặc nhiều kháng nguyên trong số: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, và virus cúm lợn;
- vacxin kết hợp cũng chứa kháng nguyên không sao chép từ *Mycoplasma hyopneumoniae*;
- vacxin kết hợp cũng chứa kháng nguyên không sao chép từ *Lawsonia intracellularis*;
- vacxin kết hợp là vacxin đánh dấu; và
- vacxin kết hợp là dành cho lợn.

Trong phương án của vacxin kết hợp theo sáng chế, vacxin này chứa squalan với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 9% khối lượng/thể tích; vacxin này chứa vitamin E axetat với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 10% khối lượng/thể tích; vitamin E axetat là DL-alpha-tocopherol-axetat; vacxin này được bào chế từ hỗn hợp của pha nước và nhũ tương dầu, ở tỷ lệ thể tích nằm trong khoảng từ 20:80 đến khoảng 80:20; vacxin này chứa polysorbate 80 với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến khoảng 5% khối lượng/thể tích; nhũ tương dầu trong nước này là loại nhũ tương có đường kính hạt dưới micromet; và vacxin này là dành cho lợn.

Vacxin kết hợp theo sáng chế có thể được bào chế theo nhiều cách khác nhau, như được mô tả ở đây.

Một cách có lợi để bào chế vacxin kết hợp theo sáng chế, là bằng cách hoàn nguyên chế phẩm đông khô của PRRSV sống. Ví dụ như, dạng chưa hoàn thiện của vacxin kết hợp theo sáng chế, vẫn chưa bao gồm PRRSV, có thể được sử dụng làm chất pha loãng cho chế phẩm đông khô của PRRSV nhược độc sống, một cách thuận tiện: vacxin PRRSV sống được làm đông khô hiện nay như, ví dụ, Porcilis PRRSV, hoặc Prime Pac™ PRRS+.

Do đó, vacxin kết hợp theo sáng chế có thể được bào chế từ kit, chứa ít nhất hai đồ bao gói: một đồ bao gói chứa tất cả các thành phần của vacxin kết hợp theo sáng chế ngoại trừ virus PRRSV sống; và một đồ bao gói chứa PRRSV nhược độc sống ở dạng đông khô. Các thành phần của kit này sau đó cùng nhau tạo nên vacxin kết hợp theo sáng chế.

Do đó trong khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến kit chứa ít nhất hai đồ bao gói: một đồ bao gói chứa kháng nguyên không sao chép từ PCV2 trong nhũ tương dầu

trong nước chứa squalan và vitamin E axetat; và một đồ bao gói chứa PRRSV sống ở dạng đông khô.

Khi hoàn nguyên PRRSV sống, vaccin kết hợp hoàn thiện theo sáng chế được tạo thành. Bước này còn được gọi là trộn vaccin ‘tại chỗ’, hoặc trộn ‘tại thực địa’.

Mặc dù vaccin kết hợp này không có tác dụng diệt virus đối với PRRSV, tốt hơn là nên hoàn nguyên ngay trước khi sử dụng vaccin, để đảm bảo chất lượng tốt nhất của vaccin. Tốt hơn là hoàn nguyên trong vòng 8 tiếng trước khi sử dụng, tốt hơn là trong vòng 6, 5, 4, 3, hoặc thậm chí 2 tiếng trước khi sử dụng, theo thứ tự ưu tiên.

Kit theo sáng chế và các thành phần của nó có thể bao gồm bất kỳ trong số các phương án (được ưu tiên hoặc không) như được mô tả ở đây cho vaccin kết hợp theo sáng chế, hoặc sự kết hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều trong số các phương án của vaccin kết hợp theo sáng chế.

Ứng dụng có lợi khác của kit theo sáng chế là ứng dụng trong đó cả kháng nguyên không sao chép từ Lawsonia và PRRSV sống đều được đưa vào vaccin kết hợp theo sáng chế bằng cách hoàn nguyên chế phẩm đông khô.

Do đó trong một phương án, kit theo sáng chế chứa ít nhất ba đồ bao gói: một đồ bao gói chứa kháng nguyên không sao chép từ PCV2, trong nhũ tương dầu trong nước chứa squalan và vitamin E axetat; một đồ bao gói chứa PRRSV sống ở dạng đông khô; và một đồ bao gói chứa kháng nguyên không sao chép từ Lawsonia ở dạng đông khô.

Trong phương án được ưu tiên của kit theo sáng chế chứa ít nhất ba đồ bao gói, đồ bao gói chứa kháng nguyên không sao chép từ PCV2 trong nhũ tương dầu trong nước chứa squalan và vitamin E axetat, và cũng chứa kháng nguyên không sao chép từ Mhyo.

Dạng đông khô có thể là bánh đông khô trong đồ bao gói, ví dụ như lọ, nhưng cũng có thể là dạng khối cầu đông khô (lyosphere) như được áp dụng trong công nghệ Sphereon™.

Do bản chất của khối đông khô, việc hoàn nguyên nó không làm thay đổi đáng kể (nghĩa là, ít hơn khoảng 5%; tốt hơn là: ít hơn khoảng 1%) thể tích của chất pha loãng được sử dụng. Kết quả là, chế phẩm của vaccin kết hợp theo sáng chế với tất cả các thành phần ngoại trừ PRRSV sống, hoặc với tất cả các thành phần ngoại trừ PRRSV sống và kháng nguyên không sao chép từ Lawsonia, mà cần được cung cấp trong kit theo sáng chế, có thể được cung cấp chủ yếu cùng với các thành phần khác của nó với lượng cuối cùng hoặc ở các nồng độ cuối cùng của chúng.

Vacxin kết hợp theo sáng chế có thể được bào chế từ các kháng nguyên và các tá được tương ứng, bằng các phương pháp đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật, và nằm trong khả năng thông thường của người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ như: PCV2 ORF2 có thể được biểu hiện bằng baculovirus tái tổ hợp trong môi trường nuôi cấy tế bào côn trùng, và được thu gom; theo cách khác, protein PCV2 ORF2 có thể được phân phối và biểu hiện bằng cách sử dụng hạt replicon (ở trên). PRRSV có thể được nuôi cấy trên các tế bào chủ thích hợp, ví dụ đại thực bào lợn sơ cấp, hoặc dòng tế bào như Marc-145 hoặc MA104,

Các kháng nguyên này được định lượng, và đưa vào pha nước với lượng theo yêu cầu. Việc này có thể cùng với hoặc không cùng với các kháng nguyên không sao chép từ Mhyo, Lawsonia và/hoặc PRRSV sống; trong trường hợp vacxin kết hợp theo sáng chế được thương mại hóa dưới dạng kit theo sáng chế.

Nhũ tương dầu với các tá chất và chất nhũ hoá trong nước, được điều chế riêng bằng quá trình nhũ hóa. Sau đó, nó được trộn với pha nước với các kháng nguyên, theo tỷ lệ thể tích mong muốn.

Các giai đoạn khác nhau của quá trình sản xuất được theo dõi bằng các thử nghiệm phù hợp, ví dụ bằng thử nghiệm vi sinh vật và xét nghiệm miễn dịch đối với chất lượng và số lượng vi khuẩn và virus, hoặc kháng nguyên khác bất kỳ; bằng các thử nghiệm về sự vắng mặt của tác nhân ngoại lai; các thử nghiệm về độ ổn định hóa học và sinh học; và cuối cùng bằng các thí nghiệm in vitro hoặc in vivo để xác định hiệu quả và độ an toàn của vacxin. Tất cả các thử nghiệm này đều được biết rõ đối với người có kiến thức trung bình, và được quy định trong các quy định của Chính phủ như Dược điển, và trong các sổ tay như: Remington and Pastoret (cả hai đã được nhắc đến ở trên).

Do đó trong khía cạnh khác nữa sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế vacxin kết hợp theo sáng chế, bao gồm các bước:

- điều chế pha nước chứa kháng nguyên không sao chép từ PCV2, và PRRSV sống, và
- trộn pha nước nói trên với nhũ tương dầu chứa squalan và vitamin E axetat.

Như đã được mô tả, phương pháp bào chế vacxin kết hợp theo sáng chế có thể được điều chỉnh một cách thuận tiện để kết hợp kháng nguyên từ Mhyo, hoặc từ Lawsonia và/hoặc từ PRRSV sống ở giai đoạn sau, ví dụ như bằng cách hoàn nguyên các chế phẩm đông khô riêng của các kháng nguyên này.

Do đó theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế vaccin kết hợp theo sáng chế, bao gồm các bước:

- điều chế PRRSV sống ở dạng đông khô,
- điều chế pha nước chứa kháng nguyên không sao chép từ PCV2,
- trộn pha nước nói trên với nhũ tương dầu chứa squalan và vitamin E axetat, và
- hoàn nguyên PRRSV sống ở dạng đông khô nói trên với hỗn hợp của pha nước và nhũ tương dầu nói trên.

Pha nước chứa kháng nguyên không sao chép từ PCV2 chứa tùy ý kháng nguyên không sao chép từ Mhyo.

Tương tự,

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế vaccin kết hợp theo sáng chế, bao gồm các bước:

- điều chế PRRSV sống ở dạng đông khô,
- điều chế kháng nguyên không sao chép từ Lawsonia ở dạng đông khô,
- điều chế pha nước chứa kháng nguyên không sao chép từ PCV2,
- trộn pha nước nói trên với nhũ tương dầu chứa squalan và vitamin E axetat, và
- hoàn nguyên PRRSV sống ở dạng đông khô nói trên và kháng nguyên không sao chép từ Lawsonia nói trên với hỗn hợp của pha nước và nhũ tương dầu nói trên.

Pha nước chứa kháng nguyên không sao chép từ PCV2 tùy ý chứa kháng nguyên không sao chép từ Mhyo.

Hoặc trong phương án tương tự: sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế vaccin kết hợp theo sáng chế, bao gồm các bước:

- điều chế hỗn hợp của pha nước chứa kháng nguyên không sao chép từ PCV2, và của nhũ tương dầu chứa squalan và vitamin E axetat, và
- hoàn nguyên PRRSV sống ở dạng đông khô với hỗn hợp nói trên.

Pha nước chứa kháng nguyên không sao chép từ PCV2 chứa tùy ý kháng nguyên không sao chép từ Mhyo.

Tại các vị trí khác nhau trong các phương pháp trên, các bước bổ sung có thể được thêm vào, ví dụ như, để xử lý thêm như tinh chế hoặc bảo quản. Phương pháp bào chế còn có thể bao gồm bước trộn với kháng nguyên bổ sung, hoặc các tá dược được dụng như các chất ổn định hoặc các chất bảo quản.

Các biến đổi này, và tùy ý nhiều hơn nữa, có thể được kết hợp thành một bước thêm nữa tại vị trí thích hợp trong phương pháp bào chế theo sáng chế.

Do đó các phương pháp bào chế theo sáng chế có thể bao gồm bất kỳ trong số các phương án (được ưu tiên hoặc không) như đã được mô tả ở đây cho vaccin kết hợp theo sáng chế, hoặc sự kết hợp bất kỳ của hai hoặc nhiều phương án này của vaccin kết hợp theo sáng chế.

Như đã được mô tả, vaccin kết hợp theo sáng chế, mà có thể được bào chế bằng phương pháp theo sáng chế, có thể được sử dụng thuận tiện để sử dụng cho lợn, để bảo vệ khỏi bệnh nhiễm trùng bởi và/hoặc bệnh liên quan đến sự nhiễm PCV2 và PRRSV.

Do đó theo khía cạnh thêm nữa sáng chế đề cập đến nhũ tương dầu trong nước chứa squalan và vitamin E axetat, kháng nguyên không sao chép từ PCV2 và PRRSV sống, để sử dụng trong việc chủng ngừa cho lợn kháng lại PCV2 và PRRSV.

Theo một cách khác:

Theo khía cạnh thêm nữa sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng nguyên không sao chép từ PCV2 và PRRSV sống, để sản xuất vaccin kết hợp cho lợn, khác biệt ở chỗ vaccin này là nhũ tương dầu trong nước chứa squalan và vitamin E axetat.

Vaccin kết hợp theo sáng chế có thể được sử dụng để chủng ngừa cho lợn kháng lại PCV2 và PRRSV.

Do đó theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp chủng ngừa cho lợn kháng lại PCV2 và PRRSV, bằng cách sử dụng cho lợn nhũ tương dầu trong nước chứa squalan và vitamin E axetat, kháng nguyên không sao chép từ PCV2 và PRRSV sống.

Hoặc trong phương án tương tự: sáng chế đề cập đến phương pháp chủng ngừa cho lợn kháng lại PCV2 và PRRSV, bằng cách sử dụng cho lợn vaccin kết hợp theo sáng chế.

Nhũ tương dầu trong nước như vaccin kết hợp theo sáng chế, tốt hơn là được sử dụng bằng một số đường sử dụng ngoài đường tiêu hóa, ví dụ bằng tất cả các con đường tiêm vào hoặc xuyên qua da: ví dụ vào trong cơ, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, trong da, dưới niêm mạc, hoặc dưới da. Điều này có thể đạt được theo các cách khác nhau, ví dụ như sử dụng xylanh và kim tiêm dưới da cổ điển.

Theo một cách khác, việc sử dụng ngoài đường tiêu hóa có thể được thực hiện bằng một số phương pháp tiêm không cần kim tiêm, phân phối vaccin bằng thiết bị chuyên dụng phân phối vaccin trong da, hoặc qua da như IDAL™.

Trong phương án của phương pháp chủng ngừa theo sáng chế, việc sử dụng vaccin là bằng đường trong cơ.

Thể tích của một liều dành cho động vật của vaccin kết hợp theo sáng chế là không quan trọng miễn là đạt được tác dụng bảo vệ miễn dịch hiệu quả. Thể tích này có thể khác nhau với các đường sử dụng khác nhau như: trong cơ, dưới da, hoặc trong da. Tốt hơn là thể tích của một liều dành cho động vật nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10 ml mỗi động vật; tốt hơn là trong khoảng từ 0,2 đến 5 ml, 0,5 đến 3, hoặc trong khoảng 0,5 đến 2 ml mỗi liều dành cho động vật, theo thứ tự ưu tiên.

Do đó trong phương án của phương pháp sử dụng theo sáng chế, vaccin kết hợp theo sáng chế được sử dụng với liều nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10 ml cho mỗi động vật.

Phác đồ sử dụng đối với phương pháp chủng ngừa theo sáng chế, cho lợn đích có thể ở liều đơn hoặc nhiều liều, hoặc theo cách phù hợp với các khía cạnh thực tế của việc chăn nuôi lợn.

Khi cần thiết, lợn đích có thể được sử dụng lần thứ hai hoặc nhiều lần vaccin kết hợp theo sáng chế, sau này trong cuộc đời, được gọi là chủng ngừa tăng cường. Tuy nhiên vaccin kết hợp theo sáng chế được tối ưu hóa theo cách mà một liều chủng ngừa duy nhất thường sẽ đủ để gây ra tác dụng bảo vệ miễn dịch trong giai đoạn thích hợp của cuộc đời của con lợn này, ví dụ như trong giai đoạn vỗ béo của lợn đến 6 tháng tuổi.

Do đó trong phương án được ưu tiên, vaccin kết hợp theo sáng chế được sử dụng chỉ một lần cho mỗi lợn đích, nghĩa là, nó là vaccin đơn liều.

Tốt hơn là, phác đồ theo phương pháp chủng ngừa được đưa vào lịch chủng ngừa hiện có của các vaccin khác mà lợn đích có thể cần, để làm giảm thêm áp lực lên động vật và làm giảm chi phí nhân công. Các vaccin khác này có thể được sử dụng theo cách đồng thời, cùng lúc, hoặc lần lượt, theo cách phù hợp với việc sử dụng đã được đăng ký của chúng.

Do đó trong một phương án của phương pháp chủng ngừa cho lợn theo sáng chế, vaccin kết hợp theo sáng chế được sử dụng kết hợp với vaccin khác cho lợn.

Các lợn đích để chủng ngừa theo sáng chế có thể ở độ tuổi bất kỳ mà tại đó chúng dễ chủng ngừa, và/hoặc dễ mắc bệnh hoặc dễ bị nhiễm trùng mà vacxin này có tác dụng bảo vệ chống lại.

Ngoài ra, khối lượng, giới tính, tình trạng miễn dịch, v.v. của lợn đích để chủng ngừa theo sáng chế là không quan trọng mặc dù sẽ tốt hơn nếu chủng ngừa cho các động vật đích khỏe mạnh, và chủng ngừa càng sớm càng tốt để phòng ngừa (hậu quả của) nhiễm trùng sớm bởi Mhyo, Lawsonia, PCV2, hoặc PRRSV.

Do đó, trong một phương án của phương pháp chủng ngừa cho lợn theo sáng chế, vacxin kết hợp theo sáng chế được sử dụng cho lợn con.

Theo sáng chế, “lợn con” là lợn khoảng 2 tháng tuổi.

Do tỷ lệ mắc cao của Mhyo, Lawsonia, PCV2, và PRRSV, và vì việc sử dụng rộng rãi các vacxin kháng lại một hoặc nhiều các mầm bệnh trên, nhiều lợn nái sẽ có huyết thanh dương tính với các kháng thể kháng lại một hoặc nhiều trong số các mầm bệnh Mhyo, Lawsonia, PCV2, và PRRSV. Do đó, lợn con mà uống sữa non từ các lợn nái trên, sẽ là MDA+ (dương tính đối với kháng thể có nguồn gốc từ mẹ). Điều này không gây cản trở hiệu quả của vacxin kết hợp theo sáng chế, vì vacxin này cũng hiệu quả với lợn MDA+.

Do đó trong một phương án của phương pháp chủng ngừa theo sáng chế, vacxin kết hợp theo sáng chế được sử dụng cho lợn MDA+.

PRRSV đặc biệt gây ra bệnh về hô hấp ở lợn trưởng thành.

Do đó trong một phương án của phương pháp chủng ngừa cho lợn theo sáng chế, vacxin kết hợp theo sáng chế được sử dụng cho lợn trưởng thành.

Theo sáng chế, “lợn trưởng thành” là lợn từ khoảng 6 tháng tuổi.

Việc sử dụng vacxin kết hợp theo sáng chế có thể được áp dụng làm phương pháp phòng bệnh hoặc chữa bệnh, hoặc cả hai, vì vacxin này cản trở cả sự thiết lập và sự phát triển của bệnh nhiễm trùng do Mhyo, Lawsonia, PCV2, và PRRSV.

Việc sử dụng vacxin kết hợp theo sáng chế sẽ hỗ trợ làm giảm bệnh nhiễm trùng do một, hoặc tất cả trong số Mhyo, Lawsonia, PCV2, và PRRSV, ở một đàn lợn, trong một trang trại, hoặc ở lợn trong một khu vực địa lý.

Do đó, theo khía cạnh khác nữa sáng chế đề cập đến phương pháp làm giảm tình trạng nhiễm Mhyo, Lawsonia, PCV2, hoặc PRRSV, hoặc các dấu hiệu kèm theo của

bệnh ở lợn, khác biệt ở chỗ phương pháp này bao gồm việc sử dụng cho lợn này vaccin kết hợp theo sáng chế.

Sáng chế này bây giờ sẽ được mô tả thêm bằng các ví dụ không giới hạn sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

1. Bào chế vaccin kết hợp

Vaccin kết hợp theo sáng chế được bào chế như sau:

Nhũ tương dầu ở nồng độ 2x chứa trong mỗi 100 g:

Polysorbate 80 (Tween 80):	3,24 g;
Squalan:	6,75 g;
DL-alpha tocopherol axetat:	7,94 g;
Nước pha tiêm:	82,07 g.

Nhũ tương dầu này được bào chế theo các bước xử lý liên tục sau đây:

- các lượng cần thiết của Tween 80 và squalan được cân và được kết hợp vào cốc có mỏ
- hỗn hợp Tween 80/squalan được làm đồng nhất bằng cách trộn năng lượng thấp (máy khuấy từ), ở nhiệt độ phòng,
- lượng cần thiết của DL-alpha tocopherol axetat được cân, và được thêm vào hỗn hợp Tween 80/squalan đã đồng nhất này
- hỗn hợp đã kết hợp này lại được làm đồng nhất, bằng cách trộn năng lượng thấp ở nhiệt độ phòng,
- hỗn hợp này được làm nóng đến 65 - 75°C
- nước pha tiêm được làm nóng đến 65 - 75°C
- pha dầu và nước đã được làm nóng được trộn sơ bộ bằng cách sử dụng phương pháp trộn năng lượng cao bởi Ultra Turrax với trục đồng hóa N18, trong khoảng 5 - 15 phút; nhiệt độ được giảm từ 65 xuống 55°C.
- hỗn hợp sơ bộ này được đưa vào 3 đường dẫn xuyên qua Microfluidiser (thiết bị vi lỏng hóa) tại 800 bar; nhiệt độ được duy trì dưới 50°C với thiết bị làm mát kiểu xoắn ốc.
- nhũ tương dầu đã vi lỏng hóa này được khử trùng bằng cách lọc qua bộ lọc 0,2 micromet (Pall, Ultipor™ N66); bộ lọc này đã được làm nóng trước đến 55 - 75°C qua vách kép của nó.

Trong nhũ tương dầu cuối cùng này (trong dịch cô đặc 2x), sự hoàn toàn và mức độ đồng nhất được kiểm tra bằng kính hiển vi quang học. Ngoài ra, pH (7,34), và độ thẩm thấu (221 mOsm/kg) cũng được kiểm tra. Phép đo kích thước hạt cho thấy: D100 = 300 nm; D99 = 250 nm; D90 = 200 nm và D50 = 130 nm.

Pha nước (ở nồng độ 2x) được điều chế bằng cách lấy lượng cần thiết của mỗi kháng nguyên không sao chép: Mhyo: 6% thể tích/thể tích của môi trường nuôi cấy bị bất hoạt đậm đặc 10x; Lawsonia: 2×10^9 tế bào bất hoạt; và PCV: 50 μ g ORF2.

Tiếp theo, cả hai chế phẩm đậm đặc này (nhũ tương dầu với các tá chất, và pha nước với các kháng nguyên) được kết hợp ở tỷ lệ thể tích 50:50, bằng cách trộn năng lượng thấp ở nhiệt độ phòng.

Hỗn hợp vaccin này được sử dụng để tạo huyền phù lại ống thuốc tiêm chứa Porcilis PRRS, với thể tích cần thiết để đạt một liều đầy đủ của PRRSV (10^5 TCID₅₀) cho mỗi 2 ml vaccin kết hợp.

Vaccin kết hợp cuối cùng bao gồm: 3,375% khối lượng/thể tích squalan; 3,97% khối lượng/thể tích vitamin E axetat, và 1,62% khối lượng/thể tích Tween 80, và có tỷ trọng 0,9913 g/ml. Các sản phẩm được bảo quản ở 2 - 8°C.

2. Kiểm tra tác dụng diệt virus

Nhũ tương dầu theo sáng chế được ủ với mẫu PRRSV sống, để xác định xem có tác dụng diệt virus xảy ra hay không.

Ngắn gọn: ống thuốc tiêm chứa Porcilis PRRSV được hoàn nguyên trong PBS đến thể tích cuối cùng là 7 ml, để đạt được hiệu giá là 6 Log₁₀ TCID₅₀/ml. 50 μ l mẫu huyền phù virus này được kết hợp với 450 μ l vaccin kết hợp không chứa PRRSV sống, mà được bào chế như trong ví dụ 1, và chứa: squalan, vitamin E axetat, và polysorbate 80, được vi lỏng hóa trong nước, với các kháng nguyên không sao chép từ Mhyo, Lawsonia và PCV2. Mẫu đối chứng của PRRSV được trộn với 450 μ l PBS. Cả hai mẫu được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Tiếp theo, các mẫu đã được ủ này được chuẩn độ để xác định hiệu giá còn lại của PRRSV.

Việc chuẩn độ được thực hiện trên các lớp đơn tế bào 1 ngày tuổi của tế bào MA104. 10 hàng giếng đầu nhận 25 μ l mẫu virus đã ủ, mẫu này đã được pha loãng 1:10 qua 7 giếng liên tiếp. 2 cột của tế bào không được xử lý đóng vai trò làm đối chứng âm. Việc này được thực hiện hai lần. Tiếp theo, các đĩa này được ủ 3 ngày ở 37°C trong khí

quyển 5% CO₂. Cuối cùng, sự sao chép của virus PRRSV được phát hiện bằng miễn dịch huỳnh quang sử dụng kháng thể đơn dòng kháng PRRSV và kháng thể phát hiện được đánh dấu huỳnh quang. Hiệu giá được tính bằng cách sử dụng thuật toán Spearman-Kärber.

Mẫu	Hiệu giá ⁽¹⁾ (Log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)
vacxin kết hợp (0,9x)	4,6
đối chứng	4,8

(1) Hiệu giá là giá trị trung bình của hai lần xác định

Với mức độ chênh lệch trong các giá trị hiệu giá được phát hiện thấy là $\pm 0,2$ Log₁₀ TCID₅₀, các kết quả đã chứng minh là các mẫu PRRSV sống được ủ trong vacxin kết hợp đậm đặc 0,9x theo sáng chế không bị giảm đáng kể về hiệu giá.

3. Thử nghiệm chủng ngừa-gây nhiễm

3.1 Giới thiệu

Vacxin kết hợp không chứa PRRSV sống, được bào chế như trong ví dụ 1, và chứa: squalan, vitamin E axetat, và polysorbate 80, được vi lỏng hóa trong nước, với các kháng nguyên không sao chép từ Mhyo, Lawsonia và PCV2, được thử nghiệm trên động vật. Việc chủng ngừa được thực hiện bằng một liều tiêm duy nhất, bằng đường trong cơ, tại thời điểm 3 tuần tuổi. Hiệu quả đối với Mhyo được thử nghiệm bằng cách gây nhiễm trùng, ở thời điểm 4 tuần sau chủng ngừa. Nhiều tá chất khác được so sánh.

3.2 Thiết kế nghiên cứu

84 lợn con SPF được sử dụng cho nghiên cứu này. 6 nhóm gồm 12 động vật được chủng ngừa một lần vào trong cơ tại thời điểm 3 tuần tuổi (± 3 ngày). Một nhóm 12 con lợn không được chủng ngừa và đóng vai trò làm nhóm đối chứng gây nhiễm. Trước khi chủng ngừa và hai ngày sau chủng ngừa, nhiệt độ trực tràng được đo. Ngoài ra, đối với nhóm SVEA, các vị trí tiêm được sờ nắn hàng tuần để kiểm tra các phản ứng khu trú. Bốn tuần sau chủng ngừa tất cả các động vật được gây nhiễm với chủng Mhyo có độc lực. Ba tuần sau gây nhiễm, tất cả các động vật bị gây chết không đau và được kiểm tra về các tổn thương phổi. Mẫu máu được lấy từ tất cả các động vật: trước chủng ngừa, trước gây nhiễm và sau khi chết.

Bảng 1: Lịch xử lý theo ví dụ 3

Nhóm	Tá chất vacxin
1	Amphigen
2	SVEA
3	SVEA + Al(OH) ₃
4	MF59 + DDA
5	Dầu SP (Metastim)
6	Vaxliant S5
7	không vacxin

3.3 Kiểm tra các tá chất

Một số chế phẩm vacxin được kiểm tra, mà chỉ khác nhau về loại chế phẩm và tá chất được sử dụng; hàm lượng kháng nguyên là giống nhau. Các tá chất sau đây được kiểm tra:

- Amphigen: dầu trong nước của dầu khoáng với lexithin
- SVEA: nhũ tương dầu trong nước được vi lỏng hóa với squalan, vitamin E axetat và Tween 80
- SVEA + Al(OH)₃: SVEA với 0,2% khối lượng/thể tích nhôm hydroxit (giống như trong Porcilis PCV Mhyo)
- MF59+DDA: MF59 là nhũ tương dầu trong nước với squalen, polysorbate 80 và Span 85; DDA là lipit cation: dimetyldioctadexylamoni.
- Dầu SP: pluronic, squalan và Tween, như đã được mô tả trong đơn sáng chế WO 2013/152086.
- Vaxliant™ S5: tá chất độc quyền có thành phần chưa biết

3.4. Phương pháp và vật liệu

Gây nhiễm:

Vật liệu gây nhiễm là Mhyo, chủng độc lực tại hiện trường, môi trường nuôi cấy tươi 3 ngày trong môi trường FRIIS với huyết thanh lợn. 10 ml môi trường nuôi cấy chứa 9 CCU, được dùng nội khí quản cho mỗi động vật, trong hai ngày liên tiếp. Tất cả các động vật đều được giám sát thú y thường xuyên.

Chủng ngừa:

Chủng ngừa được thực hiện tại thời điểm 3 tuần, khi động vật vẫn còn ở với lợn mẹ. Liều là 3 ml, được đưa vào trong cơ, ở bên phải của cổ. Cai sữa tại thời điểm 4 tuần tuổi. Một tuần trước khi gây nhiễm lợn được chuyển đến các cơ sở gây nhiễm.

Huyết thanh học:

Mẫu máu (từ tĩnh mạch cảnh) được lấy ngay trước khi chủng ngừa ($T=0$), ngay trước khi gây nhiễm ($T=4$) và sau khi chết ($T=7$). Các mẫu được giữ ở nhiệt độ môi trường, cho đến khi thu được huyết thanh. Sự có mặt của các kháng thể liên quan trong các mẫu huyết thanh đối với PCV2 (nhờ Elisa), hoặc đối với Lawsonia, được xác định theo các quy trình chuẩn.

Kiểm tra bằng cách sờ nắn

Vị trí tiêm của nhóm SVEA được kiểm tra về các phản ứng khu trú: ngay trước khi chủng ngừa, bốn giờ sau khi chủng ngừa, hàng ngày trong hai ngày và hàng tuần trong năm tuần sau khi chủng ngừa. Các động vật mà vẫn thể hiện các phản ứng khu trú năm tuần sau khi chủng ngừa được kiểm tra bằng cách sờ nắn từng con một trong hàng tuần cho đến khi các phản ứng khu trú biết mất.

Nhiệt độ trực tràng và quan sát lâm sàng

Nhiệt độ trực tràng được đo và quan sát lâm sàng (0= Bình thường; 1= ít hoạt động; 2= nôn mửa; 3= nằm xuống) được thực hiện một ngày trước và ngay trước khi chủng ngừa, bốn giờ và một ngày và hai ngày sau khi chủng ngừa.

Khám nghiệm tử thi:

Vào cuối thử nghiệm này, tại thời điểm 3 tuần sau gây nhiễm, tất cả lợn bị gây chết không đau. Vị trí tiêm được kiểm tra về các phản ứng khu trú ở từng động vật. Điểm số tổn thương phổi theo tỷ lệ phần trăm được ghi lại cho từng con lợn theo thang điểm Goodwin & Whittlestone.

3.5 Kết quả

Bảng 2: Kết quả của ví dụ 3

Nhóm	Tá chất vaccin	Mhyo LLS ⁽¹⁾	Hiệu giá PCV2 Ab ⁽²⁾ tại x tuần p.v.			Hiệu giá Lawsonia Ab tại x tuần p.v.		
			0	4	7	0	4	7
1	Amphigen	1,5	8,2	8,1	< 6,7	< 4,2	< 5,7	< 6,8
2	SVEA	0,75	8,2	9,3	8,9	< 4,1	7,3	9,1
3	SVEA + Al(OH) ₃	2	8,1	8,7	< 7,6	< 4,2	7,6	9,6
4	MF59 + DDA	0,5	< 7,9	7,7	< 6,4	< 4,2	< 4,7	< 4,6
5	Dầu SP (Metastim)	0	8,6	8,0	< 6,9	< 4,2	6,7	8,4
6	Vaxliant S5	0	7,5	< 7,1	< 6,3	< 4,0	< 4,6	< 6,1
7	không vaccin	3,5	8,0	< 6,4	< 4,8	< 4,1	< 4,1	< 3,9

(1) Mhyo LLS = điểm số tổn thương phổi trung vị

Kết quả kiểm tra bằng cách sờ nắn và nhiệt độ:

Nhóm được theo dõi bằng cách sờ nắn vị trí chủng ngừa và được kiểm tra nhiệt độ là nhóm nhận vaccin có tá chất là SVEA (nhóm 2). Kết quả này thể hiện là không quan sát thấy hiện tượng sưng cục bộ có thể phát hiện được, và không có sự tăng nhiệt độ trong suốt thời gian theo dõi.

3.6 Kết luận

Bảng 2 cho thấy rằng hiệu lực rộng đối với vaccin kết hợp là khó đạt được; một số tá chất đã kiểm tra gây ra khả năng miễn dịch đối với một hoặc thậm chí hai trong số các mầm bệnh, có thể được coi là có tính bảo vệ; điều này được thể hiện ở điểm số tổn thương phổi Mhyo thấp, hoặc hiệu giá kháng thể đặc hiệu đủ cao đối với PCV2 và Lawsonia. Tuy nhiên, chỉ vaccin có tá chất là SVEA, là bảo vệ đủ tốt đối với cả ba mầm bệnh. Không một tá chất còn lại nào đạt đến mức hiệu lực rộng đó.

Số liệu từ ví dụ 2, về sự thiếu tác dụng diệt virus của vaccin kết hợp có tá chất là SVEA đối với PRRSV sống, dự báo rằng vaccin kết hợp với tá chất SVEA cũng sẽ có hiệu lực kháng PRRSV.

Điều này chứng minh rằng vaccin kết hợp theo sáng chế có hiệu lực miễn dịch kháng từng mầm bệnh Mhyo, Lawsonia, PCV2, và PRRSV. Ngoài ra, vaccin này còn an toàn cho lợn.

4. Các thử nghiệm chủng ngừa-gây nhiễm 4 trong 1

Các thử nghiệm chủng ngừa-gây nhiễm khác được thực hiện, nhờ đó lợn được chủng ngừa với vacxin kết hợp 4 trong 1 theo sáng chế, và trong 4 thử nghiệm riêng biệt vacxin này được kiểm tra về hiệu lực của 4 thành phần: Mhyo, Lawsonia, PCV và PRRSV.

Cụ thể là, vacxin kết hợp 3 trong 1 được bào chế như đã được mô tả trong các ví dụ 1 và 3, chứa nhũ tương có hạt dưới micromet của squalan, vitamin E axetat, và Tween 8, được trộn với tỷ lệ 1:1 với pha nước chứa các kháng nguyên bất hoạt của Mhyo và Lawsonia, và sản phẩm biểu hiện tái tổ hợp của PCV2-Orf2. Sau đó, vài ngày trước khi chủng ngừa cho lợn, vacxin 3 trong 1 này được sử dụng để hòa tan ống thuốc tiêm chứa vacxin PRRS thương mại dạng đông khô, bằng cách sử dụng thể tích cần thiết để đạt được một liều đầy đủ của PRRSV là 10^5 TCID₅₀, cho mỗi liều 2ml cho động vật của vacxin kết hợp 4 trong 1. Việc chủng ngừa được thực hiện bằng một liều tiêm duy nhất, bằng đường trong cơ, cho lợn 3 tuần tuổi.

Phân tích tiếp theo về hiệu lực vacxin của mỗi kháng nguyên trong bốn kháng nguyên vacxin được thực hiện trong các thử nghiệm riêng biệt, bằng cách gây nhiễm trùng lên lợn đã được chủng ngừa và lợn đối chứng, để cho phép tập trung vào các triệu chứng đặc hiệu của bệnh nhiễm trùng và bệnh đối với các điều kiện khác nhau này.

Tuy nhiên, mong đợi là không có sự khác biệt về kết quả hiệu lực chủng ngừa kháng lại bất kỳ trong số các bệnh nhiễm trùng gây nhiễm này so với các kết quả được mô tả trong ví dụ 3 trên đây; rất khó có khả năng là sẽ có tác dụng khác bất kỳ khi sử dụng vacxin 3 trong 1 so với vacxin 4 trong 1 về việc bảo vệ kháng lại các kháng nguyên bất hoạt. Nói cách khác, sự có mặt của virus PRRSV trong vacxin kết hợp 4 trong 1 không được mong đợi là ảnh hưởng đến hiệu lực của vacxin kết hợp này kháng lại bất kỳ một trong số bệnh nhiễm trùng bị gây nhiễm bởi Mhyo, Lawsonia, hoặc PCV. Ngoài ra, không có tác dụng nào được mong đợi về khả năng tồn tại và hiệu lực của thành phần PRRSV sống, vì các thử nghiệm trước đã chỉ ra rằng không có tác dụng đáng kể nào của vacxin 3 trong 1 trong tá chất SVEA đối với khả năng tồn tại của virus PRRS. Do đó, vì virus PRRS không bị giết hoặc khả năng

gây nhiễm của nó bị hủy hoại do trộn vào vacxin 3 trong 1, sẽ không có lý do gì để nó không thể gây ra tác dụng bảo vệ hữu hiệu.

Các mong đợi này đã thực sự được xác nhận bởi kết quả của 4 thử nghiệm gây nhiễm được mô tả dưới đây: vacxin kết hợp 4 trong 1 theo sáng chế được phát hiện ra là tạo ra tác dụng bảo vệ miễn dịch hiệu quả kháng lại bệnh nhiễm trùng và các dấu hiệu của bệnh bị gây ra bởi bệnh nhiễm trùng do gây nhiễm với mầm bệnh từ mỗi một trong 4 thành phần của nó. Và cũng không có tác dụng tiêu cực hoặc cản trở nào từ sự kết hợp của nó.

4.1 Hiệu lực đối với *M. hyopneumoniae*

Vacxin kết hợp 4 trong 1 được bào chế như được mô tả trên đây, bằng cách sử dụng vacxin đông khô Porcilis PRRS.

Tóm tắt thử nghiệm

24 lợn con SPF được sử dụng cho nghiên cứu này. 1 nhóm 12 động vật được chủng ngừa một lần vào trong cơ ở thời điểm khoảng ba tuần tuổi. Một nhóm 12 con lợn không được chủng ngừa và đóng vai trò làm nhóm đối chứng gây nhiễm. Bốn tuần sau chủng ngừa, tất cả động vật được gây nhiễm với chủng Mhyo độc lực. Ba tuần sau gây nhiễm, tất cả động vật bị gây chết không đau và được kiểm tra sau khi chết về các tổn thương phổi. Mẫu máu được lấy từ tất cả các động vật: trước khi chủng ngừa, trước khi gây nhiễm và sau khi chết.

Chi tiết thử nghiệm

Vật liệu gây nhiễm là từ Mhyo, chủng độc lực tại hiện trường, ở dạng môi trường nuôi cấy tươi 3 ngày tuổi trong môi trường FRIIS với huyết thanh lợn. 10 ml môi trường nuôi cấy chứa 10 và 9 CCU, tương ứng, được sử dụng nội khí quản ở mỗi động vật, trong hai ngày liên tiếp. Tất cả các động vật được giám sát thú y thường xuyên

Việc chủng ngừa được thực hiện tại thời điểm 3 tuần tuổi, khi lợn con vẫn còn ở với lợn mẹ. Liều là 2 ml, được đưa vào trong cơ, ở bên phải của cổ. Cai sữa tại thời điểm 4 tuần tuổi. Một tuần trước khi gây nhiễm, lợn được chuyển đến các cơ sở gây nhiễm.

Mẫu máu (từ tĩnh mạch cảnh) được lấy ngay trước khi chủng ngừa (T=0 tuần), ngay trước khi gây nhiễm (T=4 tuần) và sau khi chết (T=7 tuần). Các mẫu được giữ ở nhiệt độ môi trường, cho đến khi thu được huyết thanh. Sự có mặt của các kháng thể liên quan trong các mẫu huyết thanh cho PCV2, hoặc cho Lawsonia, được xác định bằng ELISA theo các quy trình chuẩn.

Phân tích số liệu:

Khi kết thúc thử nghiệm này, tại thời điểm 3 tuần sau gây nhiễm, tất cả lợn bị gây chết không đau. Điểm số tổn thương phổi theo tỷ lệ phần trăm được ghi lại cho từng con lợn theo thang điểm Goodwin & Whittlestone (ở trên).

Kết quả

Bảng 3: Kết quả của Mhyo và số liệu huyết thanh học của ví dụ 4.1

Nhóm	Chủng ngừa	Mhyo LLS ⁽¹⁾	Hiệu giá PCV2 Ab tại 7 tuần p.v.			Hiệu giá Lawsonia Ab tại 7 tuần p.v.		
			0	4	7	0	4	7
1	Vacxin 4 trong 1 trong SVEA	8,0	<4,8	10,6	9,9	< 3,9	< 6,6	9,2
2	không vaccin	12,7	5,4	<4,8	<4,3	< 3,9	< 3,9	<3,9

(1) Mhyo LLS = giá trị trung vị của điểm số tổn thương phổi

Kết luận:

Việc chủng ngừa cho lợn với vaccin kết hợp 4 trong 1 theo sáng chế là hữu hiệu trong việc bảo vệ kháng lại bệnh nhiễm trùng và các dấu hiệu của bệnh bị gây ra do gây nhiễm Mhyo. Ngoài ra, cũng có phát triển tác dụng bảo vệ tốt kháng lại Lawsonia và PCV2, như được đo bằng huyết thanh học.

4.2 Hiệu lực PCV2

Vacxin kết hợp 4 trong 1 được bào chế như được mô tả trên đây, bằng cách sử dụng vaccin đông khô Porcilis PRRS.

Tóm tắt thử nghiệm & Chi tiết thử nghiệm

Lợn con được phân bổ vào các nhóm điều trị với mỗi nhóm 10 lợn con. Lợn con được chủng ngừa trong da hoặc trong cơ khi chúng khoảng 5 tuần tuổi:

- một nhóm được chủng ngừa trong cơ với vaccin kết hợp 4 trong 1 trong tá chất SVEA: liều duy nhất 2 ml của vaccin được bào chế với PCV2-Orf2 (2500 AU/ml), Mhyo (1,0 PCVU/ml), Lawsonia (5000 AU/ml), và PRRSV ở 10^5 TCID₅₀/liều. Khoảng thời gian giữa bước hòa tan vaccin PRRS và bước chủng ngừa là 1 giờ.
- nhóm 2 là đối chứng dương, và nhóm này được chủng ngừa bằng cách sử dụng các vaccin thương mại Porcilis PCV ID và Porcilis PRRS ID, đều bằng đường trong da, nhưng không trộn với nhau và được đưa vào ở các vị trí khác nhau trên lưng của lợn.
- lợn con trong nhóm thứ ba không được chủng ngừa (nhóm đối chứng âm), nhưng bị gây nhiễm.

Tại thời điểm 3 tuần sau khi chủng ngừa (8 tuần tuổi, 3 tuần sau chủng ngừa, ngày lấy mẫu [SD] 22 ngày), tất cả các động vật đều bị gây nhiễm bằng cách sử dụng $5,0 \log_{10}$ TCID₅₀/mL virut gây nhiễm PCV2b kiểu hoang, chủng I12/11, mà được chủng qua đường mũi, ở 3 ml mỗi lỗ mũi.

3 tuần sau gây nhiễm, tất cả các động vật được mổ khám nghiệm và hạch bạch huyết bẹn, hạch bạch huyết mạc treo ruột, amidan và phổi được lấy mẫu để phát hiện PCV2, bằng qPCR, và bằng kỹ thuật hóa mô miễn dịch.

Tất cả lợn con đều được theo dõi hàng ngày sau chủng ngừa về các dấu hiệu lâm sàng. Nhiệt độ được đo tại SD-1, SD0, SD0+4 giờ và SD1.

Các mẫu huyết thanh được thu thập từ tất cả các động vật, các mẫu này được kiểm tra về các kháng thể kháng lại PCV2, PRRSV và Lawsonia.

Các mẫu huyết thanh, mô, và phân và gạc lấy dịch mũi được thu thập từ tất cả các động vật, và được kiểm tra về axit nucleic PCV bằng qPCR.

Phân tích số liệu & Kết quả:

Các kết quả về nhiệt độ cho thấy các kết quả không có ý nghĩa.

Các kết quả huyết thanh học kết hợp được trình bày trong Bảng 4 dưới đây.

Huyết thanh học cho PCV2:

Tất cả lợn con từ hai nhóm được chủng ngừa đã đạt 100% chuyển đảo huyết thanh đối với kháng thể kháng PCV2 tại ngày lấy mẫu 22 (3 tuần p.v.). Hiệu giá thực tế tăng thêm nữa sau đó, và đạt trạng thái ổn định từ SD35. Các đối chứng không được chủng ngừa chỉ chuyển đảo huyết thanh sau gây nhiễm, nhưng không bao giờ đạt được hơn 20% chuyển đảo huyết thanh.

IHC và qPCR cho PCV2:

Việc sàng lọc và tính điểm hóa học mô miễn dịch được thực hiện cho các dấu hiệu của PCV trong hạch bạch huyết và amidan. Kết quả cho thấy rằng cả hai nhóm được chủng ngừa đều có điểm số trung bình là 0,3, trong khi nhóm đối chứng bị gây nhiễm không được chủng ngừa có điểm số IHC trung bình là 1,6.

Kết quả qPCR cho thấy rằng trong cả hai nhóm được chủng ngừa, lợn có rất ít sự có mặt của PCV2 trong huyết thanh, que lấy mẫu phân, que lấy dịch từ mũi, hoặc các mẫu mô (các hạch bạch huyết, amidan, và phổi). Tuy nhiên, nhóm đối chứng trở nên dương tính mạnh với axit nucleic của PCV2 sau gây nhiễm.

Huyết thanh học Lawsonia

Huyết thanh học Lawsonia đối với nhóm 1 cho thấy sự tăng hiệu giá từ SD22, trong khi đó trong nhóm đối chứng hiệu giá Lawsonia thể hiện sự giảm ổn định.

Huyết thanh học PRRSV

Kết quả huyết thanh học cho PRRSV thường được thể hiện bằng tỷ lệ SP (mẫu so với dương tính). Khi tỷ lệ này lớn hơn 0,4, mẫu được coi là dương tính đối với sự chuyển đảo huyết thanh PRRSV. Phần Bảng 4 đối với PRRSV thể hiện các giá trị SP này. Các giá trị này cho thấy rằng các động vật trong nhóm đối chứng dương 2 (vacxin PRRSV bằng đường id) là dương tính mạnh với sự chuyển đảo huyết thanh PRRSV; tuy nhiên, các động vật trong nhóm 1 (vacxin kết hợp 4 trong 1 bằng đường im) cũng đạt tỷ lệ chuyển đảo huyết thanh tốt. Các đối chứng không được chủng ngừa hầu như không cho thấy bất kỳ sự chuyển đảo huyết thanh nào đối với PRRSV, do không phát hiện được tỷ lệ SP trên 0,05.

Bảng 4: Kết quả huyết thanh học kết hợp của Ví dụ 4.2

Huyết thanh học cho mỗi nhóm	SD0	SD22	SD28	SD35	SD43
------------------------------	-----	------	------	------	------

PCV					
1. vacxin 4 trong 1, im	3,7	7,2	7,7	10,0	10,4
2. Porcillis PCV ID + Porcilis PRRS ID	3,7	7,0	8,1	9,5	9,9
3. các đối chứng không được chủng ngừa	4,2	2,3	2,1	3,5	5,7
Lawsonia					
1. vacxin 4 trong 1, im	4,7	4,3	5,0	5,7	6,3
3. các đối chứng không được chủng ngừa	3,3	3,3	3,3	2,9	2,9
PRRSV (tỉ lệ SP)					
1. vacxin 4 trong 1, im	0,0	0,9	1,3	1,3	1,4
2. Porcillis PCV ID + Porcilis PRRS ID	0,0	1,6	1,8	2,1	2,3
3. các đối chứng không được chủng ngừa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Kết luận:

Việc chủng ngừa cho lợn với vacxin kết hợp 4 trong 1 theo sáng chế là hữu hiệu trong việc bảo vệ kháng lại sự nhiễm trùng và các dấu hiệu của bệnh bị gây ra bởi sự nhiễm trùng do gây nhiễm PCV2. Ngoài ra, có sự phát triển tác dụng bảo vệ tốt kháng lại Lawsonia và PRRSV, như được đo bằng huyết thanh học.

4.3 Hiệu quả đối với Lawsonia

Vacxin kết hợp 4 trong 1 được bào chế như được mô tả ở trên, bằng cách sử dụng vacxin đông khô Prime Pac PRRS .

Tóm tắt thử nghiệm

Ba nhóm lợn 3 tuần tuổi được chủng ngừa với vacxin kết hợp 4 trong 1, và được gây nhiễm với vi khuẩn Lawsonia độc lực tại thời điểm 5 tuần sau đó. Một nhóm được nhận vacxin 4 trong 1 đầy đủ, một nhóm khác được nhận vacxin đối chứng chứa tất cả các thành phần giống như vậy, ngoại trừ kháng nguyên Lawsonia. Nhóm thứ ba được nhận vacxin đối chứng, nhưng không gây nhiễm vì các lợn trong nhóm này được mổ khám nghiệm cùng thời điểm gây nhiễm để xác nhận là không có sự nhiễm Lawsonia trong đàn lợn trước khi gây nhiễm.

Các nhóm được so sánh để xác định hiệu lực của một liều duy nhất của vacxin kết hợp kháng lại bệnh gây ra bởi sự gây nhiễm Lawsonia: bệnh viêm hồi tràng, sự cư trú trong hồi tràng của Lawsonia, sự thải virus, và ảnh hưởng đến sự tăng thể lượng.

Tất cả lợn được đánh giá mỗi ngày về các phản ứng khu trú và toàn thân trong 21 ngày sau khi chủng ngừa, hoặc cho đến khi các phản ứng này biến mất. Các mẫu phân được lấy để xác nhận không có sự nhiễm trùng do *Lawsonia* trước khi gây nhiễm. Các mẫu máu được lấy trong suốt quá trình nghiên cứu để đánh giá các đáp ứng kháng thể đối với sự chủng ngừa và gây nhiễm, các mẫu phân còn được lấy cho qPCR *Lawsonia*, và số liệu về thể trọng được ghi lại.

3 tuần sau khi gây nhiễm (11 tuần tuổi), tất cả các động vật còn lại được mổ khám nghiệm và tính điểm cho toàn bộ các tổn thương của hồi tràng, và các mẫu cạo niêm mạc được lấy cho PCR định lượng *Lawsonia* (qPCR). Một phần của hồi tràng cũng được lấy để xét nghiệm hóa mô miễn dịch (IHC) và mô bệnh học.

Chi tiết thí nghiệm

Các con lợn có nhiều giới tính khác nhau, và nhiều giống khác nhau của Mỹ Yorkshire-Landrace-Duroc. Nước và thức ăn phù hợp với lứa tuổi được cung cấp theo nhu cầu.

Vacxin 4 trong 1 đầy đủ chứa trong mỗi liều 2 ml cho động vật: 2,0 RP của kháng nguyên Mhyo; 6000 đơn vị Elisa của kháng nguyên *Lawsonia*/ml; 5,7 µg/ml kháng nguyên PCV2 Orf2 ; và 10^5 TCID₅₀ của PRRSV.

Ngay trước khi gây nhiễm, hai con lợn được chủng ngừa với vacxin đối chứng được mổ khám nghiệm, để xác minh là không có sự nhiễm trùng do *Lawsonia* trước khi gây nhiễm.

Sự gây nhiễm *Lawsonia* được thực hiện bằng đường miệng, tại thời điểm 5 tuần sau chủng ngừa (khoảng 8 tuần tuổi), với việc chủng 4,6 10Log TCID₅₀ *Lawsonia* sống độc lực cho mỗi động vật.

Tính điểm tổn thương hồi tràng được thực hiện trên phần 2,5 cm của hồi tràng, được cắt và được thu gom trong formalin đậm 10% , mà được sử dụng cho xét nghiệm mô bệnh học, và về sự có mặt của *Lawsonia* bằng xét nghiệm hóa mô miễn dịch.

Phần còn lại của hồi tràng được mở ra và bề mặt niêm mạc được kiểm tra bằng mắt thường về sự có mặt của các tổn thương do *Lawsonia* của bệnh viêm hồi tràng (còn được gọi là viêm ruột tăng sinh ở lợn hoặc PPE) bao gồm sự tăng sinh niêm mạc với sự dày lên của thành ruột, phù, sung huyết, ứ huyết, hoại tử và xuất huyết. Toàn bộ các tổn thương được cho điểm từ 0 (niêm mạc bình thường) đến 5 (PPE nghiêm

trọng với sự xuất huyết và/hoặc hoại tử). Mẫu cạo từ hồi tràng cũng được thu thập và làm đông lạnh cho đến khi phân tích.

Phân tích số liệu:

Điểm số cho bệnh viêm hồi tràng là dựa trên số điểm tổn thương có kích thước hiển vi của bệnh viêm hồi tràng bằng xét nghiệm mô bệnh học, và điểm số nghiêm trọng của toàn bộ tổn thương của hồi tràng.

Sự nhiễm Lawsonia (sự cư trú) được xác định dựa trên điểm số IHC hiển vi.

qPCR được sử dụng để tính điểm về sự có mặt của Lawsonia trong que lấy mẫu trực tràng và mẫu cạo từ niêm mạc ruột và sự xuất hiện trong phân.

Kết quả

Sự xuất hiện trong phân:

Không có sự khác biệt đáng kể được phát hiện thấy giữa các nhóm ở thời điểm 14 ngày sau gây nhiễm (dpc). Tuy nhiên kết quả về sự xuất hiện trong phân tại 20 dpc cho thấy rằng lợn được chủng ngừa thải Lawsonia ít hơn đáng kể so với nhóm giả được tại thời điểm này ($p=0,0134$), điều này cho thấy sự phục hồi sớm hơn ở lợn được chủng ngừa.

Sự cư trú:

qPCR của mẫu nạo hồi tràng được thu thập tại 20 dpc thể hiện sự cư trú của Lawsonia nhiều hơn đáng kể trong nhóm nhận vaccin giả được ($p=0,0094$).

Sự tăng thể trọng hàng ngày:

Sau khi gây nhiễm, sự tăng thể trọng hàng ngày cũng được cải thiện đáng kể ở lợn được chủng ngừa bằng vaccin 4 trong 1, so với nhóm nhận vaccin giả được ($p=0,0337$).

Kết luận:

Việc chủng ngừa cho lợn bằng vaccin kết hợp 4 trong 1 theo sáng chế là hữu hiệu trong việc bảo vệ kháng lại sự nhiễm trùng và các dấu hiệu của bệnh được gây ra bởi sự gây nhiễm Lawsonia.

4.4 Hiệu quả đối với PRRSV

Vacxin kết hợp 4 trong 1 được bào chế như được mô tả trên đây và chứa PRRSV từ việc hoàn nguyên ống thuốc tiêm chứa vacxin PrimePac™ PRRS, ngay trước khi chủng ngừa.

Tóm tắt thí nghiệm

Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá khả năng gây miễn dịch của thành phần PRRS của vacxin kết hợp theo sáng chế, bằng cách chủng ngừa lợn 3 tuần tuổi, và gây nhiễm với PRRSV độc lực 4,5 tuần sau đó.

Hai nhóm gồm 25 lợn khỏe mạnh mỗi nhóm, âm tính với kháng thể kháng PRRSV và PCV2 trong máu, được chủng ngừa tại thời điểm 3 tuần tuổi bằng đường trong cơ với liều 2 ml của vacxin kết hợp 4 trong 1, hoặc với vacxin giả được (3 trong 1) không chứa PRRSV. Tất cả các kháng nguyên có mặt ở mức liều lượng đã được ước tính.

Ở khoảng 7,5 tuần tuổi, lợn được gây nhiễm trong mũi với virus PRRS chủng NADC-20. Trong khoảng thời gian sau gây nhiễm, lợn được đánh giá bằng quan sát lâm sàng và điểm số lâm sàng, và các mẫu máu và que lấy mẫu từ mũi được thu thập. 14 ngày sau gây nhiễm, tất cả lợn bị gây chết không đau và được mổ khám nghiệm. Toàn bộ các tổn thương của phổi được tính điểm và các phần của phổi và các hạch bạch huyết được thu thập cho xét nghiệm mô bệnh học và hóa mô miễn dịch (IHC). Các kết quả được đánh giá để xác định hiệu lực của liều duy nhất của vacxin kết hợp đối với tác dụng làm giảm bệnh hô hấp, sự có mặt của virus trong máu và/hoặc thải virus PRRSV sau khi gây nhiễm.

Thể trọng được ghi lại tại thời điểm chủng ngừa, gây nhiễm, và kết thúc thử nghiệm.

Chi tiết thử nghiệm

Việc gây nhiễm bằng PRRSV được thực hiện trong mũi với 2 ml vật liệu gây nhiễm đã được pha loãng cho mỗi lỗ mũi. Virus gây nhiễm được bào chế ngay trước khi dùng và được giữ trên đá trước và trong khi sử dụng. Tổng liều gây nhiễm là khoảng 4,2 log₁₀ TCID₅₀ cho mỗi động vật.

Vacxin 4 trong 1 đầy đủ chứa trong mỗi liều 2 ml cho động vật: 2,0 RP của kháng nguyên Mhyo; 7000 đơn vị Elisa của kháng nguyên Lawsonia/ml; 5,7 µg/ml của kháng nguyên PCV2 Orf2; và 10^5 TCID₅₀ của PRRSV.

Phân tích số liệu

Quan sát lâm sàng về suy hô hấp và trạng thái ngủ lịm được ghi lại ngay trước và sau khi gây nhiễm. Điểm số lâm sàng được biểu thị trong khoảng từ 0: bình thường, đến 3: khó thở nặng và/hoặc thở nhanh và/hoặc thở bằng bụng rõ rệt khi căng thẳng, trong đó sự căng thẳng được gây ra bằng cách làm cho lợn di chuyển nhanh trong thời gian ngắn.

Cách tính điểm cho phổi được áp dụng theo Halbur et.al. (1995, Vet. Pathol., vol. 32, p. 648-660 [Appendix 7, Ref. 1]). Các tổn thương phổi vĩ mô được cho điểm để ước lượng tỷ lệ phần trăm của phổi bị ảnh hưởng bởi viêm phổi. Mỗi thùy phổi được gán cho một số điểm để phản ánh tỷ lệ phần trăm thể tích gần đúng của toàn bộ phần phổi được đại diện bởi thùy đó. 10 điểm khả thi (5 cho mặt lưng, 5 cho mặt bụng) được gán cho từng thùy trước bên phải, thùy giữa bên phải, phần trước của thùy trước bên trái, và phần đuôi của thùy trước bên trái. Thùy phụ được gán 5 điểm khả thi, và 27,5 điểm khả thi (15 cho mặt lưng và 12.5 cho mặt bụng) được gán cho từng thùy đuôi phải và thùy đuôi trái để đạt tổng 100 điểm khả thi. Điểm số của toàn bộ các tổn thương phổi được ghi lại là số điểm phản ánh tỷ lệ phần trăm thể tích gần đúng của thùy bị ảnh hưởng bởi viêm phổi liên quan đến PRRS. Tổng số điểm tổn thương phổi cho từng phổi được tính bằng tổng số điểm của toàn bộ các tổn thương phổi của tất cả các thùy.

Các mẫu phổi được lấy từ mỗi con lợn cho xét nghiệm mô bệnh học, cụ thể gồm: đỉnh của thùy giữa bên trái, một mẫu của thùy phụ, và phần trước của thùy đuôi bên phải. Ngoài ra, có các phần được lấy từ các hạch bạch huyết của trung thất và của phế quản. Các mô được cố định trong formalin đậm trung tính 10% cho xét nghiệm mô bệnh học và IHC.

Thu thập thêm các mẫu huyết thanh, để phát hiện kháng thể kháng PRRSV; que lấy mẫu từ mũi, để phát hiện axit nucleic của PRRSV bằng RT-PCR định lượng; và các mẫu mô, để phân tích dưới kính hiển vi và IHC.

Các mẫu PRRSV được chuẩn độ trên dòng tế bào MARC145. Với mỗi bản sao, các dung dịch pha loãng 10 lần liên tiếp được bổ sung vào 10 giếng của đĩa 96 giếng chứa lớp đơn tế bào đã được hình thành trước, và các đĩa này được ủ với 5% CO₂ ở 35-39°C trong 5 ngày. Sau đó, các đĩa này được cố định và nhuộm với kháng thể huỳnh quang kháng PRRSV, và được tính điểm bằng IFT.

Các biến số kết quả đối với hiệu lực chủng ngừa được đánh giá bằng cách phân tích các quan sát lâm sàng giai đoạn sau gây nhiễm và điểm số lâm sàng, nhiệt độ cơ thể, thể trọng, thải virus đường mũi và sự có mặt của virus trong máu như được xác định bằng PCR, cũng như phân tích vĩ mô và hiển vi các tổn thương phổi tại thời điểm 14 ngày sau gây nhiễm. Bệnh về hô hấp được đánh giá bằng điểm số tổn thương phổi vĩ mô.

Các biến số phụ về hiệu lực bằng phân tích mô bằng xét nghiệm mô bệnh học và IHC, lượng tối đa của virus có mặt trong máu, lượng tối đa của virus thải ra, sự tăng thể trọng sau gây nhiễm, các quan sát lâm sàng sau gây nhiễm, và điểm số lâm sàng hô hấp sau gây nhiễm.

Kết quả

Giá trị trung vị của điểm số tổn thương phổi, tính bằng % phổi có liên quan, là: 20% đối với nhóm vaccin giả được, so với 7% đối với nhóm vaccin 4 trong 1 ($p=0,0014$).

Mô bệnh học của 3 mẫu phổi đã thu thập được tính điểm trên thang điểm từ 0 (bình thường) đến 4 (viêm phổi kẽ nghiêm trọng). Số điểm tối đa là: 3 đối với nhóm vaccin giả được, so với 2 đối với nhóm vaccin 4 trong 1 ($p=0,0010$).

Hóa mô miễn dịch của mẫu phổi được tính điểm trên thang điểm từ 0 (không có tế bào dương tính với kháng nguyên PRRSV) đến 4 (> 100 tế bào dương tính trên mỗi phần mô). Số điểm tối đa của 3 mẫu phổi đã thu thập là 2 đối với nhóm vaccin giả được, so với 1 đối với nhóm vaccin 4 trong 1 ($p=0,0006$).

Kết luận:

Việc chủng ngừa cho lợn bằng vaccin kết hợp 4 trong 1 theo sáng chế, là hiệu quả trong việc bảo vệ kháng lại sự nhiễm trùng và các dấu hiệu của bệnh bị gây ra bởi gây nhiễm PRRSV.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vacxin kết hợp chứa kháng nguyên không sao chép từ circovirus typ 2 ở lợn (PCV2) và virus sống gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV), khác biệt ở chỗ vacxin này là nhũ tương dầu trong nước chứa squalan và vitamin E axetat.
2. Vacxin kết hợp theo điểm 1, trong đó vacxin này chứa squalan với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 1 đến khoảng 9% khối lượng/thể tích.
3. Vacxin kết hợp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó vacxin này chứa vitamin E axetat với lượng nằm trong khoảng từ khoảng 1 đến khoảng 10% khối lượng/thể tích.
4. Vacxin kết hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó nhũ tương dầu trong nước là nhũ tương có đường kính hạt dưới micromet.
5. Vacxin kết hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó vacxin này còn chứa kháng nguyên không sao chép từ *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo).
6. Vacxin kết hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó vacxin này còn chứa kháng nguyên không sao chép từ *Lawsonia intracellularis* (Lawsonia).
7. Kit bao gồm ít nhất hai đồ bao gói: một đồ bao gói chứa kháng nguyên không sao chép từ PCV2 trong nhũ tương dầu trong nước chứa squalan và vitamin E axetat; và đồ bao gói còn lại chứa PRRSV sống ở dạng đông khô.
8. Phương pháp bào chế vacxin kết hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, bao gồm các bước:
 - điều chế pha nước chứa kháng nguyên không sao chép từ PCV2 và PRRSV sống, và
 - trộn pha nước này với nhũ tương dầu chứa squalan và vitamin E axetat.

9. Phương pháp bào chế vacxin kết hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, bao gồm các bước:

- bào chế PRRSV sống ở dạng đông khô,
- điều chế pha nước chứa kháng nguyên không sao chép từ PCV2,
- trộn pha nước này với nhũ tương dầu chứa squalan và vitamin E axetat, và
- hoàn nguyên PRRSV sống ở dạng đông khô này với hỗn hợp của pha nước và nhũ tương dầu này.

10. Phương pháp bào chế vacxin kết hợp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, bao gồm các bước:

- bào chế hỗn hợp của pha nước chứa kháng nguyên không sao chép từ PCV2 và nhũ tương dầu chứa squalan và vitamin E axetat, và
- hoàn nguyên PRRSV sống ở dạng đông khô với hỗn hợp này.

11. Nhũ tương dầu trong nước chứa squalan và vitamin E axetat, kháng nguyên không sao chép từ PCV2, và PRRSV sống, để sử dụng trong việc chủng ngừa cho lợn kháng PCV2 và PRRSV.