



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

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

(11)



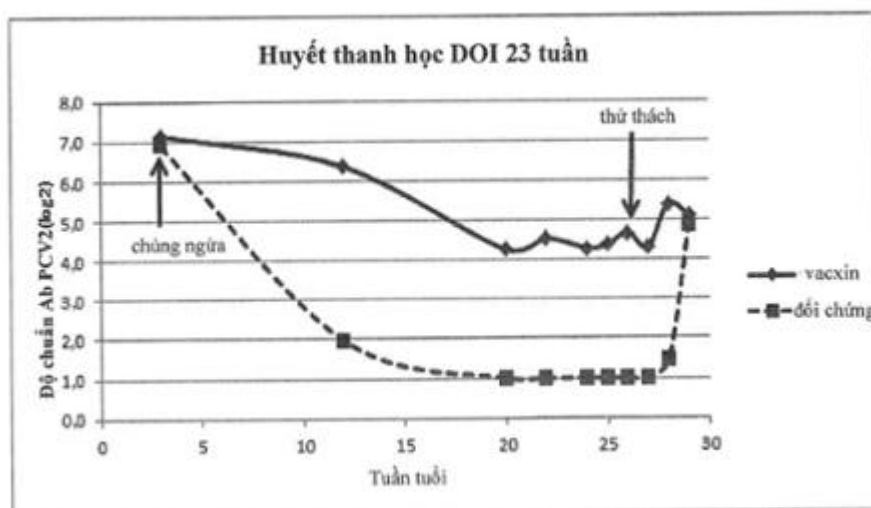
1-0037400

(51)⁷ A61K 39/02; A61P 31/04; A61P 31/20; (13) B
A61K 39/12

- (21) 1-2016-01980 (22) 02/12/2014
(86) PCT/EP2014/076223 02/12/2014 (87) WO 2015/082457 11/06/2015
(30) 13195515.5 03/12/2013 EP; 14187317.4 01/10/2014 EP
(45) 27/11/2023 428 (43) 25/11/2016 344A
(73) INTERVET INTERNATIONAL B.V. (NL)
Wim de Koerverstraat 35, NL-5831 AN Boxmeer, Netherlands
(72) JACOBS, Antonius Arnoldus Christiaan (NL); FACHINGER, Vicky (DE); SNO,
Melanie (NL); WITVLIET, Maarten Hendrik (NL).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) VACXIN PHÒNG NGỪA LÂY NHIỄM VI KHUẨN *LAWSONIA*
INTRACELLULARIS VÀ VIRUT CIRCO LỢN TYP 2

(57) Sáng chế đề cập đến vaccin chứa hỗn hợp vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt và protein ORF2 của virus circo lợn typ 2 (PCV2) để sử dụng trong bảo vệ lợn chống lại sự lây nhiễm *Lawsonia intracellularis* và PCV2 bằng cách dùng vaccin này trong da. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp bảo vệ lợn chống lại sự lây nhiễm vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* và PCV2.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế nhìn chung đề cập đến lĩnh vực chăm sóc sức khỏe cho lợn. Lợn dễ bị lây nhiễm nhiều vi sinh vật gây bệnh. Việc kiểm soát lây nhiễm thường được thực hiện bằng cách quản lý chuồng trại và kiểm soát việc cung cấp thức ăn, xử lý bằng các dược chất như thuốc kháng virus và chất kháng sinh, hoặc xử lý phòng bệnh sử dụng vaccin.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Cả virus circo lợn typ 2 (Porcine Circo Virus 2 - PCV2) và vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* đều gây ra các tổn thất lớn về kinh tế do chúng gây hại cho sức khỏe của lợn. Mặc dù nhiều thuốc và vaccin đã được biết đến và có sẵn trên thị trường để điều trị sự lây nhiễm PCV2 và/hoặc *Lawsonia*, nhưng vẫn cần các biện pháp mới có khả năng bảo vệ tốt theo cách an toàn và thuận tiện. Các vaccin hỗn hợp chống lây nhiễm PCV2 và *Lawsonia* đã được biết đến nhưng chưa có sẵn trên thị trường. Trên thực tế, không phải tất cả các hỗn hợp kháng nguyên đều được tính đến hoặc đề xuất, cụ thể, không phải mỗi và mọi cách sử dụng đều có thể tạo ra vaccin hỗn hợp an toàn và hiệu quả. Trên thực tế, độ an toàn và hiệu quả của vaccin hỗn hợp không phải lúc nào cũng ổn định, nhất là khi chế độ dùng lại thay đổi.

Ủy ban phụ trách các sản phẩm thú y thuộc Cơ quan đánh giá dược phẩm châu Âu (EMA) đã công bố tài liệu “Note for guidance: requirements for combined veterinary products” (EMA, 2000, CVMP/IWP/52/97-FINAL), tài liệu này (trang 2/6) đã nêu rằng “việc phát triển vaccin hỗn hợp là không dễ. Mỗi hỗn hợp phải được phát triển và nghiên cứu một cách riêng rẽ về mặt chất lượng, độ an toàn và hiệu quả”. Ủy ban này còn cho rằng một vaccin hỗn hợp tốt được tìm kiếm thường là vaccin có tính tương hợp giữa các thành phần riêng rẽ trong vaccin hỗn hợp, bao gồm, ví dụ, chất bảo quản, chất phụ gia và

chất làm ổn định, chất làm bất hoạt và tá dược. Trên trang 3, đoạn đầu tiên, tài liệu này đã nêu rằng “Trong vaccin hỗn hợp, sự có mặt của nhiều hơn một thành phần có thể thường gây ra các tương tác, làm cho đáp ứng đối với các thành phần riêng rẽ giảm hoặc tăng, so với khi (từng) thành phần cụ thể được dùng một mình.....Các tương tác này thường có bản chất miễn dịch, nhưng cũng có thể do các yếu tố khác ít có tác động trực tiếp đến hệ miễn dịch gây ra”, và cũng nêu rằng “Khi tá dược được sử dụng để làm tăng đáp ứng miễn dịch đối với vaccin hỗn hợp, các vấn đề đặc biệt có thể xảy ra.”

Vào tháng 4 năm 1997, Bộ y tế và dịch vụ nhân sinh Hoa Kỳ, Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ, Trung tâm đánh giá và nghiên cứu chế phẩm sinh học Hoa Kỳ, đã công bố tài liệu “Guidance for Industry, for the evaluation of combination vaccines for preventable diseases: Production, Testing and Clinical Studies”, trong tài liệu hướng dẫn này (trang 3, phần “Tính tương hợp của các thành phần”) có đoạn nêu rằng “Thử nghiệm đã cho thấy rằng việc kết hợp các vaccin đơn giá có thể tạo ra hỗn hợp mới có độ an toàn hoặc hiệu quả thấp hơn kỳ vọng. Đôi khi, các thành phần của các vaccin đã được làm bất hoạt có thể tác động bất lợi đến một hoặc nhiều thành phần có hoạt tính”, điều đó cho thấy rằng, cụ thể, vaccin đã được làm bất hoạt, có thể ảnh hưởng xấu đến hiệu quả của vaccin sống, chẳng hạn như khi kết hợp vaccin ho gà sống và vaccin virus bại liệt đã được làm bất hoạt thì tạo ra vaccin với hiệu lực ho gà giảm. Đã biết rằng các thành phần bổ sung bất kỳ trong vaccin có thể ảnh hưởng đến độ an toàn và hiệu lực của thành phẩm khi so với các vaccin riêng rẽ.

Tổ chức y tế thế giới (WHO) đã khai giảng một khóa học trực tuyến gọi là “Vaccine Safety Basics”, trong đó Module 2 đề cập đến vaccin hỗn hợp. Phần này bắt đầu bằng đoạn “Vaccin hỗn hợp được cấp phép trải qua nhiều thử nghiệm kỹ lưỡng trước khi được phê chuẩn bởi cơ quan có thẩm quyền quốc gia để đảm bảo rằng sản phẩm này là an toàn, hiệu quả và chất lượng chấp nhận được.” Phần này cũng nêu rằng “Do đó, đối với tất cả các hỗn hợp, nhà sản xuất phải đánh giá hiệu lực của mỗi thành phần kháng nguyên, hiệu quả của

các thành phần vacxin khi được kết hợp để kích thích tính miễn dịch, nguy cơ khả năng phục hồi độc tính, và phản ứng với các thành phần vacxin khác.”

Trên trang 53 của bài giảng trực tuyến này, WHO báo cáo rằng “Đường dùng là con đường nhờ đó vacxin (hoặc thuốc) được tiếp xúc với cơ thể. Đây là yếu tố quyết định thành công của việc gây miễn dịch. Chất phải được vận chuyển từ vị trí tiếp nhận đến phần cơ thể ở đó mong muốn xảy ra tác dụng của nó. Tuy nhiên, việc sử dụng cơ chế vận chuyển của cơ thể cho mục đích này là ít quan trọng.”

Chi nhánh văn phòng chủng ngừa của Bộ y tế California đã công bố hướng dẫn để gây miễn dịch chính xác (http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/appendices/d/vacc_admin.pdf). Đối với vị trí sử dụng, trên trang 7, toàn bộ đoạn thứ nhất đã nêu rằng “Đường dùng và vị trí được khuyến cáo đối với mỗi vacxin được dựa trên các thử nghiệm lâm sàng, kinh nghiệm thực tế và các suy xét theo lý thuyết. Thông tin này được bao gồm trong thông tin sản phẩm của nhà sản xuất đối với mỗi vacxin. Có năm đường dùng được sử dụng đối với vacxin. Đi trệch đường dùng đã được khuyến cáo có thể làm giảm hiệu quả vacxin hoặc làm tăng các phản ứng bất lợi cục bộ.” Trên trang 14, tài liệu này đưa ra vacxin trong da duy nhất được cấp phép bởi Hoa Kỳ: “Fluzon trong da là vacxin duy nhất được cấp phép bởi Hoa Kỳ được sử dụng bởi đường dùng trong da. Nó chỉ được phê chuẩn để sử dụng cho người có độ tuổi từ 18 đến 64. Chế phẩm Fluzon này không giống như chế phẩm trong cơ của vacxin cúm đã được làm bất hoạt (TIV). Các chế phẩm TIV khác KHÔNG được sử dụng bởi đường dùng trong da.”

Nhìn chung, hỗn hợp bất kỳ của các kháng nguyên cụ thể và vị trí sử dụng là phức tạp và cần có các thử nghiệm để xác định độ an toàn và hiệu quả.

Có nhu cầu liên tục về biện pháp quản lý sức khỏe cho lợn một cách thuận tiện, an toàn và hiệu quả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất vaccin mới để phối hợp bảo vệ lợn khỏi bị lây nhiễm các vi sinh vật gây bệnh khác nhau, vaccin này chứa hỗn hợp vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt và protein ORF2 của virus circo lợn typ 2 (PCV2).

Ngoài vaccin như vậy, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp bảo vệ lợn chống lại sự lây nhiễm vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* và PCV2, bao gồm bước sử dụng vaccin này trong da, và phương pháp tạo ra vaccin này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 Huyết thanh học trong nghiên cứu DOI

Fig. 2 Tải lượng virus trong huyết thanh, phân và các cơ quan

Fig. 3 Nhiệt độ trung bình của cơ thể

Fig. 4 Kết quả PCV2 Ig Ab tổng trung bình

Fig. 5 Kết quả PCV2 IgM Ab trung bình

Fig. 6 Độ chuẩn kháng thể trong nghiên cứu về khoảng thời gian

Fig. 7 Tải lượng virus trong các cơ quan

Fig. 8 Tải lượng virus trong các cơ quan

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

“Vaccin” là thành phần bảo vệ chống lại sự lây nhiễm (sau khi chủng ngừa) vi sinh vật gây bệnh.

“Bảo vệ chống lại sự lây nhiễm” vi sinh vật gây bệnh được hiểu là ngăn ngừa hoặc làm giảm sự lây nhiễm bởi chính vi sinh vật này, hoặc ngăn ngừa hoặc làm giảm bệnh (cận) lâm sàng do sự lây nhiễm gây ra, thường bằng cách

can thiệp vi sinh vật này, ví dụ thông qua các kháng thể, trong vật chủ đã được chủng ngừa.

Chế phẩm chứa “vi khuẩn tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt” làm kháng nguyên bao gồm thành phần kháng nguyên thu được từ việc giết vi khuẩn sống, tế bào toàn phần. Điều này không loại trừ rằng các tế bào vi khuẩn, ít nhất một phần, bị phá vỡ trong quá trình giết, hoặc dịch chiết hoặc dịch đồng nhất của các tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt trên thực tế được cung cấp làm kháng nguyên trong “vacxin chứa vi khuẩn tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt” theo sáng chế. Vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt, ví dụ, được biết từ WO2009/144088 và WO97/20050.

“Protein ORF2 PCV2” là protein capsit của virut circo lợn typ 2. ORF 2 của PCV 2 mã hóa protein có khối lượng khoảng 28 kDa. ORF 2 của tất cả các thể phân lập PCV-2 có chung 91-100% độ tương đồng trình tự nucleotit và 90-100% độ tương đồng trình tự axit amin suy luận (Fenaux et al., J.Clin. Micorbiol., 38(7), 2494-2503, 2000). Chẳng hạn, protein ORF2 có thể được biểu hiện theo cách tái tổ hợp, ví dụ trong hệ biểu hiện baculo virut, như được mô tả trong WO2007/028823, WO 2007/094893 hoặc WO2008/076915.

“Việc sử dụng vacxin trong da” nghĩa là lượng đủ của vacxin này được đặt trong hạ bì, dẫn đến tạo ra đáp ứng miễn dịch khác biệt một cách đáng kể (cụ thể: khi sử dụng Kiểm định tổng sắp hạng Wilcoxon trong thử nghiệm được thiết lập như được chỉ ra trong Ví dụ 3, giá trị p phải nhỏ hơn 0,10, tốt hơn là ít hơn 0,05) so với việc sử dụng cùng lượng vacxin này trong cơ. Một vài thiết bị là có sẵn trên thị trường để chủng ngừa trong da, ví dụ thiết bị chủng ngừa IDAL® (MSD Animal Health), Pulse 50 MicroDose (Pulse Needle Free Systems), hoặc các thiết bị khác như được mô tả trong Vaccine, 2012 Jan 11;30(3):523-38 (cụ thể xem Bảng 1, trang 525: “Tổng quan về các thiết bị khác nhau để sử dụng chế phẩm rắn và lỏng”)

“Việc tiêm duy nhất một mũi vacxin để sử dụng trong bảo vệ” nghĩa là để thu được tính miễn dịch bảo vệ, việc chủng ngừa không cần phải được tăng

cường bằng việc sử dụng lần thứ hai. Trong chế độ hai mũi tiêm, việc chủng ngừa lần thứ nhất (cơ bản) thường được tăng cường trong vòng 6 tuần từ lần sử dụng đầu tiên, thông thường trong 3 hoặc thậm chí 2 tuần từ lần sử dụng đầu tiên, và chỉ ngay sau lần sử dụng thứ hai (tăng cường), tính miễn dịch bảo vệ được hiểu là thu được.

“Chất mang được dụng” là môi trường tương hợp sinh học, tức là môi trường mà sau khi sử dụng, không kích thích các phản ứng bất lợi đáng kể ở đối tượng động vật, có khả năng trình diện kháng nguyên cho hệ miễn dịch của động vật chủ sau khi sử dụng vaccin. Chất mang này có thể là chất lỏng chứa nước và/hoặc dung môi tương hợp sinh học bất kỳ khác, nhưng cũng có thể là chất rắn như thường được sử dụng để thu được vaccin sấy đông khô (dựa trên đường và/hoặc protein).

Các phương án của sáng chế

Theo một phương án, vaccin là để bảo vệ lợn sau một mũi tiêm duy nhất. Đã phát hiện thấy rằng có lợi nếu lợn được bảo vệ chống lại cả hai mầm bệnh ngay cả sau một mũi tiêm duy nhất vaccin này. Phương án này không loại trừ rằng sự chủng ngừa tiếp theo được đưa ra, ví dụ 6 đến 12 tháng sau lần chủng ngừa đầu tiên để khôi phục mức độ bảo vệ. Sự chủng ngừa tiếp theo này khác với sự chủng ngừa tăng cường trong phác đồ chủng ngừa cơ bản - tăng cường, trong đó sự bảo vệ chỉ được tin là thu được sau khi chủng ngừa tăng cường. Trong phác đồ cơ bản - tăng cường, hai lần chủng ngừa thường cách nhau 2-3 tuần.

Theo một phương án, vaccin chứa tá dược. Đã phát hiện thấy rằng tá dược, mà thường được sử dụng để cải thiện đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên đã được làm bất hoạt, không can thiệp một cách có hại đối với kháng nguyên Lawsonia hoặc PCV2 khi sử dụng vaccin trong hạ bì (đây là vị trí đã được biết về các phản ứng bất lợi của nó), cũng không làm tăng một cách quá mức tính phản ứng đối với kháng nguyên khác, mặc dù WHO cảnh báo rõ ràng đối với kiểu can thiệp và tính phản ứng này trong bài giảng “Vaccine Safety

Basics” - Khái niệm cơ bản về độ an toàn của vaccin (xem trên đây) trên trang 1, hai dòng cuối cùng (phần “Vaccin hỗn hợp”) của bài giảng này. Theo phương án khác, tá dược chứa dầu không thể phân hủy sinh học, như ví dụ dầu hydrocacbon no có thể thu được từ ExxonMobil® (Marcol® 52).

Theo một phương án, vaccin còn chứa kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) được làm bất hoạt, tốt hơn là Mhyo bacterin. Vaccin này được chứng tỏ là vaccin thuận tiện, an toàn và hiệu quả chống lại ba mầm bệnh chính ở lợn.

Theo phương án khác, vaccin chứa, cho mỗi liều, 1×10^9 vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* đã bị tiêu diệt. Tức là, kháng nguyên *Lawsonia intracellularis* được làm bất hoạt có tải lượng sao cho vaccin chứa kháng nguyên *Lawsonia intracellularis* tương ứng với 1×10^9 vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* cho mỗi liều. Phương án này không loại trừ tải lượng kháng nguyên cao hơn, tải lượng cao hơn này có thể ảnh hưởng tích cực đến mức độ bảo vệ và khoảng thời gian miễn dịch.

Theo một phương án, vi khuẩn *Lawsonia* được sấy đông khô trước khi bổ sung vi khuẩn này vào chế phẩm, ví dụ chế phẩm hoặc nhũ tương gốc nước chứa PCV2 ORF2, để tạo thành vaccin.

Theo cách tương tự, phương pháp tạo ra vaccin để sử dụng trong da, bao gồm bước kết hợp vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt và protein ORF2 của virus circo lợn 2 (PCV2) với chất mang được dùng, vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt này có thể ở dạng được sấy đông khô và được bổ sung vào chế phẩm lỏng chứa chất mang và protein ORF2 PCV2, thường trong vòng 1 giờ trước khi sử dụng.

Sáng chế sẽ được giải thích chi tiết hơn dựa vào các ví dụ và hình vẽ sau.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 là thử nghiệm cho thấy rằng việc chủng ngừa trong da liều đơn có thể tạo ra 23 tuần miễn dịch chống lại sự lây nhiễm virus circo lợn typ 2.

Ví dụ 2 là thử nghiệm khác với phương pháp chủng ngừa một lần bằng PCV2 ID cho thấy rằng việc chủng ngừa là an toàn và dẫn đến hiệu giá bảo vệ.

Ví dụ 3 là so sánh trực tiếp giữa việc chủng ngừa trong da và trong cơ.

Ví dụ 4 mô tả các thử nghiệm với việc chủng ngừa trong da kết hợp.

Ví dụ 5 mô tả thử nghiệm với vaccin hỗn hợp, các liều lượng kháng nguyên khác nhau và các tá dược khác nhau.

Ví dụ 6 mô tả thử nghiệm khác với vaccin hỗn hợp.

Ví dụ 1

Thiết kế thử nghiệm

Thế hệ con của 10 lợn nái với kháng thể chống lại PCV2 được sử dụng cho nghiên cứu này. Lợn con được chia theo các lứa thành 2 nhóm, mỗi nhóm 15 con. Vào lúc 3 tuần tuổi, lợn con của nhóm 1 được chủng ngừa trong da trên phía bên phải của cổ bằng 0,2 ml vaccin chứa protein ORF2 được biểu hiện theo cách tái tổ hợp của virus circo lợn typ 2 (xem WO 2007/028823 về cách tạo ra protein này), sử dụng thiết bị chủng ngừa trong da có sẵn trên thị trường IDAL® (có sẵn từ MSD Animal Health, Boxmeer, The Netherlands), trong khi nhóm 2 không được chủng ngừa và đóng vai trò làm nhóm đối chứng. Tất cả các động vật nghiên cứu được quan sát hằng ngày về các dấu hiệu lâm sàng. Mẫu máu của tất cả các con vật được lấy tại thời điểm chủng ngừa, 9, 17, 19 và 21 tuần sau đó. 23 tuần sau khi chủng ngừa, mỗi con vật được lây nhiễm thử thách sử dụng chủng virus thử thách PCV2 kiểu đại được áp dụng trong mũi.

Mẫu huyết thanh và miếng gạt chứa phân được lấy một ngày trước khi thử thách và một, hai và ba tuần sau khi thử thách và được kiểm tra axit nucleic virus PCV2 bằng PCR định lượng. Ngoài ra, các mẫu huyết thanh được kiểm

tra kháng thể kháng PCV2.

Ba tuần sau khi thử thách, tất cả các con vật được mổ xác và hạch bạch huyết bẹn, amidan và phổi được lấy mẫu để xác định axit nucleic và kháng nguyên virus PCV2.

Vaccine được sử dụng dưới dạng nhũ tương dầu trong nước, chứa dầu khoáng Marcol® 52 (Exxon) với lượng bằng 5% theo thể tích, vitamin E axetat với lượng bằng 0,30% khối lượng/thể tích và Polysorbat 80 (Tween 80; Sigma Aldrich) với lượng bằng 0,32%, nước để tiêm và 2000 AU của protein PCV2 cho mỗi 0,2 ml. Các đơn vị AU được tính toán dựa trên thử nghiệm AlphaLISA của PerkinElmer. Đối với thử nghiệm này, các lỗ của đĩa vi chuẩn độ polystyren được nạp các dung dịch pha loãng theo dãy của mẫu thử nghiệm chứa kháng nguyên ORF2 PCV2 kế bên là các dung dịch pha loãng theo dãy của chuẩn tham chiếu. Các dung dịch pha loãng này được ủ với các hạt nhận (được phủ kháng thể đơn dòng hướng chống lại ORF2 PCV2), và kháng thể thứ cấp được gắn nhãn biotin mà cũng được hướng chống lại ORF2 PCV2. Sau đó, định lượng lượng kháng thể thứ cấp đã được liên kết bằng cách ủ với các hạt cho được phủ streptavidin và phát hiện sự phát quang hóa học. Chuẩn tham chiếu là vaccine Porcilis® PCV có sẵn trên thị trường chứa 5000 AU cho mỗi liều (2 ml).

Quy trình thử nghiệm

Quan sát hằng ngày

Tất cả các con lợn đều được quan sát hằng ngày về các dấu hiệu lâm sàng của bệnh. Các quan sát này gồm các phản ứng toàn thân bao gồm mất cảm giác thèm ăn, xu hướng nằm bệt, bơ phờ hoặc tình trạng uể oải, run rẩy, lông dựng đứng, phù nề (đặc biệt là xung quanh mắt), nôn mửa, tiêu chảy và khó thở.

Lấy mẫu máu

Mẫu máu được thu gom trước khi chủng ngừa, 9, 17, 19 và 21 tuần sau đó. Mẫu máu được thu gom một ngày trước khi thử thách và 7, 13 và 19 ngày sau khi thử thách. Việc thu gom mẫu máu được thực hiện một cách riêng rẽ đối với tất cả các con lợn.

Thẩm phân bằng miếng gạc

Miếng gạc chứa phân được lấy từ tất cả các con vật, sử dụng một miếng gạc khô cho mỗi con vật, một ngày trước khi thử thách, 7, 13 và 18 ngày sau thử thách. Các miếng gạc được đưa, bằng cách sử dụng quy trình chuẩn, vào môi trường chứa chất kháng sinh. Huyền phù của nguyên liệu đã được thẩm bằng miếng gạc trong môi trường được lọc bằng cách ly tâm, được chia thành các lượng nhỏ và được bảo quản ở nhiệt độ $\leq -18^{\circ}\text{C}$ cho đến lần sử dụng tiếp theo.

Huyết thanh học

Tất cả các mẫu huyết thanh đều được xét nghiệm về kháng thể chống lại PCV2, sử dụng quy trình ELISA chuẩn. Một cách ngắn gọn, các mẫu huyết thanh đã được pha loãng theo dãy được ủ trên các đĩa vi chuẩn độ đã được phủ kháng nguyên ORF2 PCV2 đã được biểu hiện của baculovirus. Sau khi loại bỏ huyết thanh, tất cả các lỗ được ủ với lượng cố định của kháng thể đơn dòng đặc hiệu PCV2 đã được gắn nhãn biotin. Sau đó, MoAb đã được liên kết được ủ với streptavidin liên hợp với peroxidaza, sau đó phát hiện nhóm mang màu. Độ chuẩn được biểu thị dưới dạng độ chuẩn $\log_2$.

Xét nghiệm sau khi chết

Vào cuối thử nghiệm, tất cả các con vật đều được làm chết không đau đớn bằng cách trích máu, sau đó là gây choáng. Trong quá trình mổ xác, động vật được để phanh và nội tạng được kiểm tra tại chỗ, đặc biệt là các cơ quan sau: phổi, hạch bạch huyết bẹn và hạch bạch huyết mạc treo ruột, amidan, tuyến ức, lá lách, gan và thận. Sau đó, các mẫu từ amidan, phổi (cùng với các thùy), và hạch bạch huyết bẹn được lấy ra để làm đông lạnh nhanh và phân tích

sau đó bằng PCR định lượng (qPCR).

PCR định lượng

PCR định lượng (qPCR) được tiến hành trên tất cả các mẫu huyết thanh và miếng gạc chứa phân, và trên dịch đồng nhất mô 10% của amidan, phổi và hạch bạch huyết bẹn. Một cách ngắn gọn, ADN được chiết từ các mẫu sử dụng kit bán trên thị trường. ADN hệ gen PCV2 trong mỗi mẫu được định lượng bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR), sử dụng các đoạn mồi và mẫu dò thủy phân được đánh dấu kép đặc hiệu PCV2. Số chu kỳ trong đó sự phát huỳnh quang đặc trưng vượt quá ngưỡng giới hạn có liên quan với số chu kỳ đối với tập hợp mẫu chứa lượng đã biết của plasmit chứa PCV2. Các kết quả được biểu thị dưới dạng log10 bản sao/ μ l hỗn hợp phản ứng (log10 c/ μ l).

Kết quả

Vào lúc bắt đầu thử nghiệm, tất cả các con vật đều được thấy là khỏe mạnh. Trong nhóm đối chứng, một con vật được thấy là bị chết vào lúc 6 tuần sau khi chủng ngừa (weeks post vaccination - wpv). Hai con vật đã được chủng ngừa có vấn đề cục bộ nhẹ, *tức là*, loạn chức năng vận động nhẹ (cứng một bên chân). Do vấn đề này không nghiêm trọng, các con vật không được xử lý. Không có con vật đã được chủng ngừa nào cho thấy dấu hiệu bệnh bất kỳ hoặc các phản ứng toàn thân như chứng thân nhiệt cao, giảm sự lấy thức ăn, sốt phản vệ hoặc nôn mửa.

Kết quả huyết thanh học được đưa ra trên Fig. 1. Rõ ràng là các con vật đã được chủng ngừa giữ được độ chuẩn kháng PCV2 mà dường như giữ vững ở khoảng 4,0 log2, trong khi đó ở các con vật đối chứng, độ chuẩn giảm dưới giới hạn phát hiện. Sau khi thử thách (23 wpv, ở độ tuổi 26 tuần), độ chuẩn tăng nhẹ trong nhóm được chủng ngừa. Trong nhóm đối chứng, độ chuẩn tăng đến cùng mức.

Kết quả qPCR được thể hiện trên các Fig 2A, 2B và 2C (“dpc – days post challenge” = ngày sau thử thách). Dường như là các con vật đã được

chủng ngừa được bảo vệ khỏi sự lây nhiễm thử thách với PCV2 vào 23 tuần sau khi chủng ngừa, như được thể hiện bởi sự giảm đáng kể axit nucleic PCV2 trong huyết thanh, các cơ quan lympho và phổi. Ngoài ra, vaccin có khả năng làm giảm sự lột vỏ của virus như được chứng tỏ bởi sự giảm đáng kể tải lượng virus trong miếng gạc chứa phân chống lại PCV2 ít nhất 23 tuần. Thử nghiệm này được tiến hành ở động vật nông trại, có độ chuẩn kháng thể tuần hoàn chống lại PCV2 vào khoảng $7 \log 2$, đây được xem là mức trung bình.

Ví dụ 2

Thiết kế thử nghiệm

Tổng cộng 46 lợn con từ một lứa đẻ được phân bổ vào 4 nhóm xử lý: hai nhóm được chủng ngừa, mỗi nhóm gồm 13 lợn con và hai nhóm đối chứng, mỗi nhóm 10 lợn con. Nhóm 1 được chủng ngừa như được thể hiện trên đây trong Ví dụ 1 khi lợn con khoảng hai tuần tuổi, nhóm 2 được chủng ngừa khi lợn con khoảng ba tuần tuổi. Lợn con được chủng ngừa trong da ở phía bên phải cổ bằng liều đơn của vaccin. Nhóm 3 (nhóm đối chứng 2 tuần tuổi) và nhóm 4 (nhóm đối chứng 3 tuần tuổi) không được chủng ngừa. Mẫu huyết thanh được thu gom từ tất cả các con vật vào ngày chủng ngừa, 2, 3 và 4 tuần sau khi chủng ngừa. Nhiệt độ được lấy một ngày trước khi chủng ngừa, vào ngày chủng ngừa và 4 giờ sau đó và vào 1, 2, 3, 4 ngày sau khi chủng ngừa.

Quy trình thử nghiệm

Trước khi chủng ngừa, lợn con được quan sát về tình hình sức khỏe chung. Tất cả lợn con đều được đo thân nhiệt, vào ngày $T = -1$, ngày $T = 0$ vào 0 và 4 giờ sau khi chủng ngừa, và vào ngày $T = 1, 2, 3, 4$ sau khi chủng ngừa.

Mẫu máu được thu gom vào ngày chủng ngừa và 2, 3 và 4 tuần sau. Việc thu gom mẫu máu được tiến hành ở tất cả các con lợn một cách riêng rẽ theo quy trình chuẩn. Mẫu máu được thu gom mà không bổ sung chất chống đông tụ. Huyết thanh được chuẩn bị từ mẫu máu đã đóng cục và các lượng nhỏ được nạp đầy và bảo quản ở -20°C cho đến khi phân tích.

ELISA kháng thể IgM PCV2 và kháng thể Ig PCV2 tổng được thử nghiệm như được nêu trên đây trong Ví dụ 1 (“Huyết thanh học”), ngoại trừ là trong trường hợp ELISA kháng thể IgM, các đĩa được phủ kháng thể IgM và sau đó được ủ kháng nguyên ORF2 PCV2, trước khi ủ lượng cố định của kháng thể đơn dòng đặc hiệu PCV2 đã được gắn nhãn biotin.

Kết quả

Vào lúc bắt đầu thử nghiệm, tất cả các con vật được thấy là khỏe mạnh. Kết quả trung bình của thân nhiệt được thể hiện trên Fig. 3. Không quan sát thấy sự khác biệt nào đối với mức tăng trung bình nhiệt độ cơ thể giữa các con lợn hai và ba tuần tuổi (mức tăng trung bình tối đa nằm trong khoảng từ 0,0 đến 0,3°C). Ngoài ra, mức tăng tối đa nhiệt độ cơ thể của các động vật riêng rẽ trong nhóm 1 và trong nhóm 2 là tương đương với mức tăng nhiệt độ tối đa của các động vật riêng rẽ trong hai nhóm đối chứng.

ELISA kháng thể Ig PCV2 tổng

Kết quả trung bình của đáp ứng kháng thể Ig PCV2 tổng được tóm tắt trên Fig. 4. Tại thời điểm chủng ngừa, lợn con được chủng ngừa vào lúc 2 tuần tuổi có độ chuẩn kháng thể PCV2 (chủ yếu thu được từ mẹ) cao hơn so với lợn con được chủng ngừa vào lúc 3 tuần tuổi. Các con vật đã được chủng ngừa cho thấy sự tăng độ chuẩn cao hơn một cách đáng kể so với các động vật đối chứng.

ELISA kháng thể IgM PCV2

Kết quả trung bình của đáp ứng kháng thể IgM PCV2 được thể hiện trên Fig. 5. Tại thời điểm chủng ngừa, tất cả các con vật đều âm tính đối với kháng thể IgM. Sau khi chủng ngừa, các con vật 3 tuần tuổi có đáp ứng kháng thể IgM cao hơn và nhanh hơn đáng kể so với các con vật 2 tuần tuổi. Các con vật đối chứng vẫn âm tính trong suốt nghiên cứu.

Dựa trên các kết quả này, có thể kết luận được rằng việc chủng ngừa một liều trong da cho lợn con vào lúc 2 và 3 tuần tuổi dẫn đến profin độ an toàn

chấp nhận được và đáp ứng huyết thanh học tốt. Các kết quả tương đương thu được với thử nghiệm khác (số liệu không được thể hiện) trong đó mức bắt đầu của độ chuẩn kháng thể tuần hoàn thậm chí cao hơn, *tức là*, lên đến $9,4 \log 2$, mức này được xem là ở đầu mút cao của khoảng trung bình.

Ví dụ 3

Thiết kế thử nghiệm

Tổng cộng 30 lợn con được phân bổ vào 3 nhóm xử lý, mỗi nhóm 30 lợn con. Lợn con từ nhóm 1 được chủng ngừa trong da bằng liều đơn của vaccin như được thể hiện trên đây trong Ví dụ 1. Lợn con từ nhóm 2 được chủng ngừa trong cơ bằng liều đơn của cùng vaccin, với cùng lượng ở cùng vị trí (trong cổ), và lợn con từ nhóm 3 được để nguyên không được xử lý. Mẫu huyết thanh được thu gom từ tất cả các con vật vào ngày chủng ngừa, ba và năm tuần sau khi chủng ngừa.

Quy trình thử nghiệm

Trước khi chủng ngừa, lợn con được quan sát về tình hình sức khỏe chung, theo quy trình chuẩn. Việc lấy mẫu máu và huyết thanh học đối với kháng thể kháng PCV2 tổng và kháng thể IgM đặc hiệu ORF2 PCV2 được tiến hành theo quy trình như được nêu trên đây trong Ví dụ 2.

Kết quả

Vào lúc bắt đầu nghiên cứu, tất cả các con vật được thấy là khỏe mạnh. Kết quả huyết thanh học được tóm tắt trong Bảng 1 (độ chuẩn được biểu thị dưới dạng $\log 2$). Tại thời điểm chủng ngừa, độ chuẩn kháng thể trung bình là tương đối cao. Sau khi chủng ngừa, không có con vật nào cho thấy sự tăng độ chuẩn PCV2 Ab. Vào thời điểm 3 và 5 tuần sau khi chủng ngừa, có thể quan sát thấy trong nhóm ID, độ chuẩn kháng thể PCV2 trung bình cao hơn so với trong nhóm IM.

Kết quả huyết thanh học IgM kháng PCV2 được tóm tắt trong Bảng 2

(độ chuẩn được biểu thị dưới dạng log2). Vào lúc ba tuần sau khi chủng ngừa, độ chuẩn kháng thể IgM kháng PCV2 của nhóm ID cao hơn một cách đáng kể so với của nhóm IM và nhóm đối chứng.

Bảng 1: Kết quả kháng thể trung bình

Nhóm	Độ chuẩn 0 wpv	Độ chuẩn 3 wpv	Độ chuẩn 5 wpv
1	8,2	7,3	6,2
2	8,6	6,5	5,1
3	8,4	6,2	4,3

Bảng 2: Kết quả kháng thể IgM kháng PCV2 trung bình

Nhóm	Độ chuẩn IgM 3 wpv
1	12,7
2	3,4
3	1,0

Khi áp dụng kiểm định tổng sắp hạng Wilcoxon, giá trị p về sự khác biệt trong đáp ứng IgM đối với nhóm ID so với nhóm IM là 0,0001.

Ví dụ 4

Thế hệ con của một vài lợn nái có kháng thể kháng PCV2 là có sẵn cho nghiên cứu này. Lợn con được chia theo các lứa thành 3 nhóm, mỗi nhóm 18 con vật. Vào lúc 3 tuần tuổi, lợn con của nhóm 1 và 2 được chủng ngừa trong da như được nêu trên đây trong Ví dụ 1. Các con vật trong nhóm 2 được chủng ngừa trong da ở phía bên kia của cổ vào cùng thời điểm với vacxin Mhyo được bất hoạt có sẵn trên thị trường Porcilis® M Hyo ID Once (chứa Mhyo bacterin) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các con vật của nhóm 3 (nhóm đối chứng) không được xử lý. Tất cả các động vật nghiên cứu đều được quan sát hàng ngày. Mẫu huyết thanh được lấy tại thời điểm chủng ngừa và cách tuần cho đến khi các con vật được đem đi mổ thịt (23-25 tuần tuổi). Các mẫu này được xét nghiệm kháng thể kháng PCV2.

Quy trình thử nghiệm là như được nêu trên đây trong Ví dụ 1. Huyết

thanh học thu được được thể hiện trên Fig. 6. Từ hình vẽ này, rõ ràng là độ chuẩn kháng PCV2 vẫn còn tốt, lớn hơn mức 4 log 2 như được thiết lập với các thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1 và được thấy là có tính bảo vệ. Không có dấu hiệu về sự can thiệp bất lợi giữa các vaccin.

Thử nghiệm này được lặp lại để kiểm tra sự bảo vệ chống lại *Mycoplasma hyopneumoniae* độc. Thử nghiệm lặp lại này sử dụng 60 lợn con. 40 con vật được chủng ngừa vào lúc 18-24 ngày tuổi bằng vaccin Mhyo và 20 con trong số các con vật này cũng được chủng ngừa bằng vaccin PCV. 20 con vật không được chủng ngừa và đóng vai trò làm đối chứng thử thách. 3 tuần sau khi chủng ngừa, tất cả các con vật đều được lây nhiễm với chủng *M. hyopneumoniae* độc và 3 tuần sau thử thách, tất cả các con vật được nghiên cứu khám xác về tổn thương phổi. Điểm số tổn thương phổi (Lung lesion score - LLS) được so sánh giữa các nhóm.

LLS đối với nhóm được chủng ngừa bằng Porcilis® M Hyo ID Once thấp hơn một cách đáng kể so với của nhóm đối chứng ($p < 0,05$, Thử nghiệm Dunn). Không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nhóm đã được chủng ngừa bằng Porcilis® M Hyo ID Once một mình hoặc kết hợp với vaccin PCV. Do đó, có thể kết luận được rằng việc chủng ngừa kết hợp không có tác động bất lợi đến tính miễn dịch thu được với Porcilis® M Hyo ID Once.

Ví dụ 5

Tổng cộng 8 vaccin được tạo chế phẩm chứa protein ORF2 PCV2 (250 đến 6000 AU/0,2 ml), M hyo (với cùng mức như trong Porcilis® Mhyo ID Once) và kháng nguyên Lawsonia (xem WO 20089/127684, ví dụ 2 đối với các kháng nguyên tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt: ở mức khoảng 1×10^9 tế bào cho mỗi 0,2 ml). Các vaccin chứa tá dược khác nhau. Một số vaccin sử dụng dầu có khả năng phân hủy sinh học hiện có, chứa tá dược Diluvac Forte (MSD Animal Health, Boxmeer, The Netherlands; gọi là “DF”). Các vaccin khác sử dụng chế phẩm tá dược như được mô tả trên đây trong Ví dụ 1 (gọi là “X-solve 12”), hoặc tá dược được tạo chế phẩm với cùng các thành phần như X-solve 12,

nhưng với nồng độ chỉ bằng một nửa (gọi là “X-solve 6”), hoặc $2\frac{1}{2}$ lần nồng độ như trong X-solve 12 (gọi là “X-solve 30”). Vacxin thu được là như sau (kháng nguyên Mhyo và Lawsonia không được trích dẫn; hàm lượng cho mỗi liều):

Nhóm 1:	2000 AU PCV2/X-solve 30
Nhóm 2:	250 AU PCV2/X-solve 12
Nhóm 3:	500 AU PCV2/X-solve 12
Nhóm 4:	2000 AU PCV2/X-solve 12
Nhóm 5:	2000 AU PCV2/X-solve 6
Nhóm 6:	500 AU PCV2/DF
Nhóm 7:	2000 AU PCV2/DF
Nhóm 8:	6000 AU PCV2/DF

Thế hệ con của 8 con lợn nái được sử dụng cho nghiên cứu này. Các con lợn con có mức kháng thể thu được từ mẹ (Maternally derived antibody - MDA) vừa phải (mức trung bình) chống lại PCV2 (trung bình: 6,7 log₂). Vào lúc 3/4 tuần tuổi, lợn con từ nhóm 1 đến 8 được chủng ngừa trong da bằng liều đơn, sử dụng thiết bị chủng ngừa IDAL®. Lợn con từ nhóm 9 không được chủng ngừa. Vào 7 tuần sau khi chủng ngừa, tất cả các con vật được chuyển đến khu vực thử thách. Một ngày sau, tất cả các con vật được lây nhiễm thử thách với chủng thử thách PCV2. Tất cả các con lợn con đều được quan sát hằng ngày về các dấu hiệu lâm sàng.

Các phản ứng cục bộ được theo dõi bằng cách bắt mạch, bắt đầu vào ngày chủng ngừa và hai ngày một lần sau khi chủng ngừa cho đến 20 ngày sau khi chủng ngừa.

Mẫu máu được thu gom từ tất cả các con vật vào ngày chủng ngừa và 3 tuần sau, một ngày trước khi thử thách, 1 và 2 tuần sau và vào lúc mổ xác. Mẫu huyết thanh lấy từ mỗi con vật được kiểm tra kháng thể chống lại PCV2 và Mhyo. Trong quá trình mổ xác, hạch bạch huyết mạc treo ruột và hạch bạch huyết bẹn, amidan và phổi được lấy mẫu để định lượng axit nucleic PCV2.

Quy trình thử nghiệm là giống như được mô tả trên đây trong Ví dụ 2. Đáp ứng kháng thể IgM PCV2 tại thời điểm chủng ngừa là dưới mức phát hiện đối với tất cả các nhóm (dưới 2,0 log₂). Tại thời điểm 3 tuần sau khi chủng

ngừa độ chuẩn kháng thể PCV là cao nhất đối với vaccin 2000AU PCV2/X-solve 30, tức là 20 log 2. Nhóm X-solve 12, chứa 250, 500 và 2000 AU kháng nguyên PCV2 cho mỗi liều có độ chuẩn lần lượt bằng 9, 16 và 19 log 2. Nhóm nhận được vaccin 2000 AU/X-solve 6 có độ chuẩn bằng 15 log 2. Nhóm DF chứa 500, 2000 và 6000 AU kháng nguyên PCV2 cho mỗi liều có độ chuẩn lần lượt bằng 8, 14 và 16 log 2. Nhóm đối chứng có độ chuẩn dưới mức phát hiện.

Trong nghiên cứu này, các phản ứng toàn thân và cục bộ được đánh giá. Không quan sát thấy các phản ứng toàn thân do sự chủng ngừa gây ra. Đến chừng mực mà các tác động cục bộ có liên quan, không nhiều hơn ba động vật được chủng ngừa (tương ứng nhận được X-solve 12 500 và 2000 AU, hoặc DF 6000 AU PCV2 cho mỗi liều vaccin) có chút vấn đề về vận động, số lượng giống như ở các con vật đối chứng. Do đó, các phản ứng này có thể được xem là không liên quan đến sự chủng ngừa. Đối với các phản ứng cục bộ khác, nhiều động vật (khoảng từ 60 đến 100%) được chủng ngừa bằng X-solve cho thấy các phản ứng cục bộ, kích thước sưng phồng trung bình là nhỏ hơn 3 cm, tức là từ 1 đến 2 cm, và chỗ sưng phồng biến mất trong 2-6 ngày. Sử dụng DF, chỉ khoảng 30% động vật cho thấy sự sưng phồng cục bộ, kích thước trung bình là nhỏ hơn 0,5 cm, và chúng biến mất trong một ngày.

Fig 7 và 8 mô tả tải lượng virus trong các cơ quan (tính trung bình) đối với các vaccin khác nhau. Dường như là tất cả các vaccin đều có khả năng làm giảm đáng kể (trong các trường hợp này ít nhất là 3 log) tải lượng virus trong các cơ quan có liên quan.

Trong nghiên cứu này, dường như là tất cả các tá dược được sử dụng là an toàn, kích thích đáp ứng IgM kháng PCV2 và có khả năng điều trị động vật chống lại sự lây nhiễm virus circo lợn typ 2 gây bệnh. Không phát hiện thấy có sự can thiệp có hại giữa các kháng nguyên khác nhau. Huyết thanh học Lawsonia (không được thể hiện) cho thấy đáp ứng kháng thể tốt, căn cứ vào đó, tin rằng thu được sự bảo vệ chống lại sự lây nhiễm *Lawsonia intracellularis*. Để xác nhận điều này, thử nghiệm tiếp theo bao gồm thử thách với *Lawsonia*

intracellularis gây bệnh được tiến hành (xem Ví dụ 6).

Ví dụ 6

Để xác nhận rằng các động vật được bảo vệ chống lại thử thách với *Lawsonia intracellularis*, chế phẩm vacxin với các lượng tá được X-solve khác nhau, như được mô tả trong Ví dụ 5, được tạo chế phẩm mới đối với các thử nghiệm thử thách khác nhau. Cơ sở cho các vacxin này là vacxin PCV2 chứa protein ORF2 PCV2. Vacxin thứ nhất được tạo chế phẩm trong X-solve 30 như được thể hiện trong Ví dụ 5. Vacxin thứ hai được tạo chế phẩm trong X-solve 12, trong đó kháng nguyên *Lawsonia* được đưa vào bằng cách bổ sung tế bào *Lawsonia* đã bị tiêu diệt và được sấy đông khô (cùng kháng nguyên như được sử dụng trong Ví dụ 5) vào vacxin PCV2 sử dụng ngay trong 30 phút trước khi sử dụng. Nồng độ cuối của protein ORF2 PCV2 trong cả hai vacxin là 2000 AU/0,2 ml. Nồng độ của kháng nguyên *Lawsonia* là giống như được sử dụng cho các thử nghiệm như được mô tả trong Ví dụ 5 (khoảng 1×10^9 tế bào cho mỗi 0,2 ml). Các vacxin thu được là như sau:

- 1: 2000 AU PCV2/*Lawsonia*/X-solve 30
- 2: 2000 AU PCV2/*Lawsonia*/X-solve 12

Nghiên cứu thử nhất được tiến hành bằng cách sử dụng vacxin số 1 (X-solve 30). 39 con lợn được sử dụng, được phân bổ vào hai nhóm, một nhóm 19 con lợn và một nhóm 20 con lợn. Cả hai nhóm được chủng ngừa vào lúc ba tuần tuổi với 0,2 ml vacxin bằng cách chủng ngừa trong da cổ như được thể hiện trong Ví dụ 1. Nhóm thứ nhất được chủng ngừa bằng vacxin số 1 như được nêu trên đây, nhóm thứ hai được chủng ngừa với cùng vacxin nhưng không có kháng nguyên *Lawsonia*. Nhóm này đóng vai trò là nhóm đối chứng đối với thử thách *Lawsonia*. Tất cả các con vật được thử thách vào lúc 22 tuần tuổi. Không quan sát thấy vấn đề độ an toàn không chấp nhận được. Các kết quả về sự tăng trọng lượng trung bình hằng ngày (vào ngày 14-21 sau thử thách), điểm số hồi tràng (3 tuần sau khi thử thách; điểm số này tỷ lệ thuận với sự có mặt của tổn thương hồi tràng do có sự lây nhiễm *Lawsonia*) và tỷ lệ mắc

PPE được biểu thị trong Bảng 3. Các giá trị khác biệt về mặt thống kê (kiểm định hai phía, $p < 0,05$; kiểm định ANCOVA đối với ADWG, mô hình logit cộng dồn đối với điểm số hồi tràng và kiểm định chính xác của Fischer đối với tỷ lệ mắc PPE) được biểu thị bằng dấu hoa thị.

Bảng 3

Vacxin	ADWG tính bằng kg	Điểm số hồi tràng	Tỷ lệ mắc PPE
Vacxin 1	1,100*	50*	4/19*
Vacxin đối chứng	0,886	83,5	11/20

Nghiên cứu thứ hai được tiến hành bằng cách sử dụng vacxin số 2 (X-solve 12). 50 con lợn được sử dụng, được phân bổ vào hai nhóm, mỗi nhóm 25 con lợn. Một nhóm được chủng ngừa vào lúc ba tuần tuổi với 0,2 ml vacxin được biểu thị trên đây là vacxin số 2 bằng cách chủng ngừa trong da cổ như được thể hiện trong Ví dụ 1. Nhóm thứ hai không được chủng ngừa và đóng vai trò là nhóm đối chứng. Tất cả các con vật được thử thách vào lúc 24 tuần tuổi. Các kết quả về sự tăng trọng lượng trung bình hàng ngày (vào ngày 13-20 sau thử thách), điểm số hồi tràng (3 tuần sau khi thử thách; điểm số này tỷ lệ thuận với sự có mặt của tổn thương hồi tràng do có sự lây nhiễm Lawsonia) và tỷ lệ mắc PPE được biểu thị trong Bảng 4. Các giá trị khác biệt về mặt thống kê (kiểm định hai phía, $p < 0,05$; kiểm định ANCOVA đối với ADWG, mô hình logit cộng dồn đối với điểm số hồi tràng và kiểm định chính xác của Fischer đối với tỷ lệ mắc PPE) được biểu thị bằng dấu hoa thị. Trong quá trình thử nghiệm, trong mỗi nhóm, 1 con vật bị làm chết không đau đớn do các vấn đề riêng biệt, không liên quan đến vacxin.

Bảng 4

Vacxin	ADWG tính bằng kg	Điểm số hồi tràng	Tỷ lệ mắc PPE
Vacxin 2	1,001*	129*	11/24*
Không có vacxin	-0,053	241	22/24

Các kết quả cho thấy rằng việc chủng ngừa trong da cho động vật bằng

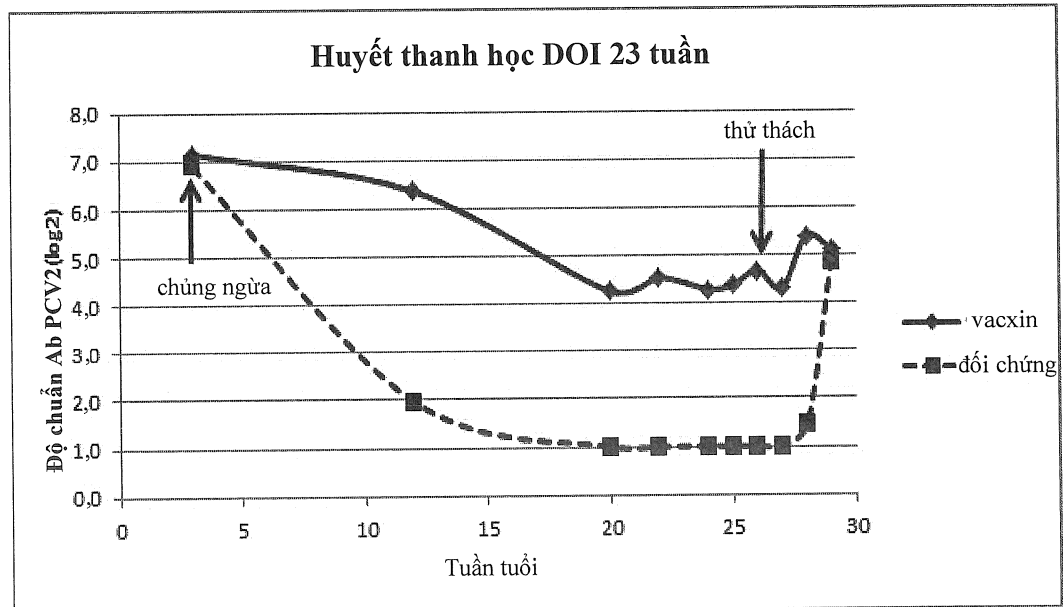
vacxin hỗn hợp chứa protein ORF2 PCV2 và vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* đã bị tiêu diệt tạo ra khả năng bảo vệ chống lại sự lây nhiễm *Lawsonia intracellularis* gây bệnh. Ngoài ra, việc sấy đông khô kháng nguyên *Lawsonia* trước khi tạo chế phẩm đường như không có tác động bất lợi đến công hiệu.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vacxin chứa hỗn hợp vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* tế bào toàn phần đã bị tiêu diệt và protein ORF2 của virut circo lợn typ 2 (PCV2) để sử dụng trong việc bảo vệ lợn chống lại sự lây nhiễm *Lawsonia intracellularis* và PCV2 bằng cách dùng vacxin này trong da, trong đó vacxin này chứa từ 2,5% theo thể tích đến 12,5% theo thể tích là tá dược dầu hydrocacbon no.
2. Vacxin để sử dụng theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, vacxin này còn chứa kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) đã được làm bất hoạt.
3. Vacxin để sử dụng theo điểm 2, khác biệt ở chỗ, kháng nguyên *Mycoplasma hyopneumoniae* đã được làm bất hoạt chứa Mhyo bacterin.
4. Vacxin để sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ, vacxin này chứa, cho mỗi liều, 1×10^9 vi khuẩn *Lawsonia intracellularis* đã bị tiêu diệt.
5. Vacxin để sử dụng theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ, vi khuẩn *Lawsonia* được sấy đông khô trước khi bổ sung vi khuẩn này vào chế phẩm để tạo nên vacxin.

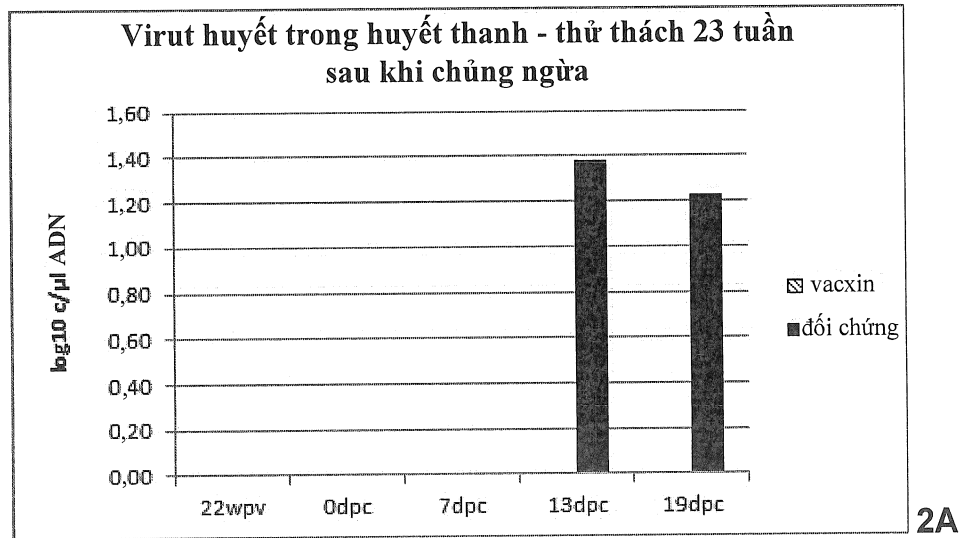
1/6

Fig.1

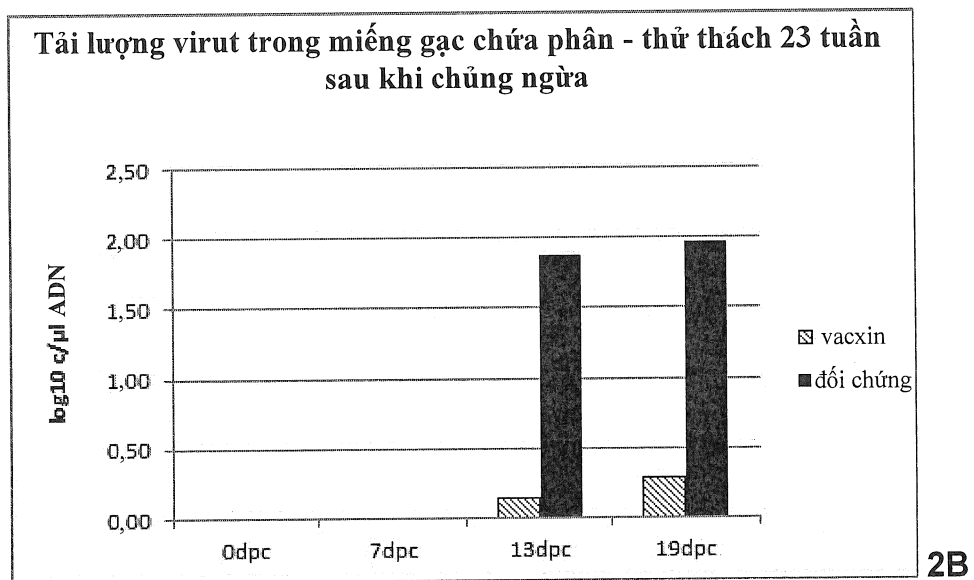


2/6

Fig.2



5



10

Fig.2 (tiếp)

5

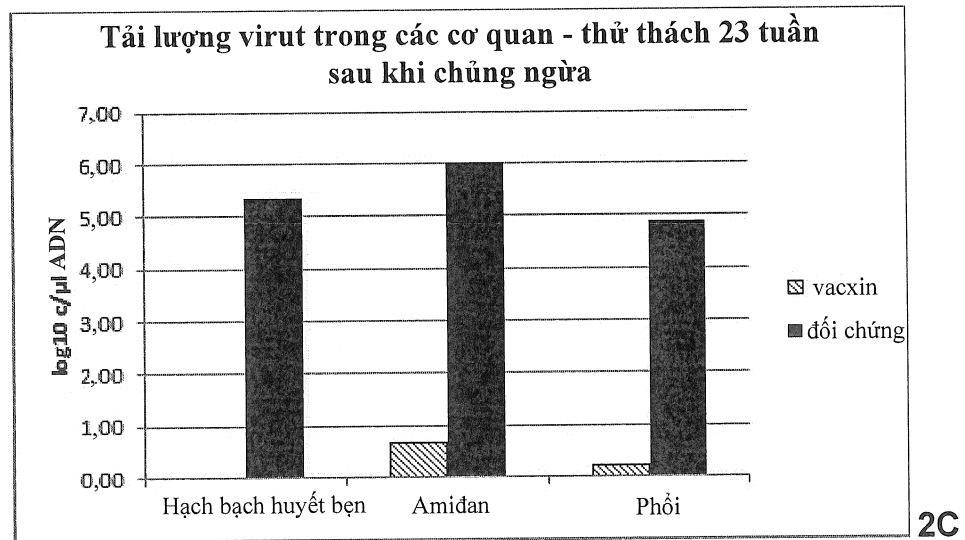
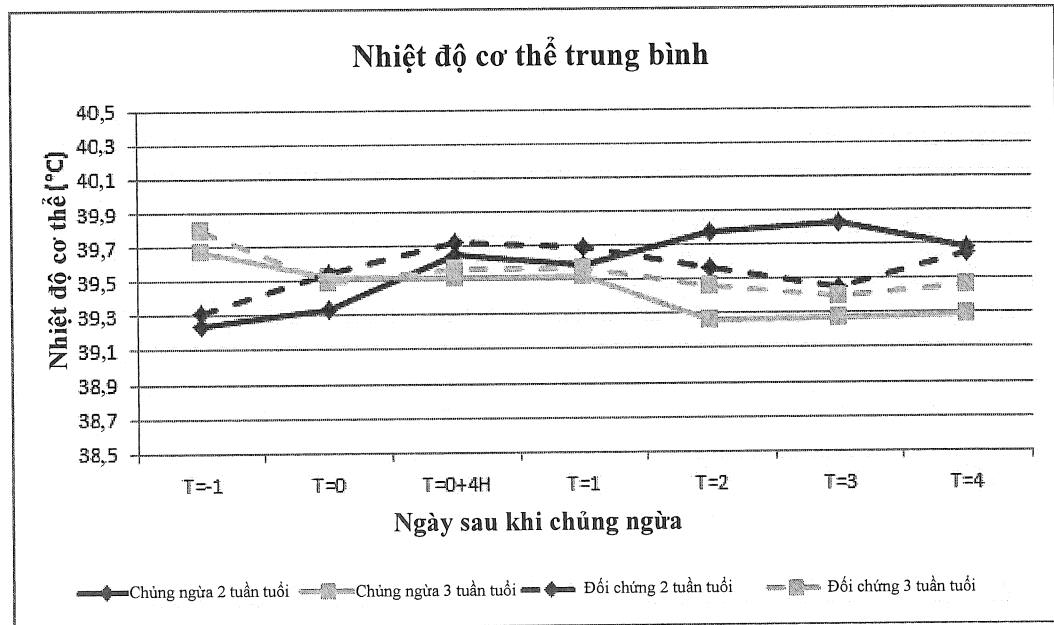
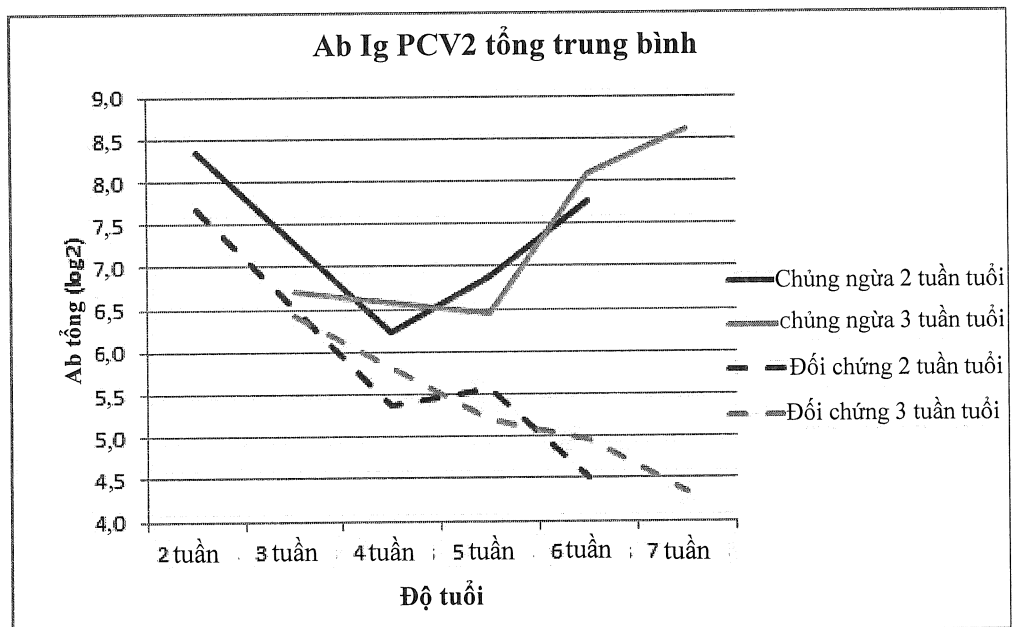


Fig.3



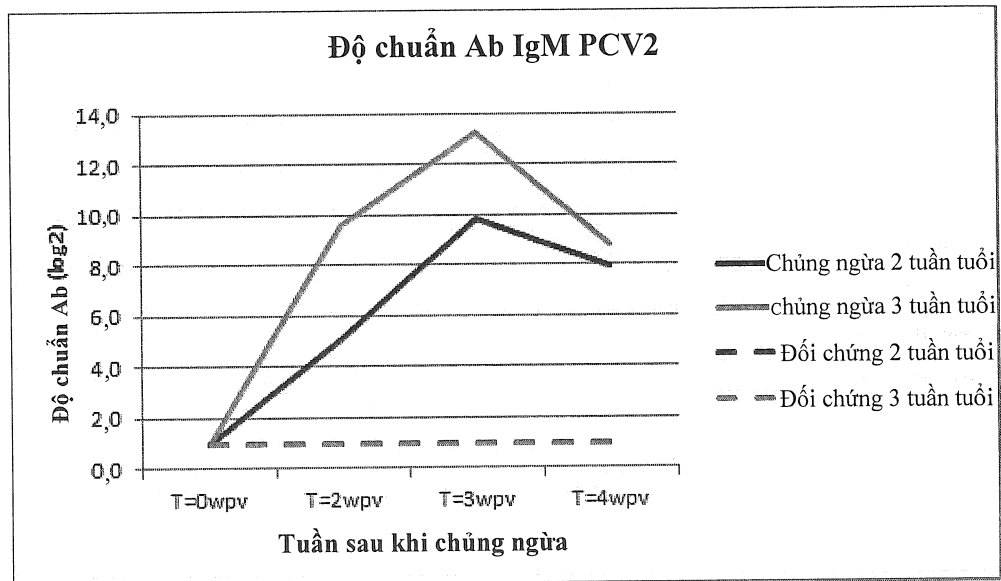
5

Fig.4



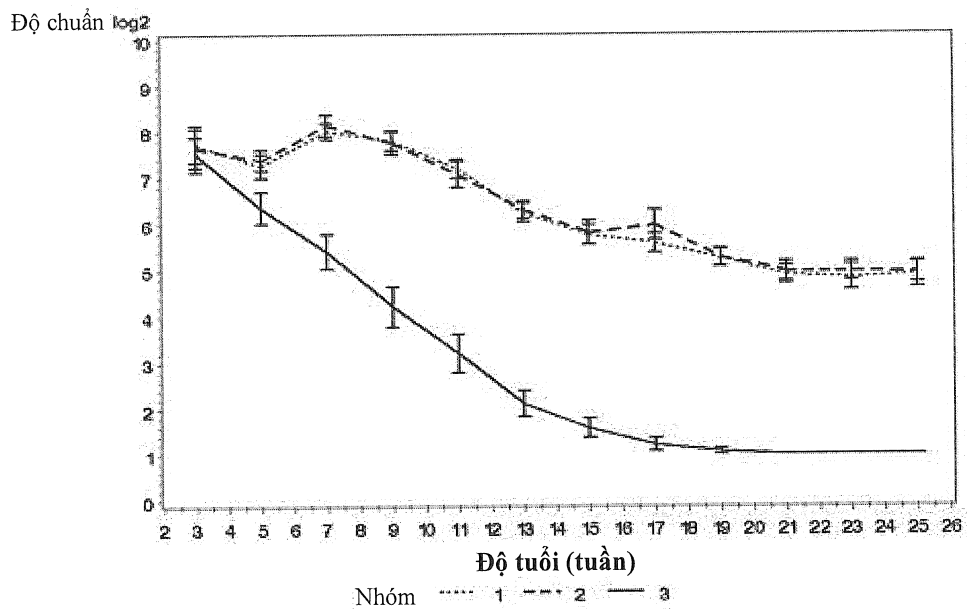
5/6

Fig.5



5

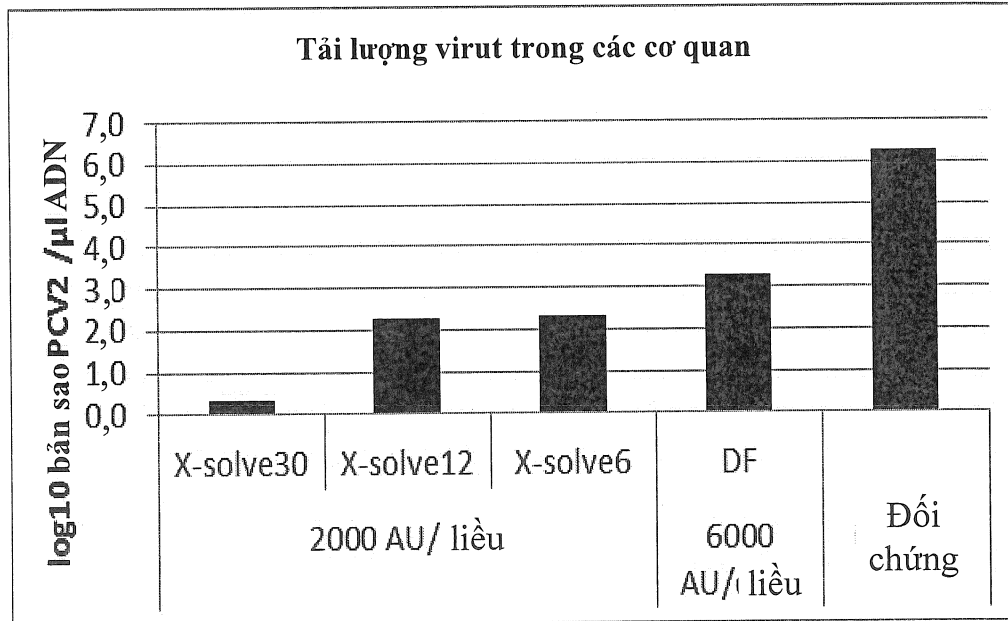
Fig.6



10

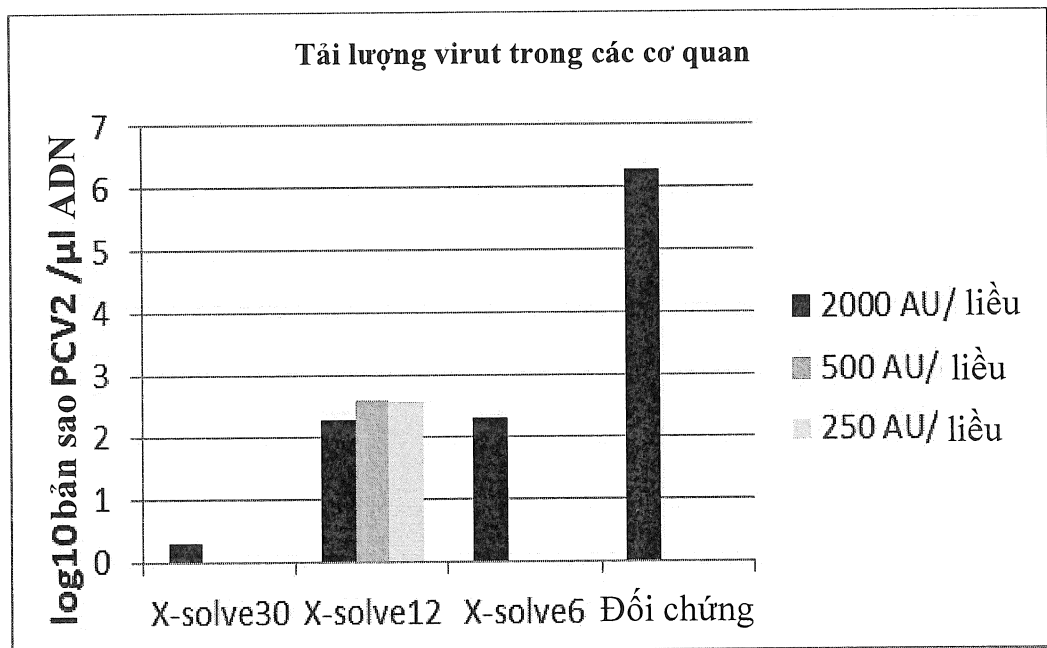
6/6

Fig.7



5

Fig.8



10