



(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)



1-0044551

(51)⁷ C12Q 1/68

(13) B

(21) 1-2013-02272

(22) 29/12/2005

(62) 1-2007-01531

(86) PCT/US2005/047596 29/12/2005

(87) WO 2006/072065 06/07/2006

(30) 60/640,510 30/12/2004 US; 11/034,797 13/01/2005 US; 11/319,975 29/12/2005 US

(45) 25/04/2025 445

(43) 25/09/2013 306A

(71) Boehringer Ingelheim Animal Health USA Inc. (US)

3239 Satellite Blvd., Duluth, GA 30096, United States of America

(72) EICHMEYER, Mark (US); NITZEL, Greg (US); SCHAEFFER, Merrill (US).

(74) Công ty TNHH Tư vấn đầu tư và chuyển giao công nghệ (INVESTCONSULT)

(54) CHẾ PHẨM TẠO MIỄN DỊCH PCV2

(21) 1-2013-02272

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp cải tiến nhằm thu hồi protein được biểu hiện bởi khung đọc mở 2 từ virus gây ra hội chứng gây còm sau thời kỳ dứt sữa loại 2 ở lợn. Nhìn chung, phương pháp bao gồm các bước chuyển nhiễm virus tái tổ hợp chứa khung đọc mở 2 viết mã các trình tự vào các tế bào có trong môi trường sinh trưởng, làm cho virus biểu hiện khung đọc mở 2, và thu hồi protein biểu hiện trong dịch nổi. Việc thu hồi này nên diễn ra trong xấp xỉ 5 ngày sau khi gây nhiễm các tế bào để cho phép số lượng vừa đủ của protein tái tổ hợp được biểu hiện và thoát ra khỏi vào môi trường sinh trưởng. Các phương pháp này không tốn nhiều chi phí và thời gian để phân tách và thu hồi protein tái tổ hợp từ trong các tế bào.

CÁC ĐƠN LIÊN QUAN

Đơn sáng chế này bảo hộ lợi ích của đơn số 60/640,510 nộp ngày 30/12/2004, và đơn số 11/034,737 nộp ngày 13/01/2005, do đó tài liệu và nội dung của các đơn này được tập hợp ở phần tham khảo.

DANH SÁCH TRÌNH TỰ

Đơn sáng chế này bao gồm một danh sách trình tự được in trên khổ giấy và có thể đọc trên máy vi tính, do đó tài liệu và nội dung của trình tự này được tập hợp ở phần tham khảo.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Một khía cạnh của sáng chế đề cập đến sự thu hồi của một protein biểu hiện ở khung đọc mở 2 (ORF2) của virus gây ra hội chứng gây còm sau thời kỳ dứt sữa loại 2 ở lợn virus gây ra hội chứng gây còm sau thời kỳ dứt sữa loại 2 ở lợn (PCV2). Cụ thể hơn, protein này là một protein tái tổ hợp được biểu hiện bằng một virus chuyển nhiễm chứa các trình tự mã hoá tái tổ hợp cho virus gây ra hội chứng gây còm sau thời kỳ dứt sữa loại 2 ở lợn, khung đọc mở 2. Cụ thể hơn, virus chuyển nhiễm này gây nhiễm các tế bào trong môi trường sinh trưởng và protein biểu hiện ở khung đọc mở 2 được thu hồi trong dịch nổi, hơn là từ bên trong của các tế bào. Cụ thể hơn nữa, phương pháp này bao gồm các bước sao chép quá mức gen của khung đọc mở 2 từ virus gây ra hội chứng gây còm sau thời kỳ dứt sữa loại 2 ở lợn, cấy phần sao chép quá mức này vào một vật truyền đầu tiên, cắt bỏ phần khung đọc mở 2 từ vật truyền đầu tiên và cấy nó vào một vật truyền vận chuyển, đồng chuyển nhiễm vật truyền vận chuyển với một vật truyền virus vào các tế bào trong môi trường sinh trưởng, làm cho các tế bào bị nhiễm bởi vật truyền virus và do đó biểu hiện khung đọc mở 2, và thu hồi protein tái tổ hợp được mã hóa bởi khung đọc mở 2 trong dịch nổi.

Ở một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến một chế phẩm tạo miễn dịch có tác dụng đem lại một phản ứng miễn dịch với PCV2, và các phương pháp điều chế các chế phẩm tạo miễn dịch này. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến một chế phẩm miễn dịch có tác dụng tạo

ra một phản ứng miễn dịch bảo vệ động vật dùng chế phẩm và giảm, hoặc làm giảm sự trầm trọng của các triệu chứng lâm sàng liên quan đến nhiễm PCV2. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến một chế phẩm miễn dịch được điều chế từ protein có tác dụng bảo vệ khỏi bị nhiễm PCV2. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến một chế phẩm miễn dịch bao gồm ORF2 của PCV2, trong đó áp dụng các kết quả của PCV2-ORF2 trong việc bảo vệ khỏi bị nhiễm PCV2. Cụ thể nhất, sáng chế đề cập đến một chế phẩm miễn dịch có tác dụng miễn dịch đối với lợn dùng chế phẩm miễn dịch, và trong đó chế phẩm bao gồm protein được biểu hiện bởi ORF2 của PCV2.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virus gây ra hội chứng gây còm sau thời kỳ dứt sữa loại 2 ở lợn (PCV2) là một virus dạng ADN không có thành tế bào, nhỏ (đường kính 17-22 nm), có hai mươi mặt, chứa một bộ gen dạng vòng sợi đơn. PCV2 chiếm xấp xỉ 80% đồng nhất trình tự với virus gây ra hội chứng gây còm sau thời kỳ dứt sữa loại 1 ở lợn (PCV1). Tuy nhiên, trái với PCV1, thường là không độc hại, lợn bị nhiễm PCV2 thường có một hội chứng được gọi là hội chứng gây còm sau thời kỳ dứt sữa (PMWS). PMWS được thể hiện lâm sàng qua sự gây còm, sự tái đi của da, thể trạng còi cọc, khó thở, tiêu chảy, chứng vàng da, và bệnh vàng da. Trong một vài con lợn bị nhiễm bệnh, có thể có tất cả các triệu chứng trên trong khi những con lợn khác chỉ có một hoặc hai triệu chứng này. Trong khi mổ để khám nghiệm, cũng thấy xuất hiện những tổn thương vi mô và vĩ mô trên các mô và các cơ quan khác nhau, các cơ quan bạch huyết là nơi xuất hiện nhiều tổn thương nhất. Có thể thấy một sự tương quan chặt chẽ giữa lượng axit nucleic PCV2 hoặc kháng thể với mức độ trầm trọng của tổn thương bạch huyết vi mô. Tỷ lệ tử vong ở lợn bị nhiễm PCV2 có thể lên đến 80%. Ngoài PMWS, PCV2 cùng với một vài bệnh lây nhiễm khác bao gồm bệnh giả dại, hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS), bệnh Glasser, bệnh viêm màng não do khuẩn cầu trình tự gây ra, bệnh do vi khuẩn *Salmonella* gây ra, bệnh do trực khuẩn *coli* gây ra sau khi cai sữa, bệnh sa gan do chế độ dinh dưỡng gây ra, và bệnh viêm cuống phổi dạng mưng mủ.

Protein mã hóa bởi khung đọc mở 2 (ORF2) của PCV2, có phân tử lượng xấp xỉ 30 kDa khi chạy trên chất gel SDS-PAGE, trước đây được dùng làm một thành phần kháng thể trong vắc xin cho PCV2. Các phương pháp đặc trưng để thu được ORF2 để sử dụng

trong các vắc xin này thường bao gồm việc sao chép quá mức ADN của PCV2 mã hóa cho ORF2, chuyển nhiễm vật truyền virus với ADN của ORF2, gây nhiễm các tế bào với vật truyền virus chứa ADN của ORF2, cho virus biểu hiện protein ORF2 trong tế bào, và chiết tách protein ORF2 ra khỏi tế bào qua việc phân giải tế bào. Các quy trình này thường tiến hành trong khoảng 04 ngày sau khi các tế bào bị nhiễm bệnh qua vật truyền virus. Tuy nhiên, các quy trình này có nhược điểm là việc chiết tách protein ra khỏi tế bào vừa tốn kém vừa mất thời gian. Ngoài ra, lượng ORF2 thu hồi từ các tế bào là không nhiều; do đó, cần một lượng lớn tế bào bị gây nhiễm bởi một lượng lớn các vật truyền virus để thu được lượng protein tái tổ hợp vừa đủ để dùng làm vắc xin và các thuốc tương tự.

Các cách giải quyết hiện nay nhằm tạo miễn dịch đối với PCV2 bao gồm các vắc xin được điều chế từ ADN, như các vắc xin được mô tả trong tài liệu sáng chế số U.S. 6,703,023. Tuy nhiên, các vắc xin này không có tác dụng tạo ra miễn dịch đối với bệnh nhiễm PCV2 và các dấu hiệu lâm sàng đi kèm.

Do đó, trong lĩnh vực này có nhu cầu cần tạo ra phương pháp để thu được protein ORF2, mà không cần chiết tách protein ORF2 ra khỏi các tế bào nhiễm bệnh. Còn có nhu cầu nữa là tạo ra các phương pháp để thu được protein ORF2 tái tổ hợp với lượng đủ để điều chế các chế phẩm vắc xin hữu hiệu. Còn có nhu cầu nữa là tạo ra các phương pháp để thu được protein ORF2 mà không cần các phương pháp phức tạp và tốn nhiều công sức như cách thức chiết tách protein ORF2 ra khỏi tế bào hiện nay. Cuối cùng, liên quan đến các chế phẩm, trong lĩnh vực này cần tạo ra chế phẩm tạo miễn dịch có tác dụng miễn dịch đối với bệnh nhiễm PCV2 và làm giảm sự trầm trọng của hoặc ngăn chặn các dấu hiệu lâm sàng đi kèm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế này nhằm khắc phục các vấn đề vốn có trong tình trạng kỹ thuật đã biết nêu trên và tạo ra một bước tiến rõ ràng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Cụ thể là, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phương pháp cải tiến nhằm điều chế và/hoặc thu hồi protein ORF2 tái tổ hợp của PCV2, i) bằng cách cho các tế bào dễ bị tổn thương bị nhiễm với một vật truyền virus tái tổ hợp chứa các trình tự mã ADN ORF2 của PCV2, trong đó protein ORF2 được thể hiện bởi vật truyền virus tái tổ hợp, và ii) sau đó thu hồi ORF2 trong

dịch nổi. Tác giả sáng chế phát hiện ra rằng ORF2 được giải phóng trong dịch nổi với lượng lớn nếu việc lây nhiễm các tế bào và việc ủ bệnh sau đó của các tế bào bị lây nhiễm được tiến hành tăng tiến hơn quy trình thu hồi ORF2 của PCV2, mà chiết tách ORF2 của PCV2 từ bên trong các tế bào. Tác giả sáng chế còn bất ngờ phát hiện ra rằng protein ORF2 của PCV2 có khả năng chống lại sự thoái hoá kiểu gốc bên ngoài các tế bào điều chế. Hai phát hiện này cùng cho phép thu hồi protein ORF2 của PCV2 với lượng lớn từ dịch nổi của môi trường nuôi cấy tế bào bị nhiễm các vật truyền virus tái tổ hợp chứa ADN ORF2 của PCV2 và biểu hiện protein ORF2 của PCV2. Một lượng lớn protein ORF2 của PCV2 có nghĩa là khoảng hơn 20 $\mu\text{g/mL}$ dịch nổi, tốt hơn là khoảng hơn 25 $\mu\text{g/mL}$, tốt hơn nữa là khoảng 30 $\mu\text{g/mL}$, thậm chí tốt hơn là khoảng 40 $\mu\text{g/mL}$, thậm chí tốt hơn nữa là khoảng 50 $\mu\text{g/mL}$, thậm chí tốt hơn nữa là khoảng 60 $\mu\text{g/mL}$, thậm chí tốt hơn nữa là khoảng 80 $\mu\text{g/mL}$, thậm chí tốt hơn nữa là khoảng 100 $\mu\text{g/mL}$, thậm chí tốt hơn nữa là khoảng 150 $\mu\text{g/mL}$, tốt nhất là khoảng hơn 190 $\mu\text{g/mL}$. Các tỷ lệ biểu hiện này cũng có thể đạt được, ví dụ như bằng các phương pháp được mô tả trong các Ví dụ từ 1 đến 3.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là một biểu đồ dòng sơ đồ hình thành baculovirus tái tổ hợp của ORF2 của PCV2; và

Fig. 2a và Fig. 2b là biểu đồ dòng sơ đồ làm thế nào để điều chế một chế phẩm theo sáng chế.

Mô tả chi tiết sáng chế

Môi trường cấy tế bào được ưa dùng có lượng tế bào nằm trong khoảng $0,3 - 2,0 \times 10^6$ tế bào/mL, tốt hơn là nằm trong khoảng từ $0,35 - 1,9 \times 10^6$ tế bào/mL, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ $0,4 - 1,8 \times 10^6$ tế bào/mL, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ $0,45 - 1,7 \times 10^6$ tế bào/mL, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ $0,5 - 1,5 \times 10^6$ tế bào/mL. Các tế bào được ưa dùng có thể được xác định bởi các chuyên gia trong lĩnh vực này. Các tế bào được ưa dùng là các tế bào dễ bị tổn thương với một vật truyền virus tái tổ hợp thích hợp, chứa một ADN ORF2 của PCV2 và biểu hiện protein ORF2 PCV2. Tốt hơn là, các tế bào này là các tế bào côn trùng, và tốt hơn nữa, các tế bào bao gồm các tế bào côn trùng

được bán dưới nhãn hiệu tế bào côn trùng Sf⁺ (Protein Sciences Corporation, Meriden, CT).

Môi trường sinh trưởng thích hợp cũng có thể được xác định bởi các chuyên gia sáng chế với một môi trường sinh trưởng ưa dùng là môi trường tế bào côn trùng không có huyết thanh như Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) và các môi trường cùng loại. Các vật truyền virus hay dùng bao gồm baculovirus như BaculoGold (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), đặc biệt nếu các tế bào điều chế là các tế bào côn trùng. Mặc dù hệ thống biểu hiện baculovirus được ưu tiên dùng, nhưng các chuyên gia sáng chế hiểu rằng các hệ thống biểu hiện khác vẫn được dùng cho các mục đích của sáng chế, cụ thể là sự biểu hiện ORF2 của PCV2 ra bên ngoài của môi trường tế bào. Các hệ thống biểu hiện khác như vậy có thể cần phải sử dụng một trình tự dấu hiệu để biểu hiện ORF2 vào môi trường. Tác giả sáng chế bất ngờ nhận ra rằng khi ORF2 được tạo ra bởi một hệ thống biểu hiện baculovirus, thì không cần bất kỳ một trình tự dấu hiệu nào hoặc một sự biến đổi thêm nào để thể hiện ORF2 vào môi trường. Tác giả sáng chế tin rằng protein này có thể độc lập tạo ra các phần tử virus (Journal of General Virology Vol. 81, từ trang 2281-2287 (2000) và thoát ra ngoài môi trường. Vật truyền virus tái tổ hợp chứa các trình tự ADN ORF2 của PCV2 có bội nhiễm (MOI) ưu tiên nằm trong khoảng từ 0,03 – 1,5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,05 – 1,3, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,09 – 1,1, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,1 – 1,0, khi dùng để gây nhiễm các tế bào để bị tổn thương. Tốt hơn là các MOI đề cập ở trên có thể hiểu là 01 mL chất lưu môi trường tế bào. Tốt hơn là, phương pháp mô tả ở đây bao gồm việc gây nhiễm $0,35 - 1,9 \times 10^6$ tế bào/mL, tốt hơn là khoảng từ $0,4 - 1,8 \times 10^6$ tế bào/mL, thậm chí tốt hơn là khoảng $0,45 - 1,7 \times 10^6$ tế bào/mL, và tốt nhất là khoảng $0,5 - 1,5 \times 10^6$ tế bào/mL với một vật truyền virus tái tổ hợp chứa một ADN ORF2 của PCV2 và biểu hiện protein ORF2 của PCV2 có một MOI (bội nhiễm) nằm trong khoảng từ 0,03 – 1,5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,05 – 1,3, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,09 – 1,1, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,1 – 1,0.

Các tế bào bị nhiễm bệnh sau đó được ủ trong một thời gian tối đa là 10 ngày, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 - 10 ngày, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 4 - 9 ngày, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 5 - 8 ngày. Điều kiện ủ ưa dùng bao gồm nhiệt độ nằm trong khoảng từ 22 - 32°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 24 - 30°C, tốt hơn nữa là nằm

trong khoảng từ 25 - 29°C, thậm chí tốt hơn là nằm trong khoảng từ 26 - 28°C, và tốt nhất là khoảng 27°C. Tốt hơn là, tế bào Sf+ được quan sát sau khi ghép để có những thay đổi đặc trưng do baculovirut đem lại. Việc quan sát này có thể bao gồm việc kiểm tra xu hướng mật độ tế bào và kiểm tra sự giảm khả năng sống sót trong giai đoạn sau khi nhiễm bệnh. Tác giả sáng chế thấy rằng độ chuẩn virut tối đa được quan sát từ 3 - 5 ngày sau khi nhiễm bệnh và sự phóng thích ORF2 tối đa từ các tế bào ra bên ngoài đạt được trong khoảng từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 8, và/hoặc khi khả năng sống sót của tế bào giảm xuống dưới 10%.

Vì vậy, một khía cạnh của sáng chế đưa ra một phương pháp cải tiến để điều chế và/hoặc thu hồi protein ORF2 tái tổ hợp của PCV2, tốt hơn là với một lượng mô tả ở trên, bằng cách i) gây nhiễm một số tế bào dễ bị tổn thương (xem ở trên) trong khi cấy với một vật truyền virut tái tổ hợp với MOI xác định ở trên, ii) biểu hiện protein ORF2 của PCV2 bằng vật truyền virut tái tổ hợp, và iii) sau đó thu hồi ORF2 của PCV2 trong dịch nổi tế bào thu được trong khoảng từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 8 sau khi nhiễm bệnh và/hoặc khả năng sống sót của tế bào giảm xuống dưới 10%. Tốt hơn là, vật truyền virut tái tổ hợp là một baculovirut tái tổ hợp chứa các trình tự mã ADN ORF2 của PCV2 và các tế bào là các tế bào Sf+. Ngoài ra, tốt hơn là việc cấy vi khuẩn được kiểm tra định kỳ để có những bằng chứng nhiễm bệnh vĩ mô và vi mô hoặc để có những thay đổi đột biến trong hình thái học của tế bào trong giai đoạn sau nhiễm bệnh. Bất kỳ một việc cấy vi khuẩn nào có bằng chứng nhiễm bệnh nên được loại bỏ. Tốt hơn là, protein ORF2 tái tổ hợp biểu hiện đi vào môi trường sinh trưởng xung quanh nhờ các tế bào mà vẫn giữ khả năng sống sót của tế bào. ORF2 sau đó được thu lại ở bên ngoài xung quanh tế bào hơn là từ chính các tế bào.

Tốt hơn là, quá trình thu lại bắt đầu với việc phân chia các mảnh vụn của tế bào từ ORF2 thể hiện trong môi trường qua một bước phân chia. Các bước phân chia ra dùng bao gồm lọc, ly tâm với tốc độ tối đa khoảng 20,000xg, ly tâm lưu lượng liên tục, phân chia bằng phép ghi sắc sử dụng trao đổi ion hoặc lọc gel, và các phương pháp ái lực miễn dịch thông thường. Các phương pháp được các chuyên gia sáng chế biết đến, ví dụ qua tài liệu (Harris và Angel (eds.), Các phương pháp tinh chế protein – một phương pháp giải quyết thực tế, IRL press Oxford 1995). Các phương pháp phân chia hay dùng nhất bao gồm phương pháp ly tâm với tốc độ tối đa khoảng 20,000xg và phương pháp lọc. Các phương pháp lọc hay dùng bao gồm vi lọc và lọc lưu lượng tiếp tuyến (hoặc lưu lượng chéo) bao

gồm vi lọc lọc sợi rỗng. Trong số các phương pháp này, vi lọc hay được dùng. Kích thước lỗ hay dùng cho phương pháp vi lọc nằm trong khoảng từ $0,30 - 1,35 \mu\text{m}$, tốt hơn là nằm trong khoảng từ $0,35 - 1,25 \mu\text{m}$, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ $0,40 - 1,10 \mu\text{m}$, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ $0,45 - 1,0 \mu\text{m}$. Tác giả sáng chế tin rằng bất kỳ một màng lọc thông thường nào cũng dùng được cho các mục đích của sáng chế và màng polyetesulfon thì hay được dùng hơn. Tất cả các axit nucleic khối lượng thấp được loại bỏ trong bước lọc này.

Vì vậy, một khía cạnh khác của sáng chế đưa ra một phương pháp cải tiến nhằm điều chế và/hoặc thu hồi protein ORF2 tái tổ hợp của PCV2, tốt hơn là với một lượng mô tả ở trên, bằng cách i) gây nhiễm một số tế bào dễ bị tổn thương (xem ở trên) trong khi cấy với một vật truyền virus tái tổ hợp với một MOI xác định ở trên, ii) biểu hiện protein ORF2 của PCV2 bằng vật truyền virus tái tổ hợp, iii) thu hồi ORF2 của PCV2 trong dịch nổi tế bào thu được trong khoảng thời gian từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 8 sau khi nhiễm bệnh và/hoặc khả năng sống sót của tế bào giảm xuống dưới 10%, và, iv) phân chia các mảnh vụn của tế bào từ ORF2 biểu hiện của PCV2 qua bước phân chia. Tốt hơn là, vật truyền virus tái tổ hợp là một baculovirus chứa các trình tự mã ADN của ORF2 và các tế bào là tế bào SF+. Các bước phân chia hay dùng là các bước mô tả ở trên. Hay dùng nhất là phương pháp vi lọc sử dụng một màng có kích thước lỗ nằm trong khoảng từ $0,30 - 1,35 \mu\text{m}$, tốt hơn là nằm trong khoảng từ $0,35 - 1,25 \mu\text{m}$, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ $0,40 - 1,10 \mu\text{m}$, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ $0,45 - 1,0 \mu\text{m}$.

Để thu hồi ORF2 của PCV2 dùng trong chế phẩm tạo miễn dịch hoặc chế phẩm miễn dịch như một vắc xin, việc dùng bước làm bất hoạt được ưu tiên để làm bất hoạt của vật truyền virus. "Chế phẩm tạo miễn dịch hoặc chế phẩm miễn dịch" có nghĩa là một chế phẩm vật chất chứa ít nhất một kháng thể tạo ra một phản ứng miễn dịch trong vật chủ của tế bào và/hoặc phản ứng miễn dịch trung gian kháng thể với chế phẩm hoặc vắc xin đang quan tâm. Thông thường, "phản ứng miễn dịch" bao gồm nhưng không hạn chế với một hoặc nhiều tác dụng sau: điều chế hoặc làm bất hoạt kháng thể, tế bào B, tế bào T trợ giúp, tế bào T ức chế, và/hoặc tế bào T độc tế bào và/hoặc tế bào T yd, nói riêng đến một kháng thể hoặc nhiều kháng thể có trong các chế phẩm hoặc vắc xin đang quan tâm. Tốt hơn là, vật chủ sẽ có phản ứng miễn dịch chữa bệnh hoặc phòng ngừa do vậy sẽ tăng sức đề kháng đối

với bệnh nhiễm mới và/hoặc giảm mức trầm trọng lâm sàng của bệnh. Cách phòng ngừa này sẽ được chứng minh bằng việc giảm hoặc không có triệu chứng thường xuất hiện ở vật chủ bị nhiễm bệnh, thời gian thu hồi nhanh hơn và/hoặc độ chuẩn virus thấp hơn ở vật chủ bị nhiễm bệnh. Vì vậy, sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều chế và/hoặc thu hồi protein ORF2 tái tổ hợp của PCV2, tốt hơn là với một lượng mô tả ở trên, bằng cách i) gây nhiễm một số tế bào dễ bị tổn thương (xem ở trên) trong khi cấy với một vật truyền virus tái tổ hợp với một MOI như xác định ở trên, ii) biểu hiện protein ORF2 của PCV2 bằng một vật truyền virus tái tổ hợp, iii) thu hồi ORF2 của PCV2 trong dịch nổi tế bào thu được trong khoảng thời gian từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 8 sau khi nhiễm bệnh và/hoặc khả năng sống sót của tế bào giảm xuống dưới 10%, iv) phân chia các mảnh vụn của tế bào từ ORF2 biểu hiện của PCV2 qua một bước phân chia, và v) làm bất hoạt vật truyền virus tái tổ hợp.

Tốt hơn là, việc làm bất hoạt được thực hiện trước hoặc sau bước lọc, sau bước lọc là thời gian hay được dùng để làm bất hoạt. Bất kỳ một phương pháp làm bất hoạt thông thường nào cũng có thể được dùng cho các mục đích của sáng chế. Vì vậy, làm bất hoạt có thể được thực hiện bằng xử lý hoá học và/hoặc xử lý vật lý. Ở các dạng hay dùng, khối lượng chất lưu thu được được xác định và nhiệt độ nằm trong khoảng từ 32 - 42°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 34 - 40°C, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 35 - 39°C. Các phương pháp làm bất hoạt hay dùng bao gồm việc cho thêm etylenimin nhị phân đóng vòng (BEI), tốt hơn là với nồng độ nằm trong khoảng từ 1 đến 20 mM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 10 mM, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 2 đến 8 mM, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3 đến 7 mM, tốt nhất là khoảng 5 mM. Ví dụ, việc làm bất hoạt bao gồm việc thêm vào một dung dịch 2-bromoetylenamin hydrobromit, tốt hơn là khoảng 0,4M, được đóng vòng thành 0,2M etylenimin nhị phân (BEI) trong 0,3N NaOH, vào chất lưu để tạo ra một nồng độ cuối cùng khoảng 5mM BEI. Tốt hơn là, chất lưu sau đó được khuấy liên tục trong khoảng từ 72 - 96 tiếng và chất lưu thu được bị làm bất hoạt có thể được ướp lạnh ở nhiệt độ -40°C hoặc thấp hơn hoặc nằm trong khoảng từ 1 - 7°C. Sau khi làm bất hoạt xong, một dung dịch thiosulfat natri, tốt hơn là với nồng độ 1,0M được cho thêm vào để trung hoà bất kỳ một BEI còn lại nào. Tốt hơn là, thiosulfat natri được thêm vào với một lượng tương đương như so sánh với BEI được thêm vào trước khi làm bất hoạt. Ví dụ, trong trường hợp BEI được thêm vào nồng độ cuối cùng là 5mM, 1,0M dung dịch thiosulfat natri

được thêm vào để tạo ra nồng độ tối thiểu cuối cùng là 5 mM để trung hoà bất kỳ một BEI còn lại nào.

Vì vậy, một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến một phương pháp điều chế protein ORF2 tái tổ hợp của PCV2, tốt hơn là với một lượng mô tả ở trên, bằng cách i) gây nhiễm một số các tế bào để bị tổn thương (xem ở trên) trong khi cấy với một vật truyền virus tái tổ hợp với một MOI xác định ở trên, ii) biểu hiện protein ORF2 của PCV2 bằng một vật truyền virus tái tổ hợp, iii) thu hồi ORF2 của PCV2 trong dịch nổi tế bào thu được trong khoảng từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 8 sau khi nhiễm bệnh và/hoặc khả năng sống sót của tế bào giảm xuống dưới 10%, iv) phân chia các mảnh vụn của tế bào từ ORF2 biểu hiện của PCV2 qua bước phân chia, và v) làm bất hoạt vật truyền virus tái tổ hợp. Tốt hơn là, vật truyền virus tái tổ hợp là một baculovirus chứa các trình tự mã ADN ORF2 và các tế bào là tế bào SF+. Các bước phân chia hay dùng là các bước mô tả ở trên, hay dùng nhất là bước lọc. Các bước làm bất hoạt hay dùng là các bước mô tả ở trên. Tốt hơn là, việc làm bất hoạt được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 35 - 39°C và có từ 2 đến 8 mM BEI, tốt hơn nữa là có khoảng 5 mM BEI. Tác giả sáng chế bất ngờ nhận thấy rằng nồng độ BEI cao có ảnh hưởng tiêu cực đến protein ORF2 của PCV2.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, phương pháp mô tả ở trên cũng bao gồm bước trung hoà sau bước v). Bước vi) này bao gồm việc thêm vào một lượng tương đương một chất trung hoà chất làm bất hoạt trong dung dịch. Tốt hơn là, nếu chất làm bất hoạt là BEI, thì việc cho thêm thiosulfat natri vào một lượng tương đương là cách hay được dùng. Do vậy, theo một khía cạnh khác, bước vi) bao gồm việc thêm một dung dịch thiosulfat natri vào một nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 1 đến 20 mM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 10 mM, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 2 đến 8 mM, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 3 đến 7 mM, tốt nhất là khoảng 5 mM, khi chất làm bất hoạt là BEI.

Ở dạng hay dùng và đặc biệt là ở dạng sẽ sử dụng protein ORF2 tái tổ hợp của PCV2 trong một chế phẩm tạo miễn dịch như một vắc xin, mỗi một lượng ORF2 thu được sẽ được thí nghiệm để làm bất hoạt bằng cách chuyển qua neo phụ thuộc, baculovirus để bị tổn thương, tế bào Sf+. Ở một dạng hay dùng của thí nghiệm này, 150 cm² tăng đơn cấy tế bào thích hợp được ghép với 1,0 mL chất lưu PCV2 làm bất hoạt và được giữ ở nhiệt độ nằm

trong khoảng từ 25 - 29°C trong 14 ngày với ít nhất 2 bước chuyển tiếp. Cuối giai đoạn duy trì, tầng đơn của tế bào được kiểm tra ảnh hưởng gây bệnh ở tế bào (CPE) đặc thù của baculovirus ORF2 của PCV2. Tốt hơn là, có thể dùng phương pháp kiểm soát virus tích cực. Các phương pháp kiểm soát này có thể bao gồm việc cấy tế bào Sf+ được ghép với một baculovirus ORF2 của PCV2 không làm bất hoạt và một bình tế bào Sf+ chưa được ghép. Sau khi ghép và chuyển tiếp, việc không có các tế bào bị nhiễm virus trong BEI xử lý chất lưu virus sẽ tạo nên một thí nghiệm làm bất hoạt thành công. Các tế bào kiểm soát được ghép với virus liên quan sẽ tạo ra đặc trưng CPE của baculovirus ORF2 của PCV2 và bình không ghép sẽ không tạo ra bất kỳ một bằng chứng CPE baculovirus ORF2 của PCV2 nào. Thay vào đó, cuối giai đoạn duy trì, các mẫu nổi trên bề mặt sẽ được thu thập và ghép trên bảng 96 Sf+ chất đầy tế bào Sf+, và sau đó giữ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 - 29°C trong 5 - 6 ngày. Bảng này sau đó được cố định và bị nhiễm chất kháng thể ORF2 kháng PCV2 kết hợp với FITC. Việc không có CPE và biểu hiện ORF2, được thấy bởi kính hiển vi IFA, trong BEI xử lý chất lưu virus tạo nên một thí nghiệm làm bất hoạt thoả mãn. Các tế bào kiểm soát được ghép với virus liên quan sẽ tạo ra CPE và phải dùng IFA và bình không ghép sẽ không tạo ra bất kỳ một bằng chứng nào của CPE baculovirus ORF2 của PCV2 và không cần dùng đến IFA.

Vì vậy, một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến một thí nghiệm làm bất hoạt để xác định ảnh hưởng của việc làm bất hoạt của vật truyền virus tái tổ hợp, bao gồm các bước: i) cho tiếp xúc ít nhất một phần của chất lưu cấy chứa vật truyền virus tái tổ hợp với một chất làm bất hoạt, tốt hơn là như được mô tả ở trên, ii) cho thêm một chất trung hoà để trung hoà chất làm bất hoạt, tốt hơn là như được mô tả ở trên, và iii) xác định tính lây nhiễm còn lại bằng các thí nghiệm như mô tả ở trên.

Sau khi làm bất hoạt, lượng protein ORF2 tái tổ hợp của PCV2 tương đối trong mẫu có thể được xác định bằng nhiều cách. Các phương pháp định lượng hay dùng bao gồm phương pháp đo tỷ trọng SDS-PAGE, ELISA, và các nghiên cứu tiêm chủng trên động vật tương quan số lượng vắc xin với kết quả lâm sàng (huyết thanh học, v.v.). Khi dùng SDS-PAGE để định lượng, vật liệu mẫu chứa một lượng protein ORF2 không xác định của PCV2 chạy trên gel, cùng với các mẫu chứa các lượng protein ORF2 cụ thể khác nhau của PCV2. Đường cong tiêu chuẩn sau đó có thể được tạo ra dựa trên những mẫu cụ thể và lượng ORF2

tái tổ hợp của PCV2 trong mẫu không xác định có thể được xác định bằng cách so sánh với đường cong tiêu chuẩn. Bởi vì ELISA thường được xem như tiêu chuẩn công nghiệp để định lượng kháng thể, nên chúng hay được dùng để định lượng.

Vì vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế cũng đề cập đến một ELISA để định lượng protein ORF2 tái tổ hợp của PCV2. Một ELISA mong muốn như mô tả ở đây sẽ tạo ra kèm theo với pha loãng kháng thể thu được với tỷ lệ 1:6000 hoặc pha loãng trong dung dịch đệm phủ. Một kháng thể mong muốn thu được là Pab Prot. G kháng PCV2 ở lợn được tinh chế, và dung dịch đệm phủ hay dùng là 0,05M dung dịch đệm Carbonat, dung dịch này có thể được điều chế bằng cách kết hợp 2,93g NaHCO_3 (Sigma Cat. Số. S-6014, hoặc tương đương) với 1,59g NaCO_3 (Sigma Cat. Số. S-6139, hoặc tương đương). Hỗn hợp được kết hợp với nước chưng cất, hoặc tương đương, để tạo ra 1 lít ở mức pH là $9,6 \pm 0,1$. Tiếp theo, kháng thể thu được được pha loãng với tỷ lệ 1:6000, hoặc bất kỳ một tỷ lệ pha loãng thích hợp nào khác, trong dung dịch đệm phủ. Ví dụ, với 4 bảng, 1 bảng sẽ cần 42 mL dung dịch đệm phủ và 7 μL kháng thể thu được. Sử dụng phương pháp ống hút tự động quay, 100 μL kháng thể thu được pha loãng được thêm vào tất cả các bể chứa. Để có thể phủ đều, các mặt của bảng nên được gõ nhẹ. Các bảng này sau đó được đóng dấu, trước khi xếp bảng và đặt bảng một bảng 96 rỗng. Các bảng này được ủ qua đêm (từ 14-24 tiếng) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 35-39°C. Mỗi một bảng sau đó được rửa 3 lần với dung dịch đệm rửa sử dụng máy rửa bảng độ chuẩn vi mô được đặt ở chế độ 250 μL /1 lần rửa với 3 lần rửa và không có thời gian ngâm. Sau lần rửa cuối cùng, bảng sẽ được tháo lỏng trên một khăn giấy. Lần nữa, dùng kỹ thuật ống hút tự động quay, 250 μL dung dịch chặn sẽ được thêm vào tất cả các bể chứa. Bảng thí nghiệm sẽ được đóng dấu và ủ trong khoảng 1 giờ (± 5 phút) ở nhiệt độ nằm trong khoảng 35-37°C. Tốt hơn là, bảng sẽ không được xếp chồng sau bước này. Trong bước chặn, tất cả các mẫu thí nghiệm sẽ được lấy ra và được làm tan ở nhiệt độ phòng. Tiếp theo, 4 bảng pha loãng riêng biệt sẽ được chuẩn bị bằng cách thêm 200 μL dung dịch pha loãng vào tất cả các bể chứa còn lại trừ bể chứa ở hàng A và hàng H, cột từ 1-3. Tiếp theo, 6 ống thí nghiệm sẽ được dán nhãn như sau, độ chuẩn thấp, độ chuẩn trung bình, độ chuẩn cao, làm bất hoạt/lọc (1:240), làm bất hoạt/lọc (1:480), và kiểm tra bên trong. Trong các ống được đặt tên, việc pha loãng với tỷ lệ thích hợp sẽ được chuẩn bị cho các mẫu thí nghiệm tiếp theo. Các mẫu thí nghiệm được làm tan sẽ được xoáy nước

trước khi sử dụng. Với 4 bảng, cách pha loãng sau sẽ được dùng: A) độ chuẩn thấp sẽ không được pha loãng trước : 3,0mL độ chuẩn thấp; B) chất kiểm soát âm với tỷ lệ pha loãng 1:30 (tế bào SF+) : 3,77mL chất pha loãng + 130 μ L chất kiểm soát âm; C) độ chuẩn trung bình với tỷ lệ pha loãng 1:30 (8 μ g/mL) : 3,77mL chất pha loãng + 130 μ L độ chuẩn trung bình; D) độ chuẩn cao với tỷ lệ pha loãng 1:90 (16 μ g/mL): 2,967mL chất pha loãng + 33 μ L độ chuẩn cao; E) làm bất hoạt/lọc với tỷ lệ pha loãng 1:240 : 2,39mL chất pha loãng + 10 μ L mẫu làm bất hoạt/mẫu lọc; F) làm bất hoạt/lọc với tỷ lệ pha loãng 1:480 : 1,0mL chất pha loãng + 1,0mL mẫu chuẩn bị không hoạt hoá/lọc (1:240) từ E ở trên; G) kiểm soát trong với tỷ lệ pha loãng 1:30 : 3,77mL chất pha loãng + 130 μ L kiểm soát trong. Tiếp theo, thêm 300 μ L mẫu được chuẩn bị để vào các bể chứa rộng tương ứng trong các bảng pha loãng từ bảng 1 qua bảng 4. Ống hút nhiều lần sau đó được đặt ở mức 100 μ L, và dung lượng ở hàng A được cố định bằng ống hút lên và xuống ít nhất 5 lần và sau đó 100 μ L được chuyển sang hàng B sử dụng kỹ thuật ống hút tự động quay. Đầu mút sẽ được thay đổi và cách làm giống như này được đưa xuống bảng ở hàng G. Các mẫu thí nghiệm trong các bảng pha loãng này đã sẵn sàng để chuyển xuống các bảng thí nghiệm khi bảng thí nghiệm được rửa 3 lần với dung dịch đệm rửa sử dụng máy rửa bảng có độ chuẩn vi mô (được đặt ở chế độ 250 μ L/1 lần rửa, 3 lần rửa, không có thời gian ngâm). Sau lần rửa cuối cùng, bảng sẽ được để ráo nước trên một khăn giấy. Tiếp theo, dung lượng của bảng pha loãng được chuyển sang bảng thí nghiệm sử dụng thao tác chuyển đơn giản. Cụ thể hơn, bắt đầu ở hàng H, 100 μ L/bể chứa được chuyển từ bảng pha loãng sang bể chứa tương ứng của bảng thí nghiệm sử dụng kỹ thuật ống hút tự động quay. Sau mỗi một lần chuyển, đầu ống hút sẽ được thay. Từ hàng G, 100 μ L/bể chứa trong bảng pha loãng được chuyển sang các bể chứa tương ứng của bảng thí nghiệm sử dụng kỹ thuật ống hút tự động quay. Cách cài đặt đầu ống hút theo kiểu này có thể được sử dụng cho các lần chuyển sau. Để đảm bảo dung dịch đồng nhất để chuyển, dung dịch sẽ được hút lên và hút xuống ít nhất 3 lần trước khi chuyển. Tiếp theo, bảng thí nghiệm được niêm phong và ủ trong khoảng 1,0 giờ $\pm$ 5 phút ở nhiệt độ 37°C $\pm$ 2,0°C. Lần nữa, tốt hơn là không xếp bảng. Bảng sau đó được rửa 3 lần với dung dịch đệm rửa sử dụng máy rửa bảng có độ chuẩn vi mô (đặt ở chế độ 250 μ L/1 lần rửa, 3 lần rửa, và không có thời gian ngâm). Sau lần rửa cuối cùng, các bảng được để ráo nước trên một khăn giấy. Sử dụng kỹ thuật ống hút tự động quay, 100 μ L kháng thể tìm được được pha loãng

với tỷ lệ 1:300, hoặc tỷ lệ pha loãng thích hợp đang dùng, trong dung dịch pha loãng được thêm vào tất cả các bể chứa của bảng thí nghiệm. Ví dụ, với 4 bảng, một bảng sẽ cần 42mL dung dịch pha loãng với 140 μ L kháng thể thu được. Các bảng thí nghiệm sau đó được niêm phong và được ủ trong 1,0 giờ $\pm$ 5 phút ở nhiệt độ $37^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$. Lần nữa, các bảng được rửa 3 lần với dung dịch đệm rửa sử dụng máy rửa bảng có độ chuẩn vi mô (đặt ở chế độ 250 μ L/1 lần rửa, 3 lần rửa, và không có thời gian ngâm). Sau lần rửa cuối cùng, các bảng được để ráo nước trên một khăn giấy. Tiếp theo, chất pha loãng kết hợp được chuẩn bị bằng cách thêm 1% huyết thanh thô bình thường vào chất pha loãng. Ví dụ, với 4 bảng, 420 μ L huyết thanh thô bình thường được thêm vào 42mL chất pha loãng. Kháng thể kết hợp được pha loãng với tỷ lệ 1:10.000, hoặc bất kỳ một tỷ lệ pha loãng thích hợp nào khác, trong một dung dịch pha loãng kết hợp mới được điều chế vào tất cả các bể chứa của bảng thí nghiệm. Sử dụng kỹ thuật ống hút tự động quay, 100 μ L kháng thể kết hợp pha loãng được thêm vào tất cả các bể chứa. Các bảng thí nghiệm sau đó được niêm phong và ủ khoảng 45 ± 5 phút ở nhiệt độ $37^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$. Tốt hơn là, các bảng này không được xếp. Các bảng này sau đó được rửa 3 lần với dung dịch đệm rửa sử dụng máy rửa bảng có độ chuẩn vi mô (đặt ở chế độ 250 μ L/1 lần rửa, 3 lần rửa, và không có thời gian ngâm). Sau lần rửa cuối cùng, các bảng này được để ráo nước trên một khăn giấy. Tiếp theo, dung tích đủ của Chất nền Peroxy hoá TMB (Thuốc thử A) với Dung dịch Peroxy hóa B (Thuốc thử B) được trộn ngay trước khi sử dụng. Lượng trộn này sẽ thay đổi phụ thuộc vào số lượng bảng, nhưng mỗi bảng sẽ cần 10mL/1 bảng + 2mL. Vì vậy, với 4 bảng, sẽ cần 21mL Thuốc thử A + 21mL Thuốc thử B. Sử dụng kỹ thuật ống hút tự động quay, 100 μ L chất nền được thêm vào tất cả các bảng thí nghiệm. Các bảng này sau đó được ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút + 15 giây. Phản ứng được dừng bằng cách thêm 100 μ L dung dịch 1N HCl vào tất cả các bể chứa sử dụng kỹ thuật ống hút tự động quay. Thiết bị đọc bảng ELISA sau đó được vận xuống và phải qua giai đoạn chẩn đoán và thí nghiệm theo cách thông thường.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến một phương pháp tạo ra một vật truyền virus tái tổ hợp chứa ADN ORF2 của PCV2 và biểu hiện protein ORF2 của PCV2 với số lượng nhiều, khi gây nhiễm các tế bào dễ bị tổn thương. Tác giả sáng chế bắt ngờ nhận ra rằng vật chủ trung gian virus tái tổ hợp như đưa ra ở đây biểu hiện với số lượng nhiều, như xác định ở trên, của ORF2 PCV2 sau khi gây nhiễm các tế bào dễ bị tổn thương. Vì vậy,

sáng chế cũng đề cập đến một phương pháp cải tiến để điều chế và/hoặc thu hồi protein ORF2 của PCV2, tốt hơn là gồm bước: tạo ra một vật truyền virus tái tổ hợp chứa ADN ORF2 của PCV2 và biểu hiện protein ORF2 của PCV2. Tốt hơn là, vật truyền giống virus là một baculovirus tái tổ hợp. Chi tiết của phương pháp tạo ra vật truyền virus tái tổ hợp chứa ADN ORF2 của PCV2 và biểu hiện protein ORF2 của PCV2, như đưa ra ở đây, được mô tả như sau: ở dạng hay dùng, vật truyền virus tái tổ hợp chứa ADN ORF2 của PCV2 và biểu hiện protein ORF2 của PCV2 được sử dụng để gây nhiễm các tế bào được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm một vật truyền vận chuyển có một gen ORF2 được cấy vào vật truyền virus. Tốt hơn là, chỉ một phần của vật truyền vận chuyển được chuyển nhiễm vào vật truyền virus, chứa ADN ORF2. Thuật ngữ "chuyển nhiễm vào vật truyền virus" có nghĩa là, và được dùng như một từ đồng nghĩa cho "tạo ra" hoặc "cấy" một ADN dị loại vào một vật truyền virus, ví dụ vào một vật truyền baculovirus. Tốt hơn nhưng không nhất thiết, vật truyền virus là một baculovirus.

Vì vậy, theo một khía cạnh khác của sáng chế, vật truyền virus tái tổ hợp được tạo ra bằng cách tái tổ hợp một vật truyền vận chuyển chứa ADN ORF2 của PCV2 dị loại với một vật truyền virus, tốt hơn là một baculovirus, thậm chí tốt hơn là một baculovirus không tái tạo tuyến tính (như ADN Baculo Gold). "Vật truyền vận chuyển" có nghĩa là một phân tử ADN, gồm ít nhất một gốc tái tạo, gen dị loại, trong ORF2 của PCV2, và các trình tự ADN cho phép cấy gen dị loại vào vật truyền virus. Tốt hơn là, các trình tự cho phép cấy gen dị loại vào vật truyền giống virus ở bên cạnh gen dị loại. Thậm chí tốt hơn, các trình tự bên cạnh này ít nhất là dị loại một phần với các trình tự của vật truyền virus. Tính đồng nhất của trình tự sau đó cho phép sự tái tổ hợp cả hai phân tử, vật truyền virus và vật truyền vận chuyển tạo ra một vật truyền virus tái tổ hợp chứa gen dị loại. Một vật truyền vận chuyển hay dùng là vật truyền pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen), được tạo ra để cùng chuyển nhiễm với ADN BaculoGold vào dòng tế bào Sf⁺ hay dùng. Tốt hơn là, vật truyền vận chuyển nêu trên bao gồm một ADN ORF2 của PCV2. Cấu trúc chuyển nhiễm có chiều dài xấp xỉ 10,387 cặp bazơ.

Ở dạng hay dùng hơn, các phương pháp theo sáng chế sẽ bắt đầu với việc tách ADN ORF2 của PCV2. Nói chung, việc tách này có thể bắt đầu từ một dòng quen thuộc hoặc lạ như ADN ORF2 có ít nhất khoảng 95% đồng nhất trình tự giữa các cách tách khác nhau.

Bất kỳ một gen ORF2 của PCV2 nào được biết đến trong lĩnh vực cũng có thể được sử dụng cho những mục đích của sáng chế bởi vì mỗi một gen sẽ được biểu hiện trong dịch nổi. Tốt hơn là, ADN ORF2 của PCV2 được sao chép quá mức bằng cách sử dụng phương pháp PCR, thậm chí tốt hơn với việc đưa vào trình tự liên ứng của Kozak gần 5' (CCGCCAUG) (SEQ ID NO 1) và/hoặc vị trí EcoR1 gần 3' (GAATTC) (SEQ ID NO 2). Tốt hơn là, việc đưa liên ứng Kozak 5' vào sẽ loại bỏ codon khởi động AUG của ORF2 PCV2. Tốt hơn là, vị trí EcoR1 3' được đưa vào xuôi dòng codon kết thúc của ORF2 PCV2. Tốt hơn nữa, vị trí này được đưa vào xuôi dòng của trình tự kết thúc sao chép poly A, vị trí này nằm xuôi dòng của codon kết thúc ORF2 PCV2. Tác giả sáng chế nhận ra rằng việc sử dụng trình tự liên ứng Kozak, đặc biệt như mô tả ở trên, làm tăng mức biểu hiện của protein ORF2 PCV2 tiếp theo. ADN ORF2 sao chép quá mức của PCV2, với các trình tự bổ sung này, được cấy vào một vật truyền. Vật truyền hay dùng cho bước cấy dòng ban đầu là vật truyền pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI). Tốt hơn là, ADN ORF2 của PCV2 bao gồm một vài trình tự vật truyền pGEM (SEQ ID NO: 7) được cắt bỏ từ vật truyền ở vị trí giới hạn Not1. ADN thu được sau đó được cấy vào vật truyền vận chuyển.

Do vậy, trong một khía cạnh của sáng chế, phương pháp tạo ra một vật truyền virus tái tổ hợp chứa ADN ORF2 của PCV2 được đề xuất. Phương pháp này bao gồm những bước: i) cấy dòng ORF2 PCV2 tái tổ hợp vào một vật truyền vận chuyển; và ii) chuyển nhiễm một phần của vật truyền vận chuyển chứa ORF2 PCV2 tái tổ hợp vào một vật truyền virus, để tạo ra vật truyền virus tái tổ hợp. Tốt hơn là, vật truyền vận chuyển là vật truyền mô tả ở trên hoặc được tạo ra như mô tả ở trên hoặc được thể hiện làm ví dụ trong Fig. 1. Vì vậy, theo một khía cạnh khác, vật truyền vận chuyển được sử dụng để tạo ra vật truyền virus tái tổ hợp như mô tả ở đây, chứa trình tự SEQ ID NO: 7.

Theo một khía cạnh khác, phương pháp này còn bao gồm bước sau trước bước i): sao chép quá mức ADN ORF2 PCV2 trong ống nghiệm, trong đó các trình tự bên cạnh của ADN ORF2 PCV2 được thay đổi như mô tả ở trên. Phương pháp trong ống nghiệm để sao chép quá mức ADN ORF2 PCV2 và biến đổi các trình tự bên cạnh, cấy trong ống nghiệm ADN ORF2 PCV2 được sao chép quá mức vào một vật truyền vận chuyển và vật truyền vận chuyển thích hợp như được mô tả ở trên, được thể hiện làm ví dụ ở Fig. 1, hoặc được các chuyên gia sáng chế biết. Do vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến một

phương pháp để tạo ra một vật truyền virus tái tổ hợp chứa ADN ORF2 PCV2 và biểu hiện protein ORF2 PCV2 gồm các bước: i) sao chép quá mức ADN ORF2 PCV2 trong ống nghiệm, trong đó các trình tự bên cạnh của ADN ORF2 PCV2 được thay đổi, ii) cấy ADN ORF2 PCV2 sao chép quá mức vào một vật truyền vận chuyển; và iii) dịch chuyển vật truyền vận chuyển hoặc một phần của nó chứa ADN ORF2 PCV2 tái tổ hợp vào một vật truyền giống virus để sinh ra vật truyền virus tái tổ hợp. Tốt hơn là, việc thay đổi các trình tự bên cạnh của ADN ORF2 PCV2 được thực hiện như mô tả ở trên, ví dụ bằng cách đưa vào một trình tự 5' Kozak và/hoặc vị trí 'EcoR 1, tốt hơn là như được mô tả ở trên.

Theo một khía cạnh khác, phương pháp điều chế và/hoặc thu hồi protein tái tổ hợp biểu hiện bằng khung đọc mở 2 của PCV2 được đề xuất. Phương pháp này thường bao gồm các bước: i) cấy một ORF2 của PCV2 tái tổ hợp vào một vật truyền vận chuyển; ii) chuyển nhiễm một phần của vật truyền vận chuyển chứa ORF2 tái tổ hợp của PCV2 vào một virus; iii) gây nhiễm các tế bào trong môi trường với virus chuyển nhiễm; iv) làm cho virus chuyển nhiễm biểu hiện protein tái tổ hợp từ ORF2 của PCV2; v) phân tách các tế bào từ dịch nổi; và vi) thu hồi protein ORF2 biểu hiện của PCV2 từ dịch nổi.

Các phương pháp làm thế nào để cấy một ADN ORF2 tái tổ hợp của PCV2 vào một vật truyền vận chuyển được mô tả ở trên. Tốt hơn là, vật truyền vận chuyển chứa trình tự SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7. Tuy nhiên, vật truyền vận chuyển có thể chứa bất kỳ một ADN ORF2 của PCV2 nào, chưa biến đổi hoặc đã biến đổi, miễn là ADN ORF2 của PCV2, khi chuyển nhiễm vào vật truyền virus tái tổ hợp, được biểu hiện trong khi cấy tế bào. Tốt hơn là, vật truyền virus tái tổ hợp chứa trình tự SEQ ID NO: 8. Ngoài ra, phương pháp làm thế nào để gây nhiễm tế bào, tốt hơn là làm thế nào để gây nhiễm tế bào côn trùng với một số baculovirus tái tổ hợp xác định chứa ADN ORF2 của PCV2 và biểu hiện protein ORF2 của PCV2 được mô tả chi tiết ở trên. Ngoài ra, các bước phân tách tế bào từ bên ngoài cũng như các bước để thu hồi protein ORF2 biểu hiện của PCV2 cũng được mô tả chi tiết ở trên. Bất kỳ bước nào trong số các bước của quá trình cụ thể này, như được mô tả ở đây, là một phần của phương pháp điều chế và/hoặc thu hồi protein tái tổ hợp biểu hiện bằng khung đọc mở 2 của PCV2 như mô tả ở trên. Tốt hơn là, các tế bào này là các tế bào SF+. Tốt hơn nữa, việc cấy tế bào có tổng số tế bào nằm trong khoảng từ $0,3 - 2,0 \times 10^6$ tế bào/mL, tốt hơn là nằm trong khoảng từ $0,35 - 1,9 \times 10^6$ tế bào/mL, tốt hơn

nữa là nằm trong khoảng từ $0,4 - 1,8 \times 10^6$ tế bào/mL, thậm chí tốt hơn là nằm trong khoảng từ $0,45 - 1,7 \times 10^6$ tế bào/mL, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ $0,5 - 1,5 \times 10^6$ tế bào/mL. Tốt hơn là, vật truyền virus tái tổ hợp chứa ADN ORF2 của PCV2 có tính bội nhiễm (MOI) hay dùng nằm trong khoảng từ 0,03 - 15, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,05 - 1,3, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,09 - 1,1, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,1 - 1,0, và tốt nhất là khoảng 0,5, khi được sử dụng để gây nhiễm các tế bào dễ bị tổn thương. Tốt hơn là, việc thu hồi protein ORF2 của PCV2 trong dịch nổi của tế bào đạt được trong khoảng từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 8 sau khi gây nhiễm và/hoặc khả năng sống sót của tế bào giảm xuống dưới 10%. Tốt hơn là, để điều chế protein ORF2 của PCV2, các tế bào được cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 - 29°C. Tốt hơn là, bước phân tách là bước ly tâm hoặc bước lọc.

Tuỳ chọn, phương pháp này có thể bao gồm bước sao chép quá mức ADN ORF2 của PCV2 từ một dòng PCV2 trước khi cấy dòng ADN ORF2 của PCV2 vào vật truyền vận chuyển. Ở dạng hay dùng, trình tự 5' Kozak, vị trí 3' EcoR1, và sự kết hợp của chúng cũng có thể được thêm vào trình tự sao chép quá mức, tốt hơn là trước khi hoặc trong lúc sao chép quá mức. Trình tự 5' Kozak' được ưu tiên bao gồm trình tự SEQ ID NO: 1. Vị trí 3' EcoR1 được ưu tiên bao gồm trình tự SEQ ID NO: 2. ADN ORF2 của PCV2 được ưu tiên bao gồm trình tự nucleotit Genbank Accession No. AF086834 (SEQ ID NO: 3) và SEQ ID NO: 4. Protein ORF2 tái tổ hợp của PCV2 được ưu tiên bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO: 5, là protein có mã SEQ ID NO: 3 (Genbank Accession No. AF086834) và SEQ ID No: 6, là protein có mã SEQ ID NO: 4. Môi trường được ưu tiên bao gồm môi trường tế bào côn trùng không có huyết thanh, tốt hơn là môi trường Excell 420. Khi bước sao chép quá mức tuỳ chọn được thực hiện, tốt hơn là trước hết cấy khung đọc mở 2 sao chép quá mức vào một vật truyền đầu tiên, cắt bỏ khung đọc mở 2 từ vật truyền đầu tiên, và sử dụng khung đọc mở cắt bỏ để cấy vào vật truyền vận chuyển. Dòng tế bào được ưu tiên để đồng chuyển nhiễm là dòng tế bào SF+. Virus được ưu tiên để đồng chuyển nhiễm là baculovirus. Ở dạng ưu tiên của phương pháp này, phần dịch chuyển của vật truyền vận chuyển bao gồm trình tự SEQ ID NO: 8. Cuối cùng, đối với phương pháp này, tốt hơn là thu hồi protein khung đọc mở 2 (ORF2) của PCV2 trong khi cấy tế bào ở ngoài ít nhất 5 ngày sau khi gây nhiễm tế bào với virus.

Vì vậy, một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến một phương pháp điều chế và/hoặc thu hồi khung đọc mở 2 của PCV2, bao gồm các bước: i) sao chép quá mức ADN ORF2 của PCV2 trong ống nghiệm, tốt hơn là bằng cách thêm trình tự 5' Kozak và/hoặc bằng cách thêm vị trí giới hạn 3' EcoR1, ii) cấy dòng ORF2 sao chép quá mức của PCV2 vào vật truyền vận chuyển; iii) chuyển nhiễm một phần của vật truyền vận chuyển chứa ORF2 tái tổ hợp của PCV2 vào một virus; iv) gây nhiễm tế bào trong môi trường với virus chuyển nhiễm; v) làm cho virus chuyển nhiễm biểu hiện protein tái tổ hợp từ ORF2 của PCV2; vi) phân tách các tế bào từ dịch nổi; và vii) thu hồi protein ORF2 biểu hiện của PCV2 từ dịch nổi.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến một phương pháp điều chế một chế phẩm chứa protein ORF2 của PCV2, và vật truyền virus bất hoạt. Phương pháp này bao gồm các bước: i) cấy dòng ORF2 sao chép quá mức của PCV2 vào một vật truyền vận chuyển; ii) chuyển nhiễm một phần của vật truyền vận chuyển chứa ORF2 tái tổ hợp của PCV2 vào một virus; iii) gây nhiễm các tế bào trong môi trường với vật truyền virus chuyển nhiễm; iv) làm cho vật truyền virus chuyển nhiễm biểu hiện protein tái tổ hợp từ ORF2 của PCV2; v) phân tách các tế bào từ dịch nổi; vi) thu hồi protein ORF2 biểu hiện của PCV2 từ dịch nổi; và vii) làm bất hoạt vật truyền virus tái tổ hợp. Tốt hơn là, vật truyền virus tái tổ hợp là một baculovirus chứa các trình tự mã ADN ORF2 và các tế bào là tế bào SF+. Các bước phân tách hay dùng là các bước mô tả ở trên, tốt nhất là bước lọc. Các bước làm bất hoạt hay dùng là các bước mô tả ở trên. Tốt hơn là, việc làm bất hoạt được thực hiện ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 35 - 39°C và có khoảng từ 2 - 8 mM BEI, tốt hơn nữa là có khoảng 5 mM BEI. Tác giả sáng chế bất ngờ nhận ra rằng nồng độ BEI càng cao sẽ ảnh hưởng tiêu cực đến protein ORF2 của PCV2, và nồng độ càng thấp thì không có tác dụng làm bất hoạt của vật truyền virus trong khoảng từ 24 - 72 giờ làm bất hoạt. Tốt hơn là, việc làm bất hoạt được thực hiện ít nhất trong 24 giờ, thậm chí tốt hơn là trong khoảng từ 24 - 72 giờ.

Theo một khía cạnh khác, phương pháp điều chế một chế phẩm chứa protein ORF2 của PCV2, và vật truyền virus bất hoạt, như mô tả ở trên, cũng bao gồm bước trung hoà sau bước vii). Bước viii) này bao gồm việc thêm vào một lượng tương ứng của một chất làm trung hoà chất làm bất hoạt trong dung dịch. Tốt hơn là, nếu chất làm bất hoạt là BEI, thì việc thêm thiosulfat natri vào một lượng tương ứng là cách được ưu tiên. Vì vậy, theo một

khía cạnh khác, bước viii) bao gồm việc thêm một dung dịch thiosulfat natri vào nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 1 - 20 mM, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 - 10 mM, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 2 - 8 mM, thậm chí tốt hơn là nằm trong khoảng từ 3 - 6 mM, tốt nhất là khoảng 5 mM, khi chất làm bất hoạt là BEI.

Theo một khía cạnh khác, phương pháp điều chế một chế phẩm chứa protein ORF2 của PCV2, và vật truyền virus bất hoạt, như mô tả ở trên, bao gồm bước sau trước bước i): sao chép quá mức ADN ORF2 của PCV2 trong ống nghiệm, trong đó các trình tự bên cạnh của ADN ORF2 của PCV2 được biến đổi như mô tả ở trên. Phương pháp trong ống nghiệm để sao chép quá mức ADN ORF2 của PCV2 và biến đổi các trình tự bên cạnh, cấy dòng ADN ORF2 của PCV2 sao chép quá mức trong ống nghiệm vào một vật truyền vận chuyển và các vật truyền vận chuyển thích hợp được mô tả ở trên, được thể hiện làm ví dụ trong Fig. 1, hoặc quen thuộc với chuyên gia trong lĩnh vực. Do vậy, theo một khía cạnh khác, phương pháp này bao gồm các bước: i) sao chép quá mức ADN ORF2 của PCV2 trong ống nghiệm, trong đó các trình tự bên cạnh của ADN ORF2 của PCV2 nêu trên được biến đổi; ii) cấy dòng ADN ORF2 của PCV2 sao chép quá mức vào một vật truyền vận chuyển; và iii) chuyển nhiễm vật truyền vận chuyển hoặc một phần của nó chứa ADN ORF2 của PCV2 tái tổ hợp vào một vật truyền virus để sinh ra vật truyền virus tái tổ hợp; iv) gây nhiễm các tế bào trong môi trường với virus chuyển nhiễm; v) làm cho virus chuyển nhiễm biểu hiện protein tái tổ hợp từ ORF2 của PCV2; vi) phân tách các tế bào từ dịch nổi; vii) thu hồi protein ORF2 biểu hiện của PCV2 từ dịch nổi; viii) làm bất hoạt vật truyền virus tái tổ hợp, tốt hơn là, có khoảng từ 1 - 20 mM BEI, tốt nhất là có khoảng 5 mM BEI; và ix) thêm một lượng tương đương của một chất có tác dụng trung hoà chất làm bất hoạt trong dung dịch, tốt hơn là, thêm một dung dịch thiosulfat natri vào nồng độ cuối cùng khoảng từ 1 - 20 mM, tốt hơn là khoảng 5 mM, khi chất làm bất hoạt là BEI.

Trong một khía cạnh khác của sáng chế, phương pháp điều chế một chế phẩm, tốt hơn là một chế phẩm kháng thể, ví dụ như một vắc xin, để tạo ra một phản ứng miễn dịch đối với PCV2 được đề xuất. Nhìn chung, phương pháp này bao gồm các bước chuyển nhiễm một cấu trúc vào một virus, trong đó cấu trúc này bao gồm i) ADN tái tổ hợp từ ORF2 của PCV2, ii) gây nhiễm các tế bào trong môi trường sinh trưởng với virus chuyển nhiễm, iii) làm cho virus biểu hiện protein tái tổ hợp từ ORF2 của PCV2, iv) thu hồi protein biểu hiện

của ORF2 từ dịch nổi, v) và điều chế chế phẩm bằng cách kết hợp protein thu hồi với một tá chất thích hợp và/hoặc chất mang được dụng.

"Các tá chất" được sử dụng ở đây, có thể bao gồm nhôm hydroxit và nhôm photphat, saponins v.v., Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Lac, Birmingham, AL), nhũ tương nước – dầu, nhũ tương dầu – nước, nhũ tương nước – dầu – nước. Nhũ tương có thể đặc biệt phụ thuộc vào dầu parafin lỏng nhẹ (loại Dược điển Châu Âu); dầu isoprenoit như squalan hoặc squalen; dầu thu được từ alken, đặc biệt là của isobuten hoặc dextrin; este của axit hoặc của rượu chứa một nhóm alkyl thẳng, đặc biệt hơn là dầu thực vật, etyl oleat, propylen glycol di-(caprylat/caprat), glyxeryl tri-(caprylat/caprat) hoặc propylen glycol dioleat; este của axit béo nhánh hoặc rượu, đặc biệt là axit este isostearic. Dầu được sử dụng kết hợp với các chất nhũ tương để tạo thành nhũ tương. Tốt hơn là, các chất nhũ tương là các chất có hoạt tính bề mặt không ion, đặc biệt là este của sorbitan, của manit (ví dụ anhydromanitol oleat), của glycol, của polyglyxerol, của propylen glycol và của axit oleic, isostearic, rixinoleic hoặc hydroxystearic, tùy theo được etoxylat hoá, và các khối copolyme polyoxypropylen-polyoxyetylen, đặc biệt là các sản phẩm Pluronic, đặc biệt là L121. Tham khảo Hunter và đồng tác giả, Lý thuyết và ứng dụng thực tế của các tá chất (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley và Sons, NY, từ trang 51-94 (1995) và Todd và đồng tác giả, Vắc xin 15: 564-570 (1997).

Ví dụ, có thể sử dụng nhũ tương SPT mô tả ở trang 147 của cuốn sách "Tạo ra Vắc xin, Phương pháp siêu phân tử và tá chất" do M. Powell và M. Newman biên tập, Plenum Press, 1995, và nhũ tương MF59 mô tả ở trang 183 của cuốn sách này.

Một ví dụ khác về tá chất là một hợp chất chọn từ các polyme của axit acrylic hoặc metacrylic và các copolyme của anhydrit maleic và dẫn xuất alkenyl. Các hợp chất tá được có lợi là các polyme của axit acrylic hoặc metacrylic liên kết ngang, đặc biệt với polyalkenyl ete của đường hoặc rượu đa chức. Những hợp chất này được biết đến qua thuật ngữ carbomer (Pharmeuropa Vol. 8, Số. 2, Tháng 6/ 1996). Chuyên gia trong lĩnh vực cũng có thể tham khảo tài liệu sáng chế U.S số 2,909,462 mô tả các polyme acrylic liên kết ngang với một hợp chất polyhydroxylat hoá có ít nhất 3 nhóm hydroxyl, tốt hơn là không hơn 8,

các nguyên tử hydro của ít nhất 3 hydroxyl được thay thế bởi các gốc béo chưa no có ít nhất 2 nguyên tử carbon. Các gốc hay dùng là các gốc chứa từ 2 - 4 nguyên tử carbon, ví dụ vinyl, allyl và các nhóm chưa no etylen. Bản thân các gốc chưa no có thể chứa các phân tử thay thế khác, như methyl. Các sản phẩm bán dưới tên Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, USA) đặc biệt thích hợp. Các sản phẩm này liên kết ngang với sucroza allyl hoặc với pentaerythritol allyl. Trong số các sản phẩm này, có thể có đề cập Carbopol 974P, 934P và 971P. Hay dùng nhất là việc sử dụng Carbopol 971P. Trong số các copolyme của anhydrit maleic và dẫn xuất alkenyl, các copolyme EMA (Monsanto) là các copolyme của anhydrit maleic và etylen. Việc hoà tan các polyme này trong nước tạo ra một dung dịch axit sẽ được trung hoà, tốt hơn là tạo ra pH sinh lý, để đưa dung dịch tá chất vào chế phẩm tạo miễn dịch, miễn dịch hoặc vắc xin sẽ được kết hợp.

Các tá chất thích hợp khác bao gồm, nhưng không hạn chế, hệ thống tá chất RIBI (Ribi Inc.), khối co-polyme (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), lipit monophosphoryl A, tá chất lipit-amin Avridin, độc tố đường ruột không chịu nhiệt từ E. coli (tái tổ hợp hoặc cách khác), độc tố bệnh tả, IMS 1314 hoặc dipeptit muramyl trong số nhiều tá chất khác.

Tốt hơn là, tá chất được thêm vào với một lượng nằm trong khoảng 100µg đến 10mg/liều lượng. Thậm chí tốt hơn, tá chất được thêm vào với một lượng nằm trong khoảng từ 100µg đến 10mg/liều lượng. Thậm chí tốt hơn nữa, tá chất được thêm vào với một lượng nằm trong khoảng từ 500µg đến 5mg/liều lượng. Thậm chí tốt hơn, tá chất được thêm vào với một lượng nằm trong khoảng từ 750µg đến 2,5mg/liều lượng. Tốt nhất là, tá chất được thêm vào với một lượng khoảng 1mg/liều lượng.

Vì vậy, theo một khía cạnh khác, phương pháp để điều chế một chế phẩm kháng thể, ví dụ như một vắc xin, để tạo ra một phản ứng miễn dịch đối với PCV2 bao gồm i) điều chế và thu hồi protein ORF2 của PCV2, và ii) trộn protein này với một tá chất thích hợp. Tốt hơn là, tá chất này là Carbopol 971P. Thậm chí tốt hơn, Carbopol 971P được thêm vào với một lượng nằm trong khoảng từ 500µg đến 5mg/liều lượng, thậm chí tốt hơn là với một lượng nằm trong khoảng từ 750µg đến 2,5mg/liều lượng và tốt nhất là với một lượng khoảng 1mg/liều lượng. Tốt hơn là, bước i) của quá trình bao gồm các bước của quá trình

như mô tả để điều chế và thu hồi ORF2 của PCV2. Ví dụ, ở dạng hay dùng của phương pháp này, cấu trúc bao gồm ADN ORF2 của PCV2 đạt được trong một vật truyền vận chuyển. Các vật truyền vận chuyển thích hợp và các phương pháp điều chế chúng được mô tả ở trên. Tuy theo, phương pháp này có thể bao gồm bước sao chép quá mức ORF2 từ dòng PCV2 qua PCR trước khi cấy dòng ORF2 vào vật truyền vận chuyển. Các trình tự khung đọc mở hay dùng, các trình tự Kozak, các trình tự vị trí 3' EcoR1, các trình tự protein tái tổ hợp, các trình tự cấu trúc chuyển nhiễm, môi trường, tế bào và các virus được mô tả trong các phương pháp trước. Một bước tùy ý khác cho phương pháp này bao gồm việc cấy dòng ADN ORF2 sao chép quá mức của PCV2 vào một vật truyền đầu tiên, cắt bỏ ADN ORF2 từ vật truyền đầu tiên này, và sử dụng ADN ORF2 cắt bỏ của PCV2 để cấy vào vật truyền vận chuyển. Giống với các phương pháp khác, tốt hơn là đợi ít nhất 5 ngày sau khi gây nhiễm các tế bào bằng baculovirus dịch chuyển trước khi thu hồi protein ORF2 tái tổ hợp từ dịch nổi. Tốt hơn là, bước thu hồi của phương pháp này cũng bao gồm bước phân tách môi trường từ các tế bào và cặn tế bào. Bước này có thể được thực hiện theo nhiều cách nhưng để dễ dàng và thuận tiện, tốt hơn là lọc các tế bào, cặn tế bào, và môi trường sinh trưởng qua một máy lọc có cỡ lỗ nằm trong khoảng từ $0,45\mu\text{M}$ – $1,0\mu\text{M}$. Cuối cùng, đối với phương pháp này, tốt hơn là bao gồm bước làm bất hoạt của virus trước khi kết hợp protein ORF2 tái tổ hợp thu hồi của PCV2 trong một chế phẩm. Bước này có thể được thực hiện theo nhiều cách, nhưng tốt hơn là với thói quen sử dụng BEI theo sáng chế.

Vì vậy, theo một khía cạnh khác, phương pháp này bao gồm các bước: i) sao chép quá mức ADN ORF2 của PCV2 trong ống nghiệm, trong đó các trình tự bên cạnh của ADN ORF2 của PCV2 nêu trên được biến đổi; ii) cấy dòng ADN ORF2 sao chép quá mức của PCV2 vào một vật truyền vận chuyển; và iii) chuyển nhiễm vật truyền vận chuyển hoặc một phần của nó chứa ADN ORF2 tái tổ hợp của PCV2 vào một vật truyền virus để sinh ra vật truyền virus tái tổ hợp; iv) gây nhiễm các tế bào trong môi trường với virus chuyển nhiễm; v) làm cho virus chuyển nhiễm biểu hiện protein tái tổ hợp từ ORF2 của PCV2; vi) phân tách các tế bào từ dịch nổi; vii) thu hồi protein ORF2 biểu hiện của PCV2 từ bên ngoài; viii) làm bất hoạt của vật truyền virus tái tổ hợp, tốt hơn là, có khoảng từ 1 đến 20mM BEI, tốt nhất là có khoảng 5mM BEI; ix) thêm một lượng tương ứng của một chất có tác dụng trung hoà chất làm bất hoạt trong dung dịch, tốt hơn là, thêm một dung dịch thiosulfat

natri vào nồng độ cuối cùng nằm trong khoảng từ 1 đến 20mM, tốt hơn là khoảng 5mM, khi chất làm bất hoạt là BEI; và x) thêm một lượng thích hợp của một tá chất, tốt hơn là thêm Carbopol, tốt hơn nữa là Carbopol 971P, thậm chí tốt hơn với một lượng như mô tả ở trên (ví dụ nằm trong khoảng từ 500 μ g đến 5mg/liều lượng, thậm chí tốt hơn với một lượng nằm trong khoảng từ 750 μ g đến 2,5mg/liều lượng và tốt nhất là với một lượng khoảng 1mg/liều lượng).

Ngoài ra, chế phẩm có thể bao gồm một hoặc nhiều chất mang dược dụng. Như được sử dụng ở đây, chất mang dược dụng bao gồm bất kỳ và tất cả dung môi, môi trường phân tán, phủ, chất ổn định, chất pha loãng, chất bảo quản, chất kháng khuẩn và chất chống nấm, chất đẳng trương, chất cản trở hấp phụ, và các chất cùng loại. Tốt nhất, chế phẩm đưa ra ở đây, chứa protein ORF2 của PCV2 được thu hồi từ dịch nổi của tế bào cấy trong ống nghiệm, trong đó các tế bào nêu trên được gây nhiễm với một vật truyền virus tái tổ hợp chứa ADN ORF2 của PCV2 và biểu hiện protein ORF2 của PCV2, và trong đó việc cấy tế bào nêu trên được xử lý với khoảng từ 2 đến 8mM BEI, tốt hơn là với khoảng 5mM BEI để làm bất hoạt của vật truyền virus, và một nồng độ tương ứng của một chất trung hoà, tốt hơn là dung dịch thiosulfat natri vào nồng độ cuối cùng của khoảng từ 2 đến 8mM, tốt hơn là khoảng 5mM, Carbopol, tốt hơn là Carbopol 971P, tốt hơn là với một lượng nằm trong khoảng từ 500 μ g đến 5mg/liều lượng, thậm chí tốt hơn là với một lượng nằm trong khoảng từ 750 μ g đến 2,5mg/liều lượng và tốt nhất là với một lượng khoảng 1mg/liều lượng, và nước muối sinh lý, tốt hơn là với một lượng nằm trong khoảng từ 50 đến 90% (v/v), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 60 đến 80% (v/v), thậm chí tốt hơn là khoảng 70% (v/v).

Vì vậy, một khía cạnh khác đề cập đến một phương pháp điều chế một chế phẩm kháng thể, ví dụ như một vắc xin, để tạo ra một phản ứng miễn dịch đối với PCV2 bao gồm các bước: i) sao chép quá mức ADN ORF2 của PCV2 trong ống nghiệm, trong đó các trình tự bên cạnh của ADN ORF2 của PCV2 nêu trên được biến đổi; ii) cấy dòng ADN ORF2 sao chép quá mức của PCV2 vào một vật truyền vận chuyển; và iii) dịch chuyển vật truyền vận chuyển hoặc một phần của nó chứa ADN ORF2 tái tổ hợp của PCV2 vào một vật truyền virus để sinh ra vật truyền virus tái tổ hợp; iv) gây nhiễm các tế bào trong môi trường với virus chuyển nhiễm; v) làm cho virus chuyển nhiễm biểu hiện protein tái tổ hợp từ ORF2 của PCV2; vi) phân tách các tế bào từ dịch nổi; vii) thu hồi protein ORF2 biểu hiện của

PCV2 từ dịch nổi; viii) làm bất hoạt của vật truyền virus tái tổ hợp, tốt hơn là, có khoảng từ 2 đến 20mM BEI, tốt nhất là có khoảng 5mM BEI; ix) thêm một lượng tương ứng của một chất có tác dụng trung hoà chất làm bất hoạt trong dung dịch, tốt hơn là, thêm một dung dịch thiosulfat natri vào nồng độ cuối cùng có khoảng từ 0,5 đến 20mM, tốt hơn là khoảng 5mM, khi chất làm bất hoạt là BEI; x) thêm một lượng thích hợp của một tá dược, tốt hơn là thêm Carbopol, tốt hơn nữa là Carbopol 971P, thậm chí tốt hơn nữa với một lượng như mô tả ở trên (ví dụ nằm trong khoảng từ 500 μ g đến 5mg/liều lượng, thậm chí tốt hơn với một lượng nằm trong khoảng từ 750 μ g đến 2,5mg/liều lượng và tốt nhất là với một lượng khoảng 1mg/liều lượng); và xi) thêm muối sinh lý, tốt hơn là với một lượng nằm trong khoảng từ 50 đến 90% (v/v), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 60 đến 80% (v/v), tốt hơn nữa là khoảng 70% (v/v). Tuy theo, phương pháp này có thể bao gồm việc thêm chất bảo vệ. Chất bảo vệ được sử dụng ở đây, là một chất có tác dụng kháng vi sinh vật, ví dụ như Gentamycin, Merthiolat, và các chất cùng loại. Đặc biệt, việc thêm một chất bảo vệ hay được dùng nhất để điều chế một chế phẩm đa liều lượng. Các chất có tác dụng kháng vi sinh vật này được thêm nồng độ để có tác dụng ngăn ngừa chế phẩm đang quan tâm gây nhiễm vi sinh vật hoặc kiểm chế sự sinh trưởng của vi sinh vật trong chế phẩm đang quan tâm.

Ngoài ra, phương pháp này cũng có thể bao gồm việc thêm bất kỳ một chất ổn định nào, ví dụ như sacarit, trihaloza, manitol, sacaroza và các chất cùng loại, để tăng và/hoặc duy trì thời hạn sử dụng của sản phẩm. Tuy nhiên, tác giả sáng chế bất ngờ nhận ra rằng hợp phần thu được có tác dụng miễn dịch trong khoảng thời gian ít nhất 24 tháng, mà không cần thêm bất kỳ một chất ổn định nào khác.

Một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến các sản phẩm điều chế từ các phương pháp như mô tả ở trên. Đặc biệt, sáng chế đề cập đến một chế phẩm chứa protein ORF2 biểu hiện tái tổ hợp của PCV2. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến một chế phẩm chứa protein ORF2 biểu hiện tái tổ hợp của PCV2, thu hồi từ dịch nổi của môi trường cấy tế bào côn trùng. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến một chế phẩm chứa protein ORF2 biểu hiện tái tổ hợp của PCV2, thu hồi từ dịch nổi của môi trường cấy tế bào côn trùng. Tốt hơn là, sáng chế cũng đề cập đến một chế phẩm cũng chứa một chất thích hợp để làm bất hoạt của các vật truyền virus. Tốt hơn là, chất làm bất hoạt nêu trên là BEI. Hơn nữa, sáng chế cũng

đề cập đến một chế phẩm chứa protein ORF2 biểu hiện tái tổ hợp của PCV2, thu hồi từ dịch nổi của môi trường cấy tế bào côn trùng, và bao gồm một chất, thích hợp để làm bất hoạt của các vật truyền virus, tốt hơn là BEI và một chất trung hoà để trung hoà chất làm bất hoạt. Tốt hơn là, chất trung hoà đó là thiosulfat natri, khi BEI được sử dụng như một chất làm bất hoạt.

Trong một khía cạnh khác của sáng chế, một chế phẩm tạo miễn dịch tạo ra một phản ứng miễn dịch và, tốt hơn là, tạo ra phản ứng bảo vệ đối với các dấu hiệu lâm sàng của việc nhiễm PCV2, được tạo ra. Chế phẩm này thường bao gồm polypeptit, hoặc một mảnh của nó, biểu hiện bởi Khung Đọc Mở 2 (ORF2) của PCV2, như một thành phần tạo miễn dịch của chế phẩm.

ADN và protein của ORF2 của PCV2, như được sử dụng ở đây để điều chế các chế phẩm và cũng như được sử dụng trong các quá trình đưa ra ở đây là một miễn được bảo vệ tốt trong PCV2 tách riêng và do vậy, bất kỳ một ORF2 của PCV2 nào sẽ có tác dụng như nguồn ADN ORF2 của PCV2 và/hoặc polypeptit như được sử dụng ở đây. Một protein ORF2 hay dùng của PCV2 là protein của trình tự SEQ ID NO: 11. Một polypeptit ORF2 hay dùng của PCV2 được đưa ra ở đây như trình tự SEQ ID NO: 5, nhưng các chuyên gia sáng chế hiểu rằng trình tự này có thể thay đổi từ 6 - 10% đồng nhất trình tự và vẫn giữ lại các đặc điểm tạo miễn dịch làm cho nó có ích trong các chế phẩm tạo miễn dịch. Các đặc điểm tạo miễn dịch của một chế phẩm miễn dịch có thể, ví dụ, được đánh giá bằng thí nghiệm quyết định như đưa ra bởi Ví dụ 4. Ngoài ra, đặc điểm tạo miễn dịch của một kháng thể biến đổi vẫn được giữ lại, khi kháng thể biến đổi tạo ra ít nhất 70%, tốt hơn là 80%, tốt hơn nữa là 90% khả năng miễn dịch bảo vệ như so sánh với protein ORF2 của PCV2, ghi mã bằng trình tự polynucleotit của SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4. Một "chế phẩm tạo miễn dịch" như được sử dụng ở đây, có nghĩa là một protein ORF2 của PCV2 tạo ra một "phản ứng miễn dịch" trong vật chủ của một tế bào và/hoặc một phản ứng miễn dịch trung gian kháng thể với protein ORF2 của PCV2. Tốt hơn là, chế phẩm tạo miễn dịch này có khả năng tạo ra phản ứng bảo vệ đối với việc nhiễm PCV2 và các dấu hiệu lâm sàng liên quan. Ở một số dạng, các phần tạo miễn dịch của protein ORF2 của PCV2 được sử dụng như thành phần tạo miễn dịch trong chế phẩm. Thuật ngữ "phần tạo miễn dịch" như được sử dụng ở đây có nghĩa là các dạng cắt bỏ và/hoặc thể, hoặc các mảnh protein ORF2 của

PCV2 và/hoặc polynucleotit, một cách tương ứng. Tốt hơn là, các dạng cắt bỏ và/hoặc thể này, hoặc các mảnh sẽ bao gồm ít nhất 6 axit amin liền kề từ polypeptit ORF2 đầy đủ. Tốt hơn nữa, các dạng cắt bỏ hoặc thay thế, hoặc các mảnh sẽ có ít nhất 10, tốt hơn là có ít nhất 15, và tốt hơn nữa là có ít nhất 19 axit amin liền kề từ polypeptit ORF2 đầy đủ. Hai trình tự hay dùng trong khía cạnh này được đưa ra ở đây như các trình tự SEQ ID NO: 9 và 10. Tác giả sáng chế cũng hiểu rằng các trình tự này có thể là một phần của các mảnh lớn hơn hoặc các dạng cắt bỏ. Một polypeptit ORF2 hay dùng khác của PCV2, đưa ra ở đây được ghi mã bằng các trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4. Nhưng các chuyên gia sáng chế hiểu rằng trình tự này có thể thay đổi từ 6 - 20% sự đồng nhất trình tự và vẫn giữ lại các đặc điểm kháng thể làm cho nó có ích trong các chế phẩm tạo miễn dịch. Ở một số dạng, dạng cắt bỏ hoặc thay thế, hoặc mảnh của ORF2 được sử dụng như thành phần kháng thể trong chế phẩm. Tốt hơn là, các dạng cắt bỏ hoặc thay thế, hoặc các mảnh này sẽ bao gồm ít nhất 18 nucleotit liền kề từ trình tự nucleotit ORF2 đầy đủ, ví dụ trình tự SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4. Tốt hơn nữa, các dạng cắt bỏ hoặc thay thế, hoặc các mảnh sẽ có ít nhất 30, tốt hơn nữa là có ít nhất 45, và tốt hơn nữa là có ít nhất 57 nucleotit liền kề trình tự nucleotit ORF2 đầy đủ, ví dụ trình tự SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4.

"Đồng nhất trình tự" như được biết trong sáng chế có nghĩa là một mối quan hệ giữa hai hoặc nhiều trình tự polypeptit hoặc hai hoặc nhiều trình tự polynucleotit, cụ thể là một trình tự tham khảo và một trình tự đưa ra được so sánh với trình tự tham khảo. Đồng nhất trình tự được xác định bằng cách so sánh trình tự đưa ra với trình tự tham khảo sau khi các trình tự này được xếp thẳng nhất để thể hiện mức độ giống nhau nhất của trình tự, như được xác định bởi sự ngang nhau của các sợi ở các trình tự này. Sau khi xếp thẳng hàng, đồng nhất trình tự được xác định trên cơ sở vị trí – vị trí, ví dụ, các trình tự là đồng nhất ở một vị trí cụ thể nếu tại vị trí đó, các nucleotit hoặc các chất cận của axit amin là đồng nhất. Tổng số các đồng nhất vị trí này sau đó được chia bởi tổng số các nucleotit hoặc các chất cận trong trình tự tham khảo để đưa ra mức % đồng nhất trình tự. Đồng nhất trình tự có thể được tính dễ dàng bằng các phương pháp quen thuộc, bao gồm nhưng không giới hạn, các phương pháp mô tả trong tài liệu Computational Molecular Biology, Lesk, A. N., ed., Oxford University Press, New York (1988), Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of

Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinge, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988), các tài liệu này được tổng hợp ở đây để tham khảo. Các phương pháp hay dùng để xác định đồng nhất trình tự được phác thảo để đưa ra sự giống nhau lớn nhất giữa các trình tự thí nghiệm. Các phương pháp để xác định đồng nhất trình tự được mã hoá trong các chương trình máy tính giúp xác định đồng nhất trình tự giữa các trình tự đưa ra. Các ví dụ về các chương trình này bao gồm, nhưng không hạn chế, bộ chương trình GCG (Devereux, J., cùng đồng tác giả, Nghiên cứu axit nucleic, 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN và FASTA (Altschul, S. F. cùng đồng tác giả, J. Molec. Biol., 215:403-410 (1990)). Chương trình BLASTX có trong NCBI và các nguồn khác (Cuốn BLAST, Altschul, S. cùng đồng tác giả, NCVI NLM NIH Bethesda, MD 20894, Altschul, S. F. cùng đồng tác giả, J. Molec. Biol., 215: 403-410 (1990), các tài liệu này được tổng hợp ở đây để tham khảo). Các chương trình này sẽ xếp thẳng nhất các trình tự sử dụng khối lượng khe thiếu sót để tạo ra mức đồng nhất trình tự cao nhất giữa các trình tự đưa ra và trình tự tham khảo. Như một ví dụ minh hoạ, bằng một polynucleotit có một trình tự nucleotit có ít nhất, ví dụ, 85%, tốt hơn là 90%, thậm chí tốt hơn là 95% "đồng nhất trình tự" với một trình tự nucleotit tham khảo, tác giả sáng chế có ý rằng trình tự nucleotit của polynucleotit đưa ra đồng nhất với trình tự tham khảo ngoại trừ trình tự polynucleotit đưa ra có thể bao gồm tối đa 15, tốt hơn là tối đa 10, thậm chí tốt hơn là tối đa 5 đột biến điểm/100 nucleotit của trình tự nucleotit tham khảo. Nói một cách khác, trong một polynucleotit có một trình tự nucleotit có ít nhất 85%, tốt hơn là có 90%, thậm chí tốt hơn là có 95% sự đồng nhất với trình tự nucleotit tham khảo, tối đa 15%, tốt hơn là 10%, thậm chí tốt hơn là 5% nucleotit trong trình tự tham khảo có thể được bỏ đi hoặc thay thế với một nucleotit khác, hoặc một số nucleotit chiếm tối đa 15%, tốt hơn là 10%, thậm chí tốt hơn là 5% tổng lượng nucleotit trong trình tự tham khảo có thể được ghép vào trình tự tham khảo. Những đột biến này của trình tự tham khảo có thể xảy ra ở điểm kết thúc 5' hoặc 3' của trình tự nucleotit tham khảo hoặc bất kỳ điểm nào giữa các điểm kết thúc này, được đặt rải rác riêng rẽ giữa các nucleotit trong trình tự tham khảo hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liền kề trong trình tự tham khảo. Tương tự, bằng một

polypeptit có một trình tự axit amin đưa ra có ít nhất, ví dụ, 85%, tốt hơn là 90%, thậm chí tốt hơn là 95% đồng nhất trình tự với một trình tự axit amin tham khảo, tác giả sáng chế có ý rằng trình tự axit amin đưa ra của polypeptit đồng nhất với trình tự tham khảo ngoại trừ trình tự polypeptit đưa ra có thể bao gồm tối đa 15, tốt hơn là tối đa 10, thậm chí tốt hơn là tối đa 5 biến đổi axit amin/100 axit amin của trình tự axit amin tham khảo. Nói một cách khác, để thu được một trình tự polypeptit đưa ra có ít nhất 85%, tốt hơn là có 90%, thậm chí tốt hơn là có 95% đồng nhất trình tự với một trình tự axit amin tham khảo, tối đa 15%, tốt hơn là tối đa 10%, thậm chí tốt hơn là tối đa 5% chất cặn của axit amin trong trình tự tham khảo có thể bị bỏ đi hoặc thay thế với một axit amin khác, hoặc một số axit amin tối đa 15%, tốt hơn là tối đa 10%, thậm chí tốt hơn là tối đa 5% tổng số chất cặn của axit amin trong trình tự tham khảo có thể được ghép vào trình tự tham khảo. Các biến đổi này của trình tự tham khảo có thể xảy ra ở các vị trí kết thúc amin hoặc carboxy của trình tự axit amin tham khảo hoặc bất kỳ vị trí nào giữa các vị trí kết thúc này, đặt rải rác riêng lẻ giữa các chất cặn trong trình tự tham khảo hoặc trong một hoặc nhiều nhóm liền kề trong trình tự tham khảo. Tốt hơn là, vị trí của chất cặn không đồng nhất bởi việc thay thế các axit amin bảo toàn. Tuy nhiên, việc thay thế theo kiểu bảo toàn này không được tính đến như một việc không thể tách rời khi xác định đồng nhất trình tự.

"Tính đồng đẳng của trình tự", như sử dụng ở đây, nói đến một phương pháp xác định mối liên hệ giữa hai trình tự. Để xác định tính đồng đẳng của trình tự, hai hoặc nhiều trình tự được xếp thẳng hàng tốt nhất, và khoảng trống được đưa ra nếu cần thiết. Tuy nhiên, trái với "đồng nhất trình tự", việc thay thế các axit amin bảo toàn được tính như một việc đi liền khi xác định tính đồng đẳng của trình tự. Nói một cách khác, để thu được một polypeptit hoặc một polynucleotit có 95% tính đồng đẳng trình tự với một trình tự tham khảo, 85%, tốt hơn là 90%, thậm chí tốt hơn là 95% chất cặn axit amin hoặc nucleotit trong trình tự tham khảo phải hợp hoặc bao gồm bước thay thế bảo toàn với một axit amin hoặc nucleotit khác, hoặc một số axit amin hoặc nucleotit chứa tối đa 15%, tốt hơn là tối đa 10%, thậm chí tốt hơn là tối đa 5% tổng lượng chất cặn axit amin hoặc nucleotit, không bao gồm bước thế bảo toàn, trong trình tự tham khảo có thể được ghép vào trình tự tham khảo. Tốt hơn là, trình tự tương đồng bao gồm ít nhất một đoạn có 50, tốt hơn là 100, thậm chí tốt hơn là 250, tốt hơn nữa là 500 nucleotit.

"Thay thế bảo toàn" nói đến việc thay thế chất cận của axit amin hoặc nucleotit với một chất cận của axit amin khác hoặc nucleotit có những đặc điểm hoặc tính chất tương tự bao gồm kích thước, tính kỵ nước, v.v., làm cho chức năng tổng thể không thay đổi đáng kể.

"Tách" có nghĩa là thay đổi "bằng tác động của con người" từ trạng thái tự nhiên của nó, có nghĩa là, nếu nó xảy ra tự nhiên, thì nó bị thay đổi hoặc loại bỏ từ môi trường gốc, hoặc cả hai. Ví dụ, một polynucleotit hoặc một polypeptit tự nhiên có trong một sinh vật sống không bị "tách", nhưng cũng polynucleotit hoặc polypeptit này phân tách từ vật liệu sống chung ở trạng thái tự nhiên của nó bị "tách", như thuật ngữ được dùng ở đây.

Vì vậy, một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến một chế phẩm tạo miễn dịch có tác dụng làm giảm mức trầm trọng của triệu chứng lâm sàng liên quan đến nhiễm PCV2 bao gồm protein ORF2 của PCV2. Tốt hơn là, protein ORF2 của PCV2 là bất kỳ trong số những chất mô tả ở trên. Tốt hơn là, protein ORF2 của PCV2 nêu trên là

- i) polypeptit bao gồm trình tự SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11;
- ii) bất kỳ một polypeptit nào có ít nhất 80% tính tương đồng với polypeptit ở mục i),
- iii) bất kỳ một phân tạo miễn dịch nào của polypeptit ở mục i) và/hoặc mục ii)
- iv) phân tạo miễn dịch của mục iii), bao gồm ít nhất 10 axit amin liên kế có trong các trình tự SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 hoặc SEQ ID NO: 11,
- v) polypeptit được ghi mã bởi một ADN bao gồm trình tự SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4.
- vi) bất kỳ một polypeptit nào được ghi mã bởi một polynucleotit có ít nhất 80% tính tương đồng với polynucleotit ở mục v),
- vii) bất kỳ một phân tạo miễn dịch nào của polypeptit được ghi mã bởi polynucleotit ở mục v) và/hoặc mục vi)

viii) phần tạo miễn dịch ở mục vii), trong đó polynucleotit ghi mã cho phần tạo miễn dịch nêu trên bao gồm ít nhất 30 nucleotit liên kề có trong các trình tự SEQ ID NO: 3, hoặc SEQ ID NO: 4.

Tốt hơn là, bất kỳ một phần nào trong số các phần tạo miễn dịch này có các đặc điểm tạo miễn dịch của protein ORF2 của PCV2 được ghi mã bởi trình tự SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4.

Theo một khía cạnh khác, protein ORF2 của PCV2 được đưa ra trong chế phẩm miễn dịch ở mức bao kháng thể có tác dụng tạo ra phản ứng miễn dịch mong muốn, cụ thể là giảm tỷ lệ mắc bệnh hoặc làm giảm mức trầm trọng của dấu hiệu lâm sàng do nhiễm PCV2. Tốt hơn là, mức bao protein ORF2 của PCV2 là ít nhất 0,2 μ g kháng thể/ml chế phẩm tạo miễn dịch cuối cùng (μ g/ml), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,2 đến 400 μ g/ml, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,3 đến 200 μ g/ml, thậm chí tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,35 đến 100 μ g/ml, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,4 đến 50 μ g/ml, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,45 đến 30 μ g/ml, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,6 đến 15 μ g/ml, thậm chí tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,75 đến 8 μ g/ml, thậm chí tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1,0 đến 6 μ g/ml, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1,3 đến 3,0 μ g/ml, thậm chí tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1,4 đến 2,5 μ g/ml, thậm chí tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1,5 đến 2,0 μ g/ml, và tốt nhất là khoảng 1,6 μ g/ml.

Theo một khía cạnh khác, mức bao kháng thể ORF2 là ít nhất 0,2 μ g protein ORF2 của PCV2 như mô tả ở trên cho trong mỗi liều lượng của chế phẩm kháng thể cuối cùng (μ g/liều lượng), tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,2 đến 400 μ g/liều lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,3 đến 200 μ g/liều lượng, thậm chí tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,35 đến 100 μ g/liều lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,4 đến 50 μ g/liều lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,45 đến 30 μ g/liều lượng, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,6 đến 15 μ g/liều lượng, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,75 đến 8 μ g/liều lượng, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1,0 đến 6 μ g/liều lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1,3 đến 3,0 μ g/liều lượng, thậm chí tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1,4 đến 2,5 μ g/liều lượng, thậm chí tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1,5 đến 2,0 μ g/liều lượng, và tốt nhất là khoảng 1,6 μ g/liều lượng.

Polypeptit ORF2 của PCV2 dùng trong chế phẩm tạo miễn dịch theo sáng chế có thể dẫn xuất trong bất kỳ hình dạng nào bao gồm tách và tinh chế ORF2 của PCV2, tổng hợp protein tiêu chuẩn, và hệ phương pháp tái tổ hợp. Các phương pháp hay dùng để thu được polypeptit ORF2 của PCV2 được mô tả ở trên và cũng được đưa ra trong tài liệu Đơn sáng chế U.S. số 11/034,797, các tài liệu và nội dung của chúng do đó được tổng hợp trong phần tham khảo. Nói một cách ngắn gọn, các tế bào dễ bị tổn thương bị nhiễm với một vật truyền virus tái tổ hợp chứa các trình tự mã ADN ORF2 của PCV2, polypeptit ORF2 của PCV2 được biểu hiện qua virus tái tổ hợp, và polypeptit ORF2 biểu hiện của PCV2 được thu hồi từ dịch nổi bằng phương pháp lọc và được làm bất hoạt bằng phương pháp thông thường, tốt hơn là sử dụng etylenimin nhị phân, chất này sau đó được trung hoà để ngăn chặn quá trình làm bất hoạt.

Vì vậy, theo một khía cạnh khác, chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm i) bất kỳ một protein ORF2 của PCV2 nào mô tả ở trên, tốt hơn là với nồng độ mô tả ở trên, và ii) ít nhất một phần của vật truyền virus biểu hiện protein ORF2 của PCV2 nêu trên, tốt hơn là của một baculovirus tái tổ hợp. Ngoài ra, theo một khía cạnh khác, chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm i) bất kỳ một protein ORF2 của PCV2 nào mô tả ở trên, tốt hơn là với nồng độ mô tả ở trên, ii) ít nhất một phần của vật truyền virus biểu hiện protein ORF2 của PCV2 nêu trên, tốt hơn là của một baculovirus tái tổ hợp, và iii) một phần của môi trường cấy tế bào dịch nổi.

Theo một phương án cụ thể của quá trình điều chế và thu hồi protein ORF2 của PCV2, môi trường cấy tế bào dịch nổi được lọc qua một màng có kích thước lỗ, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,45 đến 1µm. Vì vậy, một khía cạnh khác đề cập đến một chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm i) bất kỳ một protein ORF2 của PCV2 nào mô tả ở trên, tốt hơn là với nồng độ mô tả ở trên, ii) ít nhất một phần của vật truyền virus biểu hiện protein ORF2 của PCV2 nêu trên, tốt hơn là của một baculovirus tái tổ hợp, và iii) một phần của môi trường cấy tế bào; trong đó khoảng 90% thành phần có kích thước nhỏ hơn 1µm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến một chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm i) bất kỳ một protein ORF2 của PCV2 nào mô tả ở trên, tốt hơn là với nồng độ mô tả ở trên, ii) ít nhất một phần của vật truyền virus biểu hiện protein ORF2 của PCV2 nêu trên, iii) một

phần của môi trường cấy tế bào, iv) và chất làm bất hoạt để làm bất hoạt vật truyền virus tái tổ hợp, tốt hơn là BEI, trong đó khoảng 90% thành phần từ i) đến iii) có kích thước nhỏ hơn 1 μm . Tốt hơn là, BEI có nồng độ có tác dụng làm bất hoạt của baculovirus. Nồng độ hiệu quả được mô tả ở trên.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến một chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm i) bất kỳ một protein ORF2 của PCV2 nào mô tả ở trên, tốt hơn là với nồng độ mô tả ở trên, ii) ít nhất một phần của vật truyền virus biểu hiện protein ORF2 của PCV2 nêu trên, iii) một phần của môi trường cấy tế bào, iv) một chất làm bất hoạt để làm bất hoạt vật truyền virus tái tổ hợp, tốt hơn là BEI, và v) một chất trung hoà để ngăn chặn việc làm bất hoạt do chất làm bất hoạt gây ra, trong đó khoảng 90% thành phần từ i) đến iii) có kích thước nhỏ hơn 1 μm . Tốt hơn là, nếu chất làm bất hoạt là BEI, thì chế phẩm nêu trên bao gồm thiosulfat natri với một lượng tương đương với BEI.

Polypeptit được tổng hợp vào một chế phẩm mà có thể dùng cho một động vật dễ bị nhiễm PCV2. Ở dạng hay dùng, chế phẩm này có thể bao gồm các thành phần bổ sung quen thuộc với các chuyên gia sáng chế (có thể tham khảo tài liệu Khoa học Dược của Remington. (1990). 18th ed. Mack Publ., Easton). Ngoài ra, chế phẩm cũng bao gồm một hoặc nhiều chất mang được chấp nhận trong ngành thú y. Như được sử dụng ở đây, "một chất mang được chấp nhận trong ngành thú y" bao gồm bất kỳ hoặc tất cả các dung môi, môi trường phân tán, phủ, tá chất, chất ổn định, chất pha loãng, chất bảo quản, chất kháng khuẩn và chất chống nấm, chất đẳng trương, chất làm chậm khả năng hấp phụ, và các chất cùng loại.

Trong một phương án ưu tiên, chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm protein ORF2 của PCV2 như đưa ra kèm theo đây, tốt hơn là với nồng độ mô tả ở trên như một thành phần kháng thể, được trộn với một tá chất, tốt hơn là Carbopol, và nước muối sinh lý.

Các chuyên gia sáng chế sẽ hiểu rằng chế phẩm ở đây có thể ở dạng tiêm, các dung dịch vô trùng được chấp nhận trong sinh lý học. Để điều chế dung dịch dùng ngay để tiêm hoặc truyền ngoài ruột, các dung dịch đẳng trương dạng nước, ví dụ như nước muối hoặc các dung dịch protein huyết thanh tương ứng luôn có sẵn. Ngoài ra, các chế phẩm tạo miễn dịch và chế phẩm vắc xin của sáng chế có thể bao gồm các chất pha loãng, chất đẳng trương,

chất ổn định, hoặc tá chất. Các chất pha loãng có thể bao gồm nước, nước muối, dextroza, etanol, glyxerol, và các chất cùng loại. Các chất đẳng trương có thể bao gồm natri clorua, dextroza, manitol, sorbitol, và lactoza, trong số các chất khác. Chất ổn định bao gồm albumin và muối kiềm của axit etylendiamintetraxetic, trong số các chất khác. Các tá chất thích hợp là các tá chất mô tả ở trên. Hay dùng nhất là việc sử dụng Carbopol, đặc biệt là việc sử dụng Carbopol 971P, tốt hơn là với một lượng như mô tả ở trên (ví dụ nằm trong khoảng 500 μ g đến 5mg/liều lượng, thậm chí tốt hơn là với một lượng nằm trong khoảng 750 μ g đến 2,5mg/liều lượng và tốt nhất là với một lượng khoảng 1mg/liều lượng).

Vì vậy, sáng chế cũng đề cập đến một chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm i) bất kỳ một protein ORF2 của PCV2 như mô tả ở trên, tốt hơn là với nồng độ như mô tả ở trên, ii) ít nhất một phần của vật truyền virus biểu hiện protein ORF2 của PCV2 nêu trên, iii) một phần của môi trường cấy tế bào, iv) một chất làm bất hoạt để làm bất hoạt của vật truyền virus tái tổ hợp, tốt hơn là BEI, và v) một chất trung hoà để ngăn chặn việc làm bất hoạt do chất làm bất hoạt tạo ra, tốt hơn là thiosulfat natri với một lượng tương ứng với BEI; và vi) một tá chất thích hợp, tốt hơn là Carbopol 971 với một lượng như mô tả ở trên; trong đó khoảng 90% thành phần từ i) đến iii) có kích thước nhỏ hơn 1 μ m. Theo một khía cạnh khác, chế phẩm tạo miễn dịch này còn bao gồm một muối được dùng, tốt hơn là một muối photphat với nồng độ được chấp nhận trong sinh lý học. Tốt hơn là, nồng độ pH của chế phẩm tạo miễn dịch nêu trên được điều chỉnh tới mức pH sinh lý, có nghĩa là nằm trong khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Vì vậy, sáng chế cũng đề cập đến một chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm/ml i) ít nhất 1,6 μ g protein ORF2 của PCV2 mô tả ở trên, ii) ít nhất một phần của baculovirus biểu hiện protein ORF2 của PCV2 nói trên, iii) một phần của môi trường cấy tế bào, iv) khoảng từ 2 đến 8mM BEI, v) thiosulfat natri với một lượng tương ứng với BEI; và vi) khoảng 1mg Carbopol 971, và vii) muối photphat với nồng độ được chấp nhận trong sinh lý học; trong đó khoảng 90% thành phần từ i) đến iii) có kích thước nhỏ hơn 1 μ m và nồng độ pH của chế phẩm tạo miễn dịch nêu trên được điều chỉnh tới mức khoảng từ 6,5 đến 7,5.

Các chế phẩm tạo miễn dịch có thể còn bao gồm một hoặc nhiều chất điều biến miễn dịch, ví dụ như intolokine, intoforon, hoặc các cytokine khác. Các chế phẩm tạo miễn dịch

cũng có thể bao gồm Gentamixin và Mertiolat. Trong khi khối lượng và nồng độ của các tá chất và chất phụ trợ có ích trong phạm vi của sáng chế có thể được xác định dễ dàng bằng các chuyên gia sáng chế, sáng chế dự tính các chế phẩm bao gồm từ 50 μ g đến 2000 μ g tá chất và tốt hơn là nằm trong khoảng 250 μ g/ml liều lượng chế phẩm vắc xin. Trong một phương án ưu tiên khác, sáng chế dự tính các chế phẩm vắc xin bao gồm từ 1 μ g/ml đến 60 μ g/ml thuốc kháng sinh, và tốt hơn là ít hơn 30 μ g/ml thuốc kháng sinh.

Vì vậy, sáng chế cũng đề cập đến một chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm i) bất kỳ một protein ORF2 của PCV2 nào mô tả ở trên, tốt hơn là với nồng độ mô tả ở trên, ii) ít nhất một phần của vật truyền virus biểu hiện protein ORF2 của PCV2 nêu trên, iii) một phần của môi trường cấy tế bào, iv) một chất làm bất hoạt để làm bất hoạt vật truyền virus tái tổ hợp, tốt hơn là BEI, và v) một chất trung hoà để ngăn chặn việc làm bất hoạt do chất làm bất hoạt tạo ra, tốt hơn là thiosulfat natri với một lượng tương ứng với BEI; vi) một tá chất thích hợp, tốt hơn là Carbopol 971 với một lượng như mô tả ở trên; vii) một nồng độ được dụng của dung dịch đệm nước muối, tốt hơn là muối photphat, và viii) một chất có hoạt tính chống vi sinh vật; trong đó khoảng 90% thành phần từ i) đến iii) có kích thước nhỏ hơn 1 μ m.

Tác giả sáng chế bất ngờ nhận ra rằng chế phẩm tạo miễn dịch đưa ra kèm theo đây có tính ổn định cao trong một giai đoạn 24 tháng. Tác giả sáng chế cũng nhận ra rằng các chế phẩm tạo miễn dịch đưa ra kèm theo ở đây, bao gồm baculovirus tái tổ hợp biểu hiện protein ORF2 của PCV2 như đưa ra kèm theo đây có tác dụng giảm triệu chứng lâm sàng liên quan đến nhiễm PCV2. Tác giả sáng chế bất ngờ nhận ra rằng các chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm baculovirus tái tổ hợp biểu hiện protein ORF2 của PCV2 như đưa ra kèm theo đây có tác dụng tốt hơn một chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm toàn bộ virus PCV2 ở dạng làm bất hoạt hoặc kháng thể ORF2 virus được tách của PCV2. Đặc biệt, tác giả sáng chế bất ngờ nhận ra rằng baculovirus tái tổ hợp biểu hiện protein ORF2 của PCV2 có tác dụng với nồng độ rất thấp, có nghĩa là với nồng độ tối đa 0,25 μ g/liều lượng. Khả năng tạo miễn dịch cao bất ngờ này của protein ORF2 của PCV2 có thể tăng thêm bằng việc thêm Carbopol.

Một khía cạnh khác đề cập đến một bình chứa bao gồm ít nhất một liều lượng của chế phẩm tạo miễn dịch của protein ORF2 của PCV2 như đưa ra kèm theo đây, trong đó một liều lượng bao gồm ít nhất 2 μ g protein ORF2 của PCV2, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 16 μ g protein ORF2 của PCV2. Bình chứa nêu trên có thể bao gồm từ 1 đến 250 liều lượng chế phẩm tạo miễn dịch, tốt hơn là chứa 1, 10, 25, 50, 100, 150, 200, hoặc 250 liều lượng chế phẩm tạo miễn dịch của protein ORF2 của PCV2. Tốt hơn là, mỗi một bình chứa bao gồm hơn một liều lượng chế phẩm tạo miễn dịch của protein ORF2 của PCV2 bao gồm thêm một chất có hoạt tính kháng vi sinh vật. Các chất này, ví dụ là kháng sinh bao gồm Gentamixin và Mertiolat và các chất cùng loại. Vì vậy, một khía cạnh của sáng chế đề cập đến một bình chứa bao gồm từ 1 đến 250 liều lượng của chế phẩm tạo miễn dịch của protein ORF2 của PCV2, trong đó một liều lượng bao gồm ít nhất 2 μ g protein ORF2 của PCV2, và Gentamixin và/hoặc Mertiolat, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 μ g/ml đến 60 μ g/ml kháng sinh, và tốt hơn nữa là ít hơn 30 μ g/ml.

Một khía cạnh khác đề cập đến một bộ, bao gồm bất kỳ một bình chứa nào, mô tả ở trên, và một cuốn hướng dẫn, bao gồm thông tin dùng trong bắp của ít nhất một liều lượng chế phẩm tạo miễn dịch của protein ORF2 của PCV2 vào lợn để làm giảm mức trầm trọng của triệu chứng lâm sàng liên quan đến nhiễm PCV2. Ngoài ra, theo một khía cạnh khác, cuốn hướng dẫn nêu trên bao gồm thông tin dùng lần hai hoặc dùng thêm ít nhất một liều lượng chế phẩm tạo miễn dịch của ORF2 của PCV2, trong đó việc dùng lần hai hoặc việc dùng thêm được thực hiện ít nhất 14 ngày sau lần dùng đầu tiên hoặc lần dùng trước. Tốt hơn là, cuốn hướng dẫn nêu trên cũng bao gồm thông tin dùng một chất kích thích miễn dịch. Tốt hơn là, chất kích thích miễn dịch nêu trên sẽ được đưa ra ít nhất hai lần. Tốt hơn là, ít nhất 3, tốt hơn là ít nhất 5, thậm chí tốt hơn là ít nhất 7 ngày là khoảng thời gian giữa lần dùng đầu tiên và lần dùng thứ hai hoặc lần dùng thêm của chất kích thích miễn dịch. Tốt hơn là, chất kích thích miễn dịch được đưa ra ít nhất 10 ngày, tốt hơn là 15, thậm chí tốt hơn là 20, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 22 ngày sau lần dùng đầu tiên của chế phẩm tạo miễn dịch của protein ORF2 của PCV2. Một chất kích thích miễn dịch hay dùng, ví dụ là hemoxyanin bám lỗ khoá (KLH), tốt hơn là nhũ hoá với tá chất Freund không toàn vẹn (KLH/ICFA). Tuy nhiên, tác giả sáng chế ở đây hiểu rằng bất kỳ một chất kích thích miễn dịch nào khác quen thuộc với chuyên gia sáng chế cũng có thể được sử dụng. "Chất kích

thích miễn dịch" như được sử dụng ở đây, có nghĩa là bất kỳ một chất hoặc một chế phẩm nào có thể gây ra phản ứng miễn dịch, tốt hơn là không cần đề xướng hoặc tăng một phản ứng miễn dịch cụ thể, ví dụ phản ứng miễn dịch đối với một mầm bệnh cụ thể. Cuốn sách còn hướng dẫn dùng chất kích thích miễn dịch trong một liều lượng thích hợp. Ngoài ra, bộ còn có thể bao gồm một bình chứa, bao gồm ít nhất một liều lượng chất kích thích miễn dịch, tốt hơn là một liều lượng KLH, hoặc KLH/ICFA.

Ngoài ra, tác giả sáng chế cũng bất ngờ nhận ra rằng khả năng tạo miễn dịch của các chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm baculovirut tái tổ hợp biểu hiện protein ORF2 của PCV2, tốt hơn là kết hợp với Carbopol, có thể được tăng thêm bằng việc dùng vắc xin IngelVac PRRS MLV (xem Ví dụ 5). Dấu hiệu lâm sàng của PCV2 và các biểu hiện của bệnh được sao chép quá mức khi có nhiễm PRRS. Tuy nhiên, các chế phẩm tạo miễn dịch và các chiến lược tiêm chủng như đưa ra kèm theo đây làm giảm ảnh hưởng này, và hơn mong đợi. Nói một cách khác, ảnh hưởng hiệp lực bất ngờ được quan sát khi động vật, tốt hơn là lợn được tiêm với bất kỳ một chế phẩm tạo miễn dịch ORF2 của PCV2 nào, như được đưa ra kèm theo đây, và vắc xin IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim).

Vì vậy, một khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến một bộ như mô tả ở trên, bao gồm chế phẩm tạo miễn dịch của ORF2 của PCV2 như đưa ra kèm theo đây và cuốn hướng dẫn, trong đó cuốn hướng dẫn còn bao gồm thông tin sử dụng chế phẩm tạo miễn dịch ORF2 của PCV2 cùng với chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm kháng thể PRRS, tốt hơn là kháng thể PRRS được bổ sung tá chất. Tốt hơn là, kháng thể PRRS là IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim).

Một khía cạnh khác của sáng chế cũng đề cập đến một bộ bao gồm i) một bình chứa chứa ít nhất một liều lượng chế phẩm tạo miễn dịch của ORF2 của PCV2 như đưa ra kèm theo đây, và ii) một bình chứa chứa một chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm kháng thể PRRS, tốt hơn là kháng thể PRRS được bổ sung tá chất. Tốt hơn là kháng thể PRRS là IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim). Tốt hơn nữa, bộ còn bao gồm một cuốn hướng dẫn, bao gồm thông tin sử dụng cả hai chế phẩm được. Tốt hơn là, cuốn hướng dẫn chứa thông tin rằng chế phẩm chứa ORF2 của PCV2 được sử dụng tạm thời trước chế phẩm chứa PRRS.

Một khía cạnh khác đề cập đến cách sử dụng bất kỳ một chế phẩm nào đưa ra kèm theo đây như một loại thuốc, tốt hơn là như một loại thuốc thú y, thậm chí tốt hơn là như một vắc xin. Hơn nữa, sáng chế còn đề cập đến cách sử dụng bất kỳ một chế phẩm nào mô tả ở đây, để điều chế một loại thuốc làm giảm mức trầm trọng của các triệu chứng lâm sàng liên quan đến nhiễm PCV2. Tốt hơn là, loại thuốc này dùng để phòng ngừa nhiễm PCV2, thậm chí tốt hơn là dùng ở lợn.

Một khía cạnh khác đề cập đến một phương pháp để (i) phòng ngừa nhiễm bệnh, hoặc tái nhiễm PCV2 hoặc (ii) giảm hoặc loại trừ các triệu chứng lâm sàng do PCV2 gây ra, bao gồm việc sử dụng bất kỳ một chế phẩm tạo miễn dịch nào đưa ra kèm theo đây với một đối tượng cần dùng của nó. Tốt hơn là, đối tượng này là một con lợn. Tốt hơn là, chế phẩm tạo miễn dịch được sử dụng trong bắp. Tốt hơn là sử dụng một liều lượng hoặc hai liều lượng chế phẩm tạo miễn dịch, trong đó tốt hơn là một liều lượng bao gồm ít nhất khoảng 2 μ g protein ORF2 của PCV2, thậm chí tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 16 μ g, và ít nhất khoảng từ 0,1 đến 5mg Carbopol, tốt hơn là khoảng 1mg Carbopol. Một khía cạnh khác đề cập đến phương pháp điều trị như mô tả ở trên, trong đó việc sử dụng lần hai của chế phẩm tạo miễn dịch được thực hiện. Tốt hơn là, việc sử dụng lần hai này được thực hiện với cùng một loại chế phẩm tạo miễn dịch, tốt hơn là có cùng một lượng protein ORF2 của PCV2. Tốt hơn là, việc sử dụng lần hai này cũng được thực hiện qua bắp. Tốt hơn là, việc sử dụng lần hai được thực hiện ít nhất 14 ngày sau lần sử dụng đầu tiên, thậm chí tốt hơn là ít nhất 4 tuần sau lần sử dụng đầu tiên.

Theo một khía cạnh khác, phương pháp điều trị cũng bao gồm việc sử dụng một chất kích thích miễn dịch. Tốt hơn là, chất kích thích miễn dịch nêu trên được sử dụng ít nhất hai lần. Tốt hơn là, ít nhất 3, tốt hơn nữa là ít nhất 5 ngày, thậm chí tốt hơn là ít nhất 7 ngày là khoảng thời gian giữa lần sử dụng thứ nhất và lần sử dụng thứ hai của chất kích thích miễn dịch. Tốt hơn là, chất kích thích miễn dịch được sử dụng ít nhất 10 ngày, tốt hơn là 15, thậm chí tốt hơn là 20, thậm chí tốt hơn nữa là ít nhất 22 ngày sau lần sử dụng đầu tiên của chế phẩm tạo miễn dịch ORF2 của PCV2. Một chất kích thích miễn dịch hay dùng, ví dụ là hemoxyanin bám lỗ khoá (KLH), tốt hơn là nhũ hoá với tá chất Freund không toàn vẹn (KLH/ICFA). Tuy nhiên, tác giả sáng chế ở đây hiểu rằng bất kỳ một chất kích thích miễn dịch nào khác quen thuộc với chuyên gia sáng chế cũng có thể được sử dụng. Việc sử

dùng chất kích thích miễn dịch với một liều lượng thích hợp là kiến thức chung của chuyên gia sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, phương pháp điều trị mô tả ở trên cũng bao gồm việc sử dụng kháng thể PRRS. Tốt hơn là, kháng thể PRRS là IngelVac® PRRS MLV (Boehringer Ingelheim). Tốt hơn là, kháng thể PRRS nêu trên được sử dụng tạm thời sau việc sử dụng chế phẩm tạo miễn dịch của protein ORF2 của PCV2.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây đưa ra các vật liệu và các quy trình ưu tiên theo sáng chế. Tuy nhiên, tác giả sáng chế sẽ hiểu rằng các ví dụ này được đưa ra chỉ để làm minh họa, không có gì trong đó được cho là giới hạn với toàn bộ phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1

Ví dụ này so sánh sản lượng tương ứng của ORF2 sử dụng các phương pháp của sáng chế với các phương pháp đã đề cập trong sáng chế trước. Bốn bình tơ 1000mL, mỗi bình được cấy xấp xỉ $1,0 \times 10^6$ tế bào Sf+/ml trong 300mL môi trường côn trùng không có huyết thanh, Excell 420 (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS). Môi trường tế bào chủ được coi như gốc cấy tế bào chủ SF+ (*Spodoptera frugiperda*), đường dẫn 19, Lot#N112-095W. Các tế bào này thường sinh ra gốc cấy tế bào chủ SF+ thu được từ Protein Sciences Corporation, Inc., Meriden, CT. Dòng tế bào SF+ dùng trong ví dụ này bị hạn chế giữa đường dẫn 19 và 59. Các đường dẫn khác sẽ phục vụ cho các mục đích của sáng chế, nhưng để đẩy quá trình điều chế quy mô lớn lên, thì cần đến ít nhất 19 đường dẫn và các đường dẫn sau đường dẫn 59 có thể có ảnh hưởng đến khả năng biểu hiện, mặc dù điều này không được nghiên cứu. Cụ thể hơn, môi trường tế bào SF+ đầu tiên từ nitơ dạng lỏng được phát triển trong môi trường Excell 420 ở dạng huyền phù trong các bình tơ vô trùng với máy quay liên tục. Môi trường cấy tế bào này được phát triển trong các bình tơ có dung tích từ 100mL đến 250mL với từ 25 đến 150mL môi trường Excell 420 không có huyết thanh. Khi các tế bào này nhân lên tới mật độ tế bào $1,0 - 8,0 \times 10^6$ tế bào/mL, chúng được chia ra các bình mới với mật độ tế bào là $0,5 - 1,5 \times 10^6$ tế bào/mL. Môi trường sinh trưởng sau được phát triển trong các bình tơ có kích thước tối đa 36 lít hoặc các lò phản ứng sinh học bằng

thép không gỉ có dung tích tối đa 300 lít trong khoảng thời gian từ 2-7 ngày ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 25 - 29°C.

Sau khi cấy, các bình này được ủ ở nhiệt độ 27°C trong 04 giờ. Sau đó, mỗi một bình được cấy với baculovirut tái tổ hợp chứa gen ORF2 của PCV2 (SEQ ID NO: 4). Baculovirut tái tổ hợp chứa gen ORF2 của PCV2 được sinh ra như sau: gen ORF2 của PCv2 từ dòng Bắc Mỹ của PCV2 là PCR sao chép quá mức để chứa một trình tự 5' Kozak (SEQ ID NO: 1) và một vị trí 3' EcoR1 (SEQ ID NO: 2), được cấy vào vật truyền pGEM-T-Easy (Promega, Madison, WI). Sau đó, nó được cắt bỏ tiếp và cấy phụ vào vật truyền vận chuyển pVL1392 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Phần cấy phụ này được trình bày ở đây là trình tự SEQ ID NO: 7. Plasmid pVL1392 chứa gen ORF2 của PCv2 được gọi là N47-064Y và sau đó đồng dịch chuyển với ADN của baculovirut BaculoGold® (BD Biosciences Pharmingen) vào các tế bào côn trùng Sf+ (Khoa học Protein, Meriden, CT) để sinh ra baculovirut tái tổ hợp chứa gen ORF2 của PCV2. Cấu trúc mới này được đưa ra ở đây là trình tự SEQ ID NO: 8. Baculovirut tái tổ hợp chứa gen ORF2 của PCV2 được tinh chế bằng kỹ thuật tạo màng và Virut cấy chủ (MSV) được nhân giống trên dòng tế bào SF+, được phân chia đều và giữ ở nhiệt độ -70°C. MSV được coi là baculovirut ORF2 của PCV2 bằng PCR-RFLP sử dụng các tài liệu cụ thể về baculovirut. Các tế bào côn trùng được gây nhiễm với baculovirut ORF2 của PCV2 để sinh ra MSV hoặc Virut cấy biểu hiện kháng thể ORF2 của PCV2 được phát hiện bởi kháng thể đơn dòng hoặc các kháng thể đơn dòng trong thí nghiệm kháng thể huỳnh quang gián tiếp. Ngoài ra, tính đồng nhất của baculovirut ORF2 của PCV2 được xác nhận bởi việc sắp xếp trình tự axit amin kết thúc N-. MSV của baculovirut ORF2 của PCV2 cũng được thử nghiệm độ tinh khiết theo 9 C.F.R. 113.27 (c), 113.28, và 113.55. Mỗi một baculovirut tái tổ hợp được cấy vào các bình tơ có các đa nhiễm khác nhau (MOIs). Bình 1 được cấy với 7,52mL của 0,88 MOI; bình 2 được cấy với 3,01mL của 0,36 MOI; bình 3 được cấy với 1,5mL của 0,18 MOI và bình 4 được cấy với 0,75mL của 0,09 MOI. Một biểu đồ dòng sơ đồ minh họa các bước cơ bản thường tạo ra một baculovirut tái tổ hợp ORF2 của PCV2 được đề xuất ở đây như ở Fig. 1.

Sau khi cấy với baculovirut, các bình sau đó được ủ ở nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 7 ngày và được quay với tốc độ 100 vòng/phút trong suốt thời gian đó. Các bình này sử dụng

các nắp có lỗ thông hơi để lưu thông không khí. Cứ 24 giờ, các mẫu từ mỗi bình được lấy ra cho 7 ngày tiếp theo. Sau khi chiết, mỗi một mẫu được ly tâm, và cả viên kết lẫn những viên nổi trên bề mặt được phân tách và sau đó được vi lọc qua một màng có kích thước lỗ nằm trong khoảng từ 0,45 – 1,0 μ m.

Các mẫu thu được sau đó định lượng lượng ORF2 có trong các mẫu này qua một thí nghiệm ELISA. Thí nghiệm ELISA được tiến hành với kháng thể bắt Pab IgG Prot. G ở lợn kháng PCV2 được tinh chế (pha loãng với tỷ lệ 1:250 trong PBS) pha loãng với tỷ lệ 1:6000 trong 0,05M dung dịch đệm Carbonat (pH 9,6). 100 μ L kháng thể sau đó được cho vào các khoang của bản kính vi chuẩn, được niêm phong, và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 37°C. Bản kính sau đó được rửa 3 lần với một dung dịch rửa bao gồm 0,5mL Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO), 100mL 10X D-PBS (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) và 899,5mL nước pha loãng. Sau đó, 250 μ L dung dịch chặn (từ 5g sữa bột không béo (Nestle, Glendale, CA) trong 10mL D-PBS QS đến 100mL với nước pha loãng) được cho thêm vào mỗi một khoang. Bước tiếp theo là rửa bản kính thí nghiệm và sau đó thêm kháng thể chưa pha loãng. Kháng thể chưa pha loãng được tạo ra bằng cách thêm 200 μ L dung dịch pha loãng (0,5mL Tween 20 trong 999,5mL D-PBS) vào mỗi một khoang trên bản kính pha loãng. Mẫu thử sau đó được pha loãng với tỷ lệ 1:240 và tỷ lệ 1:480, và 100 μ L của mỗi một mẫu pha loãng này sau đó được thêm vào một trong các khoang đầu trên bản kính pha loãng (có nghĩa là một khoang đầu nhận 100 μ L với tỷ lệ pha loãng 1:240 và một khoang đầu khác nhận 100 μ L với tỷ lệ pha loãng 1:480). Sau đó, tiến hành pha loãng các khoang còn lại của tấm bằng cách lấy ra 100 μ L từ mỗi một khoang kế tiếp và chuyển sang khoang bên cạnh trên bản kính. Mỗi một khoang được trộn trước khi chuyển sang khoang khác. Rửa tấm thí nghiệm bao gồm việc rửa bản kính ba lần với dung dịch đệm rửa. Tấm sau đó được niêm phong và ủ trong một giờ ở nhiệt độ 37°C trước khi được rửa 3 lần với dung dịch đệm rửa. Kháng thể thăm dò được sử dụng là kháng thể đơn dòng đến ORF2 của PCV2. Kháng thể này được pha loãng với tỷ lệ 1:300 trong dung dịch pha loãng, và 100 μ L kháng thể thăm dò pha loãng sau đó được thêm vào các khoang. Tấm sau đó được niêm phong và ủ trong một giờ ở nhiệt độ 37°C trước khi được rửa 3 lần với dung dịch đệm rửa. Chất pha loãng liên hợp sau đó được điều chế bằng cách thêm huyết thanh thỏ thông thường (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) vào dung dịch pha loãng nồng độ 1%. Kháng thể liên

hợp ở dê (H+1)-HRP chống chuột (Jackson ImmunoResearch) được pha loãng trong chất pha loãng liên hợp với tỷ lệ 1:10.000. 100 μ L kháng thể liên hợp pha loãng sau đó được thêm vào mỗi một khoang. Tấm sau đó được niêm phong và ủ trong 45 phút ở nhiệt độ 37°C trước khi được rửa 3 lần với dung dịch đệm rửa. 100 μ L chất nền (TMB Peroxidase Substrate, Kirkgaard và Perry Laboratories (KPL), Gaithersberg, MD), trộn với một lượng tương đương của Peroxidase Substrate B (KPL) được thêm vào mỗi một khoang. Tấm được ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. 100 μ L dung dịch 1N HCL sau đó được thêm vào tất cả các khoang để ngăn chặn phản ứng. Tấm sau đó được đưa qua một máy đọc ELISA. Các kết quả của thí nghiệm này được đưa ra trong Bảng 1 dưới đây:

Bảng 1

Ngày	Bình	ORF2 ở dạng viên kết (μ g)	ORF2 trong dịch nổi (μ g)
3	1	47,53	12
3	2	57,46	22
3	3	53,44	14
3	4	58,64	12
4	1	43,01	44
4	2	65,61	62
4	3	70,56	32
4	4	64,97	24
5	1	31,74	100
5	2	34,93	142
5	3	47,84	90
5	4	55,14	86

6	1	14,7	158
6	2	18,13	182
6	3	34,78	140
6	4	36,88	146
7	1	6,54	176
7	2	12,09	190
7	3	15,84	158
7	4	15,19	152

Các kết quả này chỉ ra rằng khi thời gian ủ được kéo dài, thì khả năng biểu hiện của ORF2 ra dịch nổi của các tế bào ly tâm và môi trường lớn hơn khả năng biểu hiện ở dạng viên kết của các tế bào ly tâm và môi trường. Theo đó, cho phép khả năng biểu hiện ORF2 tiếp diễn trong ít nhất 5 ngày và thu hồi ORF2 ở dịch nổi hơn là cho phép khả năng biểu hiện tiếp diễn trong ít hơn 5 ngày và thu hồi ORF2 từ các tế bào, tạo ra một mức tăng mạnh về sản lượng ORF2, và bước cải thiện đáng kể hơn các phương pháp trước.

Ví dụ 2

Ví dụ này đưa ra số liệu về mức hiệu quả của sáng chế đòi hỏi ở đây. Một bình to 1000mL được cấy với xấp xỉ $1,0 \times 10^6$ tế bào Sf+/ml trong 300mL môi trường Excell 420. Bình này sau đó được ủ ở nhiệt độ 27°C và được quay với tốc độ 100 vòng/phút. Tiếp theo, bình này được cấy với 10mL virus PCV2 ORF2/Bac p+6 (baculovirus tái tổ hợp chứa gen ORF2 của PCV2 đi qua thêm 6 lần trong tế bào côn trùng Sf9) với 0,1 MOI sau khi ủ trong 24 giờ.

Bình này sau đó được ủ ở nhiệt độ 27°C trong tổng cộng 6 ngày. Sau khi ủ, bình này được ly tâm và 3 mẫu thử thu được trên bề mặt được thu lại và được làm bất hoạt. Mẫu thu được trên bề mặt được làm bất hoạt bằng cách đưa nhiệt độ lên $37 \pm 2^\circ\text{C}$. Đối với mẫu thử

đầu tiên, 0,4M dung dịch 2-bromoetylenamin hydrobromit được vòng hoá thành 0,2M etylenimin nhị phân (BEI) trong 0,3N NaOH được thêm vào trên bề mặt để tạo ra 5mM nồng độ cuối cùng của BEI. Đối với mẫu thử thứ hai, 10mM BEI được thêm vào trên bề mặt. Đối với mẫu thử thứ ba, không thêm BEI vào trên bề mặt. Các mẫu thử này sau đó được khuấy liên tục trong 48 giờ. 1,0M dung dịch thiosulfat natri để tạo ra 5mM nồng độ tối thiểu cuối cùng được thêm vào để trung hoà bất kỳ một BEI còn lại nào. Số lượng ORF2 trong mỗi mẫu thử sau đó được định lượng sử dụng cùng một quy trình thí nghiệm ELISA như mô tả ở Ví dụ 1. Các kết quả của thí nghiệm có thể được thấy ở Bảng 2 dưới đây:

Bảng 2

Mẫu thử	ORF2 trong dịch nổi (μg)
1	78,71
2	68,75
3	83,33

Ví dụ này cho thấy rằng trung hoà với BEI không loại bỏ hoặc làm giảm lượng sản phẩm protein ORF2 tái tổ hợp của PCV2. Điều này được chứng minh bằng thực tế rằng không mất nhiều ORF2 ở dịch nổi từ nhiệt độ BEI hoặc nhiệt độ được tăng lên. Các chuyên gia sáng chế sẽ nhận thấy rằng ORF2 thu hồi là một sản phẩm protein bền vững.

Ví dụ 3

Ví dụ này cho thấy rằng sáng chế được nâng lên từ việc điều chế quy mô nhỏ ORF2 tái tổ hợp của PCV2 lên việc điều chế quy mô lớn ORF2 tái tổ hợp của PCV2. $5,0 \times 10^5$ tế bào/ml của tế bào SF+/ml trong 7000mL môi trường Excell 420 được cấy trong một lò phản ứng sinh học Applikon có dung tích 20.000mL. Môi trường và các tế bào sau đó được ủ ở nhiệt độ 27°C và được quay với tốc độ 100 vòng/phút trong 68 giờ tiếp theo. Tại giờ thứ 68, 41,3mL baculovirus MSV+3 của ORF2 của PCV2 được thêm vào 7000mL môi trường ExCell 420. Hỗn hợp tổng hợp này sau đó được thêm vào lò phản ứng sinh học. Trong 7 ngày tiếp theo, hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 27°C và được quay với tốc độ 100 vòng/phút.

Cứ 24 giờ, các mẫu thử từ lò phản ứng sinh học được chiết ra ở ngày thứ 4, sau khi gây nhiễm, và mỗi một mẫu thử được ly tâm. Dịch nổi trên bề mặt của các mẫu thử được bảo quản và lượng ORF2 sau đó được định lượng sử dụng phương pháp mật độ SDS-PAGE. Các kết quả của phương pháp này có thể được thấy trong Bảng 3 dưới đây:

Bảng 3

Ngày sau khi gây nhiễm	ORF2 trong dịch nổi ($\mu\text{g/mL}$)
4	29,33
5	41,33
6	31,33
7	60,67

Ví dụ 4

Ví dụ này thử nghiệm hiệu quả của 7 vắc xin thử nghiệm PCV2 và xác định giới hạn hiệu quả sau khi thể hiện trên dòng virut của PCV2. Một trăm linh tám (108) cesarean bắt nguồn từ sữa non của lợn (CDCD), từ 9-14 ngày tuổi, được chia ngẫu nhiên thành 9 nhóm có kích thước tương đương. Bảng 4 đưa ra đề cương nghiên cứu chung cho Ví dụ này.

Bảng 4. Đề cương nghiên cứu chung

Nhóm	Số con lợn	Thuốc điều trị	Ngày điều trị	KLH/ICFA ở ngày thứ 21 và ngày thứ 27	Phản ứng với PCV2 có virut ở ngày thứ 24	Mổ xác ở ngày thứ 49
1	12	Vắc xin PCV2 số 1 – (vORF2 16 μg)	0	+	+	+

2	12	Vắcxin PCV2 số 2 – (vORF2 8µg)	0	+	+	+
3	12	Vắcxin PCV2 số 3 – (vORF2 4µg)	0	+	+	+
4	12	Vắcxin PCV2 số 4 – (vORF2 16µg)	0	+	+	+
5	12	Vắcxin PCV2 số 5 – (vORF2 8µg)	0	+	+	+
6	12	Vắcxin PCV2 số 6 – (vORF2 4µg)	0	+	+	+
7	12	Vắcxin PCV2 số 7 – (virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt)	0	+	+	+
8	12	Kiểm tra không phản ứng	N/A	+	+	+
9	12	Nhóm kiểm tra âm không nghiêm ngặt	N/A	+	-	+

vORF2 = ORF2 virus tách ra; rORF2 = baculovirus tái tổ hợp biểu hiện ORF2; virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt = virus PCV2 lớn lên trong môi trường cấy tế bào thích hợp

Bảy nhóm (từ nhóm 1-7) nhận liều lượng polypeptit ORF2 của PCV2, một trong những nhóm hoạt động như một phương pháp phòng trừ quyết định và không nhận ORF2 của PCV2, và nhóm khác hoạt động như một nhóm phòng trừ âm và cũng không nhận ORF2 của PCV2. Vào ngày 0, các nhóm từ 1-7 được xử lý với vắc xin ấn định. Lợn ở nhóm 7 được xử lý với liều lượng cao vào ngày 14. Lợn được quan sát những kết quả có hại và những phản ứng tại vị trí gây nhiễm sau khi tiêm chủng và vào ngày 19, lợn được đưa sang vị trí nghiên cứu thứ hai. Tại vị trí nghiên cứu thứ hai này, các nhóm từ 1-8 là nhóm ở trong một toà nhà trong khi nhóm 9 ở một toà nhà riêng biệt. Tất cả số lợn này nhận hemoxyanin

bám lỗ khoá (KLH)/tá chất Freund không toàn vẹn (ICFA) vào ngày 21 và 27 và vào ngày 24, các nhóm từ 1-8 được thử với PCV2 virut.

Trước và sau khi thử, các mẫu máu được thu thập để đo huyết thanh PCV2. Sau khi thử, số liệu về thể trọng để xác định mức tăng trọng trung bình hàng ngày (ADWG), và các triệu chứng lâm sàng, cũng như các mẫu gạc ở mũi để xác định sự rơi xuống mũi của PCV2, được thu thập. Vào ngày 49, tất cả những con lợn còn sống sót được mổ xác, phổi được đo mức thương tổn, và các mô chọn lọc được bảo quản trong formalin để thử nghiệm mô hoá học miễn dịch (IHC) vào một ngày sau đó.

Các tài liệu và phương pháp

Đây là một nghiên cứu khả thi về việc dùng vắc xin che từng phần tiến hành ở lợn CDCD, từ 9 đến 14 ngày tuổi vào ngày 0. Để đưa vào trong nghiên cứu, mức chuẩn IFA của PCV2 của lợn cái là $\leq 1:1000$. Ngoài ra, tình trạng huyết thanh của lợn cái được lấy từ đàn lợn âm tính với PRRS. Hai mươi tám (28) con lợn cái được thử nghiệm tình trạng huyết thanh PCV2. Mười bốn (14) con lợn cái có mức chuẩn PCV2 ≤ 1000 và được chuyển sang vị trí nghiên cứu đầu tiên. Một trăm mười (110) con lợn con được phẫu thuật và được dùng để nghiên cứu vào ngày -4. Vào ngày -3, 108 con lợn CDCD ở vị trí nghiên cứu đầu tiên được cân, được nhận dạng với cái thẻ đeo trên tai, bị chặn bởi vật nặng và được đưa ngẫu nhiên vào các nhóm từ 1-9, như trình bày ở trên trong bảng 4. Nếu trong bất kỳ một cuộc họp nào về động vật thử nghiệm, tiêu chí đưa ra được ghi trong nghiên cứu và sau đó được loại ra vì bất kỳ lý do nào, thì người nghiên cứu và người giám sát thảo luận để xác định việc sử dụng số liệu thu thập từ động vật trong phân tích cuối cùng. Ngày đưa lợn con vào nghiên cứu bị loại ra và lý do loại ra này được ghi trong tài liệu. Ban đầu, không có lợn cái nào bị loại ra. Tổng số 108 trong số 110 con lợn được ngẫu nhiên chuyển sang một trong số 9 nhóm vào ngày -3. Hai con lợn nhỏ nhất (Số 17 và 19) không được chuyển sang một nhóm và được dùng để dự phòng, nếu cần. Trong suốt quá trình nghiên cứu, một vài động vật bị loại ra. Con lợn số 82 (Nhóm 9) vào ngày -1, Con lợn số 56 (Nhóm 6) vào ngày 3, Con lợn số 53 (Nhóm 9) vào ngày 4, Con lợn số 28 (Nhóm 8) vào ngày 8, Con lợn số 69 (Nhóm 8) vào ngày 7, và Con lợn số 93 (Nhóm 4) vào ngày 9, lần lượt tử vong trước khi dùng vắc xin. Sáu con lợn này không được đưa vào trong kết quả nghiên cứu cuối cùng.

Con lợn số 17 (một trong số những con lợn dự phòng) được đưa vào Nhóm 9. Con lợn dự phòng còn lại, con lợn số 19, được loại ra khỏi nghiên cứu.

Các hợp phần đưa ra cho mỗi nhóm như sau: Nhóm 1 dự kiến sẽ dùng 1ml ORF2 virus (vORF2) chứa 16 μ g ORF2/ml. Hợp phần này được điều chế bằng cách trộn 10,24ml ORF2 virus ($256\mu\text{g}/25\mu\text{g}/\text{ml} = 10,24\text{ml vORF2}$) với 3,2ml của 0,5% Carbopol và 2,56ml muối đệm photphat có nồng độ pH là 7,4. Cách làm này tạo ra 16ml hợp phần của nhóm 1. Nhóm 2 dự kiến sẽ dùng 1ml vORF2 chứa 8 μ g vORF2/ml. Hợp phần này được điều chế bằng cách trộn 5,12ml vORF2 ($128\mu\text{g}/25\mu\text{g}/\text{ml} = 5,12\text{ml vORF2}$) với 3,2ml của 0,5% Carbopol và 7,68ml muối đệm photphat có nồng độ pH là 7,4. Cách làm này tạo ra 16ml hợp phần của nhóm 2. Nhóm 3 dự kiến sẽ dùng 1ml vORF2 chứa 4 μ g vORF2/ml. Hợp phần này được điều chế bằng cách trộn 2,56ml vORF2 ($64\mu\text{g}/25\mu\text{g}/\text{ml} = 2,56\text{ml vORF2}$) với 3,2ml của 0,5% Carbopol và 10,24ml muối đệm photphat có nồng độ pH là 7,4. Cách làm này tạo ra 16ml hợp phần cho nhóm 3. Nhóm 4 dự kiến sẽ dùng 1ml ORF2 tái tổ hợp (rORF2) chứa 16 μ g rORF2/ml. Hợp phần này được điều chế bằng cách trộn 2,23ml rORF2 ($512\mu\text{g}/230\mu\text{g}/\text{ml} = 2,23\text{ml rORF2}$) với 6,4ml của 0,5% Carbopol và 23,37ml muối đệm photphat có nồng độ pH là 7,4. Cách làm này tạo ra 32ml hợp phần cho nhóm 4. Nhóm 5 dự kiến sẽ dùng 1ml rORF2 chứa 8 μ g rORF2/ml. Hợp phần này được điều chế bằng cách trộn 1,11ml rORF2 ($256\mu\text{g}/230\mu\text{g}/\text{ml} = 1,11\text{ml rORF2}$) với 6,4ml của 0,5% Carbopol và 24,49ml muối đệm photphat có nồng độ pH là 7,4. Cách làm này tạo ra 32ml hợp phần cho nhóm 5. Nhóm 6 dự kiến dùng 1ml rORF2 chứa 8 μ g rORF2/ml. Hợp phần này được điều chế bằng cách trộn 0,56ml rORF2 ($128\mu\text{g}/230\mu\text{g}/\text{ml} = 0,56\text{ml rORF2}$) với 6,4ml của 0,5% Carbopol và 25,04ml muối đệm photphat có nồng độ pH là 7,4. Cách làm này tạo ra 32ml hợp phần cho nhóm 6. Nhóm 7 dự kiến dùng 2ml vắc xin toàn bộ tế bào bị tiêu diệt của PCV2 (PCV2 KV) chứa MAX PCV2 KV. Cách làm này được điều chế bằng cách trộn 56ml PCV2 KV với 14ml của 0,5% Carbopol. Cách làm này tạo ra 70ml hợp phần cho nhóm 7. Cuối cùng, nhóm 8 dự kiến dùng KLH với liều lượng 0,5 μ g/ml hoặc 1,0 μ g/ml/2ml. Cách làm này được điều chế bằng cách trộn 40,71ml KLH ($7,0\mu\text{g protein}/\text{ml}$ với liều lượng $0,5\mu\text{g}/\text{ml} = 570\text{ml}$ ($7,0\mu\text{g}/\text{ml})(x) = (0,5)(570\text{ml})$), 244,29ml muối đệm photphat có nồng độ pH là 7,4, và 285ml tá chất Freund. Bảng 5 mô tả khung thời gian cho các hoạt động chính của Ví dụ này.

Bảng 5. Các hoạt động của nghiên cứu

Ngày nghiên cứu	Hoạt động nghiên cứu
-4, 0 đến 49	Quan sát tổng thể sức khỏe và các triệu chứng lâm sàng
-3	Cân; Ngẫu nhiên hoá chia thành các nhóm; Thu thập các mẫu máu từ tất cả các con lợn
0	Kiểm tra sức khỏe; Lăn lượt cho các Nhóm từ 1-7 dùng IVP từ số 1-7
0-7	Quan sát các con lợn để phản ứng vị trí gây nhiễm
14	Cho nhóm 7 dùng vắc xin số 7 của PCV2; Các mẫu máu từ tất cả các con lợn
14-21	Quan sát nhóm 7 để phản ứng vị trí gây nhiễm
16-19	Cho các con lợn dùng kháng sinh (mất số liệu)
19	Các con lợn được chuyển từ vị trí thử nghiệm đầu tiên sang vị trí thử nghiệm thứ hai
21	Cho các nhóm từ 1-9 dùng KLH/ICFA
24	Thu thập các mẫu máu và mẫu gạc ở mũi từ tất cả các con lợn; Cân tất cả các con lợn; Cho các nhóm từ 1-8 dùng thử PCV2
25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47	Thu thập các mẫu gạc ở mũi từ tất cả các con lợn
27	Cho các nhóm từ 1-9 dùng KLH/ICFA
31	Thu thập các mẫu máu từ tất cả các con lợn
49	Thu thập các mẫu máu và gạc ở mũi từ tất cả các con lợn; Cân tất cả các con lợn; Mô xác tất cả các con lợn; Những tổn thương nặng thường nằm trên các chỗ loét vàng da và ở dạ dày; Phổi được đo mức tổn thương; Các mẫu mô sạch và các mẫu mô cố định bằng formalin được bảo quản; Giai đoạn sống của nghiên cứu hoàn tất

Sau khi hoàn tất giai đoạn sống của nghiên cứu, các mô cố định bằng formalin được nhà nghiên cứu bệnh học xét nghiệm bằng mô hoá chất miễn dịch (IHC) để tìm ra kháng thể PCV2, các mẫu máu được ước lượng mức huyết thanh PCV2, các mẫu gạc ở mũi được ước lượng mức rơi PCV2, và mức tăng trọng trung bình hàng ngày (ADWG) được xác định từ ngày 24 đến ngày 49.

Các động vật ở vị trí nghiên cứu đầu tiên trong các chuồng riêng biệt ở 5 phòng từ lúc sinh ra đến xấp xỉ 11 ngày tuổi (xấp xỉ ngày 0 của nghiên cứu). Mỗi một phòng giống nhau về cách bày trí và bao gồm các chuồng bằng thép không gỉ được xếp riêng với không khí được làm nóng và được lọc, được cung cấp riêng rẽ tới từng đơn vị tách biệt. Mỗi một phòng có một hệ thống sưởi và thông gió riêng, do đó phòng ngừa lây nhiễm không khí giữa các phòng. Các động vật ở trong hai toà nhà khác nhau ở vị trí nghiên cứu thứ hai. Nhóm 9 (Nhóm kiểm soát âm tính nghiêm ngặt) ở riêng trong một toà nhà mới được hoàn thành chuyển đổi và các nhóm từ 1-8 ở trong một toà nhà dành cho động vật giai đoạn bú mẹ mới được chuyển đổi. Mỗi một nhóm được ở trong một trại riêng (từ 11-12 con lợn/trại) và mỗi một trại dành xấp xỉ 3,0 Ft²/con lợn. Mỗi một trại ở trên một tầng cao có sàn bằng nhựa. Một cái hố dưới các trại có tác dụng như một thùng chứa phân và rác thải. Mỗi một toà nhà có một hệ thống sưởi và thông gió riêng của nó, với ít khả năng lây nhiễm không khí giữa các toà nhà.

Ở vị trí nghiên cứu đầu tiên, các con lợn con được ăn một khẩu phần sữa có công thức đặc biệt từ khi sinh ra đến xấp xỉ 3 tuần tuổi. Tất cả số lợn con này sẽ dùng một loại thực phẩm rắn, được trộn đặc biệt vào ngày 19 (xấp xỉ 4^{1/2} tuần tuổi). Ở vị trí nghiên cứu thứ hai, tất cả số lợn con được ăn một thực phẩm trộn không tẩm thuốc có sẵn để bán thích hợp với độ tuổi và cân nặng của chúng, một cách tùy ý. Nước ở cả hai vị trí nghiên cứu cũng có thể dùng, một cách tùy ý.

Tất cả số lợn thử nghiệm được dùng Vitamin E vào ngày -2, gây nhiễm chứa sắt vào ngày -1 và dùng NAXCEL® (1,0mL, IM, vào đùi luân phiên) vào các ngày 16, 17, 18 và 19. Ngoài ra, con lợn số 52 (Nhóm 9) được gây nhiễm chứa sắt vào ngày 3, con lợn số 45 (Nhóm 6) được gây nhiễm chứa sắt vào ngày 11, con lợn số 69 (Nhóm 8) được dùng NAXCEL® vào ngày 6, con lợn số 74 (Nhóm 3) được dùng dexametazon và penixilin vào

ngày 14, và con lợn số 51 (Nhóm 1) được dùng dexametazon và penixilin vào ngày 13 và dùng NAXCEL® vào ngày 14 vì một số lý do về sức khỏe.

Khi ở cả hai vị trí nghiên cứu, các con lợn được chăm sóc thú y. Kiểm tra sức khỏe động vật được tiến hành vào ngày 0 và được lưu lại trong mẫu hồ sơ kiểm tra sức khỏe. Tất cả các động vật ở trong tình trạng sức khỏe và dinh dưỡng tốt trước khi dùng vắc xin như được xác định bằng quan sát vào ngày 0. Tất cả các động vật thử nghiệm được quan sát có tình trạng sức khỏe và dinh dưỡng tốt trước khi thử nghiệm. Xác và mô động vật được sắp xếp. Sắp xếp cuối cùng các động vật nghiên cứu được lưu lại trên hồ sơ sắp xếp động vật.

Vào ngày 0, các con lợn ở các nhóm từ 1-6 nhận 1,0mL Vắc xin PCV2 từ 1-6, một cách lần lượt, IM ở vùng cổ trái sử dụng ống tiêm khoá Luer vô trùng dung tích 3,0mL và một kim tiêm vô trùng 20g x 1/2". Các con lợn ở nhóm 7 nhận 2,0mL IM Vắc xin PCV2 số 7 ở vùng cổ trái sử dụng ống tiêm khoá Luer vô trùng dung tích 3,0mL và một kim tiêm vô trùng 20g x 1/2". Vào ngày 14, các con lợn ở nhóm 7 nhận 2,0mL IM Vắc xin PCV2 số 7 ở vùng cổ phải sử dụng ống tiêm khoá Luer vô trùng dung tích 3,0mL và một kim tiêm vô trùng 20g x 1/2".

Vào ngày 21, tất cả số lợn thử nghiệm nhận 2,0mL IM KLH/ICFA ở vùng đùi phải sử dụng ống tiêm khoá Luer vô trùng dung tích 3,0mL và một kim tiêm vô trùng 20g x 1". Vào ngày 27, tất cả số lợn thử nghiệm nhận 2,0mL KLH/ICFA ở vùng đùi trái sử dụng ống tiêm khoá Luer vô trùng dung tích 3,0mL và một kim tiêm vô trùng 20g x 1".

Vào ngày 24, các con lợn ở các nhóm từ 1-8 nhận 1,0mL IM vật liệu thử nghiệm PCV2 ISUVDL ($5,11 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$) ở vùng cổ trái sử dụng ống tiêm khoá Luer vô trùng dung tích 3,0mL và một kim tiêm vô trùng 20g x 1". Thêm 1,0mL của cùng một vật liệu được tiêm vào mỗi một con lợn (0,5mL/lỗ mũi) sử dụng ống tiêm khoá Luer vô trùng dung tích 3,0mL và ống thông dò mũi.

Số lợn thử nghiệm được quan sát sức khỏe tổng thể và các kết quả bất lợi hàng ngày vào ngày -4 và từ ngày 0 đến ngày 19. Các quan sát này được ghi lại trong hồ sơ quan sát lâm sàng. Tất cả số lợn thử nghiệm được quan sát từ ngày 0 đến ngày 7, và nhóm 7 được quan sát thêm từ ngày 14 đến ngày 21, để phản ứng vị trí gây nhiễm. Mức tăng trọng trung bình hàng ngày được xác định bằng cách cân từng con lợn trên một cái cân được định cỡ

vào các ngày -3, 24 và 49, hoặc vào ngày mà một con lợn bị phát hiện là tử vong sau khi thử nghiệm. Thẻ trọng được ghi lại trên mẫu thẻ trọng. Thẻ trọng vào ngày -3 được dùng để hạn chế số lợn trước khi chia ngẫu nhiên. Số liệu về trọng lượng vào ngày 24 và ngày 49 được dùng để xác định mức tăng trọng trung bình hàng ngày (ADWG) cho từng con lợn trong suốt các điểm thời gian này. Đối với những con lợn tử vong sau khi thử nghiệm và trước ngày 49, ADWG được điều chỉnh để mô tả ADWG từ ngày 24 đến ngày tử vong.

Để xác định huyết thanh PCV2, toàn bộ máu trong tĩnh mạch được thu thập từ từng con lợn con từ xoang tĩnh mạch của ổ mắt vào các ngày -3 và 14. Đối với từng con lợn con, máu được thu thập từ xoang tĩnh mạch của ổ mắt bằng cách cắm một ống mao dẫn vô trùng vào giữa khoé mắt của một mắt và hút xấp xỉ 3,0mL tổng lượng máu vào một ống tách huyết thanh có dung tích 4,0mL (SST). Vào các ngày 24, 31, và 49, toàn bộ lượng máu trong tĩnh mạch từ từng con lợn được thu thập từ tĩnh mạch chủ trước sử dụng một kim tiêm vô trùng Vacutainer kích thước 18g x 1 1/2" (Becton Dickinson và Công ty, Franklin Lakes, New Jersey), một hộp đựng kim Vacutainer và 13mL SST. Việc thu thập máu tại từng điểm thời gian được ghi lại trên hồ sơ thu thập mẫu. Máu trong từng SST được cô lại, từng SST sau đó được dốc xuống và thu được huyết thanh. Huyết thanh thu được được chuyển sang một ống vô trùng và giữ ở nhiệt độ $-70 \pm 10^{\circ}\text{C}$ cho đến khi được thử nghiệm vào một ngày sau đó. Các mẫu huyết thanh được nhân viên BIVI-R&D thử nghiệm để có kháng thể PCV2.

Các con lợn được quan sát một lần hàng ngày từ ngày 20 đến ngày 49 để phát hiện những triệu chứng lâm sàng và các quan sát lâm sàng được ghi lại trên hồ sơ quan sát lâm sàng.

Để thử nghiệm sự phát tán qua mũi của PCV2, vào các ngày 24, 25, và sau đó là tất cả các ngày nghiên cứu lẻ khác cho đến và bao gồm cả ngày, một miếng gạc vô trùng bằng sợi tổng hợp được nhét vào trong mũi, hoặc là lỗ mũi trái, hoặc là lỗ mũi phải của mỗi một con lợn (1 miếng gạc/1 con lợn) ở mức vô trùng có thể, ngoáy xung quanh lỗ mũi trong vài giây và sau đó bỏ đi. Mỗi một miếng gạc sau đó được đặt vào trong ống nghiệm khoá nắp vô trùng chứa 1,0mL môi trường EMEM với 2% IFBS, 500 đơn vị/mL Penixilin, 500 $\mu\text{g/mL}$ Streptomycin và 2,5 $\mu\text{g/mL}$ Fungizon. Miếng gạc bị làm vụn ra trong ống nghiệm, và ống

nghiệm được niêm phong và dán nhãn thích hợp với số thứ tự của động vật, số nghiên cứu, ngày thu thập, ngày nghiên cứu và "miếng gạc mũi. Ống nghiệm niêm phong được giữ ở nhiệt độ $-40\pm 10^{\circ}\text{C}$ cho đến khi được chuyển qua đêm trên đá đến BIVI-St. Joseph. Các mẫu thu thập miếng gạc mũi được ghi lại trên mẫu thu thập mẫu miếng gạc. BIVI-R&D tiến hành tách virus về mặt số lượng (VI) thử nghiệm PCV2 trên các mẫu gạc mũi. Các kết quả được thể hiện trong các giá trị $\log_{10}$. Giá trị $\log 1,3$ hoặc thấp hơn được coi là âm tính và bất kỳ một giá trị nào lớn hơn $\log 1,3$ được coi là dương tính.

Các con lợn tử vong (số 28, 52, 56, 69, 82, và 93) ở vị trí nghiên cứu đầu tiên được mổ xác đến mức cần thiết để xác định phép chuẩn đoán. Những tổn thương lớn được ghi lại và không có mô nào được lưu lại từ những con lợn này. Ở vị trí nghiên cứu thứ hai, các con lợn tử vong trước ngày 49 (số 45, 23, 58, 35), các con lợn được phát hiện tử vong vào ngày 49 trước khi tử vong không đau đớn (số 2, 43) và các con lợn tử vong không đau đớn vào ngày 49 được mổ xác. Tất cả các tổn thương lớn được ghi chép và phân trăm thủy phổi bị tổn thương được ghi lại trên mẫu hồ sơ mổ xác.

Từ mỗi một con lợn trong số 103 con lợn được mổ xác ở vị trí nghiên cứu thứ hai, một mẫu mô của amidan, phổi, tim, gan, u bạch huyết ở màng treo ruột, thận và u bạch huyết ở bẹn được đặt vào một bình riêng với 10% formalin đậm; trong khi đó các mẫu mô khác từ các tế bào đã nói ở trên được đặt vào một Whirl-pak (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, UK) và mỗi một Whirl-pak được đặt trên đá. Mỗi một bình được dán nhãn thích hợp. Các mẫu thu thập được ghi lại trên mẫu báo cáo mổ xác. Sau đó, các mẫu mô được cố định bằng formalin và một mẫu yêu cầu chẩn đoán được đưa ra để thử nghiệm IHC. Thử nghiệm IHC được tiến hành theo các quy trình tiêu chuẩn ISU của phòng thí nghiệm để nhận mẫu các mẫu, mẫu và chuẩn bị bản kính, và các kỹ thuật gây nhiễm. Các mô lành trong Whirl-pak mang các bao đá đến máy giám sát nghiên cứu để cất trữ (ở nhiệt độ $-70^{\circ}\pm 10^{\circ}\text{C}$) và có thể sử dụng sau này. Các mô được cố định bằng formalin được nhà nghiên cứu bệnh học kiểm tra để tìm ra PCV2 bằng IHC và được cho điểm sử dụng hệ thống cho điểm dưới đây: 0 = không có gì; 1 = gây nhiễm dương tính ít, tại một vài vị trí; 2 = gây nhiễm dương tính vừa phải, tại nhiều vị trí; và 3 = gây nhiễm dương tính nhiều, lan rộng qua toàn bộ mô. Do thực tế rằng nhà nghiên cứu bệnh học không thể phân biệt rõ ràng LN

ở bẹn từ LN ở màng treo ruột, nên các kết quả của các mô này được dán nhãn đơn giản là U Bạch huyết và cho điểm cao nhất cho một trong hai mô/động vật.

Kết quả

Các kết quả cho ví dụ này được đưa ra dưới đây. Kết quả cho thấy một con lợn từ nhóm 9 tử vong trước ngày 0, và thêm 5 con lợn tử vong sau khi dùng vắc xin (1 con từ nhóm 4; một con từ nhóm 6; 2 con từ nhóm 8; và 1 con từ nhóm 9). Việc kiểm tra sau khi tử vong cho thấy tất cả sáu con lợn tử vong do nằm ở khu vực nhiễm bệnh không được sử dụng vắc xin hoặc PMWS. Ngoài ra, không có kết quả bất lợi nào hoặc phản ứng tại vị trí nhiễm bệnh nào được ghi lại với tất cả các nhóm.

Các kết quả tăng trọng trung bình hàng ngày (ADWG) được đưa ra dưới đây trong bảng 6. Nhóm 9, nhóm kiểm soát âm tính nghiêm ngặt, có ADWG cao nhất ($1,06 \pm 0,17$ lbs/ngày), theo sau là nhóm 5 ($0,94 \pm 0,22$ lbs/ngày), nhóm nhận một liều lượng là $8\mu\text{g}$ rORF2. Nhóm 3, nhóm nhận một liều lượng là $4\mu\text{g}$ vORF2, có ADWG thấp nhất ($0,49 \pm 0,21$ lbs/ngày), theo sau là nhóm 7 ($0,50 \pm 0,15$ lbs/ngày), nhóm nhận 2 liều vắc xin làm tử vong động vật.

Bảng 6. Tóm tắt mức tăng trọng trung bình hàng ngày theo nhóm (ADWG)

Nhóm	Biện pháp xử lý	N	ADWG – lbs/ngày (Từ ngày 24 đến ngày 49) hoặc điều chỉnh để lợn tử vong trước ngày 29
1	vORF2 – $16\mu\text{g}$ (1 liều lượng)	12	$0,87 \pm 0,29$ lbs/ngày
2	vORF2 – $8\mu\text{g}$ (1 liều lượng)	12	$0,70 \pm 0,32$ lbs/ngày
3	vORF2 – $4\mu\text{g}$ (1 liều lượng)	12	$0,49 \pm 0,21$ lbs/ngày
4	rORF2 – $16\mu\text{g}$ (1 liều lượng)	11	$0,84 \pm 0,30$ lbs/ngày
5	rORF2 – $8\mu\text{g}$ (1 liều lượng)	12	$0,94 \pm 0,22$ lbs/ngày
6	rORF2 – $4\mu\text{g}$ (1 liều lượng)	11	$0,72 \pm 0,25$ lbs/ngày
7	KV (2 liều lượng)	12	$0,50 \pm 0,15$ lbs/ngày

8	Kiểm soát thử nghiệm	10	$0,76 \pm 0,19$ lbs/ngày
9	Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt	11	$1,06 \pm 0,17$ lbs/ngày

vORF2 = ORF2 virus được tách; rORF2 = ORF2 biểu hiện của baculovirus tái tổ hợp; virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt = virus PCV2 phát triển trong môi trường cấy tế bào thích hợp

Các kết quả huyết thanh của PCV2 được đưa ra dưới đây trong Bảng 7. Tất cả chín nhóm huyết thanh âm tính với PCV2 vào ngày -3. Vào ngày 14, tất cả các nhóm nhận vắc xin vORF2 có mức chuẩn cao nhất, trong phạm vi từ 187,5 đến 529,2. Các con lợn nhận vắc xin virus tiêu diệt có mức chuẩn cao nhất tiếp theo, theo sau là các nhóm nhận vắc xin rORF2. Các nhóm 8 và 9 vẫn huyết thanh âm tính vào thời điểm này. Vào ngày 24 và ngày 31, các con lợn nhận vắc xin vORF2 tiếp tục cho thấy có phản ứng huyết thanh mạnh, theo sát là nhóm nhận 2 liều vắc xin virus tiêu diệt. Các con lợn nhận vắc xin rORF2 có phản ứng huyết thanh chậm hơn và các nhóm 8 và 9 tiếp tục huyết thanh âm tính. Vào ngày 49, các con lợn nhận vắc xin vORF2, 2 liều vắc xin virus tiêu diệt và liều rORF2 thấp nhất biểu hiện phản ứng huyết thanh mạnh nhất. Các con lợn nhận 16 μ g và 8 μ g vắc xin rORF2 có mức chuẩn IFA cao hơn một chút so với kiểm soát thử nghiệm. Nhóm 9 vào ngày 49 biểu hiện phản ứng huyết thanh mạnh.

Bảng 7. Tóm tắt mức chuẩn IFA của PCV2 theo nhóm

MỨC CHUẨN IFA TRUNG BÌNH

Nhóm	Biện pháp xử lý	Ngày -3	Ngày 14	Ngày 24	Ngày 31**	Ngày 49***
1	vORF2 – 16 μ g (1 liều lượng)	50,0	529,2	4400,0	7866,7	11054,5
2	vORF2 – 8 μ g (1 liều lượng)	50,0	500,0	3466,7	6800,0	10181,8
3	vORF2 – 4 μ g (1 liều lượng)	50,0	187,5	1133,3	5733,3	9333,3
4	rORF2 – 16 μ g (1 liều lượng)	50,0	95,5	1550,0	3090,9	8000,0
5	rORF2 – 8 μ g (1 liều lượng)	50,0	75,0	887,5	2266,7	7416,7
6	rORF2 – 4 μ g (1 liều lượng)	50,0	50,0	550,0	3118,2	10570,0

7	KV (2 liều lượng)	50,0	204,2	3087,5	4620,8	8680,0
8	Kiểm soát thử nghiệm	50,0	55,0	50,0	50,0	5433,3
9	Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt	50,0	59,1	59,1	54,5	6136,4

vORF2 = ORF2 virus được tách; rORF2 = ORF2 biểu hiện của baculovirus tái tổ hợp; virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt = virus PCV2 phát triển trong môi trường cấy tế bào thích hợp

* Đối với mục đích tính toán, mức chuẩn IFA ≤ 100 được gọi là mức chuẩn "50"; mức chuẩn IFA ≥ 6400 được gọi là mức chuẩn "12,800".

** Ngày thử nghiệm

*** Ngày mổ xác

Các kết quả từ quan sát trên lâm sàng sau khi thử nghiệm được đưa ra dưới đây trong bảng 8. Bảng tóm tắt các kết quả này bao gồm việc quan sát lỗi sinh hoạt bất thường, hô hấp, ho, tiêu chảy bất thường. Bảng 9 bao gồm các kết quả từ bảng tóm tắt toàn bộ phạm vi ảnh hưởng của các triệu chứng lâm sàng của nhóm và bảng 10 bao gồm các kết quả từ bảng tóm tắt tỷ lệ tử vong của nhóm sau khi thử nghiệm. Triệu chứng lâm sàng phổ biến nhất ghi trong nghiên cứu này là ảnh hưởng bất thường, được cho là nhẹ đối với trạng thái hôn mê nghiêm trọng. Các con lợn nhận 2 liều vORF2 ít hơn, các con lợn nhận 16 μ g rORF2 và các con lợn nhận 2 liều vắc xin KV có tỷ lệ ảnh hưởng $\geq 27,3\%$. Các con lợn nhận 8 μ g rORF2 và nhóm kiểm soát âm tính nghiêm ngặt không có tác động bất thường. Không có một con lợn nào trong nghiên cứu này có biểu hiện hô hấp bất thường. Chứng ho được ghi chép thường xuyên trong tất cả các nhóm (nằm trong khoảng từ 0 đến 25%), như là bệnh tiêu chảy (0-20%). Không có triệu chứng lâm sàng nào được ghi chép là đặc trưng bệnh cho PMWS.

Ảnh hưởng toàn bộ của các triệu chứng lâm sàng khác nhau giữa các nhóm. Nhóm nhận vắc xin vORF2, nhóm nhận 16 μ g rORF2, nhóm nhận 2 liều vắc xin KV và nhóm kiểm soát thử nghiệm có ảnh hưởng của toàn bộ các triệu chứng lâm sàng cao nhất ($\geq 36,4\%$). Nhóm kiểm soát âm tính nghiêm ngặt, nhóm nhận 8 μ g rORF2 và nhóm nhận 4 μ g rORF2 có tổng tỷ lệ ảnh hưởng của các triệu chứng lâm sàng là 0%, 8,3% và 9,1%, một cách lần lượt.

Tổng tỷ lệ tử vong giữa các nhóm cũng khác nhau. Nhóm nhận 2 liều vắc xin KV có tỷ lệ tử vong cao nhất (16,7%); trong khi các nhóm nhận 4 μ g vORF2, 16 μ g rORF2, hoặc 8 μ g rORF2 và nhóm kiểm soát âm tính nghiêm ngặt có tỷ lệ tử vong là 0%.

Bảng 8. Tóm tắt quan sát sinh hoạt bất thường, hô hấp, ho, và tiêu chảy bất thường ở các nhóm

Nhóm	Biện pháp xử lý	N	Hành vi bất thường ¹	Hành vi bất thường ²	Ho ³	Tiêu chảy ⁴
1	vORF2 – 16 μ g (1 liều lượng)	12	2/12 (16,7%)	0/12 (0%)	3/12 (25%)	2/12 (16,7%)
2	vORF2 – 8 μ g (1 liều lượng)	12	4/12 (33,3%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	1/12 (8,3%)
3	vORF2 – 4 μ g (1 liều lượng)	12	8/12 (66,7%)	0/12 (0%)	2/12 (16,7%)	1/12 (8,3%)
4	rORF2 – 16 μ g (1 liều lượng)	11	3/11 (27,3%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	2/11 (18,2%)
5	rORF2 – 8 μ g (1 liều lượng)	12	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	0/12 (0%)
6	rORF2 – 4 μ g (1 liều lượng)	11	1/11 (9,1%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/12 (0%)
7	KV (2 liều lượng)	12	7/12 (58,3)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)
8	Kiểm soát thử nghiệm	10	1/10 (10%)	0/10 (0%)	2/10 (20%)	2/10 (20%)
9	Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt	11	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

vORF2 = ORF2 virus được tách; rORF2 = ORF2 biểu hiện của baculovirus tái tổ hợp; virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt = virus PCV2 phát triển trong môi trường cấy tế bào thích hợp

¹ Toàn bộ số lợn trong mỗi nhóm có biểu hiện sinh hoạt bất thường ít nhất một ngày

² Toàn bộ số lợn trong mỗi nhóm có biểu hiện hô hấp bất thường ít nhất một ngày

³ Toàn bộ số lợn trong mỗi nhóm có biểu hiện ho ít nhất một ngày

⁴ Toàn bộ số lợn trong mỗi nhóm có biểu hiện tiêu chảy ít nhất một ngày

Bảng 9. Tóm tắt ảnh hưởng toàn bộ của các triệu chứng lâm sàng ở các nhóm

Nhóm	Biện pháp xử lý	N	Ảnh hưởng của lợn với các triệu chứng lâm sàng ¹	Tỷ lệ mắc
1	vORF2 – 16µg (1 liều lượng)	12	5	41,7%
2	vORF2 – 8µg (1 liều lượng)	12	5	41,7%
3	vORF2 – 4µg (1 liều lượng)	12	8	66,7%
4	rORF2 – 16µg (1 liều lượng)	11	4	36,4%
5	rORF2 – 8µg (1 liều lượng)	12	1	8,3%
6	rORF2 – 4µg (1 liều lượng)	11	1	9,1%
7	KV (2 liều lượng)	12	7	58,3%
8	Kiểm soát thử nghiệm	10	4	40%
9	Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt	11	0	0%

vORF2 = ORF2 virus được tách; rORF2 = ORF2 biểu hiện của baculovirus tái tổ hợp; virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt= virus PCV2 phát triển trong môi trường cấy tế bào thích hợp

¹ Toàn bộ số lợn trong mỗi nhóm có biểu hiện triệu chứng lâm sàng ít nhất một ngày

Bảng 10. Tóm tắt tỷ lệ tử vong của các nhóm sau thử nghiệm

Nhóm	Biện pháp xử lý	N	Tử vong sau thử nghiệm	Tỷ lệ tử vong
1	vORF2 – 16µg (1 liều lượng)	12	1	8,3%
2	vORF2 – 8µg (1 liều lượng)	12	1	8,3%

3	vORF2 – 4 μ g (1 liều lượng)	12	0	0%
4	rORF2 – 16 μ g (1 liều lượng)	11	0	0%
5	rORF2 – 8 μ g (1 liều lượng)	12	0	0%
6	rORF2 – 4 μ g (1 liều lượng)	11	1	9,1%
7	KV (2 liều lượng)	12	2	16,7%
8	Kiểm soát thử nghiệm	10	1	10%
9	Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt	11	0	0%

vORF2 = ORF2 virus được tách; rORF2 = ORF2 biểu hiện của baculovirus tái tổ hợp; virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt= virus PCV2 phát triển trong môi trường cấy tế bào thích hợp

Các kết quả phân tán qua mũi của PCV2 được thể hiện dưới đây trong bảng 11. Tiếp theo thử nghiệm vào ngày 24, 1 con lợn trong nhóm 7 bắt đầu phân tán PCV2 vào ngày 27. Không có một nhóm nào khác trải qua quá trình phân tán cho đến ngày 33. Phần lớn tình trạng phân tán qua mũi được ghi chép từ ngày 35 đến ngày 45. Các nhóm nhận liều vắc xin bất kỳ trong số ba liều vắc xin vORF2 và các nhóm nhận hoặc 4 hoặc 8 μ g rORF2 có tỷ lệ phân tán PCV2 qua mũi nhỏ nhất ($\leq 9,1\%$). Nhóm kiểm soát nghiêm ngặt (Nhóm 8) có tỷ lệ phát tán cao nhất (80%), theo sau là nhóm kiểm soát âm tính nghiêm ngặt (Nhóm 9), nhóm có tỷ lệ mắc là 63,6%.

Bảng 11. Tóm tắt ảnh hưởng nhỏ PCV2 vào mũi giữa các nhóm

Nhóm	Biện pháp xử lý	N	Số lợn nhỏ mũi ít nhất 1 ngày	Tỷ lệ ảnh hưởng
1	vORF2 – 16 μ g (1 liều lượng)	12	1	8,3%
2	vORF2 – 8 μ g (1 liều lượng)	12	1	8,3%
3	vORF2 – 4 μ g (1 liều lượng)	12	1	8,3%
4	rORF2 – 16 μ g (1 liều lượng)	11	2	18,2%
5	rORF2 – 8 μ g (1 liều lượng)	12	1	8,3%
6	rORF2 – 4 μ g (1 liều lượng)	11	1	9,1%

7	KV (2 liều lượng)	12	5	41,7%
8	Kiểm soát thử nghiệm	10	8	80%
9	Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt	11	7	63,6%

vORF2 = ORF2 virus được tách; rORF2 = ORF2 biểu hiện của baculovirus tái tổ hợp; virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt = virus PCV2 phát triển trong môi trường cấy tế bào thích hợp

Tóm tắt tỷ lệ mắc chứng vàng da giữa các nhóm, tỷ lệ mắc loét dạ dày ở các nhóm, tỷ lệ tổn thương phổi trung bình ở các nhóm, và tỷ lệ mắc tổn thương phổi giữa các nhóm được thể hiện dưới đây trong Bảng 12. Sáu con lợn tử vong ở vị trí thử nghiệm đầu tiên trong suốt giai đoạn sau khi dùng vắc xin của nghiên cứu (Nhóm 4, N=1; Nhóm 6, N=1; Nhóm 8, N=2; Nhóm 9, N=2). Bốn trong số sáu con lợn bị tổn thương cơ thể trong một hoặc nhiều khoang cơ thể, một con lợn (Nhóm 6) luôn bị tổn thương với bệnh do trực khuẩn gây ra, và một con lợn (Nhóm 9) không có tổn thương lớn. Không có con lợn nào tử vong trong suốt giai đoạn sau khi dùng vắc xin của nghiên cứu bị tổn thương liên tục với PMWS.

Các con lợn tử vong sau khi thử nghiệm và các con lợn tử vong không đau đớn vào ngày 49 được mổ xác. Khi mổ xác, không thấy loét vàng da và dạ dày ở các nhóm. Về % tổn thương phổi trung bình, Nhóm 9 có mức % tổn thương phổi trung bình thấp nhất (0%), theo sau là Nhóm 1 với $0,40 \pm 0,50\%$ và Nhóm 5 với $0,68 \pm 1,15\%$. Các nhóm 2, 3, 7 và 8 có mức % tổn thương phổi trung bình cao nhất ($\geq 7,27\%$). Mỗi một nhóm trong số bốn nhóm này có một con lợn có mức % tổn thương phổi $\geq 71,5\%$, làm nghiêng các kết quả cao hơn bốn nhóm này. Ngoại trừ Nhóm 9 với mức tổn thương phổi là 0% được ghi chép, 8 nhóm còn lại có mức tổn thương phổi $\leq 36\%$. Hầu hết tất cả các tổn thương phổi ghi chép lại được mô tả bằng màu đỏ/màu tím và thống nhất.

Bảng 12. Tóm tắt ảnh hưởng của chứng vàng da giữa các nhóm, ảnh hưởng của loét dạ dày giữa các nhóm, tỷ lệ % tổn thương phổi trung bình giữa các nhóm, và ảnh hưởng tổn thương phổi ghi chép lại giữa các nhóm

Nhóm	Biện pháp xử lý	Chứng vàng da	Loét dạ dày	Mức % tổn thương phổi trung bình	Ảnh hưởng của tổn thương phổi được ghi chép
1	vORF2 – 16 μ g (1 liều lượng)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0,40 $\pm$ 0,50%	10/12 (83%)
2	vORF2 – 8 μ g (1 liều lượng)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	7,41 $\pm$ 20,2%	10/12 (83%)
3	vORF2 – 4 μ g (1 liều lượng)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	9,20 $\pm$ 20,9%	10/12 (83%)
4	rORF2 – 16 μ g (1 liều lượng)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	1,5 $\pm$ 4,74%	4/11 (36%)
5	rORF2 – 8 μ g (1 liều lượng)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	0,68 $\pm$ 1,15%	9/12 (75%)
6	rORF2 – 4 μ g (1 liều lượng)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	2,95 $\pm$ 5,12%	7/11 (64%)
7	KV (2 liều lượng)	0/12 (0%)	0/12 (0%)	7,27 $\pm$ 22,9%	9/12 (75%)
8	Kiểm soát thử nghiệm	0/10 (0%)	0/10 (0%)	9,88 $\pm$ 29,2%	8/10 (80%)
9	Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

vORF2 = ORF2 virus được tách; rORF2 = ORF2 biểu hiện của baculovirus tái tổ hợp; virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt = virus PCV2 phát triển trong môi trường cấy tế bào thích hợp

Tóm tắt các kết quả tỷ lệ mắc dương tính với IHC ở các nhóm được biểu hiện trong Bảng 13. Nhóm 1 (vORF2 - 16 μ g) và Nhóm 5 (rORF2 - 8 μ g) có tỷ lệ các kết quả dương tính với IHC thấp nhất (16,7%). Nhóm 8 (Kiểm soát thử nghiệm) và Nhóm 9 (Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt) có tỷ lệ các kết quả dương tính với IHC cao nhất, 90% và 90,9%, một cách lần lượt.

Bảng 13. Tóm tắt tỷ lệ ảnh hưởng dương tính với IHC giữa các nhóm

Nhóm	Biện pháp xử lý	N	Số lợn có ít nhất một mô dương tính với PCV2	Tỷ lệ ảnh hưởng
1	vORF2 – 16 μ g (1 liều lượng)	12	2	16,7%
2	vORF2 – 8 μ g (1 liều lượng)	12	3	25,0%
3	vORF2 – 4 μ g (1 liều lượng)	12	8	66,7%
4	rORF2 – 16 μ g (1 liều lượng)	11	4	36,3%
5	rORF2 – 8 μ g (1 liều lượng)	12	2	16,7%
6	rORF2 – 4 μ g (1 liều lượng)	11	4	36,4%
7	KV (2 liều lượng)	12	5	41,7%
8	Kiểm soát thử nghiệm	10	9	90,0%
9	Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt	11	10	90,9%

vORF2 = ORF2 virus được tách; rORF2 = ORF2 biểu hiện của baculovirus tái tổ hợp; virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt = virus PCV2 phát triển trong môi trường cấy tế bào thích hợp

Sau khi thử nghiệm, Nhóm 5, nhóm nhận một liều 8 μ g kháng thể rORF2, thể hiện những kết quả tốt hơn sáu nhóm khác nhận vắc xin. Nhóm 5 có mức ADWG cao nhất ($0,94 \pm 0,22$ lbs/ngày), mức ảnh hưởng của sinh hoạt bất thường thấp nhất (0%), mức ảnh hưởng của chứng ho thấp nhất thứ hai (8,3%), mức ảnh hưởng của toàn bộ các triệu chứng lâm sàng thấp nhất (8,3%), tỷ lệ tử vong thấp nhất (0%), tỷ lệ phân tán PCV2 ở mũi thấp nhất (8,3%), tỷ lệ % mức tổn thương phổi trung bình thấp nhất thứ hai ($0,68 \pm 1,15$ %) và mức

tỷ lệ mắc đối với các mô dương tính thấp nhất (16,7%). Các nhóm nhận các mức kháng thể rORF2 khác nhau đều thể hiện những kết quả tốt hơn các nhóm nhận các mức vORF2 khác nhau và nhóm nhận 2 liều vắc xin PCV2 từ tế bào bị giết thể hiện kết quả tồi nhất. Các bảng 14 và 15 bao gồm phần tóm tắt số liệu của các nhóm sau thử nghiệm.

Bảng 14. Tóm tắt số liệu của các nhóm sau thử nghiệm – Phần 1

Nhóm	N	Biện pháp xử lý	ADWG (lbs/ngày)	Sinh hoạt bất thường	Ho	Ảnh hưởng toàn bộ của các triệu chứng lâm sàng
1	12	vORF2 – 16 μ g (1 liều lượng)	0,87 $\pm$ 0,29	2/12 (16,7%)	3/12 (25%)	41,7%
2	12	vORF2 – 8 μ g (1 liều lượng)	0,70 $\pm$ 0,32	4/12 (33,3%)	1/12 (8,3%)	41,7%
3	12	vORF2 – 4 μ g (1 liều lượng)	0,49 $\pm$ 0,21	8/12 (66,7%)	2/12 (16,7%)	66,7%
4	11	rORF2 – 16 μ g (1 liều lượng)	0,84 $\pm$ 0,30	3/11 (27,3%)	0/11 (0%)	36,4%
5	12	rORF2 – 8 μ g (1 liều lượng)	0,94 $\pm$ 0,22	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	8,3%
6	11	rORF2 – 4 μ g (1 liều lượng)	0,72 $\pm$ 0,25	1/11 (9,1%)	0/11 (0%)	9,1%
7	12	KV (2 liều lượng)	0,50 $\pm$ 0,15	7/12 (58,3)	0/12 (0%)	58,3%
8	10	Kiểm soát thử nghiệm	0,76 $\pm$ 0,19	1/10 (10%)	2/10 (20%)	40%
9	11	Kiểm soát âm tính nghiệm ngặt	1,06 $\pm$ 0,17	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0%

vORF2 = ORF2 virus được tách; rORF2 = ORF2 biểu hiện của baculovirus tái tổ hợp; KV hoặc virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt = virus PCV2 phát triển trong môi trường cấy tế bào thích hợp

Bảng 15. Tóm tắt số liệu của các nhóm sau thử nghiệm – Phần 2

Nhóm	N	Biện pháp xử lý	Tỷ lệ tử vong	Phát tán qua mũi	% tổn thương phổi trung bình	Tỷ lệ mắc của ít nhất một mô IHC dương tính với PCV2
1	12	vORF2 – 16 μ g (1 liều lượng)	8,3%	8,3%	0,40 $\pm$ 0,50%	16,7%
2	12	vORF2 – 8 μ g (1 liều lượng)	8,3%	8,3%	7,41 $\pm$ 20,2%	25,0%
3	12	vORF2 – 4 μ g (1 liều lượng)	0%	8,3%	9,20 $\pm$ 20,9%	66,7%
4	11	rORF2 – 16 μ g (1 liều lượng)	0%	18,2%	1,50 $\pm$ 4,74%	36,3%
5	12	rORF2 – 8 μ g (1 liều lượng)	0%	8,3%	0,68 $\pm$ 1,15%	16,7%
6	11	rORF2 – 4 μ g (1 liều lượng)	9,1%	9,1%	2,95 $\pm$ 5,12%	36,4%
7	12	KV (2 liều lượng)	16,7%	41,7%	7,27 $\pm$ 22,9%	41,7%
8	10	Kiểm soát thử nghiệm	10%	80%	9,88 $\pm$ 29,2%	90,0%
9	11	Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt	0%	63,6%	0/11 (0%)	90,9%

vORF2 = ORF2 virus được tách; rORF2 = ORF2 biểu hiện của baculovirus tái tổ hợp; KV hoặc virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt = virus PCV2 phát triển trong môi trường cấy tế bào thích hợp

Các kết quả của nghiên cứu này chỉ ra rằng tất cả các nỗ lực tiếp theo để tạo ra vắc xin nên tập trung vào vắc xin rORF2. Nhìn chung, sự phát tán PCV2 qua mũi được phát hiện sau thử nghiệm và tiêm chủng với một vắc xin PCV2 dẫn đến giảm sự phát tán. Mô hoá học miễn dịch của các mô bạch huyết được chọn lọc cũng có tác dụng như một tham số tốt cho

hiệu quả của vắc xin, trong khi sự khác nhau rõ rệt ở ADWG, các triệu chứng lâm sàng, và các tổn thương lớn không được phát hiện giữa các nhóm. Nghiên cứu này trở nên phức tạp do thực tế rằng PCV2 ở ngoài được đưa ra tại một vài thời điểm trong nghiên cứu, như được chứng minh bằng việc phát tán PCV2 qua mũi, việc chuyển đổi huyết thanh PCV2 và các mô IHC dương tính trong Nhóm 9, nhóm kiểm soát âm tính nghiêm ngặt.

Thảo luận

Bảy vắc xin PCV2 được đánh giá trong nghiên cứu này, bao gồm ba mức liều lượng kháng thể vORF2 khác nhau được dùng một lần vào ngày 0, ba mức liều lượng kháng thể rORF2 khác nhau được dùng một lần vào ngày 0 và một mức liều lượng vắc xin PCV2 của toàn bộ tế bào bị tiêu diệt được dùng vào ngày 0 và ngày 14. Nhìn chung, Nhóm 5, nhóm nhận một liều vắc xin chứa 8 μ g kháng thể rORF2, có các kết quả tốt nhất. Nhóm 5 có mức ADWG cao nhất, tỷ lệ mắc hành vi bất thường thấp nhất, tỷ lệ mắc hô hấp bất thường thấp nhất, tỷ lệ mắc chứng ho thấp nhất thứ hai, tỷ lệ mắc tổng thể các triệu chứng lâm sàng thấp nhất, tỷ lệ tử vong thấp nhất, tỷ lệ phát tán PCV2 qua mũi thấp nhất, tỷ lệ % tổn thương phổi trung bình thấp nhất thứ hai và tỷ lệ mắc đối với các mô IHC dương tính thấp nhất.

Điều thú vị là, Nhóm 4, nhóm nhận một liều kháng thể rORF2 cao hơn Nhóm 5, không thể hiện kết quả tốt bằng hoặc tốt hơn Nhóm 5. Nhóm 4 có mức ADWG thấp hơn một chút, tỷ lệ mắc hành vi bất thường cao hơn, tỷ lệ mắc tổng thể các triệu chứng lâm sàng cao hơn, tỷ lệ phát tán PCV2 qua mũi cao hơn, mức % tổn thương phổi trung bình cao hơn và tỷ lệ đối với các mô IHC dương tính cao hơn Nhóm 5. Phân tích thống kê, mà có thể cho thấy rằng sự khác nhau giữa hai nhóm này không có ý nghĩa về mặt thống kê, không được thực hiện trên những số liệu này, nhưng có một xu hướng được quan sát cho thấy Nhóm 4 không biểu hiện kết quả tốt bằng Nhóm 5.

Sau khi dùng vắc xin, sáu con lợn tử vong ở vị trí nghiên cứu đầu tiên. Bốn trong số sáu con lợn này là từ Nhóm 8 hoặc Nhóm 9, nhóm không nhận vắc xin. Không có con lợn nào trong số sáu con lợn này có biểu hiện tổn thương dai dẳng với PMWS, không có kết quả bất lợi nào được báo cáo và nhìn chung, tất cả bảy vắc xin có vẻ an toàn khi được dùng với các con lợn xấp xỉ 11 ngày tuổi. Trong suốt giai đoạn sau tiêm chủng của nghiên cứu này, các con lợn nhận hoặc là ba mức liều lượng vắc xin vORF2 hoặc là vắc xin của toàn bộ

tế bào bị giết có mức IFAT cao nhất, trong khi Nhóm 5 có mức IFAT thấp nhất trước khi thử nghiệm, của các nhóm dùng vắc xin.

Mặc dù không được chứng minh một cách chính thức, nhưng con đường chủ yếu để truyền PCV2 vào các con lợn con ngay sau khi cai sữa được tin là do tiếp xúc trực tiếp qua miệng – mũi và một vắc xin hiệu quả làm giảm sự phát tán PCV2 qua mũi trong môi trường chăn nuôi sẽ giúp kiểm soát lây nhiễm. Các nhóm nhận một trong ba mức kháng thể vORF2 và nhóm nhận 8 μ g rORF2 có tỷ lệ mắc sự phát tán PCV2 qua mũi thấp nhất (8,3%). Dự kiến là, nhóm kiểm soát thử nghiệm có tỷ lệ mắc sự phát tán qua mũi cao nhất (80%).

Những tổn thương lớn ở lợn với PMWS thứ yếu với việc nhiễm PCV2 chủ yếu bao gồm bệnh hạch bạch huyết phổ biến kết hợp với một hoặc nhiều triệu chứng sau: (1) viêm phổi kẽ với phù gian thùy nhỏ, (2) tái da hoặc vàng da, (3) gan teo có đốm, (4) loét dạ dày và (5) viêm thận. Khi mổ xác, chứng vàng da, bệnh viêm gan, viêm thận và loét dạ dày không được ghi chép lại trong bất kỳ nhóm nào và bệnh hạch bạch huyết không được khám xét rõ ràng. Mức % tổn thương phổi trung bình khác nhau giữa các nhóm. Nhóm nhận 16 μ g kháng thể vORF2 có mức % tổn thương phổi trung bình thấp nhất ($0,40 \pm 0,50\%$), theo sau là nhóm nhận 8 μ g rORF2 ($0,68 \pm 1,15\%$). Như được trông đợi, nhóm kiểm soát thử nghiệm có mức % tổn thương phổi trung bình cao nhất ($9,88 \pm 29,2\%$). Trong tất cả bốn nhóm, mức % tổn thương phổi trung bình được ước lượng do một con lợn trong mỗi một nhóm này có mức tổn thương phổi rất cao. Phần lớn các tổn thương phổi được mô tả màu đỏ/màu tía và thống nhất. Chủ yếu là, các tổn thương phổi liên kết với PMWS được mô tả bằng màu nâu vàng và không thể suy sụp với chứng phù gian thùy nhỏ. Các tổn thương phổi được ghi chép trong nghiên cứu này hoặc là không liên kết với nhiễm PCV2 hoặc là một tác nhân gây nhiễm phổi thứ hai có thể xuất hiện. Trong phạm vi của nghiên cứu này, mức % tổn thương phổi có thể không phản ánh thước đo chính xác về số lượng nhiễm trùng phổi do PCV2.

Các nhà nghiên cứu khác chứng minh mối tương quan trực tiếp giữa sự có mặt của kháng thể PCV2 do IHC và mô bệnh học. Mô bệnh học trên các mô chọn lọc không được thực hiện trong nghiên cứu này. Nhóm 1 (16 μ g vORF2) và Nhóm 5 (8 μ g rORF2) có tỷ lệ mắc thấp nhất ở lợn dương tính với kháng thể PCV2 (8,3%), trong khi Nhóm 9 (nhóm kiểm

soát âm tính nghiêm ngặt – 90,9%) và Nhóm 8 (nhóm kiểm soát thử nghiệm – 90,0%) có tỷ lệ mắc cao nhất ở lợn dương tính với kháng thể PCV2. Do bản chất không chủ quan của thí nghiệm này, mà các kết quả IHC có thể là một trong các tham số tốt nhất để đánh giá hiệu quả của vắc xin.

Vì vậy, một khía cạnh của sáng chế, liều lượng tối thiểu (MPD) của 1ml/1 liều sản phẩm tái tổ hợp với kháng thể ORF2 (rORF2) của PCV2 được chiết ở mô hình lợn CDCD trước khi thử nghiệm PCV2 được xác định. Trong số ba nhóm nhận các mức kháng thể rORF2 khác nhau, Nhóm 5 (8 μ g kháng thể rORF2) rõ ràng có mức bảo vệ cao nhất. Nhóm 5 hoặc có kết quả tốt nhất hoặc được gần với các kết quả có lợi nhất về tất cả các tham số được xem xét. Khi Nhóm 5 được so sánh với sáu nhóm khác dùng vắc xin sau thử nghiệm, thì Nhóm 5 có mức ADWG cao nhất ($0,94 \pm 0,22$ lbs/ngày), tỷ lệ mắc hành vi bất thường thấp nhất (0%), tỷ lệ mắc chứng ho thấp nhất thứ hai (8,3%), tỷ lệ mắc tổng thể các triệu chứng lâm sàng thấp nhất (8,3%), tỷ lệ tử vong thấp nhất (0%), tỷ lệ nhỏ PCV2 vào mũi thấp nhất (8,3%), tỷ lệ % tổn thương phổi trung bình thấp nhất thứ hai ($0,68 \pm 1,15\%$) và tỷ lệ ảnh hưởng đối với các mô IHC dương tính thấp nhất (16,7%).

Trong một khía cạnh khác của sáng chế, MPD của 1ml/1 liều sản phẩm thông thường mà là kháng thể ORF2 (vORF2) của PCV2 được tinh chế một phần trong mô hình lợn CDCD trước khi thử nghiệm PCV2 được xác định. Trong số ba nhóm nhận các mức kháng thể vORF2 khác nhau, Nhóm 1 (16 μ g vORF2) có mức bảo vệ cao nhất. Nhóm 1 thể hiện kết quả tốt hơn các Nhóm 2 và 3 về ADWG, mức % tổn thương phổi trung bình, và IHC. Các nhóm 1 và 2 (8 μ g kháng thể vORF2) thể hiện kết quả ngang bằng về tổng thể tỷ lệ mắc các triệu chứng lâm sàng, Nhóm 3 (4 μ g kháng thể vORF2) có tỷ lệ tử vong thấp nhất, và tất cả ba nhóm này biểu hiện kết quả ngang bằng về việc phát tán qua mũi. Nhìn chung, vắc xin vORF không biểu hiện kết quả tốt bằng vắc xin rORF.

Trong một khía cạnh khác của sáng chế, hiệu quả của liều lượng tối đa của 2ml/2 liều vắc xin của PCV2 bị tiêu diệt thông thường trong mô hình lợn CDCD trước khi thử nghiệm PCV2 được xác định. Trong số bảy vắc xin được ước lượng trong nghiên cứu này, vắc xin PCV2 của toàn bộ tế bào bị tiêu diệt biểu hiện kết quả tệ nhất. Số lợn con nhận hai liều vắc xin PCV2 của toàn bộ tế bào bị giết có mức ADWG thấp nhất, tỷ lệ của hành vi bất

thường cao nhất thứ hai (58,3%), toàn bộ ảnh hưởng của các triệu chứng lâm sàng cao nhất thứ hai (58,3%), tỷ lệ tử vong cao nhất (16,7%), tỷ lệ phát tán qua mũi cao nhất thứ hai (41,7%), mức % tổn thương phổi trung bình cao nhất ($9,88 \pm 29,2\%$), ảnh hưởng cao của các tổn thương phổi được ghi chép (75%) và tỷ lệ mắc vừa phải của IHC ở các mô (41,7%). Tuy nhiên, nó vẫn có tác dụng tạo ra một phản ứng miễn dịch.

Vẫn trong một khía cạnh khác của sáng chế, việc phát tán PCV2 qua mũi được đánh giá là một tham số hiệu quả và các tham số hiệu quả trước của PCV2 từ các nghiên cứu trước được xác nhận lại. Các kết quả từ nghiên cứu này chỉ ra rằng việc phát tán PCV2 qua mũi xảy ra sau khi thử nghiệm trong mũi và rằng vắc xin PCV2 giảm việc phát tán PCV2 qua mũi sau thử nghiệm. Ngoài ra, các kết quả từ nghiên cứu này và các báo cáo trong tài liệu này chỉ ra rằng IHC nên tiếp tục được đánh giá trong các thí nghiệm sau này về vắc xin PCV2.

Một vài kết luận bổ sung xuất phát từ nghiên cứu này đó là bệnh hạch bạch huyết là một trong những dấu hiệu xác nhận tiêu chuẩn của PMWS. Một trong những dấu hiệu xác nhận tiêu chuẩn khác của PMWS là ít bạch huyết và tổ chức bào đa nhân/không lồ. Ngoài ra, không có một kết quả bất lợi nào hoặc không có một phản ứng tại vị trí tiêm được ghi chép cho bất kỳ vắc xin nào trong 7 vắc xin PCV2 và tất cả 7 vắc xin PCV2 này có vẻ an toàn khi sử dụng với các con lợn con.

VÍ DỤ 5

Ví dụ này kiểm tra hiệu quả của tám vắc xin thử nghiệm của PCV2 và xác nhận lại các tham số thử nghiệm của PCV2 từ các nghiên cứu thử nghiệm trước sau khi đưa ra một dòng virus của PCV2. Một trăm năm mươi (150) con lợn con bị lấy đi sữa non do mô (CDCD), từ 6-16 ngày tuổi, bị hạn chế bởi trọng lượng và được ngẫu nhiên chia thành 10 nhóm có kích thước ngang nhau. Bảng 16 đưa ra Kế hoạch nghiên cứu chung cho Ví dụ này.

Bảng 16. Kế hoạch nghiên cứu chung

Nhóm	Số con lợn	Biện pháp xử lý	Ngày xử lý	KLH/ICFA vào ngày 22 và ngày 28	Thử nghiệm với PCV2 virus vào ngày 25	PRRSV MLV vào ngày 26	Mô xác vào ngày 50
1	15	Vắc xin PCV2 số 1 16µg rORF2 – IMS 1314	0 & 14	+	+	+	+
2	15	Vắc xin PCV2 số 2 16µg vORF2 – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
3	15	Vắc xin PCV2 số 3 16µg rORF2 – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
4	15	Vắc xin PCV2 số 2 16µg vORF2 – Carbopol	0	+	+	+	+
5	15	Vắc xin PCV2 số 3 4µg rORF2 – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
6	15	Vắc xin PCV2 số 3 1µg rORF2 – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
7	15	Vắc xin PCV2 số 3 0,25µg rORF2 – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+
8	15	Vắc xin PCV2 số 4 >8,0 log KV – Carbopol	0 & 14	+	+	+	+

9	15	Kiểm soát thử nghiệm	N/A	+	+	+	+
10	15	Nhóm kiểm soát âm tính nghiêm ngặt rORF2 – IMS 1314	N/A	+	-	+	+

vORF2 = ORF2 virus được tách; rORF2 = ORF2 biểu hiện của baculovirus tái tổ hợp; KV hoặc virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt = virus PCV2 phát triển trong môi trường cây tế bào thích hợp

Hợp phần của vắc xin đưa ra cho mỗi nhóm như sau. Vắc xin PCV2 số 1, được dùng ở mức 1 x 2ml liều lượng với Nhóm 1, là một liều lượng cao (16µg/2ml liều lượng) của kháng thể ORF2 tái tổ hợp được làm bất hoạt được bổ sung tá chất với IMS 1314 (16µg rORF2 – IMS 1314). Vắc xin PCV2 số 2, được dùng ở mức 1 x 2 ml liều lượng đối với Nhóm 2, là một liều lượng cao (16µg/2ml liều lượng) của một kháng thể ORF2 của PCV2 được sinh ra từ VIDO R-1 được tinh chế một phần có bổ sung tá chất với Carbopol (16µg vORF2 - Carbopol). Vắc xin PCV2 số 3, được dùng ở mức 1 x 2ml liều lượng đối với Nhóm 3, là một liều lượng cao (16µg/2ml liều lượng) của kháng thể ORF2 tái tổ hợp được làm bất hoạt có bổ sung tá chất với Carbopol (16µg rORF2 - Carbopol). Vắc xin PCV2 số 4, được dùng ở mức 1 x 1ml liều lượng đối với nhóm 4, là một liều lượng cao (16µg/1ml liều lượng) của một kháng thể ORF2 của PCV2 được sinh ra từ VIDO R-1 được tinh chế một phần có bổ sung tá chất với Carbopol (16µg vORF2 - Carbopol). Vắc xin số 5, được dùng ở mức 1 x 2ml liều lượng đối với Nhóm 5, là 4µg/2ml liều lượng của một kháng thể ORF2 tái tổ hợp được làm bất hoạt có bổ sung tá chất với Carbopol (4µg rORF2 - Carbopol). Vắc xin PCV2 số 6, được dùng ở mức 1 x 2ml liều lượng đối với Nhóm 6, là 1µg/2ml liều lượng của một kháng thể ORF2 tái tổ hợp được làm bất hoạt có bổ sung tá chất với Carbopol (1µg rORF2 - Carbopol). Vắc xin PCV2 số 7, được dùng ở mức 1 x 2ml liều lượng đối với Nhóm 7, là một liều lượng thấp (0,25µg/2ml liều lượng) của kháng thể ORF2 tái tổ hợp được làm bất hoạt có bổ sung tá chất với Carbopol (0,25µg rORF2 - Carbopol). Vắc xin PCV2 số 8, được dùng ở mức 1 x 2ml liều lượng đối với Nhóm 8, là một liều lượng cao (mức chuẩn trước khi làm bất hoạt > 8,0 log/2ml liều lượng) của kháng thể Struve của PCV2 được sinh ra từ VIDO R-1 bị giết tử vong theo cách thông thường và bị làm bất hoạt có bổ sung tá chất với Carbopol (>8,0 log KV - Carbopol). Vào ngày 0, các Nhóm từ 1-8

được xử lý với các vắc xin ấn định của chúng. Các Nhóm từ 1-3 và từ 5-8 lại nhận sự nâng đỡ của các vắc xin tương ứng của chúng vào ngày 14. Hiệu quả của một liều lượng riêng lẻ của 16 μ g vORF2 - Carbopol được kiểm tra ở Nhóm 4, nhóm không nhận sự nâng đỡ vào Ngày 14. Số lợn con được quan sát các kết quả bất lợi và phản ứng tại vị trí tiêm sau hai lần tiêm chủng. Vào Ngày 21, số lợn con được đưa sang một vị trí nghiên cứu thứ hai, tại đó các Nhóm từ 1-9 được ở theo nhóm trong một toà nhà và Nhóm 10 được ở trong một toà nhà riêng biệt. Tất cả số lợn này nhận hemoxyanin bám lỗ khoá nhũ hoá với tá chất Freund không toàn vẹn (KLH/ICFA) vào các ngày 22 và 28. Vào ngày 25, các Nhóm từ 1-9 được thử nghiệm với xấp xỉ 4 log virus PCV2. Trước ngày 46, vài con lợn trong nhóm kiểm soát thử nghiệm tử vong. Với nỗ lực kích thích miễn dịch cho đàn lợn và tăng tính độc hại của vật liệu thử nghiệm PCV2, tất cả các nhóm được xử lý với INGELVAC® PRRSV MLV (Vắc xin sinh sản và hô hấp dùng cho lợn, Virus sống biến đổi) vào ngày 46.

Các mẫu máu trước và sau thử nghiệm được thu thập để xét nghiệm huyết thanh học PCV2. Sau thử nghiệm, số liệu về thể trọng để xác định mức tăng trọng trung bình hàng ngày (ADWG) và các quan sát về các triệu chứng lâm sàng được thu thập. Vào Ngày 50, tất cả các con lợn còn sống sót được mổ xác, các tổn thương lớn được ghi lại, phổi được nghiên cứu bệnh học, và các mô chọn lọc được bảo quản trong formalin để mô hoá học miễn dịch (IHC) xét nghiệm để tìm ra kháng thể cho PCV2 vào một ngày sau đó.

Tài liệu và phương pháp

Đây là một nghiên cứu khả thi về thử nghiệm vắc xin che một phần tiến hành ở lợn CDCD, từ 6 - 16 ngày tuổi vào ngày 0. Trong nghiên cứu này, mức chuẩn IFA cho PCV2 của lợn cái là $\leq 1:1000$. Ngoài ra, tình trạng huyết thanh của lợn cái được lấy từ đàn lợn âm tính với PRRS. Mười sáu (16) con lợn cái được kiểm tra tình trạng huyết thanh PCV2 và tất cả mười sáu (16) con lợn này có mức chuẩn PCV2 ≤ 1000 và được chuyển sang vị trí nghiên cứu đầu tiên. Một trăm năm mươi (150) con lợn con được sinh ra bằng việc phương pháp mổ lấy thai và sẵn sàng cho nghiên cứu này vào ngày -3. Vào ngày -3, 150 con lợn CDCD tại vị trí nghiên cứu đầu tiên được cân, được nhận dạng bằng thẻ đeo tai, được hạn chế trọng lượng và được ngẫu nhiên ấn định vào 1 trong 10 nhóm, như trình bày ở trên trong bảng 16. Các mẫu máu được thu thập từ tất cả các con lợn. Nếu bất kỳ tiêu chí nào

được đưa ra trong cuộc họp về động vật thí nghiệm và sau đó bị loại trừ vì một lý do nào đó, thì nhà nghiên cứu và người giám sát thảo luận để xác định việc sử dụng số liệu thu thập từ động vật trong phân tích cuối cùng. Ngày lợn con bị loại trừ và lý do loại trừ được đưa vào tài liệu. Không có tiêu chí nào được đưa ra trong cuộc họp về lợn cái, được chọn cho nghiên cứu này và được chuyển sang vị trí nghiên cứu đầu tiên bị loại trừ. Không có một con lợn con nào bị loại trừ khỏi nghiên cứu này, và không có một động vật thí nghiệm nào bị loại ra khỏi nghiên cứu này trước khi hoàn thành thí nghiệm. Bảng 17 mô tả khung thời gian cho các hoạt động chính của Ví dụ này.

Bảng 17. Các hoạt động của nghiên cứu

Ngày nghiên cứu	Ngày thực tế	Hoạt động nghiên cứu
-3	4-04-03	Cân các con lợn, kiểm tra sức khỏe, chia ngẫu nhiên vào các nhóm; thu thập mẫu máu
-3, 0-21	4-04-03 4-07-03 đến 5-27-03	Quan sát sức khỏe tổng thể và các kết quả bất lợi sau khi tiêm chủng
0	4-07-03	Dùng IVP tương ứng đối với các Nhóm từ 1-8
0-7	4-07-03 đến 4-14-03	Quan sát các con lợn để phản ứng tại vị trí tiêm
14	4-21-03	Nâng đỡ các nhóm từ 1-3, 5-8 với IVP tương ứng; máu được lấy mẫu từ tất cả các con lợn
14-21	4-21-03 đến 4-28-03	Quan sát các con lợn để phản ứng tiêm
19-21	4-26-03 đến 4-28-03	Xử lý tất cả các con lợn với kháng sinh
21	4-28-03	Lợn được chuyển từ Phòng thí nghiệm Struve, Inc đến Nguồn Thú y, Inc. (VRI)

22-50	4-28-03 đến 5-27-03	Quan sát các con lợn để phát hiện các triệu chứng lâm sàng sau thử nghiệm
22	4-29-03	Xử lý các Nhóm từ 1-10 với KLH/ICFA
25	5-02-03	Thu thập các mẫu máu từ tất cả các con lợn; cân tất cả các con lợn; cho các Nhóm từ 1-9 thử nghiệm với vật liệu thử nghiệm PCV2
28	5-05-03	Xử lý các Nhóm từ 1-10 với KLH/ICFA
32	5-09-03	Thu thập các mẫu máu từ tất cả các con lợn
46	5-23-03	Cho tất cả các nhóm dùng INGELVAC® PRRS MLV
50	5-27-03	Thu thập các mẫu máu; cân và mổ xác tất cả các con lợn; các tổn thương lớn được ghi lại; phổi được ước lượng mức tổn thương, các mẫu mô mới và được cố định bằng formalin được bảo quản; giai đoạn sống của nghiên cứu được hoàn tất

Sau khi hoàn tất giai đoạn sống của nghiên cứu, các mô được cố định bằng formalin được nhà nghiên cứu bệnh học kiểm tra bằng mô hoá học miễn dịch (IHC) để tìm ra kháng thể PCV2, các mẫu máu được ước lượng huyết thanh PCV2, và mức tăng trọng trung bình hàng ngày (ADWG) được xác định từ ngày 25 đến ngày 50.

Động vật được ở tại vị trí nghiên cứu đầu tiên trong các chuồng riêng biệt tại bảy phòng từ lúc sinh ra đến xấp xỉ 11 ngày tuổi (xấp xỉ ngày 0 của nghiên cứu). Mỗi một phòng đồng nhất về bố cục và bao gồm các chuồng riêng biệt bằng thép không gỉ được xếp chồng lên nhau với hệ thống sưởi và lọc không khí được cung cấp riêng biệt tới từng đơn vị cách ly. Mỗi một phòng có hệ thống sưởi và thông gió riêng biệt, do đó ngăn chặn lây nhiễm không khí giữa các phòng. Động vật được ở trong hai toà nhà khác nhau tại vị trí nghiên cứu thứ hai. Nhóm 10 (Nhóm kiểm soát âm tính nghiêm ngặt) được ở riêng biệt trong một toà nhà được cải tạo để dành riêng cho động vật còn đang bú mẹ và các Nhóm từ 1-9 được ở trong một toà nhà được cải tạo để dành riêng cho động vật thời kỳ sinh sản. Mỗi một nhóm được ở trong một trại riêng (từ 14-15 con lợn/trại) và mỗi một trại được cung cấp xấp

xi 2,3 ft²/con lợn. Các nhóm 2, 4 và 8 được nhốt trong 3 trại liền kề ở một phía của lối đi và các nhóm 1, 3, 5, 6, 7, và 9 được nhốt trong 6 trại liền kề ở một phía khác của lối đi. Sự phân cách các nhóm này là do sự lo lắng của người giám sát nghiên cứu rằng vắc xin được dùng cho các nhóm 2, 4, và 8 không được làm bất hoạt hoàn toàn. Mỗi một trại nằm ở trên một tầng được ước lượng có sàn làm bằng thanh nhựa. Một cái hồ dưới các trại được dùng làm thùng chứa phân và rác thải. Mỗi một toà nhà có hệ thống sưởi và thông gió riêng của nó, với ít khả năng lây nhiễm không khí giữa các phòng.

Tại vị trí nghiên cứu đầu tiên, lợn con được cho ăn một khẩu phần sữa có công thức đặc biệt từ lúc sinh ra đến xấp xỉ 3 tuần tuổi. Tất cả số lợn con này dùng một thức ăn rắn, đặc biệt vào trước ngày 21 (xấp xỉ 4^{1/2} tuần tuổi). Tại vị trí nghiên cứu thứ hai, tất cả số lợn con này được cho ăn một loại thức ăn trộn bán sẵn thông thường không tẩm thuốc thích hợp với độ tuổi và trọng lượng của chúng, một cách tùy ý. Nước tại cả hai vị trí nghiên cứu cũng có một cách tùy ý.

Tất cả số lợn thí nghiệm được xử lý với 1,0 mL NAXCEL®, IM, vào bắp đùi luân phiên vào các ngày 19, 20, và 21. Ngoài ra, con lợn số 11 (Nhóm 1) được xử lý với 0,5mL NAXCEL® IM vào ngày 10, con lợn số 13 (Nhóm 10) được xử lý với 1mL Penixilin và 1mL PREDEF® 2X vào ngày 10, con lợn số 4 (Nhóm 9) được xử lý với 1,0mL NAXCEL® IM vào ngày 11, và các con lợn số 1 (Nhóm 1), 4 và 11, mỗi con được xử lý với 1,0mL NAXCEL® vào ngày 14 vì các lý do sức khỏe khác nhau.

Trong khi tại cả hai vị trí nghiên cứu, các con lợn được chăm sóc thú y. Kiểm tra sức khỏe động vật được tiến hành vào ngày -3 và được ghi lại trên mẫu hồ sơ kiểm tra sức khỏe. Tất cả số động vật ở trong tình trạng sức khỏe và dinh dưỡng tốt trước khi tiêm chủng như được xác định bằng quan sát vào ngày 0. Tất cả số động vật thí nghiệm được quan sát ở trong tình trạng sức khỏe và dinh dưỡng tốt trước khi thử nghiệm. Xác động vật và các mô được vứt bỏ bằng cách trả lại. Việc vứt bỏ cuối cùng các động vật nghiên cứu được ghi lại trên hồ sơ vứt bỏ động vật.

Vào các ngày 0 và 14, các con lợn được ấn định vào các Nhóm từ 1-3 và từ 5-8 nhận 2,0mL vắc xin PCV2 ấn định từ số 1-4, một cách tương ứng, IM ở vùng cổ phải và cổ trái, một cách tương ứng, sử dụng một ống tiêm khoá Luer vô trùng có dung tích 3,0mL và một

kim tiêm vô trùng kích thước 20g x 1/2''. Các con lợn được ấn định vào Nhóm 4 nhận 1,0mL vắc xin PCV2 số 2, IM ở vùng cổ phải sử dụng một ống tiêm khoá Luer vô trùng có dung tích 3,0mL và một kim tiêm vô trùng kích thước 20g x 1/2'' vào duy nhất ngày 0.

Vào ngày 22, tất cả các con lợn thí nghiệm nhận 2,0mL KLH/ICFA IM ở vùng cổ trái sử dụng một ống tiêm khoá Luer vô trùng có dung tích 3,0mL và một kim tiêm vô trùng kích thước 20g x 1''. Vào ngày 28, tất cả các con lợn thí nghiệm nhận 2,0mL KLH/ICFA ở vùng bắp đùi trái sử dụng một ống tiêm khoá Luer vô trùng có dung tích 3,0mL và một kim tiêm vô trùng kích thước 20g x 1''.

Vào ngày 25, số lợn được ấn định vào các Nhóm từ 1-9 nhận 1,0mL vật liệu thử nghiệm PCV2 ISUVDL ($3,98 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$) IM ở vùng cổ phải sử dụng một ống tiêm khoá Luer vô trùng có dung tích 3,0mL và một kim tiêm vô trùng kích thước 20g x 1''. Thêm 1,0mL vật liệu thử nghiệm trên được dùng IN vào từng con lợn (0,5mL/lỗ mũi) sử dụng một ống tiêm khoá Luer vô trùng có dung tích 3,0mL và ống thông dò mũi.

Vào ngày 46, tất cả số lợn thí nghiệm nhận 2,0mL INGELVAC® PRRS MLV, IM, ở vùng cổ phải sử dụng một ống tiêm khoá Luer vô trùng có dung tích 3,0mL và một kim tiêm vô trùng kích thước 20g x 1''. PRRSV MLV được dùng với nỗ lực làm tăng tính độc hại của vật liệu thử nghiệm PCV2.

Các con lợn thí nghiệm được quan sát hàng ngày về sức khoẻ tổng thể và các kết quả bất lợi vào ngày -3 và từ ngày 0 đến ngày 21. Mỗi một con lợn được định mức về hành vi, hô hấp hoặc ho bình thường hoặc bất thường. Các quan sát này được ghi lại trên hồ sơ quan sát lâm sàng. Tất cả số lợn thí nghiệm được quan sát từ ngày 0 đến ngày 7, và Nhóm 7 được quan sát thêm từ ngày 14 đến 21, để phản ứng tại vị trí tiêm. Mức tăng trọng trung bình hàng ngày được xác định bằng cách cân từng con lợn trên một cái cân được định cỡ vào Ngày -3, 25 và 50, hoặc vào ngày mà một con lợn bị phát hiện là tử vong sau khi thử nghiệm. Thể trọng được ghi lại trên mẫu thẻ trọng. Thẻ trọng vào Ngày -3 được dùng để hạn chế các con lợn trước khi ngẫu nhiên chia vào các nhóm. Số liệu về trọng lượng vào ngày 25 và ngày 50 được dùng để xác định mức tăng trọng trung bình hàng ngày (ADWG) đối với mỗi một con lợn trong suốt các điểm thời gian này. Đối với những con lợn tử vong

sau thử nghiệm và trước ngày 50, mức ADWG được điều chỉnh để thể hiện mức ADWG từ ngày 25 đến ngày tử vong.

Để xác định huyết thanh PCV2, toàn bộ máu bên trong tĩnh mạch được thu thập từ mỗi một con lợn con từ xoang tĩnh mạch của ổ mắt vào các ngày -3 và 14. Đối với mỗi một con lợn con, máu được thu thập từ xoang tĩnh mạch của ổ mắt bằng cách cắm một ống mao dẫn vô trùng vào giữa khoé mắt của một mắt và hút xấp xỉ 3,0mL của toàn bộ số máu vào một ống tách huyết thanh (SST) có dung tích 4,0mL. Vào các ngày 25, 32, và 50, toàn bộ máu ở bên trong tĩnh mạch từ mỗi một con lợn được thu thập từ hốc tĩnh mạch trước bằng cách sử dụng một kim tiêm Vacutainer® vô trùng có kích thước 20g x 1^{1/2}” (Becton Dickinson và Công ty, Franklin Lakes, New Jersey), một bộ phận giữ kim tiêm Vacutainer® và một SST có dung tích 13mL. Việc thu thập máu tại mỗi một điểm thời gian được ghi lại trên hồ sơ thu thập mẫu. Máu trong mỗi SST được để khô, mỗi một SST sau đó được để dốc xuống và thu được huyết thanh. Huyết thanh thu được được chuyển sang một ống có khóa vô trùng và được giữ ở nhiệt độ $-70 \pm 10^{\circ}\text{C}$ cho đến khi được thử nghiệm vào một ngày sau đó. Các mẫu huyết thanh được nhân viên BIVI-R&D thử nghiệm để tìm sự có mặt của các kháng thể PCV2.

Các con lợn được quan sát một lần hàng ngày từ ngày 22 đến ngày 50 để phát hiện các triệu chứng lâm sàng và đánh giá về hành vi, hô hấp hoặc ho bình thường hoặc bất thường. Các quan sát lâm sàng được ghi lại trên hồ sơ quan sát lâm sàng.

Các con lợn số 46 (Nhóm 1) và 98 (Nhóm 9) tử vong tại vị trí nghiên cứu đầu tiên. Cả hai điều này được phân loại là những cái tử vong do bị mất máu và mô xác không được tiến hành trên hai con lợn này. Tại vị trí nghiên cứu thứ hai, các con lợn tử vong sau thử nghiệm và trước ngày 50, và các con lợn tử vong không đau đớn vào ngày 50, được mô xác. Tổn thương lớn được ghi chép và mức % thủy phổi bị tổn thương được ghi lại trên mẫu báo cáo mô xác.

Từ mỗi một con lợn được mô xác tại vị trí nghiên cứu thứ hai, một mẫu mô amidan, phổi, tim, và u bạch huyết màng treo ruột được đặt vào một lọ riêng với 10% formalin đậm; trong khi một mẫu mô khác từ các cơ quan đề cập ở trên được đặt vào một Whirl-pak® (M-Tech Diagnostics Ltd., Thelwall, UK) và mỗi một Whirl-pak® được đặt trên đá lạnh. Mỗi

một lọ được dán nhãn thích hợp. Việc thu thập mẫu được ghi lại trên mẫu báo cáo mô xác. Sau đó, các mẫu mô được cố định bằng formalin và một mẫu yêu cầu chẩn đoán được đưa ra để thử nghiệm IHC. Thử nghiệm IHC được tiến hành theo các quy trình tiêu chuẩn của phòng thí nghiệm đối với việc nhận mẫu, chuẩn bị mẫu và bản kính, và các kỹ thuật nhuộm màu. Các mô mới trong Whirl-paks® được chuyển cùng với các túi đá tới Người giám sát nghiên cứu để cất trữ (ở nhiệt độ $-70^{\circ} \pm 10^{\circ}\text{C}$) và sử dụng sau này.

Các mô được cố định bằng formalin được nhà nghiên cứu bệnh học nghiên cứu để phát hiện ra PCV2 bằng IHC và được định mức bằng cách sử dụng hệ thống định mức sau: 0 = không có; 1 = nhuộm màu dương tính vừa đủ, tại một vài vị trí; 2 = nhuộm màu dương tính trung bình, tại nhiều vị trí; và 3 = nhuộm màu dương tính nhiều, bao trùm toàn bộ mô. Cho mục đích phân tích, mức 0 được coi là "âm tính", và mức lớn hơn 0 được coi là "dương tính".

Kết quả

Các kết quả của ví dụ này được đưa ra dưới đây. Kết quả cho thấy các con lợn số 46 và 98 tử vong tương ứng vào các ngày 14 và 25. Việc này được phân loại là tử vong do mất nhiều máu. Con lợn số 11 (Nhóm 1) thở hỗn hển với hô hấp nhanh vào ngày 15. Mặt khác, tất cả các con lợn có hành vi, hô hấp và ho bình thường trong suốt thời kỳ quan sát này và không có kết quả bất lợi nào về cơ thể được ghi lại với bất kỳ một nhóm nào. Không có phản ứng tại vị trí tiêm được ghi lại sau khi tiêm chủng vào ngày 0. Sau khi tiêm chủng vào ngày 14, bảy (7) trong số mười bốn (14) con lợn của Nhóm 1 (50,0%) bị sưng tấy ở mức "2" vào Ngày 15. Bốn (4) trong số mười bốn (14) con lợn của nhóm 1 (28,6%) vẫn bị sưng tấy ở mức "2" vào Ngày 16. Không có con lợn nào ở các nhóm khác bị phản ứng tại vị trí tiêm sau khi tiêm chủng.

Các kết quả về mức tăng trọng trung bình hàng ngày (ADWG) được đưa ra dưới đây trong Bảng 18. Các con lợn số 46 và 98 tử vong do mất máu bị loại ra khỏi kết quả của nhóm. Nhóm 4, nhóm nhận 1 liều $16\mu\text{g vORF2}$ - Carbopol, có mức ADWG cao nhất ($1,16 \pm 0,26\text{lbs/ngày}$), theo sau là các nhóm 1, 2, 3, 5, 6, và 10, các nhóm này có mức ADWG nằm trong phạm vi từ $1,07 \pm 0,23\text{lbs/ngày}$ đến $1,11 \pm 0,26\text{lbs/ngày}$. Nhóm 9 có mức ADWG

thấp nhất ($0,88 \pm 0,29\text{lbs/ngày}$), theo sau là các nhóm 8 và 7, có mức ADWG tương ứng là $0,93 \pm 0,33\text{lbs/ngày}$ và $0,99 \pm 0,44\text{lbs/ngày}$.

Bảng 18. Tóm tắt mức tăng trọng trung bình hàng ngày (ADWG)

Nhóm	Biện pháp xử lý	N	ADWG – lbs/ngày (từ ngày 25 đến ngày 50) hoặc được điều chỉnh đối với các con lợn tử vong trước ngày 50
1	rORF2 - 16 μg – IMS 1314 2 liều lượng	14	$1,08 \pm 0,30\text{ lbs/ngày}$
2	vORF2 - 16 μg – Carbopol 2 liều lượng	15	$1,11 \pm 0,16\text{ lbs/ngày}$
3	rORF2 - 16 μg – Carbopol 2 liều lượng	15	$1,07 \pm 0,21\text{ lbs/ngày}$
4	vORF2 - 16 μg – Carbopol 1 liều lượng	15	$1,16 \pm 0,26\text{ lbs/ngày}$
5	rORF2 - 4 μg – Carbopol 1 liều lượng	15	$1,07 \pm 0,26\text{ lbs/ngày}$
6	rORF2 - 1 μg – Carbopol 2 liều lượng	15	$1,11 \pm 0,26\text{ lbs/ngày}$
7	rORF2 - 0,25 μg - Carbopol 2 liều lượng	15	$0,99 \pm 0,44\text{ lbs/ngày}$
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 liều lượng	15	$0,93 \pm 0,33\text{ lbs/ngày}$
9	Kiểm soát thử nghiệm	14	$0,88 \pm 0,29\text{ lbs/ngày}$
10	Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt	15	$1,07 \pm 0,23\text{ lbs/ngày}$

vORF2 = ORF2 virus được tách; rORF2 = ORF2 biểu hiện của baculovirus tái tổ hợp; KV hoặc virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt = virus PCV2 phát triển trong môi trường cấy tế bào thích hợp

Các kết quả về huyết thanh của PCV2 được đưa ra dưới đây trong Bảng 19. Tất cả mười (10) nhóm biểu hiện âm tính huyết thanh đối với PCV2 vào ngày -3. Vào ngày 14, mức chuẩn PCV2 vẫn thấp đối với tất cả mười (10) nhóm (nằm trong phạm vi từ 50-113). Vào ngày 25, Nhóm 8, nhóm nhận vắc xin của toàn bộ virus tế bào bị giết, có mức chuẩn PCV2 cao nhất (4617), theo sau là Nhóm 2, nhóm nhận 16 μg vORF2 - Carbopol, Nhóm 4, nhóm nhận duy nhất 1 liều 16 μg vORF2 - Carbopol, và Nhóm 3, nhóm nhận 16 μg rORF2 - Carbopol, có mức chuẩn lần lượt là 2507, 1920 và 1503. Vào ngày 32 (1 tuần sau khi thử

nhận), mức chuẩn đối với các Nhóm từ 1-6 và Nhóm 8 nằm trong phạm vi từ 2360 đến 7619; trong khi các Nhóm 7 (0,25µg rORF2 - Carbopol), 9 (Kiểm soát Thử nghiệm), và 10 (Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt) có mức chuẩn lần lượt là 382, 129 và 78. Vào ngày 50 (ngày mô xác), tất cả mười (10) nhóm biểu hiện mức chuẩn PCV2 cao (≥ 1257).

Vào các ngày 25, 32, và 50, Nhóm 3, nhóm nhận hai liều 16µg rORF2 - Carbopol có mức chuẩn kháng thể cao hơn Nhóm 1, nhóm nhận hai liều 16µg rORF2 - IMS 1314. Vào các ngày 25, 32 và 50, Nhóm 2, nhóm nhận 2 liều 16µg vORF2 có mức chuẩn cao hơn Nhóm 4, nhóm nhận duy nhất một liều vắc xin cùng loại. Các Nhóm 3, 5, 6, 7, các nhóm nhận các mức rORF2 – Carbopol ít đi, lần lượt là 16, 4, 1, và 0,25µg, do đó biểu hiện mức chuẩn kháng thể giảm sút vào các ngày 25 và 32.

Bảng 19. Tóm tắt mức chuẩn IFA đối với PCV2 giữa các nhóm

Nhóm	Biện pháp xử lý	Ngày -3	Ngày 14**	Ngày 25***	Ngày 32	Ngày 50****
1	rORF2 - 16µg – IMS 1314 2 liều lượng	50	64	646	3326	4314
2	vORF2 - 16µg – Carbopol 2 liều lượng	50	110	2507	5627	4005
3	rORF2 - 16µg – Carbopol 2 liều lượng	50	80	1503	5120	6720
4	vORF2 - 16µg – Carbopol 1 liều lượng	50	113	1920	3720	1257
5	rORF2 - 4µg – Carbopol 1 liều lượng	50	61	1867	3933	4533
6	rORF2 - 1µg – Carbopol 2 liều lượng	50	70	490	2360	5740
7	rORF2 – 0,25µg – Carbopol 2 liều lượng	50	73	63	382	5819

8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 liều lượng	50	97	4617	7619	10817
9	Kiểm soát thử nghiệm	50	53	50	129	4288
10	Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt	50	50	50	78	11205

vORF2 = ORF2 virus được tách; rORF2 = ORF2 biểu hiện của baculovirus tái tổ hợp; KV hoặc virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt = virus PCV2 phát triển trong môi trường cấy tế bào thích hợp

* Cho mục đích tính toán, mức chuẩn IFA ≤ 100 được gọi là mức chuẩn "50"; mức chuẩn IFA ≥ 6400 được gọi là mức chuẩn "12,800".

** Ngày thử nghiệm

*** Ngày mổ xác

Các kết quả từ các quan sát lâm sàng sau thử nghiệm được đưa ra dưới đây. Bảng 20 bao gồm các quan sát đối với Hành vi bất thường, Hô hấp bất thường, Ho và Tiêu chảy. Bảng 21 bao gồm các kết quả từ Phần tóm tắt tổng thể tỷ lệ mắc các triệu chứng lâm sàng của nhóm và Bảng 22 bao gồm các kết quả từ Phần tóm tắt tỷ lệ tử vong của nhóm sau thử nghiệm. Tỷ lệ mắc hành vi, hô hấp và ho bất thường sau thử nghiệm là thấp ở những con lợn nhận 16 μ g rORF2-IMS 1314 (Nhóm 1), 16 μ g rORF2-Carbopol (Nhóm 3), 1 μ g rORF2-Carbopol (Nhóm 6), 0,25 μ g rORF2-Carbopol (Nhóm 7), và ở những con lợn trong Nhóm Kiểm soát Thử nghiệm (Nhóm 9). Tỷ lệ mắc hành vi, hô hấp và ho bất thường sau thử là con số không ở những con lợn nhận 16 μ g vORF2-Carbopol (Nhóm 2), 1 liều duy nhất 16 μ g vORF2-Carbopol (Nhóm 4), 4 μ g rORF2-Carbopol (Nhóm 5), >8 log KV-Carbopol (Nhóm 8), và ở những con lợn trong nhóm kiểm soát âm tính nghiêm ngặt (Nhóm 10).

Tổng thể tỷ lệ mắc các triệu chứng lâm sàng khác nhau giữa các nhóm. Các con lợn nhận 16 μ g vORF2-Carbopol (Nhóm 2), một liều duy nhất 16 μ g vORF2-Carbopol (Nhóm 4), và các con lợn trong nhóm kiểm soát âm tính nghiêm ngặt (Nhóm 10) có tỷ lệ mắc là 0%; các con lợn nhận 16 μ g rORF2-Carbopol (Nhóm 3), và 1 μ g rORF2-Carbopol (Nhóm 6) có tỷ lệ ảnh hưởng là 6,7%; các con lợn nhận 16 μ g rORF2-IMS 1314 (Nhóm 1) có tỷ lệ mắc chung là 7,1%; các con lợn nhận 4 μ g rORF2-Carbopol (Nhóm 5), 0,25 μ g rORF2-Carbopol (Nhóm 7), và vắc xin KV >8 log có tỷ lệ ảnh hưởng là 13,3%; và các con lợn trong Nhóm Kiểm soát Thử nghiệm (Nhóm 9) có tỷ lệ mắc là 14,3%.

Tỷ lệ tử vong chung giữa các nhóm cũng khác nhau. Nhóm 8, nhóm nhận 2 liều vắc xin KV có tỷ lệ tử vong cao nhất là 20,0%; theo sau là Nhóm 9, nhóm kiểm soát thử nghiệm, và Nhóm 7, nhóm nhận 0,25µg rORF2-Carbopol và có tỷ lệ tử vong lần lượt là 14,3% và 13,3%. Nhóm 4, nhóm nhận 1 liều 16µg vORF2-Carbopol có tỷ lệ tử vong là 6,7%. Tất cả các Nhóm khác, nhóm 1, 2, 3, 5, 6, và 10 có tỷ lệ tử vong là 0%.

Bảng 20. Tóm tắt các quan sát đối với Hành vi bất thường, Hô hấp, và Ho bất thường sau thử nghiệm giữa các nhóm

Nhóm	Biện pháp xử lý	N	Hành vi bất thường ¹	Hành vi bất thường ²	Ho ³
1	rORF2 - 16µg – IMS 1314 2 liều lượng	14	0/14 (0%)	0/14 (0%)	1/14 (7,1%)
2	vORF2 - 16µg – Carbopol 2 liều lượng	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
3	rORF2 - 16µg – Carbopol 2 liều lượng	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)
4	vORF2 - 16µg – Carbopol 1 liều lượng	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)
5	rORF2 - 4µg – Carbopol 1 liều lượng	15	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	0/15 (0%)
6	rORF2 - 1µg – Carbopol 2 liều lượng	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)
7	rORF2 – 0,25µg – Carbopol 2 liều lượng	15	0/15 (0%)	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 liều lượng	15	1/15 (6,7%)	1/15 (6,7%)	0/15 (0%)
9	Kiểm soát thử nghiệm	14	1/14 (7,1%)	1/14 (7,1%)	2/14 (14/3%)
10	Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt	15	0/15 (0%)	0/15 (0%)	0/15 (0%)

¹ Tổng số các con lợn trong mỗi nhóm có bất kỳ biểu hiện sinh hoạt bất thường nào ít nhất một ngày

² Tổng số các con lợn trong mỗi nhóm có bất kỳ biểu hiện hô hấp bất thường nào ít nhất một ngày

³ Tổng số các con lợn trong mỗi nhóm ho ít nhất một ngày

Bảng 21. Tóm tắt tổng thể tỷ lệ mắc các triệu chứng lâm sàng sau thử nghiệm ở các nhóm

Nhóm	Biện pháp xử lý	N	Tỷ lệ lợn mắc các triệu chứng lâm sàng ¹	Tỷ lệ ảnh hưởng
1	rORF2 - 16µg – IMS 1314 2 liều lượng	14	1	7,1%
2	vORF2 - 16µg – Carbopol 2 liều lượng	15	0	0,0%
3	rORF2 - 16µg – Carbopol 2 liều lượng	15	1	6,7%
4	vORF2 - 16µg – Carbopol 1 liều lượng	15	0	0,0%
5	rORF2 - 4µg – Carbopol 1 liều lượng	15	2	13,3%
6	rORF2 - 1µg – Carbopol 2 liều lượng	15	1	6,7%
7	rORF2 - 0,25µg - Carbopol 2 liều lượng	15	2	13,3%
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 liều lượng	15	2	13,3%
9	Kiểm soát thử nghiệm	14	2	14,3%
10	Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt	15	0	0,0%

vORF2 = ORF2 virus được tách; rORF2 = ORF2 biểu hiện của baculovirus tái tổ hợp; KV hoặc virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt = virus PCV2 phát triển trong môi trường cấy tế bào thích hợp

¹ Tổng số các con lợn trong mỗi nhóm biểu hiện bất kỳ một triệu chứng lâm sàng nào ít nhất một ngày

Bảng 22. Tóm tắt tỷ lệ tử vong sau thử nghiệm giữa các nhóm

Nhóm	Biện pháp xử lý	N	Tử vong sau thử nghiệm	Tỷ lệ tử vong
1	rORF2 - 16µg – IMS 1314 2 liều lượng	14	0	0,0%
2	vORF2 - 16µg – Carbopol 2 liều lượng	15	0	0,0%
3	rORF2 - 16µg – Carbopol 2 liều lượng	15	0	0,0%
4	vORF2 - 16µg – Carbopol 1 liều lượng	15	1	6,7%

5	rORF2 - 4 μ g – Carbopol 1 liều lượng	15	0	0,0%
6	rORF2 - 1 μ g – Carbopol 2 liều lượng	15	0	0,0%
7	rORF2 – 0,25 μ g – Carbopol 2 liều lượng	15	2	13,3%
8	KV > 8,0 log – Carbopol 2 liều lượng	15	3	20,0%
9	Kiểm soát thử nghiệm	14	2	14,3%
10	Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt	15	0	0,0%

vORF2 = ORF2 virus được tách; rORF2 = ORF2 biểu hiện của baculovirus tái tổ hợp; KV hoặc virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt = virus PCV2 phát triển trong môi trường cấy tế bào thích hợp

Phân tóm tắt các mức phần trăm tổn thương phổi trung bình giữa các nhóm và chẩn đoán thử được đưa ra dưới đây trong bảng 23. Nhóm 9, nhóm kiểm soát thử nghiệm, có mức phần trăm tổn thương phổi cao nhất với giá trị trung bình là $10,81 \pm 23,27\%$, theo sau là Nhóm 7, nhóm nhận 0,25 μ g rORF2-Carbopol và có giá trị trung bình là $6,57 \pm 24,74\%$, Nhóm 5, nhóm nhận 4 μ g rORF2-Carbopol và có giá trị trung bình là $2,88 \pm 8,88\%$, và Nhóm 8, nhóm nhận vắc xin KV và có giá trị trung bình là $2,01 \pm 4,98\%$. Sáu (6) nhóm còn lại có mức phần trăm tổn thương phổi trung bình thấp hơn nằm trong phạm vi từ $0,11 \pm 0,38\%$ đến $0,90 \pm 0,15\%$.

Chẩn đoán tạm thời bệnh viêm phổi khác nhau giữa các nhóm. Nhóm 3, nhóm nhận hai liều 16 μ g rORF2-Carbopol, có tỷ lệ chẩn đoán tạm thời bệnh viêm phổi thấp nhất, với 13,3%. Nhóm 9, nhóm kiểm soát thử nghiệm, có 50% nhóm được chẩn đoán tạm thời bệnh viêm phổi, theo sau là Nhóm 10, nhóm kiểm soát âm tính nghiêm ngặt và Nhóm 2, nhóm nhận hai liều 16 μ g vORF2-Carbopol, với lần lượt 46,7% và 40%, được chẩn đoán tạm thời bệnh viêm phổi.

Các nhóm 1, 2, 3, 5, 9, và 10 có 0% nhóm được chẩn đoán tạm thời nhiễm PCV2; trong khi Nhóm 8, nhóm nhận hai liều vắc xin KV, có tỷ lệ chẩn đoán tạm thời nhiễm PCV2 cao nhất, với 20%. Nhóm 7, nhóm nhận hai liều 0,25 μ g rORF2-Carbopol, và Nhóm 4, nhóm nhận một liều 16 μ g vORF2-Carbopol được chẩn đoán tạm thời nhiễm PCV2 trong lần lượt 13,3% và 6,7% mỗi nhóm.

Loét dạ dày chỉ được chẩn đoán ở một con lợn trong Nhóm 7 (6,7%); trong khi 9 nhóm khác vẫn không bị loét dạ dày.

Bảng 23. Tóm tắt mức % tổn thương phổi trung bình và chẩn đoán tạm thời

Nhóm	Biện pháp xử lý	N	Số lợn mất máu ít nhất một ngày	Tỷ lệ mắc
1	rORF2 - 16µg – IMS 1314 2 liều lượng	15	0	0%
2	vORF2 - 16µg – Carbopol 2 liều lượng	15	1	6,7%
3	rORF2 - 16µg – Carbopol 2 liều lượng	15	3	20,0%
4	vORF2 - 16µg – Carbopol 1 liều lượng	15	2	13,3%
5	rORF2 - 4µg – Carbopol 1 liều lượng	15	3	20,0%
6	rORF2 - 1µg – Carbopol 2 liều lượng	15	6	40,0%
7	rORF2 – 0,25µg – Carbopol 2 liều lượng	15	7	46,7%
8	KV > 8,0log – Carbopol 2 liều lượng	15	12	80%
9	Kiểm soát thử nghiệm	14	14	100,0%
10	Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt	15	14	93,3%

vORF2 = ORF2 virus được tách; rORF2 = ORF2 biểu hiện của baculovirus tái tổ hợp; KV hoặc virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt = virus PCV2 phát triển trong môi trường cấy tế bào thích hợp

Tóm tắt các kết quả ảnh hưởng dương tính đối với IHC giữa các nhóm được đưa ra dưới đây trong Bảng 24. Nhóm 1 (16µg rORF2 - IMS 1314) có tỷ lệ các kết quả dương tính đối với IHC thấp nhất với 0% số lợn dương tính đối với PCV2, theo sau là Nhóm 2 (16µg vORF2 - Carbopol) và Nhóm 4 (1 liều duy nhất 16µg vORF2 - Carbopol), có tỷ lệ IHC là 6,7% và 13,3%, một cách lần lượt. Nhóm 9, nhóm kiểm soát thử nghiệm, có tỷ lệ ảnh hưởng dương tính đối với IHC cao nhất với 100% số lợn dương tính đối với PCV2, theo sau là Nhóm 10, nhóm kiểm soát âm tính nghiêm ngặt, và Nhóm 8 (vaccine KV), với lần lượt 93,3% và 80% số lợn dương tính với PCV2.

Bảng 24. Tóm tắt tỷ lệ mắc dương tính đối với IHC giữa các nhóm

Nhóm	Biện pháp xử lý	N	Số lợn mất máu ít nhất một ngày	Tỷ lệ mắc
1	rORF2 - 16µg – IMS 1314 2 liều lượng	15	0	0%
2	vORF2 - 16µg – Carbopol 2 liều lượng	15	1	6,7%
3	rORF2 - 16µg – Carbopol 2 liều lượng	15	3	20,0%
4	vORF2 - 16µg – Carbopol 1 liều lượng	15	2	13,3%
5	rORF2 - 4µg – Carbopol 1 liều lượng	15	3	20,0%
6	rORF2 - 1µg – Carbopol 2 liều lượng	15	6	40,0%
7	rORF2 – 0,25µg – Carbopol 2 liều lượng	15	7	46,7%
8	KV > 8,0log – Carbopol 2 liều lượng	15	12	80%
9	Kiểm soát thử nghiệm	14	14	100,0%
10	Kiểm soát âm tính nghiêm ngặt	15	14	93,3%

vORF2 = ORF2 virus được tách; rORF2 = ORF2 biểu hiện của baculovirus tái tổ hợp; KV hoặc virus toàn bộ tế bào bị tiêu diệt = virus PCV2 phát triển trong môi trường cấy tế bào thích hợp

Thảo luận

Bảy vắc xin PCV2 được ước lượng trong ví dụ này, bao gồm một liều cao (16µg) kháng thể rORF2 được bổ sung tá chất với IMS 1314 được sử dụng 2 lần, một liều cao (16µg) kháng thể vORF2 được bổ sung tá chất với Carbopol được sử dụng một lần với một nhóm lợn và hai lần với nhóm lợn thứ hai, một liều cao (16µg) kháng thể rORF2 được bổ sung tá chất với Carbopol được sử dụng 2 lần, một liều 4µg kháng thể rORF2 được bổ sung tá chất với Carbopol được sử dụng hai lần, một liều 1µg kháng thể rORF2 được bổ sung tá chất với Carbopol được sử dụng 2 lần, một liều thấp (0,25µg) kháng thể rORF2 được bổ sung tá chất với Carbopol được sử dụng 2 lần, và một liều cao (> 8 log) của vắc xin PCV2 của toàn bộ tế bào bị giết được bổ sung tá chất với Carbopol. Nhìn chung, Nhóm 1, nhóm nhận hai liều 16µg rORF2 - IMS 1314, có kết quả tốt hơn một chút so với các Nhóm từ 2 đến 7, các nhóm nhận vắc xin chứa các mức kháng thể vORF2 hoặc rORF2 khác nhau được bổ sung tá chất với Carbopol và có kết quả tốt hơn nhiều so với Nhóm 8, nhóm nhận hai liều vắc xin PCV2 của toàn bộ tế bào bị giết. Nhóm 1 có mức ADWG cao nhất thứ ba (1,80

$\pm 0,30\text{lbs/ngày}$), tỷ lệ mắc hành vi bất thường thấp nhất (0%), tỷ lệ mắc hô hấp bất thường thấp nhất (0%), tỷ lệ mắc chứng ho thấp (7,1%), tỷ lệ mắc tổng thể các triệu chứng lâm sàng thấp (7,1%), ngang bằng với ba nhóm khác về tỷ lệ tử vong thấp nhất (0%), tỷ lệ % tổn thương phổi trung bình thấp nhất thứ hai ($0,15 \pm 0,34\%$), tỷ lệ viêm phổi thấp nhất thứ hai (21,4%) và tỷ lệ mắc đối với các mô IHC dương tính thấp nhất (0%). Tuy nhiên, Nhóm 1 là nhóm duy nhất trong đó phản ứng tại vị trí tiêm được ghi chép, bao gồm 50% được tiêm chủng 1 ngày sau lần tiêm chủng thứ hai. Các vắc xin khác được dùng cho các Nhóm từ 2 đến 7 có tác dụng tốt hơn vắc xin bị tiêu diệt và gần bằng vắc xin được dùng cho Nhóm 1.

Nhóm 8, nhóm nhận 2 liều vắc xin PCV2 bị giết được bổ sung tá chất với Carbopol, có tập hợp các kết quả tệ nhất đối với bất kỳ nhóm vắc xin nào. Nhóm 8 có mức ADWG thấp nhất ($0,93 \pm 0,33\text{lbs/ngày}$), tỷ lệ sinh hoạt bất thường cao nhất thứ hai (6,7%), tỷ lệ hô hấp bất thường cao nhất (6,7%), ngang bằng với 3 nhóm khác về tỷ lệ ảnh hưởng toàn bộ của các triệu chứng lâm sàng cao nhất (13,3%), có tỷ lệ tử vong cao nhất của tất cả các nhóm (20%), và tỷ lệ IHC dương tính cao nhất (80%) của bất kỳ nhóm vắc xin nào. Có mối quan tâm rằng vắc xin PCV2 của toàn bộ tế bào bị giết có thể không được làm bất hoạt hoàn toàn trước khi sử dụng với Nhóm 8, điều này có thể giải thích cho các kết quả xấu của nhóm này. Không may là, không có số liệu cuối cùng để xác nhận mối quan tâm này. Nhìn chung, trong phạm vi của ví dụ này, vắc xin PCV2 bị giết thông thường không có tác dụng làm giảm bệnh liên quan đến PCV2.

Như được đề cập trước đây, không có kết quả bất lợi nào liên quan đến vắc xin thử nghiệm ngoại trừ vắc xin được bổ sung tá chất với IMS 1314. Phản ứng tại vị trí tiêm được ghi chép ở 50,0% số lợn 1 ngày sau lần tiêm chủng thứ hai với vắc xin có công thức với IMS 1314 và ở 28,6% số lợn 2 ngày sau lần tiêm chủng thứ hai. Không có phản ứng nào được ghi chép ở bất kỳ một con lợn nào nhận vắc xin được bổ sung tá chất Carbopol. Bất kỳ nghiên cứu nào khác bao gồm các con lợn được tiêm chủng với vắc xin được bổ sung tá chất IMS 1314 nên tiếp tục giám sát kỹ lưỡng các con lợn để phản ứng tại vị trí tiêm.

Tất cả các con lợn biểu hiện âm tính huyết thanh đối với PCV2 vào ngày -3 và chỉ có Nhóm 2 có mức chuẩn trên 100 vào ngày 14. Vào Ngày 25 (ngày thử nghiệm), Nhóm 8

có mức chuẩn kháng thể PCV2 cao nhất (4619), theo sau là Nhóm 2 (2507). Ngoại trừ các Nhóm 7, 9 và 10, tất cả các nhóm biểu hiện phản ứng kháng thể mạnh trước ngày 32. Trước ngày 50, tất cả các nhóm bao gồm cả các Nhóm 7, 9 và 10 biểu hiện phản ứng kháng thể mạnh.

Một trong những dấu hiệu xác nhận tiêu chuẩn của việc nhiễm PCV2 ở giai đoạn muộn và sự phát triển sau của PMWS là sự chậm phát triển ở những con lợn mới cai sữa, và trong các trường hợp nghiêm trọng, tình trạng sụt cân được ghi chép. Mức tăng trọng trung bình hàng ngày của các nhóm là một phương pháp định lượng biểu hiện sự chậm phát triển hoặc sụt cân. Trong ví dụ này, không có sự khác biệt lớn về ADWG giữa các nhóm. Nhóm 8 có mức ADWG thấp nhất là $0,88 \pm 0,29\text{lbs/ngày}$, trong khi Nhóm 4 có mức ADWG cao nhất là $1,16 \pm 0,26\text{lbs/ngày}$. Trong phạm vi của nghiên cứu này, không có sự khác nhau vừa đủ giữa các nhóm để đặt mức hiệu quả của vắc xin trong tương lai trên cơ sở của ADWG.

Bên cạnh tình trạng sụt cân – tình trạng khó thở, hôn mê, tái da và đôi khi là chứng vàng da là các triệu chứng lâm sàng liên quan đến PMWS. Trong ví dụ này, hành vi bất thường và hô hấp bất thường và ho không được ghi chép thường xuyên cho mỗi nhóm. Như được chứng minh trong nghiên cứu này, mô hình thử nghiệm và dòng thử nghiệm này không dẫn đến việc biểu hiện nhiều các triệu chứng lâm sàng và không có một tham số tốt để đặt nền tảng cho mức hiệu quả của vắc xin.

Nhìn chung, tỷ lệ tử vong không cao trong ví dụ này và việc không có tỷ lệ tử vong cao ở nhóm kiểm soát thử nghiệm đã hạn chế tham số này đặt nền tảng cho mức hiệu quả của vắc xin. Trước ngày 46, các Nhóm 4 và 7, mỗi nhóm có một trong số mười lăm con lợn tử vong, Nhóm 9 có hai trong số mười bốn con lợn tử vong và Nhóm 8 có ba trong số mười lăm con lợn tử vong. Do thực tế rằng Nhóm 9, nhóm kiểm soát thử nghiệm không biểu hiện các triệu chứng lâm sàng PCV2 và chỉ hai con lợn tử vong trong nhóm này trước ngày 46, vắc xin MLV của Virus hội chứng hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV) được sử dụng với tất cả các con lợn vào ngày 46. Các nghiên cứu trước đã sử dụng INGELVAC® PRRS MLV như một chất kích thích miễn dịch để làm cho bệnh PMWS liên quan đến PCV2 trầm trọng hơn và tỷ lệ tử vong cao hơn trong các nghiên cứu trước đây. Có hai con lợn tử vong ngay

sau khi sử dụng vắc xin PRRS vào ngày 46 - Nhóm 4 có một con lợn tử vong vào ngày 46 và Nhóm 7 có một con lợn tử vong vào ngày 47 - điều này hầu như không liên quan đến việc sử dụng vắc xin PRRS. Vào trước ngày 50, Nhóm 8, nhóm nhận hai liều vắc xin bị giết, có tỷ lệ tử vong cao nhất (20%), theo sau là Nhóm 9 (kiểm soát thử nghiệm) và Nhóm 7 (0,25µg rORF2 - Carbopol), với tỷ lệ tử vong lần lượt là 14,3% và 13,3%. Nhìn chung, việc sử dụng muện vắc xin PRRS đối với mô hình thử nghiệm trong giai đoạn quan sát sau thử nghiệm của ví dụ này không làm tăng đáng kể tỷ lệ tử vong.

Những tổn thương lớn ở lợn với PMWS thứ cấp với việc nhiễm PCV2 thường bao gồm bệnh hạch bạch huyết phổ biến kết hợp với một hoặc nhiều triệu chứng sau: (1) viêm phổi kẽ với phù gian thuỳ nhỏ, (2) tái da hoặc vàng da, (3) gan teo có đốm, (4) loét dạ dày và (5) viêm thận. Khi mổ xác (ngày 50), chứng vàng da, bệnh viêm gan, và viêm thận không được ghi chép trong bất kỳ nhóm nào. Bệnh loét dạ dày được ghi chép ở một con lợn trong Nhóm 7, nhưng bệnh hạch bạch huyết không được nghiên cứu cụ thể. Dựa vào sự xuất hiện của các tổn thương luôn có ở việc nhiễm PCV2, ba nhóm có ít nhất một con lợn được chuẩn đoán thử với PCV2 (PMWS). Nhóm 8, nhóm nhận hai liều vắc xin bị tiêu diệt, có 20% số lợn được chẩn đoán tạm thời với PCV2, trong khi Nhóm 7 và Nhóm 4 có 13,3% và 6,7% số lợn được chẩn đoán thử với PCV2, một cách lần lượt. Mức % tổn thương phổi trung bình khác nhau giữa các nhóm khi mổ xác. Các Nhóm 1, 2, 3, 4, 6 và 10 có mức % tổn thương phổi thấp nằm trong phạm vi từ $0,11 \pm 0,38\%$ đến $0,90 \pm 0,15\%$. Như mong đợi, Nhóm 9, nhóm kiểm soát thử nghiệm, có mức % tổn thương phổi trung bình cao nhất ($10,81 \pm 23,27\%$). Trong bốn nhóm, mức % tổn thương phổi trung bình được ước lượng do từ một đến ba con lợn trong mỗi một nhóm có mức tổn thương phổi rất cao. Tổn thương phổi có màu đỏ/tía và thống nhất. Diễn hình là, tổn thương phổi liên quan đến PMWS được mô tả với màu nâu nhạt, không thể gập lại với chứng phù gian thuỳ nhỏ. Tổn thương phổi ghi chép trong nghiên cứu này hoặc không liên quan đến nhiễm PCV2 hoặc chất lây nhiễm ở phổi thứ hai có thể xuất hiện. Trong phạm vi của nghiên cứu này, mức % tổn thương phổi hầu như không phản ánh thước đo chính xác số lượng nhiễm phổi do PCV2. Cũng như vậy, chẩn đoán thử bệnh viêm phổi cũng có thể được sử dụng. Bất kỳ một con lợn nào bị tổn thương phổi, ở mức 0,10% được ghi vào danh sách chẩn đoán thử bệnh viêm phổi. Trong

ví dụ này, không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm về tổn thương lớn và mức % tổn thương phổi làm nền tảng cho mức hiệu quả của vắc xin.

Các kết quả về IHC cho thấy sự khác biệt lớn nhất giữa các nhóm. Nhóm 1 (16µg rORF2 - IMS 1314) có các kết quả IHC dương tính thấp nhất đối với kháng thể PCV2 (0%); trong khi các Nhóm 9 và 10 có các kết quả IHC dương tính cao nhất với tỷ lệ mắc lần lượt là 100% và 93,3%. Các Nhóm 3, 5, 6 và 7, các nhóm nhận 16, 4, 1 hoặc 0,25µg kháng thể rORF2, một cách lần lượt, được bổ sung tá chất với Carbopol, có tỷ lệ IHC dương tính lần lượt là 20%, 20%, 40% và 46,7%. Nhóm 2, nhóm nhận 2 liều 16µg vORF2 được bổ sung tá chất với Carbopol có tỷ lệ IHC dương tính là 6,7%, trong khi Nhóm 4, nhóm nhận duy nhất một liều vắc xin cùng loại, có tỷ lệ IHC dương tính là 13,3%. Do bản chất khách quan của thử nghiệm này và thực tế rằng các kết quả IHC có tương quan với các kết quả mong đợi, nên việc thử nghiệm IHC chắc chắn là một trong những tham số tốt nhất tạo nền tảng cho mức hiệu quả của vắc xin.

Vì vậy, trong một khía cạnh của sáng chế, liều lượng phòng ngừa tối thiểu (MPD) của kháng thể rORF2 của PCV2 được bổ sung tá chất với Carbopol trong mô hình lợn CDCD trước khi thử nghiệm PCV2 được xác định. Các Nhóm 3, 5, 6 và 7, mỗi nhóm nhận hai liều kháng thể rORF2 được bổ sung tá chất với Carbopol, nhưng mức kháng thể rORF2 khác nhau đối với mỗi nhóm. Các Nhóm 3, 5, 6 và 7, mỗi nhóm lần lượt nhận 16, 4, 1 hoặc 0,25µg kháng thể rORF2. Nhìn chung, việc giảm mức kháng thể rORF2 làm giảm mức chuẩn kháng thể PCV2, và làm tăng tỷ lệ tử vong, mức % tổn thương phổi trung bình và ảnh hưởng của các mô dương tính với IHC. Trong số bốn nhóm nhận các mức rORF2 – Carbopol khác nhau, các Nhóm 3 và 5, các nhóm lần lượt nhận hai liều 16 hoặc 4µg kháng thể rORF2, mỗi nhóm có tỷ lệ dương tính với IHC chỉ có 20%, và mỗi nhóm có mức chuẩn kháng thể giống nhau. Nhìn chung, dựa trên các kết quả dương tính với IHC, liều lượng phòng ngừa tối thiểu của kháng thể rORF2 được dùng hai lần là xấp xỉ 4µg.

Trong một khía cạnh khác của sáng chế, tính kháng thể của kháng thể PCV2 tái tổ hợp (rORF2) và kháng thể PCV2 VIDO R-1 (vORF2) được đánh giá. Nhóm 2 nhận hai liều 16µg vORF2 và Nhóm 3 nhận hai liều 16µg rORF2. Cả hai vắc xin này được bổ sung tá chất với Carbopol. Cả hai vắc xin này cho thấy là an toàn và cả hai loại vắc xin có tỷ lệ tử

vong là 0%. Nhóm 2 có mức chuẩn kháng thể PCV2 là 2507 vào ngày 25, trong khi Nhóm 3 có mức chuẩn kháng thể PCV2 là 1503. Nhóm 3 có mức % tổn thương phổi trung bình thấp hơn Nhóm 2 ($0,11 \pm 0,38\%$ với $0,90 \pm 0,15\%$), nhưng Nhóm 2 có tỷ lệ mắc dương tính với IHC thấp hơn Nhóm 3 (6,7% vs. 20%). Nhìn chung, cả hai vắc xin này có tính kháng thể giống nhau, nhưng vORF2 có liên quan với các kết quả IHC tốt hơn một chút.

Trong một khía cạnh khác của sáng chế, sự thích hợp của hai tá chất khác nhau (Carbopol và IMS 1314) được xác định. Các Nhóm 1 và 3 nhận hai liều vắc xin chứa 16 μ g kháng thể rORF2, nhưng Nhóm 1 nhận kháng thể được bổ sung tá chất với IMS 1314 trong khi Nhóm 3 nhận kháng thể được bổ sung tá chất với Carbopol. Cả hai nhóm về cơ bản có cùng mức ADWG, cùng mức ảnh hưởng của các dấu hiệu lâm sàng sau thử nghiệm, cùng mức tỷ lệ tử vong, và cùng mức % tổn thương phổi trung bình; nhưng Nhóm 1 có tỷ lệ dương tính với IHC là 0% trong khi Nhóm 3 có tỷ lệ dương tính với IHC là 20%. Tuy nhiên, Nhóm 3, nhóm nhận vắc xin được bổ sung tá chất với Carbopol có mức chuẩn IFAT PCV2 cao hơn vào các ngày 25, 32 và 50 so với Nhóm 1, nhóm nhận vắc xin được bổ sung tá chất với IMS 1314. Nhìn chung, mặc dù vắc xin PCV2 được bổ sung tá chất với IMS 1314 đã đưa ra những kết quả IHC tốt hơn, nhưng vắc xin này không tạo ra sự phòng ngừa tốt hơn đối với việc nhiễm PCV2 và gây ra phản ứng tại vị trí tiêm. Trong khi vắc xin PCV2 được bổ sung tá chất với Carbopol có tác dụng tốt gần bằng vắc xin được bổ sung tá chất với IMS 1314, nhưng lại không liên quan đến bất kỳ một kết quả bất lợi nào.

Trong một khía cạnh khác của sáng chế, tính khả thi của ORF2 của PCV2 trong 1ml, một liều sản phẩm được xác định. Các Nhóm 2 và 4 đều nhận 16 μ g vắc xin vORF2 được bổ sung tá chất với Carbopol vào ngày 0, nhưng Nhóm 2 nhận một liều thứ hai vào ngày 14. Nhóm 4 có mức ADWG cao hơn một chút và mức % tổn thương phổi trung bình thấp hơn Nhóm 2, nhưng Nhóm 2 có mức chuẩn PCV2 đối với IFAT cao hơn vào Ngày 25, 32 và 50, và mức tỷ lệ ảnh hưởng thấp hơn một chút của các mô dương tính đối với IHC. Tất cả các kết quả khác của hai nhóm này là giống nhau. Nhìn chung, một liều vORF2 được bổ sung tá chất với Carbopol có tác dụng giống với hai liều vắc xin cùng loại.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm một lượng protein PCV2 ORF2 tái tổ hợp có hiệu quả và một thành phần bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm các chất virus bất hoạt, vật truyền virus bất hoạt, các chất trung hòa virus bất hoạt và kết hợp của chúng, trong đó chế phẩm tạo miễn dịch đã nêu cung cấp tác dụng bảo vệ chống lại các triệu chứng lâm sàng liên quan đến nhiễm PCV2 sau khi dùng một liều duy nhất.
2. Chế phẩm tạo miễn dịch theo điểm 1, trong đó protein PCV2 ORF2 đã nêu được chọn từ nhóm bao gồm:
 - i) một polypeptit bao gồm một trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 11;
 - ii) bất kỳ polypeptit nào tương đồng ít nhất 90% với polypeptit theo i);
 - iii) một polypeptit được mã hóa bởi ADN bao gồm trình tự SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4; và
 - iv) bất kỳ polypeptit nào được mã hóa bởi một polynucleotit mà tương đồng ít nhất 90% với polynucleotit theo iii).
3. Chế phẩm tạo miễn dịch theo điểm 1, trong đó, chế phẩm đã nêu bao gồm một vật truyền virus bất hoạt.
4. Chế phẩm tạo miễn dịch theo điểm 3, trong đó vật truyền virus bất hoạt đã nêu là một baculovirus tái tổ hợp mã hóa cho protein PCV2 ORF2.
5. Chế phẩm tạo miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm đã nêu bao gồm một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm dịch nổi nuôi cấy tế bào, natri thiosulfat, BEI, chất mang, tá dược, môi trường, chất pha loãng, chất đẳng trương, chất điều hòa miễn dịch, thuốc kháng sinh, và kết hợp của chúng.

6. Chế phẩm tạo miễn dịch theo điểm 5, trong đó tá dược đã nêu được chọn từ nhóm bao gồm axit acrylic, axit metacrylic và bất kỳ polyme nào của chúng.
7. Chế phẩm tạo miễn dịch theo điểm 6, trong đó tá dược đã nêu là một polyme của axit acrylic hoặc methacrylic và trong đó cho biết polyme được liên kết chéo với ete polyalkenyl của đường hoặc rượu đa chức.
8. Chế phẩm tạo miễn dịch theo điểm 1, trong đó, chế phẩm đã nêu bao gồm một carbomer.
9. Chế phẩm tạo miễn dịch theo điểm 8, trong đó lượng carbomer đã nêu là khoảng 500 μg đến khoảng 5 mg carbomer mỗi liều.
10. Chế phẩm tạo miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm đã nêu bao gồm một loại muối được dụng.
11. Chế phẩm tạo miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm tạo miễn dịch đã nêu bao gồm 4-400 μg protein PCV2 ORF2 tái tổ hợp.
12. Chế phẩm tạo miễn dịch theo điểm 1, trong đó chế phẩm tạo miễn dịch đã nêu là vắc-xin.
13. Chế phẩm tạo miễn dịch theo điểm 1, trong đó 1 liều chế phẩm tạo miễn dịch đã nêu được bào chế có thể tích ít nhất là 1 ml.
14. Chế phẩm tạo miễn dịch cung cấp tác dụng bảo vệ chống lại các triệu chứng lâm sàng của nhiễm PCV2 ở lợn sau khi dùng một liều duy nhất của chế phẩm tạo miễn dịch này, trong đó chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm một lượng protein PCV2 ORF2 tái tổ hợp có hiệu quả được chọn từ nhóm bao gồm:
 - i) một polypeptit bao gồm một trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 11;

- ii) bất kỳ polypeptit nào ít nhất 90% tương đồng với polypeptit theo i);
- iii) một polypeptit được mã hóa bởi ADN bao gồm trình tự SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4; và
- iv) bất kỳ polypeptit nào được mã hóa bởi một polynucleotit có ít nhất 90% tương đồng với polynucleotit theo iii).

15. Chế phẩm tạo miễn dịch theo điểm 14, trong đó lượng PCV2 ORF2 tái tổ hợp có hiệu quả đã nêu ít nhất là 4 µg.

16. Chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm ít nhất 2 µg protein PCV2 ORF2 tái tổ hợp và một thành phần bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm các chất virus bất hoạt, vật truyền virus bất hoạt, các chất trung hòa virus bất hoạt và các kết hợp của chúng, trong đó chế phẩm tạo miễn dịch đã nêu cung cấp tác dụng bảo vệ chống lại các triệu chứng lâm sàng liên quan đến nhiễm PCV2 sau khi dùng một liều duy nhất.

17. Chế phẩm tạo miễn dịch bao gồm:

một lượng protein PCV2 ORF2 tái tổ hợp hiệu quả và một chất mang, trong đó protein PCV2 ORF2 này được chọn từ nhóm bao gồm:

- i) một polypeptit bao gồm một trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 11;
 - ii) bất kỳ polypeptit nào ít nhất 90% tương đồng với polypeptit theo i);
 - iii) một polypeptit được mã hóa bởi ADN bao gồm trình tự SEQ ID NO: 3 hoặc SEQ ID NO: 4; và
 - iv) bất kỳ polypeptit nào được mã hóa bởi một polynucleotit có ít nhất 90% tương đồng với polynucleotit theo iii);
- trong đó chế phẩm tạo miễn dịch đã nêu cung cấp tác dụng bảo vệ chống lại các triệu chứng lâm sàng liên quan đến nhiễm PCV2 sau khi dùng một liều duy nhất.

18. Chế phẩm tạo miễn dịch theo điểm 17, trong đó chế phẩm nói trên bao gồm một thành phần bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm các chất virus bất hoạt, vật truyền virus bất hoạt, các chất trung hòa virus bất hoạt và các kết hợp của chúng.

19. Chế phẩm tạo miễn dịch theo điểm 17, trong đó lượng protein PCV2 ORF2 tái tổ hợp có hiệu quả đã nêu nằm trong khoảng từ 4-400 μg .

34816-CIP1.ST25
DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Roof, Mike
Eichmeyer, Mark
Nitzel, Greg
Schaeffer, Merrill
Hayes, Phillip

<120> KIT ĐỂ NGĂN NGỪA SỰ NHIỄM PCV2

<130> 34816-CIP1

<140> PCT/US2005/047596

<141> 2005-12-29

<150> CHƯA BIẾT

<151> 2004-12-30

<160> 11

<170> Phiên bản patentin 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đây là trình tự Kozak biến đổi.

<400> 1

ccgccatg

8

<210> 2

<211> 6

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đây là trình tự Eco R1 tái tổ hợp.

<400> 2

gaattc

6

<210> 3

<211> 713

<212> ADN

<213> Virut gây ra hội chứng gây còm sau thời kỳ dứt sữa ở lợn (PCV)

<400> 3

cagctatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc	60
ttggccagat cctccgcgcg cgccccctggc tcgtccaccc cgcgccaccgc taccgttgga	120
gaaggaaaaa tggcatcttc aacaccgcgc tctccgcac cttcggatat actgtggaga	180
aggaaaaatg gcattcttcaa caccgcctc tcccgacact tcggatatac tgtgacgact	240
ttgttcccc gggagggggg accaacaataa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa	300

34816-CIP1.ST25

gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
 gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
 acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatccccc acccttctcc taccactccc 480
 gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
 aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
 gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
 tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttaa accctaaatg aat 713

<210> 4

<211> 713

<212> ADN

<213> PCV

<400> 4

ccgccatgac gtatccaagg aggcgttacc gcagaagaag acaccgcccc cgcagccatc 60
 ttggccagat cctccgccgc cggccctggc tgcgccaccc ccgccaccgc taccgttga 120
 gaaggaaaaa tggcatcttc aacacccgcc tctcccgac ctteggatat actgtcaagg 180
 ctaccacagt cacaacgccc tcctgggcgg tggacatgat gagatttaat attgacgact 240
 ttgttcccc gggagggggg accaacaaaa tctctatacc ctttgaatac tacagaataa 300
 gaaagggttaa ggttgaattc tggccctgct ccccatcac ccagggtgat aggggagtgg 360
 gctccactgc tgttattcta gatgataact ttgtaacaaa ggccacagcc ctaacctatg 420
 acccatatgt aaactactcc tcccgccata caatccccc acccttctcc taccactccc 480
 gttacttcac acccaaacct gttcttgact ccactattga ttacttccaa ccaaataaca 540
 aaaggaatca gctttggctg aggctacaaa cctctagaaa tgtggaccac gtaggcctcg 600
 gcactgcgtt cgaaaacagt aaatacgacc aggactacaa tatccgtgta accatgtatg 660
 tacaattcag agaatttaat cttaaagacc cccacttga accctaagaa ttc 713

<210> 5

<211> 233

<212> PRT

<213> PCV

<400> 5

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
 20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
 35 40 45

34816-CIP1.ST25

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr
 50 55 60
 Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val
 65 70 75 80
 Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95
 Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
 100 105 110
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125
 Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140
 Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
 165 170 175
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn
 180 185 190
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp
 195 200 205
 Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Lys Pro
 225 230

<210> 6

<211> 233

<212> PRT

<213> PCV

<400> 6

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1 5 10 15
 Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
 20 25 30

34816-CIP1.ST25

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
 35 40 45
 Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Thr Thr
 50 55 60
 Pro Ser Trp Ala Val Asp Met Met Arg Phe Asn Ile Asp Asp Phe Val
 65 70 75 80
 Pro Pro Gly Gly Gly Thr Asn Lys Ile Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr
 85 90 95
 Arg Ile Arg Lys Val Lys Val Glu Phe Trp Pro Cys Ser Pro Ile Thr
 100 105 110
 Gln Gly Asp Arg Gly Val Gly Ser Thr Ala Val Ile Leu Asp Asp Asn
 115 120 125
 Phe Val Thr Lys Ala Thr Ala Leu Thr Tyr Asp Pro Tyr Val Asn Tyr
 130 135 140
 Ser Ser Arg His Thr Ile Pro Gln Pro Phe Ser Tyr His Ser Arg Tyr
 145 150 155 160
 Phe Thr Pro Lys Pro Val Leu Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Phe Gln Pro
 165 170 175
 Asn Asn Lys Arg Asn Gln Leu Trp Leu Arg Leu Gln Thr Ser Arg Asn
 180 185 190
 Val Asp His Val Gly Leu Gly Thr Ala Phe Glu Asn Ser Lys Tyr Asp
 195 200 205
 Gln Asp Tyr Asn Ile Arg Val Thr Met Tyr Val Gln Phe Arg Glu Phe
 210 215 220
 Asn Leu Lys Asp Pro Pro Leu Glu Pro
 225 230

<210> 7

<211> 756

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Trình tự này là từ PCV loại 2, khung đọc mở 2, cùng với một phần từ vật truyền pGEM T-easy.

34816-CIP1.ST25

<400> 7

```

gcggccgcgg gaattcgatc cgccatgacg tatccaagga ggcgttaccc cagaagaaga    60
caccgcccc gcagccatct tggccagatc ctccgcgcc gccctggct cgtccacccc    120
cgccaccgct accggtggag aaggaaaaat ggcattctca acaccgcct ctcccgacc    180
ttcgatata ctgtcaaggc taccacagtc acaacgccct cctgggcggt ggacatgatg    240
agatttaata ttgacgactt tgttcccccg ggagggggga ccaacaaaat ctctataccc    300
tttgaatact acagaataag aaaggttaag gttgaattct ggccctgctc ccccatcacc    360
cagggtgata ggggagtggt ctccactgct gttattctag atgataactt tgtaacaaag    420
gccacagccc taacctatga cccatattga aactactcct cccgccatac aatcccccaa    480
cccttctcct accactcccc ttacttcaca cccaaacctg ttcttgactc cactattgat    540
tacttccaac caaataacaa aaggaatcag ctttggctga ggctacaaac ctctagaaat    600
gtggaccacg taggcctcgg cactgcgttc gaaaacagta aatacgacca ggactacaat    660
atccgtgtaa ccattgtatg acaattcaga gaatttaatc ttaaagaccc cccacttgaa    720
ccctaagaat tctatcacta gtgaattcgc ggcgcg                                756

```

<210> 8

<211> 10387

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Đây là PCV loại 2, cấu trúc ORF2, bao gồm baculovirut và các trình tự mã hóa pGEM T-easy.

<400> 8

```

aagctttact cgtaaagcga gttgaaggat catatttagt tgcgtttatg agataagatt    60
gaaagcacgt gtaaaatggt tcccgcgcgt tggcacaact atttacaatg cggccaagtt    120
ataaaaagatt ctaatctgat atgtttttaa acacctttgc ggcccagatt gtttgctac    180
gtgactagcg aagaagatgt gtggaccgca gaacagatag taaaacaaaa ccctagtatt    240
ggagcaataa tcgatttaac caacacgtct aaatattatg atggtgtgca tttttgcgg    300
gcgggcctgt tatacaaaaa aattcaagta cctggccaga ctttgccgc tgaaagcata    360
gttcaagaat ttattgacac ggtaaaagaa ttacagaaa agtgtcccg catgttggtg    420
ggcgtgcact gcacacacgg tattaatcgc accggttaca tgggtgtcag atatttaatg    480
cacaccctgg gtattgcgcc gcaggaagcc atagatagat tcgaaaaagc cagaggtcac    540
aaaattgaaa gacaaaatta cgttcaagat ttattaattt aattaatatt atttgcattc    600
tttaacaaat accttatcct attttcaaat tgttgcgctt cttccagcga accaaaacta    660
tgcttcgctt gctccgttta gctttagacc gatcagtggc gttgttccaa tcgacggtag    720
gattaggccg gatattctcc accacaatgt tggcaacgtt gatgttacgt ttatgctttt    780

```

34816-CIP1.ST25

ggttttccac gtacgtcttt tggccggtaa tagccgtaaa cgtagtgccg tcgcgcgta	840
cgcacaacac cggatgtttg cgcttgccg cgggggtattg aaccgcgcga tccgacaaat	900
ccaccacttt ggcaactaaa tcggtgacct gcgcgtcttt tttctgcatt atttcgtctt	960
tcttttgcac ggtttcctgg aagccggtgt acatgcggtt tagatcagtc atgacgcgcg	1020
tgacctgcaa atctttggcc tcgatctgct tgtccttgat ggcaacgatg cgttcaataa	1080
actcttggtt ttaacaagt tcctcggtt tttgcgccac caccgcttgc agcgcggttg	1140
tgtgctcggg gaatgtcgca atcagcttag tcaccaactg tttgctctcc tcctcccgtt	1200
gtttgatcgc gggatcgtaac ttgccgggtgc agagcacttg aggaattact tcttctaaaa	1260
gccattcttg taattctatg gcgtaaggca atttggactt cataatcagc tgaatcacgc	1320
cggatttagt aatgagcact gtatgcggct gcaaatacag cgggtcgccc cttttcacga	1380
cgctgttaga ggtaggggcc cctttttgga tggctctgctc aaataacgat ttgtatttat	1440
tgtctacatg aacacgtata gctttatcac aaactgtata ttttaaactg ttagcgacgt	1500
ccttgccac gaaccggacc tgttggtcgc gctctagcac gtaccgcagg ttgaacgtat	1560
cttctccaaa tttaaattct ccaattttta cgcgagccat tttgatacac gtgtgtcgat	1620
tttgcaacaa ctattgtttt ttaacgcaaa ctaaacttat tgtggtaagc aataattaaa	1680
tatgggggaa catgcgccgc tacaacactc gtcgttatga acgcagacgg cgccggtctc	1740
ggcgcaagcg gctaaaacgt gttgcgcgtt caacgcggca aacatcgcaa aagccaatag	1800
tacagttttg atttgcatat taacggcgat tttttaaatt atcttattta ataaatagtt	1860
atgacgccta caactccccg cccgcgttga ctcgctgcac ctcgagcagt tcgttgacgc	1920
cttctccgt gtggccgaac acgtcgagcg ggtggctgat gaccagcggc gtgccgcacg	1980
cgacgcacaa gtatctgtac accgaatgat cgtcgggcca aggcacgtcg gcctccaagt	2040
ggcaatattg gcaaattcga aaatatatac agttgggttg tttgcgcata tctatcgtgg	2100
cgttgggcat gtacgtccga acgttgattt gcatgcaagc cgaaattaaa tcattgcgat	2160
tagtgcgatt aaaacgttgt acatcctcgc ttttaatcat gccgtcgatt aaatcgcga	2220
atcgagtcaa gtgatcaaag tgtggaataa tgttttcttt gtattcccga gtcaagcgca	2280
gcgcgtattt taacaaacta gccatcttgt aagttagttt catttaatgc aactttatcc	2340
aataatatat tatgtatcgc acgtcaagaa ttaacaatgc gcccgttgtc gcatctcaac	2400
acgactatga tagagatcaa ataaagcgcg aattaaatag cttgcgacgc aacgtgcacg	2460
atctgtgcac gcgttccggc acgagctttg attgtaataa gtttttacga agcgatgaca	2520
tgacccccgt agtgacaacg atcacgccca aaagaactgc cgactacaaa attaccgagt	2580
atgtcgggtga cgttaaaaact attaagccat ccaatcgacc gttagtcgaa tcaggaccgc	2640

5

tggtgcgaga agccgcgaag tatggcgaat gcatcgtata acgtgtggag tccgctcatt	2700
agagcgtcat gtttagacaa gaaagctaca tattttaattg atcccgatga ttttattgat	2760
aaattgaccc taactccata cacggtattc tacaatggcg gggtttttgt caaaatttcc	2820
ggactgcgat tgtacatget gttaacggct ccgcccacta ttaatgaaat taaaaattcc	2880
aattttaaaa aacgcagcaa gagaaacatt tgtatgaaag aatgcgtaga aggaaagaaa	2940
aatgtcgtcg acatgctgaa caacaagatt aatatgcctc cgtgtataaa aaaaatattg	3000
aacgatttga aagaaaacaa tgtaccgcgc ggcggtatgt acaggaagag gtttatacta	3060
aactgttaca ttgcaaacgt ggttctgtgt gccaaagtgt aaaaccgatg tttaatcaag	3120
gctctgacgc atttctacaa ccacgactcc aagtgtgtgg gtgaagtcac gcatctttta	3180
atcaaatccc aagatgtgta taaaccacca aactgccaaa aaatgaaaac tgtcgacaag	3240
ctctgtccgt ttgctggcaa ctgcaagggc ctcaatccta tttgtaatta ttgaataata	3300
aaacaattat aaatgctaaa tttgtttttt attaacgata caaaccaaac gcaacaagaa	3360
catttgtagt attatctata attgaaaacg cgtagttata atcgtcgagg taatatttaa	3420
aatcattttc aaatgattca cagttaattt gcgacaatat aattttatit tcacataaac	3480
tagacgcctt gtcgtcttct tcttcgtatt ccttctcttt ttcatttttc tcctcataaa	3540
aattaacata gttattatcg tatccatata tgtatctatc gtatagagta aattttttgt	3600
tgtcataaat atatatgtct tttttaatgg ggtgtatagt accgctgcgc atagtttttc	3660
tgtaattttac aacagtgcga ttttctggta gttcttcgga gtgtgttgct ttaattatta	3720
aatttatata atcaatgaat ttgggatcgt cggttttgta caatatgttg ccggcatagt	3780
acgcagcttc ttctagttca attacaccat tttttagcag caccggatta acataacttt	3840
ccaaaatggt gtacgaaccg ttaaacaata acagttcacc tcccttttct atactattgt	3900
ctgcgagcag ttgtttgttg ttaaaaataa cagccattgt aatgagacgc acaaactaat	3960
atcacaaact ggaaatgtct atcaatatat agttgctgat atcatggaga taattaaaat	4020
gataaccatc tcgcaaataa ataagtattt tactgttttc gtaacagttt tgtaataaaa	4080
aaacctataa atattccgga ttattcatac cgtcccacca tcgggcgcgc atcagatctg	4140
cagcgccgcg gggaattcga tccgccatga cgtatccaag gaggcgttac cgcagaagaa	4200
gacaccgccc ccgcagccat cttggccaga tcctccgccg ccgcccctgg ctctccacc	4260
cccgccaccg ctaccgttgg agaaggaaaa atggcatctt caacaccgcg ctctcccgca	4320
ccttcggata tactgtcaag gctaccacag tcacaacgcc ctctctggcg gtggacatga	4380
tgagatttaa tattgacgac ttgtttcccc cgggaggggg gaccaacaaa atctctatac	4440
cctttgaata ctacagaata agaaagggtt aggttgaatt ctggccctgc tccccatca	4500
cccaggggtg taggggagtg ggctccactg ctgttattct agatgataac ttgtatacaa	4560

34816-CIP1.ST25

aggccacagc cctaacctat gaccatagc taaactactc ctcccgccat acaatcccc	4620
aacccttctc ctaccactcc cgttacttca cacccaaacc tggtcttgac tccactattg	4680
attacttcca accaaataac aaaaggaatc agctttggct gaggctacaa acctctagaa	4740
atgtggacca cgtaggcctc ggcactgctg tcgaaaacag taaatcgac caggactaca	4800
atatccgtgt aaccatgtat gtacaattca gagaatttaa tcttaaagac cccccacttg	4860
aaccctaaga attctatcac tagtgaattc gcgccgcgcg gccgctccag aattctagaa	4920
ggtaccggg atcctttcct gggacccggc aagaacaaa aactcactct cttcaaggaa	4980
atccgtaatg ttaaaccga cagatgaag ctgtcggtg gatggaaagg aaaagagttc	5040
tacagggaaa cttggaccgc cttcatggaa gacagcttcc ccattgttaa cgaccaagaa	5100
gtgatggatg ttttcttgt tgtcaacatg cgteccacta gacccaaccg ttgttataaa	5160
ttctggccc aacacgctct gcgttgcgac cccgactatg tacctcatga cgtgattagg	5220
atcgctgagc cttcatgggt gggcagcaac aacgagtacc gcatcagcct ggctaagaag	5280
ggcggcggct gcccaataat gaaccttcac tctgagtaca ccaactcgtt cgaacagttc	5340
atcgatcgtg tcatctggga gaacttctac aagcccatcg ttacatcgg taccgactct	5400
gctgaagagg aggaaattct cttgaagtt tccttggtgt tcaaagtaaa ggagtttgca	5460
ccagacgcac ctctgttcac tggtcggcg tattaataca cgatacattg ttattagtac	5520
atttattaag cgctagattc tgtgcgttgt tgatttacag acaattggtg tacgtatttt	5580
aataattcat taaatttata atctttaggg tggatatgta gagcgaaaat caaatgattt	5640
tcagcgtctt tatatctgaa tttaaattt aaatcctcaa tagatttgta aaataggttt	5700
cgattagttt caaacaaggg ttgtttttcc gaaccgatgg ctggactatc taatggattt	5760
tcgctcaacg ccacaaaact tgccaaatct tgtagcagca atctagcttt gtcgatattc	5820
gtttgtgttt tgttttgtaa taaaggttcg acgtcgttca aaatattatg cgcttttgta	5880
tttctttcat cactgtcgtt agtgtaaat tgactcgacg taaacacggt aaataaagct	5940
tggacatatt taacatcggg cgtgttagct ttattaggcc gattatcgtc gtcgtccaa	6000
ccctcgtcgt tagaagttgc ttccgaagac gattttgcca tagccacacg acgctatta	6060
attgtgtcgg ctaacacgtc cgcgatcaaa ttgtagttg agctttttgg aattatttct	6120
gattgcgggc gtttttggc gggtttcaat ctaactgtgc ccgattttaa ttcagacaac	6180
acgttagaaa gcgatggtgc aggcggtggt aacatttcag acggcaaate tactaatggc	6240
ggcgggtggt gagctgatga taaatctacc atcgggtggag gcgcaggcgg ggctggcggc	6300
ggaggcggag gcggaggtgg tggcgggtgat gcagacggcg gtttaggctc aaatgtctct	6360
ttaggcaaca cagtcggcac ctcaactatt gtactggttt cgggcgccgt ttttggtttg	6420

34816-CIP1.ST25

accggtctga gacgagtgcg atttttttcg tttctaatag cttccaacaa ttgttgctctg	6480
tctgtctaaag gtgcagcggg ttgaggttcc gtcggcattg gtggagcggg cggcaattca	6540
gacatcgatg gtgggtggtg ttgtggaggc gctggaatgt taggcacggg agaaggtggt	6600
ggcggcgggtg ccgccgggat aattttgttct ggttttagttt gttcgcgcac gatttggtggc	6660
accggcgag ggcggcgtg ctgcacaacg gaaggctcgt tgcctcgagg cagcgttgg	6720
ggtggtggca attcaatatt ataattggaa tacaatcgt aaaaatctgc tataagcatt	6780
gtaatttcgc tatcgtttac cgtgccgata tttacaacc gctcaatgta agcaattgta	6840
ttgtaaagag attgtctcaa gctcgccgca cgccgataac aagccttttc atttttacta	6900
cagcattgta gtggcgagac acttcgctgt cgtcgacgta catgtatgct ttgttgctca	6960
aaacgtcgtt ggcaagcttt aaaatattta aaagaacatc tctgttcagc accactgtgt	7020
tgtcgtaaat gttgtttttg ataattttcg cttccgcagt atcgacacgt tcaaaaaatt	7080
gatgcgcac aattttgttg ttctattat tgaataaata agattgtaca gattcatatc	7140
tacgattcgt catggccacc acaaatgcta cgctgcaaac gctggtacaa ttttacgaaa	7200
actgcaaaaa cgtcaaaact cgggtataaaa taatcaacgg gcgctttggc aaaatatcta	7260
ttttatcgca caagcccact agcaaattgt atttgcagaa aacaatttcg gcgcacaatt	7320
ttaacgctga cgaaataaaa gttcaccagt taatgagcga ccacccaaat ttataaaaa	7380
tctattttta tcacggttcc atcaacaacc aagtgatcgt gatggactac attgactgtc	7440
ccgatttatt tgaaacacta caaattaaag gcgagctttc gtaccaactt gttagcaata	7500
ttattagaca gctgtgtgaa gcgctcaacg atttgcacaa gcacaatttc atacacaacg	7560
acataaaact cgaaaatgtc ttatatttcg aagcacttga tcgctgtgat gtttgcgatt	7620
acggattgtg caaacacgaa aactcactta gcgtgcacga cggcacgttg gagtatttta	7680
gtccggaaaa aattcgacac acaactatgc acgtttcgtt tgactggtac gcggcgtgtt	7740
aacatacaag ttgctaacgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc	7800
gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta	7860
atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa	7920
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgat	7980
tgggcgctct tccgcttcct cgtcactga ctcgtgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg	8040
agcggatatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc	8100
aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt	8160
gctggcggtt ttccataggc tccgcccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag	8220
tcagaggtgg cgaaaccgca caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc	8280
cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc	8340

34816-CIP1.ST25

ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt	8400
cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt	8460
atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc	8520
agccactggg aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa	8580
gtggtggcct aactacggct acactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa	8640
gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg	8700
tagcgggtgg ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga	8760
agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg	8820
gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg	8880
aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt	8940
aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact	9000
ccccgtcgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat	9060
gataccgcga gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg	9120
aagggccgag cgcagaagtg gtccctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg	9180
ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat	9240
tgctacagge atcgtgggtg cacgctcgtc gtttggtagt gcttcattca gtcgccgttc	9300
ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt	9360
cggctcctcg atcgttgctc gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc	9420
agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga	9480
gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgccgggc	9540
gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa	9600
acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta	9660
accactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg	9720
agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac ggaaatgttg	9780
aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat	9840
gagcgggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt	9900
tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa	9960
aaataggcgt atcacgagge cctttcgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct	10020
ctgacacatg cagctcccg agacggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag	10080
acaagcccg cagggcgcg cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc	10140
ggcatcagag cagattgtac tgagagtgca ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg	10200

34816-CIP1 ST25

cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgcca ttccgcatc aggctgcgca actgttgga 10260
 agggcgatcg gtgcgggctt ctccgctatt acgccagctg gcgaaagggg gatgtgctgc 10320
 aaggcgatta agttgggtaa cgccagggtt ttcccagtcg cgacgttgta aaacgacggc 10380
 cagtgcc 10387

<210> 9
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> PCV

<400> 9

Ser Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His His Pro Pro Ser
 1 5 10 15

His Leu Gly Gln
 20

<210> 10
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> PCV

<400> 10

Pro Arg His His Tyr Arg Pro Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr
 1 5 10 15

Thr Leu Ser

<210> 11
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> Đây là trình tự axit amin cho PCV loại 2 ở lợn, khung đọc mở 2.

<400> 11

Met Thr Tyr Pro Arg Arg Arg Tyr Arg Arg Arg Arg His Arg Pro Arg
 1 5 10 15

Ser His Leu Gly Gln Ile Leu Arg Arg Arg Pro Trp Leu Val His Pro
 20 25 30

Arg His Arg Tyr Arg Trp Arg Arg Lys Asn Gly Ile Phe Asn Thr Arg
 35 40 45

Leu Ser Arg Thr Phe Gly Tyr Thr Val Lys Ala Thr Thr Val Arg Thr

34816-CIP1.ST25

50	55	60
Pro Ser Trp Ala Val 65	Asp Met Met Arg Phe 70	Asn Ile Asp Asp Phe Val 75 80
Pro Pro Gly Gly Gly 85	Thr Asn Lys Ile 90	Ser Ile Pro Phe Glu Tyr Tyr 95
Arg Ile Lys Lys Val 100	Lys Val Glu Phe Trp 105	Pro Cys Ser Pro Ile Thr 110
Gln Gly Asp Arg Gly Val 115	Gly Ser Thr Ala Val 120	Ile Leu Asp Asp Asn 125
Phe Val Thr Lys Ala Thr 130	Ala Leu Thr Tyr Asp 135	Pro Tyr Val Asn Tyr 140
Ser Ser Arg His Thr 145	Ile Pro Gln Pro Phe 150	Ser Tyr His Ser Arg Tyr 155 160
Phe Thr Pro Lys Pro Val 165	Leu Asp Ser Thr Ile 170	Asp Tyr Phe Gln Pro 175
Asn Asn Lys Arg Asn Gln 180	Leu Trp Leu Arg Leu 185	Gln Thr Ser Arg Asn 190
Val Asp His Val Gly Leu 195	Gly Thr Ala Phe Glu 200	Asn Ser Ile Tyr Asp 205
Gln Asp Tyr Asn Ile Arg 210	Val Thr Met Tyr Val 215	Gln Phe Arg Glu Phe 220
Asn Leu Lys Asp Pro 225	Pro Leu Lys Pro 230	

Fig. 1

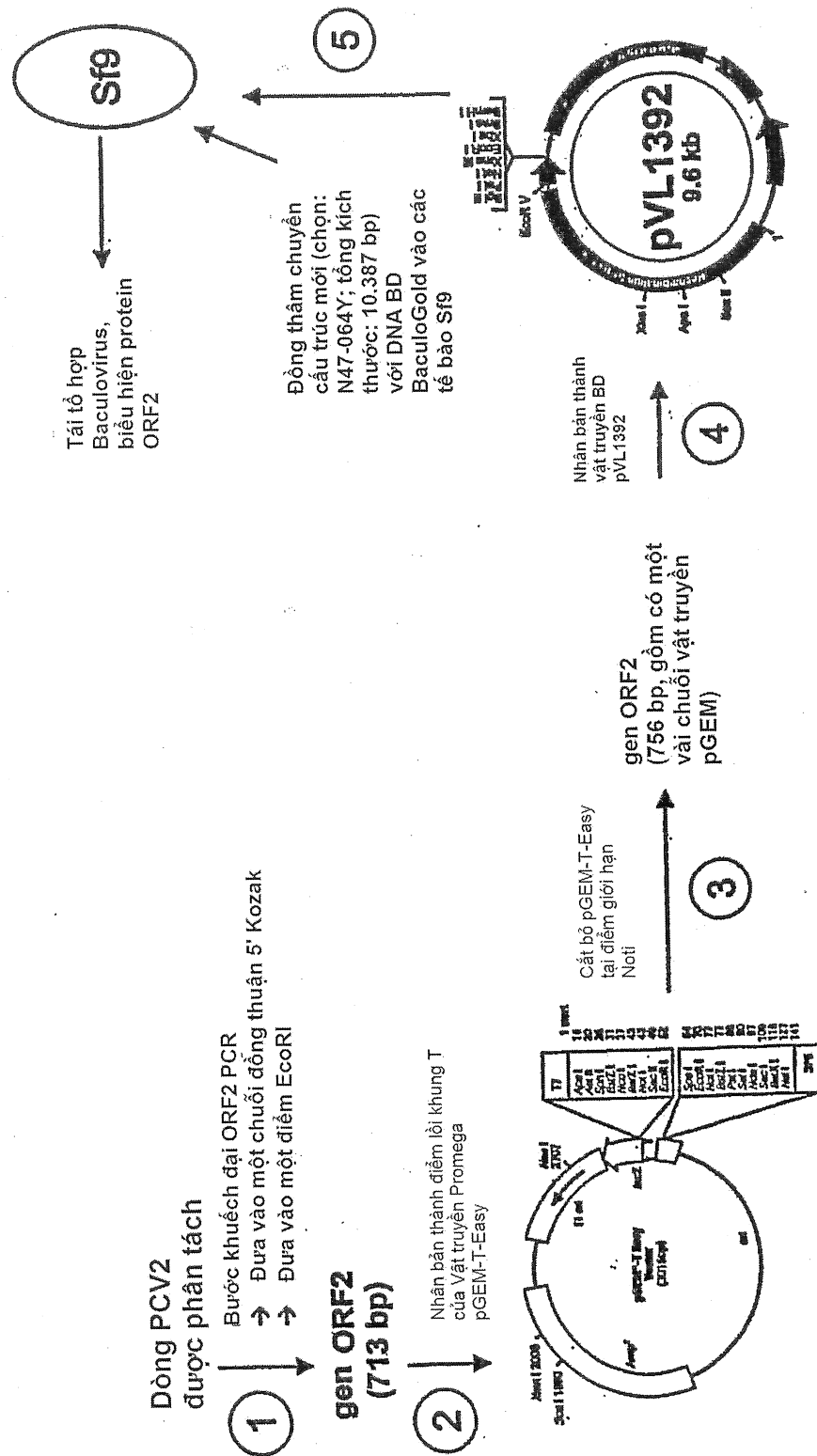


Fig 2(a)

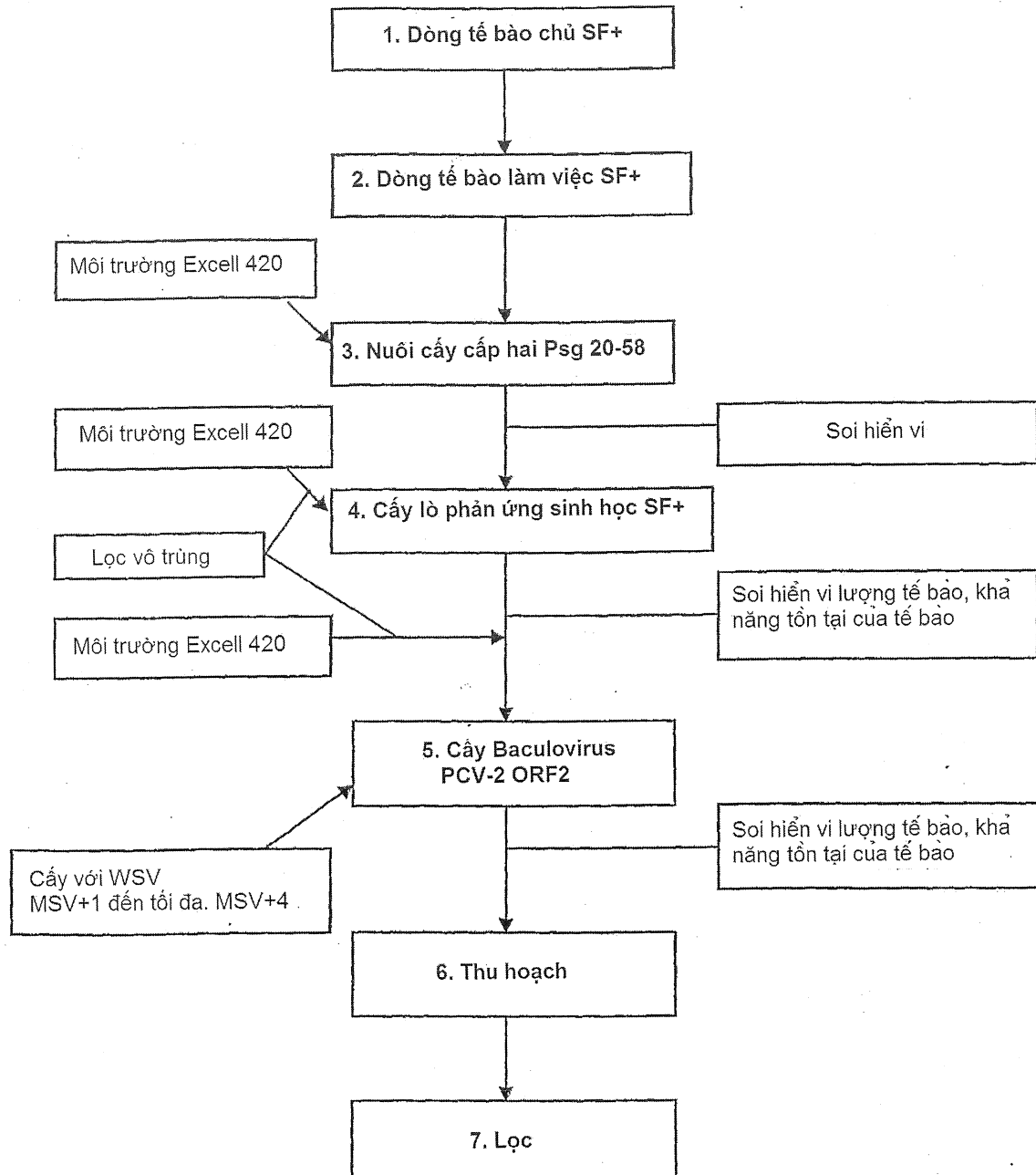


Fig 2(b)

