(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) **1-0037713**

(51)[7] **A61K 39/12**; C12N 7/00; A61K 39/00 (13) **B**

(21) 1-2019-03671 (22) 14/12/2017
(86) PCT/US2017/066347 14/12/2017 (87) WO2018/112169 21/06/2018
(30) 62/434,144 14/12/2016 US
(45) 25/12/2023 429 (43) 25/09/2019 378A
(73) ZOETIS SERVICES LLC (US)
10 Sylvan Way, Parsippany, NJ 07054, United States of America
(72) CALVERT, Jay, Gregory (US); BALASCH, Monica (ES); FORT, Maria (ES); PEARCE, Douglas, S. (US); KEITH, Marcia, L. (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) VACXIN ĐỂ BẢO VỆ LỢN CHỐNG LẠI SỰ LÂY NHIỄM VIRUT GÂY HỘI CHỨNG SINH SẢN VÀ HÔ HẤP Ở LỢN

(57) Sáng chế đề cập đến virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS) sống được cải biến (được tái tổ hợp hoặc không tái tổ hợp) mà lúc nào cũng có thể được nuôi cấy, duy trì, và/hoặc làm giảm độc lực trên tế bào không phải của khỉ simian, thường là tế bào của lợn, trong đó tế bào này biểu hiện thụ thể CD163 của lợn và vacxin được bào chế từ virut này an toàn và hiệu quả, và cho phép chủng ngừa cho lợn một liều trước khi cai sữa, thường là sớm nhất là vào ngày tuổi đầu tiên.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vacxin bảo vệ lợn ở tất cả các độ tuổi, cả đực và cái, kháng chủng virut gây hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome - PRRS) có nguồn gốc châu Âu. Sáng chế cụ thể đề cập đến việc chủng ngừa sớm và an toàn cho lợn con trước cai sữa, bao gồm từ ngay sau khi sinh (tức là chỉ khoảng 1 ngày tuổi hoặc nhỏ hơn) đến ba tuần tuổi, ở tất cả các thời gian tùy ý kết hợp với các vacxin tổ hợp đa giá dùng cho cho lợn, như vacxin PRRSV/*Mycoplasma hyopneumoniae (M.hyo)* nhị giá, vacxin PRRSV/Circovirut ở lợn typ 2 (PCV2) nhị giá, và vacxin PRRSV/*M.hyo*/PCV2 tam giá, hoặc đơn giản là vacxin PRRSV đơn giá, trong đó thành phần vacxin PRRS thường tương ứng với kiểu gen của chúng (và các phân typ của kiểu gen này) được công nhận để lưu hành trên lục địa châu Âu, bao gồm cả Tây Âu, vùng Địa Trung Hải, các vùng Xcăng-đi-na-vi, và Đông Âu như Nga, Thổ Nhĩ Kỳ và U-crai-na.

Sáng chế rộng hơn là đề cập đến các nhóm mới của chủng PRRSV châu Âu giảm độc lực mà, ở dạng sống được cải biến, có độ an toàn và hiệu lực rõ rệt khi được dùng thậm chí cho cả động vật non nhất ở dạng vacxin, và cung cấp thời gian miễn dịch rất dài.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (Porcine reproductive and respiratory syndrome - PRRS) được đặc trưng bởi sự sẩy thai, thai chết lưu và các vấn đề sinh sản khác ở lợn nái và lợn nái hậu bị, cũng như bệnh hô hấp ở lợn con. Tác nhân gây bệnh là virut PRRS (PRRSV), thành viên thuộc họ Arteriviridae và bộ Nidovirales. Các nidovirut là virut được bao vỏ có hệ gen chứa một mạch ARN phân cực dương. ARN hệ gen của virut ARN mạch dương có đầy đủ hai vai trò vừa lưu giữ vừa biểu hiện thông tin di truyền. Không có ADN tham gia vào quá trình sao chép hoặc phiên mã ở Nidovirut. Các protein phi cấu trúc được dịch mã trực tiếp từ ARN hệ gen của nidovirut là các polyprotein lớn và sau đó được phân cắt bằng proteaza virut thành các protein chức năng

thích hợp. Một tập hợp đồng kết thúc đầu 3' lồng nhau của các ARN dưới hệ gen (sgARN) được tổng hợp từ hệ gen và được sử dụng làm ARN thông tin để dịch mã protein cấu trúc. Việc sao chép của ARN hệ gen nidovirut vì thế là quy trình kết hợp của sao chép hệ gen và tổng hợp sgARN.

Vào cuối thập niên 1980, hai kiểu gen khác nhau của virut này đã xuất hiện gần như đồng thời, một ở Bắc Mỹ và một ở Châu Âu. Virut PRRS hiện đang là đặc hữu ở hầu hết các nước sản xuất lợn và được coi là một trong những bệnh quan trọng nhất về kinh tế ảnh hưởng đến ngành công nghiệp sản xuất thịt lợn toàn cầu. Ngoài ra, các kiểu gen có độc lực cao đã được phân lập ở Trung Quốc và các nước lân cận, và kiểu gen như vậy thường liên quan chặt chẽ với các kiểu gen Bắc Mỹ.

Mặc dù đã có những tiến bộ đáng kể trong việc tìm hiểu đặc điểm sinh học của PRRSV, thì việc kiểm soát virut này vẫn còn khó khăn. Việc chủng ngừa cho động vật trên đồng ruộng đã được chứng tỏ là phần lớn không hiệu quả. PRRS thường xuất hiện lại ở các đàn đã được gây miễn dịch, và hầu hết các chương trình chủng ngừa PRRSV ở trang trại cuối cùng không kiểm soát được bệnh.

Không bị giới hạn bởi lý thuyết, việc lây nhiễm cho lợn bằng PRRSV kiểu dại hoặc chủng ngừa chúng bằng dạng sống được làm giảm độc lực của mầm bệnh này đáng tiếc là chỉ dẫn đến việc sản xuất các kháng thể không trung hòa. Trong khoảng thời gian này, ví dụ, chỉ lượng hạn chế các tế bào tiết interferon (IFN)-γ được tạo ra. Vì thế, PRRSV dường như vốn kích thích đáp ứng miễn dịch mất cân bằng được phân biệt bởi tính miễn dịch thể dịch (trên cơ sở kháng thể) phong phú, và đáp ứng IFN-γ như T hỗ trợ (Th) 1 có thể thay đổi và hạn chế nhưng có tiềm năng bảo vệ. Một đặc điểm của việc lây nhiễm PRRSV là rất có thể góp phần vào sự phát triển mất cân bằng của tính miễn dịch thích ứng là thiếu đáp ứng miễn dịch bẩm sinh đầy đủ. Thông thường, các tế bào nhiễm virut tiết interferon "IFN" typ I (bao gồm IFN-α và IFN-β), mà bảo vệ các tế bào lân cận không bị lây nhiễm. Ngoài ra, IFN typ I được giải phóng tương tác với tập con của tế bào T tự nhiên để thúc đẩy sự chuyển hóa của chúng thành tế bào tiết IFN typ II (IFN-γ) đặc hiệu virut. Ngược lại, đáp ứng IFN-α của lợn với sự tiếp xúc PRRSV gần như không tồn tại. Việc kích thích sản xuất IFNα không hiệu quả bằng mầm bệnh này có thể được kỳ

vọng là sẽ có tác động đáng kể đến bản chất của đáp ứng miễn dịch đáp ứng của vật chủ, do IFN-α điều hòa tăng sự biểu hiện gen IFN-γ. Do đó, xytokin trước đây có khả năng kiểm soát con đường ưu thế mà thúc đẩy sự phát triển của tính miễn dịch thích ứng, cụ thể là, đáp ứng IFN-γ qua trung gian tế bào T và đạt đến đỉnh phòng vệ miễn dịch chống virut.

Liên quan đến vấn đề này, đã trở nên rõ ràng rằng một liên kết có thể xảy ra giữa miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch thích ứng khi nhiễm virut thông qua một loại tế bào tua đặc biệt mà có thể có khả năng tạo ra lượng lớn interferon typ I, và đóng vai trò quan trọng trong việc phân cực hóa chức năng tế bào T. Cụ thể là, một loại tế bào tua không thường xuyên nhưng đáng chú ý, tế bào tua (PDC), cũng được biết là tế bào sản xuất IFN-α/β tự nhiên, đóng vai trò quan trọng trong tính miễn dịch kháng virut nhờ chúng có khả năng biệt hóa tế bào T tự nhiên thành tế bào tiết IFN-γ. Mặc dù hiếm, PDC là đơn vị sản xuất IFN-α tiềm năng vô cùng lớn, với mỗi tế bào có khả năng sản xuất 3-10 pg IFN-α trong đáp ứng với virut. Ngược lại, bạch cầu đơn nhân sản xuất IFN-α ít hơn 5 đến 10 lần trên mỗi cơ sở tế bào. Kiểu hình và một số đặc điểm sinh học của PDC lợn đã được mô tả (Summerfield *et al.*, 2003, Immunology 110:440). Các nghiên cứu gần đây đã xác định rằng PRRSV không kích thích PDC lợn tiết ra IFN-α (Calzada *et al.*, 2010, Veterinary Immunology and Immunopathology 135:20).

Thực tế là, khi kết hợp với việc quan sát rằng IFN-α được bổ sung từ bên ngoài tại thời điểm chủng ngừa đã phát hiện ra được sự cải thiện về cường độ đáp ứng IFN-γ đặc hiệu PRRSV (W.A. Meier et al., Vet. Immunol. Immunopath. 102, pp 299-314, 2004), nhấn mạnh vai trò quan trọng của IFN-α trong việc lây nhiễm cho lợn bằng virut này. Với vai trò quan trọng rõ ràng của IFN-α trong việc phát triển tính miễn dịch bảo vệ, điều quan trọng là xác định khả năng của các kho virut PRRS khác nhau trong việc kích thích và/hoặc ức chế sự sản xuất IFN-α. Theo đó, có một nhu cầu cấp thiết đối với vacxin sống được cải biến mới và được cải tiến để bảo vệ chống lại PRRS.

PRRSV châu Âu thường được đặt tên là 'typ 1" để phân biệt với nó từ Bắc Mỹ có liên quan xa hoặc "typ 2" PRRS, và hai loại này chỉ giống nhau khoảng 60%, về tổng mức nucleotit. Thể phân lập PRRSV châu Âu được xác định rõ ràng lần đầu tiên được

bộc lộ bởi Wensvoort và cộng sự, là tác nhân Lelystad (xem Institut Pasteur Isolate 1102, và các patent Mỹ 5,620,691 và 6,197,310 và các đơn tương đương quốc tế của chúng). Các kiểu phụ khác nhau của PRRSV châu Âu (tất cả chúng có thể được bảo vệ đối với các khía cạnh khác nhau trong sáng chế) được đề cập chi tiết hơn trong M. P. Murtaugh et al., Virus Research, Vol 154, pp. 18-30, 2010; and M. Shi et al., Virus Research, vol 154 pp. 7-17, 2010. Các thể phân lập PRRS Bắc Mỹ trước đó được bộc lộ trong các patent Mỹ 5,476,778 và 5,840, 563.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng có thể tạo ra dạng được làm giảm độc lực của chủng PRRSV châu Âu mà chứng tỏ được là vừa an toàn vừa hiệu quả khi được dùng cho các động vật non nhất, và không giống như nhiều vacxin PRRS hiện có khác, không vô hiệu hóa nhiều khía cạnh của các cơ chế đáp ứng miễn dịch của động vật, chẳng hạn như những khía cạnh đã nói ở trên, do đó góp phần vào sự an toàn và hiệu quả. Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, việc nuôi cấy virut PRRS rất khó khăn. Trong lịch sử, dòng tế bào thận khỉ MA-104 và các thể phát sinh của nó hầu như chỉ được sử dụng để nhân giống và làm giảm độc lực của vacxin PRRSV sống được cải biến thương mại, mặc dù không biết tại sao các tế bào này có thể hoạt động được cho mục đích này (xem patent Mỹ 5,476,778).

Việc phát hiện rằng protein bề mặt tế bào động vật có vú "CD163" được virut PRRS sử dụng theo cách tự nhiên để đi vào tế bào động vật có vú (xem ví dụ Patent Mỹ 9,102,912) đã cho phép phát triển dòng tế bào chấp nhận PRRSV mới. Bất ngờ là việc làm giảm độc lực các dòng tế bào mới hơn này thu được virut vacxin với các đặc điểm khác với các vacxin hiện có (xem Patent Mỹ 9,566,324 và công bố đơn Mỹ 2013-0309263)

Theo đó, bất ngờ phát hiện ra rằng virut PRRS châu Âu được làm thích nghi để nuôi cấy được trên (1) tế bào của lợn hoặc (2) tế bào không phải của lợn mà được đưa vào thụ thể CD163 của lợn (xem Patent Mỹ 7,754,464) giữ lại profin an toàn và hiệu quả mà có ý nghĩa với động vật là lợn hơn là profin được cung cấp bởi virut vacxin được nuôi cấy bằng phương pháp thông thường, và hơn nữa là tính miễn dịch bảo vệ có thể đạt được thậm chí ngay cả bằng việc chủng ngừa cho giai đoạn tuổi sớm. Do đó, có vẻ như sự thích nghi thông thường của PRRS để nuôi cấy trong dòng tế bào thận khỉ MA-104 (mà

biểu hiện bất thường CD163 của khỉ simian có thể liên quan đến chức năng làm sạch hemoglobin, và trong đó CD163 của khỉ simian này chỉ giống CD163 của lợn khoảng 85%) tạo ra profin an toàn/hiệu quả mà sẽ thường ít liên quan về mặt sinh học hơn và không tối ưu. Các ví dụ đại diện về CD163 của lợn được mô tả trong patent Mỹ 7,754,464 và các sáng chế đồng dạng liên quan của nó, các patent Mỹ 8,058,050; 8,486,685; và 9,102,912 (xem, ví dụ, SEQ ID: NO:14 và SEQ ID NO:2 trong đó). Như được mô tả thêm trong nhóm sáng chế đồng dạng này, khi áp dụng để thực hiện sáng chế, không nhất thiết cho tế bào biểu hiện tái tổ hợp biểu hiện CD163 chiều dài đầy đủ, miễn là polypeptit CD163 có miền xuyên màng để gắn vào màng và biểu hiện các miền được lộ ra trên bề mặt của nó, vì thế miền đầu tận C có thể không có mặt được loại bỏ.

Ngoài ra, vacxin theo sáng chế được kỳ vọng là không điều hòa giảm đáp ứng interferon của vật chủ, trong khi đó các vacxin trong tình trạng kĩ thuật như Ingelvac MLV (xem US 5,476,778 và 5,846,805) mà được làm phù hợp để được nuôi cấy trong tế bào khỉ (mà chỉ cung cấp CD163 khỉ làm thụ thể) thường thể hiện hiệu quả ức chế mạnh đáp ứng IFN-alpha của vật chủ (xem Ví dụ 5 nói chung, và Fig. 4 trong U.S. 9,566,324).

Virut PRRS thường tạo ra hầu hết các triệu chứng nghiêm trọng ở các động vật non nhất, và có thể cung cấp việc chủng ngừa vừa an toàn vừa hiệu quả cho lợn con mà chỉ mới một ngày tuổi, ví dụ, đóng góp đáng kể vào việc quản lý trong ngành công nghiệp, không chỉ giảm tỷ lệ tử vong ở lợn con non, mà còn cho phép di chuyển động vật giữa các cơ sở vào thời điểm sớm nhất có thể sau khi cai sữa.

Một khía cạnh nữa của sáng chế là đề cập đến việc công nhận rằng vacxin châu Âu trên cơ sở tế bào khỉ hiện nay có thể được cải thiện bằng cách làm các virut trong đó tái thích nghi để tăng trưởng trong tế bào thích hợp của lợn (xem phần thảo luận, ví dụ, của tế bào PK-9 dưới đây) hoặc tế bào không phải của lợn mà biểu hiện CD163 của lợn, với kết quả là vacxin đó thường an toàn hơn, và có thể gây ra đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ và lâu dài một cách an toàn ở giai đoạn tuổi nhỏ hơn nhiều. Vì thế, các yêu cầu về tính an toàn và hiệu quả điển hình đi kèm với các vacxin truyền thống mà được bào chế trong tế bào khỉ (tức là các vacxin đó chỉ được dùng lúc khoảng 3 tuần tuổi hoặc muộn hơn) có thể được giảm bớt với đặc tính được cải thiện, cũng đạt được hiệu quả ngay từ 1 ngày tuổi. Vì thế, do sự đa dạng về loại, kiểu phụ và các chủng PRRSV, nên các phương

pháp theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để cải thiện sự thích hợp và tính hiệu quả hiện nay của nhiều vacxin PRRS sống có từ trước.

Đó là vacxin PRRS typ 2 (Bắc Mỹ) có thể an toàn và hiệu quả khi được dùng trước khi cai sữa mà được thông báo trước đó liên quan đến các chủng PRRS Bắc Mỹ/châu Á (xem WO2013/173443 ở các ví dụ 9 và 10, ví dụ), cụ thể tham khảo việc làm giảm độc lực "chủng P129" của virut PRRS Bắc Mỹ (xem SEQ ID NO:6 trong đó, ví dụ, và cả PCT/IB2011/055003 và US 6,500,662). Tuy nhiên, virut PRRS châu Âu và Bắc Mỹ chỉ giống khoảng 60% về mức nucleotit, và biểu hiện theo các cách khác nhau ở một mức độ nào đó, về các loại bệnh lý quan sát được, ở các lớp động vật khác nhau (tuổi, giới tính, và các yếu tố tương tự).

Ở đây các tác giả sáng chế mô tả việc sử dụng dòng tế bào biểu hiện Cd163 của lợn để làm giảm độc lực và chọn chủng PRRSV kiểu gen 1 (châu Âu) có các đặc tính nổi bật làm vacxin.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo phương án thứ nhất, sáng chế đề cập đến phân tử polynucleotit phân lập được chứa trình tự ADN mã hóa phân tử ARN lây nhiễm mã hóa virut PRRS mà được biến đổi di truyền sao cho, với vai trò là vacxin, nó gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ hữu hiệu kháng virut PRRS ở lợn. Theo các khía cạnh nhất định, sáng chế đề cập đến trình tự ADN như được nêu ở đây bao gồm SEQ ID NO.:5. Các trình tự mã hóa mà có độ đồng nhất ít nhất 80% với SEQ ID NO:5 (và tốt hơn nữa là có độ đồng nhất 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99%) cũng có thể thực hiện được sáng chế, miễn là chúng cung cấp các đột biến quan trọng khác nhau, như được mô tả dưới đây, mà phân biệt thể phân lập này với các thể phân lập khác hoặc các chủng trước đó.

Một phương án nữa của sáng chế bao gồm các trình tự ARN tương ứng với polynucleotit ADN nêu trên, và có thể được biểu hiện từ đó, và virut thực sự mà có thể lắp ráp từ việc biểu hiện này. Các virut PRRS châu Âu được làm giảm độc lực bổ sung có thể sử dụng để thực hiện sáng chế bao gồm các virut được mã hóa bởi trình tự ADN mà lai hóa với trình tự bổ sung của trình tự ADN có SEQ ID NO:5 trong điều kiện nghiêm

ngặt cao mà bao gồm việc lai hóa để lọc ADN liên kết trong NaHPo4 0,5 M, SDS 7%, EDTA 1mM ở 65 độ C, và rửa trong 0,1 SSC/0/1%SDS ở 68 độ C.

Theo mục đích của sáng chế, "tương ứng" có nghĩa là các trình tự liên quan có thể được sắp thẳng hàng tối ưu bằng cách sử dụng thuật toán BLOSUM như được mô tả trong Henikoff et al. Proc Natl. Acad. Sci., USA, 89, pp. 10915-10919, 1992.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến plasmit bao gồm phân tử polynucleotit phân lập được như được nêu ở đây và vùng khởi đầu có khả năng phiên mã phân tử polynucleotit trong tế bào chủ thích hợp. Theo một phương án, trình tự mã hóa PRRSV châu Âu của plasmit ở đây còn mã hóa một hoặc nhiều epitop kháng nguyên khác loại có thể phát hiện. Sáng chế đề cập đến tế bào chủ được chuyển nhiễm mà bao gồm plasmit được nêu ở đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vacxin để bảo vệ lợn không bị nhiễm virut PRRS. Vacxin có thể bao gồm virut PRRS châu Âu được mã hóa bởi phân tử ARN lây nhiễm, phân tử ARN lây nhiễm này, mỗi phân tử được mã hóa bởi phân tử polynucleotit phân lập được như được nêu ở đây. Theo một khía cạnh khác, vacxin bao gồm plasmit hoặc vectơ virut bao gồm polynucleotit theo sáng chế. Vacxin được nêu ở đây có thể tùy ý bao gồm chất mang vacxin có thể chấp nhận sử dụng trong thú y. Theo một khía cạnh quan trọng, vacxin có tác dụng ức chế interferon-α giảm so với virut châu Âu kiểu dại và các vacxin sẵn có khác.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến bộ kit chẩn đoán bao gồm các phân tử polynucleotit mà phân biệt (còn được gọi là thử nghiệm DIVA) lợn bị nhiễm tự nhiên bởi chủng virut PRRS trên thực địa và lợn được chủng ngừa bằng vacxin sống được cải biến được nêu ở đây.

Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bảo vệ động vật là lợn không bị lây nhiễm chủng virut PRRS, bao gồm việc dùng cho động vật này lượng bảo vệ theo cách sinh miễn dịch của vacxin được yêu cầu bảo hộ ở đây.

Sáng chế cũng đề cập đến plasmit có khả năng chuyển nhiễm trực tiếp tế bào chủ thích hợp và biểu hiện virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome - PRRS) từ tế bào chủ thích hợp được chuyển

nhiễm, mà plasmit bao gồm: (a) trình tự ADN mã hóa phân tử ARN lây nhiễm mã hóa virut PRRS, và (b) vùng khởi đầu có khả năng phiên mã phân tử ARN lây nhiễm này.

Theo các phương án được ưu tiên khác, plasmit này chứa vùng khởi đầu mà là vùng khởi đầu nhân chuẩn có khả năng cho phép ADN khởi động trong tế bào nhân chuẩn mục tiêu, hoặc vùng khởi đầu nhân sơ hoặc thể thực khuẩn có khả năng trực tiếp phiên mã in vitro plasmit. Sáng chế tương tự đề cập đến phương pháp tạo ra virut PRRS, là phương pháp này bao gồm bước chuyển nhiễm tế bào chủ thích hợp với plasmit thích hợp và thu được virut PRRS được tạo ra bằng tế bào được chuyển nhiễm.

Sáng chế cũng đề cập đến tế bào chủ được chuyển nhiễm với phân tử polynucleotit và tạo ra vacxin để bảo vệ lợn chống lây nhiễm virut PRRS, mà vacxin này bao gồm: (a) virut PRRS châu Âu được biến đổi di truyền được mã hóa bởi các phân tử polynucleotit nêu trên, hoặc (b) phân tử lây nhiễm, hoặc (c) phân tử polynucleotit này ở dạng plasmit, hoặc (d) vectơ virut chứa phân tử polynucleotit này, trong đó virut PRRS có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ hữu hiệu chống lây nhiễm virut PRRS, với lượng hữu hiệu để tạo ra sự bảo vệ miễn dịch chống lây nhiễm, và chất mang thích hợp để sử dụng trong thú y.

Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS) châu Âu, trong đó phương pháp này bao gồm việc chuyển nhiễm tế bào chủ nhân chuẩn thích hợp với thành phần được chọn từ nhóm bao gồm:

(a) plasmit chứa (1) trình tự ADN mã hóa phân tử ARN lây nhiễm mã hóa virut PRRS châu Âu, trong đó trình tự ADN mã hóa này là SEQ ID: NO:5, hoặc trình tự ADN mã hóa mà đồng nhất ít nhất 85% với SEQ ID NO:5, và (2) vùng khởi đầu có khả năng điều khiển quá trình phiên mã của trình tự ADN này mã hóa phân tử ARN lây nhiễm này trong tế bào chủ thích hợp; và

(b) phân tử ARN của virut PRRS lây nhiễm được tạo ra từ quá trình phiên mã in vitro của plasmit chứa trình tự ADN mã hóa phân tử ARN của virut PRRS lây nhiễm này mã hóa virut PRRS châu Âu, trong đó trình tự ADN mã hóa này là SEQ ID: NO:5, hoặc trình tự ADN mã hóa mà tương đồng ít nhất 85% với SEQ ID NO:5,

trong đó, đối với các trường hợp (a) và (b) trình tự mã hóa được sử dụng là trình tự tương đồng ít nhất 85% với SEQ ID NO:5 và chứa một hoặc nhiều đột biến cụ thể so với trình tự tham chiếu.

Trong các ví dụ ưu tiên, cả hai việc chủng ngừa bảo vệ và an toàn có thể được tạo ra cho lợn con (đực lẫn cái) trong một liều nhỏ hơn một ngày tuổi, như 8-16 giờ sau khi sinh, đến hai tuần tuổi, hoặc ba tuần tuổi, có tính đến việc lợn con có thể được cai sữa ở thời điểm bất kỳ từ khoảng hai đến ba tuần tuổi. Vì thế sáng chế thường có thể áp dụng để chủng ngừa sớm bằng một liều, có nghĩa là tại thời điểm bất kỳ vào ngày tuổi đầu tiên (từ lúc sinh đến 24 giờ tuổi), tương tự vào ngày 2, ngày 3, ngày 4, ngày 5, ngày 6, ngày 7, các ngày 1-10, các ngày 1-14, và ngày 1-21, hoặc việc chủng ngừa đơn giản mà được thực hiện sớm hơn khoảng ngày cai sữa. Hai hoặc nhiều liều có thể tùy ý được sử dụng.

Việc chủng ngừa sớm (thường là bằng đường trong cơ hoặc trong mũi) chống lại virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV) trong các điều kiện này cũng dẫn đến việc khởi phát sớm tính miễn dịch bảo vệ, như khoảng tám tuần tuổi; hoặc từ khoảng hai đến sáu tuần sau khi chủng ngừa; và thường khoảng 28 ngày sau khi chủng ngừa.

Việc chủng ngừa theo cách thực hành sáng chế thường tạo ra khoảng thời gian miễn dịch cho lợn con là khoảng 23-28 tuần, thường là ít nhất khoảng 26 tuần, là toàn bộ vòng đời dự kiến của lợn thương phẩm. Vì thế chương trình vacxin có thể thực hiện bởi sáng chế bảo vệ cho lợn con khi chúng dễ bị lây nhiễm nhất và dễ xử lý nhất. Việc chủng ngừa này cho phép bắt đầu sự miễn dịch trùng hợp với thời điểm lợn con đã cai sữa được tách khỏi lợn nái, và có thể được vận chuyển đến các cơ sở khác nơi có thể có nhiều nguy cơ lây nhiễm PRRSV. Vacxin theo sáng chế cũng có hiệu quả cao trong việc bảo vệ lợn đực; và lợn nái và lợn nái hậu bị, vì thế gián tiếp bảo vệ thế hệ con cháu chưa được sinh ra. Mặc dù việc chủng ngừa trong cơ và trong mũi được dự tính là ưu tiên, nhưng các đường dùng khác khác cũng được áp dụng.

Trong một ví dụ của sáng chế, mặc dù ít được ưu tiên hơn, polypeptit CD163 được biểu hiện bằng tế bào tái tổ hợp trong đó virut PRRS châu Âu được nuôi cấy (và vì thế được làm thích nghi lại để lây nhiễm và tăng trưởng ở động vật là lợn) không phải là CD163 của lợn, mà đúng hơn là CD163 của động vật có vú có trình tự axit amin mà

tương đối gần trình tự của lợn, chẳng hạn tương đồng ít nhất 90% với SEQ ID NOS 2 hoặc 14 của U.S. 7,754,464. Tốt hơn là, độ tương đồng axit amin là 92%, 95%, 96%,97%, 98% hoặc 99%.

Sáng chế cũng đề cập đến bộ kit chẩn đoán bao gồm phân tử polynucleotit mà phân biệt lợn bị nhiễm một cách tự nhiên chủng virut PRRS trên thực địa và lợn được chủng ngừa bằng vacxin theo sáng chế, mà vacxin (virut) tốt hơn là chứng tỏ có tác dụng ức chế interferon-α giảm so với kiểu dại.

Sáng chế cũng đề cập đến trình tự toàn bộ hệ gen điển hình của PRRSV có nguồn gốc từ thể phân lập PRRSV châu Âu (Bỉ) 96V198. Chính thể phân lập 96V198 được Giáo sư Hans Nauwynck, Ghent University, Belgium, thu được vào năm 1996 từ phổi của lợn con có các dấu hiệu hô hấp (đời cấy chuyền 0 vì thế được thu hồi từ huyết thanh của lợn bị nhiễm (SEQ ID NO:1).

Đời cấy chuyền 1 (SEQ ID NO:2) là kết quả của một lần cấy chuyền trên đại thực bào phế nang sơ cấp của lợn (primary porcine alveolar macrophages - PAMs). Tất cả các lần cấy chuyền sau đó được thực hiện trên dòng tế bào BHK21-C12-26. Đời cấy chuyền 9 (SEQ ID NO:3) là ngay trước khi tạo dòng sinh học virut bằng ba chu trình pha loãng giới hạn. Đời cấy chuyền 14 (SEQ ID NO:4) là dòng 1 (trong sáu dòng được kiểm tra và đánh giá). Dòng 1 được tiếp tục trở thành chủng virut giống gốc ở đời cấy chuyền 44, và các đời cấy chuyền MSV+5 trở thành sản phẩm Suvaxyn® PRRS MLV ở đời cấy chuyền 49 (SEQ ID NO:5). Toàn bộ hệ gen có chiều dài 15092 nt. Toàn bộ hệ gen có độ tương đồng ít nhất 99,5% với nhau, là độ tương đồng khoảng 92% với virut Lelystad.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện trình tự nucleotit chiều dài đầy đủ (15092 bazơ) của thể phân lập đời cấy chuyền 49 đối với sản phẩm PRRS MLV Suvaxyn®, SEQ ID NO:5.

Mô tả vắn tắt danh mục trình tự

SEQ ID NO:1 cung cấp đời cấy chuyền 0 của thể phân lập PRRSV 96V198.

SEQ ID NO:2 cung cấp đời cấy chuyền 1 của thể phân lập PRRSV 96V198.

SEQ ID NO:3 cung cấp đời cấy chuyền 9 của thể phân lập PRRSV 96V198.

SEQ ID NO:4 cung cấp đời cấy chuyền 14 của thể phân lập PRRSV 96V198.

SEQ ID NO:5 cung cấp đời cấy chuyền 49 của thể phân lập PRRSV 96V198.

SED ID NOS: 6-8 cung cấp trình tự mồi PCR.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng trong bản mô tả này và trong các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo, các dạng số ít "một" và dạng xác định bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi được định nghĩa một cách rõ ràng trong nội dung đó theo cách khác. Vì thế, ví dụ, khi nói đến "phương pháp" bao gồm một hoặc nhiều phương pháp, và/hoặc bước thuộc loại được mô tả trong đó sẽ trở nên hiển nhiên với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này khi đọc phần mô tả này và tương tự.

Trừ khi được xác định khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả có cùng nghĩa như thường được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực của sáng chế này. Mặc dù các phương pháp và vật liệu tương tự hoặc tương đương với các phương pháp và vật liệu được mô tả trong bản mô tả có thể được dùng để thực hành hoặc thử nghiệm sáng chế, các phương pháp và vật liệu được ưu tiên sẽ được mô tả dưới đây.

Việc thực hành sáng chế sẽ sử dụng, trừ khi trừ khi có chỉ dẫn ngược lại một cách cụ thể, các phương pháp thông thường về virut học, miễn dịch học, vi sinh vật học, sinh học phân tử và kỹ thuật ADN tái tổ hợp theo kỹ năng trong lĩnh vực này, nhiều phương pháp trong số này được mô tả dưới đây nhằm mục đích minh họa. Các kỹ thuật như vậy được giải thích đầy đủ trong tài liệu. Xem, *ví dụ*, Sambrook, *et al*. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Maniatis *et al*. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotit Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984).

"Virut PRRS Bắc Mỹ" có nghĩa là virut PRRS có đặc điểm di truyền đi kèm với thể phân lập virut PRRS Bắc Mỹ, chẳng hạn, nhưng không giới hạn ở virut PRRS mà lần

đầu được phân lập ở Mỹ khoảng đầu những năm 1990 (xem, ví dụ, Collins, J. E., et al., 1992, J. Vet. Diagn. Invest. 4:117-126); North American PRRS virus isolate MN-1b (Kwang, J. et al., 1994, J. Vet. Diagn. Invest. 6:293-296); the Quebec LAF-exp91 strain of PRRS (Mardassi, H. et al., 1995, Arch. Virol. 140:1405-1418); and North American PRRS virus isolate VR 2385 (Meng, X.-J et al., 1994, J. Gen. Virol. 75:1795-1801). Đặc điểm di truyền để chỉ độ tương tự của trình tự nucleotit hệ gen và độ tương tự của trình tự axit amin chung nhau giữa các chủng virut PRRS Bắc Mỹ. Các chủng virut PRRS châu Á thường có độ đồng nhất là 80-95% về trình tự nucleotit với chủng Bắc Mỹ (xem các giá trị mặc định đối với thuật toán Clustal W trong bộ phần mềm Lasergene, DNASTAR, Inc.), và các chủng Bắc Mỹ có độ tương tự là giống nhau khoảng 85% đến 100%.

"Virut PRRS châu Âu" (PRRSV-1, hoặc trước đây là PRRSV Typ 1) để chỉ chủng virut PRRS bất kỳ có đặc điểm di truyền đi kèm với virut PRRS mà lần đầu tiên được phân lập ở châu Âu vào khoảng năm 1991 (xem ví dụ, Wensvoort, G., et al., 1991, Vet. Q. 13:121-130, the Lelystad virus, cũng xem các patent Mỹ 5,620,691 and 6,197,310). Virut PRRS châu Âu thường để chỉ các virut có trình tự nucleotit chiều dài đầy đủ mà giống khoảng 80% hoặc cao hơn với thể phân lập Lelystad. Nên lưu ý là trong PRRSV-1, các kiểu phụ dần dần được nhận biết, do đó virut Lelystad được xác định là kiểu gốc đối với kiểu phụ 1, và virut Lena (U. Karniychuk et al., BMC Veterinary Research, 2010, Vol 6, No. 30) được xác định là kiểu gốc của kiểu phụ 3. Hai virut này gần như mở rộng sự lan tỏa tối đa hiện nay của PRRSV-1, và vì thế, ví dụ, bằng cách sử dụng ORF5, độ tương đồng của Lelystad và Lena là khoảng 82,8% về mức nucleotit, và bằng cách sử dụng hệ gen đầy đủ, Lelystad và Lena có độ tương đồng khoảng 80,7% về mức nucleotit. Việc tối ưu hóa sắp thẳng hàng thay đổi một chút dựa trên các thông số của thuật toán, nhưng người đọc thường tham chiếu đến các giá trị mặc định đối với thuật toán Clustal W trong bộ phần mềm Lasergene (DNASTAR, Inc.).

Các chủng PRRSV châu Âu thường chỉ đồng nhất khoảng 60% với cả chủng Bắc Mỹ và châu Á (Trung Quốc). Ví dụ, bằng cách sử dụng trình tự nucleotit ORF5 (mà có xu hướng đưa ra ước tính từ khá đến tốt cho toàn bộ hê gen khi toàn bộ hệ gen là chưa biết), virut Lelystad kiểu gốc PRRSV-1 và chủng VR2332 kiểu gốc Bắc Mỹ có độ đồng nhất khoảng 65,0% về mức nucleotit. Bằng cách sử dụng trình tự hệ gen đầy đủ, virut

Lelystad kiểu gốc và virut VR2332 kiểu gốc có độ đồng nhất khoảng 58,6% về mức nucleotit, một lần nữa bằng cách sử dụng các giá trị mặc định cho thuật toán Clustal W đã nêu.

"Đáp ứng miễn dịch bảo vệ hữu hiệu", "bảo vệ miễn dịch", và các thuật ngữ tương tự, nhằm các mục đích của sáng chế, có nghĩa là đáp ứng miễn dịch mà được hướng đến một hoặc nhiều epitop kháng nguyên của mầm bệnh để bảo vệ chống lây nhiễm bởi mầm bệnh ở động vật được chủng ngừa. Đối với các mục đích của sáng chế, việc bảo vệ chống lây nhiễm bởi mầm bệnh bao gồm nhưng không giới hạn ở việc ngăn ngừa tuyệt đối, nhưng cũng có thể giảm ở mức có thể phát hiện được bất kỳ về mức độ hoặc tỷ lệ lây nhiễm bởi mầm bệnh, hoặc giảm ở mức có thể phát hiện được bất kỳ về tính nghiêm trọng của bệnh hoặc triệu chứng hoặc tình trạng bệnh bất kỳ do việc lây nhiễm mầm bệnh ở động vật được chủng ngừa so với động vật bị nhiễm không được chủng ngừa. Đáp ứng miễn dịch bảo vệ hữu hiệu có thể được cảm ứng ở động vật màtrước đó chưa bị nhiễm mầm bệnh và/hoặc không bị nhiễm mầm bệnh tại thời điểm chủng ngừa. Đáp ứng miễn dịch bảo vệ hữu hiệu cũng có thể được cảm ứng ở động vật mà đã bị nhiễm mầm bệnh tại thời điểm chủng ngừa.

Virut PRRS được biến đổi di truyền "được làm giảm độc lực" nếu nó ít độc lực hơn chủng ban đầu chưa được biến đổi. Một chủng là "ít độc lực hơn" nếu nếu nó cho thấy sự giảm đáng kể về mặt thống kê về một hoặc nhiều thông số xác định tính nghiêm trọng của bệnh. Các thông số này bao gồm mức nhiễm virut trong máu, sốt, tính nghiêm trọng của suy hô hấp, tính nghiêm trọng của hội chứng sinh sản, hoặc số lượng hoặc mức nghiêm trọng của tổn thương phổi, v.v.

"Tế bào chủ có khả năng hỗ trợ quá trình sao chép của virut PRRS" có nghĩa là tế bào mà có khả năng tạo ra PRRS lây nhiễm khi bị nhiễm virut theo sáng chế. Các tế bào như vậy bao gồm tế bào của lợn của dòng bạch cầu đơn nhân/đại thực bào như tế bào đại thực bào phế nang của lợn và các dẫn xuất, tế bào thận khỉ MA-104 và các dẫn xuất như tế bào MARC-145; và các tế bào được chuyển nhiễm với gen mã hóa thụ thể đối với virut PRRS (xem patent Mỹ 9,102,912 đề cập đến việc sắp xếp protein bề mặt CD163 động vật có vú như thụ thể tế bào virut PRRS bình thường). Thuật ngữ "tế bào chủ có thể hỗ trợ quá trình sao chép của virut PRRS" cũng bao gồm tế bào trong cơ thể lợn sống.

"Khung đọc mở", hoặc "ORF", như được sử dụng ở đây, có nghĩa là trình tự nucleotit tối thiểu cần để mã hóa protein virut PRRS cụ thể mà không cần sự can thiệp của codon kết thúc.

"Lợn" và "heo" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này và để chỉ động vật bất kỳ mà là thành viên thuộc họ *Suidae* như, ví dụ, lợn. Vacxin và phương pháp theo sáng chế có thể áp dụng cho tất cả các loại lợn, dù là đực ở mọi độ tuổi, hoặc cái ở mọi độ tuổi bao gồm lợn nái và lợn nái hậu bị, và các phương pháp như vậy có thể bảo vệ lợn con đực và cái một cách gián tiếp thông qua việc bảo vệ bằng cách dùng cho lợn nái mẹ. Thuật ngữ "virut PRRS", như được sử dụng ở đây, trừ khi được quy định khác, có nghĩa là chủng virut PRRS Bắc Mỹ, châu Á hoặc châu Âu bất kỳ.

"PRRS" bao gồm các triệu chứng bệnh ở lợn gây ra do việc lây nhiễm virut PRRS (PRRSV). Các ví dụ về các triệu chứng như vậy bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, sốt, sảy thai ở các con cái mang thai, suy hô hấp, tổn thương phổi, mất cảm giác thèm ăn, và tử vong ở lợn con. Như được sử dụng ở đây, virut PRRS mà "không có khả năng gây ra PRRS" để chỉ virut mà có thể lây nhiễm vào lợn, nhưng không tạo ra các triệu chứng bệnh thường đi kèm với việc lây nhiễm PRRS ở lợn.

"Tế bào chủ được chuyển nhiễm" thực tế là có nghĩa là tế bào chủ bất kỳ mà, khi được chuyển nhiễm với ARN của virut PRRS, có thể tạo ra chu trình virion PRRS thứ nhất.

"Phân tử ADN lây nhiễm", theo mục đích của sáng chế, là phân tử ADN mà mã hóa các yếu tố cần thiết để hỗ trợ quá trình, phiên mã, và dịch mã thành virion chức năng từ tế bào chủ thích hợp.

Tương tự như vậy, "phân tử polynucleotit phân lập được" để chỉ thành phần chứa phân tử polynucleotit theo sáng chế được tinh chế hoặc được kiểm soát đến mức có thể phát hiện so với trạng thái có trong tự nhiên của nó, nếu có.

Đối với các mục đích của sáng chế, trình tự nucleotit của phân tử polynucleotit thứ hai (ARN hoặc ADN) là "tương đồng" với trình tự nucleotit của phân tử polynucleotit thứ nhất, hoặc có "độ đồng nhất" với phân tử polynucleotit thứ nhất, trong đó trình tự nucleotit của phân tử polynucleotit thứ hai mã hóa polyaxit amin giống như trình tự

nucleotit của phân tử polynucleotit thứ nhất dựa trên sự thoái hóa của mã di truyền, hoặc khi nó mã hóa polyaxit amin mà đủ tương tự với polyaxit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit của phân tử polynucleotit thứ nhất để có thể sử dụng trong thực hành sáng chế. Trình tự polynucleotit tương đồng cũng để chỉ các mạch có nghĩa và đối nghĩa, và trong tất cả các trường hợp để chỉ mạch bổ sung với mạch bất kỳ. Theo mục đích của sáng chế, phân tử polynucleotit có thể sử dụng để thực hành sáng chế, và vì thế tương đồng hoặc có độ tương tự, trong đó nó có thể được sử dụng làm mẫu dò chẩn đoán để phát hiện sự có mặt của virut PRRS hoặc polynucleotit virut trong mẫu dịch lỏng hoặc mẫu mô của lợn bị nhiễm, ví dụ bằng kỹ thuật lai hóa tiêu chuẩn hoặc bằng kỹ thuật khuếch đại. Nói chung, trình tự nucleotit của phân tử polynucleotit thứ hai tương đồng với trình tự nucleotit của phân tử polynucleotit thứ nhất nếu nó có độ đồng nhất về trình tự nucleotit ít nhất là khoảng 70% với trình tự nucleotit của phân tử polynucleotit thứ nhất khi dựa trên thuật toán BLASTN (Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia - National Center for Biotechnology Information, hoặc còn được gọi là NCBI, (Bethesda, Maryland, USA) của Viện Sức khỏe quốc gia Hoa Kỳ). Trong một ví dụ cụ thể để tính toán theo việc thực hành sáng chế, tham khảo BLASTP 2.2.6 [Tatusova TA and TL Madden, "trình tự BLAST 2- công cụ mới để so sánh trình tự protein và nucleotit." (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250.]. Vắn tắt, hai trình tự axit amin được sắp thẳng hàng để tối ưu hóa điểm số sắp thẳng hàng bằng cách sử dụng điểm phạt hở khoảng trống là 10, điểm phạt mở rộng khoảng trống là 0,1, và ma trận tính điểm "blosum62" của Henikoff và Henikoff (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:10915-10919. 1992). Tỷ lệ % độ đồng nhất sau đó được tính như sau: Tổng số trùng khớp x 100/chia cho chiều dài của trình tự dài hơn + số khoảng trống được đưa vào trình tự dài hơn để sắp thẳng hàng hai trình tự.

Tốt hơn là một trình tự nucleotit tương đồng có độ đồng nhất về trình tự nucleotit ít nhất khoảng 75%, còn tốt hơn nữa là độ đồng nhất về trình tự nucleotit ít nhất là khoảng 80%, 85%, 90% 95%, 96%, 97%, 98% và 99%. Do mã di truyền có tính thoái hóa, trình tự nucleotit tương đồng có thể bao gồm số lượng thay đổi bazơ "im lặng" bất kỳ, tức là việc thay thế nucleotit dù sao vẫn mã hóa cho cùng axit amin.

Một trình tự nucleotit tương đồng có thể còn chứa các đột biến không im lặng, tức là thay thế, bớt hoặc thêm bazơ dẫn đến sự khác biệt về axit amin trong polyaxit amin

được mã hóa, miễn là trình tự này vẫn giữ được độ đồng nhất 70% với polyaxit amin được mã hóa bởi trình tự nucleotit thứ nhất hoặc hoặc nếu không thì cũng hữu ích cho việc thực hành sáng chế.

Liên quan đến vấn đề này, việc thay thế axit amin bao toàn nhất định có thể được thực hiện mà thường được công nhận là không làm bất hoạt chức năng protein tổng thể: chẳng hạn như liên quan đến các axit amin tích điện dương (và ngược lại), lysin, arginin và histidin; liên quan đến các axit amin tích điện âm (và ngược lại), axit aspartic và axit glutamic; và liên quan đến các nhóm axit amin trung tính (và trong tất cả các trường hợp, và cũng ngược lại), (1) alanin và serin, (2) asparagin, glutamin, và histidin, (3) xystein và serin, (4) glyxin và prolin, (5) isoleuxin, leuxin và valin, (6) metionin, leuxin và isoleuxin, (7) phenylalanin, metionin, leuxin, và tyrosin, (8) serin và threonin, (9) tryptophan và tyrosin, (10) và ví dụ tyrosin, tyrptophan và phenylalanin. Các axit amin có thể được phân loại theo các đặc tính vật lý và sự đóng góp vào cấu trúc protein bậc hai hoặc bậc ba. Việc thay thế bảo toàn được công nhận trong lĩnh vực là việc thay thế một axit amin thành một axit amin khác có đặc tính tương tự. Các thay thế bảo toàn được lấy làm ví dụ có thể được tìm thấy trong WO 97/09433, trang 10, được công bố và 13.3. 1997 (PCT/GB96/02197, được nộp ngày 6/9/1996. Theo cách khác, các axit amin bảo toàn có thể được nhóm lại như được mô tả trong Lehninger, (Biochemistry, Second Edition; Worth Publishers, Inc. NY:NY (1975), pp. 71-77). Các thay đổi bảo toàn thích hợp bổ sung và việc ứng dụng chúng được mô tả dưới đây.

Các trình tự nucleotit tương đồng có thể được xác định bằng cách so sánh trình tự nucleotit, ví dụ bằng cách sử dụng BLASTN, như trên. Theo cách khác, trình tự nucleotit tương đồng có thể được xác định bằng cách lai hóa trong các điều kiện được chọn. Ví dụ, trình tự nucleotit của phân tử polynucleotit thứ hai tương đồng với SEQ ID NO:5 (hoặc trình tự polynucleotit cụ thể khác bất kỳ) nếu nó lai hóa với trình tự bổ sung của SEQ ID NO:5 trong điều kiện nghiêm ngặt vừa phải, ví dụ, lai hóa với ADN được liên kết với vật liệu lọc trong $NaHPO_4$ 0,5 M, natri dodexyl sulfat 7% (SDS), EDTA 1 mM ở 65°C, và rửa trong SSC 0,2x/SDS 0,1% ở 42°C (xem nhà xuất bản Ausubel et al, Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons, 1994, pp. 6.0.3 to 6.4.10), hoặc các điều kiện mà mặt khác sẽ dẫn đến việc lai hóa các trình tự mã hóa virut PRRS như được xác định dưới

đây. Các biến đổi trong các điều kiện lai hóa có thể được xác định theo kinh nghiệm hoặc được tính toán chính xác dựa trên chiều dài và tỷ lệ % của việc bắt cặp bazơ guanosin/xytosin (GC) của mẫu dò. Các điều kiện lai hóa có thể được tính toán như được mô tả trong Sambrook, *et al.*, (Eds.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York (1989), pp. 9.47 to 9.51.

Theo một phương án khác, trình tự nucleotit thứ hai tương đồng với SEQ ID NO:5 (hoặc trình tự khác bất kỳ của sáng chế) nếu nó lai hóa với trình tự bổ sung của SEQ ID NO:5 trong điều kiện nghiêm ngặt cao, ví dụ lai hóa với ADN được liên kết với vật liệu lọc trong $NaHPO_4$ 0,5 M, SDS 7%, EDTA 1 mM ở 65°C, và rửa trong SSC0,1x/SDS 0,1% ở 68°C, như đã biết trong lĩnh vực này (Ausebel et al. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1989.

Ngoài ra nên hiểu rằng phân tử polynucleotit phân lập được và phân tử ARN phân lập được theo sáng chế bao gồm cả phân tử tổng hợp và phân tử thu được bằng kỹ thuật tái tổ hợp, như bằng tách dòng in vitro và phiên mã.

Các phân tử polynucleotit có thể được tạo đột biến di truyền bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp đã biết với người có kiến thức trung bình trong lĩnh vực này, bao gồm đột biến định hướng điểm, hoặc bằng cách đột biến ngẫu nhiên như bằng cách tiếp xúc với các hóa chất gây đột biến hoặc với bức xạ, như đã biết trong lĩnh vực". Đột biến có thể được thực hiện bằng các phương pháp chuẩn đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ đột biến định hướng điểm (xem ví dụ Sambrook et al.(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) của các bản sao lây nhiễm như đã được mô tả (ví dụ Meulenberg et al., Adv. Exp. Med. Biol., 1998, 440:199-206).

Liên quan đến việc cung cấp các trình tự virut PRRS châu Âu ưu tiên mà vừa an toàn vừa hiệu quả khi được dùng cho lợn con trước khi cai sữa, sau đây là một trong những vị trí axit amin có thể được biến đổi. Trong việc xác định các đột biến cụ thể này, tất nhiên lưu ý rằng các thay thế bảo toàn đối với các gốc axit amin được ưu tiên này, như được xác định ngay trên đây, cũng có thể được sử dụng. Trong việc xác định các axit amin được mã hóa ưu tiên, các axit amin tương ứng/ban đầu của thể phân lập kiểu dại của

chủng 96V198 cũng được thể hiện bằng dấu ngoặc đơn, vì thế đời cấy chuyền 0 (SEQ ID NO:1) được so sánh với đời cấy chuyền 49 (nguyên liệu vacxin được ưu tiên, SEQ ID NO:5). Vì thế, đối với trình tự axit amin được mã hóa từ ORF1a, S ở vị trí axit amin 19 (N); Y ở vị trí axit amin 24 (F); A ở vị trí axit amin 156 (T); Y ở vị trí axit amin 157 (H); D ở vị trí axit amin 268 (N); H at vị trí axit amin 294 (Y); Y at vị trí axit amin 416 (C); S at vị trí axit amin 742 (P); L ở vị trí axit amin 884 (F); P ở vị trí axit amin 908 (S); K ở vị trí axit amin 916 (E); K ở vị trí axit amin 977 (E); S ở vị trí axit amin 1138 (P); F ở vị trí axit amin 1160 (L); S ở vị trí axit amin 1500 (P); R ở vị trí axit amin 2094 (Q); P ở vị trí axit amin 2254 (S); và L ở vị trí axit amin 2290 (F). Đối với trình tự axit amin được mã hóa từ ORF1b, S ở vị trí axit amin 567 (N); và H ở vị trí axit amin 912 (Q). Đối với trình tự axit amin được mã hóa từ ORF2a, L ở vị trí axit amin 22 (S); F ở vị trí axit amin 88 (V); M ở vị trí axit amin 94 (I); và F ở vị trí axit amin 95 (L). Đối với trình tự axit amin được mã hóa từ ORF2b, L ở vị trí axit amin 47 (F). Đối với trình tự axit amin được mã hóa từ ORF3, S ở vị trí axit amin 52 (T). Đối với trình tự axit amin được mã hóa từ ORF4, T ở vị trí axit amin 151 (I). Đối với trình tự axit amin được mã hóa từ ORF5, F ở vị trí axit amin 20 (L); và D ở vị trí axit amin 37 (N). Đối với trình tự axit amin được mã hóa từ ORF5a, V ở vị trí axit amin 18 (A); và R ở vị trí axit amin 35 (Q).

Do đó, sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra virut PRRS châu Âu được biến đổi di truyền, mà phương pháp này bao gồm bước gây đột biến trình tự ADN mã hóa phân tử ARN lây nhiễm mà mã hóa virut PRRS như được mô tả ở trên, và biểu hiện virut PRRS được biến đổi di truyền bằng cách sử dụng hệ thống biểu hiện thích hợp. Virut PRRS được biến đổi di truyền có thể được biểu hiện từ phân tử polynucleotit phân lập được bằng cách sử dụng hệ thống biểu hiện thích hợp thường đã biết trong lĩnh vực này, các ví dụ về các hệ thống này được mô tả trong đơn sáng chế này. Ví dụ, phân tử polynucleotit phân lập được có thể ở dạng plasmit có thể biểu hiện virut được mã hóa trong tế bào chủ thích hợp in vitro, như được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Trình tự protein N của PRRSV Bắc Mỹ được bảo toàn cao và các trình tự được thông báo có độ đồng nhất khoảng từ 93-100% với nhau. Protein N của PRRSV Bắc Mỹ và châu Âu có độ đồng nhất khoảng 57-59% và chung nhau các motif cấu trúc thông thường. Nói chung, khi so sánh các thể phân lập và trình tự mã hóa PRRS, mà có thể

được đánh số khác nhau do các nucleotit hoặc các axit amin được mã hóa cụ thể, việc nhận biết các vùng thích hợp dễ dàng đạt được bằng việc nhận biết các axit amin đặc trưng bảo toàn ở chủng PRRS quan tâm và sắp thẳng hàng nó với chủng tham chiếu.

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp bao gồm các kỹ thuật sinh học phân tử cực kỳ đa dạng và hiệu quả nhằm mục đích biến đổi axit nucleic ở mức ADN và làm cho có thể phân tích và cải biến hệ gen ở mức phân tử. Riêng về mặt này, các virut như virut PRRS do kích thước khiêm tốn của bộ gen của nó đặc biệt phù hợp với các thao tác như vậy. Tuy nhiên, công nghệ ADN tái tổ hợp không được áp dụng ngay lập tức đối với các virus RNA không phải retrovirut do các virut này không bao gồm bước trung gian ADN trong quá trình sao chép của chúng. Đối với các virut này, các dòng cADN phải được phát triển trước khi kỹ thuật ADN tái tổ hợp có thể được áp dụng cho hệ gen của chúng để tạo ra virut được cải biến. Các dòng lây nhiễm có thể có nguồn gốc từ việc tạo cấu trúc cADN chiều dài đầy đủ (chiều dài hệ gen) (ở đây được sử dụng với nghĩa rộng về bản sao ADN của ARN và không chỉ với nghĩa hẹp về bản sao ADN của mARN) của virut trong nghiên cứu, sau đó các sản phẩm phiên mã lây nhiễm được tổng hợp *in vivo* trong tế bào được chuyển nhiễm với cADN có chiều dài đầy đủ, nhưng các sản phẩm phiên mã lây nhiễm cũng có thể thu được bằng quá trình phiên mã *in vitro* từ cADN có chiều dài đầy đủ trong plasmit có vùng khởi đầu nhân sơ với sự có mặt của hỗn hợp phiên mã, hoặc một lần nữa *in vitro* bằng cách sử dụng các mảnh cADN có chiều dài một phần được nối mà bao gồm hệ gen đầy đủ của virut. Trong tất cả các trường hợp, các ARN đã phiên mã mang các biến đổi mà được đưa vào cADN và có thể được sử dụng để cấy chuyền tiếp virut đã biến đổi.

Việc tạo ra dòng lây nhiễm của thể phân lập virut PRRS châu Âu hoặc virut Lelystad được mô tả trong patent Mỹ số 6,268,199 mà kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Việc tạo ra dòng cADN lây nhiễm của thể phân lập virut PRRS Bắc Mỹ được đặt tên là P129 (Lee *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2004) được mô tả trong patent Mỹ số 6,500,662 mà kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Trình tự của cADN P129 được bộc lộ trong Số truy cập GenBank AF494042 và trong patent Mỹ số 6,500,662. Dưới đây là việc sử dụng một dòng lây nhiễm như vậy trong phạm vi plasmit được biểu hiện bởi vùng khởi đầu rất sớm CMV và được gọi là pCMV-S-P129 và cũng được bộc lộ

trong patent Mỹ số 6,500,662. Như được mô tả trong patent Mỹ số 6,500,662 đây là các plasmit và vùng khởi đầu khác thích hợp để sử dụng ở đây.

Với trình tự hoàn chỉnh của khung đọc mở quan tâm bất kỳ và vị trí của gốc axit amin quan tâm, người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này chỉ cần tham khảo bảng codon để thiết kế các thay đổi ở vị trí cụ thể quan tâm.

Các codon cấu thành chuỗi bộ ba nucleotit trong mARN và phân tử cADN tương đương của chúng. Các codon được đặc trưng bởi bazơ uraxil (U) khi có mặt trong phân tử mARN nhưng được đặc trưng bởi bazơ thymidin (T) khi có mặt trong ADN. Một thay đổi đơn giản trong codon đối với cùng gốc axit amin trong polynucleotit sẽ không làm thay đổi trình tự hoặc cấu trúc của polypeptit được mã hóa. Rõ ràng là khi một cụm từ nói rằng một trình tự 3 nucleotit cụ thể "mã hóa" axit amin bất kỳ, người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng bảng trên cung cấp một phương tiện để xác định nucleotit cụ thể đang gặp vấn đề. Bằng cách ví dụ, nếu một trình tự ba nucleotit cụ thể mã hóa lysin, bảng trên mô tả rằng hai trình tự bộ ba là AAA và AAG. Glyxin được mã hóa bởi GGA, GGC, GGT (GGU nêu trong ARN) và GGG. Để thay đổi gốc lysin thành glyxin trong protein được mã hóa người ta có thể thay thế bộ ba AAA hoặc AAG bằng bất kỳ trong số GGA và GGC, GGT hoặc GGG trong axit nucleic mã hóa.

Các nghiên cứu về sinh học miễn dịch của virut PRRS gợi ý rằng sự tương tác của virut PRRS với kiểm tra các tính năng của các PDC. Loại tế bào này có 0,2%-0,8% tế bào máy đơn nhân loại vi ở người, chuột nhắt, chuột cống, lợn và khỉ. Mặc dù hiếm, nhưng tế nào này là thành phần quan trọng của hệ miễn dịch bẩm sinh và có khả năng tiết ra lượng lớn IFN-α sau khi kích thích bằng virut. Thông qua việc tiết IFN-α mà các PDC đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa tính miễn dịch bẩm sinh tính miễn dịch thích ứng kháng virut do chúng thúc đẩy chức năng của tế bào tiêu diệt tự nhiên, tế bào B, và tế bào T. Hơn nữa, việc trưởng thành của tế bào tua có nguồn gốc từ bạch cầu đơn nhân của lợn (MoDC) được hỗ trợ bởi IFN-α được tiết ra bởi PDC dẫn đến tăng cường khả năng của MoDCs với việc trình diện kháng nguyên và hoạt hóa tế bào T. Ở giai đoạn sau của quá trình nhiễm virut, PDC biệt hóa thành loại tế bào tua trưởng thành đặc thù, mà trực tiếp điều hòa chức năng của tế bào T và định hướng việc biệt hóa tế bào T thành tế bào có khả năng tiết IFN-γ, mà là chất điều tiết chính của tính miễn dịch kháng virut đối với các

virut bao gồm virut PRRS. Không có gì ngạc nhiên khi có virut ở người, như virut hợp bào hô hấp và virut sởi, mà đã được biết là ức chế khả năng của PDC trong việc tiết IFN-α. Tác dụng ức chế này được coi là đóng vai trò quan trọng trong tính ưu thế của đáp ứng miễn dịch thể dịch và bệnh học miễn dịch kèm theo quan sát được là kết quả của việc lây nhiễm các virut này, cũng như việc tăng tính nhạy cảm của vật chủ với việc nhiễm thứ cấp vi khuẩn và virut.

Như đã nêu trên, có rất nhiều chủng và thể phân lập của PRRSV châu Âu, Bắc Mỹ và Trung Quốc được biết đến, và các chủng mới tiếp tục phát triển hoặc phân lập được. Mặc dù giữa tất cả các chủng này có độ tương đồng cao về trình tự axit amin, người có kỹ năng trong lĩnh vực này sẽ nhận ra ngay lập tức có một số thay đổi, và thực sự có thể tận dụng được các khác biệt và tương đồng này để cải thiện thêm các đặc điểm kiểu hình của tất cả các chủng vacxin.

Thứ nhất, liên quan đến tất cả các motif axit amin được xác định trong các SEQ ID NOS được chỉ ra dưới đây, nói chung là có thể kiểm tra các trình tự protein đã biểu hiện tương ứng từ PRRSV châu Âu khác, để phát hiện motif axit amin tương ứng, ngay cả khi những thay đổi bổ sung đã xảy ra ở những chủng khác như vậy, là kết quả của quá trình tiến hóa, gây ra sự thay thế và/hoặc bớt hoặc thêm. Vì thế, dễ dàng có thể nhận biết motif có thể so sánh ở chủng PRRS khác nếu, ví dụ, valin trong đó được thay thế bằng isoleuxin hoặc leuxin, hoặc gốc khác bất kỳ, hoặc nếu một gốc đơn giản bị khuyết hoặc một gốc bổ sung được thêm vào. Hiện có nhiều chương trình máy tính để nhận biết sự sắp thẳng hàng và vì thế xác định các motif trình tự polypeptit có tương ứng hay không, ví dụ các bảng Blosum (được dựa trên mức tỷ lệ % độ tương đồng cho trước), xem S. Henikoff et al. "Amino Acid Substitution matrices from protein blocks", Proc Natl Acad Sci, USA, 89(22), pp. 10915-10919, Nov 15, 1992., và cũng xem A. L. Lehninger et al. Principles of Biochemistry, 2005, MacMillan and Company, 4th edition. Các thay thế axit amin bảo toàn cũng được nhận ra dựa trên việc phân loại thành 5 nhóm chính: sulfydryl (Cys); thơm (Phe, Tyr, và Trp); bazơ (Lys, Arg, His); béo (Val, Ileu, Leu, Met), và ưa nước (Ala, Pro, Gly, Glu, Asp, Gln, Asn, Ser và Thr). Do đó nằm trong phạm vi thực hành sáng chế để biến đổi PRRSV châu Âu bất kỳ mã hóa trình tự nucleotit để kết hợp vào vị trí thích hợp và tương ứng, việc thay đổi bất kỳ trong số các thay đổi axit amin

được cung cấp bởi SEQ ID NO:5 ngay cả khi một hoặc nhiều axit amin khác liền kề với vị trí được thiết kế được thêm, bớt hoặc thay thế. Tất nhiên việc thay thế axit amin như vậy có thể được đưa vào trình tự nucleotit mã hóa tương ứng của virut bằng đột biến định hướng điểm, PCR, và các kỹ thuật khác đã biết rõ trong lĩnh vực này.

Biện pháp giảm độc lực chung

Để chứng tỏ một chủng đã được biến đổi di truyền cụ thể được làm giảm độc lực một thử nghiệm được mô tả dưới đây có thể được sử dụng.

Ít nhất 10 con lợn nái hậu bị mỗi nhóm được bao gồm trong mỗi thử nghiệm, mà có nguồn gốc từ trang trại không có PRRSV. Động vật được thử nghiệm không có kháng thể huyết thanh đặc hiệu virut PRRS và âm tính với PRRSV. Tất cả các động vật được bao gồm trong thử nghiệm là cùng nguồn và cùng giống. Việc phân phối động vật vào các nhóm được thực hiện ngẫu nhiên.

Thử thách được thực hiện vào ngày 90 của thai kỳ bằng cách dùng trong mũi 1 ml PRRSV với 10^5 $TCID_{50}$ cho mỗi lỗ mũi. Có ít nhất ba nhóm cho mỗi thiết lập thử nghiệm: Một nhóm đối với virut kiểu dại; một nhóm thử nghiệm để thử thách bằng virut được giảm độc lực có thể; và một nhóm đối chứng nghiêm ngặt.

Nghiên cứu được coi là hợp lệ khi các đối chứng nghiêm ngặt ở tình trạng âm tính với PRRSV trong suốt thời gian nghiên cứu và ít nhất 25% lợn con khỏe mạnh còn sống được sinh ra trong nhóm được thử thách virut kiểu dại so với nhóm đối chứng nghiêm ngặt.

Việc làm giảm độc lực, nói cách khác ít độc lực hơn, được định nghĩa là sự thay đổi đáng kể về mặt thống kê của một hoặc nhiều thông số xác định năng suất sinh sản hoặc phức hợp triệu chứng khác:

Việc giảm đáng kể về ít nhất một trong các thông số sau đây đối với nhóm thử nghiệm (virut được làm giảm độc lực có thể) so với nhóm bị nhiễm chủng ban đầu không được cải biến được sẽ là một dấu hiệu của việc giảm độc lực:

a) tần số thai chết lưu

b) sẩy thai lúc hoặc trước ngày 112 của thai kỳ

c) số lợn con bị thai gỗ

d) số lợn con yếu hoặc có sức sống kém

e) chết trước khi cai sữa.

Ngoài ra, việc tăng đáng kể một trong các thông số sau đây đối với nhóm thử nghiệm được so sánh với nhóm bị nhiễm chủng ban đầu không được cải biến được ưu tiên:

f) số lợn con được cai sữa từ mỗi lợn nái

g) số lợn con sống khỏe mạnh được sinh ra từ mỗi lợn nái.

Theo cách khác, hội chứng hô hấp và các triệu chứng khác của việc nhiễm PRRSV có thể được kiểm tra để thiết lập việc làm giảm độc lực.

Chủng được làm giảm độc lực có giá trị trong việc bào chế vacxin. Vacxin theo sáng chế hữu hiệu nếu nó bảo vệ lợn chống lại việc nhiễm virut PRRS. Vacxin bảo vệ lợn chống nhiễm virut PRRS nếu, sau khi dùng vacxin này cho một hoặc nhiều lợn chưa bị nhiễm, thử thách sau đó với thể phân lập virut tinh khiết về mặt sinh học (ví dụ, kiểu dại có nguồn gốc châu Âu bất kỳ) dẫn đến giảm mức độ nghiêm trọng của các thay đổi tổng thể hoặc mô bệnh học (ví dụ, tổn thương trong phổi) và/hoặc các triệu chứng của bệnh, khi so sánh với các thay đổi hoặc triệu chứng đó thường gây ra bởi thể phân lập ở các lợn tương tự mà không được bảo vệ (tức là, so với đối chứng thích hợp). Cụ thể hơn, vacxin theo sáng chế có thể được thể hiện là hiệu quả hơn bằng việc dùng cho một hoặc nhiều lợn thích hợp có nhu cầu, sau đó sau một khoảng thời gian (ví dụ, 4 tuần), thử thách bằng mẫu lớn ($10^{(3-7)}$ $TCID_{(50)}$) của thể phân lập tinh khiết về mặt sinh học PRRSV. Mẫu máu sau đó được lấy từ lợn đã thử thách sau khoảng một tuần, và sau đó cố gắng phân lập virut từ mẫu máu này. Việc phân lập lượng lớn virut là dấu hiệu cho thấy vacxin này có thể không hiệu quả, trong khi việc phân lập được lượng virut giảm (hoặc không có virut) là dấu hiệu cho thấy rằng vacxin có thể có hiệu quả.

Vì thế, tính hiệu quả của vacxin theo sáng chế có thể được đánh giá theo cách định lượng (tức là, việc làm giảm tỷ lệ phần trăm mô phổi bị kết đặc so với nhóm đối chứng thích hợp) hoặc theo cách định tính (ví dụ, phân lập PRRSV từ máu, phát hiện kháng nguyên PRRSV trong phổi, mẫu mô amiđan hoặc hạch bạch huyết bằng thử nghiệm miễn

dịch). Các triệu chứng của bệnh sinh sản và hô hấp ở lợn có thể được đánh giá theo cách định lượng (ví dụ, nhiệt độ/sốt) hoặc bán định lượng (ví dụ, sự có mặt hoặc vắng mặt của một hoặc nhiều triệu chứng hoặc giảm tính nghiêm trọng của một hoặc nhiều triệu chứng, như tím tái, viêm phổi, tổn thương phổi v.v).

Lợn không bị nhiễm là lợn chưa từng tiếp xúc với tác nhân lây nhiễm bệnh sinh sản và hô hấp ở lợn, hoặc lợn đã từng tiếp xúc với tác nhân lây nhiễm bệnh sinh sản và hô hấp ở lợn nhưng không thể hiện các triệu chứng của bệnh. Lợn bị ảnh hưởng là lợn thể hiện các triệu chứng của PRRS hoặc từ đó PRRSV có thể phân lập được.

Vacxin theo sáng chế có thể được bào chế theo quy ước được chấp nhận để bao gồm các chất mang được chấp nhận cho động vật (nếu có thể áp dụng), như chất đệm, chất làm ổn định, chất pha loãng, chất bảo quản, và/hoặc chất hòa tan tiêu chuẩn, và cũng có thể được bào chế để hỗ trợ cho việc giải phóng kéo dài. Chất pha loãng bao gồm nước, nước muối, đextroza, etanol, glyxerol, và các chất tương tự. Các chất phụ trợ để tạo tính đẳng trương bao gồm natri clorua, dextroza, mannitol, sorbitol, và lactoza, trong số các chất khác. Chất làm ổn định bao gồm albumin, trong số các chất khác. Các chất dẫn thuốc và chất phụ trợ của vacxin thích hợp khác, bao gồm các chất thường được sử dụng để bào chế vacxin sống được cải biến, được biết hoặc sẽ là hiển nhiên với người có kỹ năng trong lĩnh vực này. Xem ví dụ, Remington's Pharmaceutical Science, 18th ed., 1990, Mack Publishing, mà được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Vacxin theo sáng chế có thể còn chứa một hoặc nhiều thành phần điều biến miễn dịch bổ sung như, ví dụ, tá dược hoặc xytokin, trong số các thành phần khác. Các ví dụ không giới hạn về tác dược mà có thể được sử dụng trong vacxin theo sáng chế bao gồm hệ thống tá dược RIBI (Ribi Inc., Hamilton, Mont.), alum, gel khoáng như gel alumin hydroxit, nhũ tương dầu trong nước, nhũ tương nước trong dầu như, ví dụ, tá dược không hoàn chỉnh và hoàn chỉnh của Freund, copolyme khối (CytRx, Atlanta, Ga.), QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge Mass.), SAF-M (Chiron, Emeryville Calif.), tá dược AMPHIGEN.RTM., saponin, Quil A hoặc phân đoạn saponin khác, monophosphoryl lipit A, và tá dược Avridine lipit-amin. Các ví dụ không giới hạn về nhũ tương dầu trong nước có thể sử dụng trong vacxin theo sáng chế bao gồm các chế phẩm SEAM62 và SEAM 1/2 được cải biến. SEAM62 được cải biến là nhũ tương dầu trong nước chứa 5% (thể

tích/thể tích) squalen (Sigma), 1% chất tẩy rửa (thể tích/thể tích) SPAN.RTM. 85 (chất hoạt động bề mặt ICI), 0,7% (thể tích/thể tích) chất tẩy rửa TWEEN.RTM. 80 (chất hoạt động bề mặt ICI), 2,5% (thể tích/thể tích) etanol, 200 pg/ml Quil A, 100 [mgr]g/ml cholesterol, và 0,5% (thể tích/thể tích) lexitin. SEAM 1/2 được cải biến là nhũ tương dầu trong nước chứa 5% (thể tích/thể tích) squalen, 1% (thể tích/thể tích) chất tẩy rửa SPAN.RTM. 85, 0,7% (thể tích/thể tích) chất tẩy rửa Tween 80, 2,5% (thể tích/thể tích) etanol, 100 .mu.g/ml Quil A, và 50 .mu.g/ml cholesterol. Các chất điều biến miễn dịch khác mà có thể được bao gồm trong vacxin bao gồm, ví dụ, một hoặc nhiều interleukin, interferon, hoặc các xytokin đã biết khác.

Vacxin theo sáng chế có thể tùy ý được bào chế để giải phóng kéo dài virut, phân tử ARN lây nhiễm, plasmit, hoặc vectơ virut theo sáng chế. Các ví dụ về chế phẩm giải phóng kéo dài bao gồm virut, phân tử ARN lây nhiễm, plasmit, hoặc vectơ virut trong tổ hợp với các thành phần của polyme, tương thích sinh học như, ví dụ, poly(axit lactic), poly(axit lactic-co-glycolic), metylxenluloza, axit hyaluronic, colagen và tương tự. Cấu trúc, việc lựa chọn và sử dụng polyme có khả năng phân giải trong chất dẫn phân phối dược chất được đề cập trong một vài tài liệu công bố, bao gồm A. Domb et al., 1992, Polymers for Advanced Technologies 3: 279-292, mà được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Hướng dẫn bổ sung về việc chọn và sử dụng polyme trong dược phẩm có thể được tìm thấy trong các văn bản đã được biết đến trong lĩnh vực, ví dụ M. Chasin and R. Langer (eds), 1990, "Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems" in: Drugs and the Pharmaceutical Sciences, Vol. 45, M. Dekker, N.Y., mà cũng được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, virut, plasmit, hoặc vectơ virut cũng có thể được bao vi nang để cải thiện việc sử dụng và hiệu quả. Các phương pháp bao vi nang kháng nguyên được biết rõ trong lĩnh vực này, và bao gồm các kỹ thuật được mô tả, ví dụ, trong patent Mỹ số 3,137,631; Patent Mỹ số 3,959,457; Patent Mỹ số 4,205,060; Patent Mỹ số 4,606,940; Patent Mỹ số 4,744,933; Patent Mỹ số 5,132,117; và Công bố đơn sáng chế quốc tế WO 95/28227, tất cả các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Liposom cũng có thể được sử dụng để tạo ra dạng giải phóng kéo dài của virut, plasmit, hoặc vectơ virut. Chi tiết liên quan đến cách tạo ra và sử dụng chế phẩm liposom

có thể được tìm thấy trong, trong số các tài liệu khác, patent Mỹ số 4,016,100; Patent Mỹ số 4,452,747; Patent Mỹ số 4,921,706; Patent Mỹ số 4,927,637; Patent Mỹ số 4,944,948; Patent Mỹ số 5,008,050; và patent Mỹ số 5,009,956, tất cả các tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Lượng hữu hiệu của vacxin bất kỳ trong số các vacxin được mô tả ở trên cũng có thể được xác định bằng cách thông thường, bắt đầu bằng liều lượng thấp của virut, plasmit protein virut hoặc vectơ virut, và sau đó tăng liều lượng trong khi vẫn kiểm soát hiệu quả. Lượng hữu hiệu có thể thu được sau một lần dùng vacxin hoặc sau nhiều lần dùng vacxin. Các yếu tố đã biết có thể được xem xét khi xác định liều tối ưu cho mỗi động vật. Các yếu tố này bao gồm loài, kích thước, độ tuổi và các tình trạng bệnh tổng quát của động vật, sự có mặt của các dược chất khác trong cơ thể động vật, và yếu tố tượng tự. Liều lượng thực tế tốt hơn là được chọn sau khi xem xét kết quả từ các nghiên cứu trên động vật khác nhau (xem các ví dụ 3-7 dưới đây).

Một phương pháp phát hiện đáp ứng miễn dịch thích hợp có đạt được hay không là xác định độ chuẩn chuyển đảo huyết thanh và kháng thể ở động vật sau khi chủng ngừa. Thời điểm chủng ngừa và số lần chủng tăng cường, nếu có, tốt hơn là được xác định bởi bác sĩ hoặc bác sĩ thú y trên cơ sở phân tích tất cả các yếu tố liên quan, một vài trong số đó là các yếu tố đã được mô tả ở trên.

Lượng liều hữu hiệu của virut, protein, phân tử ADN lây nhiễm, plasmit, hoặc vectơ virut, theo sáng chế có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết, xem xét đến các yếu tố mà có thể được xác định bởi người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này cân nặng của động vật được chủng ngừa. Liều lượng của virut theo sáng chế trong vacxin theo sáng chế tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 10^1 đến khoảng 10^9 pfu (đơn vị tạo thành vệt tan), tốt hơn nữa là từ khoảng 10^2 đến khoảng 10^8 pfu, và tốt nhất là từ khoảng 10^3 đến khoảng 10^7 pfu. Liều lượng plasmit theo sáng chế trong vacxin theo sáng chế tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 0,1mg đến khoảng 100mg, tốt hơn nữa là từ khoảng 1mg đến khoảng 10mg, còn tốt hơn nữa là từ khoảng 10mg đến khoảng 1mg. Liều lượng của phân tử ADN lây nhiễm theo sáng chế trong vacxin theo sáng chế tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 0,1mg đến khoảng 100mg, tốt hơn nữa là từ khoảng 1mg đến khoảng 10mg, còn tốt hơn nữa là từ khoảng 10mg đến khoảng 1mg.

Liều lượng của vectơ virut theo sáng chế trong vacxin theo sáng chế tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 10^1 pfu đến khoảng 10^9 pfu, tốt hơn nữa là từ khoảng 10^2 pfu đến khoảng 10^8 pfu, và còn tốt hơn nữa là từ khoảng 10^3 đến khoảng 10^7 pfu. Kích thước liều lượng thích hợp nằm trong khoảng từ khoảng 0.5 ml đến khoảng 10 ml, và tốt hơn nữa là từ khoảng 1 ml đến khoảng 5 ml.

Liều thích hợp đối với vacxin protein hoặc peptit virut theo sáng chế để thực hành sáng chế thường nằm trong khoảng từ 1 đến 50 microgam mỗi liều, hoặc lượng cao hơn khi được xác định bằng các phương pháp chuẩn, với lượng tá dược được xác định hoặc được nhận biết bằng các phương pháp liên quan đến mỗi chất này. Trong một ví dụ được ưu tiên của sáng chế liên quan đến chủng ngừa cho lợn, một mục tiêu tuổi tối ưu đối với động vật là nằm trong khoảng từ khoảng 1 đến 21 ngày, mà tại thời điểm trước cai sữa, có thể cũng tương ứng với các chương trình chủng ngừa khác như chương trình kháng *Mycoplasma hyopneumoniae* hoặc PCV. Ngoài ra, chương trình chủng ngừa được ưu tiên đối với lợn nái giống sẽ bao gồm các liều tương tự, với chương trình tái chủng ngừa hàng năm.

Một phương pháp phát hiện đáp ứng miễn dịch thích hợp có đạt được hay không là xác định độ chuẩn chuyển đảo huyết thanh và kháng thể ở động vật sau khi chủng ngừa. Thời điểm chủng ngừa và số lần chủng tăng cường, nếu có, tốt hơn là được xác định bởi bác sĩ hoặc bác sĩ thú y trên cơ sở phân tích tất cả các yếu tố liên quan, một vài trong số đó là các yếu tố đã được mô tả ở trên.

Lượng liều hữu hiệu của virut, phân tử ARN lây nhiễm, plasmit, hoặc vectơ virut, theo sáng chế có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết, xem xét đến các yếu tố mà có thể được xác định bởi người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này như cân nặng của động vật được chủng ngừa. Theo cách ví dụ, vacxin có thể được phân phối qua đường uống, ngoài đường tiêu hóa, trong da, dưới da, trong cơ, trong mũi hoặc trong tĩnh mạch. Việc phân phối qua đường uống có thể bao gồm, ví dụ, bổ sung chế phẩm vào thức ăn hoặc nước uống cho động vật. Các yếu tố tác động đến liều lượng vacxin bao gồm, ví dụ, cân nặng và độ tuổi của lợn.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp bào chế vacxin chứa virut PRRS, phân tử ARN lây nhiễm, plasmit, hoặc vectơ virut được mô tả ở đây, mà phương pháp này bao gồm việc kết hợp lượng hữu hiệu của một trong số virut PRRS, phân tử ARN lây nhiễm, plasmit, hoặc vectơ virut theo sáng chế, với chất mang được chấp nhận để sử dụng trong dược phẩm hoặc thú y.

Ngoài ra vacxin sống được làm giảm độc lực theo sáng chế có thể được cải biến như được mô tả trong patent Mỹ số 6,500,662 để mã hóa epitop kháng nguyên khác loại mà được gắn chèn vào trong hệ gen virut PRRS bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp đã biết. Cũng xem patent Mỹ 7,132,106 mà được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Epitop kháng nguyên hữu dụng làm epitop kháng nguyên khác loại theo sáng chế bao gồm epitop kháng nguyên từ mầm bệnh ở lợn khác với PRRS mà bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, epitop kháng nguyên từ mầm bệnh ở lợn được chọn từ nhóm bao gồm virut parvo ở lợn, virut circo ở lợn, virut rota ở lợn, virut cúm lợn, virut giả dại, virut viêm dạ dày ruột truyền nhiễm, virut corona bệnh hô hấp ở lợn, virut dịch tả lợn cổ điển, virut cúm lợn châu Phi, virut viêm não và cơ tim, virut paramyxo lợn, virut torque teno, *Actinobacillus pleuropneumoniae, Actinobacillus suis, Bacillus anthraci, Bordetella bronchiseptica, Clostridium haemolyticum, Clostridium perfringens, Clostridium tetani, Escherichia coli, Erysipelothrix rhusiopathiae, Haemophilus parasuis, Leptospira spp., Mycoplasma hyopneumoniae, Mycoplasma hyorhinis, Mycoplasma hyosynovia, Pasteurella multocida, Salmonella choleraesuis, Salmonella typhimurium, Streptococcus equismilis,* và *Streptococcus suis*. Các trình tự nucleotit mã hóa epitop kháng nguyên từ mầm bệnh ở lợn nêu trên đã biết trong lĩnh vực này và có thể thu được từ cơ sở dữ liệu gen công cộng trên trang web trên toàn thế giới, như ở Genbank từ Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia (USA).

Các dấu hiệu và biến đổi bổ sung của sáng chế sẽ hiển nhiên với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực này khi tham khảo toàn bộ đơn này, bao gồm phần mô tả chi tiết, và tất cả các dấu hiệu này được dự định là các khía cạnh của sáng chế. Tương tự như vậy, các dấu hiệu của sáng chế được mô tả ở đây có thể được kết hợp lại thành các phương án bổ sung mà được dự định là các khía cạnh của sáng chế, không phân biệt sự kết hợp của các dấu hiệu được đề cập cụ thể ở trên có phải là một khía cạnh hay phương

án của sáng chế hay không. Ngoài ra, nên hiểu rằng chỉ những giới hạn như vậy mà được mô tả ở đây là quan trọng đối với sáng chế; các biến thể của sáng chế không có các giới hạn mà không được mô tả ở đây là quan trọng được dự định là các khía cạnh của sáng chế. Rõ ràng là sáng chế có thể được thực hành khác với phần được mô tả chi tiết trong phần mô tả trên đây và phần ví dụ.

Do đó, vacxin PRRS dựa trên virut có SEQ ID NO:5 sẽ được coi là đại diện cho các vacxin có profin an toàn và hiệu quả mà tạo ra sự cải thiện đáng kể cho phép chủng ngừa thành công ở lợn con, ngay từ ngày tuổi đầu tiên, với tính miễn dịch kéo dài đến khoảng 6 tháng tuổi. Những cải tiến chưa từng có như vậy về tính năng của vacxin bất ngờ được tạo ra bằng cách nuôi cấy và làm giảm độc lực virut trong môi trường nuôi cấy tế bào mà tối đa hóa sự liên quan đến sinh học của lợn, bao gồm việc cho phép virut sao chép thích hợp và an toàn trong cơ thể vật chủ là lợn trong khi không điều hòa giảm sự đáp ứng miễn dịch cần thiết ở vật chủ. Những lợi ích như vậy được cung cấp cho lợn con, lợn đực giống và lợn nái và lợn nái hậu bị (cả trước và sau khi mang thai); và trong tất cả các trường hợp cho dù động vật là huyết thanh dương tính hoặc huyết thanh âm tính tại thời điểm chủng ngừa.

Cũng dễ dàng thấy rằng các cải tiến về nuôi cấy theo sáng chế có thể áp dụng đồng đều cho virut PRRS châu Âu bất kể chúng là, hoặc được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp, hoặc chỉ được phân lập, duy trì, hoặc được nuôi cấy và được thích nghi bằng phương pháp chủ yếu là không tái tổ hợp; trong các trường hợp bao gồm dù cho tế bào nuôi cấy bất kỳ được sử dụng là, hoặc không phải là tự tái tổ hợp.

Nhiều cải biến và biến thể của sáng chế có thể là có thể dựa vào phần mô tả nêu trên và do đó, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây được đưa ra để minh họa, chứ không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1- Tạo ra dòng tế bào BHK21-C12-26

Việc tạo ra dòng tế bào BHK21-C12, bố mẹ của dòng tế bào BHK21-C12-26 được sử dụng trong các thử nghiệm này, đã được mô tả trước đây trong US 9,102,912. Trong

sáng chế này, dòng tế bào BHK21-C12 được gọi là BHK/CMV/v1 #12 trong Ví dụ 14 và Fig. 6. Tóm lại, dòng tế bào thận chuột con hamster thường được sử dụng BHK-21 được chuyển nhiễm với plasmit pCMV-susCD163v1, mà chứa biến thể được cắt cụt (v1) của gen thụ thể CD163 PRRSV (sus) của lợn, dưới sự kiểm soát của vùng khởi đầu CMV. Plasmit này cũng chứa gen kháng kanamyxin/neomyxin dưới sự kiểm soát của vùng khởi đầu kép nhân sơ/nhân chuẩn để chọn lọc trong E. coli và tế bào động vật có vú, tương ứng. Sau khi chuyển nhiễm, tế bào được chọn lọc đồng thời với G418 (Geneticin, chất tương tự neomyxin) và tạo dòng tế bào đơn trong các đĩa 96 lỗ. Một trong các dòng tạo thành (#12, hoặc "C12") được chọn để sử dụng tiếp và được đặt tên là BHK21-C12.

Dòng tế bào BHK21-C12 được cấy chuyền hàng loạt 65 lần dưới sự chọn lọc của G418 và giữ lại được kiểu hình chấp nhận PRRSV. Đến đời cấy chuyền 64 người ta quan sát thấy rằng một vài tế bào sống sót nhiễm virut PRRS, chỉ ra rằng các giai đoạn sớm có sự không ổn định kiểu hình. Quy trình tạo dòng tế bào đơn bổ sung được thực hiện, và nhiều dòng mới được đánh giá về kiểu hình chấp nhận PRRSV và về các đặc điểm tăng trưởng. Trong số các dòng này, dòng #26 được chọn do vượt trội so với các dòng khác và dòng tế bào BHK21-C12 bố mẹ. Dòng #26 được gọi là BHK21-C12-26, và được sử dụng để làm giảm độc lực của virut PRRS 96V198.

Ví dụ 2- Các tế bào bổ sung thích hợp đối với việc thích nghi và nuôi cấy virut mà an toàn và hiệu quả đối với độ tuổi rất non, như để chủng ngừa vào ngày 1 sau sinh

Tế bào PK-9 là dòng tế bào chuyển gen thu được bằng cách chuyển nhiễm ổn định dòng tế bào thận lợn PK0809 với plasmit mã hóa phiên bản bị xóa của gen CD163 của lợn và gen kháng neomyxin. Chi tiết về việc tạo cấu trúc và mô tả đặc điểm của dòng tế bào PK-9 trước đây đã được mô tả (xem patent Mỹ 9,102,912).

Cần lưu ý rằng sự thích nghi của virut đời cấy chuyền thứ nhất từ tế bào PAM để tăng trưởng trong tế bào PK-9 có thể khó khăn, và và yêu cầu một vài lần thử với nhiều dòng song song. Trong trường hợp này, việc lây nhiễm có thể được theo dõi bằng miễn dịch huỳnh quang ở hai giếng giống nhau sử dụng kháng thể đơn dòng liên hợp hợp FITC SDOW17 đặc hiệu nucleocapsit virut (Rural Technologies Inc, Brookings South Dakota). Các đời cấy chuyền sớm có thể dẫn đến một vài cụm nhỏ, và không tạo ra các hạt virut

không có tế bào đủ để bắt đầu việc lây nhiễm lớp đơn mới. Tuy nhiên các đời cấy chuyền này có thể được hoàn thành bằng cách xử lý lớp đơn đã lây nhiễm bằng Accutase (chất thay thế trypsin) và cấy lại tế bào trong nhiều lỗ bằng môi trường mới, có hoặc không có tế bào PK-9 không bị nhiễm. Sau một vài lần cấy chuyền như vậy, một số dòng nên thể hiện việc tăng rõ ràng tần số và kích thước cụm huỳnh quang. Một số dòng trong số này nên có được khả năng được cấy chuyền bằng cách sử dụng dịch lỏng virut không có tế bào. Nói chung, người ta kỳ vọng rằng các đời cấy chuyền thích hợp thể hiện làm giảm khả năng ức chế alpha interferon.

Tính an toàn và hiệu quả của vacxin PRRSV châu Âu theo sáng chế được chứng minh thêm bằng các quy trình và dữ liệu thử nghiệm trong các Ví dụ 3-7, dưới đây.

Ví dụ 3: Khoảng thời gian miễn dịch được tạo ra bởi MLV PRRSV châu Âu được dùng cho lợn con 1 ngày tuổi bằng thử thách tiếp theo với thể phân lập PRRSV châu Âu vào khác khoảng khoảng 26 tuần sau chủng ngừa

Mục đích của nghiên cứu là để đánh giá thời gian miễn dịch (duration of immunity - DOI) của vacxin sống được cải biến châu Âu (virut được mã hóa bởi SEQ ID NO:5) ở lợn được chủng ngừa vào 1 ngày tuổi bằng đường dùng trong cơ (IM, nhóm T02) hoặc trong mũi (IN, nhóm T03), sau đó thử thách hô hấp ở 26 tuần sau khi chủng ngừa bằng một thể phân lập PRRSV châu Âu khác. Biến số chính trong việc xác định hiệu quả là tải lượng virut trong huyết thanh (nhiễm virut trong máu) của các nhóm điều trị T02 và T03 trong so sánh với lợn T01. Tổn thương phổi, nhiệt độ trực tràng, xuất tiết, dấu hiệu lâm sàng và thể trọng được so sánh dưới dạng biến số thứ hai.

Lúc 1 ngày tuổi, lợn từ các nhóm T02 và T03 được dùng liều đơn 2 mL IVP qua đường dùng trong cơ (T02) hoặc trong mũi (T03). Lợn trong nhóm đối chứng (T01) được nhận 2 ml trong cơ và 2 ml trong mũi dung dịch nước muối. Lúc 26 tuần sau chủng ngừa (182 ngày), lợn được thử thách trong mũi bằng thể phân lập PRRSV châu Âu Olot/91 (xem J. Duran et al., Virus Genes, vol 14 No. 1., 1997, pp 19-29 and Z. Lu et al., Virology Journal, vol 11, No 42, 2014) làm thử thách hô hấp. Trong suốt pha thử thách, mẫu máu, gạc lau mũi miệng, các dấu hiệu lâm sàng và nhiệt độ trực tràng được thu thập mỗi 3-4 ngày cho đến ngày mổ xác. Lợn được cân trước khi chủng ngừa, trước khi thử

thách, và lúc mổ xác. Chín hoặc mười ngày sau khi thử thách, lợn được cho chết êm ái và được mổ xác. Khi mổ xác, phổi được đánh giá sự có mặt của tổn thương PRRSV và được tính điểm. Thử nghiệm là hợp lệ khi tất cả các lợn T01 vẫn còn âm tính với virut PRRS trong suốt thời gian chủng ngừa và không có yếu tố bệnh gây nhiễu được phát hiện.

Hiệu quả bảo vệ của cả chủng ngừa IM và IN được quan sát khi so sánh tải lượng virut trong huyết thanh giữa các nhóm. Cả hai nhóm được chủng ngừa bằng IVP (T02 và T03) có hiệu giá virut thấp hơn đáng kể ($P \leq 0,05$) so với nhóm đối chứng ở các ngày lấy mẫu sau thử thách (3, 6, 8 và 9/10, tương ứng với các ngày nghiên cứu 185, 188, 190 và 191/192). Hiệu quả cũng được hỗ trợ bằng cách giảm đáng kể tổn thương phổi liên quan đến PRRSV lúc mổ xác, cũng như giảm đáng kể xuất tiết dịch mũi và miệng ở cả hai nhóm được chủng ngừa so với nhóm đối chứng.

So sánh giữa các nhóm được chủng ngừa đã phát hiện ra rằng vào 3 ngày sau thử thách, nhóm được chủng ngừa bằng đường IN (T03) có lượng virut trong máu, xuất tiết dịch mũi và miệng giảm đáng kể so với nhóm được chủng ngừa bằng đường IM (T02). Các kết quả này chỉ ra rằng, trong các điều kiện của thử nghiệm này, hiệu quả bảo vệ thu được sau khi chủng ngừa IN là mạnh hơn sau khi chủng ngừa IM.

Việc chủng ngừa đã cảm ứng sự phát triển kháng thể đặc hiệu PRRSV trong vòng 28 ngày sau chủng ngừa. Tất cả lợn đã chủng ngừa có huyết thanh dương tính với kháng thể PRRS lúc thử thách (26 tuần sau chủng ngừa), chỉ ra rằng cả hai đường dùng có thể gây ra đáp ứng kháng thể bảo vệ và mạnh mẽ với việc chủng ngừa. Tuy nhiên, mức hiệu giá kháng thể được phát hiện ở thử thách cao hơn đáng kể ở nhóm được chủng ngừa bằng đường IN so với nhóm được chủng ngừa trong cơ thực tế sẽ giải thích sự giảm đáng kể tải lượng virut được phát hiện trong cả huyết thanh và các đường bài tiết trong nhóm IN so với nhóm IM vào 3 ngày sau thử thách.

Kết luận, các kết quả từ nghiên cứu này đã chứng tỏ rằng việc dùng một lần vacxin MLV PRRSV châu Âu (SEQ ID NO:5) chứa liều 2,5 log10 CCID50 cho lợn 1 ngày tuổi bằng đường dùng trong cơ hoặc trong mũi đã tạo ra thời gian miễn dịch bảo vệ là 6,5 tháng (26 tuần).

Các chữ viết tắt được sử dụng trong các ví dụ 3-7 bao gồm: AAALAC, Hiệp hội đánh giá và kiểm định chất lượng chăm sóc động vật trong phòng thí nghiệm; AE, Sự kiện bất lợi; CCID50, liều gây nhiễm 50% dịch nuôi cấy tế bào; CP, sản phẩm đối chứng; DC, ngày thử thách; DCF, Biểu mẫu thu thập dữ liệu; DRAC, Đánh giá hàng ngày Chăm sóc động vật; ID, số nhận biết; IF, miễn dịch huỳnh quang; IM, trong cơ; IN, trong mũi; IV, trong tĩnh mạch; IVP, Sản phẩm thú y nghiên cứu; MDA, Kháng thể có nguồn gốc từ mẹ; MLV, Vacxin sống được cải biến; MSF, Hồ sơ nghiên cứu tổng thể; MSV, chủng virut giống gốc; NA, Không áp dụng được; PAM, Đại thực bào phế nang lợn; PRRSV, Virut gây hội chứng hô hấp sinh sản và hô hấp ở lợn; PBS, nước muối được đệm phosphat; RT-qPCR, phản ứng chuỗi polymeraza phiên mã ngược định lượng; SART, Báo cáo và điều trị động vật ốm; SOP, Quy trình thực hành chuẩn; S/P, Mẫu dương tính; và TBD, được xác định.

Ký hiệu

Nhóm	Mô tả điều trị	Liều lượng (Độ chuẩn thực tế)	Đường dùng	Ngày sử dụng	Ngày thử thách (DC)	Liều thử thách (Độ chuẩn thực tế)	Kết thúc thử nghiệm (DN)	N
T01	CP	2 mL + 2 mL	IM + IN	D0	D182	$5,7 \log_{10}$ $CCID_{50}$/lợn	D191/ D192	20
T02	IVP	$2,2 \log_{10}$ $CCID_{50}$/2,0 mL	IM	D0	D182		D191/ D192	18
T03	IVP	$2,2 \log_{10}$ $CCID_{50}$/2,0 mL	IN	D0	D182		D191/ D192	17

Lúc 1 ngày tuổi, liều 2 mL (đường IM) và liều 2 mL (đường IN) của CP được dùng cho lợn con T01. Tương tự, liều đơn 20 mL IVP được dùng cho lợn con T02 bằng đường dùng IM và cho lợn con T03 bằng đường dùng IN. 26 tuần sau chủng ngừa, lợn được thử thách bằng PRRSV Olot/91 và 9-10 sau thử thách, chúng được chết êm ái và được mổ xác. Ngày 0 = ngày chủng ngừa.

Ngẫu nhiên hóa

Ngay sau khi sinh, lợn con được nuôi dưỡng chéo sao cho lợn con được chọn ngẫu nhiên và được lây lan càng nhiều càng tốt từ tất cả các con lợn nái. Khi cai sữa, lợn mẹ

được lấy ra và lợn con được nhốt trong khu rào kín trong nông trại nguồn (một khu rào kín cho mỗi phép điều trị).

Các thông số nhất định cho các động vật như sau:

Loài/giống:	Lợn lai
Độ tuổi bắt đầu vào ngày 0:	1 ngày (24±12 giờ) tuổi
Cân nặng bắt đầu vào ngày 0	NA
Giống:	Đực và cái
Nguồn gốc	Farm Cal Marquès Zoetis Manufacturing & Research Spain S.L. Ctra Camprodon s/n Finca "La Riba" 17813 Vall de Bianya (Girona), Spain
Tình trạng huyết thanh học:	Huyết thanh dương tính với PRRSV
Tình trạng sinh sản:	NA
Phương pháp nhận biết:	Gắn thẻ tai
Quyền sở hữu:	Zoetis Manufacturing & Research Spain S.L.

Mười hai lợn nái mang thai được sử dụng để tạo ra tổng số 117 lợn con. Ngày trước ngày đẻ dự kiến, quá trình chuyển dạ được kích thích bằng cách tiêm trong cơ cloprostenol (Cyclix® Porcino, Virbac). Tất cả lợn nái đã đẻ vào ngày hôm sau (D-1). Để giảm thời gian chuyển dạ và số lợn con bị thai chết lưu, tất cả lợn nái ngoài hai con (71 và 78 đã đẻ xong), được tiêm oxytocin (Partovet® DFV).

Trong pha chủng ngừa, 8 lợn con đã chết và phải cho chết êm ái. Từ 109 lợn con còn lại, 55 con được sử dụng cho nghiên cứu này.

Để giảm hành vi hung hăng và tính dục ở các con lợn đực ở độ tuổi lớn hơn, lợn con bị thiến lúc 6 ngày tuổi theo quy trình phúc lợi động vật đặc trưng vị trí. Ba lợn con (232, 284 và 286) không thể thiến do chúng bị thoát vị bìu.

Khoảng 1 tháng sau chủng ngừa, hai trường hợp tử vong đột ngột với kết quả bệnh lý giống hệt nhau cùng với sự xuất hiện của các đốm trắng trên sàn và một số con lợn cho thấy có nước tiểu màu trắng ở cuối quá trình tiểu tiện đã gợi ý sự nhiễm khuẩn ảnh hưởng đến đường tiết niệu. Quá trình này không được coi là có ảnh hưởng đến kết quả nghiên cứu vì tất cả các động vật đều đáp ứng tốt với điều trị và không có trường hợp nào khác xuất hiện trong thời gian còn lại của giai đoạn chủng ngừa (3 tháng tiếp theo cho đến khi thử thách). • Bất kỳ động vật nào bị thương hoặc bệnh lâm sàng không liên quan đến quy trình thử nghiệm mà có thể ảnh hưởng đến sức khỏe của động vật và việc đánh giá kết

quả có thể được rút khỏi nghiên cứu theo quyết định của điều tra viên. Sản phẩm thú y nghiên cứu (Investigational Veterinary Product - IVP) được cung cấp từ phần được đông khô mà được tạo huyền phù lại trong dung dịch nước muối ở nồng độ 2,5 log $_{10}CCID_{50}$/ML (virut SEQ ID NO: 5)

Hoàn nguyên:

Vào ngày 0, IVP được pha loãng bằng dịch pha loãng vacxin (lô T22019) để phù hợp với độ chuẩn mục tiêu (2,5 $\log_{10}$ $CCID_{50}$/2 mL). Một phần phân ước của IVP được thu thập để chuẩn độ trên tế bào BHK-21-C12-26 để khẳng định liều lượng. Một mẫu IVP bổ sung được làm đông (-80±10°C) và được lưu trữ làm mẫu lưu. Độ chuẩn trên tế bào BHK-21-C12-26 được thực hiện theo quy trình chuẩn cục bộ. Vacxin đã hoàn nguyên và pha loãng có độ chuẩn $10^{1,9}$ $CCID_{50}$/ml, mà tương ứng với $10^{2,2}$ $CCID_{50}$/2 mL (2,2 $\log_{10}CCID_{50}$ /2 ml). Vào 0, IVP được pha loãng bằng dịch pha loãng vacxin (lô T22019) để phù hợp với độ chuẩn mục tiêu (2,5 $\log_{10}$ $CCID_{50}$/2 mL). Một phần phân ước của IVP được thu thập để chuẩn độ trên tế bào BHK-21-C12-26 để khẳng định liều lượng. Một mẫu IVP bổ sung được làm đông (-80±10°C) và được lưu trữ làm mẫu lưu. Độ chuẩn trên tế bào BHK-21-C12-26 được thực hiện theo quy trình chuẩn cục bộ. Vacxin đã hoàn nguyên và pha loãng có độ chuẩn là $10^{1,9}$ $CCID_{50}$/ml, mà tương ứng với $10^{2,2}$ $CCID_{50}$/2 mL (2,2 $\log_{10}CCID_{50}$ /2 ml), sản phẩm đối chứng (CP) là dịch pha loãng vacxin (dung dịch nước muối) và được dùng là 4,0 mL (2,0 mL IM + 2,0 mL IN)

Vào ngày 0, lợn con được chủng ngừa bằng IVP hoặc CP như đã mô tả. Lợn con của các nhóm T01 và T02 được tiêm trong cơ vào cổ bên phải. Lợn con của các nhóm T01 và T03 được dùng trong mũi, phân phối 1,0 mL vào mỗi lỗ mũi.

Dùng liều thử thách

Tất cả các lợn được thử thách trong mũi (IN) bằng tổng thể tích thử thách là 2,0 mL bằng cách nhỏ giọt 1,0 mL nguyên liệu thử thách là virut Olot/91 ở độ chuẩn là 105,7 CCID50/2 mL vào mỗi lỗ mũi.

Kết quả - Virut trong máu

Tất cả lợn âm tính với RT-qPCR PRRSV trong huyết thanh trước chủng ngừa (D0) và trước thử thách (D181). Sau thử thách, 100% lợn trong nhóm T01 trở nên có

virut trong máu vào ngày 185 (3 ngày sau thử thách, DC+3) và giữ tình trạng dương tính cho đến khi kết thúc thử nghiệm. Trong các nhóm được chủng ngừa, 100% (nhóm T02) và 88% (T03) lợn dương tính lúc DC+3. Tuy nhiên, tỷ lệ % lợn dương tính ở cả hai nhóm chủng ngừa giảm theo thời gian và trở nên thấp hơn đáng kể lúc DC+8 và ngày mổ xác (DN) so với nhóm đối chứng T01.

Ở cả hai nhóm chủng ngừa, lượng tải lượng virut được phát hiện trong huyết thanh cũng giảm đáng kể so với nhóm T01 ở tất cả các ngày lấy mẫu sau thử thách. Vào ngày 185 (DC+3), việc giảm đáng kể hiệu giá virut cũng quan sát được ở nhóm T03 so với T02. Bảng 1 tóm tắt kết quả virut trong máu trong khoảng thời gian 10 ngày sau thử thách.

Bảng 1. Tóm tắt kết quả nhiễm virut trong máu theo nhóm và ngày nghiên cứu (dữ liệu pha thử thách)

Nhóm	Ngày nghiên cứu		Log_{10} bản sao ARN / ml huyết thanh					% động vật có virut trong máu
		N	Giá trị trung bình bình phương tối thiểu	Sai số chuẩn	Khoảng	Dưới CB 95%	Trên CB 95%	
T01	D181 (DC-1)	20	1,69	0,18	1,70 đến 1,70	1,31	2,08	0,0
T02	D181 (DC-1)	18	1,71	0,18	1,70 đến 1,70	1,33	2,09	0,0
T03	D181 (DC-1)	17	1,70	0,26	1,70 đến 1,70	1,17	2,22	0,0
T01	D185 (DC+3)	20	6,47	0,18	5,28 đến 7,95	6,09	6,85	100,0
T02	D185 (DC+3)	18	5,77	0,18	3,94 đến 7,13	5,38	6,15	100,0
T03	D185 (DC+3)	17	5,04	0,26	1,70 đến 7,28	4,51	5,57	88,2
T01	D188 (DC+6)	20	5,24	0,18	3,89 đến 6,40	4,86	5,62	100,0
T02	D188 (DC+6)	17	3,95	0,18	1,70 đến 5,86	3,56	4,34	94,1
T03	D188 (DC+6)	17	3,73	0,26	1,70 đến 5,45	3,20	4,26	82,4
T01	D190 (DC+8)	20	4,62	0,18	2,91 đến 6,58	4,24	5,00	100,0
T02	D190 (DC+8)	17	2,12	0,18	1,70 đến 4,17	1,74	2,51	35,3
T03	D190 (DC+8)	17	2,22	0,26	1,70 đến 4,48	1,70	2,75	29,4
T01	D191/192 (DN)	20	5,90	0,18	4,51 đến 7,35	5,52	6,28	100,0
T02	D191/192 (DN)	17	2,06	0,18	1,70 đến 3,41	1,68	2,45	35,3
T03	D191/192 (DN)	17	1,99	0,26	1,70 đến 2,95	1,46	2,51	29,4

N: số; SE: Sai số chuẩn; CB: giới hạn tin cậy; D= ngày nghiên cứu; DC: ngày thử thách; DN: ngày mổ xác; RT-qPCR dương tính: > 1,7 log10 bản sao ARN/ml.

Xuất tiết dịch mũi

Tất cả lợn âm tính với RT-qPCR PRRSV trong gạc mũi trước thử thách (D181). Sau thử thách, tất cả các lợn từ T01 trở thành lợn bị xuất tiết dịch mũi. Trong các nhóm

được chủng ngừa, tỷ lệ % lợn từng bị xuất tiết bằng đường mũi là 94% (nhóm T02) và 88% (nhóm T03). Liên quan đến nhóm T01, việc giảm đáng kể tỷ lệ % lợn xuất tiết dịch mũi quan sát được ở nhóm T03 vào các ngày 185, 188 và 191/192 (DC+3, DC+6 và DN) và trong nhóm T02 vào ngày 191/192 (DN). Không có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ % lợn xuất tiết dịch mũi được phát hiện giữa các nhóm được chủng ngừa. Lượng virut được rơi ra bằng đường mũi cao hơn đáng kể trong nhóm T01 so với nhóm T02 ở DC+6 và DN, và so với T03 ở DC+3, DC+6 và DN. So sánh giữa các nhóm được chủng ngừa đã phát hiện hiệu giá virut trong nhóm T02 so với T03 lúc DC+3. Bảng 2 tóm tắt kết quả xuất tiết dịch mũi trong khoảng thời gian 10 ngày sau thử thách.

Bảng 2. Tóm tắt kết quả xuất tiết dịch mũi theo nhóm và ngày nghiên cứu (dữ liệu sau thử thách)

Nhóm	Ngày nghiên cứu	N	Log_{10} bản sao ARN / ml Giá trị trung bình bình phương tối thiểu	Sai số chuẩn	Khoảng	Dưới 95% CB	Trên 95% CB	% lợn bị xuất tiết dịch mũi
T01	D181 (DC-1)	20	1,70	0,19	1,70 đến 1,70	1,32	2,08	0,0
T02	D181 (DC-1)	18	1,68	0,20	1,70 đến 1,70	1,28	2,08	0,0
T03	D181 (DC-1)	16	1,69	0,21	1,70 đến 1,70	1,27	2,11	0,0
T01	D185 (DC+3)	20	4,61	0,19	3,70 đến 5,51	4,23	4,99	100,0
T02	D185 (DC+3)	18	4,66	0,20	1,70 đến 6,49	4,26	5,06	88,9
T03	D185 (DC+3)	17	3,35	0,21	1,70 đến 5,44	2,94	3,75	70,6
T01	D188 (DC+6)	20	4,36	0,19	3,44 đến 5,25	3,98	4,75	100,0
T02	D188 (DC+6)	17	3,33	0,21	1,70 đến 5,21	2,92	3,74	94,1
T03	D188 (DC+6)	17	3,02	0,21	1,70 đến 5,22	2,62	3,43	76,5
T01	D190 (DC+8)	20	2,21	0,19	1,70 đến 3,69	1,83	2,59	40,0
T02	D190 (DC+8)	17	2,39	0,21	1,70 đến 4,73	1,98	2,80	35,3
T03	D190 (DC+8)	17	2,21	0,21	1,70 đến 3,92	1,80	2,61	35,3
T01	D191/192 (DN)	20	2,55	0,19	1,70 đến 5,98	2,17	2,94	50,0
T02	D191/192 (DN)	17	1,81	0,21	1,70 đến 3,25	1,40	2,22	11,8
T03	D191/192 (DN)	17	1,82	0,21	1,70 đến 2,84	1,41	2,22	11,8

N: số; SE: Sai số chuẩn; CB: giới hạn tin cậy; D= ngày nghiên cứu; DC: ngày thử thách; DN: ngày mổ xác; RT-qPCR dương tính: > 1,7 log10 bản sao ARN/ml

Xuất tiết miệng

Tất cả lợn âm tính với RT-qPCR PRRSV trong gạc lấy bệnh phẩm trong miệng trước thử thách (D181). Sau thử thách, tỷ lệ lợn mà đã từng xuất tiết miệng qua đường miệng là 9/20 (45%), 8/18 (44%) và 7/17 (41%) tương ứng trong các nhóm T01, T02 và

T03. Vào cuối quá trình nghiên cứu, tất cả những con lợn thuộc nhóm T02 và tất cả trừ một con trong nhóm T03 đều âm tính trong gạc lấy bệnh phẩm trong miệng. Trong nhóm đối chứng T01, 5/20 vẫn dương tính ở thời điểm đó; sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ % lợn có xuất tiết miệng giữa T01 và T02 là có ý nghĩa về mặt thống kê tại thời điểm kết thúc thử nghiệm (DN). Lượng virut được xuất tiết bằng đường miệng trong nhóm T01 cao hơn đáng kể so với nhóm T03 vào ngày mổ xác, tương ứng với 9/10 ngày sau thử thách. Tải lượng virut cũng cao hơn đáng kể trong nhóm T02 so với cả hai nhóm T01 và T03 vào ngày 185 (DC+3). Bảng 3 tóm tắt kết quả xuất tiết miệng trong thời gian 10 ngày sau thử thách.

Bảng 3. Tóm tắt kết quả xuất tiết miệng theo nhóm và ngày nghiên cứu (dữ liệu sau thử thách)

Nhóm	Ngày nghiên cứu	N	Log_{10} bản sao ARN / ml Giá trị trung bình bình phương tối thiểu	Sai số chuẩn	Khoảng	Dưới 95% CB	Trên 95% CB	% lợn xuất tiết miệng
T01	D181 (DC-1)	20	1,70	0,07	1,70 đến 1,70	1,57	1,83	0,0
T02	D181 (DC-1)	18	1,70	0,12	1,70 đến 1,70	1,45	1,95	0,0
T03	D181 (DC-1)	17	1,70	0,08	1,70 đến 1,70	1,54	1,86	0,0
T01	D185 (DC+3)	20	1,79	0,07	1,70 đến 2,71	1,66	1,93	10,0
T02	D185 (DC+3)	18	2,17	0,12	1,70 đến 5,65	1,92	2,42	27,8
T03	D185 (DC+3)	17	1,79	0,08	1,70 đến 2,52	1,64	1,95	11,8
T01	D188 (DC+6)	20	1,85	0,07	1,70 đến 2,86	1,72	1,98	15,0
T02	D188 (DC+6)	17	1,95	0,13	1,70 đến 2,59	1,70	2,20	23,5
T03	D188 (DC+6)	17	2,11	0,08	1,70 đến 3,66	1,95	2,26	35,3
T01	D190 (DC+8)	20	1,70	0,07	1,70 đến 1,70	1,57	1,83	0,0
T02	D190 (DC+8)	17	1,75	0,13	1,70 đến 1,70	1,49	2,00	0,0
T03	D190 (DC+8)	17	1,70	0,08	1,70 đến 1,70	1,54	1,86	0,0
T01	D191/192 (DN)	20	1,95	0,07	1,70 đến 3,16	1,81	2,08	25,0
T02	D191/192 (DN)	17	1,73	0,13	1,70 đến 1,70	1,48	1,99	0,0
T03	D191/192 (DN)	17	1,72	0,08	1,70 đến 2,00	1,56	1,87	5,9

N: số; SE: Sai số chuẩn; CB: giới hạn tin cậy; D= ngày nghiên cứu; DC: ngày thử thách; DN: ngày mổ xác; RT-qPCR dương tính: > 1,7 log10 bản sao ARN/ml

Quan sát lâm sàng

Không có con lợn nào thể hiện tình trạng chung bất thường, suy kiệt, suy hô hấp, ho hoặc hắt hơi trong toàn bộ khoảng thời gian sau thử thách.

Nhiệt độ trực tràng

Bảng 4 tóm tắt kết quả nhiệt độ trực tràng trong khoảng thời gian sau thử thách. Trong nhóm T01, 5/20 lợn (25%) bị sốt (RT ≥ 40,5) ít nhất một lần trong khoảng thời gian sau thử thách. Trong các nhóm được chủng ngừa T02 và T03, tỷ lệ lợn bị sốt sau thử thách tương ứng là 8/18 (44%) và 12/17 (71%). Nhiệt độ trực tràng cao hơn đáng kể ở cả hai nhóm được chủng ngừa T02 và T03 so với nhóm T01, vào ngày 185 (DC+3).

Bảng 4. Tóm tắt kết quả nhiệt độ trực tràng ở lợn con theo nhóm và ngày nghiên cứu

			Nhiệt độ trực tràng (°C)					
Nhóm	Ngày nghiên cứu	N	LSM	Sai số chuẩn	Khoảng	Dưới 95% CB	Trên 95% CB	% lợn bị sốt (RT≥40,5)
T01	D182 (DC)	20	39,5	0,09	39 đến 40,32	39,3	39,7	0,0
T02	D182 (DC)	18	39,7	0,13	39 đến 40,85	39,4	39,9	5,6
T03	D182 (DC)	17	39,7	0,12	38,94 đến 40,43	39,4	39,9	0,0
T01	D185 (DC+3)	20	39,9	0,09	39,06 đến 40,82	39,7	40,1	5,0
T02	D185 (DC+3)	18	40,3	0,13	39,39 đến 41,54	40,1	40,6	33,3
T03	D185 (DC+3)	17	40,4	0,12	39,3 đến 41,14	40,1	40,6	52,9
T01	D188 (DC+6)	20	40,0	0,09	39,14 đến 40,8	39,8	40,1	25,0
T02	D188 (DC+6)	17	40,1	0,14	39,14 đến 41,02	39,9	40,4	29,4
T03	D188 (DC+6)	17	40,2	0,12	39,36 đến 41,38	39,9	40,4	29,4
T01	D190 (DC+8)	20	39,5	0,09	38,9 đến 40,26	39,3	39,7	0,0
T02	D190 (DC+8)	17	39,7	0,14	39,02 đến 40,75	39,4	39,9	5,9
T03	D190 (DC+8)	17	39,6	0,12	39,07 đến 40,86	39,4	39,9	17,6
T01	D191(DC+9)	20	39,5	0,09	38,85 đến 39,95	39,3	39,7	0,0
T02	D191(DC+9)	17	39,7	0,14	39,02 đến 40,2	39,4	40,0	0,0
T03	D191(DC+9)	17	39,7	0,12	38,9 đến 41,15	39,5	40,0	5,9

LSM: Giá trị trung bình bình phương nhỏ nhất; SE: Sai số chuẩn; CB: giới hạn tin cậy; RT: nhiệt độ trực tràng

Tổn thương phổi

Tỷ lệ % phổi bị tổn thương đối với mỗi nhóm điều trị được thể hiện trên bảng 5. Điểm số hình ảnh trực quan phổi được thể hiện trên bảng 6. Khi mổ xác, 18/20 lợn (90%) từ nhóm đối chứng T01 có điểm số hình ảnh trực quan phổi dương tính, chỉ ra rằng thử thách PRRSV thành công trong việc gây ra tổn thương phổi. Trong các nhóm T02 và T03, 12/17 (71%) và 7/16 (44%) lợn cũng có điểm số dương tính. Một con lợn trong nhóm T03 (#300) đã thể hiện viêm màng phổi chảy mủ ảnh hưởng đến 10 đến 70% thùy phổi phải, từ 2 đến 30% thùy phổi trái và 70% thùy phụ, vì thế che khuất sự có mặt của các tổn thương có thể liên quan đến PRRSV. Dữ liệu từ con lợn này được gắn cờ từ phân tích (xem thông báo gắn cờ trong MSF). Tỷ lệ % phổi có các tổn thương quan sát được lúc mổ xác cao hơn đáng kể trong nhóm đối chứng T01 so với các nhóm được chủng

ngừa T02 và T03. Không có sự khác biệt được phát hiện giữa các nhóm được chủng ngừa.

Bảng 5. Tóm tắt tỷ lệ % phổi có các tổn thương

Nhóm	N	LSM* được biến đổi trở lại	Sai số chuẩn	Thấp hơn 95% CB	Trên 95% CB	Khoảng
T01	20	3,7 [A]	0,61	2,6	5,0	0,2 đến 13,5
T02	17	1,0 [B]	0,35	0,5	1,9	0,0 đến 4,4
T03	16	0,7 [B]	0,30	0,2	1,5	0,0 đến 5,2

*Các ký tự trên khác nhau cho thấy sự khác biệt đáng kể về thống kê.

Bảng 6. Điểm số đánh giá cảm quan phổi của nhóm điều trị

Nhóm	Điểm số đánh giá cảm quan								Tổng quan sát
	0 (Không tổn thương)		1 (Tổn thương nhẹ)		2 (Tổn thương vừa phải)		3 (Tổn thương nghiêm trọng)		
	Số	%	Số	%	Số	%	Số	%	Số
T01	2	10,0	17	85,0	1	5,0	0	0,0	20
T02	5	29,4	12	70,6	0	0,0	0	0,0	17
T03	9	56,3	7	43,8	0	0,0	0	0,0	16

Kết quả huyết thanh học (ELISA)

Tóm tắt kết quả huyết thanh học được thể hiện trên bảng 7. Kết quả ELISA thu được từ các mẫu được thu thập từ vào khoảng thời gian hàng tháng trong giai đoạn chủng ngừa chỉ được tóm tắt bằng thống kê mô tả (trung bình nhân và độ lệch chuẩn); sự khác biệt giữa các nhóm không thể đánh giá được bởi vì không lặp lại y hệt đơn vị thí nghiệm (việc điều trị không được kết hợp). Sự khác biệt giữa các nhóm chỉ được thử nghiệm vào ngày nghiên cứu 181, sau khi trộn lẫn động vật cho giai đoạn thử thách. Tất cả lợn là ELISA âm tính trước khi chủng ngừa (tỷ lệ IDEXX S/P < 0,4). Lợn từ nhóm đối chứng T01 vẫn âm tính cho đến khi thử thách. Một tháng sau chủng ngừa (ngày 28), tất cả lợn từ các nhóm T02 và T03 đã phát triển kháng thể với PRRSV và tất cả chúng vẫn dương tính lúc thử thách (6,5 tháng sau chủng ngừa). So sánh giữa các nhóm vào ngày 181 (DC-1) đã thấy giá trị trung bình bình phương cao hơn đáng kể của hiệu giá kháng thể trong nhóm T03 so với nhóm T02.

Bảng 7. Tóm tắt kết quả ELISA tỷ lệ S/P,

Điều trị số	Ngày nghiên cứu	N	Trung bình nhân/LSM*	SD/SE	Khoảng	% huyết thanh dương tính
T01	Ngày 0	20	0,023	0,002	-0,019 đến 0,239	0,0
T02	Ngày 0	18	0,006	0,000	-0,015 đến 0,140	0,0
T03	Ngày 0	17	0,001	0,000	-0,018 đến 0,100	0,0
T01	Ngày 28	20	-0,013	-0,000	-0,025 đến 0,018	0,0
T02	Ngày 28	18	2,487	0,174	2,112 đến 2,923	100,0
T03	Ngày 28	17	2,496	0,218	2,022 đến 3,037	100,0
T01	Ngày 56	20	-0,010	-0,001	-0,079 đến 0,182	0,0
T02	Ngày 56	18	2,366	0,832	-0,078 đến 3,591	94,4
T03	Ngày 56	17	2,523	0,317	1,656 đến 3,452	100,0
T01	Ngày 83	20	0,011	0,000	-0,013 đến 0,080	0,0
T02	Ngày 83	18	2,249	0,328	1,556 đến 2,852	100,0
T03	Ngày 83	17	2,281	0,322	1,582 đến 3,162	100,0
T01	Ngày 113	20	0,042	0,001	-0,003 đến 0,091	0,0
T02	Ngày 113	18	1,598	0,333	0,692 đến 2,606	100,0
T03	Ngày 113	17	1,797	0,360	0,956 đến 2,938	100,0
T01	Ngày 140	20	0,023	0,001	-0,005 đến 0,118	0,0
T02	Ngày 140	18	1,270	0,249	0,612 đến 2,076	100,0
T03	Ngày 140	17	1,461	0,316	0,526 đến 2,534	100,0
T01	Ngày 168	20	0,034	0,001	-0,002 đến 0,122	0,0
T02	Ngày 168	18	1,433	0,329	0,709 đến 2,780	100,0
T03	Ngày 168	17	1,674	0,427	0,677 đến 3,175	100,0
T01	Ngày 181	20	0,055	0,001	0,006 đến 0,200	0,0
T02	Ngày 181	18	1,190	0,060	0,477 đến 1,959	100,0
T03	Ngày 181	17	1,527	0,068	0,665 đến 2,422	100,0

*Các kết quả từ các ngày 0, 28, 56, 83, 113, 140 và 168 được biểu diễn bằng giá trị trung bình nhân và độ lệch chuẩn (standard deviation - SD). Ngày 181 với giá trị trung bình bình phương tối thiểu được biến đổi ngược lại – (LSM) và sai số chuẩn (SE);; ELISA dương tính: Tỷ lệ S/P ≥ 0,4

Virut trong máu và xuất tiết

Trước khi phân tích thống kê RT-qPCR được biến đổi bằng cách sử dụng phép chuyển đổi logarit thích hợp. Dữ liệu đã chuyển đổi được phân tích bằng cách sử dụng

mô hình hỗn hợp đo lặp lại tuyến tính tổng quát. So sánh kết quả điều trị theo cặp được thực hiện tại mỗi thời điểm xem hiệu quả điều trị hoặc sự tương tác điều trị theo thời điểm có ý nghĩa hay không (P≤0,05). Giá trị trung bình bình phương tối thiểu của điều trị và khoảng tin cậy 95% đã được chuyển đổi trở lại để trình bày. Tỷ lệ % của động vật có virut trong máu/sản phẩm reo rắc virut cũng được tính. Từng mẫu được xác định là dương tnhs nêu >50 bản sao ARN của PRRSV /mL (1,7 log10 bản sao ARN của PRRSV /mL), tương ứng với một nửa giới hạn phát hiện của kỹ thuật (100 bản sao ARN của PRRSV/mL). Người ta cũng xác định xem một con vật đã từng có virut trong máu hay đã từng xuất tiết vào các ngày ≤DC (tham chiếu đến thử thách trước) và các ngày > DC (sau thử thách). Các bảng tần suất đối với tình trạng nhiễm virut trong máu được tính tại mỗi thời điểm và động vật có từng nhiễm virut trong máu vào các ngày trước thử thách và các ngày sau khi thử thách hay không.

Nhiệt độ trực tràng

Nhiệt độ trực tràng được phân tích bằng cách sử dụng phân tích mô hình hỗn hợp đo lặp lại tuyến tính tổng quát. So sánh kết quả điều trị theo cặp được thực hiện tại mỗi thời điểm xem hiệu quả điều trị hoặc sự tương tác điều trị theo thời điểm có ý nghĩa hay không (P≤0,05). Giá trị trung bình bình phương tối thiểu của điều trị, khoảng tin cậy 95%, giá trị tối thiểu và tối đa được tính cho mỗi thời điểm. Thống kê mô tả, giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, và các khoảng, được tính cho mỗi điều trị và ngày nghiên cứu, trước thử thách.

Phân phối tần số của động vật bị sốt (nhiệt độ trực tràng ≤ 40,5°C) được tính cho mỗi dữ liệu điều trị và thời điểm được thu thập. Người ta cũng xác định xem một con vật bị sốt trong các ngày ≤DC và trong các ngày> DC hay không. Các bảng tần suất đối với một con vật bị sốt được tính cho từng giai đoạn, các ngày ≤DC và các ngày> DC.

Huyết thanh học (ELISA)

Trước khi phân tích thống kê huyết thanh học được chuyển đổi, nếu cần, bằng cách sử dụng phép chuyển đổi logarit thích hợp. Dữ liệu huyết thanh học đã chuyển đổi được phân tích bằng cách sử dụng mô hình hỗn hợp đo lặp lại tuyến tính tổng quát. So sánh kết quả điều trị theo cặp được thực hiện tại mỗi thời điểm xem hiệu quả điều trị

hoặc sự tương tác điều trị theo thời điểm có ý nghĩa hay không (P≤0,05). Giá trị trung bình bình phương tối thiểu của điều trị và khoảng tin cậy 95% được chuyển đổi trở lại để trình bày. Ngoài ra, sự phân phối tần suất của các kết quả dương tính/âm tính được tính cho mỗi điều trị tại mỗi thời điểm. Ngoài ra, người ta cũng xác định đối với mỗi con vật có được chuyển đổi huyết thanh (tỷ lệ S/P ≥ 0,4) tại thời điểm bất kỳ trong suốt thử nghiệm hay không. Sự phân phối tần suất của việc có hay không có động vật được chuyển đổi huyết thanh được tính cho mỗi điều trị. Thống kê mô tả, giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, và các khoảng, được tính cho mỗi điều trị, trước thử thách.

Quan sát lâm sàng

Phân phối tần suất của các dấu hiệu lâm sàng trước thử thách và dấu hiệu lâm sàng sau thử thách được tính, một cách riêng rẽ, đối với mỗi dữ liệu thời điểm và điều trị được thu thập. Sự phân phối tần suất về việc động vật đã từng có dấu hiệu lâm sàng hay không, đối với từng pha (các ngày ≤DC và các ngày >DC), được tính cho mỗi điều trị.

Thể trọng

Thể trọng được phân tích bằng cách sử dụng mô hình hỗn hợp đo lặp lại tuyến tính tổng quát. Giá trị trung bình bình phương tối thiểu, sai số chuẩn, khoảng tin cậy 95%, các giá trị tối thiểu và các giá trị tối đa được tính cho mỗi điều trị tại mỗi thời điểm. So sánh kết quả điều trị theo cặp được thực hiện giữa các phép điều trị tại mỗi thời điểm xem hiệu quả điều trị và/hoặc sự tương tác điều trị theo thời điểm có ý nghĩa hay không. Sai số chuẩn và khoảng tin cậy 95% của các ước lượng được tính. Thống kê mô tả, giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, và các khoảng, được tính cho mỗi điều trị, trước thử thách. Mức ước lượng tăng trọng trung bình hàng ngày và các so sánh được tính bằng cách sử dụng các thông số ước lượng từ mô hình.

Tổn thương phổi

Tỷ lệ phần trăm của toàn bộ phổi bị thương tổn được tính theo công thức sau: Tỷ lệ % toàn bộ phổi bị tổn thương =(0,10 x trái trước) + (0,10 x trái giữa) + (0,25 x trái sau) + (0,10 x phải trước) + (0,10 x phải giữa) + (0,25 x phải sau) + (0,10 x thùy phụ). Chuyển đổi căn bậc hai arcsine được áp dụng cho tỷ lệ % của toàn bộ phổi bị tổn thương trước phân tích. Tổn thương phổi đã chuyển đổi được phân tích bằng mô hình hỗn hợp

tuyến tính tổng quát. Việc so sánh theo cặp được thực hiện giữa các nhóm điều trị xem hiệu quả điều trị có ý nghĩa hay không. Giá trị trung bình bình phương tối thiểu được biến đổi ngược lại của tỷ lệ % toàn bộ phổi bị tổn thương, sai số chuẩn của chúng, và khoảng tin cậy 95% của chúng được tính cũng như các giá trị tối thiểu và tối đa.

Điểm đánh giá tổn thương phổi.

Phân phối tần suất của điểm đánh giá tổn thương phổi được tính cho mỗi điều trị. Điểm số, bình thường hoặc không bình thường, được phân tích bằng cách sử dụng mô hình hỗn hợp tuyến tính tổng quát đối với dữ liệu nhị thức. Nếu mô hình hỗn hợp tuyến tính tổng quát không hội tụ, kiểm định Fisher Exact được sử dụng để phân tích dữ liệu. Nếu hiệu quả chính của điều trị là đáng kể, thì so sánh hiệu quả điều trị theo cặp được thực hiện.

Mô hình phân tích

Tỷ lệ % biến đổi của toàn bộ phổi bị tổn thương được phân tích bằng mô hình hỗn hợp tuyến tính tổng quát với các tác động cố định, điều trị, và các tác động ngẫu nhiên bãi nhốt và lô đất trong bãi nhốt. Tổ hợp tuyến tính của các thông số ước lượng được sử dụng trong kiểm định trước sau khi thử nghiệm về hiệu quả điều trị có ý nghĩa ($P \leq 0,05$). Việc so sánh được thực hiện giữ các phép điều trị. Mức ý nghĩa 5% ($P \leq 0,05$) được sử dụng để đánh giá sự khác biệt thống kê. Giá trị trung bình bình phương tối thiểu (biến đổi ngược lại), sai số chuẩn, 95% khoảng tin cậy của các giá trị trung bình bình và các khoảng được tính cho mỗi phép điều trị.

Tình trạng virut trong máu được phân tích bằng mô hình hỗn hợp đo lặp lại tuyến tính tổng quát với một liên kết logit với tác động cố định: điều trị, thời điểm, và sự tương tác điều trị theo thời điểm, và các tác động ngẫu nhiên: bãi nhốt, lô đất trong bãi nhốt, và động vật trong lô đất, bãi nhốt, và điều trị, mà là thông số của động vật. Tổ hợp tuyến tính của các thông số ước lượng được sử dụng trong kiểm định trước sau khi thử nghiệm về hiệu quả điều trị có ý nghĩa ($P \leq 0,05$) hoặc sự tương tác điều trị theo thời điểm. Việc so sánh được thực hiện giữ các phép điều trị tại mỗi thời điểm. Mức ý nghĩa 5% ($P \leq 0,05$) được sử dụng để đánh giá sự khác biệt thống kê. Giá trị trung bình bình phương tối thiểu (biến đổi ngược lại), sai số chuẩn, và khoảng tin cậy 95% của giá trị trung bình đối với

mỗi phép điều trị và thời điểm. Nếu mô hình không hội tụ, kiểm định Fisher Exact được sử dụng để phân tích.

Điểm số đánh giá phổi, bình thường/không bình thường, và nếu đã từng có virut trong máu được phân tích bằng mô hình hỗn hợp tuyến tính tổng quát với với việc điều trị là các tác động cố định, và tác động ngẫu nhiên là bãi nhốt và khu đất trong bãi nhốt, thông qua GLIMMIX. Nếu hiệu quả chính của điều trị là đáng kể, thì so sánh hiệu quả điều trị theo cặp được thực hiện. Nếu GLIMMIX không hội tụ, kiểm định Fisher Exact được sử dụng để phân tích.

Tải lượng virut, huyết thanh học, thể trọng, và nhiệt độ trực tràng được phân tích bằng mô hình hỗn hợp đo lặp lại tuyến tính tổng quát với các tác động cố định: điều trị, thời điểm, và sự tương tác điều trị theo thời điểm, và các tác động ngẫu nhiên: bãi nhốt, lô đất trong bãi nhốt, và động vật trong lô đất, bãi nhốt, và điều trị, mà là thông số của động vật. Tổ hợp tuyến tính của các thông số ước lượng được sử dụng trong kiểm định trước sau khi thử nghiệm về hiệu quả điều trị có ý nghĩa ($P \leq 0,05$) hoặc sự tương tác điều trị theo thời điểm. Việc so sánh được thực hiện giữ các phép điều trị tại mỗi thời điểm. Mức ý nghĩa 5% ($P \leq 0,05$) được sử dụng để đánh giá sự khác biệt thống kê. Giá trị trung bình bình phương tối thiểu (biến đổi ngược lại đối với tải lượng virut và huyết thanh học), sai số chuẩn, khoảng tin cậy 95% của giá trị trung bình và các khoảng được tính cho mỗi điều trị và thời điểm. Tất cả các thử nghiệm giả thuyết được thực hiện ở mức có ý nghĩa là 0,05 bằng cách sử dụng kiểm định hai đầu.

Thảo luận

Mục đích của nghiên cứu này là để đánh giá khoảng thời gian miễn dịch (DOI) của vacxin sống được cải biến PRRSV châu Âu (SEQ ID NO:5) ở lợn được chủng ngừa lúc 1 ngày tuổi bằng đường trong cơ (IM, nhóm T02) hoặc đường trong mũi (IN, nhóm T03), khi chủng với thể phân lập PRRS kiểu gen I làm thử thách hô hấp ở 26 tuần sau chủng ngừa. Biến số chính trong việc xác định hiệu quả là tải lượng virut trong huyết thanh (nhiễm virut trong máu) của các nhóm điều trị T02 và T03 trong so sánh với lợn T01. Tổn thương phổi, nhiệt độ trực tràng, xuất tiết, dấu hiệu lâm sàng và thể trọng được so sánh dưới dạng biến số thứ hai.

Thử nghiệm là hợp lệ khi tất cả các lợn T01 vẫn còn âm tính với virut PRRS trong suốt thời gian chủng ngừa và không có yếu tố bệnh gây nhiễu được phát hiện. Hiệu quả bảo vệ của cả hai đường chủng ngừa IM và IN được quan sát khi so sánh tải lượng virut trong huyết thanh giữa các nhóm; nhóm đối chứng T01 có hiệu giá virut cao hơn đáng kể so với các nhóm được chủng ngừa T02 và T03 ở tất cả các ngày lấy mẫu sau khi chủng ngừa. Ngoài ra, liên quan đến nhóm đối chứng, tỷ lệ lợn có virut trong máu cũng được giảm đáng kể vào các ngày 8 và 9/10 sau thử thách ở cả hai nhóm được chủng ngừa. Khi các nhóm được chủng ngừa được so sánh, hiệu giá virut thấp hơn đáng kể được phát hiện vào ngày 185 (DC+3) trong nhóm được chủng ngừa bằng đường IN (T03) so với nhóm được chủng ngừa trong cơ (T02). Lợi ích của việc chủng ngừa qua IM và IN đối với việc sao chép của virut cũng được hỗ trợ bởi việc giảm đáng kể lượng virut được xuất tiết bằng đường mũi cũng như tỷ lệ % lợn có xuất tiết dịch mũi quan sát được ở cả hai nhóm được chủng ngừa Ngoài ra, tác dụng tích cực của việc chủng ngừa cũng quan sát được đối với việc xuất tiết miệng ở 9/10 ngày sau thử thách, như được chứng tỏ bằng việc giảm đáng kể tải lượng virut (nhóm T03) hoặc tỷ lệ % lợn dương tính trong gạc lấy bệnh phẩm trong miệng (nhóm T02) so với nhóm đối chứng.

Sau thử thách, nhiệt độ trực tràng cao hơn đáng kể ở cả hai nhóm được chủng ngừa so với nhóm đối chứng ở DC+3. Tại thời điểm đó, tỷ lệ lợn bị sốt (RT≥40,5°C) trong các nhóm được chủng ngừa bằng IVP bằng đường IM và IN tương ứng là 6/18 (33%) và 9/17 (53%). Trong nhóm đối chứng, chỉ 1/20 (5%) bị sốt ở DC+3. Tuy nhiên, đáng chú ý là phải đề cập rằng tại thời điểm đó (DC+3), tải lượng virut được phát hiện trong huyết tương đã thực sự giảm đáng kể ở cả hai nhóm được chủng ngừa so với nhóm đối chứng, vì thế đề xuất rằng việc sao chép của PRRSV có lẽ không phải là lý do duy nhất làm cho nhiệt độ trực tràng tăng quan sát được ở các lợn được chủng ngừa ngay sau khi thử thách. Ngoài ra, từ đó trở đi, nhiệt độ trực tràng của lợn được chủng ngừa giảm và, đến khoảng ngày 8 sau thử thách, nhiệt độ trực tràng trung bình trong tất cả các nhóm đều dưới 40°C.

Ngoài nhiệt độ trực tràng tăng, không có con lợn nào từ nhóm bất kỳ thể hiện dấu hiệu lâm sàng phù hợp với PRRSV (tình trạng cơ thể bất thường, suy nhược, suy hô hấp, ho hoặc hắt hơi) trong toàn bộ khoảng thời gian sau thử thách. Ngoài ra, không có sự

khác biệt trong thể trọng hoặc lượng tăng thể trọng trung bình hàng ngày được phát hiện giữa các nhóm.

Khi mổ xác, 18/20 lợn (90%) từ nhóm đối chứng T01 có điểm số hình ảnh trực quan phổi dương tính, chỉ ra rằng thử thách PRRSV thành công trong việc gây ra tổn thương phổi. Trong các nhóm T02 và T03, 12/17 (71%) và 7/16 (44%) lợn cũng có điểm số dương tính. Việc so sánh giữa các nhóm điều trị đã thể hiện % phổi có tổn thương trong nhóm đối chứng cao hơn đáng kể so với các nhóm được chủng ngừa, chứng tỏ lợi ích của việc chủng ngừa đối với việc giảm tổn thương phổi liên quan đến PRRSV không phụ thuộc vào đường dùng.

Dữ liệu huyết thanh học đã chứng tỏ việc chủng ngừa bằng IVP bằng đường dùng IM hoặc IN trong việc phát triển kháng thể đặc hiệu PRRSV trong vòng 28 ngày sau chủng ngừa. Tất cả lợn đã chủng ngừa có huyết thanh dương tính với kháng thể PRRSV lúc thử thách (6,5 tháng sau chủng ngừa), chỉ ra rằng cả hai đường dùng có thể gây ra đáp ứng kháng thể bảo vệ và mạnh mẽ với việc chủng ngừa. Tuy nhiên, việc so sánh giữa các nhóm được chủng ngừa đã thể hiện hiệu giá kháng thể cao hơn đáng kể trong nhóm được chủng ngừa bằng đường IN so với nhóm được chủng ngừa bằng đường IM.

Mặc dù việc chủng ngừa bằng cả đường IN và IM tạo ra sự bảo vệ rõ ràng chống lại thử thách PRRSV ở 26 tuần sau chủng ngừa, việc so sánh giữa các nhóm đã cho thấy rằng lúc 3 ngày sau thử thách, nhóm được chủng ngừa bằng đường IN (T03) có lượng virut trong máu, xuất tiết dịch mũi và xuất tiết miệng thấp hơn đáng kể so với nhóm được chủng ngừa trong cơ (T02). Các kết quả này chỉ ra rằng, trong các điều kiện của thử nghiệm này, hiệu quả bảo vệ thu được sau khi chủng ngừa IN là mạnh hơn sau khi chủng ngừa IM. Sự khác biệt về kết quả virut học này sẽ được giải thích bằng hiệu giá kháng thể cao hơn đáng kể được phát hiện bằng ELISA trước thử thách trong nhóm được chủng ngừa bằng đường IN (tỷ lệ S/P nằm trong khoảng: 0,665-2,422), so với nhóm được chủng ngừa bằng đường IM (tỷ lệ S/P nằm trong khoảng: 0,477-1,959).

Việc chủng ngừa bằng cách dùng một lần vacxin MLV PRRSV châu Âu (SEQ ID NO:5) chứa liều 2,5 log10 CCID50 cho lợn 1 ngày tuổi huyết thanh dương tính bằng đường dùng IM hoặc IN tạo ra thời gian miễn dịch là 26 tuần, như được quan sát bằng

việc giảm đáng kể tải lượng virut được phát hiện trong huyết thanh sau khi thử thách chủng PRRSV châu Âu gây bệnh lúc 26 tuần sau chủng ngừa. Hiệu quả cũng được củng cố bằng việc làm giảm đáng kể tỷ lệ % tổn thương phổi lúc mổ xác, cũng như giảm xuất tiết dịch mũi và miệng.

Phương pháp phòng thí nghiệm

Liên quan đến RT qPCR, nhiễm virut trong máu (tải lượng PRRSV trong huyết thanh) và sự reo rắc virut (tải lượng PRRSV trong gạc lấy bệnh phẩm) được xác định bằng qPCR phiên mã ngược (RT) được thực hiện sau SOP cục bộ trên các mẫu huyết thanh được thu thập trước khi chủng ngừa (D-1), trước khi thử thách (D62) và lúc 3, 5, 7 và 10 ngày sau thử thách (D66, D68, D70 và D73). Tóm lại, ARN virut được tinh chế được sử dụng làm khuôn, được phiên mã ngược ở 50°C trong 30 phút, và được biến tính ở 95oC trong 5 phút. Chương trình PCR của phản ứng gồm 40 chu trình biến tính ở 95oC trong 20 giây và ủ ở 53°C trong 40 giây. qRT-PCR được thực hiện trong máy luân nhiệt hệ thống PCR thời gian thực 7500. Các đoạn mồi và mẫu dò thích hợp được chọn cho virut Lelystad như sau:

Mồi xuôi (Lelystad F): 5'-GCACCACCTCACCCAGAC-3' (SEQ ID NO: 6, nồng độ cuối cùng 0,5 micromol).

Mồi ngược (Lelystad R): 5'-CAGTTCCTGCGCCTTGAT-3' (SEQ ID NO:7, nồng độ cuối cùng 0,5 micromol).

Mẫu dò (Lelystad S): 5'-6-FAM- CCTCTGCTTGCAATCGATCCAGAC – TAMRA-3' (SEQ ID NO:8, nồng độ cuối cùng 0,6 micromol).

Huyết thanh học (ELISA)

Huyết thanh được thu thập trước khi chủng ngừa (D0), trước khi thử thách (D67) và lúc mổ xác (D77) được thử nghiệm các kháng thể đối với PRRSV bằng cách sử dụng IDEXX PRRS X3 ELISA, theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Vắn tắt, các mẫu huyết thanh được pha loãng tỷ lệ 1:40 trong đĩa 96 lỗ được phủ kháng nguyên PRRSV tái tổ hợp và được ủ 30 phút ở 18-26°C. Sau khi rửa, thể liên hợp peroxidaza cây cải ngựa kháng lợn được bổ sung và các đĩa được ủ trong 30 phút nữa ở 18-26°C. Thể liên hợp không gắn kết được rửa trôi và chất TMB được bổ sung vào các lỗ. Việc hiện màu được

xác định ở 650 nm. Các giá trị S/P được ghi nhận đối với từng mẫu. Nếu tỷ lệ S/P là ≥ 0,4 mẫu được phân loại là dương tính với kháng thể PRRS. Nếu tỷ lệ S/P < 0,4 mẫu được phân loại làm âm tính. Hướng dẫn ELISA được bao gồm trong hồ sơ nghiên cứu.

Ví dụ 4 - Khởi phát tính miễn dịch (OOI) của vacxin PRRSV châu Âu sống được cải biến cho lợn 2 tuần tuổi đối với thử thách bằng thể phân lập PRRSV châu Âu lúc 4 tuần sau chủng ngừa

Mục đích của nghiên cứu là đánh giá sự khởi phát tính miễn dịch (Onset of Immunity - OOI) của vacxin PRRSV châu Âu thử nghiệm (virut SEQ ID NO:5) được dùng cho lợn 2 tuần tuổi để ngăn ngừa bệnh hô hấp gây ra bởi PRRSV lúc 4 tuần sau chủng ngừa. Biến số chính trong việc xác định hiệu quả ngăn ngừa bệnh là tải lượng virut trong huyết thanh trong nhóm điều trị T02 (được chủng ngừa bằng vật phẩm thử nghiệm) so với T01 (được chủng ngừa bằng sản phẩm đối chứng), được củng cố bởi tổn thương phổi, xuất tiết miệng và mũi, các hệ quả lâm sàng, nhiệt độ trực tràng và thể trọng.

Ở độ tuổi 14-15 ngày, liều đơn 2,0 mL sản phẩm đối chứng (CP) hoặc vật phẩm thử nghiệm (TI, virut SEQ ID NO:5) được dùng làm chất tiêm trong cơ cho mỗi động vật. Bốn tuần sau chủng ngừa, lợn được thử thách trong mũi bằng thể phân lập PRRSV châu Âu Olot/91 làm thử thách hô hấp. Trong suốt pha thử thách, mẫu máu, gạc lấy bệnh phẩm mũi và miệng, các dấu hiệu lâm sàng và nhiệt độ trực tràng được thu thập mỗi 2-3 ngày cho đến ngày mổ xác. Lợn được cân vào ngày trước khi chủng ngừa, trước khi thử thách, và lúc mổ xác. Mười ngày sau thử thách, lợn được gây mê, cho chết êm ái và mổ xác. Khi mổ xác, phổi được đánh giá sự có mặt của tổn thương PRRSV và được tính điểm. Nghiên cứu là hợp lệ khi cả các lợn T01 vẫn còn âm tính với virut và huyết thanh PRRSV trong suốt thời gian chủng ngừa và không có yếu tố bệnh gây nhiễu được phát hiện.

Hiệu quả bảo vệ của việc chủng ngừa được quan sát khi so sánh tải lượng virut trong huyết thanh giữa các nhóm. Nhóm được chủng ngừa bằng TI (T02) có hiệu giá virut thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng ở tất cả các ngày lấy mẫu sau khi chủng ngừa.

Hiệu quả cũng được củng cố bởi việc giảm đáng kể tỷ lệ % phổi có tổn thương lúc mổ xác (10 ngày sau thử thách), giảm xuất tiết dịch mũi và miệng, cũng như giảm nhiệt độ trực tràng lúc 7 ngày sau thử thách. Không có sự khác biệt được phát hiện về thể trọng. Việc chủng ngừa đã cảm ứng sự phát triển kháng thể đặc hiệu PRRSV trong vòng 4 tuần sau chủng ngừa. Mười ngày sau thử thách, hiệu giá kháng thể duy trì cao hơn đáng kể trong nhóm T02 so với nhóm đối chứng (T01). Tóm lại, việc dùng một lần trong cơ vacxin MLV PRRSV châu Âu thử nghiệm chứa liều 2,0 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ cho lợn 14-15 ngày tuổi (huyết thanh âm tính với PRRSV) có tác dụng bảo vệ kháng bệnh hô hấp gây ra sau khi thử thách bằng chủng PRRSV châu Âu gây bệnh lúc 4 tuần sau chủng ngừa. Thiết kế thử nghiệm như sau:

Nhóm	Chủng ngừa (ngày 0)		Thử thách (ngày 27)		N
	Vật liệu thử nghiệm	Liều	Vật liệu thử nghiệm	Liều	
T01	Sản phẩm đối chứng	2 mL	PRRSV Olot/91	5,4 $\log_{10}$ $CCID_{50}$/2 mL	20
T02	Mục thí nghiệm	2,0 $\log_{10}$ $CCID_{50}$/2 mL	PRRSV Olot/91	5,4 $\log_{10}$ $CCID_{50}$/2 mL	20

Vào ngày 27, sau khi lợn bị nhốt lại, tất cả động vật được thử thách bằng 2 ml chủng thử thách Olot/91, bằng đường trong mũi (IN). Lợn được thử thách bằng tổng thể tích thử thách là 2,0 mL bằng cách nhỏ giọt 1,0 mL vật liệu thử thách vào mỗi lỗ mũi. Lợn được giữ trong tư thế ngẩng cao đầu trong vài giây sau thử thách.

Quan sát lâm sàng và nhiệt độ trực tràng

Các quan sát lâm sàng bao gồm tình trạng bệnh lý tổng quát, suy yếu, hắt hơi, ho và suy hô hấp. Nhiệt độ trực tràng được thu thập theo quy trình chuẩn cục bộ. Các ngày (trước và sau chủng ngừa/chủng thử thách) trong đó việc khám lâm sàng hoàn chỉnh không được thực hiện, sức khỏe chung của lợn được quan sát và ghi lại trong biểu mẫu chăm sóc động vật hàng ngày (DRAC) hàng ngày (DRAC) sau SOP chuẩn.

Mổ xác và tính điểm số phổi.

Khi mổ xác, các tổn thương phổi được tính điểm bằng cách sử dụng các phương pháp sau: 1) tỷ lệ % đặc của mỗi thùy (trái trước, trái giữa, trái sau, phải trước, phải giữa, phải sau và thùy phụ) sẽ được tính điểm và được ghi dưới dạng tỷ lệ % của thùy được quan sát có tổn thương; và 2) điểm số đánh giá cảm quan bằng số (0, 1, 2, 3).

RT qPCR

Virut huyết (tải lượng PRRSV trong huyết thanh) và việc xuất tiết (tải lượng PRRSV trong gạc lấy bệnh phẩm trong miệng và mũi) được xác định bằng qPCR (RT) phiên mã ngược được thực hiện bằng quy trình chuẩn dưới đây. Nói ngắn gọn, ARN virut đã tinh chế được sử dụng làm khuôn, được phiên mã ngược ở 50°C trong 30 phút, và được biến tính ở 95°C trong 5 phút. Chương trình PCR của phản ứng gồm 40 chu trình biến tính ở 95°C trong 20 giây và ủ ở 53°C trong 40 giây. qRT-PCR được thực hiện trong máy luân nhiệt hệ thống PCR thời gian thực 7500. Kết quả được biểu diễn dưới dạng bản sao ARN/ml.

Huyết thanh học

Huyết thanh được thu thập trước khi chủng ngừa, trước khi thử thách và lúc mổ xác được thử nghiệm các kháng thể đối với PRRSV bằng cách sử dụng IDEXX PRRS X3 ELISA, theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nói ngắn gọn, các mẫu huyết thanh được pha loãng tỷ lệ 1:40 trong đĩa 96 lỗ được phủ kháng nguyên PRRSV tái tổ hợp và được ủ 30 phút ở 18-26°C. Sau khi rửa, thể liên hợp peroxidaza cây cải ngựa kháng lợn được bổ sung và các đĩa được ủ trong 30 phút nữa ở 18-26°C. Thể liên hợp không gắn kết được rửa trôi và chất TMB được bổ sung vào các lỗ. Việc hiện màu được xác định ở 650 nm. Các giá trị S/P được ghi nhận đối với từng mẫu. Nếu tỷ lệ S/P là $\geq$ 0,4 mẫu được phân loại là dương tính với kháng thể PRRS. Nếu tỷ lệ S/P < 0,4 mẫu được phân loại làm âm tính. Hướng dẫn ELISA được bao gồm trong hồ sơ nghiên cứu. Nghiên cứu kết thúc ở ngày 37 (chết êm ái).

Virut trong máu và xuất tiết

Trước khi phân tích thống kê dữ liệu RT-qPCR được biến đổi bằng cách sử dụng phép chuyển đổi logarit thích hợp. Dữ liệu đã chuyển đổi được phân tích bằng cách sử dụng mô hình hỗn hợp đo lặp lại tuyến tính tổng quát. So sánh kết quả điều trị theo cặp được thực hiện tại mỗi thời điểm xem hiệu quả điều trị hoặc sự tương tác điều trị theo thời điểm có ý nghĩa hay không ($P \leq 0,05$). Giá trị trung bình bình phương tối thiểu của điều trị và khoảng tin cậy 95% đã được chuyển đổi trở lại để trình bày. Tỷ lệ % của các ngày có virut trong máu/xuất tiết cũng được tính. Từng mẫu được xác định là dương tính

nếu >250 bản sao ARN của PRRSV /mL, mà tương ứng với một nửa giới hạn phát hiện của kỹ thuật (500 bản sao ARN của PRRSV /mL mẫu). Người ta cũng xác định động vật đã từng bị sốt hoặc đã từng xuất tiết đối với các ngày ≤27 (tham chiếu với trước thử thách) và các ngày >27 (sau thử thách).

Tổn thương phổi

Tỷ lệ phần trăm của toàn bộ phổi bị thương tổn được tính theo công thức sau: Tỷ lệ % phổi bị tổn thương = (0,10 x trái trước) + (0,10 x trái giữa) + (0,25 x trái sau) + (0,10 x phải trước) + (0,10 x phải giữa) + (0,25 x phải sau) + (0,10 x thùy phụ). Chuyển đổi căn bậc hai arcsine được áp dụng cho tỷ lệ % của toàn bộ phổi bị tổn thương trước phân tích. Tổn thương phổi đã chuyển đổi được phân tích bằng mô hình hỗn hợp tuyến tính tổng quát. Việc so sánh theo cặp được thực hiện giữa các nhóm điều trị xem hiệu quả điều trị có ý nghĩa hay không. Giá trị trung bình bình phương tối thiểu được biến đổi ngược lại của tỷ lệ % toàn bộ phổi có tổn thương, sai số chuẩn của chúng, và khoảng tin cậy 95% của chúng được tính cũng như các giá trị tối thiểu và tối đa. Phân phối tần suất của điểm đánh giá tổn thương phổi được tính cho mỗi điều trị. Điểm số, bình thường hoặc không bình thường, được phân tích bằng cách sử dụng mô hình tuyến tính hỗn hợp tuyến tính tổng quát đối với dữ liệu nhị thức. Nếu mô hình hỗn hợp tuyến tính tổng quát không hội tụ, kiểm định Fisher Exact được sử dụng để phân tích dữ liệu. Nếu hiệu quả chính của điều trị là đáng kể, thì so sánh hiệu quả điều trị theo cặp được thực hiện.

Tính điểm số phổi

Tỷ lệ % phổi bị tổn thương đối với mỗi nhóm điều trị được thể hiện trên bảng 8. Điểm số hình ảnh trực quan phổi được thể hiện trên bảng 9. Khi mổ xác, 17/18 lợn (94,4%) từ nhóm đối chứng T01 có điểm số hình ảnh trực quan phổi dương tính chỉ ra rằng thử thách PRRSV thành công trong việc gây tổn thương phổi. Trong nhóm T02, 14/19 (73,7%) lợn được cho điểm là dương tính. Nhóm đối chứng T01 có tỷ lệ % giá trị trung bình LS của phổi bị tổn thương cao hơn đáng kể so với nhóm T02. Liên quan đến điểm số đánh giá cảm quan toàn bộ phổi, phổi từ lợn thuộc nhóm T02 được cho điểm là 0 (không có tổn thương) hoặc 1 (tổn thương nhẹ). Trong nhóm đối chứng T01, 7/18

(38,9%) lợn có điểm số đánh giá cảm quan là 2 (tổn thương vừa phải). Không có phổi nào bị nhận điểm số đánh giá cảm quan là 3 (tổn thương nghiêm trọng).

Bảng 8. Tóm tắt tỷ lệ % phổi có các tổn thương

	N	Các giá trị trung bình LS được chuyển đổi ngược lại.	Sai số chuẩn	Thấp hơn 95% CL	Cao hơn 95% CL	Khoảng
T01	18	7[a]	2	4	11	0 đến 29
T02	19	2[b]	1	1	5	0 đến 10

Các ký tự trên khác nhau có nghĩa là có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.

Bảng 9. Điểm số đánh giá cảm quan phổi của nhóm điều trị

Điều trị	Điểm số đánh giá cảm quan						Tổng quan sát
	0 (không tổn thương)		1 (tổn thương nhẹ)		2 (tổn tổn thương vừa phải)		
	Số	%	Số	%	Số	%	Số
T01	1	5,6	10	55,6	7	38,9	18
T02	4	26,3	14	73,7	0	0,0	19

Kết quả RT-qPCR,virut trong máu (tải lượng PRRSV trong huyết tương)

Tất cả các lợn được phát hiện là âm tính RT-qPCR PRRSV trong máu vào ngày 0. Khi thử thách (ngày 27), ARN PRRSV có thể được phát hiện 100% trong lợn được chủng ngừa bằng TI (nhóm T02). Đến lúc đó, tất cả lợn T01 vẫn còn âm tính PRRSV. Ở lợn đối chứng, việc nhiễm virut trong máu lần đầu tiên được phát hiện vào ngày 29 (2 ngày sau thử thách) và lợn vẫn dương tính PRRSV cho đến kết thúc thử nghiệm. Vào tất cả các ngày lấy mẫu sau thử thách, tải lượng virut được phát hiện trong nhóm T01 đối chứng là cao hơn đáng kể so với các nhóm T02. Bảng 10 tóm tắt kết quả nhiễm virut trong máu từ ngày 27 (ngày thử thách) cho đến ngày 36. Tóm tắt sự khác biệt giá trị trung bình bình phương tối thiểu và giá trị LS giữa các nhóm được thể hiện trong bảng 11.

Bảng 10. Tóm tắt kết quả nhiễm virut trong máu theo nhóm và ngày nghiên cứu.

		Log_{10} bản sao ARN / ml huyết thanh					% lợn có virut trong máu
	Ngày nghiên cứu	Giá trị trung bình bình phương tối thiểu	Sai số chuẩn	Khoảng	Thấp hơn Giới hạn tin cậy 95%	Cao hơn Giới hạn tin cậy 95%	

	Ngày nghiên cứu	Log_{10} bản sao ARN / ml huyết thanh					% lợn có virut trong máu
		Giá trị trung bình bình phương tối thiểu	Sai số chuẩn	Khoảng	Thấp hơn Giới hạn tin cậy 95%	Cao hơn Giới hạn tin cậy 95%	
T01	Ngày 27	2,4	0,16	2,4 đến 2,4	2,0	2,8	0,0%
T02	Ngày 27	6,0	0,16	4,6 đến 7,8	5,6	6,4	100,0%
T01	Ngày 29	7,4	0,25	5,3 đến 9,4	6,8	7,9	100,0%
T02	Ngày 29	5,6	0,25	3,8 đến 7,8	5,1	6,1	100,0%
T01	Ngày 31	8,1	0,27	6,3 đến 9,2	7,5	8,6	100,0%
T02	Ngày 31	6,9	0,27	4 đến 8,9	6,4	7,5	100,0%
T01	Ngày 34	7,3	0,24	5,4 đến 8,4	6,8	7,8	100,0%
T02	Ngày 34	6,4	0,24	4,2 đến 8	5,9	6,9	100,0%
T01	Ngày 36	7,2	0,28	5,7 đến 8,6	6,6	7,7	100,0%
T02	Ngày 36	5,6	0,28	2,7 đến 8,4	5,0	6,2	100,0%

RT-qPCR dương tính: > 2,4 log10 bản sao ARN/ml

Bảng 11. Bảng tóm tắt giá trị trung bình bình phương tối thiểu của kết quả nhiễm virut trong máu.

Điều trị số	Giá trị trung bình bình phương tối thiểu ở các ngày nghiên cứu khác nhau				
	Ngày 27	Ngày 29	Ngày 31	Ngày 34	Ngày 36
T01	2,4[a]	7,4 [a]	8,1 [a]	7,3 [a]	7,2 [a]
T02	6,0 [b]	5,6 [b]	6,9 [b]	6,4 [b]	5,6 [b]

Các ký tự trên khác nhau có nghĩa là có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.

Xuất tiết mũi và miệng

Tất cả lợn được phát hiện là âm tính RT-qPCR PRRSV trong gạc lấy bệnh phẩm mũi và miệng vào ngày 0. Tại thời điểm thử thách (ngày 27), 70% và 85% lợn được chủng ngừa bằng TI (nhóm T02) có ARN PRRSV phát hiện được tương ứng trong gạc lấy bệnh phẩm mũi và miệng. Không có lợn nào thuộc nhóm T01 bị xuất tiết tại thời điểm này. Trong khoảng thời gian sau thử thách, tỷ lệ % lợn bị xuất tiết miệng trong

nhóm T01 nằm trong khoảng từ 85% (ngày 34) đến 100% (ngày 29). Trong nhóm T02, tỷ lệ % lợn bị xuất tiết miệng nằm trong khoảng từ 42% (ngày 36) đến 90% (ngày 29). Liên quan đến việc xuất tiết miệng, tỷ lệ % lợn dương tính nằm trong khoảng từ 95 đến 100% trong nhóm T01 và nằm trong khoảng từ 73,7 đến 100% trong nhóm T02. So sánh giá trị LSM giữa các nhóm cho thấy tải lượng virut trong nhóm T01 cao hơn đáng kể ở tất cả các ngày sau thử thách ngoài ngày 34 đối với gạc lấy bệnh phẩm trong mũi và các ngày 31 và 36 đối với gạc lấy bệnh phẩm trong miệng.

Kết quả từ việc xuất tiết dịch mũi và miệng từ ngày 27 (ngày thử thách) cho đến ngày 36 được tóm tắt trong bảng 12 và bảng 14, tương ứng. Tóm tắt sự khác biệt về giá trị LSM và giá trị trung bình LS giữa các nhóm được thể hiện trong các bảng 13 và 15.

Bảng 12. Tóm tắt kết quả xuất tiết dịch mũi theo nhóm và ngày nghiên cứu.

	Ngày nghiên cứu	Bản sao ARN / ml (trong mỗi miếng gạc)					% lợn bị xuất tiết
		Giá trị trung bình bình phương tối thiểu	Sai số chuẩn	Khoảng	Thấp hơn Giới hạn tin cậy 95%	Cao hơn Giới hạn tin cậy 95%	
T01	Ngày 27	2,4	0,19	2,4 đến 2,4	2,0	2,8	0,0%
T02	Ngày 27	3,5	0,26	2,4 đến 4,9	3,0	4,1	70,0%
T01	Ngày 29	6,5	0,19	5,4 đến 7,6	6,1	6,9	100,0%
T02	Ngày 29	4,8	0,26	2,4 đến 6,8	4,2	5,3	90,0%
T01	Ngày 31	6,4	0,19	5,2 đến 7,7	6,0	6,8	100,0%
T02	Ngày 31	5,0	0,27	2,4 đến 6,8	4,5	5,5	94,7%
T01	Ngày 34	4,5	0,19	2,4 đến 6,9	4,1	4,9	85,0%
T02	Ngày 34	4,2	0,27	2,4 đến 7,2	3,7	4,8	84,2%
T01	Ngày 36	4,7	0,20	2,4 đến 6,5	4,3	5,1	88,9%
T02	Ngày 36	3,3	0,27	2,4 đến 5,6	2,8	3,9	42,1%

RT-qPCR dương tính: > 2,4 log10 bản sao ARN/ml

Bảng 13. Bảng tóm tắt giá trị trung bình bình phương tối thiểu về các kết quả xuất tiết dịch mũi.

Điều trị số	Giá trị trung bình bình phương tối thiểu ở các ngày nghiên cứu khác nhau				
	Ngày 27	Ngày 29	Ngày 31	Ngày 34	Ngày 36
T01	2,4[a]	6,5 [a]	6,4 [a]	4,5 [a]	4,7 [a]
T02	3,5 [b]	4,8 [b]	5,0 [b]	4,2 [a]	3,3 [b]

Bảng 14. Tóm tắt kết quả xuất tiết miệng theo nhóm và ngày nghiên cứu.

	Ngày nghiên cứu	Bản sao ARN / ml (trong mỗi miếng gạc)					% lợn bị xuất tiết
		Giá trị trung bình bình phương tối thiểu	Sai số chuẩn	Khoảng	Thấp hơn Giới hạn tin cậy 95%	Cao hơn Giới hạn tin cậy 95%	
T01	Ngày 27	2,4	0,19	2,4 đến 2,4	2,0	2,8	0,0%
T02	Ngày 27	4,9	0,26	2,4 đến 7,4	4,3	5,4	85,0%
T01	Ngày 29	4,2	0,19	2,4 đến 5,9	3,8	4,6	95,0%
T02	Ngày 29	4,0	0,26	2,4 đến 5,2	3,5	4,6	90,0%
T01	Ngày 31	5,2	0,19	4 đến 6,9	4,8	5,6	100,0%
T02	Ngày 31	4,4	0,26	2,4 đến 6,6	3,8	4,9	94,7%
T01	Ngày 34	4,9	0,19	3,7 đến 6,7	4,5	5,3	100,0%
T02	Ngày 34	4,6	0,26	3 đến 5,8	4,1	5,1	100,0%
T01	Ngày 36	4,6	0,20	3,5 đến 6,1	4,2	5,0	100,0%
T02	Ngày 36	3,8	0,26	2,4 đến 5,2	3,3	4,4	73,7%

RT-qPCR dương tính: > 2,4 log10 bản sao ARN/ml

Bảng 15. Bảng tóm tắt giá trị trung bình bình phương tối thiểu đối với kết quả xuất tiết miệng.

Điều trị số	Giá trị trung bình bình phương tối thiểu ở các ngày nghiên cứu khác nhau				
	Ngày 27	Ngày 29	Ngày 31	Ngày 34	Ngày 36
T01	2,4[a]	4,2 [a]	5,2 [a]	4,9 [a]	4,6 [a]
T02	4,9 [b]	4,0 [a]	4,4 [b]	4,6 [a]	3,8 [b]

Các ký tự trên khác nhau có nghĩa là có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.

Huyết thanh học

Tất cả lợn âm tính về mặt huyết thanh học đối với PRRSV trước khi chủng ngừa (IDEXX tỷ lệ S/P<0,4) Tại thời điểm thử thách (4 tuần sau chủng ngừa), tất cả lợn đối chứng vẫn huyết thanh âm tính, trong khi 90% lợn được chủng ngừa bằng TI được chuyển đổi huyết thanh với PRRSV (IDEXX tỷ lệ S/P > 0,4). Vào ngày 36 (9 ngày sau khi thử thách), tất cả lợn có huyết thanh dương tính với PRRSV. Lợn từ nhóm T02 có giá trị trung bình LS hiệu giá kháng thể cao hơn đáng kể với nhóm đối chứng T01. Bảng6 tóm tắt kết quả huyết thanh học thu được bằng ELISA.

Bảng 16. Kết quả ELISA tỷ lệ S/P (giá trị trung bình và khoảng giá trị LS) và % lợn huyết thanh dương tính theo nhóm và ngày điều trị

Điều trị	Ngày 27		Ngày 36	
	Giá trị LS (khoảng giá trị)	% huyết thanh dương tính	Giá trị LS (khoảng giá trị)	% huyết thanh dương tính
T01	0,011[a] (-0,087 đến 0,123)	0,0%	1,582[a] (0,846 đến 2,357)	100%
T02	1,617[b] (0,31 đến 2,561)	90%	1,960[b] (0,762 đến 2,884)	100%

Các ký tự trên khác nhau có nghĩa là có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.

Thảo luận

Nghiên cứu này đánh giá sự khởi phát tính miễn dịch (OOI) của một vacxin PRRSV sống được biến đổi ở lợn được chủng ngừa lúc 14-15 ngày tuổi khi chủng bằng thể phân lập PRRSV kiểu 1 gen gây bệnh, làm thử thách hô hấp sau 4 tuần chủng ngừa. Thử nghiệm là hợp lệ khi tất cả các lợn T01 vẫn còn âm tính huyết thanh và âm tính virut PRRS trong suốt thời gian chủng ngừa và không có yếu tố bệnh gây nhiễu được phát hiện.

Biến số chính trong việc xác định hiệu quả là tải lượng virut trong huyết thanh của các nhóm điều trị T02 khi so sánh với lợn T01. Tổn thương phổi, nhiệt độ trực tràng, xuất tiết, dấu hiệu lâm sàng và thể trọng được so sánh dưới dạng biến số thứ hai.

Tác dụng bảo vệ của việc chủng ngừa quan sát được khi so sánh tải lượng virut trong huyết thanh giữa các nhóm T01 và T02; nhóm được chủng ngừa bằng TI có hiệu giá virut thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng T01 ở các ngày lấy mẫu sau thử thách.

Sau khi thử thách, hiện tượng xuất tiết miệng và mũi có thể được phát hiện ở tất cả lợn không liên quan đến nhóm điều trị. Tuy nhiên, tải lượng virut cao hơn đáng kể được

phát hiện trong nhóm T01, vào tất cả các ngày ngoài ngày 34 đối với gạc lấy bệnh phẩm trong mũi và các ngày 31 và 36 đối với gạc lấy bệnh phẩm trong miệng.

Liên quan đến tổn thương phổi, công hiệu vacxin bảo vệ cũng quan sát được đối với các lợn T02 khi so sánh tỷ lệ % giá trị trung bình bình phương tối thiểu được biến đổi ngược lại của tổn thương phổi giữa các nhóm. Ngoài ra, tất cả các lợn 14 T02 mà được nhận điểm số đánh giá cảm quan dương tính lúc mổ xác được tính điểm là 1 (tổn thương nhẹ). Ngược lại, phổi từ 17 lợn trong nhóm T01 cũng được tính điểm dương tính, 10 được nhận điểm là 1 (tổn thương nhẹ) và 7 được nhận điểm là 2 (tổn thương vừa phải).

Trong khoảng thời gian sau thử thách, nhiệt độ trực tràng thấp hơn đáng kể ở các lợn được chủng ngừa bằng TI vào ngày 7 sau thử thách. Đến thời điểm đó, 20% lợn T01 bị sốt, trong khi đó không có lợn nào trong nhóm T02 bị sốt. Trước khi thử thách, nhiệt độ trực tràng trong nhóm T02 cũng thấp hơn đáng kể so với T01. Tuy nhiên, không có lợn nào bị sốt và không có tình trạng lâm sàng rõ ràng trong nhóm đó có thể gây ra sự gia tăng nhiệt độ trực tràng. Ngoài nhiệt độ trực tràng tăng, không có hệ quả lâm sàng khác phù hợp với PRRS (suy kiệt, suy hô hấp, ho hoặc hắt hơi) quan sát được ở lợn bất kỳ trong toàn bộ khoảng thời gian. Ngoài ra, không có sự khác biệt về thể trọng có thể phát hiện được ở thời điểm bất kỳ giữa các nhóm.

Dữ liệu huyết thanh học đã chứng tỏ rằng việc chủng ngừa bằng TI (nhóm T02) đã cảm ứng việc phát triển kháng thể đặc hiệu PRRSV trong vòng 4 tuần sau chủng ngừa. Hiệu giá kháng thể trong nhóm T02 tăng cho đến khi kết thúc nghiên cứu và cao hơn đáng kể so với hiệu giá được phát hiện cùng thời điểm trong nhóm không được thử thách chủng ngừa T01.

Chủng ngừa bằng cách dùng một lần trong cơ vacxin MLV PRRSV châu Âu thử nghiệm chứa liều 2,0 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ cho lợn 14-15 ngày tuổi có tác dụng bảo vệ kháng PRRSV, như quan sát được bằng việc giảm đáng kể tải lượng virut được phát hiện trong huyết thanh sau thử thách với chủng PRRSV châu Âu gây bệnh lúc 4 tuần sau chủng ngừa. Tính hiệu quả cũng được hỗ trợ bởi hiệu quả bảo vệ quan sát dựa trên tỷ lệ % tổn thương phổi lúc mổ xác (10 ngày sau thử thách), giảm xuất tiết miệng và xuất tiết dịch mũi cũng như giảm nhiệt độ trực tràng vào 7 ngày sau thử thách.

Ví dụ 5- Đánh giá hiệu quả tiềm năng của kháng thể có nguồn gốc từ mẹ đối với hiệu quả của vacxin PRRSV châu Âu sống được cải biến được dùng cho lợn 1 ngày tuổi có huyết thanh dương tính chống lại thử thách thể phân lập PRRSV châu Âu.

Mục đích của nghiên cứu này là để đánh giá sự ảnh hưởng của kháng thể có nguồn gốc từ mẹ (MDA) đối với hiệu quả của MLV PRRSV châu Âu (virut được biểu hiện từ SEQ ID NO:5), khi được dùng cho lợn con 1 ngày tuổi bằng đường dùng trong cơ (IM, nhóm T02) hoặc trong mũi (IN, nhóm T03) .

Nghiên cứu được thiết kế dựa trên khuyến nghị của EMA/CVMP/WP/439467/2007: "Bài viết phản ánh về việc chứng minh tác động có thể có của các kháng thể có nguồn gốc từ mẹ đối với hiệu quả của vacxin ở động vật non" và dược điển châu Âu (Ph. Eur.) Monograph 04/2008:50207: "Đánh giá hiệu quả của vacxin thú y và huyết thanh miễn dịch". Cả hai tài liệu đều khuyến nghị rằng ảnh hưởng của các kháng thể đạt được thụ động và có nguồn gốc từ mẹ đối với hiệu quả của vacxin phải được đánh giá đầy đủ. Ngoài ra, EMA/CVMP/WP/439467/2007 tuyên bố rằng hiệu quả của vacxin ở động vật được chủng ngừa khi có các MDA mặc dù có sự biến đổi sinh học bình thường nên tương tự với hiệu quả thu được ở động vật có cùng độ tuổi được chủng ngừa nhưng không có các MDA.

Dựa vào phần mô tả trên đây, việc khởi phát tính miễn dịch bảo vệ (OOI) của vacxin PRRSV châu Âu sống được biến đổi được đánh giá ở lợn có huyết thanh dương tính đã chủng ngừa (đường IM và IN) lúc 1 ngày tuổi khi chủng bằng thể phân lập PRRSV kiểu gen I gây bệnh làm thử thách hô hấp. Động vật được thử thách tại thời điểm khi mức MDA được phát hiện trong thử nghiệm trung hòa huyết thanh (SNT) trong nhóm đối chứng (T01) trở nên không phát hiện được. Để chứng tỏ hiệu quả bảo vệ chống lại thử thách, các thông số tương tự được đánh giá trong thử nghiệm trước đó được thực hiện ở động vật có huyết thanh dương tính được đánh giá (tải lượng virut trong huyết thanh, tổn thương phổi, nhiệt độ trực tràng, chảy nước mắt nước mũi, các dấu hiệu lâm sàng và thể trọng).

Thử nghiệm là hợp lệ khi tất cả các lợn đối chứng (nhóm T01) vẫn âm tính với virut PRRS trong suốt thời gian chủng ngừa và không có yếu tố bệnh gây nhiễu được phát hiện.

Khi MLV PRRSV châu Âu được dùng bằng đường IM, hiệu quả bảo vệ của việc chủng ngừa quan sát được khi thấy giảm đáng kể tải lượng virut trong huyết thanh so với nhóm đối chứng; hiệu quả cũng được hỗ trợ bởi việc giảm xuất tiết dịch mũi và miệng cũng như giảm nhiệt độ trực tràng. Sự khác biệt về tỷ lệ % giá trị trung bình của tổn thương phổi là gần với mức có ý nghĩa (p=0,092). Hiệu quả quan sát được sau khi dùng IM trong nghiên cứu này là tương tự với hiệu quả thu được trong nghiên cứu trước đó, trong đó hiệu quả được đánh giá ở động vật có huyết thanh dương tính; ở cả hai nghiên cứu, tác động đáng kể của việc chủng ngừa được quan sát trên biến số chính (giảm virut trong máu) và cũng được củng cố bởi việc giảm xuất tiết dịch mũi và nhiệt độ trực tràng.

Khi MLV PRRSV châu Âu được dùng bằng đường IN, không đạt được sự bảo vệ chống lại thử thách PRRSV, như được thấy bằng việc không có sự khác biệt đáng kể về thông số bất kỳ trong số các thông số được đánh giá.

Kết luận, kết quả của nghiên cứu này đã chứng tỏ việc không có sự can thiệp của kháng thể có nguồn gốc từ mẹ đối với hiệu quả vacxin, khi vacxin được dùng trong cơ cho lợn con 1 ngày tuổi. Tuy nhiên, khi vacxin được dùng bằng đường IN, đáp ứng miễn dịch không được tạo ra ở hầu hết các lợn sau khi chủng ngừa, có lẽ là do việc trung hòa vacxin bởi MDA. Để tạo ra lợn con dương tính với MDA đối với PRRSV, sáu con lợn nái mang thai được chủng ngừa bằng vacxin MLV PRRS số lô VMRD13-015 (5 $\log_{10}$ $CCID_{50}$/2 mL) trong nửa đầu thai kỳ (45 ngày mang thai). Ngày trước ngày đẻ dự kiến, quá trình chuyển dạ được kích thích bằng cách tiêm trong cơ cloprostenol (Cyclix® Porcino, Virbac). Tất cả lợn nái đều đẻ vào ngày hôm sau. Tất cả lợn này đều huyết thanh dương tính với PRRS vào ngày 0. Kết quả được thể hiện

Virut vacxin đã tạo ra hiệu lực ở 6,0 log10CCID50 /ml. Vào ngày 0, IVP được pha loãng bằng chất pha loãng vacxin (số lô T22019) để phù hợp với độ chuẩn mục tiêu (2,5 log10 CCID50/2 mL). Một phần phân ước của IVP được thu thập để chuẩn độ trên tế bào BHK-21-C12-26 để khẳng định liều lượng. Một mẫu IVP bổ sung được làm đông (-

80±10°C) và được lưu trữ làm mẫu lưu. Độ chuẩn trên tế bào BHK-21-C12-26 được thực hiện theo quy trình chuẩn cục bộ. Vacxin đã hoàn nguyên và pha loãng có độ chuẩn là 101,8 CCID50/ml, mà tương ứng với 102,1 CCID50/2 mL (2,1 log10CCID50 /2 ml)

Vào ngày 0, lợn con được chủng ngừa bằng IVP hoặc CP như đã mô tả trong phần 4. Lợn con của các nhóm T01 và T02 được tiêm trong cơ vào cổ bên phải. Lợn con của các nhóm T01 và T03 được dùng trong mũi, phân phối 1,0 mL vào mỗi lỗ mũi. Vật liệu thử thách là thể phân lập PRRSV Tây Ban Nha kiểu gen 1 Olot/91, được nuôi trong đại thực bào phế nang lợn (PAM). Chủng này được phân lập vào năm 1991 từ trường hợp sẩy thai giai đoạn muộn ở lợn nái.

Virut trong máu

Tất cả lợn được phát hiện âm tính RT-qPCR PRRSV trong huyết tương trước khi chủng ngừa (D0) và tất cả lợn từ nhóm T01 vẫn âm tính cho đến khi thử thách. Ngược lại, 8/16 (50%) lợn con từ nhóm T02 (được chủng ngừa IM) và 1/19 (5,3%) lợn con từ nhóm T03 (được chủng ngừa IN) dương tính RT-qPCR PRRSV khi thử thách (67 ngày sau chủng ngừa).

Sau thử thách, 100% lợn trong nhóm T01 trở nên có virut trong máu vào ngày D70 (3 ngày sau thử thách) và giữ tình trạng dương tính cho đến khi kết thúc thử nghiệm (DC+10). Trong các nhóm được chủng ngừa (T02 và T03), tất cả lợn đều phát hiện dương tính PRRSV ít nhất một lần; tuy nhiên, khi gần kết thúc thử nghiệm (DC+10), chỉ 11/16 lợn T02 (68,8%) vẫn còn virut trong máu. Ngược lại, tất cả lợn T03 ngoài một con dương tính vào tất cả các thời điểm lấy mẫu sau thử thách.

Lợn từ nhóm T02 có tải lượng virut trong huyết thanh thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng T01 ở các ngày lấy mẫu sau thử thách. Vào ngày DC+3 và DC+10, tải lượng virut trong nhóm T02 cũng thấp hơn đáng kể trong nhóm T03. Không phát hiện thấy có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm T01 và T03.

Bảng 17 tóm tắt kết quả virut trong máu trong khoảng thời gian 10 ngày sau thử thách.

Bảng 17. Tóm tắt kết quả virut trong máu theo nhóm và ngày nghiên cứu (dữ liệu sau thử thách)

			Log_{10} bản sao ARN / ml huyết thanh					
Nhóm	Ngày nghiên cứu	N	Giá trị trung bình bình phương tối thiểu	Sai số chuẩn	Khoảng	Dưới 95% CB	Trên 95% CB	% động vật có virut trong máu
T01	D67 (DC)	18	1,65	0,20	1,70 đến 1,70	1,24	2,05	0,0
T02	D67 (DC)	16	2,25	0,36	1,70 đến 3,84	1,53	2,97	50,0
T03	D67 (DC)	19	1,82	0,29	1,70 đến 3,80	1,25	2,40	5,3
T01	D70 (DC+3)	18	6,60	0,20	5,23 đến 7,66	6,20	7,01	100,0
T02	D70 (DC+3)	16	2,87	0,36	1,70 đến 6,59	2,15	3,59	50,0
T03	D70 (DC+3)	19	6,30	0,29	1,70 đến 8,10	5,72	6,87	94,7
T01	D73 (DC+6)	18	6,39	0,20	4,87 đến 7,44	5,99	6,80	100,0
T02	D73 (DC+6)	16	5,18	0,36	1,70 đến 7,00	4,45	5,90	93,8
T03	D73 (DC+6)	19	5,80	0,29	1,70 đến 7,70	5,22	6,37	94,7
T01	D75 (DC+8)	18	5,32	0,20	3,32 đến 7,21	4,92	5,73	100,0
T02	D75 (DC+8)	16	4,18	0,36	2,25 đến 6,22	3,46	4,90	100,0
T03	D75 (DC+8)	19	5,07	0,29	1,70 đến 7,13	4,50	5,65	94,7
T01	D77 (DC+10)	18	5,29	0,20	3,51 đến 6,47	4,89	5,70	100,0
T02	D77 (DC+10)	16	2,96	0,36	1,70 đến 5,86	2,23	3,68	68,8
T03	D77 (DC+10)	19	5,42	0,29	2,16 đến 7,08	4,85	6,00	100,0

N: số; SE: Sai số chuẩn; CB: giới hạn tin cậy; D= ngày nghiên cứu; DC: ngày thử thách; RT-qPCR dương tính > 1,7 log_{10} bản sao ARN/ml

Virut trong máu và xuất tiết

Trước khi phân tích thống kê dữ liệu RT-qPCR được biến đổi bằng cách sử dụng phép chuyển đổi logarit thích hợp. Dữ liệu đã chuyển đổi được phân tích bằng cách sử dụng mô hình hỗn hợp đo lặp lại tuyến tính tổng quát. So sánh kết quả điều trị theo cặp được thực hiện tại mỗi thời điểm xem hiệu quả điều trị hoặc sự tương tác điều trị theo thời điểm có ý nghĩa hay không ($P \leq 0,05$). Giá trị trung bình bình phương tối thiểu của điều trị và khoảng tin cậy 95% đã được chuyển đổi trở lại để trình bày. Tỷ lệ % các ngày có virut trong máu/chảy nước mắt nước mũi cũng được tính. Từng mẫu được xác định là dương tính nếu >50 bản sao ARN của PRRSV /mL, mà tương ứng với một nửa giới hạn phát hiện của kỹ thuật (100 bản sao ARN của PRRSV /mL mẫu). Người ta cũng xác định động vật đã từng có virut trong máu hoặc đã từng chảy nước mắt nước mũi vào các ngày ≤DC (tham chiếu với trước thử thách) và các ngày >DC (sau thử thách).

Mục đích của nghiên cứu này là để đánh giá sự ảnh hưởng của kháng thể có nguồn gốc từ mẹ (MDA) đối với hiệu quả của MLV PRRSV châu Âu, khi được dùng cho lợn con 1 ngày tuổi bằng đường dùng trong cơ (IM, nhóm T02) hoặc trong mũi (IN, nhóm T03). Hiệu quả được đánh giá ở các lợn có huyết thanh dương tính được chủng ngừa lúc 1 ngày tuổi bằng cách chủng thể phân lập PRRSV kiểu gen I gây bệnh làm thử thách hô hấp. Động vật được thử thách tại thời điểm khi mức MDA được phát hiện bằng SNT trong nhóm T01 trở nên không phát hiện được (ngày 67).

Biến số chính trong việc xác định hiệu quả là tải lượng virut trong huyết thanh (nhiễm virut trong máu) của các nhóm điều trị T02 và T03 trong so sánh với lợn T01. Tổn thương phổi, nhiệt độ trực tràng, xuất tiết, dấu hiệu lâm sàng và thể trọng được so sánh dưới dạng biến số thứ hai.

Thử nghiệm là hợp lệ khi tất cả các lợn T01 vẫn còn âm tính với virut PRRS trong suốt thời gian chủng ngừa và không có yếu tố bệnh gây nhiễu được phát hiện.

Tác dụng bảo vệ của việc chủng ngừa qua IM quan sát được khi so sánh tải lượng virut trong huyết thanh giữa các nhóm T01 và T02; nhóm được chủng ngừa bằng IVP qua đường IM có hiệu giá virut thấp hơn đáng kể so với nhóm đối chứng T01 ở các ngày lấy mẫu sau thử thách. Không có sự khác biệt về hiệu giá virut được phát hiện giữa các nhóm T01 và T03, chỉ ra rằng không có tác dụng bảo vệ từ việc chủng ngừa IN đối với tải lượng virut sau thử thách. Việc thiếu hiệu quả trong nhóm T03 cũng được chứng minh bằng tải lượng virut cao hơn đáng kể trong nhóm này so với nhóm T02 lúc 3 và 10 ngày sau thử thách.

Hiệu quả bảo vệ được tạo ra sau khi chủng ngừa IM (nhóm T02) được củng cố bằng việc giảm đáng kể tỷ lệ % lợn bị xuất tiết dịch mũi cũng như lượng virut được phát hiện trong dịch tiết dịch mũi và miệng trong nhóm T02 so với nhóm đối chứng T01. Tương tự như kết quả quan sát được đối với virut trong máu, không quan sát thấy tác dụng tích cực của việc chủng ngừa trong việc phát tán virut khi IVP được dùng bằng đường IN (nhóm T03), do không phát hiện thấy sự khác biệt giữa nhóm T01 và T03. Trên thực tế, lượng vi rút được phát tán từ cả đường mũi và đường miệng được phát hiện trong nhóm T03 cũng cao hơn đáng kể so với T02.

Việc chủng ngừa bằng đường IM cũng có tác động tích cực đến nhiệt độ trực tràng. Trước khi thử thách (D67), nhiệt độ trực tràng trung bình thấp hơn đáng kể trong nhóm T02 so với T01 và T03; tuy nhiên, do không có con lợn nào trong cả ba nhóm bị sốt (RT≥40,5) tại thời điểm đó và nhiệt độ trực tràng ở ngày D67 được thu thập trước khi trộn lẫn các động vật cho pha thử thách, có thể kết luận được rằng sự khác biệt này có lẽ là do sự căng thẳng của các động vật được đánh giá đầu tiên. Trong khoảng thời gian sau thử thách, tỷ lệ % lợn bị sốt ít nhất một lần là 61%, 31%, và 42% tương ứng trong các nhóm T01, T02 và T03. Lợn đối chứng (T01) có nhiệt độ trực tràng cao hơn đáng kể so với các lợn được chủng ngừa bằng IVP (các nhóm T02 và T03) vào ngày 70 (3 sau thử thách); tuy nhiên, vào ngày DC+10, nhiệt độ trực tràng của nhóm T03 cao hơn đáng kể so với các nhóm T01 và T02. Ngoài nhiệt độ trực tràng tăng, không quan sát thấy có các dấu hiệu lâm sàng khác phù hợp với việc nhiễm PRRSV. Liên quan đến thể trọng, không quan sát thấy có hiệu quả của việc chủng ngừa do không thấy có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm.

Lúc mổ xác, 13/18 lợn (72%) từ nhóm đối chứng T01 có điểm số đánh giá cảm quan phổi dương tính. Trong các nhóm T02 và T03, 7/16 (44%) và 13/19 (68%) lợn cũng có điểm số dương tính. So sánh giữa các nhóm điều trị đã cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về % phổi có tổn thương. Tuy nhiên, sự khác biệt quan sát được giữa nhóm đối chứng T01 và nhóm được chủng ngừa bằng IVP bằng đường IM (T02) là gần với giá trị có ý nghĩa (p=0,092).

Tất cả lợn có kháng thể đặc hiệu PRRSV trước khi chủng ngừa khi được xác định bằng ELISA (tỷ lệ S/P ≥ 0,4), vì thế phù hợp với tiêu chuẩn lấy mẫu. Trước khi thử thách (67 ngày sau chủng ngừa), 39% của lợn trong nhóm đối chứng vẫn có huyết thanh dương tính, chỉ ra rằng sự có mặt của MDA còn lại tại thời điểm đó (tỷ lệ S/P trung bình: 0,279). Tuy nhiên, thực tế là tất cả lợn từ nhóm đối chứng đã phát triển nhiễm virut trong máu sau thử thách và 13/18 có điểm số phổi dương tính lúc mổ xác chỉ ra rằng MDA còn lại được phát hiện bằng ELISA không can thiệp vào thử thách. Trên thực tế, khi mức kháng thể trung hòa đặc hiệu PRRSV được xác định trong các con lợn bằng SNT, các kết quả âm tính được phát hiện ở tất cả các T01 trước khi thử thách (ngày 52). Trong nhóm được chủng ngừa bằng IVP bằng đường IM, 9/16 lợn đã trải qua việc tăng mức kháng thể được

phát hiện bằng ELISA từ ngày chủng ngừa đến 67 ngày sau chủng ngừa và tất cả chúng đều có huyết thanh dương tính trước khi thử thách (tỷ lệ S/P trung bình: 1,803), chỉ ra rằng việc phát triển đáp ứng kháng thể sau khi chủng ngừa IM ngay cả khi có mặt MDA. Ngược lại, chỉ 2/19 lợn được chủng ngừa bằng IVP bằng đường IN có sự gia tăng kháng thể PRRS từ việc chủng ngừa với thử thách, và chỉ 32% là huyết thanh dương tính ở ngày D67 (tỷ lệ S/P trung bình: 0.328), mà chỉ ra rằng không có đáp ứng miễn dịch thể dịch được cảm ứng trong 17 con lợn khác do việc trung hòa vacxin bởi MDA. Sau khi thử thách (D77), tất cả lợn, không liên quan đến nhóm điều trị, có huyết thanh dương tính và không có sự khác biệt đáng kể về độ chuẩn ELISA được phát hiện giữa các nhóm.

Hướng dẫn EMA/CVMP/WP/439467/2007 "Bài viết phản ánh về việc chứng minh tác động có thể có của kháng thể có nguồn gốc từ mẹ đối với hiệu quả của vacxin ở động vật non" nêu rằng hiệu quả của vacxin ở động vật được chủng ngừa khi có mặt các MDA, mặc dù có sự biến đổi sinh học bình thường, tương tự như hiệu quả thu được ở động vật cùng tuổi không có MDA nhưng được chủng ngừa. Dựa vào phần mô tả, hiệu quả quan sát được trong thử nghiệm này nên tương tự như hiệu quả quan sát được trong thử nghiệm trước đó (C/394/13), trong đó OOI được đánh giá ở các động vật có huyết thanh âm tính được chủng ngừa lúc 1 ngày tuổi bằng đường dùng IN và IM.

Khi MLV PRRSV châu Âu được dùng bằng đường IM, hiệu quả có thể được chứng tỏ không liên quan đến tình trạng huyết thanh học của lợn, do việc giảm đáng kể virut trong máu (biến số cơ bản) quan sát được ở cả hai thử nghiệm. Hiệu quả bảo vệ của việc chủng ngừa IM cũng được chứng tỏ đối với việc xuất tiết dịch mũi và nhiệt độ trực tràng ở cả hai trường hợp. Ngoài ra, sau khi chủng ngừa IM cho lợn dương tính với MDA, việc xuất tiết miệng cũng được giảm đáng kể và sự khác biệt về % phổi có tổn thương cũng gần với giá trị có ý nghĩa. Nhìn chung, các những dữ liệu này rõ ràng chứng tỏ việc không có sự can thiệp của MDA đối với hiệu quả của vacxin, khi vacxin được dùng cho lợn con 1 ngày tuổi bằng đường IM.

Khi MLV PRRSV châu Âu được dùng bằng đường IN, hiệu quả có thể chỉ chứng tỏ trong khi không có MDA, như được thấy bằng việc giảm đáng kể virut trong máu và việc xuất tiết dịch mũi quan sát được ở động vật có huyết thanh âm tính. Ở lợn dương

tính với MDA, việc chủng ngừa IN không cảm ứng sự bảo vệ do không có sự khác biệt đáng kể về thông số bất kỳ trong số các thông số được đánh giá.

Vì thế, chủng ngừa bằng cách dùng một lần vacxin MLV PRRSV châu Âu chứa liều 2,5 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ cho lợn 1 ngày tuổi có huyết thanh dương tính bằng đường IM có tác dụng bảo vệ chống lại PRRSV, như được thấy bằng việc giảm đáng kể tải lượng virut được phát hiện trong huyết thanh sau khi thử thách bằng chủng PRRSV châu Âu gây bệnh 67 ngày (9,6 tuần) sau chủng ngừa. Tính hiệu quả cũng được củng cố bằng việc giảm đáng kể hiện tượng xuất tiết dịch mũi và miệng cũng như nhiệt độ trực tràng sau thử thách. Ngoài ra, sự khác biệt về tỷ lệ % trung bình của tổn thương phổi là gần với mức có ý nghĩa (p=0,09). Chủng ngừa bằng việc dùng một lần vacxin MLV PRRSV châu Âu chứa liều 2,5 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ cho lợn 1 ngày tuổi có huyết thanh dương tính bằng đường IN không có tác dụng bảo vệ chống lại thử thách PRRSV. Kết quả của nghiên cứu này đã chứng tỏ việc không có sự can thiệp của kháng thể có nguồn gốc từ mẹ đối với hiệu quả vacxin, khi vacxin được dùng trong cơ lúc 1 ngày tuổi. Khi vacxin được dùng bằng đường IN, phần lớn lợn (17/19) không tạo ra đáp ứng miễn dịch sau khi chủng ngừa khi được xác định bằng ELISA. Điều này chỉ ra rằng có sự trung hòa vacxin bởi MDA, mà có thể ảnh hưởng đến hiệu lực vắc xin ở mức đàn.

Ví dụ 6- Sự phát tán, lan truyền và sự an toàn của việc dùng một liều, liều nhắc lại và sự quá liều của vacxin PRRSV châu Âu sống được cải biến 96V198 dòng 1 MSV+3 cho lợn 1 ngày tuổi

Mục đích của thử nghiệm là đánh giá tính an toàn của liều nhắc lại và sự quá liều, và sự phát tán, lan truyền và tính an toàn của một liều, của vacxin PRRSV sống được biến đổi 96V198 dòng 1 được dùng cho lợn 1 ngày tuổi bằng đường IM và IN. Thử nghiệm được thực hiện bằng cách sử dụng MSV+3, là đời cấy chuyền được giảm độc lực ít nhất (xem trang 8, MSV+5 là đời cấy chuyền tiêu chuẩn 49) có mặt trong mẻ vacxin.

Theo luật pháp châu Âu có hiệu lực, bắt buộc phải chứng minh sự an toàn của vacxin để được phép đưa ra thị trường. Trong trường hợp này, quy trình được phát triển có xem xét đến Dược điển Châu Âu; các hướng dẫn 2009/9/EC và VICH GL44 định hướng để chứng tỏ sự an toàn của một liều, liều nhắc lại và sự quá liều bằng các đường

IN và IM ở lợn con 1 ngày tuổi - đường dùng và nhóm động vật được đề xuất mà vacxin được dự định sẽ sử dụng.

Độ an toàn được đánh giá theo khuyến nghị của Dược điển châu Âu đối với vacxin để sử dụng trong thú y, tức là: đánh giá nhiệt độ trực tràng, và các phản ứng cục bộ và tổng thể ít nhất cho đến 14 ngày sau khi chủng. Sự lan truyền của chủng vacxin được đánh giá từ các lợn cảnh báo được chủng ngừa (một liều) với không được chủng ngừa; xuất tiết (dịch nhầy mũi, dịch xoang miệng và phân) và sự xâm nhiễm vào mô ở động vật được chủng ngừa (một liều) cũng được nghiên cứu.

Nghiên cứu được thực hiện theo các quy định thực hành tốt phòng thí nghiệm (Good Laboratory Practice - GLP), theo hướng dẫn OCDE tương ứng phù hợp với yêu cầu của Dược điển châu Âu 7.7 04/2013:50206 (Đánh giá sự an toàn của vacxin thú y và huyết thanh miễn dịch).

Sản phẩm thử nghiệm MLV PRRSV châu Âu (96V198 dòng 1), đời cấy chuyền được giảm độc lực ít nhất MSV+3), ở độ chuẩn giải phóng tối đa là 105,2 TCID50/2 ml với liều 2L IN hoặc IM, với đời cấy chuyền thấp hơn (ít được giảm độc lực) được chọn là tiêu chuẩn an toàn tốt hơn. Đối với hệ thống thử nghiệm, quy trình được phát triển có xem xét đến Dược điển Châu Âu; các hướng dẫn 2009/9/EC và VICH GL44 định hướng để chứng tỏ sự an toàn của một liều, liều nhắc lại và sự quá liều bằng các đường IN và IM ở lợn con 1 ngày tuổi - nhóm động vật được đề xuất mà vacxin được dự định sẽ sử dụng.

Số lượng lợn nái thích hợp (n=11) được sử dụng để thu được lợn con cần để thực hiện thử nghiệm (ít nhất là, n=80). Thiết kế được áp dụng cho phép mô tả thích hợp về sự an toàn, sự phát tán và sự xuất tiết của vacxin đối với cả hai đường dùng IM và IN. Lợn nái được chuyển đến trang trại thí nghiệm từ trang trại âm tính PRRSV (Phụ lục I). Lợn nái được đặt trong 11 ô cách ly trong các cơ sở. Tại trang trại thí nghiệm, lợn nái được lấy máu trước khi đẻ và phân tích lại sự hiện diện của kháng thể đặc hiệu PRRSV bằng cách sử dụng ELISA thương mại (PRRS X3 Ab Test: Ref. 99-4095, IDEXX Laboratories;) (Annex I). Việc dùng IM Ceftiofur natri (13ml/lợn nái; cho lợn nái được thực hiện như một phương pháp điều trị dự phòng.

Việc đẻ của lợn nái được diễn ra đồng bộ bằng cách dùng 1 ml IM D-Cloprostenol (Galapan, INVESA;) (phụ lục XVI) khoảng 111-113 ngày sau khi thụ tinh (để đồng bộ hóa các cuộc đẻ). Lợn con được sinh ra trong vòng 40 giờ sau đó (ngày 9 và 10 tháng tư). Bắt đầu việc chủng ngừa được thực hiện vào ngày 10; tại thời điểm này, tuổi của lợn con là khoảng ≤ 24 giờ (1 ngày tuổi).

Việc nuôi dưỡng chéo được thực hiện trong ngày đầu tiên sau đẻ (trước khi chủng ngừa) để cân bằng lứa đẻ và đồng nhất hóa lứa đẻ. Cuối cùng, mười lợn nái với tổng số lợn con trong từng nhóm bằng hoặc cao hơn cỡ mẫu tối thiểu để thực hiện các nghiên cứu an toàn được thiết lập theo Dược điển châu Âu được sử dụng. Tổng số lượng: 80 lợn con; 40 lợn con cho mỗi đường dùng: IN và IM (28 được chủng ngừa bằng sản phẩm thử nghiệm - liều, liều nhắc lại và quá liều, 8 động vật làm đối chứng, và 4 động vật làm động vật dự báo).

Ba mươi con lợn con nữa cũng được phân phối vào tất cả các nhóm từ T01 đến T12 để dự trữ, chỉ được đưa vào nghiên cứu nếu một số nhóm không đạt được số lượng lợn con tối thiểu cần thiết, do lợn con bị chết hoặc loại trừ (Phụ lục II và phụ lục XIV; Sửa đổi số 2); dữ liệu thô của các lợn con này được ghi nhận trong sổ ghi chép dữ liệu thô được đánh dấu bằng (S) (sổ ghi chép từ số 13 đến 24). Cuối cùng, mười con lợn nái được sử dụng và mỗi con đều duy trì mười một lợn con.

Giả thuyết thực nghiệm

Nghiên cứu này được thiết kế để chứng minh sự an toàn của vacxin PRRSV châu Âu MLV cho lợn 1 ngày tuổi (96V198 dòng 1) trong điều kiện thí nghiệm bằng cách so sánh với nhóm đối chứng được chủng bằng chất pha loãng vacxin (đối chứng âm) đối với tất cả các thông số được mô tả dưới đây, nhưng nhiệt độ được phân tính có xem xét đến nhiệt độ nền của mỗi lợn con trước khi chủng ngừa làm giá trị đối chứng. Vacxin được coi là an toàn nếu không thấy các phản ứng tại chỗ hoặc toàn thân nghiêm trọng bởi các nguyên nhân do vacxin và nhiệt độ trung bình tăng đối với các lợn trong nhóm chủng ngừa không vượt quá 1,5°C so với nhiệt độ trung bình nền trước khi chủng ngừa và không có lợn con trong nhóm thử nghiệm thể hiện việc tăng nhiệt độ lớn hơn 2°C so với mỗi nhiệt độ nền của lợn con trước khi chủng ngừa. Sự lây lan và phát tán của chủng

vacxin được đánh giá nghiên cứu sự có mặt của chủng vacxin trong các lợn dự báo. Sự phát tán của động vật được chủng ngừa được đánh giá điều tra lượng virut trong các mẫu máu, mũi, miệng và trực tràng và trong mô.

Nhiệt độ trực tràng- đường trong mũi và trong cơ.

Liên quan đến nhiệt độ, có thể kết luận rằng vacxin là an toàn trong tất cả các phác đồ được đánh giá (đường dùng, độ chuẩn và số liều) do các kết quả thu được thực hiện các khuyến nghị của dược điển châu Âu đối với vacxin để sử dụng trong thú y.

Các phản ứng cục bộ

Đường trong mũi. Không có các phản ứng cục bộ được quan sát.

Đường trong cơ.

Khi mổ xác, chỉ có hai lợn con trong T12 (độ chuẩn tối đa bằng đường IM) có tổn thương nhẹ thấy được bằng mắt thường. Về mặt hiển vi, các tổn thương chỉ được quan sát thấy ở bốn con lợn thuộc nhóm T10; các tổn thương được mô tả đặc điểm bằng sự hiện diện ổ bệnh rất nhẹ hoặc nhiều ổ bệnh do việc thâm nhiễm tế bào viêm đơn nhân.

Các phản ứng toàn thân và sự kiện bất lợi

Đường trong mũi. Việc không có các phản ứng toàn thân và dấu hiệu lâm sàng liên quan đến việc chủng ngừa cho thấy vacxin này an toàn.

Đường trong cơ.

Các sự kiện bất lợi sau khi dùng vacxin chỉ quan sát được ở 2 trong số 8 lợn con thuộc nhóm tiếp nhận độ chuẩn cao nhất (x10 độ chuẩn giải phóng tối đa) bằng đường IM (nhóm T12). Các sự kiện này biến mất trước 4 giờ và lợn con hoàn toàn hồi phục. Liên quan đến việc hệ quả lâm sàng hàng ngày, các trường hợp đi khập khiễng không thể được coi là các hiện tượng liên quan đến việc dùng vacxin; việc đi khập khiễng chỉ quan sát thấy ở các lợn con trong các nhóm đối chứng. Nguyên nhân của một trường hợp chết trong quá trình nghiên cứu là do đè lên nhau; vì thế, có thể xem là trường hợp chết này không liên quan đến việc dùng vacxin. Tóm lại, chủng vacxin 96V198 dòng 1 bằng đường IM nên được coi là hoàn toàn an toàn ngoại trừ các sự kiện bất lợi được mô tả cho độ chuẩn mức cao nhất (x10).

Thể trọng

Đường trong mũi.

Khi giá trị trung bình của mức tăng cân được so sánh, T07 đã thể hiện giá trị thấp hơn đối chứng tương đương (T02) ($p<0,05$) từ ngày 0 đến 14. Tuy nhiên, sự khác biệt này không còn khi mức tăng cân được so sánh từ ngày 14 đến 28 và, cụ thể, khi toàn bộ nghiên cứu – từ ngày 0 đến 28- được xem xét. Vì thế, mức tăng cân của lợn con được chủng ngừa bằng trong đường mũi không bị ảnh hưởng, độc lập với liều được tiếp nhận.

Đường trong cơ.

Theo cách tương tự, T11 cho thấy các giá trị thấp hơn so với đối chứng tương ứng (T04) ($p <0,05$) từ ngày 0 đến 14. Sự khác biệt này không còn khi khoảng thời gian từ 14 đến 28 được phân tích nhưng nó lại xuất hiện trong toàn bộ cứu –từ ngày 0 đến 28. Sự khác biệt này có thể được giải thích là do mức tăng cân ở ba lợn con từ T11 là mức thấp nhất bao gồm tất cả các lợn con được mổ xác vào ngày 28, không phụ thuộc vào sản phẩm, độ chuẩn hoặc đường dùng (có nghĩa là T02, T04, T07 và T11). Tất cả các đối tượng tăng cân từ ngày 0 đến 28 là bằng hoặc cao hơn 5,5 kg, ngoại trừ ba lợn con nêu trên (tăng cân 4,08, 2,89 và 3,05 kg tương ứng với các lợn con số 199, 202 và 205). Bất ngờ là những lợn con này phải chịu tình trạng đi khập khiễng trong thời gian dài nhất. Tóm lại, không thể phân biệt được là sự khác biệt quan sát được về việc tăng cân giữa T04 và T11 là do sự kiện đi khập khiễng hay do chủng ngừa.

Sự phát tán

Đường dùng trong mũi và trong cơ. Sự phát tán của virut được chứng tỏ bằng sự có mặt của chủng vacxin trong hầu hết các mô của động vật được chủng ngừa, không phụ thuộc vào đường dùng. Sự có mặt của chủng 96V198 dòng 1 ở các độ chuẩn có thể được coi là cao trong phổi, amidan và hạch bạch huyết khí quản phế quản mà còn trong các hạch bạch huyết lách và mạc treo cho thấy sự phát tán hữu cơ hoàn toàn của chủng vacxin.

Lan truyền

Đường dùng trong mũi và trong cơ. Mặc dù việc phát hiện chủng vacxin trong gạc lấy mẫu bệnh phẩm dịch khoang miệng và trực tràng là không ổn định từ các lợn con đã chủng ngừa, nhưng nó liên tục và cao trong gạc lấy mẫu bệnh phẩm trong mũi; sự phân phối tần suất của việc phát hiện chủng vacxin giảm theo thời gian. Các kết quả này cùng với việc phát hiện chủng vacxin trong mẫu máu từ tất cả các lợn dự báo, chứng tỏ rằng 96V198 dùng 1 là tích cực và liên tục xuất tiết sau chủng ngừa. Ngoài ra, sự có mặt của chủng vacxin trong các mẫu mô và máu từ các lợn con dự báo đã chỉ ra rằng việc lan truyền virut từ lợn con đã chủng ngừa là hoạt tính; nó có thể lây nhiễm cho động vật cảnh báo và nó có thể sao chép trong động vật; và thậm chí một lợn cảnh báo IM từ T09 có tổn thương phổi phù hợp với PRRS cộng với kết quả dương tính đối với IHC. Tóm lại, các kết quả được đề cập ở trên chỉ ra rằng 96V198 dòng 1 có thể được truyền liên tục từ lợn đã chủng ngừa sang lợn chưa chủng ngừa, ít nhất là trong giai đoạn sớm sau khi chủng ngừa.

Tổn thương phổi

Đường dùng trong mũi và trong cơ. Cả chính con lợn có các tổn thương quan sát bằng mắt và hiển vi phù hợp với PRRS (viêm phổi kẽ) cộng với kết quả dương tính đối với PRRSV IHC là từ nhóm IM. Vì thế, có thể kết luận rằng đường IN là an toàn, trong khi đường IM có thể gây tổn thương phổi phù hợp với PRRSV ít nhất ở một con lợn trong mỗi nhóm (từ T09 đến T12).

Ví dụ 7- Độ an toàn của việc dùng nhắc lại một liều vacxin PRRSV châu Âu sống được cải biến được dùng cho lợn nái mang thai huyết thanh dương tính PRRSv

Nghiên cứu này được thiết kế để chứng tỏ độ an toàn của việc dùng nhắc lại liều đơn MLV PRRSV châu Âu ở các con lợn nái huyết thanh dương tính ở nửa sau của thai kỳ (87 ngày mang thai). Không có các phản ứng toàn thân sau chủng ngừa được quan sát sau khi dùng lần thứ nhất và thứ hai. Ngoài ra, không có đánh giá lâm sàng được ghi nhận ở lợn nái bất kỳ trong toàn bộ thời gian quan sát.

Liên quan đến nhiệt độ trực tràng, không có lợn nái nào thể hiện là bị sốt ở thời điểm bất kỳ sau chủng ngừa (RT ≥40,1°C). Ngoài ra, nhiệt độ trực tràng trung bình sau chủng ngừa không cao hơn nhiệt độ trực tràng trung bình trước khi chủng ngừa cộng

1,5°C và không có con lợn nái nào vượt quá nhiệt độ trực tràng của chúng trước khi chủng ngừa cộng thêm 2°C.

Các phản ứng cục bộ tại vị trí tiêm quan sát được ở 63% và 50% lợn nái được chủng ngừa bằng vật phẩm thử nghiệm tương ứng với lần dùng thứ nhất và thứ hai. Các phản ứng bao gồm sưng phồng sờ thấy được và/hoặc nhìn thấy được (đường kính từ 0,4 đến 2,8 cm) mà đã biến mất trong thời gian từ 1 đến 6 ngày. Không có con lợn nái nào cho thấy bị đỏ, tăng nhiệt cục bộ hoặc đau tại vị trí tiêm sau khi dùng.

Liên quan đến năng suất sinh sản, không thế có hiện tượng sẩy thai hoặc đẻ non được ghi nhận. Ngoài ra, không thấy tác dụng rõ rệt của việc chủng ngừa lên số lượng thai chết lưu, thai gỗ, lợn con có khả năng sống thấp và chết trước khi cai sữa. Việc chủng ngừa không gây lây nhiễm qua rau thai như được thấy qua kết quả âm tính RT-qPCR được phát hiện trong các mẫu huyết thanh được thu thập lúc sinh và lúc cai sữa từ lợn con. Tóm lại, việc dùng nhắc lại vacxin là an toàn ở lợn nái có huyết thanh dương tính trong nửa cuối của thai kỳ.

Các chữ viết tắt được sử dụng ở đây bao gồm: BHK-21, dòng thận chuột Hamster con 21; BRP, Quy trình thông qua mẻ; CCID50; liều gây nhiễm 50% dịch nuôi cấy tế bào; CP, sản phẩm đối chứng;D, Day;DRAC, Đánh giá chăm sóc động vật hàng ngày; ID, định danh; GLP, Thực hành tốt phòng thí nghiệm; IF, miễn dịch huỳnh quang; IV, trong tĩnh mạch; MLV, Vacxin sống được cải biến; MSV, chủng virut giống gốc; NA, không áp dụng được; P, đời cấy chuyền; PBS, nước muối đệm phosphat; PI, sau khi chủng; PRRSV, virut hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn; RT, nhiệt độ trực tràng; RT-qPCR, chuỗi phản ứng polymeraza phiên mã ngược định lượng; SOP, quy trình thao tác chuẩn; S/P, mẫu dương tính; TBD, được xác định; TI, Vật phẩm thử nghiệm, và VICH, Hội nghị quốc tế về hài hòa hóa trong thú y.

Mục tiêu nghiên cứu và biện luận

Vacxin sống được cải biến (MLV) PRRSV châu Âu được dự định là để chủng ngừa tích cực cho lợn nái hậu bị và lợn nái trong môi trường nhiễm PRRS, để giảm nhiễm virut trong máu, lây nhiễm qua rau thai và sẩy thai gây ra do việc nhiễm chủng virut PRRS châu Âu. Theo luật pháp có hiệu lực, bắt buộc phải chứng minh sự an toàn

của vacxin để được phép đưa ra thị trường. Nghiên cứu này được thiết kế theo dược điển châu Âu 7.7:04/2013/50206 - Đánh giá sự an toàn của vacxin thú y và huyết thanh miễn dịch - và VICH GL44 - Độ an toàn của động vật mục tiêu đối với vacxin sống và vô hoạt dùng cho thú y - Hướng dẫn. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá độ an toàn của việc dùng nhắc lại (1x + 1x) MLV PRRSV châu Âu cho lợn nái huyết thanh dương tính ở nửa sau của thai kỳ. Vật liệu được thử nghiệm là 6,6 log10CCID50/ống RRSV châu Âu, chủng 96v198c1, (MSV+3), với liều 5,2 log10CCID50 trong 2 mL/trong cơ.RT qPCR

Virut huyết (tải lượng PRRSV trong huyết thanh) được xác định bằng qPCR (RT) phiên mã ngược được thực hiện bằng quy trình chuẩn dưới đây. Vắn tắt, ARN virut đã tinh chế được sử dụng làm khuôn, được phiên mã ngược ở 50°C trong 30 phút, và được biến tính ở 95°C trong 5 phút. Chương trình của các phản ứng PCR bao gồm 40 chu trình làm biến tính ở 95°C trong 20 giây và ủ ở 53°C trong 40 giây. qRT-PCR được thực hiện trong máy luân nhiệt hệ thống PCR thời gian thực 7500.

Trình tự mồi và mẫu dò như sau (SEQ ID NOS 6-8, liên tiếp):

Mồi xuôi (Lelystad F): 5'-GCACCACCTCACCCAGAC-3' (Nồng độ cuối 0,5µM).

Mồi ngược (Lelystad R): 5'-CAGTTCCTGCGCCTTGAT-3' (nồng độ cuối 0,5µM).

Mẫu dò (Lelystad S): 5'-6-FAM- CCTCTGCTTGCAATCGATCCAGAC –TAMRA-3' (nồng độ cuối 0,6µM).

Huyết thanh học

Huyết thanh được thu thập trước khi chủng ngừa, được thử nghiệm các kháng thể đối với PRRSV sử dụng IDEXX PRRS X3 ELISA, theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Vắn tắt, các mẫu huyết thanh được pha loãng tỷ lệ 1:40 trong đĩa 96 lỗ được phủ kháng nguyên PRRSV tái tổ hợp và được ủ 30 phút ở 18-26°C. Sau khi rửa, thể liên hợp peroxidaza cây cải ngựa kháng lợn được bổ sung và các đĩa được ủ trong 30 phút nữa ở 18-26°C. Thể liên hợp không gắn kết được rửa trôi và chất TMB được bổ sung vào các lỗ. Việc hiện màu được xác định ở 650 nm. Các giá trị S/P được ghi nhận đối với từng mẫu. Nếu tỷ lệ S/P là ≥ 0,4 mẫu được phân loại là dương tính với kháng thể PRRS. Nếu

tỷ lệ S/P < 0,4 mẫu được phân loại làm âm tính. Hướng dẫn ELISA được bao gồm trong hồ sơ nghiên cứu.

Quan sát lâm sàng

Không có hệ quả lâm sàng được ghi nhận đối với lợn nái bất kỳ trong suốt giai đoạn sau chủng ngừa (từ D0 đến D28).

Nhiệt độ trực tràng

Để nghiên cứu nhiệt độ trực tràng, hai tiêu chuẩn được tuân theo:

a) Nhiệt độ trực tràng trung bình sau chủng ngừa của cả nhóm nên không cao hơn nhiệt độ trực tràng trung bình trước chủng ngừa cộng với 1,5°C.

Chủng ngừa lần thứ nhất: Nhiệt độ trực tràng trung bình sau chủng ngừa (ở D0+4h, D1, D2, D3 hoặc D4) ≤ [Nhiệt độ trực tràng trung bình trước chủng ngừa (D-1/D0) trung bình] + 1,5 °C

Chủng ngừa lần thứ hai: Nhiệt độ trực tràng trung bình sau chủng ngừa (ở D14+4h, D15, D16, D17 hoặc D18) ≤ [Nhiệt độ trực tràng trung bình trước chủng ngừa (D13/D14 trung bình)] + 1,5 °C

b) Nhiệt độ trực tràng cá thể sau chủng ngừa của từng lợn nái không nên cao hơn nhiệt độ trực tràng trước chủng ngừa (Pre-vac) cộng với 2°C.

Chủng ngừa lần thứ nhất: Nhiệt độ trực tràng sau chủng ngừa riêng rẽ (ở D0+4h, D1, D2, D3 hoặc D4) ≤ [nhiệt độ trực tràng riêng rẽ trước chủng ngừa (D-1/D0 trung bình cá thể)] + 2,0°C

Chủng ngừa lần thứ hai: Nhiệt độ trực tràng cá thể sau chủng ngừa (ở D14+4h, D15, D16, D17 hoặc D18) ≤ [nhiệt độ trực tràng cá thể sau chủng ngừa (D13/D14 trung bình cá thể)] + 2,0 °C

Ở cả hai nhóm T01 và T02, RT trung bình sau chủng ngừa không cao hơn trước chủng ngừa trung bình cộng với 1,5°C. Ngoài ra, RT sau chủng ngừa của mỗi lợn nái không cao hơn nhiệt độ trực tràng trước chủng ngừa của lợn nái đó cộng với 2°C ở lợn nái bất kỳ trong số các lợn nái thuộc các nhóm T01 hoặc T02. Sau khi chủng ngừa lần

thứ nhất, việc tăng tối đa RT là 0,81°C (ngày 2) trong nhóm T01 và 0,76°C (ngày 0+4h) trong nhóm T02. Sau khi chủng ngừa lần thứ hai, việc tăng tối đa quan sát được vào ngày 17 ở cả hai nhóm T01 (0,81°C) và T02 (0,47°C). Không có lợn nái nào từ nhóm T01 hoặc T02 thể hiện nhiệt độ trực tràng tăng (≥40,1°C) tại thời điểm bất kỳ sau chủng ngừa.

Phản ứng toàn thân sau chủng ngừa

Không có phản ứng toàn thân sau chủng ngừa được quan sát ở lợn nái bất kỳ trong số các lợn nái từ nhóm T01 hoặc T02.

Phản ứng tại chỗ tại vị trí tiêm

Trước khi chủng ngừa, tất cả lợn nái đã được kiểm tra sự hiện diện của các phản ứng tại chỗ ở vùng cổ do việc chủng trước đó mà có thể can thiệp vào việc đánh giá các phản ứng tại chỗ tại vị trí tiêm. Ba lợn nái, hai từ nhóm T01 (1802 và 2259) và một từ nhóm T02 (1663) đã thể hiện phản ứng cũ ở ở cổ phải do việc chủng trước đó. Tuy nhiên, tất cả các phản ứng này đều nằm bên dưới và ở xa vị trí chủng tương ứng. Khi cổ trái được kiểm tra trước khi chủng ngừa, các phản ứng cũ cũng được quan sát thấy ở bốn con lợn nái, hai từ nhóm T01 (316 và 1802) và hai từ nhóm T02 (2547 và 2842). Như quan sát được ở cổ bên phải, các phản ứng này nằm bên dưới vị trí chủng. Trong tất cả các trường hợp (cho cả cổ phải và cổ trái), các phản ứng cũ không được coi là có khả năng can thiệp vào việc đánh giá các phản ứng tại chỗ sau chủng ngừa. Không có lợn nái nào trong số những con lợn nái được chủng ngừa bằng CP (nhóm T01) đã thể hiện phản ứng tại chỗ ở vị trí tiêm tại thời điểm bất kỳ sau chủng ngừa. Các phản ứng tại chỗ quan sát được sau chủng ngừa trong nhóm T02 được tóm tắt trong 17.

Sau khi chủng ngừa lần thứ nhất, 63% lợn nái T02 (5/8) đã thể hiện hiện tượng sưng phồng nhìn thấy được và/hoặc sờ thấy được tại vị trí tiêm ở cổ phải. Hiện tượng sưng phồng tối đa quan sát được là phản ứng có đường kính 2,8 cm (tương ứng với điểm số bằng 3) kéo dài trong 6 ngày. Không có con lợn nái nào cho thấy bị đỏ, tăng nhiệt cục bộ hoặc đau tại vị trí tiêm.

Sau khi chủng ngừa lần hai, hiện tượng sưng phồng nhìn thấy được và/hoặc sờ thấy được (cổ trái) quan sát được ở 50% lợn nái T02 (4/8). Tất cả các phản ứng quan sát được được tính điểm là 1 hoặc 2 (đường kính tối đa 1 cm), và kéo dài tối đa trong 5 ngày.

Như được quan sát sau khi chủng ngừa lần thứ nhất, không có con lợn nái nào thể hiện việc bị hóa đỏ, tăng nhiệt cục bộ hoặc đau tại vị trí tiêm.

Bảng 18. Tóm tắt phản ứng cục bộ trong nhóm T02

Phía cổ	Nhìn thấy được Hóa đỏ	Sưng phồng nhìn thấy được	Khoảng điểm số sưng phồng	Khoảng thời gian (ngày)	Sưng phồng sờ thấy được	Phản ứng đau	Tăng nhiệt độ
Phải	0/8 (0%)	4/8 (50%)	1 - 3	1 - 6	3/8 (38%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)
Trái	0/8 (0%)	4/8 (50%)	1 - 2	1 - 5	4/8 (50%)	0/8 (0%)	0/8 (0%)

Kiểm tra vị trí tiêm sau khi chết

Khi kiểm tra bằng mắt, người ta quan sát thấy rằng một vài lợn nái ở tất cả các nhóm có tổn thương trong cơ cổ, chủ yếu bao gồm nhiều nốt vật liệu dạng bã đậu, mà lan rộng ra toàn bộ vùng cổ. Các tổn thương này được cho là do các mũi tiêm cũ vì chúng không được phát hiện tại thời điểm tiêm.

Khi các điểm chủng của lợn nái T02 được kiểm tra, 1/8 phản ứng có thể nhìn thấy được trên cổ phải 3/8 trên cổ trái. Trong nhóm T01, một lợn nái (1/7) cũng thể hiện phản ứng nhìn thấy được ở vị trí chủng thứ nhất (cổ phải). Tất cả các phản ứng được mô tả là có sự hiện diện của các sợi cơ nhạt, trong hầu hết các trường hợp rõ ràng theo quỹ đạo của kim tiêm và không thể xác định được. Ngoài ra, nhiều nốt sần được quan sát ở hai lợn nái T02 (điểm chủng bên trái).

Năng suất sinh sản

Không ghi nhận thấy có hiện tượng sẩy thai hoặc đẻ non trong nhóm điều trị bất kỳ. Thời gian mang thai dao động trong khoảng từ 114 đến 117 ngày trong nhóm T01 và 114 và 119 trong nhóm T02. Lợn con được sinh ra khỏe mạnh từ mỗi lợn nái được nhận diện bằng thẻ tai và được duy trì bằng

Trong nghiên cứu này, độ an toàn của việc dùng nhắc lại một liều MLV PRRSV châu Âu được đánh giá ở nửa sau của thai kỳ (87 ngày mang thai) trong lợn nái huyết thanh dương tính. Các thông số an toàn được bao gồm trong các phản ứng toàn thân với việc chủng ngừa, nhiệt độ trực tràng sau chủng ngừa, hệ quả lâm sàng, các phản ứng cục bộ tại vị trí tiêm, năng suất sinh sản và kiểm tra vị trí tiêm sau khi chết.

Không có phản ứng toàn thân sau chủng ngừa quan sát được sau khi dùng lần thứ nhất và thứ hai. Ngoài ra, không có hệ quả lâm sàng tổng quát được ghi nhận ở lợn nái bất kỳ trong toàn bộ quá trình thử nghiệm.

Liên quan đến nhiệt độ trực tràng, không có lợn nái nào thể hiện là bị sốt ở thời điểm bất kỳ sau chủng ngừa (RT ≥40,1°C). Ngoài ra, nhiệt độ trực tràng trung bình sau chủng ngừa không cao hơn nhiệt độ trực tràng trung bình trước khi chủng ngừa cộng 1,5°C và không có con lợn nái nào vượt quá nhiệt độ trực tràng của chúng trước khi chủng ngừa cộng thêm 2°C.

Các phản ứng cục bộ tại thời điểm tiêm quan sát được tương ứng là 63% và 50% của lợn nái T02 vào các lần chủng ngừa thứ nhất và thứ hai. Sau khi chủng ngừa lần thứ nhất, hiện tượng sưng phồng tối đa quan sát được là phản ứng có đường kính 2,8 cm kéo dài tối đa 6 ngày. Sau khi chủng ngừa lần thứ hai, hiện tượng sưng phồng tối đa quan sát được là phản ứng có đường kính 1 cm và thời gian tối đa là 5 ngày. Không có con lợn nái nào cho thấy bị đỏ, tăng nhiệt cục bộ hoặc đau tại vị trí tiêm sau khi dùng.

Tại thời điểm kiểm tra sau khi chết, phản ứng nhìn thấy được ở vị trí chủng quan sát được chỉ ở 3/8 lợn nái được chủng ngừa. Hai trong số chúng (15 và 1663) tương ứng với các lợn có điểm số sưng phồng cao nhất (tương ứng là 2 và 3) đưa ra khi đánh giá các phản ứng cục bộ; về mặt vĩ mô, các tổn thương được mô tả là sợi cơ trở nên tái đi theo quỹ đạo kim, mà được chẩn đoán là viêm cơ u hạt vừa phải với sự tham gia của các sợi cơ. Trong trường hợp lợn nái 15, các giọt vacxin quan sát được bên trong thương tổn, hỗ trợ việc thực sự là tổn thương này đã được gây ra do kết quả của việc sử dụng vật phẩm thử nghiệm. Đối với lợn nái T02 khác (2547) mà đã thể hiện phản ứng nhìn thấy được, tổn thương cũng được mô tả là sợi cơ trở nên tái đi theo quỹ đạo kim, nhưng trong trường hợp này cũng có nhiều nốt sần chứa vật liệu dạng bã đậu. Khi phân tích mô bệnh học, tổn thương này được chẩn đoán là viêm cơ hạt nặng với sự hiện diện của hoại tử theo ổ nhưng rộng. Do sự có mặt của nhiều nốt sần trong vùng cổ, nhưng không đặc thù ở vị trí chủng, cũng được quan sát ở 8/8 lợn nái T02 và ở 5/7 lợn nái T01, có thể là tổn thương quan sát được ở lợn nái 2547 là do tiêm trước đó chứ không phải do vật phẩm thử nghiệm. Điều này sẽ được hỗ trợ bởi thực tế là, trong quá trình đánh giá *in vivo* các phản ứng cục bộ, lợn nái này chỉ có đường kính sưng phồng <0,5 cm mà kéo dài 5 ngày.

Rối loạn sinh sản liên quan đến PRRSV được đặc trưng bởi đẻ non, sẩy thai giai đoạn muộn, chết non hoặc lợn con khả năng sống kém và thai gỗ. Trong nghiên cứu này, không thấy có hiện tượng sẩy thai hoặc đẻ non được ghi nhận. Ngoài ra, không thấy tác động rõ rệt của việc chủng ngừa lên số lượng thai chết lưu, thai gỗ hoặc lợn con sức sống kém. Việc nhiễm PRRSV cũng có thể làm tăng tỷ lệ tử vong trước khi cai sữa. Trong nghiên cứu này, % trung bình của tỷ lệ tử vong trước khi cai sữa là 6,0 và 5,3 tương ứng trong các nhóm T01 và T02, chỉ ra rằng không có tác động của việc chủng ngừa lên sự sống sót của lợn con.

Cuối cùng, tất cả các mẫu huyết thanh được thu gom lúc sinh hoặc khi cai sữa từ lợn con được sinh ra từ lợn nái T01 và T02 âm tính PRRSV bằng RT-qPCR, chỉ ra rằng không có sự lây nhiễm qua rau thai sau khi chủng ngừa.

Vì thế, việc dùng nhắc lại liều đơn MLV PRRSV châu Âu cho lợn nái huyết thanh dương tính với PRRSV lúc 87 ngày mang thai: không cảm ứng các phản ứng toàn thân bất thường (sốc phản vệ, nôn); không cảm ứng hệ quả lâm sàng trong thời gian 14 ngày sau chủng ngừa; không cảm ứng nhiệt độ trực tràng bất thường sau chủng ngừa; gây phản ứng cục bộ tại vị trí tiêm ở 63% và 50% lợn nái tương ứng sau khi chủng ngừa lần một và lần hai trong đó các phản ứng này bao gồm sưng phồng sờ thấy được và/hoặc nhìn thấy được (đường kính từ 0,4 đến 2,8 cm) mà đã biến mất trong thời gian từ 1 đến 6 ngày; không tác động đến các thông số sinh sản; và không gây nhiễm qua nhau thai.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vacxin để bảo vệ lợn chống lại sự lây nhiễm virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS), mà vacxin này bao gồm: (a) virut PRRS châu Âu được mã hóa bằng phân tử polynucleotit SEQ ID NO: 5 hoặc polynucleotit bất kỳ mà đồng nhất ít nhất là 90% với SEQ ID NO: 5; (b) phân tử polynucleotit mã hóa đã nêu; (c) phân tử polynucleotit đã nêu ở dạng plasmit; hoặc (d) vectơ virut chứa phân tử polynucleotit đã nêu;

với lượng hữu hiệu để tạo ra sự bảo vệ miễn dịch chống lây nhiễm, và chất mang thích hợp để sử dụng trong thú y, và trong đó vacxin này cung cấp sự chủng ngừa sớm và an toàn ngay khi lợn con được một ngày tuổi hoặc ít hơn, và trong đó vacxin này cung cấp khoảng thời gian miễn dịch lên đến 6 tháng.

2. Vacxin theo điểm 1, trong đó vacxin này cung cấp sự bảo vệ chống lại sự lây nhiễm khi được sử dụng cho lợn con khoảng từ 8 đến 12 giờ tuổi.

3. Vacxin theo điểm 1, trong đó sự khởi phát miễn dịch được cung cấp bắt đầu vào lúc hai tuần sau khi chủng ngừa.

4. Vacxin theo điểm 1, trong đó sự khởi phát miễn dịch được cung cấp bắt đầu từ 24 đến 28 ngày sau khi chủng ngừa.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Zoetis Services LLC
Calvert, Jay Gregory
Balasch, Monica
Fort, Maria
Pearce, Douglas S.
Keith, Marcia L.

<120> VACXIN ĐỂ BẢO VỆ LỢN CHỐNG LẠI SỰ LÂY NHIỄM VIRUT GÂY HỘI CHỨNG SINH SẢN VÀ HÔ HẤP Ở LỢN

<130> ZP000148A PCT

<150> 62/434,144
<151> 2016-12-14

<160> 8

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 15092
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thể phân lập virut PRRS 96V198 - đời cấy chuyền 0

<400> 1
atgatgtgta gggtattccc cctacataca cgacacttct agtgtttgtg tgccttggag 60

gcgtgggtac agccccgccc cacctcttgg cccctgttct agcccaacag gtatccttct 120

ctctcggggc gagcgcgccg cctgctgctc ccttgcagca ggaaggacct cccgagtatt 180

tccggagagc acctgcttta cgggatctcc acccctttaac catgtctggg acgttctccc 240

ggtgcatgtg caccccggct gcccgggtat tttggaacgc cggccaagtc ttttgcacac 300

ggtgtctcag tgcgcggtct cttctctctc cggagcttca ggacactgac ctcgctgcaa 360

ttggcttgtt ttacaagcct aaagacaagc ttcactggaa agtccctatc ggcatccctc 420

aggtggagtg tactccgtcc gggtgctgtt ggctctcagc catcttcccc ttggcgcgca 480

tgacctccgg caatcacaac tttctccaac gacttgtgaa ggttgctgat gttttgtacc 540

gtgacggctg cttggcacct cgacaccttc gcgaactcca agtttacgag cgcggctgca 600

actggtaccc gatcacgggg cccgtgcccg ggatgggttt gtacgcgaac tccatgcacg 660

tgtccgacca accgtttcct ggtgccactc atgtgttaac gaactcacct ctgcctcagc 720

aggcttgtcg acagccgttt tgtccatttg aggaggttca ttccgacgta tacaggtgga 780

agaaattcgt gatttttgtg gattcctctt ctgacggccg atctcgcatg atgtggacac 840

caggatccga cgactcggct gccttagaag tattgccacc tgaactagaa tgtcgagtcg 900

aaatcctcgt tcggagtttt cctgcccacc accctgtcga catcaccaac tgggagctca 960

ctgagtcccc tgagcacggt ttttccttca gcacgtctca ttcttgtggt taccttgccc 1020

aaaaccctga cgtgtttgat ggtaagtgtt ggctttcttg ctttttgggc ctgccgaccg 1080

aagtgtggcg tcatgaggag tatctagcta acgccttcgg ttaccaaacc aagtggggcg 1140

tgcatggtaa gtacctccag cgcaggcttc aggtccgcgg catgcgtgct gtagttgatc 1200

ctgatggtcc catccacgtt gaagcgctgt cttgccccca gtcttggatc aggcacctga 1260

ctctaaatga tgacgtcacc ccaggatttg ttcgcctaac atcccttcgc attgagccga 1320

acacagagcc tactactttc cggatctttc ggtttggagc gcataagtgg tatggcgctg 1380

ccggcaaacg ggctcgtgct aagcgtgccg ctaaaggtga gaagaattca gctcccaccc 1440

ccaaggtcgc cctgccggtc cccacctgtg gaattaccac ctactctcca ccgacagacg 1500

ggtcttgtgg ttggcatgtc cttgccgcca taatgaaccg gatgataaat ggtgacttca 1560

cgtcccctct gactccgtac aacagaccag aggatgattg ggcttctgat tatgatcttg 1620

ctcaggcaat ccaatgtcta caactgcctg ctaccgtggt ccggagtcgc gcctgtccta 1680

acgccaagta cctcataaaa ctcaacggag tccactggga ggtagaggtg aggtcaggaa 1740

tggctcctcg ctctctttct cgtgaatgtg tggttggcgt ttgctctgaa ggttgtgttg 1800

caccgcctta tccagcagac gggctaccag aacgagcact cgaggccttg gcgtctgctt 1860

acaggttacc ctctgattgt gttagctctg gcattgctga ctttcttgct aacccacctc 1920

ctcaggaatt ctggaccctc gacaaaatgt tgacctcccc gtcaccagag cggtccggct 1980

tctctagttt gtataaatta ctattagagg ttgttccgca aaaatgcggt gccacggaag 2040

gggctttcgt ctatgctgtt gagagaatgt tgaaggattg tccgagctcc aaacaggcca 2100

tggcccttct ggcaaaaatt aaagttccat cctcaaaggc cccgtctgtg tcccttgacg 2160

agtgtttccc tacggatgtt tcagccgact tcgagccagc atctcaggaa aggccccaaa 2220

gttccggtgc tgctgttgtc ctgtgttcac cggaagtaaa agagttcgaa gaagcagccc 2280

cagaagaagt tcaagagagt ggccacaagg tcgcccgctc tgcatttgtt gccgagggtc 2340

ctaacaatga acaggtaccg atggctgccg gcgagcaact gaagcccggt ggtcgcgttt 2400

tggcggtcgg gaatgctcat gaaggtgttc tggcctcaac tagtccgact aacctgatag 2460

gcgggaactt ccccccttca gactccatga aagagagcat gctcaatagc tgggaagacg 2520

aaccactgga tttgtcccaa ccggcaccag ctgttacaat gacccttgtg agagagcaaa 2580

cacccgacaa cctgggtcct gatgccggtg ccttccccgt caccgttcga aaatttgtcc 2640

cgacagggcc tacactccgt catgttgagc actgcggcac ggagtcaggc gacagcagtt 2700

cgcccttgga tctgtcttat gcgcaaaccc tggaccagcc tttaaatcta tccttggccg 2760

cttggccagt gagggccacc gcgtctgacc ctggctgggt ccacggtagg cgcgagccta 2820

tctttgtaaa gcctcgagat gctttctctg acggcgattc agcccttcag ttcggggagc 2880

tgtctgaatc cggctctgtc atcgagtttg accggacaag aaatgctccg gcggtcgacg 2940

cctctgttga cttgacggct tcgaacgagg ccctctctgt ggttgatcct ttcgaatttg 3000

ccgaactcaa gcgcccgcgt ttttccgcac aagccttaat tgaccgaggc ggtccacttg 3060

ccgacgtcca tgcaaaaata aagaaccggg tatatgaaca gtgcctccag gcttgtgagc 3120

ctggcagtcg cgcaacccca gccaccaagg agtggctcga taaaatgtgg gatagggtgg 3180

acatgaagac ttggcgctgt acctcgcagt tccaagctgg tcgcattctt gcgtccctta 3240

aattcctccc tgacatgatt caggacacac cacctcctgt tcctaggaag aatcgggcta 3300

gtgataatgc cggcctgaag cgactggtgg cgcagtggga cagaaaattg agtgcaaccc 3360

ccccttcaaa accggttgga ccaacacttg accaaattgt cccttcgccc acgggtaccc 3420

agcaagaaga tgtcacttcc tccgatgggc catctcatgc gccggatcct cctagtcgaa 3480

tgagcacgag tgggagttgg aagggccttg tgctctctgg tacccgtctc gcggggtcca 3540

ttagtcagca tttcatgaca tgggtttttg aggttttctc ccatctccca gcttttgcac 3600

tcacactttt ctcgccgagg ggctctatgg ctccaggtga ttggatgttt gcaggtgttg 3660

ttttacttgc tctcctgctc tgtcgttctt acccagtact cgggtgcctt cccttattgg 3720

gtgtcctttc tggctctgtg cggcgcgttc gtctgggggt ttttggttct tggatggctt 3780

tcgctgtatt tttattctcg actccatcca acccagtcgg ttcttcttgt gaccacgatt 3840

cgccggagtg tcatgctgag cttttggctc ttgagcagcg ccaactttgg gaacctgtgc 3900

gcggccttgt ggtcggcccc tcgggcctct tatgtgtcat tcttggcaag ctactcggtg 3960

ggtcacgtta tctctggcat gttttcttac gtttatgcat gcttgcagat ttggcccttt 4020

ctcttgttta tgtggtgtcc caggggcgtt gtcacaagtg ttggggaaag tgtataagaa 4080

cagctccggc ggaggtggct ctcaatgtgt tccctttctc gcgcgctacc cgtagctctc 4140

ttgtgtcctt gtgcgatcgg ttccaagcgc caaaaggggt tgatcctgtg tacttggcaa 4200

cgggttggcg cgggtgttgg tgtggtgaga gtcccattca tcaaccgcac caaaaaccca 4260

tagcttatgc taatttggat gaaaagaaaa tatctgccca aacggtggtt gctgtcccac 4320

acgatcccag tcaggccatc aagtgcctga aagttttgca ggcgggagga gccatcgtgg 4380

accagcccac acctgaggtc gtccgtgtat ccgaaatccc cttctcagcc ccatttttcc 4440

caaaagttcc agtcaaccca gattgtaagg ttgtggtgga ttcggacact tttgtggctg 4500

cggttcgctg cggctactcg acagcacaac tggtcctagg ccagggcaac tttgccaagt 4560

taaatcagat tcccctcagg agctccatct ccaccaaagc gattggcggg gcctcttaca 4620

cccttgctgt ggctcaagtt tctgtgtgga ctcttgttca cttcatcctc ggtctttggt 4680

tcacgtcacc ccaagtgtgt ggccgaggaa cctctgaccc atggtgttca aatccttttt 4740

cataccctac ctatggcccc ggggttgtgt gctcctctcg actttgtgtg tctgccgacg 4800

gggtcactct accattgttc tcagccgtgg ctcaactctc cggtagagag gtggggattt 4860

ttattttggt gctcgtctcc ttgatggctt tggcccaccg catggccctt aaggcagaca 4920

tgttgatggt ctttctggct ttttgtgctt acgcctggcc catgagctcc tggttgattt 4980

gcttctttcc tacactcttg aagtgggtta ccctccaccc tcttactatg ctttgggtgc 5040

actcattctt ggtgttttgt ctgccagcag ccggcatcct ctcactaggg ataactggcc 5100

ttctttgggc ggttggccgc tttactcagg ttgccggaat tattacacct tatgacatcc 5160

accagtacac ctctgggcca cgtggcgcag cagccgtggc cacagcccca gaaggcactt 5220

atatggccgc cgtcaggaga gctgctttaa ctgggcgaac tttaatcttc accccgtctg 5280

cagttggatc ccttctcgaa ggagctttca ggactcataa accttgtctt aacaccgtaa 5340

atgttgtagg ctcttccctt ggttccggcg gggttttcac tattgacggc agaaaaattg 5400

ttgtcactgc tgcccatgtg ttgaacggcg acacagctag agtcaccggc gactcctaca 5460

accgcatgca tactttcaag accaatggtg attatgcctg gtcccatgct gatgactggc 5520

ggggcgttgc ccctgcggtc aaggttgcga aggggtaccg cggtcgtgcc tactggcaaa 5580

catcaactgg cgtcgaaccc ggtgttattg gggaagggtt cgccttctgt ttcaccacct 5640

gtggcgattc ggggtcaccc gtcatctcag aatccggtga tctcattgga atccataccg 5700

gttcaaataa acttggttct ggtcttgtga caacccctga aggggagaca tgtaccatca 5760

aagaaaccaa gctctctgac ctttccagac atttcgcagg cccaagcgtt cctcttgggg 5820

atattaaatt gagtccagcc atcatccctg atgtaacatc cattccgagt gacttggcat 5880

cgctcctatc ctccgtccct gtagtggaag gcggcctctc gaccgttcaa cttttgtgtg 5940

tctttttcct actttggcgc atgatgggcc atgcctggac tcccattgtt gccgtgggtt 6000

tctttttact gaatgaaatt cttccagcag ttttggtccg agccgtgttt tcttttgcac 6060

tttttgtgct tgcatgggcc acccccctggt ctgcacaggt gttgatgatt agactcctca 6120

cggcatctct caaccgcaac aagctttctc tggcgttcta cgcactcggg ggggtcgtcg 6180

gtttggccgc tgaaatcggg acttttgctg gcaaattgcc tgaattgtct caaacccttt 6240

cgacatactg cttcttacct agggtccttg ctatgaccag ttgtgttccc accatcatca 6300

ttggtggact ccatgccctc ggtgtaattc tgtggttgtt caaataccgg tgcctccaca 6360

acatgctcgt tggtgatggg agtttttcaa gcgccttctt cctacggtat tttgcagagg 6420

gtaatctcag aaaaggtgtt tcgcagtcct gtggcatgaa taacgagtcc ctgacggctg 6480

ctttagcttg caagttgtca caggctgacc ttgatttttt gtccagctta acgaacttca 6540

agtgctttgt atctgcttcg aatatgaaaa atgctgccgg ccagtacatt gaagcggcgt 6600

atgccaaggc cctgcgccaa gagttggcat ctctagttca gattgacaaa atgaaaggag 6660

ttttgtccaa actcgaggcc tttgctgaaa cagctactcc gtcccttgac ataggtgacg 6720

tgattgttct gcttgggcaa catccacacg gatctatcct tgatattaat gtggggactg 6780

agaggaaaac tgtgtccgtg caagagaccc ggagcctagg cggttccaaa ttcagtgttt 6840

gtactgtcgt gtctaacaca cccgtggacg ccttaaccgg catcccactc cagacaccaa 6900

cccctctttt tgagaatggt ccgcgtcatc gcagcgaaga agacgatctt aaagtcgaga 6960

ggatgaagaa acactgtgtg tccctcggct tccacaacat caatggcaaa gtttactgca 7020

agatttggga caagtccacc ggtgacacct tttacacgga tgattcccgg tatacccacg 7080

accatgcttt tcaggacagg tcagccgact acagagacag ggactatgag ggtgtgcaaa 7140

ccgcccccca acagggattt gatccaaagt ctgaaacccc tgtcggcact gttgtgatcg 7200

gcggtattac gtataacagg tatctgacta agggtaagga ggttctggtt cccaagcccg 7260

acaattgcct tgaagctgcc aagctgtctc ttgagcaagc tctcgctggg atgggccaaa 7320

cttgcgacct tacagctgcc gaggtggaaa agttaaagcg catcatcagt caactccaag 7380

gtttgaccac tgaacaggct ttaaactgct agccgctagc ggcttgaccc gctgtggccg 7440

cggcggctta gttgttactg aaacggcggt aaaaattgta agataccaca gcagaacttt 7500

caccttgggc cctttggacc taaaagtcgc ttctgaggtg gaggtgaaga gatcaactga 7560

gcagggccac gctgttgtgg caaacctatg ttctggtgtt gtattgatga gacctcaccc 7620

accgtccctt gttgacgttc ttctgaaacc cggacttgac acaacacccg gcattcaacc 7680

ggggcatggg gccgggaata tgggcgtgga cggttccatt tgggattttg aaaccgcacc 7740

cacaaaggca gaactcgagt tgtccaagca aataatccaa gcatgtgaag tcaggcgcgg 7800

ggatgccccg aacctccaac tcccttacaa gctctgtcca gttaggggggg atcctgagcg 7860

gcataaaggc cgccttatca ataccaggtt tggagatttg ccttacaaga ctcctcaaga 7920

caccaagtcc gcaatccacg cggcttgttg cctgcacccc aacggggctc ccgtgtctga 7980

tggtaaatcc acattaggca ccactcttca acacggtttc gagctttatg tccctactgt 8040

gccctatagt gtcatggagt accttgattc acgccctgac acccccttta tgtgtaccaa 8100

acatggtact cccgaggctg ctgcagagga ccttcgaaaa tatgacttat ccacccaagg 8160

gtttgtcctg cctggggtcc tacgtctagt acgcagattc atctttggcc atattggtaa 8220

ggcaccgcca ctgttcctcc catcaactta tcccgccaag aactctatgg cagggatcaa 8280

tggccagagg ttcccaacaa aagacgttca gagcatacct gaaattgatg aaatgtgtgc 8340

ccgcgctgtc aaagagaatt ggcaaactgt gacgccttgc accctcaaaa aacagtattg 8400

ttccaagcct aaaaccagga ccatccttgg taccaacaac ttcattgcct tggctcacag 8460

gtcggcactc agcggtgtca ctcaggcgtt catgaaaaaa gcctggaagt ccccgatcgc 8520

cttggggaaa aacaaattta aggagttgca ctgcactgtc gccggtaggt gcctcgaggc 8580

cgacttggcc tcttgtgatc gcagcacccc ggccatcgtg aggtggtttg ttgccaacct 8640

cctgtacgaa cttgcgggtt gtgaagagta cttgccaagc tatgtgctca attgttgcca 8700

tgacctggtg gcaacgcaaa atggcgcctt cacaaaacgt ggtggcctgt catctggaga 8760

ccccgttacc agtgtgtcca acacagtgta ttcactggtg atttatgctc agcacatggt 8820

gctgtcggct ttgaagatgg gtcatgaaat cggcctcaag ttcctcgagg aacagcttaa 8880

gttcgaggac cttctcgaaa tccagcctat gttggtatat tctgatgacc ttgtattgta 8940

tgctgaaaga cccaccttcc ccaattacca ttggtgggtt gagcaccttg acctgatgct 9000

gggttttaag acagacccaa aaaagactgt cataactgac aaacccagct ttcttggctg 9060

tagaatcgaa gcggggcgac aactggttcc caatcgcgac cgcattctgg ctgctcttgc 9120

atatcacatg aaggcgcaga acgcctcaga gtattatgcg tctgctgccg cgattctgat 9180

ggactcgtgt gcttgcattg accacgatcc tgagtggtat gaggacctca tctgcggcat 9240

tgctcgatgc gcccgccagg atggctacag tttcccaggc ccgccgttct tcatgtccat 9300

gtgggagaag ctgaaaagtc acaatgaagg caagaaattc cgccactgtg gcatttgtga 9360

cgccaaggcc gatcatgcgt ccgcctgtgg gcttgattta tgtctgttcc actcgcactt 9420

tcatcaacac tgccctgtta ctctgagctg cggccatcat gccggttcaa aagaatgccc 9480

acagtgtcag tcacctgttg gagctggtaa atccccccctt gatgcagtgc tgaaacaaat 9540

cccgtacaaa ccccctcgtc ctgtcatcat gaaggtggac aataaaacaa cgacccttga 9600

cccgggaagg tatcagtccc gtcgaggtct tgttgctgtc aagaggggta ttgcaggcaa 9660

tgaggttgat ctcgctgatg gagactatca ggtagtgccc cttttgccaa cctgcaaaga 9720

cataaacatg gtgaaggtgg ctgtcaatgt gctactcagc aagttcatag tggggccgcc 9780

aggttccggc aagacgacct ggctactgag tcaagttcag gatgatgatg tcatctatac 9840

acctacccat cagaccatgt tcgacatagt caatgccctc aaagtctgta ggtattccat 9900

cccagtggct tcagggctcc ctttcccacc gcccgccaga tctggaccgt gggttaggct 9960

cgttgctagc gggcacatcc ctggccgaat atcatacctt gacgaggccg gatattgcaa 10020

tcatctggat attctcagac tgctttctaa gacacctctt gtgtgtttgg gtgaccttca 10080

gcaacttcac cctgtcggct ttgactctta ctgttatgtt tttgatcaaa tgcctcataa 10140

gcagctgacc actatttata gatttggccc caatatctgt tctgccattc aaccttgtta 10200

cagggaaaaa ctcgaatcta aggccaggaa cactagggtg gtttttactg cccggcccgt 10260

ggcttttggt caggtgttga cgccatatca taaagaccgc accggctcag ctataaccat 10320

agattcatcc cagggagcca cctttgatgt tgtgacgctg catttgccgt cgccagattc 10380

cctgaacaaa tcccgggctc ttgtagctat tactcgggca aggcatgggt tgttcatcta 10440

tgaccctcat aaccaactcc ggaagttttt caacttaaca cctgagcgca ctgattgcaa 10500

cctcgtgttc aaccgcgggg acgagttggt agttttgaat gcagataatg cagtcacgac 10560

tgtggctaag gttttggagg cgggcccgtc tcggtttcga gtatcagatc caaggtgcaa 10620

gtctctttta gccgcttgct cggccagtct ggaaggaggc tgcatgccac tgccgcaagt 10680

ggcacataat ctggggtttt acttctctcc agatagtcca gcatttgcac ctctgccaaa 10740

agagctggca ccacattggc cggtggttac tagtcagaac aaccaggcat ggcccgaccg 10800

acttgtcgct agtatgcggc cagttgatgc ccgctacagc aagcctatgg tcggtgcagg 10860

gtatgtggtt gggccatcca ctttccttgg cactcctggt gtagtgtcat actatctcac 10920

gctgtacatc aggggtgagc cccaggcctt gccggagaca ctcgtctcaa cgggacgtat 10980

agctactgat tgtcgagagt atctcgacgc agctgaggaa gaagcagcta aagaactccc 11040

tcacgcattc attggcgatg tcaaaggtac tacagtgggg gggtgtcacc acattacgtc 11100

aaaatacctt cccaggtcct tgcccaagga ctccgttgcc gtggtcggag tgagttcgcc 11160

cggcaaggct gccaaagccg tgtgtactct caccgatgtg tatcttcccg agctccggcc 11220

atatttgcaa ccggaaacag catcgaaatg ctggaaactt aaactagact tcagggatgt 11280

cagactgatg gtctggaaag gagccaccgc atatttccaa ctggaggggc tcacatggtc 11340

agcgctgccc gactatgcca ggttcattca gctaccaaaa gatgccgttg tgtacattga 11400

tccgtgcata ggaccggcaa cagccaaccg taaggttgtg agaactacag attggcgagc 11460

tgacctggca gtgacaccgt acgactacgg tgctcagagc attttgacta cagcctggtt 11520

cgaggacctt gggccgcagt ggaagatttt agggttgcaa cccttcaagc gggcatttgg 11580

ctttgaaaac actgaggatt gggcgatcct tgcacgtcgc atgaacgacg gcaaggacta 11640

cactgactat aactggaatt gtgttcgaca acgcccacat gccatctacg gacgtgcccg 11700

tgaccatacg tatcactttg cccctggcac tgaactgcaa gtagagctag gtaaaccccg 11760

gctaccgcct gagcaagtac cgtgaatcta gagtgatgca atggggtcac tgtggagtaa 11820

aatcagtcaa ctgttcgtgg atgccttcac tgagttcctc gttagtgtgg ttgatattgt 11880

catcttcctt gccatactgt ttgggttcac cgttgcaggg tggttactgg tctttttttt 11940

cagagtggtt tgctccgcgc ttctccgttc gcgctctgcc attcactctt ccgaactatc 12000

gaaggtccta tgagggcttg ctacctaatt gcagaccgga tgttccacaa ttcgcagtca 12060

agcacccatt gggtatactt tggcacatgc gagtttccca cttaattgac gaaatggtct 12120

ctcgccgcat ttaccagacc atggaacatt caggtcaagc ggcctggaag caggtggtta 12180

gtgaagctac tctcacaaga ctgtcaaagc tcgacatagt tctccacttc caacacctgg 12240

ccgcaataga ggcggattct tgccgcttcc tcagctcacg acttgtgatg ctgaaaaatc 12300

ttgccgttgg caatatgagc ctacagtaca acaccacgtt ggaccgcgtt gagctcatct 12360

tcccaacacc aggtacgagg cccaaattga ccgattttag acaatggctc gtcagtgtgc 12420

acgcttctat tttttcctct gtggcctcat cagttacctt gttcatagtg ctttggcttc 12480

gaattccagc tctacgctat gtttttggtt tccattggcc cacggcaaca catcattcga 12540

gctaaccatc aattacacta tatgtaagcc ctgtctcacc agtcaagcgg ctcgacaaag 12600

gctcgaaccc ggtcgcaaca tgtggtgcaa aataggacac accacgtgtg aggagcgtga 12660

ccatgatgag ttgtcaatga ccattccgtc cgggtacgat aacctcaaac ttgagggtta 12720

ttacgcttgg ctggcttttt tgtccttttc ttacgcagcc caatttcatc cagagttgtt 12780

cggaataggg aatgtgtcac gcgtcttcgt ggataaacgg caccagttca tctgtgccga 12840

gcacgacgga caaaattcaa ccgtatccac cgaacataat atttccgcat tgtatgcggc 12900

gtactaccac caccaggtag acgggggcaa ttggttccac ctggaatggc tgcggccttt 12960

cttttcctcc tggctagtac tcaatatttc atggtttctg aggcgttcgc ctgcaagccc 13020

tgtttctcga cgcatttatc agatattgag accaacacga ccgcggctgc cggtttcatg 13080

gtccttcagg acatcaactg tttccacagt ggctcagagg cacaaacgac tggtcccatc 13140

agaaagtcgt cccaatgccg tgaagccgtc ggcactcccc agtacatcaa gataacggcc 13200

aatgtgaccg acgaatcata cttgtacaac gcggacttgc tgatgctttc tgcgtgcctt 13260

ttctacgcct cagagatgag cgagaaaggc tttaaagtca tttttgggaa tgtctctggc 13320

gttgtctccg cttgtgtcaa ttttacagat tatgtggccc atgtgaccca acatacccag 13380

cagcatcatt tggtaatcaa tcacattcgg ttgctacatt tcctgacacc atcagcaatg 13440

aggtgggcta caaccattgc ttgtttgttc gccattctct tggcgatatg agatgttctc 13500

acaaatcggg gtgtttcttg actccgcact cttgcttctg gtggcttttt ttgctgtgta 13560

ccggcttgtc ctggtccttt gccgatggca acggcaacag ctcgacatac caatatatat 13620

ataacttgac gatatgcgag ctgaatggga ccgaatggct gtccgaccat tttaattggg 13680

cagtcgagac ttttgtgctc tacccagtgg cgactcatat cctctcactg ggtttcctca 13740

cgacaagtca tttccttgat gcgttcggtc ttggagctgt gtcagttaca gggttttgtg 13800

gcgggcggta cgtgctcagc agcgtgtacg gcgcttgtgc actagcagcg ctcgtatgtt 13860

ttgttatccg tgctgccaaa aattgtatgg cttgccgcta tgctcgtacc cggtttacca 13920

acttcattgt ggatgaccgg gggagaatcc atcggtggag gtctccaata gtggtggaaa 13980

aattaggtaa agctgacgtc ggcggcgacc ttgtcaccat caaacatgtc atcctcgaag 14040

gagtcaaagc tcaacccttg acgaggactt cggccgagca atgggaggcc tagataattt 14100

ctgcaacgat cccaccgccg cacaaaagct tgtgctagcc tttagcatca catatacacc 14160

catcatgata tacgccctta aggtgtcacg cggccgactc ttggggttgt tgcacatctt 14220

gatatttctg aactgttctt tcacgttcgg atacatgaca tatatgcatt ttgaatccac 14280

caaccgtgtc gcgcttacca tgggggggcgt tgtcgccctt ctgtggggcg tttatagttt 14340

catagagtca tggaagttta tcacttccag atgcagattg tgttgcctag gccggcgata 14400

cattctggcc cctgcccacc acgtagaaag tgctgcaggc ctccatccga tcccagcgtc 14460

tggtaaccaa gcatacgctg tgagaaagcc cggactaaca tcagtgaacg gcactctggt 14520

accaggactt cgaggcctcg tgctgggcgg caaacgagct gttaaacgag gagtggttaa 14580

cctcgtcaag tatggccggt aaaaaccaga gccagaagaa aaagaaaaat ccagctccaa 14640

tggggaatgg ccagtcagtc aatcaactgt gccagctgct gggcacaatg ataaagtccc 14700

agcgccagcg acccagggga ggacaggcta aaaagaaaaa gcctgagaag ccacatttcc 14760

ccctggctgc tgaagatgac gtccggcacc atctcaccca gaccgagcgc tccctttgct 14820

tgcaatcgat ccagacggct tttaatcaag gcgcaggaac tgcgtcgctt tcatccagcg 14880

ggaagatcgg ttttcaggtt gagtttatgc taccggttgc tcatacagtg cgcctgattc 14940

gcgtgacttc tacatccgcc ggtcaggatg caaattaatt tgatagtcag gtgaatggcc 15000

gcgattggcg tgtggcctct gagtcaccta ttcaattagg gcgatcacat gggggtcaga 15060

cttaattagg caggaaccat gtgaccgaaa tt 15092

<210> 2
<211> 15092
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thể phân lập virut PRRS 96V198 - đời cấy chuyền 1

<400> 2
atgatgtgta gggtattccc cctacataca cgacacttct agtgtttgtg tgccttggag 60

gcgtgggtac agccccgccc cacctcttgg cccctgttct agcccaacag gtatccttct 120

ctctcggggc gagcgcgccg cctgctgctc ccttgcagca ggaaggacct cccgagtatt 180

tccggagagc acctgcttta cgggatctcc acccttaac catgtctggg acgttctccc 240

ggtgcatgtg caccccggct gcccgggtat tttggaacgc cggccaagtc ttttgcacac 300

ggtgtctcag tgcgcggtct cttctctctc cagagcttca ggacactgac ctcgctgcaa 360

tcggcttgtt ttacaagcct aaagacaagc ttcactggaa agtccctatc ggcatccctc 420

aggtggagtg tactccgtcc gggtgctgtt ggctctcagc catcttcgtc ttggcgcgca 480

tgacctccgg caatcacaac tttccccaac gacttgtgaa ggttgctgat gttttgtacc 540

gtgacggctg cttggcacct cgacaccttc gcgaactcca agtttacgag cgcggctgca 600

actggtaccc gatcacgggg cccgtgcccg ggatgggttt atacgcgaac tctatgcatg 660

tgtccgacca accgtttcct ggtgccaccc atgtgttgac gaactcacct ctgcctcagc 720

aggcttgtcg acagccgttt tgtccatttg aggaggttca ttccgacgta tacaggtgga 780

agaaattcgt gatttttgtg gattcctctt ctgacggccg atctcgcatg atgtggacac 840

caggatccga cgactcggct gccttagaag tattgccacc tgaactagaa tgtcgagtcg 900

aaatcctcgt tcggagtttt cctgcccacc accctgtcga catcaccaac tgggagctca 960

ctgagtcccc tgagcacggt ttttccttca gcacgtctca ttcttgtggt taccttgccc 1020

aaaaccctga cgtgtttgat ggtaagtgtt ggctttcttg ctttttgggc ctgccgaccg 1080

aagtgtggcg tcatgaggag tatctagcta acgccttcgg ttaccaaacc aagtggggcg 1140

tgcatggtaa gtacctccag cgcaggcttc aggtccgcgg catgcgtgct gtagttgatc 1200

ctgatggtcc catccacgtt gaagcgctgt cttgccccca gtcttggatc aggcacctga 1260

ctctaaatga tgacgtcacc ccaggatttg ttcgcctaac atcccttcgc attgagccga 1320

acacagagcc tactactttc cggatctttc ggtttggagc gcataagtgg tatggcgctg 1380

ccggcaaacg ggctcgtgct aagcgtgccg ctaaaggtga gaagaattca gctcccaccc 1440

ccaaggtcgc cctgccggtc cccacctgtg gaattaccac ctactctcca ccgacagacg 1500

ggtcttgtgg ttggcatgtc cttgccgcca taatgaaccg gatgataaat ggtgacttca 1560

cgtcccctct gactccgtac aacagaccag aggatgattg ggcttctgat tatgatcttg 1620

ctcaggcaat ccaatgtcta caactgcctg ctaccgtggt ccggagtcgc gcctgtccta 1680

acgccaagta cctcataaaa ctcaacggag tccactggga ggtagaggtg aggtcaggaa 1740

tggctcctcg ctctctttct cgtgaatgtg tggttggcgt ttgctctgaa ggttgtgttg 1800

caccgcctta tccagcagac gggctaccag aacgagcact cgaggccttg gcgtctgctt 1860

acaggttacc ctctgattgt gttagctctg gcattgctga ctttcttgct aacccacctc 1920

ctcaggaatt ctggaccctc gacaaaatgt tgacctcccc gtcaccagag cggtccggct 1980

tctctagttt gtataaatta ctattagagg ttgttccgca aaaatgcggt gccacggaag 2040

gggctttcgt ctatgctgtt gagagaatgt tgaaggattg tccgagctcc aaacaggcca 2100

tggcccttct ggcaaaaatt aaagttccat cctcaaaggc cccgtctgtg tcccttgacg 2160

agtgtttccc tacggatgtt tcagccgact tcgagccagc atctcaggaa aggccccaaa 2220

gttccggtgc tgctgttgtc ctgtgttcac cggaagtaaa agagttcgaa gaagcagccc 2280

cagaagaagt tcaagagagt ggccacaagg tcgcccgctc tgcatttgtt gccgagggtc 2340

ctaacaatga acaggtaccg atggctgccg gcgagcaact gaagcccggt ggtcgcgttt 2400

tggcggtcgg gaatgctcat gaaggtgttc tggcctcaac tagttcgact aacctgatag 2460

gcgggaactt ccccccttca gactccatga aagagagcat gctcaatagc tgggaagacg 2520

aaccactgga tttgtcccaa ccggcaccag ctgttacaat gacccttgtg agagagcaaa 2580

cacccgacaa cctgggtcct gatgccggtg ccttccccgt caccgttcga aaatttgtcc 2640

cgacagggcc tacactccgt catgttgagc actgcggcac ggagtcaggc gacagcagtt 2700

cgcccttgga tctgtcttat gcgcaaaccc tggaccagcc tttaaatcta tccttggccg 2760

cttggccagt gagggccacc gcgtctgacc ctggctgggt ccacggtagg cgtgagccta 2820

tctttgtaaa gcctcgagat gctttctctg acggcgattc agcccttcag ctcggggagc 2880

tgtctgaatc cggctccgtc atcgagtttg accggacaag aaatgctccg gcggtcgacg 2940

cccctgttga cttgacggct tcgaacgagg ccctctctgt ggttgatcct ttcgaatttg 3000

ccgaactcaa gcgcccgcgt ttttccgcac aagccttaat tgaccgaggc ggtccacttg 3060

ccgacgtcca tgcaaaaata aagaaccggg tatatgaaca gtgcctccag gcttgtgagc 3120

ctggcagtcg cgcaacccca gccaccaagg agtggctcga taaaatgtgg gatagggtgg 3180

acatgaagac ttggcgctgt acctcgcagt tccaagctgg tcgcattctt gcgtccctta 3240

aattcctccc tgacatgatt caggacacac cacctcctgt tcctaggaag aatcgggcta 3300

gtgataatgc cggcctgaag cgactggtgg cgcagtggga cagaaaattg agtgcaaccc 3360

ccccttcaaa accggttgga ccaacacttg accaaattgt cccttcgccc acgggtaccc 3420

agcaagaaga tgtcacttcc tccgatgggc catctcatgc gccggatcct cctagtcgaa 3480

tgagcacgag tgggagttgg aagggccttg tgctctctgg tacccgtctc gcggggtcca 3540

ttagtcagca tttcatgaca tgggtttttg aggttttctc ccatctccca gcttttgcac 3600

tcacactttt ctcgccgagg ggctctatgg ctccaggtga ttggatgttt gcaggtgttg 3660

ttttacttgc tctcctgctc tgtcgttctt acccagtact cgggtgcctt cccttattgg 3720

gtgtcctttc tggctctgtg cggcgcgttc gtctgggggt ttttggttct tggatggctt 3780

tcgctgtatt tttattctcg actccatcca acccagtcgg ttcttcttgt gaccacgatt 3840

cgccggagtg tcatgctgag cttttggctc ttgagcagcg ccaactttgg gaacctgtgc 3900

gcggccttgt ggtcggcccc tcgggcctct tatgtgtcat tcttggcaag ctactcggtg 3960

ggtcacgtta tctctggcat gttttcttac gtttatgcat gcttgcagat ttggcccttt 4020

ctcttgttta tgtggtgtcc caggggcgtt gtcacaagtg ttggggaaag tgtataagaa 4080

cagctccggc ggaggtggct ctcaatgtgt tccctttctc gcgcgctacc cgtagctctc 4140

ttgtgtcctt gtgcgatcgg ttccaagcgc caaaaggggt tgatcctgtg tacttggcaa 4200

cgggttggcg cgggtgttgg tgtggtgaga gtcccattca tcaaccgcac caaaaaccca 4260

tagcttatgc taatttggat gaaaagaaaa tatctgccca aacggtggtt gctgtcccac 4320

acgatcccag tcaggccatc aagtgcctga aagttttgca ggcgggagga gccatcgtgg 4380

accagcccac acctgaggtc gtccgtgtat ccgaaatccc cttctcagcc ccatttttcc 4440

caaaagttcc agtcaaccca gattgtaagg ttgtggtgga ttcggacact tttgtggctg 4500

cggttcgctg cggctactcg acagcacaac tggtcctagg ccagggcaac tttgccaagt 4560

taaatcagat tcccctcagg agctccatct ccaccaaagc gattggcggg gcctcttaca 4620

cccttgctgt ggctcaagtt tctgtgtgga ctcttgttca cttcatcctc ggtctttggt 4680

tcacgtcacc ccaagtgtgt ggccgaggaa cctctgaccc atggtgttca aatccttttt 4740

cataccctac ctatggcccc ggggttgtgt gctcctctcg actttgtgtg tctgccgacg 4800

gggtcactct accattgttc tcagccgtgg ctcaactctc cggtagagag gtggggattt 4860

ttattttggt gctcgtctcc ttgatggctt tggcccaccg catggccctt aaggcagaca 4920

tgttgatggt ctttctggct ttttgtgctt acgcctggcc catgagctcc tggttgattt 4980

gcttctttcc tacactcttg aagtgggtta ccctccaccc tcttactatg ctttgggtgc 5040

actcattctt ggtgttttgt ctgccagcag ccggcatcct ctcaataggg ataactggcc 5100

ttctttgggc ggttggccgc tttactcagg ttgccggaat tattacacct tatgacatcc 5160

accagtacac ctctgggcca cgtggcgctg cagctgtggc cacagcccca gaaggcactt 5220

atatggccgc cgtccggaga gctgctttaa ctgggcgaac tttaatcttc accccgtctg 5280

cagttggatc ccttctcgaa ggagctttca ggactcataa accttgtctt aacaccgtaa 5340

atgttgtagg ctcttccctt ggttccggcg gggttttcac tattgacggc agaaaaattg 5400

ttgtcactgc tgcccatgtg ttgaacggcg acacagctag agtcaccggc gactcctaca 5460

accgcatgca tactttcaag accaatggtg attatgcctg gtcccatgct gatgactggc 5520

ggggcgttgc ccctgcggtc aaggttgcga aggggtaccg cggtcgtgcc tactggcaaa 5580

catcaactgg cgtcgaaccc ggtgttattg gggaagggtt cgccttctgt ttcaccacct 5640

gtggcgattc ggggtcaccc gtcatctcag aatccggtga tctcattgga atccataccg 5700

gttcaaataa acttggttct ggtcttgtga caacccctga aggagagaca tgtgccatca 5760

aagaaaccaa gctctctgac ctttccagac atttcgcagg cccaagcgtt cctcttgggg 5820

atattaaatt gagtccagcc atcatccctg atgtaacatc cattccgagt gacttggcat 5880

cgctcctatc ctccgtccct gtagtggaag gcggcctctc gaccgttcaa cttttgtgtg 5940

tctttttcct actttggcgc atgatgggcc atgcctggac tcccattgtt gccgtgggtt 6000

tctttttact gaatgaaatt cttccagcag ttttggtccg agccgtgttt tcttttgcac 6060

tttttgtgct tgcatgggcc acccccctggt ctgcacaggt gttgatgatt agactcctca 6120

cggcatctct caaccgcaac aagctttctc tggcgttcta cgcactcggg ggggtcgtcg 6180

gtttggccgc tgaaatcggg acttttgctg gcaaattgcc tgaattgtct caaacccttt 6240

cgacatactg cttcttacct agggtccttg ctatgaccag ttgtgttccc accatcatca 6300

ttggtggact ccatgccctc ggtgtaattc tgtggttgtt caaataccgg tgcctccaca 6360

acatgctcgt tggtgatggg agtttttcaa gcgccttctt cctacggtat tttgcagagg 6420

gtaatctcag aaaaggtgtt tcgcagtcct gtggcatgaa taacgagtcc ctgacggctg 6480

ctttagcttg caagttgtca caggctgacc ttgatttttt gtccagctta acgaacttca 6540

agtgctttgt atctgcttcg aatatgaaaa atgctgccgg ccagtacatt gaagcggcgt 6600

atgccaaggc cctgcgccaa gagttggcat ctctagttca gattgacaaa atgaaaggag 6660

ttttgtccaa actcgaggcc tttgctgaaa cagctactcc gtcccttgac ataggtgacg 6720

tgattgttct gcttgggcaa catccacacg gatctatcct tgatattaat gtggggactg 6780

agaggaaaac tgtgtccgtg caagagaccc ggagcctagg cggttccaaa ttcagtgttt 6840

gtactgtcgt gtctaacaca cccgtggacg ccttaaccgg catcccactc cagacaccaa 6900

cccctctttt tgagaatggt ccgcgtcatc gcagcgaaga agacgatctt aaagtcgaga 6960

ggatgaagaa acactgtgtg tccctcggct tccacaacat caatggcaaa gtttactgca 7020

agatttggga caagtccacc ggtgacacct tttacacgga tgattcccgg tatacccacg 7080

accatgcttt tcaggacagg tcagccgact acagagacag ggactatgag ggtgtgcaaa 7140

ccgcccccca acagggattt gatccaaagt ctgaaacccc tgtcggcact gttgtgatcg 7200

gcggtattac gtataacagg tatctgacta agggtaagga ggttctggtt cccaagcccg 7260

acaattgcct tgaagctgcc aagctgtctc ttgagcaagc tctcgctggg atgggccaaa 7320

cttgcgacct tacagctgcc gaggtggaaa agttaaagcg catcatcagt caactccaag 7380

gtttgaccac tgaacaggct ttaaactgct agccgctagc ggcttgaccc gctgtggccg 7440

cggcggctta gttgttactg aaacggcggt aaaaattgta agataccaca gcagaacttt 7500

caccttgggc cctttggacc taaaagtcgc ttctgaggtg gaggtgaaga gatcaactga 7560

gcagggccac gctgttgtgg caaacctatg ttctggtgtt gtattgatga gacctcaccc 7620

accgtccctt gttgacgttc ttctgaaacc cggacttgac acaacacccg gcattcaacc 7680

ggggcatggg gccgggaata tgggcgtgga cggttccatt tgggattttg aaaccgcacc 7740

cacaaaggca gaactcgagt tgtccaagca aataatccaa gcatgtgaag tcaggcgcgg 7800

ggatgccccg aacctccaac tcccttacaa gctctgtcca gttaggggggg atcctgagcg 7860

gcataaaggc cgccttatca ataccaggtt tggagatttg ccttacaaga ctcctcaaga 7920

caccaagtcc gcaatccacg cggcttgttg cctgcacccc aacggggctc ccgtgtctga 7980

tggtaaatcc acattaggca ccactcttca acacggtttc gagctttatg tccctactgt 8040

gccctatagt gtcatggagt accttgattc acgccctgac acccccttta tgtgtaccaa 8100

acatggtact cccgaggctg ctgcagagga ccttcgaaaa tatgacttat ccacccaagg 8160

gtttgtcctg cctggggtcc tacgtctagt acgcagattc atctttggcc atattggtaa 8220

ggcaccgcca ctgttcctcc catcaactta tcccgccaag aactctatgg cagggatcaa 8280

tggccagagg ttcccaacaa aagacgttca gagcatacct gaaattgatg aaatgtgtgc 8340

ccgcgctgtc aaagagaatt ggcaaactgt gacgccttgc accctcaaaa aacagtattg 8400

ttccaagcct aaaaccagga ccatccttgg taccaacaac ttcattgcct tggctcacag 8460

gtcggcactc agcggtgtca ctcaggcgtt catgaaaaaa gcctggaagt ccccgatcgc 8520

cttggggaaa aacaaattta aggagttgca ctgcactgtc gccggtaggt gcctcgaggc 8580

cgacttggcc tcttgtgatc gcagcacccc ggccatcgtg aggtggtttg ttgccaacct 8640

cctgtacgaa cttgcgggtt gtgaagagta cttgccaagc tatgtgctca attgttgcca 8700

tgacctggtg gcaacgcaaa atggcgcctt cacaaaacgt ggtggcctgt catctggaga 8760

ccccgttacc agtgtgtcca acacagtgta ttcactggtg atttatgctc agcacatggt 8820

gctgtcggct ttgaagatgg gtcatgaaat cggcctcaag ttcctcgagg aacagcttaa 8880

gttcgaggac cttctcgaaa tccagcctat gttggtatat tctgatgacc ttgtattgta 8940

tgctgaaaga cccaccttcc ccaattacca ttggtgggtt gagcaccttg acctgatgct 9000

gggttttaag acagacccaa aaaagactgt cataactgac aaacccagct ttcttggctg 9060

tagaatcgaa gcggggcgac aactggttcc caatcgcgac cgcattctgg ctgctcttgc 9120

atatcacatg aaggcgcaga acgcctcaga gtattatgcg tctgctgccg cgattctgat 9180

ggactcgtgt gcttgcattg accacgatcc tgagtggtat gaggacctca tctgcggcat 9240

tgctcgatgc gcccgccagg atggctacag tttcccaggc ccgccgttct tcatgtccat 9300

gtgggagaag ctgaaaagtc acaatgaagg caagaaattc cgccactgtg gcatttgtga 9360

cgccaaggcc gatcatgcgt ccgcctgtgg gcttgattta tgtctgttcc actcgcactt 9420

tcatcaacac tgccctgtta ctctgagctg cggccatcat gccggttcaa aagaatgccc 9480

acagtgtcag tcacctgttg gagctggtaa atccccccctt gatgcagtgc tgaaacaaat 9540

cccgtacaaa ccccctcgtc ctgtcatcat gaaggtggac aataaaacaa cgacccttga 9600

cccgggaagg tatcagtccc gtcgaggtct tgttgctgtc aagaggggta ttgcaggcaa 9660

tgaggttgat ctcgctgatg gagactatca ggtagtgccc cttttgccaa cctgcaaaga 9720

cataaacatg gtgaaggtgg ctgtcaatgt gctactcagc aagttcatag tggggccgcc 9780

aggttccggc aagacgacct ggctactgag tcaagttcag gatgatgatg tcatctatac 9840

acctacccat cagaccatgt tcgacatagt caatgccctc aaagtctgta ggtattccat 9900

cccagtggct tcagggctcc ctttcccacc gcccgccaga tctggaccgt gggttaggct 9960

cgttgctagc gggcacatcc ctggccgaat atcatacctt gacgaggccg gatattgcaa 10020

tcatctggat attctcagac tgctttctaa gacacctctt gtgtgtttgg gtgaccttca 10080

gcaacttcac cctgtcggct ttgactctta ctgttatgtt tttgatcaaa tgcctcataa 10140

gcagctgacc actatttata gatttggccc caatatctgt tctgccattc aaccttgtta 10200

cagggaaaaa ctcgaatcta aggccaggaa cactagggtg gtttttactg cccggcccgt 10260

ggcttttggt caggtgttga cgccatatca taaagaccgc accggctcag ctataaccat 10320

agattcatcc cagggagcca cctttgatgt tgtgacgctg catttgccgt cgccagattc 10380

cctgaacaaa tcccgggctc ttgtagctat tactcgggca aggcatgggt tgttcatcta 10440

tgaccctcat aaccaactcc ggaagttttt caacttaaca cctgagcgca ctgattgcaa 10500

cctcgtgttc aaccgcgggg acgagttggt agttttgaat gcagataatg cagtcacgac 10560

tgtggctaag gttttggagg cgggcccgtc tcggtttcga gtatcagatc caaggtgcaa 10620

gtctctttta gccgcttgct cggccagtct ggaaggaggc tgcatgccac tgccgcaagt 10680

ggcacataat ctggggtttt acttctctcc agatagtcca gcatttgcac ctctgccaaa 10740

agagctggca ccacattggc cggtggttac tagtcagaac aaccaggcat ggcccgaccg 10800

acttgtcgct agtatgcggc cagttgatgc ccgctacagc aagcctatgg tcggtgcagg 10860

gtatgtggtt gggccatcca ctttccttgg cactcctggt gtagtgtcat actatctcac 10920

gctgtacatc aggggtgagc cccaggcctt gccggagaca ctcgtctcaa cgggacgtat 10980

agctactgat tgtcgagagt atctcgacgc agctgaggaa gaagcagcta aagaactccc 11040

tcacgcattc attggcgatg tcaaaggtac tacagtgggg gggtgtcacc acattacgtc 11100

aaaatacctt cccaggtcct tgcccaagga ctccgttgcc gtggtcggag tgagttcgcc 11160

cggcaaggct gccaaagccg tgtgtactct caccgatgtg tatcttcccg agctccggcc 11220

atatttgcaa ccggaaacag catcgaaatg ctggaaactt aaactagact tcagggatgt 11280

cagactgatg gtctggaaag gagccaccgc atatttccaa ctggaggggc tcacatggtc 11340

agcgctgccc gactatgcca ggttcattca gctaccaaaa gatgccgttg tgtacattga 11400

tccgtgcata ggaccggcaa cagccaaccg taaggttgtg agaactacag attggcgagc 11460

tgacctggca gtgacaccgt acgactacgg tgctcagagc attttgacta cagcctggtt 11520

cgaggacctt gggccgcagt ggaagatttt agggttgcaa cccttcaagc gggcatttgg 11580

ctttgaaaac actgaggatt gggcgatcct tgcacgtcgc atgaacgacg gcaaggacta 11640

cactgactat aactggaatt gtgttcgaca acgcccacat gccatctacg gacgtgcccg 11700

tgaccatacg tatcactttg cccctggcac tgaactgcaa gtagagctag gtaaaccccg 11760

gctaccgcct gagcaagtac cgtgaatcta gagtgatgca atggggtcac tgtggagtaa 11820

aatcagtcaa ctgttcgtgg atgccttcac tgagttcctc gttagtgtgg ttgatattgt 11880

catcttcctt gccatactgt ttgggttcac cgttgcaggg tggttactgg tctttttttt 11940

cagagtggtt tgctccgcgc ttctccgttc gcgctctgcc attcactctt ccgaactatc 12000

gaaggtccta tgagggcttg ctacctaatt gcagaccgga tgttccacaa ttcgcagtca 12060

agcacccatt gggtatactt tggcacatgc gagtttccca cttaattgac gaaatggtct 12120

ctcgccgcat ttaccagacc atggaacatt caggtcaagc ggcctggaag caggtggtta 12180

gtgaagctac tctcacaaga ctgtcaaagc tcgacatagt tctccacttc caacacctgg 12240

ccgcaataga ggcggattct tgccgcttcc tcagctcacg acttgtgatg ctgaaaaatc 12300

ttgccgttgg caatatgagc ctacagtaca acaccacgtt ggaccgcgtt gagctcatct 12360

tcccaacacc aggtacgagg cccaaattga ccgattttag acaatggctc gtcagtgtgc 12420

acgcttctat tttttcctct gtggcctcat cagttacctt gttcatagtg ctttggcttc 12480

gaattccagc tctacgctat gtttttggtt tccattggcc cacggcaaca catcattcga 12540

gctaaccatc aattacacta tatgtaagcc ctgtctcacc agtcaagcgg ctcgacaaag 12600

gctcgaaccc ggtcgcaaca tgtggtgcaa aataggacac accacgtgtg aggagcgtga 12660

ccatgatgag ttgtcaatga ccattccgtc cgggtacgat aacctcaaac ttgagggtta 12720

ttacgcttgg ctggcttttt tgtccttttc ttacgcagcc caatttcatc cagagttgtt 12780

cggaataggg aatgtgtcac gcgtcttcgt ggataaacgg caccagttca tctgtgccga 12840

gcacgacgga caaaattcaa ccgtatccac cgaacataat atttccgcat tgtatgcggc 12900

gtactaccac caccaggtag acgggggcaa ttggttccac ctggaatggc tgcggccttt 12960

cttttcctcc tggctagtac tcaatatttc atggtttctg aggcgttcgc ctgcaagccc 13020

tgtttctcga cgcatttatc agatattgag accaacacga ccgcggctgc cggtttcatg 13080

gtccttcagg acatcaactg tttccacagt ggctcagagg cacaaacgac tggtcccatc 13140

agaaagtcgt cccaatgccg tgaagccgtc ggcactcccc agtacatcaa gataacggcc 13200

aatgtgaccg acgaatcata cttgtacaac gcggacttgc tgatgctttc tgcgtgcctt 13260

ttctacgcct cagagatgag cgagaaaggc tttaaagtca tttttgggaa tgtctctggc 13320

gttgtctccg cttgtgtcaa ttttacagat tatgtggccc atgtgaccca acatacccag 13380

cagcatcatt tggtaatcaa tcacattcgg ttgctacatt tcctgacacc atcagcaatg 13440

aggtgggcta caaccattgc ttgtttgttc gccattctct tggcgatatg agatgttctc 13500

acaaatcggg gtgtttcttg actccgcact cttgcttctg gtggcttttt ttgctgtgta 13560

ccggcttgtc ctggtccttt gccgatggca acggcaacag ctcgacatac caatatatat 13620

ataacttgac gatatgcgag ctgaatggga ccgaatggct gtccgaccat tttaattggg 13680

cagtcgagac ttttgtgctc tacccagtgg cgactcatat cctctcactg ggtttcctca 13740

cgacaagtca tttccttgat gcgttcggtc ttggagctgt gtcagttaca gggttttgtg 13800

gcgggcggta cgtgctcagc agcgtgtacg gcgcttgtgc actagcagcg ctcgtatgtt 13860

ttgttatccg tgctgccaaa aattgtatgg cttgccgcta tgctcgtacc cggtttacca 13920

acttcattgt ggatgaccgg gggagaatcc atcggtggag gtctccaata gtggtggaaa 13980

aattaggtaa agctgacgtc ggcggcgacc ttgtcaccat caaacatgtc atcctcgaag 14040

gagtcaaagc tcaacccttg acgaggactt cggccgagca atgggaggcc tagataattt 14100

ctgcaacgat cccaccgccg cacaaaagct tgtgctagcc tttagcatca catatacacc 14160

catcatgata tacgccctta aggtgtcacg cggccgactc ttggggttgt tgcacatctt 14220

gatatttctg aactgttctt tcacgttcgg atacatgaca tatatgcatt ttgaatccac 14280

caaccgtgtc gcgcttacca tgggggggcgt tgtcgccctt ctgtggggcg tttatagttt 14340

catagagtca tggaagttta tcacttccag atgcagattg tgttgcctag gccggcgata 14400

cattctggcc cctgcccacc acgtagaaag tgctgcaggc ctccatccga tcccagcgtc 14460

tggtaaccaa gcatacgctg tgagaaagcc cggactaaca tcagtgaacg gcactctggt 14520

accaggactt cgaggcctcg tgctgggcgg caaacgagct gttaaacgag gagtggttaa 14580

cctcgtcaag tatggccggt aaaaaccaga gccagaagaa aaagaaaaat ccagctccaa 14640

tggggaatgg ccagtcagtc aatcaactgt gccagctgct gggcacaatg ataaagtccc 14700

agcgccagcg acccagggga ggacaggcta aaaagaaaaa gcctgagaag ccacatttcc 14760

ccctggctgc tgaagatgac gtccggcacc atctcaccca gaccgagcgc tccctttgct 14820

tgcaatcgat ccagacggct tttaatcaag gcgcaggaac tgcgtcgctt tcatccagcg 14880

ggaagatcgg ttttcaggtt gagtttatgc taccggttgc tcatacagtg cgcctgattc 14940

gcgtgacttc tacatccgcc ggtcaggatg caaattaatt tgatagtcag gtgaatggcc 15000

gcgattggcg tgtggcctct gagtcaccta ttcaattagg gcgatcacat gggggtcaga 15060

cttaattagg caggaaccat gtgaccgaaa tt 15092

<210> 3
<211> 15092
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thể phân lập virut PRRS 96V198 - đời cấy chuyền 9

<400> 3
atgatgtgta gggtattccc cctacataca cgacacttct agtgtttgtg tgccttggag 60

gcgtgggtat agccccgccc cacctcttgg cccctgttct agcccaacag gtatccttct 120

ctctcggggc gagcgcgccg cctgctgctc ccttgcagca ggaaggacct cccgagtatt 180

tccggagagc acctgcttta cgggatctcc acccctttaac catgtctggg acgttctccc 240

ggtgcatgtg caccccggct gcccgggtat tttggagcgc cggccaagtc tattgcacac 300

ggtgtctcag tgcacggtct cttctctctc cggagcttca ggacactgac ctcgctgcaa 360

ttggcttgtt ttacaagcct aaagacaagc ttcactggaa agtccctatc ggcatccctc 420

aggtggagtg tactccgtcc gggtgctgtt ggctctcagc catcttcccc ttggcgcgca 480

tgacctccgg caatcacaac tttctccaac gacttgtgaa ggttgctgat gttttgtacc 540

gtgacggctg cttggcacct cgacaccttc gcgaactcca agtttacgag cgcggctgca 600

actggtaccc gatcacgggg cccgtgcccg ggatgggttt gtacgcgaac tccatgcacg 660

tgtccgacca accgtttcct ggtgccgctc atgtgttaac gaactcacct ctgcctcagc 720

aggcttgtcg acagccgttt tgtccatttg aggaggttca ttccgacgta tacaggtgga 780

agaaattcgt gatttttgtg gattcctctt ctgacggccg atctcgcatg atgtggacac 840

caggatccga cgactcggct gccttagaag tattgccacc tgaactagaa tgtcgagtcg 900

aaatcctcgt tcggagtttt cctgcccacc accctgtcga catcaccaac tgggagctca 960

ctgagtcccc tgagcacggt ttttccttca gcacgtctca ttcttgtggt taccttgccc 1020

aagaccctga cgtgtttgat ggtaagtgtt ggctttcttg ctttttgggc ctgccgaccg 1080

aagtgtggcg tcatgaggag tatctagcta acgccttcgg ttaccaaacc aagtggggcg 1140

tgcatggtaa gtacctccag cgcaggcttc aggtccgcgg catgcgtgct gtagttgatc 1200

ctgatggtcc catccacgtt gaagcgctgt cttgccccca gtcttggatc aggcacctga 1260

ctctaaatga tgacgtcacc ccaggatttg ttcgcctaac atcccttcgc attgagccga 1320

acacagagcc tactactttc cggatctttc ggtttggagc gcataagtgg tatggcgctg 1380

ccggcaaacg ggctcgtgct aagcgtgccg ctaaaggtga gaagaattca gctcccaccc 1440

ccaaggtcgc cctgccggtc cccacctatg gaattaccac ctactctcca ccgacagacg 1500

ggtcttgtgg ttggcatgtc cttgccgcca taatgaaccg gatgataaat ggtgacttca 1560

cgtcccctct gactccgtac aacagaccag aggatgattg ggcttctgat tatgatcttg 1620

ctcaggcaat ccaatgtcta caactgcctg ctaccgtggt ccggagtcgc gcctgtccta 1680

acgccaagta cctcataaaa ctcaacggag tccactggga ggtagaggtg aggtcaggaa 1740

tggctcctcg ctctctttct cgtgaatgtg tggttggcgt ttgctctgaa ggttgtgttg 1800

caccgcctta tccagcagac gggctaccag aacgagcact cgaggccttg gcgtctgctt 1860

acaggttacc ctctgattgt gttagctctg gcattgctga ctttcttgct aacccacctc 1920

ctcaggaatt ctggaccctc gacaaaatgt tgacctcccc gtcaccagag cggtccggct 1980

tctctagttt gtataaatta ctattagagg ttgttccgca aaaatgcggt gccacggaag 2040

gggctttcgt ctatgctgtt gagagaatgt tgaaggattg tccgagctcc aaacaggcca 2100

tggcccttct ggcaaaaatt aaagttccat cctcaaaggc cccgtctgtg tcccttgacg 2160

agtgtttccc tacggatgtt tcagccgact tcgagccagc atctcaggaa aggccccaaa 2220

gttccggtgc tgctgttgtc ctgtgttcac cggaagtaaa agagttcgaa gaagcagccc 2280

cagaagaagt tcaagagagt ggccacaagg tcgcccgctc tgcatttgtt gccgagggtc 2340

ctaacaatga acaggtaccg atggctgccg gcgagcaact gaagcccggt ggtcgcgttt 2400

tggcggtcgg gaatgctcat gaaggtgttc tggcctcaac tagttcgact aacctgatag 2460

gcgggaactt ccccccttca gactccatga aagagagcat gctcaatagc tgggaagacg 2520

aaccactgga tttgtcccaa ccggcaccag ctgttacaat gacccttgtg agagagcaaa 2580

cacccgacaa cctgggtcct gatgccggtg ccttccccgt caccgttcga aaatttgtcc 2640

cgacagggcc tacactccgt catgttgagc actgcggcac ggagtcaggc gacagcagtt 2700

cgcccttgga tctgtcttat gcgcaaaccc tggaccagcc tttaaatcta tccttggccg 2760

cttggccagt gagggccacc gcgtctgacc ctggctgggt ccacggtagg cgtgagccta 2820

tctttgtaaa gcctcgagat gctttctctg acggcgattc agcccttcag ctcggggagc 2880

tgtctgaatc cggctccgtc atcgagtttg accggacaag aaatgctccg gcggtcgacg 2940

cccctgttga cttgacggct tcgaacaagg ccctctctgt ggttgatcct ttcgaatttg 3000

ccgaactcaa gcgcccgcgt ttttccgcac aagccttaat tgaccgaggc ggtccacttg 3060

ccgacgtcca tgcaaaaata aagaaccggg tatatgaaca gtgcctccag gcttgtgagc 3120

ctggcagtcg cgcaacccca gccaccaaga agtggctcga taaaatgtgg gatagggtgg 3180

acatgaagac ttggcgctgt acctcgcagt tccaagctgg tcgcattctt gcgtccctta 3240

aattcctccc tgacatgatt caggacacac cacctcctgt tcctaggaag aatcgggcta 3300

gtgataatgc cggcctgaag cgactggtgg cgcagtggga cagaaaattg agtgcaaccc 3360

ccccttcaaa accggttgga ccaacacttg accaaattgt cccttcgccc acgggtaccc 3420

agcaagaaga tgtcacttcc tccgatgggc catctcatgc gccggatcct cctagtcgaa 3480

tgagcacgag tgggagttgg aagggccttg tgctctctgg tacccgtctc gcggggtcca 3540

ttagtcagca tttcatgaca tgggtttttg aggttttctc ccatctccca gcttttgcac 3600

tcacactttt ctcgccgagg ggctctatgg cttcaggtga ttggatgttt gcaggtgttg 3660

ttttacttgc tctcctgctc tgtcgttctt acccagtatt cgggtgcctt cccttattgg 3720

gtgtcctttc tggctctgtg cggcgcgttc gtctgggggt ttttggttct tggatggctt 3780

tcgctgtatt tttattctcg actccatcca acccagtcgg ttcttcttgt gaccacgatt 3840

cgccggagtg tcatgctgag cttttggctc ttgagcagcg ccaactttgg gaacctgtgc 3900

gcggccttgt ggtcggcccc tcgggcctct tatgtgtcat tcttggcaag ctactcggtg 3960

ggtcacgtta tctctggcat gttttcttac gtttatgcat gcttgcagat ttggcccttt 4020

ctcttgttta tgtggtgtcc caggggcgtt gtcacaagtg ttggggaaag tgtataagaa 4080

cagctccggc ggaggtggct ctcaatgtgt tccctttctc gcgcgctacc cgtagctctc 4140

ttgtgtcctt gtgcgatcgg ttccaagcgc caaaaggggt tgatcctgtg tacttggcaa 4200

cgggttggcg cgggtgttgg tgtggtgaga gtcccattca tcaaccgcac caaaaaccca 4260

tagcttatgc taatctggat gaaaagaaaa tatctgccca aacggtggtt gctgtcccac 4320

acgatcccag tcaggccatc aagtgcctga aagttttgca ggcgggagga gccatcgtgg 4380

accagcccac acctgaggtc gtccgtgtat ccgaaatccc cttctcagcc ccatttttcc 4440

caaaagttcc agtcaaccca gattgtaagg ttgtggtgga ttcggacact tttgtggctg 4500

cggttcgctg cggctactcg acagcacaac tggtcttagg ccagggcaac tttgccaagt 4560

taaatcagat tcccctcagg agctccatct ccaccaaagc gattggcggg gcctcttaca 4620

cccttgctgt ggctcaagtt tctgtgtgga ctcttgttca cttcatcctc ggtctttggt 4680

tcacgtcacc ccaagtgtgt ggccgaggaa cctctgactc atggtgttca aatccttttt 4740

cataccctac ctatggcccc ggggttgtgt gctcctctcg actttgtgtg tctgccgacg 4800

gggtcactct accattgttc tcagccgtgg ctcaactctc cggtagagag gtggggattt 4860

ttattttggt gctcgtctcc ttgatggctt tggcccaccg catggccctt aaggcagaca 4920

tgttgatggt ctttctggct ttttgtgctt acgcctggcc catgagctcc tggttgattt 4980

gcttctttcc tacactcttg aagtgggtta ccctccaccc tcttactatg ctttgggtgc 5040

actcattctt ggtgttttgt ctgccagcag ccggcatcct ctcactaggg ataactggcc 5100

ttctttgggc ggttggccgc tttactcagg ttgccggaat tattacacct tatgacatcc 5160

accagtacac ctctgggcca cgtggcgctg cagctgtggc cacagcccca gaaggcactt 5220

atatggccgc cgtccggaga gctgctttaa ctgggcgaac tttaatcttc accccgtctg 5280

cagttggatc ccttctcgaa ggagctttca ggactcataa accttgtctt aacaccgtaa 5340

atgttgtagg ctcttccctt ggttccggcg gggttttcac tattgacggc agaaaaattg 5400

ttgtcactgc tgcccatgtg ttgaacggcg acacagctag agtcaccggc gactcctaca 5460

accgcatgca tactttcaag accaatggtg attatgcctg gtcccatgct gatgactggc 5520

ggggcgttgc ccctgcggtc aaggttgcga aggggtaccg cggtcgtgcc tactggcaaa 5580

catcaactgg cgtcgaaccc ggtgttattg gggaagggtt cgccttctgt ttcaccacct 5640

gtggcgattc ggggtcaccc gtcatctcag aatccggtga tctcattgga atccataccg 5700

gttcaaataa acttggttct ggtcttgtga caacccctga aggggagaca tgtaccatca 5760

aagaaaccaa gctctctgac ctctccagac atttcgcagg cccaagcgtt cctcttgggg 5820

atattaaatt gagtccagcc atcatccctg atataacatc cattccgagt gacttggcat 5880

cgctcctatc ctccgtccct gtagtggaag gcggcctctc gaccgttcaa cttttgtgtg 5940

tctttttcct actttggcgc atgatgggcc atgcctggac tcccattgtt gccgtgggtt 6000

tctttttact gaatgaaatt cttccagcag ttttggtccg agccgtgttt tcttttgcac 6060

tttttgtgct tgcatgggcc acccccctggt ctgcacaggt gttgatgatt agactcctca 6120

cggcatctct caaccgcaat aagctttctc tggcgttcta cgcactcggg ggggtcgtcg 6180

gtttggccgc tgaaatcggg acttttgctg gcaaattgcc tgaattgtct caaacccttt 6240

cgacatactg cttcttacct agggtccttg ctatgaccag ttgtgttccc accatcatca 6300

ttggtggact ccatgccctc ggtgtaattc tgtggttgtt caaataccgg tgcctccaca 6360

acatgctcgt tggtgatggg agtttttcaa gcgccttctt cctacggtat tttgcagagg 6420

gtaatctcag aaaaggtgtt tcgcagtcct gtggcatgaa taacgagtcc ctgacggctg 6480

ctttggcttg caagttgtca cgggctgacc ttgatttttt gtccagctta acgaacttca 6540

agtgctttgt atctgcttcg aatatgaaaa atgctgccgg ccagtacatt gaagcggcgt 6600

atgccaaggc cctgcgccaa gagttggcgt ctctagttca gattgacaaa atgaaaggag 6660

ttttgtccaa actcgaggcc tttgctgaaa cagctactcc gtcccttgac ataggtgacg 6720

tgattgttct gcttgggcaa catccacacg gatctatcct tgatattaat gtggggactg 6780

agaggaaaac tgtgtccgtg caagagaccc ggagcctagg cggttccaaa ttcagtgttt 6840

gtactgtcgt gtctaacaca cccgtggacg ccttaaccgg catcccactc cagacaccaa 6900

cccctctttt tgagaatggt ccgcgtcatc gcagcgaaga agacgatctt aaagtcgaga 6960

ggatgaagaa acactgtgtg tccctcggct tccacaacat caatggcaaa gtttactgca 7020

agatttggga caagtccacc ggtgacacct tttacacgga tgattcccgg tatacccacg 7080

accatgctct tcaggacagg tcagccgact acagagacag ggactatgag ggtgtgcaaa 7140

ccgcccccca acagggattt gatccaaagt ctgaaacccc tgtcggcact gttgtgatcg 7200

gcggtattac gtataacagg tatctgacta agggtaagga ggttctggtt cccaagcccg 7260

acaattgcct tgaagctgcc aagctgtctc ttgagcaagc tctcgctggg atgggccaaa 7320

cttgcgacct tacagctgcc gaggtggaaa agttaaagcg catcatcagt caactccaag 7380

gtttgaccac tgaacaggct ttaaactgct agccgctagc ggcttgaccc gctgtggccg 7440

cggcggctta gttgttactg aaacggcggt aaaaattgta agataccaca gcagaacttt 7500

caccttgggc cctttggacc taaaagtcgc ttctgaggtg gaggtgaaga gatcaactga 7560

gcagggccac gctgttgtgg caaacctatg ttctggtgtt gtattgatga gacctcaccc 7620

accgtccctt gttgacgttc ttctgaaacc cggacttgac acaacacccg gcattcaacc 7680

ggggcatggg gccgggaata tgggcgtgga cggttccatt tgggattttg aaaccgcacc 7740

cacaaaggca gaactcgagt tgtccaagca aataatccaa gcatgtgaag tcaggcgcgg 7800

ggatgccccg aacctccaac tcccttacaa gctctgtcca gttaggggggg atcctgagcg 7860

gcataaaggc cgccttatca ataccaggtt tggagatttg ccttacaaga ctcctcaaga 7920

caccaagtcc gcaatccacg cggcttgttg cctgcacccc aacggggctc ccgtgtctga 7980

tggtaaatcc acattaggca ccactcttca acacggtttc gagctttatg tccctactgt 8040

gccctatagt gtcatggagt accttgattc acgccctgac acccccttta tgtgtaccaa 8100

acatggtact cccgaggctg ctgcagagga ccttcgaaaa tatgacttat ccacccaagg 8160

gtttgtcctg cctggggtcc tacgtctagt acgcagattc atctttggcc atattggtaa 8220

ggcaccgcca ctgttcctcc catcaactta tcccgccaag aactctatgg cagggatcaa 8280

tggccagagg ttcccaacaa aagacgttca gagcatacct gaaattgatg aaatgtgtgc 8340

ccgcgctgtc aaagagaatt ggcaaactgt gacgccttgc accctcaaaa aacagtattg 8400

ttccaagcct aaaaccagga ccatccttgg taccaacaac ttcattgcct tggctcacag 8460

gtcggcactc agcggtgtca ctcaggcgtt catgaaaaaa gcctggaagt ccccgatcgc 8520

cttggggaaa aacaaattta aggagttgca ctgcactgtc gccggtaggt gcctcgaggc 8580

cgacttggcc tcttgtgatc gcagcacccc ggccatcgtg aggtggtttg ttgccaacct 8640

cctgtacgaa cttgcgggtt gtgaagagta cttgccaagc tatgtgctca attgttgcca 8700

tgacctggtg gcaacgcaaa atggcgcctt cacaaaacgt ggtggcctgt catctggaga 8760

ccccgttacc agtgtgtcca acacagtgta ttcactggtg atttatgctc agcacatggt 8820

gctgtcggct ttgaagatgg gtcatgaaat cggcctcaag ttcctcgagg aacagcttaa 8880

gttcgaggac cttctcgaaa tccagcctat gttggtatat tctgatgacc ttgtattgta 8940

tgctgaaaga cccaccttcc ccaattacca ttggtgggtt gagcaccttg acctgatgct 9000

gggttttaag acagacccaa aaaagactgt cataactgac aaacccagct ttcttggctg 9060

tagaatcgaa gcggggcgac aactggttcc cagtcgcgac cgcattctgg ctgctcttgc 9120

atatcacatg aaggcgcaga acgcctcaga gtattatgcg tctgctgccg cgattctgat 9180

ggactcgtgt gcttgcattg accacgatcc tgagtggtat gaggacctca tctgcggcat 9240

tgctcgatgc gcccgccagg atggctacag tttcccaggc ccgccgttct tcatgtccat 9300

gtgggagaag ctgaaaagtc acaatgaagg caagaaattc cgccactgtg gcatttgtga 9360

cgccaaggcc gatcatgcgt ccgcctgtgg gcttgattta tgtctgttcc actcgcactt 9420

tcatcaacac tgccctgtta ctctgagctg cggccatcat gccggttcaa aagaatgccc 9480

acagtgtcag tcacctgttg gagctggtaa atccccccctt gatgcagtgc tgaaacaaat 9540

cccgtacaaa ccccctcgtc ctgtcatcat gaaggtggac aataaaacaa cgacccttga 9600

cccgggaagg tatcagtccc gtcgaggtct tgttgctgtc aagaggggta ttgcaggcaa 9660

tgaggttgat ctcgctgatg gagactatca ggtggtgccc cttttgccaa cctgcaaaga 9720

cataaacatg gtgaaggtgg ctgtcaatgt gctactcagc aagttcatag tggggccgcc 9780

aggttccggc aagacgacct ggctactgag tcaagttcag gatgatgatg tcatctatac 9840

acctacccat cagaccatgt tcgacatagt caatgccctc aaagtctgta ggtattccat 9900

cccagtggct tcagggctcc ctttcccacc gcccgccaga tctggaccgt gggttaggct 9960

cgttgctagc gggcacatcc ctggccgaat atcatacctt gacgaggccg gatattgcaa 10020

tcatctggat attctcagac tgctttctaa gacacctctt gtgtgtttgg gtgaccttca 10080

gcaacttcac cctgtcggct ttgactctta ctgttatgtt tttgatcaaa tgcctcataa 10140

gcagctgacc actatttata gatttggccc caatatctgt tctgccattc aaccttgtta 10200

cagggaaaaa ctcgaatcta aggccaggaa cactagggtg gtttttactg cccggcccgt 10260

ggcttttggt caggtgttga cgccatatca taaagaccgc accggctcag ctataaccat 10320

agattcatcc cagggagcca cctttgatgt tgtgacgctg catttgccgt cgccagattc 10380

cctgaacaaa tcccgggctc ttgtagctat cactcgggca aggcatgggt tgttcatcta 10440

tgaccctcat aaccaactcc ggaagttttt caacttaaca cctgagcgca ctgattgcaa 10500

cctcgtgttc aaccgcgggg acgagttggt agttttgaat gcagataatg cagtcacgac 10560

tgtggctaag gttttggagg cgggcccgtc tcggtttcga gtatcagatc caaggtgcaa 10620

gtctctttta gccgcttgct cggccagtct ggaaggaggc tgcatgccac tgccgcaagt 10680

ggcacataat ctggggtttt acttctctcc agatagtcca gcatttgcac ctctgccaaa 10740

agagctggca ccacattggc cggttgttac tagtcagaac aaccaggcat ggcccgaccg 10800

acttgtcgct agtatgcggc cagttgatgc ccgctacagc aagcctatgg tcggtgcagg 10860

gtatgtggtt gggccatcca ctttccttgg cactcctggt gtagtgtcat actatctcac 10920

gctgtacatc aggggtgagc cccaggcctt gccggagaca ctcgtctcaa cgggacgtat 10980

agctactgat tgtcgagagt atctcgacgc agctgaggaa gaagcagcta aagaactccc 11040

tcacgcattc attggcgatg tcaaaggtac tacagtgggg gggtgtcacc acattacgtc 11100

aaaatacctt cccaggtcct tgcccaagga ctccgttgcc gtggtcggag tgagttcgcc 11160

cggcaaggct gccaaagccg tgtgtactct caccgatgtg tatcttcccg agctccggcc 11220

atatttgcaa ccggaaacag catcgaaatg ctggaaactt aaactagact tcagggatgt 11280

cagactgatg gtctggaaag gagccaccgc atatttccaa ctggaggggc tcacatggtc 11340

agcgctgccc gactatgcca ggttcattca gctaccaaaa gatgccgttg tgtacattga 11400

tccgtgcata ggaccggcaa cagccaaccg taaggttgtg agaactacag attggcgagc 11460

tgacctggca gtgacaccgt acgactacgg tgctcagagc attttgacta cagcctggtt 11520

cgaggacctt gggccgcagt ggaagatttt agggttgcaa cccttcaagc gggcatttgg 11580

ctttgaaaac actgaggatt gggcgatcct tgcacgtcgc atgaacgacg gcaaggacta 11640

cactgactat aactggaatt gtgttcgaca acgcccacat gccatctacg gacgtgcccg 11700

tgaccatacg tatcactttg cccctggcac tgaactgcaa gtagagctag gtaaaccccg 11760

gctaccgcct gagcaagtac cgtgaatcta gagtgatgca atggggtcac tgtggagtaa 11820

aatcagtcaa ctgttcgtgg atgccttcac tgagttcctt gttagtgtgg ttgatattgt 11880

catcttcctt gccatactgt ttgggttcac cgttgcaggg tggttactgg tctttttttt 11940

cagagtggtt tgctccgcgc ttctccgttc gcgctctgcc attcactctt ccgaactatc 12000

gaaggtccta tgagggcttg ctacctaatt gcagaccgga tgttccacaa ttcgcattca 12060

agcacccatt gggtatgttt tggcacatgc gagtttccca cttaattgac gaaatggtct 12120

ctcgccgcat ttaccagacc atggaacatt caggtcaagc ggcctggaag caggtggtta 12180

gtgaagctac tctcacaaga ctgtcaaagc tcgacatagt tctccacttc caacacctgg 12240

ccgcaataga ggcggattct tgccgcttcc tcagctcacg acttgtgatg ctgaaaaatc 12300

ttgctgttgg caatatgagc ctacagtaca acaccacgtt ggaccgcgtt gagctcatct 12360

tcccaacacc aggtacgagg cccaaattga ccgattttag acaatggctc gtcagtgtgc 12420

acgcttctat tttttcctct gtggcctcat cagttacctt gttcatagtg ctttggcttc 12480

gaattccagc tctacgctat gtttttggtt tccattggcc cacggcaaca catcattcga 12540

gctaaccatc aattactcta tatgtaagcc ctgtctcacc agtcaagcgg ctcgacaaag 12600

gctcgaaccc ggtcgcaaca tgtggtgcaa aataggacac accacgtgtg aggagcgtga 12660

ccatgatgag ttgtcaatga ccattccgtc cgggtacgat aacctcaaac ttgagggtta 12720

ttacgcttgg ctggcttttt tgtccttttc ttacgcagcc caatttcatc cagagttgtt 12780

cggaataggg aatgtgtcac gcgtcttcgt ggataaacgg caccagttca tctgtgccga 12840

gcacgacgga caaaattcaa ccgtatccac cgaacataat atttccgcat tgtatgcggc 12900

gtactaccac caccaggtag acgggggcaa ttggttccac ctggaatggc tgcggccttt 12960

cttttcctcc tggctagtac tcaatatttc atggtttctg aggcgttcgc ctgcaagccc 13020

tgtttctcga cgcatttatc agatattgag accaacacga ccgcggctgc cggtttcatg 13080

gtccttcagg acatcaactg tttccacagt ggctcagagg cacaaacgac tggtcccatc 13140

agaaagtcgt cccaatgccg tgaagccgtc ggcactcccc agtacatcaa gataacggcc 13200

aatgtgaccg acgaatcata cttgtacaac gcggacttgc tgatgctttc tgcgtgcctt 13260

ttctacgcct cagagatgag cgagaaaggc tttaaagtca tttttgggaa tgtctctggc 13320

gttgtctccg cttgtgtcaa ttttacagat tatgtggccc atctgaccca acatacccag 13380

cagcatcatt tggtaaccaa tcacattcgg ttgctacatt tcctgacacc atcagcaatg 13440

aggtgggcta caaccattgc ttgtttgttc gccattctct tggcgatatg agatgttctc 13500

acaaatcggg gtgtttcttg actccgcact cttgcttttg gtggtttttt ttgctgtgta 13560

ccggcttgtc ctggtccttt gccgatggca acggcaacag ctcgacatac caatatatat 13620

ataacttgac gatatgcgag ctgaatggga ccgaatggct gtccgaccat tttaattggg 13680

cagtcgagac ttttgtgctc tacccagtgg cgactcatat cctctcactg ggtttcctca 13740

cgacaagtca tttccttgat gcgttcggtc ttggagctgt gtcaattaca gggttttgtg 13800

gcgggcggta cgtgctcagc agcgtgtacg gcgcttgtgc actagcagcg ctcgtatgtt 13860

ttgttatccg tgctgccaaa aattgtatgg cttgccgcta tgctcgtacc cggtttacca 13920

acttcattgt ggatgaccgg gggagaatcc atcggtggag gtctccaata gtggtggaaa 13980

aattaggtaa agctgacgtc ggcggcgacc ttgtcaccat caaacatgtc atcctcgaag 14040

gagtcaaagc tcaacccttg acgaggactt cggccgagca atgggaggcc tagataattt 14100

ctgcaacgat cccaccgccg cacaaaagct tgtgctagcc tttagcatca cgtatacacc 14160

catcatgata tacgccctta aggtgtcacg cggccgactc ttggggttgt tgcacatctt 14220

gatatttctg aactgttctt tcacgttcgg atacatgaca tatatgcatt ttgaatccac 14280

caaccgtgtc gcgcttacca tgggggggcgt tgtcgccctt ctgtggggcg tttatagttt 14340

catagagtca tggaagttta tcacttccag atgcagattg tgttgcctag gccggcgata 14400

cattctggcc cctgcccacc acgtagaaag tgctgcaggc ctccatccga tcccagcgtc 14460

tggtaaccaa gcatacgctg tgagaaagcc cggactaaca tcagtgaacg gcactctggt 14520

accaggactt cgaggcctcg tgctgggcgg caaacgagct gttaaacgag gagtggttaa 14580

cctcgtcaag tatggccggt aaaaaccaga gccagaagaa aaagaaaaat ccagctccaa 14640

tggggaatgg ccagtcagtc aatcaactgt gccagctgct gggcacaatg ataaagtccc 14700

agcgccagcg acccagggga ggacaggcta aaaagaaaaa gcctgagaag ccacatttcc 14760

ccctggctgc tgaagatgac gtccggcacc atctcaccca gaccgagcgc tccctttgct 14820

tgcaatcgat ccagacggct tttaatcaag gcgcaggaac tgcgtcgctt tcatccagcg 14880

ggaagatcgg ttttcaggtt gagtttatgc taccggttgc tcatacagtg cgcctgattc 14940

gcgtgacttc tacatccgcc ggtcaggatg caaattaatt tgatagtcag gtgaatggcc 15000

gcgattggcg tgtggcctct gagtcaccta ttcaattagg gcgatcacat gggggtcaga 15060

cttaattagg caggaaccat gtgaccgaaa tt 15092

<210> 4
<211> 15092
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thể phân lập virut PRRS 96V198 - đời cấy chuyền 14

<400> 4
atgatgtgta gggtattccc cctacataca cgacacttct agtgtttgtg tgccttggag 60

gcgtgggtat agccccgccc cacctcttgg cccctgttct agcccaacag gtatccttct 120

ctctcggggc gagcgcgccg cctgctgctc ccttgcagca ggaaggacct cccgagtatt 180

tccggagagc acctgcttta cgggatctcc acccctttaac catgtctggg acgttctccc 240

ggtgcatgtg caccccggct gcccgggtat tttggagcgc cggccaagtc tattgcacac 300

ggtgtctcag tgcacggtct cttctctctc cggagcttca ggacactgac ctcgctgcaa 360

ttggcttgtt ttacaagcct aaagacaagc ttcactggaa agtccctatc ggcatccctc 420

aggtggagtg tactccgtcc gggtgctgtt ggctctcagc catcttcccc ttggcgcgca 480

tgacctccgg caatcacaac tttctccaac gacttgtgaa ggttgctgat gttttgtacc 540

gtgacggctg cttggcacct cgacaccttc gcgaactcca agtttacgag cgcggctgca 600

actggtaccc gatcacgggg cccgtgcccg ggatgggttt gtacgcgaac tccatgcacg 660

tgtccgacca accgttccct ggtgccgctt atgtgttaac gaactcacct ctgcctcagc 720

aggcttgtcg acagccgttt tgtccatttg aggaggttca ttccgacgta tacaggtgga 780

agaaattcgt gatttttgtg gattcctctt ctgacggccg atctcgcatg atgtggacac 840

caggatccga cgactcggct gccttagaag tattgccacc tgaactagaa tgtcgagtcg 900

aaatcctcgt tcggagtttt cctgcccacc accttgtcga catcaccaac tgggagctca 960

ctgagtcccc tgagcacggt ttttccttca gcacgtctca ttcttgtggt taccttgccc 1020

aagaccctga cgtgtttgat ggtaagtgtt ggctttcttg ctttttgggc ctgccgaccg 1080

aagtgtggcg tcatgaggag catctagcta acgccttcgg ttaccaaacc aagtggggcg 1140

tgcatggtaa gtacctccag cgcaggcttc aggtccgcgg catgcgtgct gtagttgatc 1200

ctgatggtcc catccacgtt gaagcgctgt cttgccccca gtcttggatc aggcacctga 1260

ctctaaatga tgacgtcacc ccaggatttg ttcgcctaac atcccttcgc attgagccga 1320

acacagagcc tactactttc cggatctttc ggtttggagc gcataagtgg tatggcgctg 1380

ccggcaaacg ggctcgtgct aagcgtgccg ctaaaggtga gaagaattca gctcccaccc 1440

ccaaggtcgc cctgccggtc cccacctatg gaattaccac ctactctcca ccgacagacg 1500

ggtcttgtgg ttggcatgtc cttgccgcca taatgaaccg gatgataaat ggtgacttca 1560

cgtcccctct gactccgtac aacagaccag aggatgattg ggcttctgat tatgatcttg 1620

ctcaggcaat ccaatgtcta caactgcctg ctaccgtggt ccggagtcgc gcctgtccca 1680

acgccaagta cctcataaaa ctcaacggag tccactggga ggtagaggtg aggtcaggaa 1740

tggctcctcg ctctctttct cgtgaatgtg tggttggcgt ttgctctgaa ggttgtgttg 1800

caccgcctta tccagcagac gggctaccag aacgagcact cgaggccttg gcgtctgctt 1860

acaggttacc ctctgattgt gttagctctg gcattgctga ctttcttgct aacccacctc 1920

ctcaggaatt ctggaccctc gacaaaatgt tgacctcccc gtcaccagag cggtccggct 1980

tctctagttt gtataaatta ctattagagg ttgttccgca aaaatgcggt gccacggaag 2040

gggctttcgt ctatgctgtt gagagaatgt tgaaggattg tccgagctcc aaacaggcca 2100

tggcccttct ggcaaaaatt aaagttccat cctcaaaggc cccgtctgtg tcccttgacg 2160

agtgtttccc tacggatgtt tcagccgact tcgagccagc atctcaggaa aggccccaaa 2220

gttccggtgc tgctgttgtc ctgtgttcac cggaagtaaa agagttcgaa gaagcagccc 2280

cagaagaagt tcaagagagt ggccacaagg tcgcccgctc tgcatttgtt gccgagggtc 2340

ctaacaatga acaggtaccg atggctgccg gcgagcaact gaagcccggt ggtcgcgttt 2400

tggcggtcgg gaatgctcat gaaggtgttc tggcctcaac tagttcgacc aacctgatag 2460

gcgggaactt ccccccttca gactccatga aagagagcat gctcaatagc tgggaagacg 2520

aaccactgga tttgtcccaa ccggcaccag ctgttacaat gacccttgtg agagagcaaa 2580

cacccgacaa cctgggtcct gatgccggtg ccttccccgt caccgttcga aaatttgtcc 2640

cgacagggcc tacactccgt catgttgagc actgcggcac ggagtcaggc gacagcagtt 2700

cgcccttgga tctgtcttat gcgcaaaccc tggaccagcc tttaaatcta tccttggccg 2760

cttggccagt gagggccacc gcgtctgacc ctggctgggt ccacggtagg cgtgagccta 2820

tctttgtgaa gcctcgagat gctttctctg acggcgattc agcccttcag ctcggggagc 2880

tgtctgaatc cggctccgtc atcgagtttg accggacaag aaatgctccg gcggtcgacg 2940

cccctgttga cttgacggct tcgaacaagg ccctctctgt ggttgatcct ttcgaatttg 3000

ccgaactcaa gcgcccgcgt ttttccgcac aagccttaat tgaccgaggc ggtccacttg 3060

ccgacgtcca tgcaaaaata aagaaccggg tatatgaaca gtgcctccag gcttgtgagc 3120

ctggcagtcg cgcaacccca gccaccaaga agtggctcga taaaatgtgg gatagggtgg 3180

acatgaagac ttggcgctgt acctcgcagt tccaagctgg tcgcattctt gcgtccctta 3240

aattcctccc tgacatgatt caggacacac cacctcctgt tcctaggaag aatcgggcta 3300

gtgataatgc cggcctgaag cgactggtgg cgcagtggga cagaaaattg agtgcaaccc 3360

ccccttcaaa accggttgga ccaacacttg accaaattgt cccttcgccc acgggtaccc 3420

agcaagaaga tgtcacttcc tccgatgggc catctcatgc gccggatcct cctagtcgaa 3480

tgagcacgag tgggagttgg aagggccttg tgctctctgg tacccgtctc gcggggtcca 3540

ttagtcagca tttcatgaca tgggtttttg aggttttctc ccatctccca gcttttgcac 3600

tcacactttt ctcgccgagg ggctctatgg cttcaggtga ttggatgttt gcaggtgttg 3660

ttttacttgc tctcctgctc tgtcgttctt acccagtatt cgggtgcctt cccttattgg 3720

gtgtccttte tggctctgtg cggcgcgttc gtctgggggt ttttggttct tggatggctt 3780

tcgctgtatt tttattctcg actccatcca acccagtcgg ttcttcttgt gaccacgatt 3840

cgccggagtg tcatgctgag cttttggctc ttgagcagcg ccaactttgg gaacctgtgc 3900

gcggccttgt ggtcggcccc tcgggcctct tatgtgtcat tcttggcaag ctactcggtg 3960

ggtcacgtta tctctggcat gttttcttac gtttatgcat gcttgcagat ttggcccttt 4020

ctcttgttta tgtggtgtcc caggggcgtt gtcacaagtg ttggggaaag tgtataagaa 4080

cagctccggc ggaggtggct ctcaatgtgt tccctttctc gcgcgctacc cgtagctctc 4140

ttgtgtcctt gtgcgatcgg ttccaagcgc caaaaggggt tgatcctgtg tacttggcaa 4200

cgggttggcg cgggtgttgg tgtggtgaga gtcccattca tcaaccgcac caaaaaccca 4260

tagcttatgc taatctggat gaaaagaaaa tatctgccca aacggtggtt gctgtcccac 4320

acgatcccag tcaggccatc aagtgcctga aagttttgca ggcgggagga gccatcgtgg 4380

accagcccac acctgaggtc gtccgtgtat ccgaaatccc cttctcagcc ccatttttcc 4440

caaaagttcc agtcaaccca gattgtaagg ttgtggtgga ttcggacact tttgtggctg 4500

cggttcgctg cggctactcg acagcacaac tggtcttagg ccagggcaac tttgccaagt 4560

taaatcagat tcccctcagg agctctatct ccaccaaagc gattggcggg gcctcttaca 4620

cccttgctgt ggctcaagtt tctgtgtgga ctcttgttca cttcatcctc ggtctttggt 4680

tcacgtcacc ccaagtgtgt ggccgaggaa cctctgactc atggtgttca aatccttttt 4740

cataccctac ctatggcccc ggggttgtgt gctcctctcg actttgtgtg tctgccgacg 4800

gggtcactct accattgttc tcagccgtgg ctcaactctc cggtagagag gtggggattt 4860

ttattttggt actcgtctcc ttgatggctt tggcccaccg catggccctt aaggcagaca 4920

tgttgatggt ctttctggct ttttgtgctt acgcctggcc catgagctcc tggttgattt 4980

gcttctttcc tacactcttg aagtgggtta ccctccaccc tcttactatg ctttgggtgc 5040

actcattctt ggtgttttgt ctgccagcag ccggcatcct ctcactaggg ataactggcc 5100

ttctttgggc ggttggccgc tttactcagg ttgccggaat tattacacct tatgacatcc 5160

accagtacac ctctgggcca cgtggcgctg cagctgtggc cacagcccca gaaggcactt 5220

atatggccgc cgtccggaga gctgctttaa ctgggcgaac tttaatcttc accccgtctg 5280

cagttggatc ccttctcgaa ggagctttca ggactcataa accttgtctt aacaccgtaa 5340

atgttgtagg ctcttccctt ggttccggcg gggttttcac tattgacggc agaaaaattg 5400

ttgtcactgc tgcccatgtg ttgaacggcg acacagctag agtcaccggc gactcctaca 5460

accgcatgca tactttcaag accaatggtg attatgcctg gtcccatgct gatgactggc 5520

ggggcgttgc ccctgcggtc aaggttgcga aggggtaccg cggtcgtgcc tactggcaaa 5580

catcaactgg cgtcgaaccc ggtgttattg gggaagggtt cgccttctgt ttcaccacct 5640

gtggcgattc ggggtcaccc gtcatctcag aatccggtga tctcattgga atccataccg 5700

gttcaaataa acttggttct ggtcttgtga caacccctga aggggagaca tgtaccatca 5760

aagaaaccaa gctctctgac ctctccagac atttcgcagg cccaagcgtt cctcttgggg 5820

atattaaatt gagtccagcc atcatccctg atataacatc cattccgagt gacttggcat 5880

cgctcctatc ctccgtccct gtagtggaag gcggcctctc gaccgttcaa cttttgtgtg 5940

tctttttcct actttggcgc atgatgggcc atgcctggac tcccattgtt gccgtgggtt 6000

tctttttact gaatgaaatt cttccagcag ttttggtccg agccgtgttt tcttttgcac 6060

tttttgtgct tgcatgggcc acccccctggt ctgcacaggt gttgatgatt agactcctca 6120

cggcatctct caaccgcaat aagctttctc tggcgttcta cgcactcggg ggggtcgtcg 6180

gtttggccgc tgaaatcggg acttttgctg gcaaattgcc tgaattgtct caaacccttt 6240

cgacatactg cttcttacct agggtccttg ctatgaccag ttgtgttccc accatcatca 6300

ttggtggact ccatgccctc ggtgtaattc tgtggttgtt caaataccgg tgcctccaca 6360

acatgctcgt tggtgatggg agtttttcaa gcgccttctt cctacggtat tttgcagagg 6420

gtaatctcag aaaaggtgtt tcgcagtcct gtggcatgaa taatgagtcc ctgacggctg 6480

ctttggcttg caagttgtca cgggctgacc ttgatttttt gtccagctta acgaacttca 6540

agtgctttgt atctgcttcg aatatgaaaa atgctgccgg ccagtacatt gaagcggcgt 6600

atgccaaggc cctgcgccaa gagttggcgt ctctagttca gattgacaaa atgaaaggag 6660

ttttgtccaa actcgaggcc tttgctgaaa cagctactcc gtcccttgac ataggtgacg 6720

tgattgttct gcttgggcaa catccacacg gatctatcct tgatattaat gtggggactg 6780

agaggaaaac tgtgtccgtg caagagaccc ggagcctagg cggttccaaa ttcagtgttt 6840

gtactgtcgt gtctaacaca cccgtggacg ccttaaccgg catcccactc cagacaccaa 6900

cccctctttt tgagaatggt ccgcgtcatc gcagcgaaga agacgatctt aaagtcgaga 6960

ggatgaagaa acactgtgtg cccctcggct tccacaacat caatggcaaa gtttactgca 7020

agatttggga caagtccacc ggtgacacct tttacacgga tgattcccgg tatacccacg 7080

accatgctct tcaggacagg tcagccgact acagagacag ggactatgag ggtgtgcaaa 7140

ccgcccccca acagggattt gatccaaagt ctgaaacccc tgtcggcact gttgtgatcg 7200

gcggtattac gtataacagg tatctgacta agggtaagga ggttctggtt cccaagcccg 7260

acaattgcct tgaagctgcc aagctgtctc ttgagcaagc tctcgctggg atgggccaaa 7320

cttgcgacct tacagctgcc gaggtggaaa agttaaagcg catcatcagt caactccaag 7380

gtttgaccac tgaacaggct ttaaactgct agccgctagc ggcttgaccc gctgtggccg 7440

cggcggctta gttgttactg aaacggcggt aaaaattgta agataccaca gcagaacttt 7500

caccttgggc cctttggacc taaaagtcgc ttctgaggtg gaggtgaaga gatcaactga 7560

gcagggccac gctgttgtgg caaacctatg ttctggtgtt gtattgatga gacctcaccc 7620

accgtccctt gttgacgttc ttctgaaacc cggacttgac acaacacccg gcattcaacc 7680

ggggcatggg gccgggaata tgggcgtgga cggttccatt tgggattttg aaaccgcacc 7740

cacaaaggca gagctcgagt tgtccaggca aataatccaa gcatgtgaag tcaggcgcgg 7800

ggatgccccg aacctccaac tcccttacaa gctctgtcca gttaggggggg atcctgagcg 7860

gcataaaggc cgccttatca ataccaggtt tggagatttg ccttacaaga ctcctcaaga 7920

caccaagtcc gcaatccacg cggcttgttg cctgcacccc aacggggctc ccgtgtctga 7980

tggtaaatcc acattaggca ccactcttca acacggtttc gagctttatg tccctactgt 8040

gccctatagt gtcatggagt accttgattc acgccctgac acccccttta tgtgtaccaa 8100

acatggtacc cccgaggctg ctgcagagga ccttcgaaaa tatgacttat ccacccaagg 8160

gtttgtcctg cctggggtcc tacgtctagt acgcagattc atctttggcc atattggtaa 8220

ggcaccgcca ctgttcctcc catcaactta tcccgccaag aactctatgg cagggatcaa 8280

tggccagagg ttcccaacaa aagacgttca gagcatacct gaaattgatg aaatgtgtgc 8340

ccgcgctgtc aaagagaatt ggcaaactgt gacgccttgc accctcaaaa aacagtattg 8400

ttccaagcct aaaaccagga ccatccttgg taccaacaac ttcattgcct tggctcacag 8460

gtcggcactc agcggtgtca ctcaggcgtt catgaaaaaa gcctggaagt ccccgatcgc 8520

cttggggaaa aacaaattta aggagttgca ctgcactgtc gccggtaggt gcctcgaggc 8580

cgacttggcc tcttgtgatc gcagcacccc ggccatcgtg aggtggtttg ttgccaacct 8640

cctgtacgaa cttgcgggtt gtgaagagta cttgccaagc tatgtgctca attgttgcca 8700

tgacctggtg gcaacgcaaa atggcgcctt cacaaaacgt ggtggcctgt catctggaga 8760

ccccgttacc agtgtgtcca acacagtgta ttcactggtg atttatgctc agcacatggt 8820

gctgtcggct ttgaagatgg gtcatgaaat cggcctcaag ttcctcgagg aacagcttaa 8880

gttcgaggac cttctcgaaa tccagcctat gttggtatat tctgatgacc ttgtattgta 8940

tgctgaaaga cccaccttcc ccaattacca ttggtgggtt gagcaccttg acctgatgct 9000

gggttttaag acagacccaa aaaagactgt cataactgac aaacccagct ttcttggctg 9060

tagaatcgaa gcggggcgac aactggttcc cagtcgcgac cgcattctgg ctgctcttgc 9120

atatcacatg aaggcgcaga acgcctcaga gtattatgcg tctgctgccg cgattctgat 9180

ggactcgtgt gcttgcattg accacgatcc tgagtggtat gaggacctca tctgcggcat 9240

tgctcgatgc gcccgccagg atggctacag tttcccaggc ccgccgttct tcatgtccat 9300

gtgggagaag ctgaaaagtc acaatgaagg caagaaattc cgccactgtg gcatttgtga 9360

cgccaaggcc gatcatgcgt ccgcctgtgg gcttgattta tgtctgttcc actcgcactt 9420

tcatcaacac tgccctgtta ctctgagctg cggccatcat gccggttcaa aagaatgccc 9480

acagtgtcag tcacctgttg gagctggtaa atccccccctt gatgcagtgc tgaaacaaat 9540

cccgtacaaa ccccctcgtc ctgtcatcat gaaggtggac aataaaacaa cgacccttga 9600

cccgggaagg tatcagtccc gtcgaggtct tgttgctgtc aagaggggta ttgcaggcaa 9660

tgaggttgat ctcgctgatg gagactatca ggtggtgccc cttttgccaa cctgcaaaga 9720

cataaacatg gtgaaggtgg ctgtcaatgt gctactcagc aagttcatag tggggccgcc 9780

aggttccggc aagacgacct ggctactgag tcaagttcag gatgatgatg tcatctatac 9840

acctacccat cagaccatgt tcgacatagt caatgccctc aaagtctgta ggtattccat 9900

cccagtggct tcagggctcc ctttcccacc gcccgccaga tctggaccgt gggttaggct 9960

cgttgctagc gggcacatcc ctggccgaat atcatacctt gacgaggccg gatattgcaa 10020

tcatctggat attctcagac tgctttctaa gacacctctt gtgtgtttgg gtgaccttca 10080

gcaacttcac cctgtcggct ttgactctta ctgttatgtt tttgatcaca tgcctcataa 10140

gcagctgacc actatttata gatttggccc caatatctgt tctgccattc aaccttgtta 10200

cagggaaaaa ctcgaatcta aggccaggaa cactagggtg gtttttactg cccggcccgt 10260

ggcttttggt caggtgttga cgccatatca taaagaccgc accggctcag ctataaccat 10320

agattcatcc cagggagcca cctttgatgt tgtgacgctg catttgccgt cgccagattc 10380

cctgaacaaa tcccgggctc ttgtagctat cactcgggca aggcatgggt tgttcatcta 10440

tgaccctcat aaccaactcc ggaagttttt caacttaaca cctgagcgca ctgattgcaa 10500

cctcgtgttc aaccgcgggg acgagttggt agttttgaat gcagataatg cagtcacgac 10560

tgtggctaag gttctggagg cgggcccgtc tcggtttcga gtatcagatc caaggtgcaa 10620

gtctctttta gccgcttgct cggccagtct ggaaggaggc tgcatgccac tgccgcaagt 10680

ggcacataat ctggggtttt acttctctcc agatagtcca gcatttgcac ctctgccaaa 10740

agagctggca ccacattggc cggttgttac tagtcagaac aaccaggcat ggcccgaccg 10800

acttgtcgct agtatgcggc cagttgatgc ccgctacagc aagcctatgg tcggtgcagg 10860

gtatgtggtt gggccatcca ctttccttgg cactcctggt gtggtgtcat actatctcac 10920

gctgtacatc aggggtgagc cccaggcctt gccggagaca ctcgtctcaa cgggacgtat 10980

agctactgat tgtcgagagt atctcgacgc agctgaggaa gaagcagcta aagaactccc 11040

tcacgcattc attggcgatg tcaaaggtac tacagtgggg gggtgtcacc acattacgtc 11100

aaaatacctt cccaggtcct tgcccaagga ctccgttgcc gtggtcggag tgagttcgcc 11160

cggcaaggct gccaaagccg tgtgtactct caccgatgtg tatcttcccg agctccggcc 11220

atatttgcaa ccggaaacag catcgaaatg ctggaaactt aaactagact tcagggatgt 11280

cagactgatg gtctggaaag gagccaccgc atatttccaa ctggaggggc tcacatggtc 11340

agcgctgccc gactatgcca ggttcattca gctaccaaaa gatgccgttg tgtacattga 11400

tccgtgcata ggaccggcaa cagccaaccg taaggttgtg agaactacag attggcgagc 11460

tgacctggca gtgacaccgt acgactacgg tgctcagagc attttgacta cagcctggtt 11520

cgaggacctt gggccgcagt ggaagatttt agggttgcaa cccttcaagc gggcatttgg 11580

ctttgaaaac actgaggatt gggcgatcct tgcacgtcgc atgaacgacg gcaaggacta 11640

cactgactat aactggaatt gtgttcgaca acgcccacat gccatctacg gacgtgcccg 11700

tgaccatacg tatcactttg cccctggcac tgaactgcaa gtagagctag gtaaacctcg 11760

gctaccgcct gagcaagtac cgtgaatcta gagtgatgca atggggtcac tgtggagtaa 11820

aatcagtcaa ctgttcgtgg atgccttcac tgagttcctt gttagtgtgg ttgatattgt 11880

catcttcctt gccatactgt ttgggttcac cgttgcaggg tggttactgg tctttttttt 11940

cagagtggtt tgctccgcgc ttctccgttc gcgctctgcc attcactctt ccgaactatc 12000

gaaggtccta tgagggcttg ctacctaatt gcagaccgga tgttccacaa ttcgcattca 12060

agcacccatt gggtatgttt tggcacatgc gagtttccca cttaattgac gaaatggtct 12120

ctcgccgcat ttatcagacc atggaacatt caggtcaagc ggcctggaag caggtggtta 12180

gtgaagctac tctcacaaga ctgtcaaagc tcgacatagt tctccacttc caacacctgg 12240

ccgcaataga ggcggattct tgccgcttcc tcagctcacg acttgtgatg ctgaaaaatc 12300

ttgctgttgg caatatgagc ctacagtaca acaccacgtt ggaccgcgtt gagctcatct 12360

tcccaacacc aggtacgagg cccaaattga ccgattttag acaatggctc gtcagtgtgc 12420

acgcttctat tttttcctct gtggcctcat cagttacctt gttcatagtg ctttggcttc 12480

gaattccagc tctacgctat gtttttggtt tccattggcc cacggcaaca catcattcga 12540

gctaaccatc aattactcta tatgtaagcc ctgtctcacc agtcaagcgg ctcgacaaag 12600

gctcgaaccc ggtcgcaaca tgtggtgcaa aatagggcac accacgtgtg aggagcgtga 12660

ccatgatgag ttgtcaatga ccattccgtc cgggtacgat aacctcaaac ttgagggtta 12720

ttacgcttgg ctggcttttt tgtccttttc ttacgcagcc caatttcatc cagagttgtt 12780

cggaataggg aatgtgtcac gcgtcttcgt ggataaacgg caccagttca tctgtgccga 12840

gcacgacgga caaaattcaa ccgtatccac cgaacataat atttccgcat tgtatgcggc 12900

gtactaccac caccaggtag acgggggcaa ttggttccac ctggaatggc tgcggccttt 12960

cttttcctcc tggctagtac tcaatatttc atggtttctg aggcgttcgc ctgcaagccc 13020

tgtttctcga cgcatttatc agatattgag accaacacga ccgcggctgc cggtttcatg 13080

gtccttcagg acatcaactg tttccacagt ggctcagagg cacaaacgac tggtcccatc 13140

agaaagtcgt cccaatgccg tgaagccgtc ggcactcccc agtacatcaa gataacggcc 13200

aatctgaccg acgaatcata cttgtacaac gcggacttgc tgatgctttc tgcgtgcctt 13260

ttctacgcct cagagatgag cgagaaaggc tttaaagtca tttttgggaa tgtctctggc 13320

gttgtctccg cttgtgtcaa ttttacagat tatgtggccc atctgaccca acatacccag 13380

cagcatcatt tggtaaccaa tcacattcgg ttgctacatt tcctgacacc atcagcgatg 13440

aggtgggcta caaccattgc ttgtttgttc gccattctct tggcgatatg agatgttctc 13500

acaaatcggg gtgtttcttg actccgcact cttgcttttg gtggtttttt ttgctgtgta 13560

ccggcttgtc ctggtccttt gccgatggca acggcgacag ctcgacatac caatatatat 13620

ataacttgac gatatgcgag ctgaatggga ccgaatggct gtctgaccat tttaattggg 13680

cagtcgagac ttttgtgctc tacccagtgg cgactcatat cctctcactg ggtttcctca 13740

cgacaagtca tttccttgat gcgttcggtc ttggagctgt gtcaattaca gggttttgtg 13800

gcgggcggta cgtgctcagc agcgtgtacg gcgcttgtgc actagcagcg ctcgtatgtt 13860

ttgttatccg tgctgccaaa aattgtatgg cttgccgcta tgctcgtacc cggtttacca 13920

acttcattgt ggatgaccgg gggagaatcc atcggtggag gtctccaata gtggtggaaa 13980

aattaggtaa agctgacgtc ggcggcgacc ttgtcaccat caaacatgtc atcctcgaag 14040

gagtcaaagc tcaacccttg acgaggactt cggccgagca atgggaggcc tagataattt 14100

ctgcaacgat cccaccgccg cacaaaagct tgtgctagcc tttagcatca cgtatacacc 14160

catcatgata tacgccctta aggtgtcacg cggccgactc ttggggttgt tgcacatctt 14220

gatatttctg aactgttctt tcacgttcgg atacatgaca tatatgcatt ttgaatccac 14280

caaccgtgtc gcgcttacca tgggggggcgt tgtcgccctt ctgtggggcg tttatagttt 14340

catagagtca tggaagttta tcacttccag atgcagattg tgttgcctag gccggcgata 14400

cattctggcc cctgcccacc acgtagaaag tgctgcaggc ctccatccga tcccagcgtc 14460

tggtaaccaa gcatacgctg tgagaaagcc cggactaaca tcagtgaacg gcactctggt 14520

accaggactt cgaggcctcg tgctgggcgg caaacgagct gttaaacgag gagtggttaa 14580

cctcgtcaag tatggccggt aaaaaccaga gccagaagaa aaagaaaaat ccagctccaa 14640

tggggaatgg ccagtcagtc aatcaactgt gccagctgct gggcacaatg ataaagtccc 14700

agcgccagcg acccagggga ggacaggcta aaaagaaaaa gcctgagaag ccacatttcc 14760

ccctggctgc tgaagatgac gtccggcacc atctcaccca gaccgagcgc tccctttgct 14820

tgcaatcgat ccagacggct tttaatcaag gcgcaggaac tgcgtcgctt tcatccagcg 14880

ggaagatcgg ttttcaggtt gagtttatgc taccggttgc tcatacagtg cgcctgattc 14940

gcgtgacttc tacatccgcc ggtcaggatg caaattaatt tgatagtcag gtgaatggcc 15000

gcgattggcg tgtggcctct gagtcaccta ttcaattagg gcgatcacat gggggtcaga 15060

cttaattagg caggaaccat gtgaccgaaa tt 15092

<210> 5
<211> 15092
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thể phân lập virut PRRS 96V198 - đời cấy chuyền 49

<400> 5
atgatgtgta gggtattccc cctacataca cgacacttct agtgtttgtg tgccttggag 60

gcgtgggtat agccccgccc cacctcttgg cccctgttct agcccaacag gtatccttct 120

ctctcggggc gagcgcgccg cctgctgctc ccttgcagca ggaaggacct cccgagtatt 180

tccggagagc acctgcttta cgggatctcc acccttaac catgtctggg acgttctccc 240

ggtgcatgtg caccccggct gcccgggtat tttggagcgc cggccaagtc tattgcacac 300

ggtgtctcag tgcacggtct cttctctctc cggagcttca ggacactgac ctcgctgcaa 360

ttggcttgtt ttacaagcct aaagacaagc ttcactggaa agtccctatc ggcatccctc 420

aggtggagtg tactccgtcc gggtgctgtt ggctctcagc catcttcccc ttggcgcgca 480

tgacctccgg caatcacaac tttctccaac gacttgtgaa ggttgctgat gttttgtacc 540

gtgacggctg cttggcacct cgacaccttc gcgaactcca agtttacgag cgcggctgca 600

actggtaccc gatcacgggg cccgtgcccg ggatgggttt gtacgcgaac tccatgcacg 660

tgtccgacca accgttccct ggtgccgctt atgtgttaac gaactcacct ctgcctcagc 720

aggcttgtcg acagccgttt tgtccatttg aggaggttca ttccgacgta tacaggtgga 780

agaaattcgt gatttttgtg gattcctctt ctgacggccg atctcgcatg atgtggacac 840

caggatccga cgactcggct gccttagaag tattgccacc tgaactagaa tgtcgagtcg 900

aaatcctcgt tcggagtttt cctgcccacc accctgtcga catcaccaac tgggagctca 960

ctgagtcccc tgagcacggt ttttccttca gcacgtctca ttcttgtggt taccttgccc 1020

aagaccctga cgtgtttgat ggtaagtgtt ggctttcttg ctttttgggc ctgccgaccg 1080

aagtgtggcg tcatgaggag catctagcta acgccttcgg ttaccaaacc aagtggggcg 1140

tgcatggtaa gtacctccag cgcaggcttc aggtccgcgg catgcgtgct gtagttgatc 1200

ctgatggtcc catccacgtt gaagcgctgt cttgccccca gtcttggatc aggcacctga 1260

ctctaaatga tgacgtcacc ccaggatttg ttcgcctaac atcccttcgc attgagccga 1320

acacagagcc tactactttc cggatctttc ggtttggagc gcataagtgg tatggcgctg 1380

ccggcaaacg ggctcgtgct aagcgtgccg ctaaaggtga gaagaattca gctcccaccc 1440

ccaaggtcgc cctgccggtc cccacctatg gaattaccac ctactctcca ccgacagacg 1500

ggtcttgtgg ttggcatgtc cttgccgcca taatgaaccg gatgataaat ggtgacttca 1560

cgtcccctct gactccgtac aacagaccag aggatgattg ggcttctgat tatgatcttg 1620

ctcaggcaat ccaatgtcta caactgcctg ctaccgtggt ccggagtcgc gcctgtccca 1680

acgccaagta cctcataaaa ctcaacggag tccactggga ggtagaggtg aggtcaggaa 1740

tggctcctcg ctctctttct cgtgaatgtg tggttggcgt ttgctctgaa ggttgtgttg 1800

caccgcctta tccagcagac gggctaccag aacgagcact cgaggccttg gcgtctgctt 1860

acaggttacc ctctgattgt gttagctctg gcattgctga ctttcttgct aacccacctc 1920

ctcaggaatt ctggaccctc gacaaaatgt tgacctcccc gtcaccagag cggtccggct 1980

tctctagttt gtataaatta ctattagagg ttgttccgca aaaatgcggt gccacggaag 2040

gggctttcgt ctatgctgtt gagagaatgt tgaaggattg tccgagctcc aaacaggcca 2100

tggcccttct ggcaaaaatt aaagttccat cctcaaaggc cccgtctgtg tcccttgacg 2160

agtgtttccc tacggatgtt tcagccgact tcgagccagc atctcaggaa aggccccaaa 2220

gttccggtgc tgctgttgtc ctgtgttcac cggaagtaaa agagttcgaa gaagcagccc 2280

cagaagaagt tcaagagagt ggccataagg tcgcccgctc tgcatttgtt gccgagggtc 2340

ctaacaatga acaggtaccg atggctgccg gcgagcaact gaagcccggt ggtcgcgttt 2400

tggcggtcgg gaatgctcat gaaggtgttc tggcctcaac tagttcgacc aacctgatag 2460

gcgggaactt ccccccttca gactccatga aagagagcat gctcaatagc tgggaagacg 2520

aaccactgga tttgtcccaa ccggcaccag ctgttacaat gacccttgtg agagagcaaa 2580

cacccgacaa cctgggtcct gatgccggtg ccttccccgt caccgttcga aaatttgtcc 2640

cgacagggcc tacactccgt catgttgagc actgcggcac ggagtcaggc gacagcagtt 2700

cgcccttgga tctgtcttat gcgcaaaccc tggaccagcc tttaaatcta tccttggccg 2760

cttggccagt gagggccacc gcgtctgacc ctggctgggt ccacggtagg cgtgagccta 2820

tctttgtgaa gcctcgagat gctttctctg acggcgattc agcccttcag ctcggggagc 2880

tgtctgaatc cggctccgtc atcgagtttg accggacaag aaatgctccg gcggtcgacg 2940

cccctgttga cttgacggct tcgaacaagg ccctctctgt ggttgatcct ttcgaatttg 3000

ccgaactcaa gcgcccgcgt ttttccgcac aagccttaat tgaccgaggc ggtccacttg 3060

ccgacgtcca tgcaaaaata aagaaccggg tatatgaaca gtgcctccag gcttgtgagc 3120

ctggcagtcg cgcaacccca gccaccaaga agtggctcga taaaatgtgg gatagggtgg 3180

acatgaagac ttggcgctgt acctcgcagt tccaagctgg tcgcattctt gcgtccctta 3240

aattcctccc tgacatgatt caggacacac cacctcctgt tcctaggaag aatcgggcta 3300

gtgataatgc cggcctgaag cgactggtgg cgcagtggga cagaaaattg agtgcaaccc 3360

ccccttcaaa accggttgga ccaacacttg accaaattgt cccttcgccc acgggtaccc 3420

agcaagaaga tgtcacttcc tccgatgggc catctcatgc gccggatcct cctagtcgaa 3480

tgagcacgag tgggagttgg aagggccttg tgctctctgg tacccgtctc gcggggtcca 3540

ttagtcagca tttcatgaca tgggtttttg aggttttctc ccatctccca gcttttgcac 3600

tcacactttt ctcgccgagg ggctctatgg cttcaggtga ttggatgttt gcaggtgttg 3660

ttttacttgc tctcctgctc tgtcgttctt acccagtatt cgggtgcctt cccttattgg 3720

gtgtcctttc tggctctgtg cggcgcgttc gtctgggggt ttttggttct tggatggctt 3780

tcgctgtatt tttattctcg actccatcca acccagtcgg ttcttcttgt gaccacgatt 3840

cgccggagtg tcatgctgag cttttggctc ttgagcagcg ccaactttgg gaacctgtgc 3900

gcggccttgt ggtcggcccc tcgggcctct tatgtgtcat tcttggcaag ctactcggtg 3960

ggtcacgtta tctctggcat gttttcttac gtttatgcat gcttgcagat ttggcccttt 4020

ctcttgttta tgtggtgtcc caggggcgtt gtcacaagtg ttggggaaag tgtataagaa 4080

cagctccggc ggaggtggct ctcaatgtgt tccctttctc gcgcgctacc cgtagctctc 4140

ttgtgtcctt gtgcgatcgg ttccaagcgc caaaaggggt tgatcctgtg tacttggcaa 4200

cgggttggcg cgggtgttgg tgtggtgaga gtcccattca tcaaccgcac caaaaaccca 4260

tagcttatgc taatctggat gaaaagaaaa tatctgccca aacggtggtt gctgtcccac 4320

acgatcccag tcaggccatc aagtgcctga aagttttgca ggcgggagga gccatcgtgg 4380

accagcccac acctgaggtc gtccgtgtat ccgaaatccc cttctcagcc ccatttttcc 4440

caaaagttcc agtcaaccca gattgtaagg ttgtggtgga ttcggacact tttgtggctg 4500

cggttcgctg cggctactcg acagcacaac tggtcttagg ccagggcaac tttgccaagt 4560

taaatcagat tcccctcagg agctctatct ccaccaaagc gattggcggg gcctcttaca 4620

cccttgctgt ggctcaagtt tctgtgtgga ctcttgttca cttcatcctc ggtctttggt 4680

tcacgtcacc ccaagtgtgt ggccgaggaa cctctgactc atggtgttca aatccttttt 4740

cataccctac ctatggcccc ggggttgtgt gctcctctcg actttgtgtg tctgccgacg 4800

gggtcactct accattgttc tcagccgtgg ctcaactctc cggtagagag gtggggattt 4860

ttattttggt actcgtctcc ttgatggctt tggcccaccg catggccctt aaggcagaca 4920

tgttgatggt ctttctggct ttttgtgctt acgcctggcc catgagctcc tggttgattt 4980

gcttctttcc tacactcttg aagtgggtta ccctccaccc tcttactatg ctttgggtgc 5040

actcattctt ggtgttttgt ctgccagcag ccggcatcct ctcactaggg ataactggcc 5100

ttctttgggc ggttggccgc tttactcagg ttgccggaat tattacacct tatgacatcc 5160

accagtacac ctctgggcca cgtggcgctg cagctgtggc cacagcccca gaaggcactt 5220

atatggccgc cgtccggaga gctgctttaa ctgggcgaac tttaatcttc accccgtctg 5280

cagttggatc ccttctcgaa ggagctttca ggactcataa accttgtctt aacaccgtaa 5340

atgttgtagg ctcttccctt ggttccggcg gggttttcac tattgacggc agaaaaattg 5400

ttgtcactgc tgcccatgtg ttgaacggcg acacagctag agtcaccggc gactcctaca 5460

accgcatgca tactttcaag accaatggtg attatgcctg gtcccatgct gatgactggc 5520

ggggcgttgc ccctgcggtc aaggttgcga aggggtaccg cggtcgtgcc tactggcaaa 5580

catcaactgg cgtcgaaccc ggtgttattg gggaagggtt cgccttctgt ttcaccacct 5640

gtggcgattc ggggtcaccc gtcatctcag aatccggtga tctcattgga atccataccg 5700

gttcaaataa acttggttct ggtcttgtga caacccctga aggggagaca tgtaccatca 5760

aagaaaccaa gctctctgac ctctccagac atttcgcagg cccaagcgtt cctcttgggg 5820

atattaaatt gagtccagcc atcatccctg atataacatc cattccgagt gacttggcat 5880

cgctcctatc ctccgtccct gtagtggaag gcggcctctc gaccgttcaa cttttgtgtg 5940

tctttttcct actttggcgc atgatgggcc atgcctggac tcccattgtt gccgtgggtt 6000

tctttttact gaatgaaatt cttccagcag ttttggtccg agccgtgttt tcttttgcac 6060

tttttgtgct tgcatgggcc acccccctggt ctgcacaggt gttgatgatt agactcctca 6120

cggcatctct caaccgcaat aagctttctc tggcgttcta cgcactcggg ggggtcgtcg 6180

gtttggccgc tgaaatcggg acttttgctg gcaaattgcc tgaattgtct caaacccttt 6240

cgacatactg cttcttacct agggtccttg ctatgaccag ttgtgttccc accatcatca 6300

ttggtggact ccatgccctc ggtgtaattc tgtggttgtt caaataccgg tgcctccaca 6360

acatgctcgt tggtgatggg agtttttcaa gcgccttctt cctacggtat tttgcagagg 6420

gtaatctcag aaaaggtgtt tcgcagtcct gtggcatgaa taacgagtcc ctgacggctg 6480

ctttggcttg caagttgtca cgggctgacc ttgatttttt gtccagctta acgaacttca 6540

agtgctttgt atctgcttcg aatatgaaaa atgctgccgg ccagtacatt gaagcggcgt 6600

atgccaaggc cctgcgccaa gagttggcgt ctctagttca gattgacaaa atgaaaggag 6660

ttttgtccaa actcgaggcc tttgctgaaa cagctactcc gtcccttgac ataggtgacg 6720

tgattgttct gcttgggcaa catccacacg gatctatcct tgatattaat gtggggactg 6780

agaggaaaac tgtgtccgtg caagagaccc ggagcctagg cggttccaaa ttcagtgttt 6840

gtactgtcgt gtctaacaca cccgtggacg ccttaaccgg catcccactc cagacaccaa 6900

cccctctttt tgagaatggt ccgcgtcatc gcagcgaaga agacgatctt aaagtcgaga 6960

ggatgaagaa acactgtgtg cccctcggct tccacaacat caatggcaaa gtttactgca 7020

agatttggga caagtccacc ggtgacacct tttacacgga tgattcccgg tatacccacg 7080

accatgctct tcaggacagg tcagccgact acagagacag ggactatgag ggtgtgcaaa 7140

ccgcccccca acagggattt gatccaaagt ctgaaacccc tgtcggcact gttgtgatcg 7200

gcggtattac gtataacagg tatctgacta agggtaagga ggttctggtt cccaagcccg 7260

acaattgcct tgaagctgcc aagctgtctc ttgagcaagc tctcgctggg atgggccaaa 7320

cttgcgacct tacagctgcc gaggtggaaa agttaaagcg catcatcagt caactccaag 7380

gtttgaccac tgaacaggct ttaaactgct agccgctagc ggcttgaccc gctgtggccg 7440

cggcggctta gttgttactg aaacggcggt aaaaattgta agataccaca gcagaacttt 7500

caccttgggc cctttggacc taaaagtcgc ttctgaggtg gaggtgaaga gatcaactga 7560

gcagggccac gctgttgtgg caaacctatg ttctggtgtt gtattgatga gacctcaccc 7620

accgtccctt gttgacgttc ttctgaaacc cggacttgac acaacacccg gcattcaacc 7680

ggggcatggg gccgggaata tgggcgtgga cggttccatt tgggattttg aaaccgcacc 7740

cacaaaggca gagctcgagt tgtccaggca aataatccaa gcatgtgaag tcaggcgcgg 7800

ggatgccccg aacctccaac tcccttacaa gctctgtcca gttaggggggg atcctgagcg 7860

gcataaaggc cgccttatca ataccaggtt tggagatttg ccttacaaga ctcctcaaga 7920

caccaagtcc gcaatccacg cggcttgttg cctgcacccc aacggggctc ccgtgtctga 7980

tggtaaatcc acattaggca ccactcttca acacggtttc gagctttatg tccctactgt 8040

gccctatagt gtcatggagt accttgattc acgccctgac acccccttta tgtgtaccaa 8100

acatggtacc cccgaggctg ctgcagagga ccttcgaaaa tatgacttat ccacccaagg 8160

gtttgtcctg cctggggtcc tacgtctagt acgcagattc atctttggcc atattggtaa 8220

ggcaccgcca ctgttcctcc catcaactta tcccgccaag aactctatgg cagggatcaa 8280

tggccagagg ttcccaacaa aagacgttca gagcatacct gaaattgatg aaatgtgtgc 8340

ccgcgctgtc aaagagaatt ggcaaactgt gacgccttgc accctcaaaa aacagtattg 8400

ttccaagcct aaaaccagga ccatccttgg taccaacaac ttcattgcct tggctcacag 8460

gtcggcactc agcggtgtca ctcaggcgtt catgaaaaaa gcctggaagt ccccgatcgc 8520

cttggggaaa aacaaattta aggagttgca ctgcactgtc gccggtaggt gcctcgaggc 8580

cgacttggcc tcttgtgatc gcagcacccc ggccatcgtg aggtggtttg ttgccaacct 8640

cctgtacgaa cttgcgggtt gtgaagagta cttgccaagc tatgtgctca attgttgcca 8700

tgacctggtg gcaacgcaaa atggcgcctt cacaaaacgt ggtggcctgt catctggaga 8760

ccccgttacc agtgtgtcca acacagtgta ttcactggtg atttatgctc agcacatggt 8820

gctgtcggct ttgaagatgg gtcatgaaat cggcctcaag ttcctcgagg aacagcttaa 8880

gttcgaggac cttctcgaaa tccagcctat gttggtatat tctgatgacc ttgtattgta 8940

tgctgaaaga cccaccttcc ccaattacca ttggtgggtt gagcaccttg acctgatgct 9000

gggttttaag acagacccaa aaaagactgt cataactgac aaacccagct ttcttggctg 9060

tagaatcgaa gcggggcgac aactggttcc cagtcgcgac cgcattctgg ctgctcttgc 9120

atatcacatg aaggcgcaga acgcctcaga gtattatgcg tctgctgccg cgattctgat 9180

ggactcgtgt gcttgcattg accacgatcc tgagtggtat gaggacctca tctgcggcat 9240

tgctcgatgc gcccgccagg atggctacag tttcccaggc ccgccgttct tcatgtccat 9300

gtgggagaag ctgaaaagtc acaatgaagg caagaaattc cgccactgtg gcatttgtga 9360

cgccaaggcc gatcatgcgt ccgcctgtgg gcttgattta tgtctgttcc actcgcactt 9420

tcatcaacac tgccctgtta ctctgagctg cggccatcat gccggttcaa aagaatgccc 9480

acagtgtcag tcacctgttg gagctggtaa atccccccctt gatgcagtgc tgaaacaaat 9540

cccgtacaaa ccccctcgtc ctgtcatcat gaaggtggac aataaaacaa cgacccttga 9600

cccgggaagg tatcagtccc gtcgaggtct tgttgctgtc aagaggggta ttgcaggcaa 9660

tgaggttgat ctcgctgatg gagactatca ggtggtgccc cttttgccaa cctgcaaaga 9720

cataaacatg gtgaaggtgg ctgtcaatgt gctactcagc aagttcatag tggggccgcc 9780

aggttccggc aagacgacct ggctactgag tcaagttcag gatgatgatg tcatctatac 9840

acctacccat cagaccatgt tcgacatagt caatgccctc aaagtctgta ggtattccat 9900

cccagtggct tcagggctcc ctttcccacc gcccgccaga tctggaccgt gggttaggct 9960

cgttgctagc gggcacatcc ctggccgaat atcatacctt gacgaggccg gatattgcaa 10020

tcatctggat attctcagac tgctttctaa gacacctctt gtgtgtttgg gtgaccttca 10080

gcaacttcac cctgtcggct ttgactctta ctgttatgtt tttgatcaca tgcctcataa 10140

gcagctgacc actatttata gatttggccc caatatctgt tctgccattc aaccttgtta 10200

cagggaaaaa ctcgaatcta aggccaggaa cactagggtg gtttttactg cccggcccgt 10260

ggcttttggt caggtgttga cgccatatca taaagaccgc accggctcag ctataaccat 10320

agattcatcc cagggagcca cctttgatgt tgtgacgctg catttgccgt cgccagattc 10380

cctgaacaaa tcccgggctc ttgtagctat cactcgggca aggcatgggt tgttcatcta 10440

tgaccctcat aaccaactcc ggaagttttt caacttaaca cctgagcgca ctgattgcaa 10500

cctcgtgttc aaccgcgggg acgagttggt agttttgaat gcagataatg cagtcacgac 10560

tgtggctaag gttctggagg cgggcccgtc tcggtttcga gtatcagatc caaggtgcaa 10620

gtctctttta gccgcttgct cggccagtct ggaaggaggc tgcatgccac tgccgcaagt 10680

ggcacataat ctggggtttt acttctctcc agatagtcca gcatttgcac ctctgccaaa 10740

agagctggca ccacattggc cggttgttac tagtcagaac aaccaggcat ggcccgaccg 10800

acttgtcgct agtatgcggc cagttgatgc ccgctacagc aagcctatgg tcggtgcagg 10860

gtatgtggtt gggccatcca ctttccttgg cactcctggt gtggtgtcat actatctcac 10920

gctgtacatc aggggtgagc cccaggcctt gccggagaca ctcgtctcaa cgggacgtat 10980

agctactgat tgtcgagagt atctcgacgc agctgaggaa gaagcagcta aagaactccc 11040

tcacgcattc attggcgatg tcaaaggtac tacagtgggg gggtgtcacc acattacgtc 11100

aaaatacctt cccaggtcct tgcccaagga ctccgttgcc gtggtcggag tgagttcgcc 11160

cggcaaggct gccaaagccg tgtgtactct caccgatgtg tatcttcccg agctccggcc 11220

atatttgcaa ccggaaacag catcgaaatg ctggaaactt aaactagact tcagggatgt 11280

cagactgatg gtctggaaag gagccaccgc atatttccaa ctggaggggc tcacatggtc 11340

agcgctgccc gactatgcca ggttcattca gctaccaaaa gatgccgttg tgtacattga 11400

tccgtgcata ggaccggcaa cagccaaccg taaggttgtg agaactacag attggcgagc 11460

tgacctggca gtgacaccgt acgactacgg tgctcagagc attttgacta cagcctggtt 11520

cgaggacctt gggccgcagt ggaagatttt agggttgcaa cccttcaagc gggcatttgg 11580

ctttgaaaac actgaggatt gggcgatcct tgcacgtcgc atgaacgacg gcaaggacta 11640

cactgactat aactggaatt gtgttcgaca acgcccacat gccatctacg gacgtgcccg 11700

tgaccatacg tatcactttg cccctggcac tgaactgcaa gtagagctag gtaaacctcg 11760

gctaccgcct gagcaagtac cgtgaatcta gagtgatgca atggggtcac tgtggagtaa 11820

aatcagtcaa ctgttcgtgg atgccttcac tgagttcctt gttagtgtgg ttgatattgt 11880

catcttcctt gccatactgt ttgggttcac cgttgcaggg tggttactgg tctttttttct 11940

cagagtggtt tgctccgcgc ttctccgttc gcgctctgcc attcactctt ccgaactatc 12000

gaaggtccta tgagggcttg ctacctaatt gcagaccgga tgttccacaa ttcgcattca 12060

agcacccatt gggtatgttt tggcacatgc gagtttccca cttaattgac gaaatggtct 12120

ctcgccgcat ttatcagacc atggaacatt caggtcaagc ggcctggaag caggtggtta 12180

gtgaagctac tctcacaaga ctgtcaaagc tcgacatagt tctccacttc caacacctgg 12240

ccgcaataga ggcggattct tgccgcttcc tcagctcacg acttgtgatg ctgaaaaatc 12300

ttgctgttgg caatatgagc ctacagtaca acaccacgtt ggaccgcgtt gagctcatct 12360

tcccaacacc aggtacgagg cccaaattga ccgattttag acaatggctc gtcagtgtgc 12420

acgcttctat tttttcctct gtggcctcat cagttacctt gttcatagtg ctttggcttc 12480

gaattccagc tctacgctat gtttttggtt tccattggcc cacggcaaca catcattcga 12540

gctaaccatc aattactcta tatgtaagcc ctgtctcacc agtcaagcgg ctcgacaaag 12600

gctcgaaccc ggtcgcaaca tgtggtgcaa aatagggcac accacgtgtg aggagcgtga 12660

ccatgatgag ttgtcaatga ccattccgtc cgggtacgat aacctcaaac ttgagggtta 12720

ttacgcttgg ctggcttttt tgtccttttc ttacgcagcc caatttcatc cagagttgtt 12780

cggaataggg aatgtgtcac gcgtcttcgt ggataaacgg caccagttca tctgtgccga 12840

gcacgacgga caaaattcaa ccgtatccac cgaacataat atttccgcat tgtatgcggc 12900

gtactaccac caccaggtag acgggggcaa ttggttccac ctggaatggc tgcggccttt 12960

cttttcctcc tggctagtac tcaatatttc atggtttctg aggcgttcgc ctgcaagccc 13020

tgtttctcga cgcatttatc agatattgag accaacacga ccgcggctgc cggtttcatg 13080

gtccttcagg acatcaactg tttccacagt ggctcagagg cacaaacgac tggtcccatc 13140

agaaagtcgt cccaatgccg tgaagccgtc ggcactcccc agtacatcaa gataacggcc 13200

aatctgaccg acgaatcata cttgtacaac gcggacttgc tgatgctttc tgcgtgcctt 13260

ttctacgcct cagagatgag cgagaaaggc tttaaagtca tttttgggaa tgtctctggc 13320

gttgtctccg cttgtgtcaa ttttacagat tatgtggccc atctgaccca acatacccag 13380

cagcatcatt tggtaaccaa tcacattcgg ttgctacatt tcctgacacc atcagcgatg 13440

aggtgggcta caaccattgc ttgtttgttc gccattctct tggcgatatg agatgttctc 13500

acaaatcggg gtgtttcttg actccgcact cttgcttttg gtggtttttt ttgctgtgta 13560

ccggcttgtc ctggtccttt gccgatggca acggcgacag ctcgacatac caatatatat 13620

ataacttgac gatatgcgag ctgaatggga ccgaatggct gtctgaccat tttaattggg 13680

cagtcgagac ttttgtgctc tacccagtgg cgactcatat cctctcactg ggtttcctca 13740

cgacaagtca tttccttgat gcgttcggtc ttggagctgt gtcaattaca gggttttgtg 13800

gcgggcggta cgtgctcagc agcgtgtacg gcgcttgtgc actagcagcg ctcgtatgtt 13860

ttgttatccg tgctgccaaa aattgtatgg cttgccgcta tgctcgtacc cggtttacca 13920

acttcattgt ggatgaccgg gggagaatcc atcggtggag gtctccaata gtggtggaaa 13980

aattaggtaa agctgacgtc ggcggcgacc ttgtcaccat caaacatgtc atcctcgaag 14040

gagtcaaagc tcaacccttg acgaggactt cggccgagca atgggaggcc tagataattt 14100

ctgcaacgat cccaccgccg cacaaaagct tgtgctagcc tttagcatca cgtatacacc 14160

catcatgata tacgccctta aggtgtcacg cggccgactc ttggggttgt tgcacatctt 14220

gatatttctg aactgttctt tcacgttcgg atacatgaca tatatgcatt ttgaatccac 14280

caaccgtgtc gcgcttacca tgggggggcgt tgtcgccctt ctgtggggcg tttatagttt 14340

catagagtca tggaagttta tcacttccag atgcagattg tgttgcctag gccggcgata 14400

cattctggcc cctgcccacc acgtagaaag tgctgcaggc ctccatccga tcccagcgtc 14460

tggtaaccaa gcatacgctg tgagaaagcc cggactaaca tcagtgaacg gcactctggt 14520

accaggactt cgaggcctcg tgctgggcgg caaacgagct gttaaacgag gagtggttaa 14580

cctcgtcaag tatggccggt aaaaaccaga gccagaagaa aaagaaaaat ccagctccaa 14640

tggggaatgg ccagtcagtc aatcaactgt gccagctgct gggcacaatg ataaagtccc 14700

agcgccagcg acccagggga ggacaggcta aaaagaaaaa gcctgagaag ccacatttcc 14760

ccctggctgc tgaagatgac gtccggcacc atctcaccca gaccgagcgc tccctttgct 14820

tgcaatcgat ccagacggct tttaatcaag gcgcaggaac tgcgtcgctt tcatccagcg 14880

ggaagatcgg ttttcaggtt gagtttatgc taccggttgc tcatacagtg cgcctgattc 14940

gcgtgacttc tacatccgcc ggtcaggatg caaattaatt tgatagtcag gtgaatggcc 15000

gcgattggcg tgtggcctct gagtcaccta ttcaattagg gcgatcacat gggggtcaga 15060

cttaattagg caggaaccat gtgaccgaaa tt 15092

<210> 6

<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi oligonucleotit

<400> 6
gcaccacctc acccagac 18

<210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi oligonucleotit

<400> 7
cagttcctgc gccttgat 18

<210> 8
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Đoạn mồi oligonucleotit

<400> 8
cctctgcttg caatcgatcc agac 24

Trình tự hệ gen hoàn chỉnh của SEQ ID No. 5

>96V198c1p49 hệ gen hoàn chỉnh của đời cấy chuyền 49 (SEQ ID NO:5)

ATGATGTGTAGGGTATTCCCCCTACATACACGACACTTCTAGTGTTTGTG
TGCCTTGGAGGCGTGGGTATAGCCCCGCCCCACCTCTTGGCCCCTGTTCT
AGCCCAACAGGTATCCTTCTCTCTCGGGGCGAGCGCGCCGCCTGCTGCTC
CCTTGCAGCAGGAAGGACCTCCCGAGTATTTCCGGAGAGCACCTGCTTTA
CGGGATCTCCACCCTTTAACCATGTCTGGGACGTTCTCCCGGTGCATGTG
CACCCCGGCTGCCCGGGTATTTTGGAGCGCCGGCCAAGTCTATTGCACAC
GGTGTCTCAGTGCACGGTCTCTTCTCTCTCCGGAGCTTCAGGACACTGAC
CTCGCTGCAATTGGCTTGTTTTACAAGCCTAAAGACAAGCTTCACTGGAA
AGTCCCTATCGGCATCCCTCAGGTGGAGTGTACTCCGTCCGGGTGCTGTT
GGCTCTCAGCCATCTTCCCCTTGGCGCGCATGACCTCCGGCAATCACAAC
TTTCTCCAACGACTTGTGAAGGTTGCTGATGTTTTGTACCGTGACGGCTG
CTTGGCACCTCGACACCTTCGCGAACTCCAAGTTTACGAGCGCGGCTGCA
ACTGGTACCCGATCACGGGGCCCGTGCCCGGGATGGGTTTGTACGCGAAC
TCCATGCACGTGTCCGACCAACCGTTCCCTGGTGCCGCTTATGTGTTAAC
GAACTCACCTCTGCCTCAGCAGGCTTGTCGACAGCCGTTTTGTCCATTTG
AGGAGGTTCATTCCGACGTATACAGGTGGAAGAAATTCGTGATTTTTGTG
GATTCCTCTTCTGACGGCCGATCTCGCATGATGTGGACACCAGGATCCGA
CGACTCGGCTGCCTTAGAAGTATTGCCACCTGAACTAGAATGTCGAGTCG
AAATCCTCGTTCGGAGTTTTCCTGCCCACCACCCTGTCGACATCACCAAC
TGGGAGCTCACTGAGTCCCCTGAGCACGGTTTTTCCTTCAGCACGTCTCA
TTCTTGTGGTTACCTTGCCCAAGACCCTGACGTGTTTGATGGTAAGTGTT
GGCTTTCTTGCTTTTTGGGCCTGCCGACCGAAGTGTGGCGTCATGAGGAG
CATCTAGCTAACGCCTTCGGTTACCAAACCAAGTGGGGCGTGCATGGTAA
GTACCTCCAGCGCAGGCTTCAGGTCCGCGGCATGCGTGCTGTAGTTGATC
CTGATGGTCCCATCCACGTTGAAGCGCTGTCTTGCCCCCAGTCTTGGATC
AGGCACCTGACTCTAAATGATGACGTCACCCCAGGATTTGTTCGCCTAAC
ATCCCTTCGCATTGAGCCGAACACAGAGCCTACTACTTTCCGGATCTTTC
GGTTTGGAGCGCATAAGTGGTATGGCGCTGCCGGCAAACGGGCTCGTGCT
AAGCGTGCCGCTAAAGGTGAGAAGAATTCAGCTCCCACCCCCAAGGTCGC
CCTGCCGGTCCCCACCTATGGAATTACCACCTACTCTCCACCGACAGACG
GGTCTTGTGGTTGGCATGTCCTTGCCGCCATAATGAACCGGATGATAAAT
GGTGACTTCACGTCCCCTCTGACTCCGTACAACAGACCAGAGGATGATTG
GGCTTCTGATTATGATCTTGCTCAGGCAATCCAATGTCTACAACTGCCTG

FIG. 1A

Trình tự hệ gen hoàn chỉnh của SEQ ID No. 5

>96V198c1p49 hệ gen hoàn chỉnh của đời cấy chuyền 49 (SEQ ID NO:5)

CTACCGTGGTCCGGAGTCGCGCCTGTCCCAACGCCAAGTACCTCATAAAA
CTCAACGGAGTCCACTGGGAGGTAGAGGTGAGGTCAGGAATGGCTCCTCG
CTCTCTTTCTCGTGAATGTGTGGTTGGCGTTTGCTCTGAAGGTTGTGTTG
CACCGCCTTATCCAGCAGACGGGCTACCAGAACGAGCACTCGAGGCCTTG
GCGTCTGCTTACAGGTTACCCTCTGATTGTGTTAGCTCTGGCATTGCTGA
CTTTCTTGCTAACCCACCTCCTCAGGAATTCTGGACCCTCGACAAAATGT
TGACCTCCCCGTCACCAGAGCGGTCCGGCTTCTCTAGTTTGTATAAATTA
CTATTAGAGGTTGTTCCGCAAAAATGCGGTGCCACGGAAGGGGCTTTCGT
CTATGCTGTTGAGAGAATGTTGAAGGATTGTCCGAGCTCCAAACAGGCCA
TGGCCCTTCTGGCAAAAATTAAAGTTCCATCCTCAAAGGCCCCGTCTGTG
TCCCTTGACGAGTGTTTCCCTACGGATGTTTCAGCCGACTTCGAGCCAGC
ATCTCAGGAAAGGCCCCAAAGTTCCGGTGCTGCTGTTGTCCTGTGTTCAC
CGGAAGTAAAAGAGTTCGAAGAAGCAGCCCCAGAAGAAGTTCAAGAGAGT
GGCCATAAGGTCGCCCGCTCTGCATTTGTTGCCGAGGGTCCTAACAATGA
ACAGGTACCGATGGCTGCCGGCGAGCAACTGAAGCCCGGTGGTCGCGTTT
TGGCGGTCGGGAATGCTCATGAAGGTGTTCTGGCCTCAACTAGTTCGACC
AACCTGATAGGCGGGAACTTCCCCCCTTCAGACTCCATGAAAGAGAGCAT
GCTCAATAGCTGGGAAGACGAACCACTGGATTTGTCCCAACCGGCACCAG
CTGTTACAATGACCCTTGTGAGAGAGCAAACACCCGACAACCTGGGTCCT
GATGCCGGTGCCTTCCCCGTCACCGTTCGAAAATTTGTCCCGACAGGGCC
TACACTCCGTCATGTTGAGCACTGCGGCACGGAGTCAGGCGACAGCAGTT
CGCCCTTGGATCTGTCTTATGCGCAAACCCTGGACCAGCCTTTAAATCTA
TCCTTGGCCGCTTGGCCAGTGAGGGCCACCGCGTCTGACCCTGGCTGGGT
CCACGGTAGGCGTGAGCCTATCTTTGTGAAGCCTCGAGATGCTTTCTCTG
ACGGCGATTCAGCCCTTCAGCTCGGGGAGCTGTCTGAATCCGGCTCCGTC
ATCGAGTTTGACCGGACAAGAAATGCTCCGGCGGTCGACGCCCCTGTTGA
CTTGACGGCTTCGAACAAGGCCCTCTCTGTGGTTGATCCTTTCGAATTTG
CCGAACTCAAGCGCCCGCGTTTTTCCGCACAAGCCTTAATTGACCGAGGC
GGTCCACTTGCCGACGTCCATGCAAAAATAAAGAACCGGGTATATGAACA
GTGCCTCCAGGCTTGTGAGCCTGGCAGTCGCGCAACCCCAGCCACCAAGA
AGTGGCTCGATAAAATGTGGGATAGGGTGGACATGAAGACTTGGCGCTGT
ACCTCGCAGTTCCAAGCTGGTCGCATTCTTGCGTCCCTTAAATTCCTCCC

FIG. 1B

Trình tự hệ gen hoàn chỉnh của SEQ ID No. 5

>96V198c1p49 hệ gen hoàn chỉnh của đời cấy chuyền 49 (SEQ ID NO:5)

TGACATGATTCAGGACACACCACCTCCTGTTCCTAGGAAGAATCGGGCTA
GTGATAATGCCGGCCTGAAGCGACTGGTGGCGCAGTGGGACAGAAAATTG
AGTGCAACCCCCCCTTCAAAACCGGTTGGACCAACACTTGACCAAATTGT
CCCTTCGCCCACGGGTACCCAGCAAGAAGATGTCACTTCCTCCGATGGGC
CATCTCATGCGCCGGATCCTCCTAGTCGAATGAGCACGAGTGGGAGTTGG
AAGGGCCTTGTGCTCTCTGGTACCCGTCTCGCGGGGTCCATTAGTCAGCA
TTTCATGACATGGGTTTTTGAGGTTTTCTCCCATCTCCCAGCTTTTGCAC
TCACACTTTTCTCGCCGAGGGGCTCTATGGCTTCAGGTGATTGGATGTTT
GCAGGTGTTGTTTTACTTGCTCTCCTGCTCTGTCGTTCTTACCCAGTATT
CGGGTGCCTTCCCTTATTGGGTGTCCTTTCTGGCTCTGTGCGGCGCGTTC
GTCTGGGGGTTTTTGGTTCTTGGATGGCTTTCGCTGTATTTTTATTCTCG
ACTCCATCCAACCCAGTCGGTTCTTCTTGTGACCACGATTCGCCGGAGTG
TCATGCTGAGCTTTTGGCTCTTGAGCAGCGCCAACTTTGGGAACCTGTGC
GCGGCCTTGTGGTCGGCCCCTCGGGCCTCTTATGTGTCATTCTTGGCAAG
CTACTCGGTGGGTCACGTTATCTCTGGCATGTTTTCTTACGTTTATGCAT
GCTTGCAGATTTGGCCCTTTCTCTTGTTTATGTGGTGTCCCAGGGGCGTT
GTCACAAGTGTTGGGGAAAGTGTATAAGAACAGCTCCGGCGGAGGTGGCT
CTCAATGTGTTCCCTTTCTCGCGCGCTACCCGTAGCTCTCTTGTGTCCTT
GTGCGATCGGTTCCAAGCGCCAAAAGGGGTTGATCCTGTGTACTTGGCAA
CGGGTTGGCGCGGGTGTTGGTGTGGTGAGAGTCCCATTCATCAACCGCAC
CAAAAACCCATAGCTTATGCTAATCTGGATGAAAAGAAAATATCTGCCCA
AACGGTGGTTGCTGTCCCACACGATCCCAGTCAGGCCATCAAGTGCCTGA
AAGTTTTGCAGGCGGGAGGAGCCATCGTGGACCAGCCCACACCTGAGGTC
GTCCGTGTATCCGAAATCCCCTTCTCAGCCCCATTTTTCCCAAAAGTTCC
AGTCAACCCAGATTGTAAGGTTGTGGTGGATTCGGACACTTTTGTGGCTG
CGGTTCGCTGCGGCTACTCGACAGCACAACTGGTCTTAGGCCAGGGCAAC
TTTGCCAAGTTAAATCAGATTCCCCTCAGGAGCTCTATCTCCACCAAAGC
GATTGGCGGGGCCTCTTACACCCTTGCTGTGGCTCAAGTTTCTGTGTGGA
CTCTTGTTCACTTCATCCTCGGTCTTTGGTTCACGTCACCCCAAGTGTGT
GGCCGAGGAACCTCTGACTCATGGTGTTCAAATCCTTTTTCATACCCTAC
CTATGGCCCCGGGGTTGTGTGCTCCTCTCGACTTTGTGTGTCTGCCGACG
GGGTCACTCTACCATTGTTCTCAGCCGTGGCTCAACTCTCCGGTAGAGAG

FIG. 1C

Trình tự hệ gen hoàn chỉnh của SEQ ID No. 5

>96V198c1p49 hệ gen hoàn chỉnh của đời cấy chuyền 49 (SEQ ID NO:5)

GTGGGGATTTTTATTTTGGTACTCGTCTCCTTGATGGCTTTGGCCCACCG
CATGGCCCTTAAGGCAGACATGTTGATGGTCTTTCTGGCTTTTTGTGCTT
ACGCCTGGCCCATGAGCTCCTGGTTGATTTGCTTCTTTCCTACACTCTTG
AAGTGGGTTACCCTCCACCCTCTTACTATGCTTTGGGTGCACTCATTCTT
GGTGTTTTGTCTGCCAGCAGCCGGCATCCTCTCACTAGGGATAACTGGCC
TTCTTTGGGCGGTTGGCCGCTTTACTCAGGTTGCCGGAATTATTACACCT
TATGACATCCACCAGTACACCTCTGGGCCACGTGGCGCTGCAGCTGTGGC
CACAGCCCCAGAAGGCACTTATATGGCCGCCGTCCGGAGAGCTGCTTTAA
CTGGGCGAACTTTAATCTTCACCCCGTCTGCAGTTGGATCCCTTCTCGAA
GGAGCTTTCAGGACTCATAAACCTTGTCTTAACACCGTAAATGTTGTAGG
CTCTTCCCTTGGTTCCGGCGGGGTTTTCACTATTGACGGCAGAAAAATTG
TTGTCACTGCTGCCCATGTGTTGAACGGCGACACAGCTAGAGTCACCGGC
GACTCCTACAACCGCATGCATACTTTCAAGACCAATGGTGATTATGCCTG
GTCCCATGCTGATGACTGGCGGGGCGTTGCCCCTGCGGTCAAGGTTGCGA
AGGGGTACCGCGGTCGTGCCTACTGGCAAACATCAACTGGCGTCGAACCC
GGTGTTATTGGGGAAGGGTTCGCCTTCTGTTTCACCACCTGTGGCGATTC
GGGGTCACCCGTCATCTCAGAATCCGGTGATCTCATTGGAATCCATACCG
GTTCAAATAAACTTGGTTCTGGTCTTGTGACAACCCCTGAAGGGGAGACA
TGTACCATCAAAGAAACCAAGCTCTCTGACCTCTCCAGACATTTCGCAGG
CCCAAGCGTTCCTCTTGGGGATATTAAATTGAGTCCAGCCATCATCCCTG
ATATAACATCCATTCCGAGTGACTTGGCATCGCTCCTATCCTCCGTCCCT
GTAGTGGAAGGCGGCCTCTCGACCGTTCAACTTTTGTGTGTCTTTTTCCT
ACTTTGGCGCATGATGGGCCATGCCTGGACTCCCATTGTTGCCGTGGGTT
TCTTTTTACTGAATGAAATTCTTCCAGCAGTTTTGGTCCGAGCCGTGTTT
TCTTTTGCACTTTTTGTGCTTGCATGGGCCACCCCCTGGTCTGCACAGGT
GTTGATGATTAGACTCCTCACGGCATCTCTCAACCGCAATAAGCTTTCTC
TGGCGTTCTACGCACTCGGGGGGGTCGTCGGTTTGGCCGCTGAAATCGGG
ACTTTTGCTGGCAAATTGCCTGAATTGTCTCAAACCCTTTCGACATACTG
CTTCTTACCTAGGGTCCTTGCTATGACCAGTTGTGTTCCCACCATCATCA
TTGGTGGACTCCATGCCCTCGGTGTAATTCTGTGGTTGTTCAAATACCGG
TGCCTCCACAACATGCTCGTTGGTGATGGGAGTTTTTCAAGCGCCTTCTT

FIG. 1D

Trình tự hệ gen hoàn chỉnh của SEQ ID No. 5

>96V198c1p49 hệ gen hoàn chỉnh của đời cấy chuyền 49 (SEQ ID NO:5)

CCTACGGTATTTTGCAGAGGGTAATCTCAGAAAAGGTGTTTCGCAGTCCT
GTGGCATGAATAACGAGTCCCTGACGGCTGCTTTGGCTTGCAAGTTGTCA
CGGGCTGACCTTGATTTTTTGTCCAGCTTAACGAACTTCAAGTGCTTTGT
ATCTGCTTCGAATATGAAAAATGCTGCCGGCCAGTACATTGAAGCGGCGT
ATGCCAAGGCCCTGCGCCAAGAGTTGGCGTCTCTAGTTCAGATTGACAAA
ATGAAAGGAGTTTTGTCCAAACTCGAGGCCTTTGCTGAAACAGCTACTCC
GTCCCTTGACATAGGTGACGTGATTGTTCTGCTTGGGCAACATCCACACG
GATCTATCCTTGATATTAATGTGGGGACTGAGAGGAAAACTGTGTCCGTG
CAAGAGACCCGGAGCCTAGGCGGTTCCAAATTCAGTGTTTGTACTGTCGT
GTCTAACACACCCGTGGACGCCTTAACCGGCATCCCACTCCAGACACCAA
CCCCTCTTTTTGAGAATGGTCCGCGTCATCGCAGCGAAGAAGACGATCTT
AAAGTCGAGAGGATGAAGAAACACTGTGTGCCCCTCGGCTTCCACAACAT
CAATGGCAAAGTTTACTGCAAGATTTGGGACAAGTCCACCGGTGACACCT
TTTACACGGATGATTCCCGGTATACCCACGACCATGCTCTTCAGGACAGG
TCAGCCGACTACAGAGACAGGGACTATGAGGGTGTGCAAACCGCCCCCCA
ACAGGGATTTGATCCAAAGTCTGAAACCCCTGTCGGCACTGTTGTGATCG
GCGGTATTACGTATAACAGGTATCTGACTAAGGGTAAGGAGGTTCTGGTT
CCCAAGCCCGACAATTGCCTTGAAGCTGCCAAGCTGTCTCTTGAGCAAGC
TCTCGCTGGGATGGGCCAAACTTGCGACCTTACAGCTGCCGAGGTGGAAA
AGTTAAAGCGCATCATCAGTCAACTCCAAGGTTTGACCACTGAACAGGCT
TTAAACTGCTAGCCGCTAGCGGCTTGACCCGCTGTGGCCGCGGCGGCTTA
GTTGTTACTGAAACGGCGGTAAAAATTGTAAGATACCACAGCAGAACTTT
CACCTTGGGCCCTTTGGACCTAAAAGTCGCTTCTGAGGTGGAGGTGAAGA
GATCAACTGAGCAGGGCCACGCTGTTGTGGCAAACCTATGTTCTGGTGTT
GTATTGATGAGACCTCACCCACCGTCCCTTGTTGACGTTCTTCTGAAACC
CGGACTTGACACAACACCCGGCATTCAACCGGGGCATGGGGCCGGGAATA
TGGGCGTGGACGGTTCCATTTGGGATTTTGAAACCGCACCCACAAAGGCA
GAGCTCGAGTTGTCCAGGCAAATAATCCAAGCATGTGAAGTCAGGCGCGG
GGATGCCCCGAACCTCCAACTCCCTTACAAGCTCTGTCCAGTTAGGGGGG
ATCCTGAGCGGCATAAAGGCCGCCTTATCAATACCAGGTTTGGAGATTTG
CCTTACAAGACTCCTCAAGACACCAAGTCCGCAATCCACGCGGCTTGTTG
CCTGCACCCCAACGGGGCTCCCGTGTCTGATGGTAAATCCACATTAGGCA

FIG. 1E

Trình tự hệ gen hoàn chỉnh của SEQ ID No. 5

>96V198c1p49 hệ gen hoàn chỉnh của đời cấy chuyền 49 (SEQ ID NO:5)

CCACTCTTCAACACGGTTTCGAGCTTTATGTCCCTACTGTGCCCTATAGT
GTCATGGAGTACCTTGATTCACGCCCTGACACCCCCTTTATGTGTACCAA
ACATGGTACCCCCGAGGCTGCTGCAGAGGACCTTCGAAAATATGACTTAT
CCACCCAAGGGTTTGTCCTGCCTGGGGTCCTACGTCTAGTACGCAGATTC
ATCTTTGGCCATATTGGTAAGGCACCGCCACTGTTCCTCCCATCAACTTA
TCCCGCCAAGAACTCTATGGCAGGGATCAATGGCCAGAGGTTCCCAACAA
AAGACGTTCAGAGCATACCTGAAATTGATGAAATGTGTGCCCGCGCTGTC
AAAGAGAATTGGCAAACTGTGACGCCTTGCACCCTCAAAAAACAGTATTG
TTCCAAGCCTAAAACCAGGACCATCCTTGGTACCAACAACTTCATTGCCT
TGGCTCACAGGTCGGCACTCAGCGGTGTCACTCAGGCGTTCATGAAAAAA
GCCTGGAAGTCCCCGATCGCCTTGGGGAAAAACAAATTTAAGGAGTTGCA
CTGCACTGTCGCCGGTAGGTGCCTCGAGGCCGACTTGGCCTCTTGTGATC
GCAGCACCCCGGCCATCGTGAGGTGGTTTGTTGCCAACCTCCTGTACGAA
CTTGCGGGTTGTGAAGAGTACTTGCCAAGCTATGTGCTCAATTGTTGCCA
TGACCTGGTGGCAACGCAAAATGGCGCCTTCACAAAACGTGGTGGCCTGT
CATCTGGAGACCCCGTTACCAGTGTGTCCAACACAGTGTATTCACTGGTG
ATTTATGCTCAGCACATGGTGCTGTCGGCTTTGAAGATGGGTCATGAAAT
CGGCCTCAAGTTCCTCGAGGAACAGCTTAAGTTCGAGGACCTTCTCGAAA
TCCAGCCTATGTTGGTATATTCTGATGACCTTGTATTGTATGCTGAAAGA
CCCACCTTCCCCAATTACCATTGGTGGGTTGAGCACCTTGACCTGATGCT
GGGTTTTAAGACAGACCCAAAAAAGACTGTCATAACTGACAAACCCAGCT
TTCTTGGCTGTAGAATCGAAGCGGGGCGACAACTGGTTCCCAGTCGCGAC
CGCATTCTGGCTGCTCTTGCATATCACATGAAGGCGCAGAACGCCTCAGA
GTATTATGCGTCTGCTGCCGCGATTCTGATGGACTCGTGTGCTTGCATTG
ACCACGATCCTGAGTGGTATGAGGACCTCATCTGCGGCATTGCTCGATGC
GCCCGCCAGGATGGCTACAGTTTCCCAGGCCCGCCGTTCTTCATGTCCAT
GTGGGAGAAGCTGAAAAGTCACAATGAAGGCAAGAAATTCCGCCACTGTG
GCATTTGTGACGCCAAGGCCGATCATGCGTCCGCCTGTGGGCTTGATTTA
TGTCTGTTCCACTCGCACTTTCATCAACACTGCCCTGTTACTCTGAGCTG
CGGCCATCATGCCGGTTCAAAAGAATGCCCACAGTGTCAGTCACCTGTTG
GAGCTGGTAAATCCCCCCTTGATGCAGTGCTGAAACAAATCCCGTACAAA
CCCCCTCGTCCTGTCATCATGAAGGTGGACAATAAAACAACGACCCTTGA

FIG. 1F

Trình tự hệ gen hoàn chỉnh của SEQ ID No. 5

>96V198c1p49 hệ gen hoàn chỉnh của đời cấy chuyền 49 (SEQ ID NO:5)

CCCGGGAAGGTATCAGTCCCGTCGAGGTCTTGTTGCTGTCAAGAGGGGTA
TTGCAGGCAATGAGGTTGATCTCGCTGATGGAGACTATCAGGTGGTGCCC
CTTTTGCCAACCTGCAAAGACATAAACATGGTGAAGGTGGCTGTCAATGT
GCTACTCAGCAAGTTCATAGTGGGGCCGCCAGGTTCCGGCAAGACGACCT
GGCTACTGAGTCAAGTTCAGGATGATGATGTCATCTATACACCTACCCAT
CAGACCATGTTCGACATAGTCAATGCCCTCAAAGTCTGTAGGTATTCCAT
CCCAGTGGCTTCAGGGCTCCCTTTCCCACCGCCCGCCagatctggaCCGT
GGGTTAGGCTCGTTGCTAGCGGGCACATCCCTGGCCGAATATCATACCTT
GACGAGGCCGGATATTGCAATCATCTGGATATTCTCAGACTGCTTTCTAA
GACACCTCTTGTGTGTTTGGGTGACCTTCAGCAACTTCACCCTGTCGGCT
TTGACTCTTACTGTTATGTTTTTGATCACATGCCTCATAAGCAGCTGACC
ACTATTTATAGATTTGGCCCCAATATCTGTTCTGCCATTCAACCTTGTTA
CAGGGAAAAACTCGAATCTAAGGCCAGGAACACTAGGGTGGTTTTTACTG
CCCGGCCCGTGGCTTTTGGTCAGGTGTTGACGCCATATCATAAAGACCGC
ACCGGCTCAGCTATAACCATAGATTCATCCCAGGGAGCCACCTTTGATGT
TGTGACGCTGCATTTGCCGTCGCCAGATTCCCTGAACAAATCCCGGGCTC
TTGTAGCTATCACTCGGGCAAGGCATGGGTTGTTCATCTATGACCCTCAT
AACCAACTCCGGAAGTTTTTCAACTTAACACCTGAGCGCACTGATTGCAA
CCTCGTGTTCAACCGCGGGGACGAGTTGGTAGTTTTGAATGCAGATAATG
CAGTCACGACTGTGGCTAAGGTTCTGGAGGCGGGCCCGTCTCGGTTTCGA
GTATCAGATCCAAGGTGCAAGTCTCTTTTAGCCGCTTGCTCGGCCAGTCT
GGAAGGAGGCTGCATGCCACTGCCGCAAGTGGCACATAATCTGGGGTTTT
ACTTCTCTCCAGATAGTCCAGCATTTGCACCTCTGCCAAAAGAGCTGGCA
CCACATTGGCCGGTTGTTACTAGTCAGAACAACCAGGCATGGCCCGACCG
ACTTGTCGCTAGTATGCGGCCAGTTGATGCCCGCTACAGCAAGCCTATGG
TCGGTGCAGGGTATGTGGTTGGGCCATCCACTTTCCTTGGCACTCCTGGT
GTGGTGTCATACTATCTCACGCTGTACATCAGGGGTGAGCCCCAGGCCTT
GCCGGAGACACTCGTCTCAACGGGACGTATAGCTACTGATTGTCGAGAGT
ATCTCGACGCAGCTGAGGAAGAAGCAGCTAAAGAACTCCCTCACGCATTC
ATTGGCGATGTCAAAGGTACTACAGTGGGGGGGTGTCACCACATTACGTC
AAAATACCTTCCCAGGTCCTTGCCCAAGGACTCCGTTGCCGTGGTCGGAG
TGAGTTCGCCCGGCAAGGCTGCCAAAGCCGTGTGTACTCTCACCGATGTG

FIG. 1G

Trình tự hệ gen hoàn chỉnh của SEQ ID No. 5

>96V198c1p49 hệ gen hoàn chỉnh của đời cấy chuyền 49 (SEQ ID NO:5)

TATCTTCCCGAGCTCCGGCCATATTTGCAACCGGAAACAGCATCGAAATG
CTGGAAACTTAAACTAGACTTCAGGGATGTCAGACTGATGGTCTGGAAAG
GAGCCACCGCATATTTCCAACTGGAGGGGCTCACATGGTCAGCGCTGCCC
GACTATGCCAGGTTCATTCAGCTACCAAAAGATGCCGTTGTGTACATTGA
TCCGTGCATAGGACCGGCAACAGCCAACCGTAAGGTTGTGAGAACTACAG
ATTGGCGAGCTGACCTGGCAGTGACACCGTACGACTACGGTGCTCAGAGC
ATTTTGACTACAGCCTGGTTCGAGGACCTTGGGCCGCAGTGGAAGATTTT
AGGGTTGCAACCCTTCAAGCGGGCATTTGGCTTTGAAAACACTGAGGATT
GGGCGATCCTTGCACGTCGCATGAACGACGGCAAGGACTACACTGACTAT
AACTGGAATTGTGTTCGACAACGCCCACATGCCATCTACGGACGTGCCCG
TGACCATACGTATCACTTTGCCCCTGGCACTGAACTGCAAGTAGAGCTAG
GTAAACCTCGGCTACCGCCTGAGCAAGTACCGTGAATCTAGAGTGATGCA
ATGGGGTCACTGTGGAGTAAAATCAGTCAACTGTTCGTGGATGCCTTCAC
TGAGTTCCTTGTTAGTGTGGTTGATATTGTCATCTTCCTTGCCATACTGT
TTGGGTTCACCGTTGCAGGGTGGTTACTGGTCTTTTTTCTCAGAGTGGTT
TGCTCCGCGCTTCTCCGTTCGCGCTCTGCCATTCACTCTTCCGAACTATC
GAAGGTCCTATGAGGGCTTGCTACCTAATTGCAGACCGGATGTTCCACAA
TTCGCATTCAAGCACCCATTGGGTATGTTTTGGCACATGCGAGTTTCCCA
CTTAATTGACGAAATGGTCTCTCGCCGCATTTATCAGACCATGGAACATT
CAGGTCAAGCGGCCTGGAAGCAGGTGGTTAGTGAAGCTACTCTCACAAGA
CTGTCAAAGCTCGACATAGTTCTCCACTTCCAACACCTGGCCGCAATAGA
GGCGGATTCTTGCCGCTTCCTCAGCTCACGACTTGTGATGCTGAAAAATC
TTGCTGTTGGCAATATGAGCCTACAGTACAACACCACGTTGGACCGCGTT
GAGCTCATCTTCCCAACACCAGGTACGAGGCCCAAATTGACCGATTTTAG
ACAATGGCTCGTCAGTGTGCACGCTTCTATTTTTTCCTCTGTGGCCTCAT
CAGTTACCTTGTTCATAGTGCTTTGGCTTCGAATTCCAGCTCTACGCTAT
GTTTTTGGTTTCCATTGGCCCACGGCAACACATCATTCGAGCTAACCATC
AATTACTCTATATGTAAGCCCTGTCTCACCAGTCAAGCGGCTCGACAAAG
GCTCGAACCCGGTCGCAACATGTGGTGCAAAATAGGGCACACCACGTGTG
AGGAGCGTGACCATGATGAGTTGTCAATGACCATTCCGTCCGGGTACGAT
AACCTCAAACTTGAGGGTTATTACGCTTGGCTGGCTTTTTTGTCCTTTTC
TTACGCAGCCCAATTTCATCCAGAGTTGTTCGGAATAGGGAATGTGTCAC

FIG. 1H

Trình tự hệ gen hoàn chỉnh của SEQ ID No. 5

>96V198c1p49 hệ gen hoàn chỉnh của đời cấy chuyền 49 (SEQ ID NO:5)

GCGTCTTCGTGGATAAACGGCACCAGTTCATCTGTGCCGAGCACGACGGA
CAAAATTCAACCGTATCCACCGAACATAATATTTCCGCATTGTATGCGGC
GTACTACCACCACCAGGTAGACGGGGGCAATTGGTTCCACCTGGAATGGC
TGCGGCCTTTCTTTTCCTCCTGGCTAGTACTCAATATTTCATGGTTTCTG
AGGCGTTCGCCTGCAAGCCCTGTTTCTCGACGCATTTATCAGATATTGAG
ACCAACACGACCGCGGCTGCCGGTTTCATGGTCCTTCAGGACATCAACTG
TTTCCACAGTGGCTCAGAGGCACAAACGACTGGTCCCATCAGAAAGTCGT
CCCAATGCCGTGAAGCCGTCGGCACTCCCCAGTACATCAAGATAACGGCC
AATCTGACCGACGAATCATACTTGTACAACGCGGACTTGCTGATGCTTTC
TGCGTGCCTTTTCTACGCCTCAGAGATGAGCGAGAAAGGCTTTAAAGTCA
TTTTTGGGAATGTCTCTGGCGTTGTCTCCGCTTGTGTCAATTTTACAGAT
TATGTGGCCCATCTGACCCAACATACCCAGCAGCATCATTTGGTAACCAA
TCACATTCGGTTGCTACATTTCCTGACACCATCAGCGATGAGGTGGGCTA
CAACCATTGCTTGTTTGTTCGCCATTCTCTTGGCGATATGAGATGTTCTC
ACAAATCGGGGTGTTTCTTGACTCCGCACTCTTGCTTTTGGTGGTTTTTT
TTGCTGTGTACCGGCTTGTCCTGGTCCTTTGCCGATGGCAACGGCGACAG
CTCGACATACCAATATATATATAACTTGACGATATGCGAGCTGAATGGGA
CCGAATGGCTGTCTGACCATTTTAATTGGGCAGTCGAGACTTTTGTGCTC
TACCCAGTGGCGACTCATATCCTCTCACTGGGTTTCCTCACGACAAGTCA
TTTCCTTGATGCGTTCGGTCTTGGAGCTGTGTCAATTACAGGGTTTTGTG
GCGGGCGGTACGTGCTCAGCAGCGTGTACGGCGCTTGTGCACTAGCAGCG
CTCGTATGTTTTGTTATCCGTGCTGCCAAAAATTGTATGGCTTGCCGCTA
TGCTCGTACCCGGTTTACCAACTTCATTGTGGATGACCGGGGGAGAATCC
ATCGGTGGAGGTCTCCAATAGTGGTGGAAAAATTAGGTAAAGCTGACGTC
GGCGGCGACCTTGTCACCATCAAACATGTCATCCTCGAAGGAGTCAAAGC
TCAACCCTTGACGAGGACTTCGGCCGAGCAATGGGAGGCCTAGATAATTT
CTGCAACGATCCCACCGCCGCACAAAAGCTTGTGCTAGCCTTTAGCATCA
CGTATACACCCATCATGATATACGCCCTTAAGGTGTCACGCGGCCGACTC
TTGGGGTTGTTGCACATCTTGATATTTCTGAACTGTTCTTTCACGTTCGG
ATACATGACATATATGCATTTTGAATCCACCAACCGTGTCGCGCTTACCA
TGGGGGGCGTTGTCGCCCTTCTGTGGGGCGTTTATAGTTTCATAGAGTCA
TGGAAGTTTATCACTTCCAGATGCAGATTGTGTTGCCTAGGCCGGCGATA

FIG. 1I

Trình tự hệ gen hoàn chỉnh của SEQ ID No. 5

>96V198c1p49 hệ gen hoàn chỉnh của đời cấy chuyền 49 (SEQ ID NO:5)

CATTCTGGCCCCTGCCCACCACGTAGAAAGTGCTGCAGGCCTCCATCCGA
TCCCAGCGTCTGGTAACCAAGCATACGCTGTGAGAAAGCCCGGACTAACA
TCAGTGAACGGCACTCTGGTACCAGGACTTCGAGGCCTCGTGCTGGGCGG
CAAACGAGCTGTTAAACGAGGAGTGGTTAACCTCGTCAAGTATGGCCGGT
AAAAACCAGAGCCAGAAGAAAAAGAAAAATCCAGCTCCAATGGGGAATGG
CCAGTCAGTCAATCAACTGTGCCAGCTGCTGGGCACAATGATAAAGTCCC
AGCGCCAGCGACCCAGGGGAGGACAGGCTAAAAAGAAAAAGCCTGAGAAG
CCACATTTCCCCCTGGCTGCTGAAGATGACGTCCGGCACCATCTCACCCA
GACCGAGCGCTCCCTTTGCTTGCAATCGATCCAGACGGCTTTTAATCAAG
GCGCAGGAACTGCGTCGCTTTCATCCAGCGGGAAGATCGGTTTTCAGGTT
GAGTTTATGCTACCGGTTGCTCATACAGTGCGCCTGATTCGCGTGACTTC
TACATCCGCCGGTCAGGATGCAAATTAATTTGATAGTCAGGTGAATGGCC
GCGATTGGCGTGTGGCCTCTGAGTCACCTATTCAATTAGGGCGATCACAT
GGGGGTCAGACTTAATTAGGCAGGAACCATGTGACCGAAATT

FIG. 1J