



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)^{2020.01} C12N 7/01; C12R 1/93; A61K 39/12; (13) B
A61P 31/20



1-0053765

-
- (21) 1-2021-04266 (22) 26/04/2019
(86) PCT/CN2019/084469 26/04/2019 (87) WO2020/215301 29/10/2020
(30) PCT/CN2019/084469 26/04/2019 IB
(45) 25/11/2025 452 (43) 25/01/2022 406A
(73) HARBIN VETERINARY RESEARCH INSTITUTE, CHINESE ACADEMY OF
AGRICULTURAL SCIENCES (CN)
Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences
(CAAS), No. 678 Haping Road, Xiangfang District Harbin, Heilongjiang 150069,
China
(72) BU, Zhigao (CN); CHEN, Weiye (CN); ZHAO, Dongming (CN); HE, Xijun (CN);
LIU, Renqiang (CN); LIU, Jinxiong (CN).
(74) Công ty TNHH Đại Tín và Liên Danh (DAITIN AND ASSOCIATES CO.,LTD)
-

- (54) VIRUT DỊCH TẢ LỘN CHÂU PHI SUY GIẢM ĐỘC LỰC DO BỊ XÓA GEN,
VẮC-XIN LÀM TỪ VIRUT NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ VIRUT NÀY

(21) 1-2021-04266

(57) Sáng chế đề cập đến virus dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực do bị xóa gen có thể được sử dụng làm vắc-xin, vắc-xin làm từ virus này và phương pháp điều chế virus này. Phương pháp điều chế này bao gồm sử dụng chủng virus Pig/CN/HLJ/2018 gây bệnh dịch tả lợn châu Phi lưu hành tại Trung Quốc, xóa gen độc lực của virus dịch tả lợn châu Phi thông qua công nghệ kỹ thuật gen, từ đó thu được virus xóa gen MGF360-505R và xóa kết hợp gen CD2V và MGF360-505R.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này liên quan đến lĩnh vực thú y, cụ thể là để phòng ngừa và điều trị bệnh ở động vật, cụ thể hơn là liên quan đến virus dịch tả lợn châu Phi giảm độc lực và vắc xin làm từ virus này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Virut dịch tả lợn châu Phi là thành viên duy nhất của họ Asfarviridae, và chủ yếu sao chép trong tế bào chất của tế bào. Bệnh dịch tả lợn châu Phi là một loại bệnh truyền nhiễm cấp tính, nặng và rất dễ lây lan cho lợn nhà và lợn rừng, chủng virus mạnh có thể giết chết lợn nhà trong khoảng 5-14 ngày lây nhiễm, trong đó tỷ lệ tử vong là gần 100%, không có vắc xin phòng bệnh hiệu quả, không có thuốc điều trị đặc hiệu. Lợn nhà, lợn rừng và ve mềm ở tất cả các giai đoạn là vật chủ tự nhiên của bệnh dịch tả lợn châu Phi, có thể lây truyền trực tiếp giữa lợn nhà và lợn rừng, cũng có thể bị phát tán khi bị ve mềm cắn, hay cũng có thể bị phát tán xuyên quốc gia và vùng lãnh thổ thông qua nước vo gạo, thức ăn gia súc và các sản phẩm thịt lợn như giăm bông khô ướp gia vị bị nhiễm virus, v.v... Khi phát hiện ra bệnh dịch bắt buộc phải tiến hành tiêu hủy, đây là một trong những bệnh truyền nhiễm nguy hiểm gây hại cho đàn lợn trong phạm vi phòng ngừa trên toàn thế giới, là dịch bệnh của động vật ngoại lai số một mà Trung Quốc đang chú trọng phòng chống.

Nghề chăn nuôi lợn của Trung Quốc chiếm hơn 50% của thế giới. Căn cứ theo đặc điểm diễn biến của bệnh dịch tả lợn châu Phi trên phạm vi toàn cầu và hiện trạng của ngành chăn nuôi lợn ở Trung Quốc thì tình hình dịch bệnh dịch tả lợn châu Phi sẽ còn mở rộng và tồn tại lâu dài tại Trung Quốc. Một là, do số lượng chăn nuôi lợn ở Trung Quốc rất lớn, trình độ chăn nuôi nói chung thấp, điều kiện phòng ngừa an toàn sinh học kém, thường xuyên vận chuyển lợn xuyên vùng và tồn tại các vật chủ hoang dã, đã tạo điều kiện thuận lợi cho sự lây lan của dịch tả lợn châu Phi. Hai là, các quốc gia xung quanh các nước bị dịch hàng năm đều gia tăng, tồn tại các nguồn dịch bệnh tự nhiên. Ba là, theo

lịch sử bệnh dịch tả lợn châu Phi ở nước ngoài, nếu một khi tình hình dịch bệnh dịch tả lợn châu Phi xảy ra thì sẽ phải mất rất nhiều thời gian và phải trả một cái giá rất lớn để tiêu diệt tận gốc. Do đó, bắt buộc phải đẩy mạnh triển khai nghiên cứu về dịch tễ học, các cơ chế gây bệnh liên quan, các sản phẩm công nghệ kiểm tra chẩn đoán nhanh, vắc xin phòng và điều trị bệnh dịch tả lợn châu Phi, triển khai các chính sách và công nghệ ngăn ngừa và kiểm soát dài hạn để đối phó với tình hình phức tạp của dịch bệnh dịch tả lợn châu Phi. Căn cứ theo tình hình trong nước và kinh nghiệm hiện có trong việc ngăn ngừa và kiểm soát dịch bệnh virus đã có của Trung Quốc, vắc-xin là phương pháp hiệu quả và kinh tế nhất để ngăn ngừa và kiểm soát tình hình dịch bệnh dịch tả lợn châu Phi, nghiên cứu chế tạo vắc xin hiệu quả và an toàn là vô cùng cấp bách. Đặc biệt là tình hình dịch tả lợn châu Phi bùng phát tại Trung Quốc vào đầu tháng 8 năm 2018, tính đến ngày 14 tháng 01 năm 2019, đã có 24 tỉnh đã có dịch, tiêu hủy trên 916.000 con lợn, gây thiệt hại kinh tế trực tiếp lên tới vài tỷ nhân dân tệ, những thiệt hại gián tiếp không thể đo lường đã gây ra tổn thất to lớn cho ngành chăn nuôi và nền kinh tế quốc dân của Trung Quốc. Do lần đầu tiên xuất hiện ở Trung Quốc, do thiếu kiến thức khoa học hệ thống và hệ thống kỹ thuật phòng ngừa và kiểm soát hiệu quả bệnh dịch tả lợn châu Phi nên chỉ có thể dựa vào các biện pháp như tiêu diệt, khử trùng v.v... để phòng ngừa và kiểm soát, mang lại khó khăn cực lớn đối với công tác phòng ngừa và kiểm soát tình hình dịch bệnh.

Virut dịch tả lợn châu Phi đã tồn tại được hơn 100 năm kể từ khi phát hiện, áp dụng chiến lược nghiên cứu chế tạo vắc - xin truyền thống [Forman, A.J., R.C. Wardley, and P.J. Wilkinson, The immunological response of pigs and guinea pigs to antigens of African swine fever virus. Arch Virol, 1982. 74(2-3): p. 91-100; Mebus, C.A., African swine fever. Adv Virus Res, 1988. 35: p. 251-69; Stone, S.S. and W.R. Hess, Antibody response to inactivated preparations of African swine fever virus in pigs. Am J Vet Res, 1967. 28(123): p. 475-81] (bao gồm vắc-xin bất hoạt, vắc-xin giảm độc lực tự nhiên hoặc vắc-xin giảm độc lực truyền thể hệ, v.v...), tá dược mới [Blome, S., C. Gabriel, and M. Beer, Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation. Vaccine, 2014. 32(31): p. 3879-82] và các loại vắc-xin mới như vắc-xin dưới đơn vị, v.v... [Jancovich, J.K., et al., Immunization of Pigs by DNA Prime and Recombinant Vaccinia Virus Boost to Identify and Rank African Swine Fever

Virus Immunogenic and Protective Proteins. *J Virol*, 2018. 92(8); Gomez-Puertas, P., et al., The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology*, 1998. 243(2): p. 461-71; Neilan, J.G., et al., Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology*, 2004. 319(2): p. 337-42; Ruiz-Gonzalvo, F. F. Rodriguez, and J.M. Escribano, Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus. *Virology*, 1996. 218(1): p. 285-9; Lacasta, A., et al., Expression library immunization can confer protection against lethal challenge with African swine fever virus. *J Virol*, 2014. 88(22): p. 13322-32] và các chiến lược nghiên cứu chế tạo khác đều không thành công, khiến cho bệnh dịch này đã hoành hành khắp nơi trong nhiều năm qua, lây lan từ châu Phi sang phạm vi toàn thế giới. Gần với chiến lược tiêu hủy, chỉ có một số ít các quốc gia như Tây Ban Nha và Brazil đã kiểm soát thành công bệnh dịch tả lợn châu Phi. Tuy nhiên, do số lượng lợn nuôi ở Trung Quốc rất lớn, chỉ áp dụng các phương pháp tiêu hủy, chi phí quá cao, thế nên những vắc-xin an toàn và hiệu quả sẽ là một nhu cầu cấp bách để kiểm soát tình hình dịch bệnh dịch tả lợn Châu Phi ở Trung Quốc. Hiện nay, sự suy giảm độc lực do bị xóa gen đã trở thành hướng đi quan trọng trong công tác nghiên cứu vắc-xin chống bệnh dịch tả lợn châu Phi.

Virut dịch tả lợn châu Phi là một virut DNA sợi kép, có bộ gen lớn và nhiều kiểu gen (có 24 kiểu gen) [Quembo, C.J., et al., Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype. *Transbound Emerg Dis*, 2018. 65(2): p. 420-431], mã hóa 150-167 loại protein, cơ chế lẩn tránh miễn dịch phức tạp, thông thường thì nhiều gen độc lực sẽ phát huy tác dụng cùng nhau, điều đó dẫn đến sự khác biệt về đặc tính sinh vật học giữa các loại gen khác nhau là rất lớn, khả năng bảo vệ miễn dịch chéo giữa các loại gen khác nhau là yếu [Souto, R., et al., Vaccine Potential of Two Previously Uncharacterized African Swine Fever Virus Isolates from Southern Africa and Heterologous Cross Protection of an Avirulent European Isolate. *Transbound Emerg Dis*, 2016. 63(2): p. 224-31; King, K., et al., Protección of European domestic pigs from

virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunisation. Vaccine, 2011. 29(28): p. 4593-600].

Virus dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực do bị xóa chức năng của các gen sau được công bố trong tài liệu sáng chế CN 106459931 A: Các gen 9L, 10L, 11L, 12L, 13L và 14L của họ đa gen 360; các gen 1R, 2R, 3R và 4R của họ đa gen 505, sáng chế cũng đề xuất virus dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực do bị xóa chức năng của gen DP148R đồng thời thảo luận về các cách sử dụng khác nhau của vắc xin, ví dụ như thông qua việc tiêm bắp, mũi và uống.

Trình tự DNA có chiều dài đầy đủ của virus dịch tả lợn châu Phi ASF-GVAV được đưa ra trong tài liệu sáng chế US9474797B1, trong đó ngoài việc xóa đoạn từ vị trí 178643 đến 182578 dẫn đến việc xóa khung đọc MGF505-11L, MGF100-1L, 17L18LASFV GACD 01870, I9R, I10U11L, virus dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực còn thu được bằng cách kết hợp với nhiều loại đột biến khác. Virus đột biến của virus dịch tả lợn châu Phi ASF-Georgia2007 được công bố trong tài liệu sáng chế US9528094B2, có thể tạo ra sự bảo vệ hiệu quả với liều lượng từ 10^2 - 10^4 HAD₅₀, đột biến chủ yếu là xóa một phần gen MGF5001R và 3R và xóa toàn bộ các gen 12L, 13L, 14L của họ gen MGF360 và 2R của họ gen MGF5002R. Tài liệu sáng chế WO2012/107614 A1 chủ yếu liên quan đến biểu hiện ức chế pp220, pp62 hoặc pB438L, đồng thời cũng liên quan việc xóa gen CD2 và gen pol X. Virus đột biến ASFV-G A9GL của virus dịch tả lợn châu Phi ASF-Georgia2007 được công bố trong tài liệu sáng chế WO2016049101A (trong đó trình tự 172 nucleotide của gen 9GL bị xóa).

Nghiên cứu sơ bộ của sáng chế cho thấy rằng ngay cả khi áp dụng chiến lược xóa gen độc lực tương ứng thì hiệu quả giảm độc lực của các gen khác nhau lại có sự khác biệt rất lớn: Ví dụ chủng BA71 (kiểu gen I) bị xóa gen CD2V đã hoàn toàn bị giảm độc lực, tỷ lệ sống sót của lợn sau khi được tiêm chủng đều là 100% [Monteagudo, P.L., et al., BA71DeltaCD2: a New Recombinant Live Attenuated African Swine Fever Virus with Cross-Protective Capabilities. J Virol, 2017. 91(21)]; tuy nhiên tỷ lệ sống sót của lợn sau khi được tiêm chủng miễn dịch với chủng dịch tả tại Trung Quốc (kiểu gen II) và chủng Malawi Lil-20/1 (kiểu gen II) bị xóa gen tương tự [Borca, M.V. et al., Deletion of a

CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. J Virol, 1998. 72(4): p. 2881-9] lần lượt là khoảng 50% (dữ liệu chưa được hiển thị) và 0%; chủng Benin 97/1 (kiểu gen I) bị xóa gen DP148R [Reis, A.L., et al., Deletion of the African Swine Fever Virus Gene DP148R Does Not Reduce Virus Replication in Culture but Reduces Virus Virulence in Pigs and Induces High Levels of Protection against Challenge. J Virol, 2017. 91(24)] cũng có thể khiến virus suy giảm độc lực hoàn toàn, tỷ lệ sống sót của lợn sau khi được tiêm chủng miễn dịch đều là 100%, nhưng tỷ lệ sống sót của lợn được tiêm chủng miễn dịch với chủng dịch Trung Quốc bị xóa gen DP148R chỉ là 0%, hiệu quả giảm độc lực là vô cùng hạn chế.

Trong giai đoạn đầu, các tác giả đã phân lập được chủng Pig/CN/HLJ/2018 lưu hành ở Trung Quốc, thông qua giải trình tự và phân tích trình tự, trình tự của bộ gen có chiều dài đầy đủ của nó (GenBank: MK333180.1) và DB/LN/2018 đều là 189,404 bp, còn chiều dài đầy đủ của chủng PoL/2017 là 189,401 bp, và sự chèn, xóa và đột biến trình tự được phân tích [Xuexia Wen et al., Genome sequences derived from pig and dried blood pig feed samples provide important insights into the transmission of African swine fever virus in China in 2018. Emerging Microbes & Infections. 2019, VOL. 8]. Nghiên cứu cho thấy nó có độc lực và khả năng lây nhiễm cao [Dongming Zhao et al., Replication and virulence in pigs of the first African swine fever virus isolated in China. Emerging Microbes & Infections. 2019, VOL. 8], do đó, việc nghiên cứu chế tạo vắc-xin liên quan là vô cùng cấp bách, đặc biệt cần phải chú ý đến chỉ tiêu an toàn và hiệu quả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để giải quyết tình trạng thiếu vắc-xin phòng dịch bệnh tả lợn châu Phi và hiệu quả không đạt yêu cầu của các loại vắc-xin đã biết, đặc biệt là sự thiếu vắc-xin sản xuất trong nước, phương pháp bào chế vắc-xin từ virus dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực do bị xóa gen đã được nghiên cứu phát triển và 2 chủng vắc-xin an toàn và hiệu quả đã được thu nhận thành công.

Sáng chế sử dụng phương pháp kỹ thuật gen, tiến hành xóa các gen độc lực (CD2V và MGF360-505R) của chủng virus dịch tả lợn châu Phi lưu hành ở Trung Quốc, thu được hai chủng virus bị xóa gen (rASF Δ 360-eGFP và rASFV Δ CD2VyS60-eGFP-mCherry),

thông qua việc đánh giá có hệ thống về hiệu quả bảo vệ miễn dịch và kích độc, v.v... thì hiệu quả và tính an toàn đều được biểu hiện xuất sắc.

Do đó, sáng chế đã cung cấp một loại virus dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực do bị xóa gen, đặc trưng của ở chỗ, thu được thông qua việc tiến hành xóa gen MGF360-505R, hoặc tiến hành xóa kết hợp gen CD2V và gen MGF360-505R của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi kiểu gen II. Tốt nhất là, xóa gen MGF360-505R tức là ám chỉ việc xóa toàn bộ trình tự của hai loại gen là MGF360 và 505R, hoặc xóa kết hợp gen CD2V và MGF360-505R tức là ám chỉ việc xóa toàn bộ trình tự của ba loại gen là CD2V, MGF360, và 505R.

Tốt nhất là, virus dịch tả lợn châu Phi kiểu gen II được mô tả là chủng dịch Pig/CN/HLJ/2018 lưu hành tại Trung Quốc, trình tự chiều dài đầy đủ của nó đã được công khai trên GenBank (GenBank: MK333180.1).

Virus xóa gen MGF360-505 được ưu tiên theo sáng chế đã xóa nucleotide ở vị trí thứ 27942-35500 so với trình tự chiều dài đầy đủ của chủng virus ban đầu; virus xóa kết hợp gen CD2V và MGF360-505R đã xóa nucleotide ở vị trí thứ 27942-35500 và 73394-74476 so với trình tự chiều dài đầy đủ của chủng virus ban đầu. Virus xóa gen MGF360-505R và virus xóa kết hợp gen CD2V và MGF360-505R được xây dựng cụ thể hơn đã được tiến hành cấp bằng sáng chế vào ngày 11 tháng 04 năm 2019 và được lưu trữ tại Trung tâm lưu trữ nuôi cấy điển hình Trung Quốc, mã lưu trữ lần lượt là CCTCC NO:V201925 và CCTCC NO:V201924

Hơn nữa, sáng chế cũng đề xuất vắc-xin chứa virus dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực, vắc-xin theo sáng chế đã tạo ra phản ứng miễn dịch bảo vệ đối tượng thử nghiệm chống lại virus dịch tả lợn châu Phi sau đó.

Vắc-xin có thể chứa nhiều loại virus dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực của các kiểu gen khác nhau. Những loại vắc-xin như vậy có thể tạo ra phản ứng miễn dịch bảo vệ chéo chống lại nhiều kiểu gen của virus ASF.

Sáng chế cũng đề xuất tổ hợp thuốc có chứa một hoặc nhiều loại virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực. Tổ hợp thuốc này có thể dùng để ngăn ngừa hoặc

điều trị bệnh dịch tả lợn châu Phi. Vắc-xin hoặc tổ hợp thuốc có thể chứa một hoặc nhiều loại virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực theo sáng chế, hơn nữa còn có thể chứa một hoặc nhiều tá dược, tá dược lỏng, vật dẫn và chất pha loãng. Tá dược có thể là bất kỳ tá dược thích hợp nào, tá dược miễn dịch hóa học như nhôm hydroxit, tá dược freund, dầu khoáng chất, span, v.v...; tá dược miễn dịch vi sinh vật như mycobacteria, BCC, lipopolysaccharide, muramyl dipeptide, cytosines, sáp tan trong chất béo D, corynebacterium parvum; tá dược miễn dịch thực vật chủ yếu là polysaccharid chiết xuất từ thực vật hoặc nấm lớn, ví dụ như tuckahoe polysaccharides, safflower polysaccharides, các loại thảo dược Trung Quốc, v.v...; và tá dược miễn dịch sinh hóa như thymosin, yếu tố chuyển giao, interleukin, v.v.... Các tá dược được ưu tiên có thể là chất bổ trợ sinh học của tá dược nano, interleukin, interferon v.v....

Vắc-xin theo sáng chế cũng có thể dùng như vắc-xin kết hợp, ví dụ như kết hợp với loại vắc-xin khác cho lợn, nhưng trọng tâm là vắc xin sống giảm độc lực, đặc biệt là tích hợp các gen virus, ví dụ như vắc-xin hóa trị hai, hóa trị ba, v.v... Vắc-xin kết hợp có thể chứa nhiều loại virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi giảm độc lực của các kiểu gen khác nhau, do đó có thể tạo ra phản ứng miễn dịch bảo vệ chéo chống lại nhiều kiểu gen của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi.

Vắc-xin theo sáng chế có thể được sử dụng bằng những con đường thuận tiện, ví dụ như tiêm bắp, mũi, uống, tiêm dưới da, xuyên qua da, đường âm đạo, v.v... Vắc-xin giảm độc lực trong sáng chế được ưu tiên lựa chọn phương pháp tiêm bắp, liều lượng thích hợp là $10^{2.5}$ - $10^{2.5}$ TCID₅₀, liều lượng ưu tiên là 10^3 - 10^3 TCID₅₀. Vắc-xin tăng cường có thể được sử dụng sau tiêm chủng miễn dịch lần đầu.

Ví dụ, sau lần tiêm chủng đầu tiên, đối tượng thử nghiệm có thể được tiêm tăng cường lần hai sau một khoảng thời gian (ví dụ: khoảng 7, 14, 21 hoặc 28 ngày). Nói chung, liều dùng tăng cường phải giống hoặc thấp hơn liều dùng lần đầu. Ngoài ra, còn có thể tiến hành miễn dịch tăng cường lần ba, ví dụ, 2-3 tháng, 6 tháng, hoặc một năm sau khi miễn dịch.

Virut dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực do bị xóa gen thu được theo sáng chế có những ưu thế sau đây. Hai chủng virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực

do bị xóa gen được xây dựng trong sáng chế (rASFV Δ 360-eGFP và rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry) sau khi miễn dịch cho lợn, ngay cả khi được tiêm hỗn hợp miễn dịch với liều lượng 10^5 TCID₅₀ đều không có triệu chứng lâm sàng như tăng nhiệt độ cơ thể, sự phân lập virus trong máu và cơ quan nội tạng đều là âm tính, tỷ lệ sống sót đều là 100%, chứng tỏ nó đã hoàn toàn suy giảm, là một vắc-xin an toàn và tốt hơn các nghiên cứu tương tự về ASFV kiểu gen II ở nước ngoài [Borca, M.V., et al., Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. J Virol, 1998. 72(4): p. 2881-9; O'Donnell, V. et al., African Swine Fever Virus Georgia Isolate Harboring Deletions of MGF360 and MGF505 Genes Is Attenuated in Swine and Confers Protection against Challenge with Virulent Parental Virus. J Virol, 2015. 89(11): p. 6048-56] (Bảng 1): Nghiên cứu nước ngoài đã xây dựng được virus xóa gen MGF360-505R bằng cách sử dụng chủng Georgia cấp cao giống với chủng lưu hành ở Trung Quốc, tỷ lệ dương tính phân lập của virus trong máu của lợn sau khi được miễn dịch đều ở trên 60%; sử dụng virus bị xóa gen đơn CD2V được xây dựng bằng cách sử dụng chủng Malawi Lil-20/1 kiểu gen II, tỷ lệ dương tính phân lập của virus ở trong máu của lợn sau khi được tiêm miễn dịch đều là 100%, tỷ lệ sống sót là 0%. Thứ hai, về phương diện hiệu quả, sau khi bị độc lực mạnh tấn công thì tỷ lệ bảo vệ miễn dịch của rASFV Δ 360-eGFP và rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry được xây dựng theo sáng chế đều là 100%, tỷ lệ dương tính phân lập của virus trong máu lần lượt thấp hơn 35% và 100%, thế nhưng sau ngày thứ 21-22 thì đều chuyển sang âm tính, chứng tỏ hai chủng virus này đều có hiệu quả bảo vệ miễn dịch rất tốt, cũng nổi trội hơn so với các nghiên cứu ở nước ngoài về ASFV kiểu gen II [Borca, M.V., et al., Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. J Virol, 1998. 72(4): p. 2881-9; O'Donnell, V., et al., African Swine Fever Virus Georgia Isolate Harboring Deletions of MGF360 and MGF505 Genes Is Attenuated in Swine and Confers Protection against Challenge with Virulent Parental Virus. J Virol, 2015. 89(11): p. 6048-56] (Bảng 1): Tỷ lệ dương tính phân lập của virus trong máu của lợn bị nhiễm bệnh sau khi được tiêm chủng miễn dịch với virus Georgia bị xóa gen MGF360-505R theo nghiên cứu của nước ngoài là 70% [O'Donnell, V., et al., African Swine Fever Virus Georgia Isolate Harboring Deletions of MGF360 and MGF505 Genes Is Attenuated in Swine and Confers Protection against Challenge with Virulent Parental Virus. J Virol,

2015. 89(11): p. 6048-56] (trong đó, liều lượng miễn dịch 10^3 TCID₅₀ được áp dụng trong sáng chế nhỏ hơn liều lượng miễn dịch 10^4 HAD₅₀ của nghiên cứu nước ngoài, tuy nhiên tỷ lệ dương tính phân lập của virus trong máu sau khi bị kích độc chỉ là 25%); mặc dù tỷ lệ dương tính phân lập của virus trong máu của lợn bị nhiễm bệnh sau khi được tiêm miễn dịch với chủng virus xóa hai gen MGF360-505R và CD2V được xây dựng trong sáng chế là 100%, hơi kém hơn so với virus bị xóa gen MGF360-505R, nhưng tốt hơn đáng kể so với virus chủng Malawi Lil-20/1 kiểu gen II bị xóa gen đơn CD2V (tỷ lệ chết sau khi được tiêm miễn dịch là 100%) [Borca, M.V., et al., Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine, J Virol, 1998. 72(4): p. 2881-9], và tỷ lệ phân lập của virus trong máu sau khi bị nhiễm sẽ được chuyển sang âm tính sau 21 ngày. Cuối cùng, hai chủng virus xóa gen được xây dựng theo sáng chế đều có thể cung cấp sự bảo vệ đầy đủ để chống lại độc lực mạnh sau tiêm chủng miễn dịch 21 ngày, tốt hơn so với 28 ngày của nghiên cứu nước ngoài [O'Donnell, V., et al., African Swine Fever Virus Georgia Isolate Harboring Deletions of MGF360 and MGF505 Genes Is Attenuated in Swine and Confers Protection against Challenge with Virulent Parental Virus. J Virol, 2015. 89(11): p. 6048-56]. Do đó, việc sử dụng chủng phân lập của vùng lưu hành để xây dựng virus suy giảm độc lực do bị xóa gen của virus dịch tả lợn châu Phi là chiến lược tốt nhất, và cũng là mấu chốt trong việc nghiên cứu chế tạo vắc-xin chống virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi của Trung Quốc. Vậy nên, virus dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực do bị xóa gen (rASFV Δ 360-eGFP và rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry) được xây dựng trong sáng chế có một giá trị ứng dụng rất lớn.

Bảng 1. So sánh tính an toàn của virus dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực do bị xóa gen (kiểu gen II) theo nghiên cứu trong và ngoài nước

	Nghiên cứu nước ngoài		Sáng chế	
Gen độc lực bị xóa	MGF360-505R [20]	CD2V [19]	MGF360-505R	CD2V và MGF360-505R
Chủng virus và kiểu gen	Chủng Georgia	Chủng Malawi Lil-20/1	Chủng CN/HLJ/18	Chủng CN/HLJ/18
Kiểu gen	Kiểu gen II	Kiểu gen II	Kiểu gen II	Kiểu gen II

Tỷ lệ dương tính phân lập của virus sau khi được tiêm miễn dịch	$\geq 60\%$	100%	0%	0%
Tỷ lệ sống sót sau khi được tiêm miễn dịch	100%	0%	100%	100%
Tỷ lệ dương tính phân lập của virus trong máu sau khi bị nhiễm độc	70% (Miễn dịch với liều 10^4 HAD ₅₀)	—	25% (Miễn dịch với liều 10^3 TCID ₅₀)	100% (Miễn dịch với liều 10^3 TCID ₅₀)
Tỷ lệ sống sót sau khi bị nhiễm độc	100%	—	100%	100%

Ghi chú: “—” thể hiện chưa bị nhiễm độc (do chủng độc lực này miễn dịch nên dẫn đến hiện tượng lợn bị chết hết)

Thông tin lưu trữ: Virus bị xóa gen MGF360-505R và virus bị xóa kết hợp gen CD2V và MGF360-505R của chủng CN/HLJ/18 theo sáng chế đã được cấp bằng sáng chế vào ngày 11 tháng 04 năm 2019 và được lưu trữ tại Trung tâm lưu trữ nuôi cấy điển hình Trung Quốc, mã lưu trữ lần lượt là CCTCC NO:V201925 và CCTCC NO:V201924.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là hình minh họa sơ đồ cấu tạo vector để xóa gen CD2V.

Fig.2 là hình minh họa sơ đồ cấu tạo vector (biểu hiện huỳnh quang màu xanh lục) để xóa gen MGF360-505R.

Fig.3 là hình minh họa sơ đồ cấu tạo vector (biểu hiện huỳnh quang màu đỏ) để xóa gen MGF360-505R.

Fig.4 là hình thể hiện virus xóa gen gây bệnh dịch tả lợn châu Phi biểu hiện protein huỳnh quang màu xanh lục hoặc màu đỏ.

Fig.5 là hình thể hiện kết quả giám định tinh sạch virus xóa gen gây bệnh dịch tả lợn châu Phi, trong đó, Δ CD2V là rASFV Δ CD2V-eGFP, Δ 360 là rASFV Δ 360-eGFP, CD2V/360 là rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry.

Fig.6 Sự thay đổi thân nhiệt của lợn được tiêm chủng miễn dịch với rASFV Δ 360eGFP và rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry và lợn đối chứng.

Fig.7 Sự thay đổi thân nhiệt sau khi bị kích độc của lợn được tiêm chủng miễn dịch với rASFV Δ 360-eGFP và rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry và lợn đối chứng.

Fig.8 Tỷ lệ sống sót của lợn thử nghiệm sau khi được tiêm chủng miễn dịch hoặc sau khi bị kích độc, trong đó, Δ CD2V là rASFV Δ CD2V-eGFP, Δ 360 là rASFV Δ 360-eGFP, CD2V/360 là rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế được mô tả chi tiết hơn thông qua các phương pháp thực thi cụ thể dưới đây, nhưng điều này không tạo ra giới hạn cho sáng chế.

Vật liệu và phương pháp được sử dụng trong các ví dụ

Chủng lưu hành ở Trung Quốc của virus dịch tả lợn châu Phi (African swine fever virus, chủng ASFV/CN/HU/18, còn được gọi là chủng Pig/CN/HLJ/2018 của virus dịch tả lợn châu Phi lưu hành tại Trung Quốc) do Viện thú ý Cáp Nhĩ Tân của Viện khoa học nông nghiệp Trung Quốc phân lập và bảo quản (để biết trình tự chi tiết đầy đủ của nó tham khảo GenBank: MK333180.1). Tế bào đại thực bào phế nang (Primary porcine alveolar macrophages, PAM) có nguồn gốc từ lợn SFS có độ tuổi là 30-50 ngày, nuôi trong môi trường nuôi cấy 1640 có chứa 10% FBS (mua từ công ty Thermo Scientific, Hoa Kỳ). Tế bào máu ngoại vi đơn nhân (Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC) được phân lập từ trong máu chống đông EDTA của lợn SPF bằng cách sử dụng bộ kit phân lập PBMC (mua từ công ty TBD, Trung Quốc).

Các thao tác trong các thử nghiệm đều là phương pháp thao tác được biết rõ trong lĩnh vực này trừ khi có giải thích thêm.

Ví dụ 1. Cấu tạo vector tái tổ hợp tương đồng

Lấy khung ORF của gen CD2V dài khoảng 1000bp của bộ gen (là nhánh tương đồng trái và phải, vị trí trình tự nằm ở vị trí thứ 73394-74476 so với trình tự có chiều dài đầy đủ) và đoạn PCR của eGFP nhân bản thành vector pBluescriptIIKS (+) bằng bộ kit nhân bản một bước (mua từ Công ty TNHH Novazin Biotechnology, Trung Quốc), trong đó, gen eGFP được biểu hiện bằng cách sử dụng trình tự vùng gen khởi động của chính gen CD2V, thu được plasmid pB-LR Δ CD2V-eGFP (Fig.1).

Lấy nhánh tương đồng bên trái và phải của gen MGF360-505R (khoảng 1000bp phía bên trái trình tự 5'-aagccctgagaacagcagca-3' và khoảng 1000bp phía bên phải của trình tự 5'-gcgagacgtttcaataaaag-3' của gen ASF) (liên quan đến vị trí thứ 27942-35500 so với trình tự có chiều dài đầy đủ), trình tự khởi động p72 [Reis, A.L., et al., Deletion of the African Swine Fever Virus Gene DP148R Does Not Reduce Virus Replication in Culture but Reduces Virus Virulence in Pigs and Induces High Levels of Protection against Challenge. J Virol, 2017. 91(24)] và đoạn PCR của 4 gen như eGFP để nhân bản thành vector pBluescriptIIKS (+) bằng bộ kit nhân bản một lần, trong đó gen eGFP được biểu hiện dưới sự kiểm soát của trình tự khởi động p72, thu được plasmid pB-LR Δ 360-eGFP (Fig.2). Thay thế gen eGFP trong pB-LR Δ 360-eGFP thành gen mCherry, thu được plasmid pB-LR Δ 360-mCherry (Fig.3).

Ví dụ 2. Cấu tạo, tinh sạch và giám định virus dịch tả lợn châu Phi bị xóa gen

Các plasmid pB-LR Δ 360-eGFP và pB-LR Δ 360-mCherry lần lượt truyền nhiễm sang tế bào PAM đã bị nhiễm ASFV bằng nhân tố chuyển gen TransIT-LT1 (mua từ Công ty Mirus Bio, Hoa Kỳ), gen CD2V và MGF360-505R được tinh sạch bằng phương pháp nhân bản đoạn lần lượt bị xóa, đồng thời virus xóa gen dịch tả lợn châu Phi được biểu hiện protein huỳnh quang màu xanh [Reis, A.L., et al., Deletion of the African Swine Fever Virus Gene DP148R Does Not Reduce Virus Replication in Culture but Reduces Virus Virulence in Pigs and Induces High Levels of Protection against Challenge. J Virol, 2017. 91(24); Chen, W., et al., A goat poxvirus-vectored peste-des-petits-ruminants vaccine induces long-lasting neutralization antibody to high levels in goats and sheep. Vaccine, 2010. 28(30):4742-50; Chen Wei Ye, et al., Nghiên cứu vắc-xin tái tổ hợp chống

virut bệnh đậu ở dê biểu hiện protein H của động vật nhai lại peste des petts, Học báo kỹ thuật sinh học, 2009. 25(4): p. 496-502], lần lượt đặt tên là rASFV Δ CD2V-eGFP và rASFV Δ 360-eGFP (mã lưu trữ là CCTCC NO:V201925). Trong đó, so với trình tự chiều dài đầy đủ của chủng dịch Pig/CN/HLJ/2018 của virut dịch tả lợn châu Phi lưu hành ở Trung Quốc thì chủng thứ nhất bị xóa nucleotide thứ 73394-74476, chủng thứ hai bị xóa nucleotide thứ 27942-35500.

Tương tự như trên, plasmid pB-LR Δ 360-mCherry tái tổ hợp tương đồng được lây nhiễm sang tế bào PAM đã bị nhiễm rASFV Δ CD2V-eGFP theo phương pháp ở trên, virut bị xóa hai gen CD2V và MGF360-505R thu được thông qua nhiều vòng tinh sạch, có tên là rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry (mã lưu trữ là CCTCC NO:V201924). Trong đó, so với trình tự chiều dài đầy đủ của chủng dịch Pig/CN/HLJ/2018 của virut dịch tả lợn châu Phi lưu hành ở Trung Quốc thì chủng này bị xóa đồng thời nucleotide thứ 73394-74476 và nucleotide thứ 27942-35500.

Bộ kit tách gen của virut (mua từ Công ty công nghệ sinh học Tiangen Bắc Kinh) được sử dụng để tách bộ gen của ASFV và ASFV bị xóa ba loại gen, lần lượt dùng mỗi (5'-CACCACCTGAATCTAATGAAG-3' và 5'-GCGGGATATTGGGTAGTAG-3') cho CD2V và mỗi (5'-CGTCTATTTGGATGTTTT-3', và 5'-CGGCAGTATTATTTTGTG-3') cho MGF360-505R để tiến hành PCR xác nhận xem đã xóa thành công hay chưa.

Các virut đã xóa gen và được tinh sạch rASFV Δ CD2V-eGFP, rASFV Δ 360-eGFP và rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry lần lượt biểu hiện huỳnh quang xanh lục, xanh lục, hai màu xanh - đỏ trong tế bào PAM bị lây nhiễm (Fig.4). Tiến hành giám định PCR cho gen bị xóa của 3 loại virut, kết quả (Fig.5) cho thấy, đối chiếu ASFV đều khuếch đại đoạn gen CD2V và MGF360, nhưng virut xóa gen tương ứng không khuếch đại gen bị xóa.

Ví dụ 3. Chuẩn độ hiệu giá virut

Chuẩn độ hiệu giá virut dịch tả lợn châu Phi được lần lượt tiến hành thao tác bằng hai phương pháp liều gây nhiễm 50% tế bào (50% Tissue Culture Infectious Dose, TGD₅₀) và 50% liều hấp phụ hồng cầu (50% haemadsorption, HAD₅₀).

Chuẩn độ TCID₅₀ được tiến hành theo các bước sau: ASFV được pha loãng liên tục 10 lần trong môi trường dịch nuôi cấy 1640 không có huyết thanh, tế bào PAM được nuôi cấy trong đĩa nuôi cấy 96 giếng với mật độ khoảng 90-100%, mỗi độ pha loãng được cấy trong 8 giếng, mỗi giếng 0.02 ml, được ủ sau 1 giờ trong điều kiện 37 °C, nồng độ CO₂ là 5%, mỗi giếng cấy thêm 0.1 ml dịch nuôi cấy hoàn chỉnh 1640 chứa huyết thanh bào thai bò trong điều kiện 37 °C, nồng độ CO₂ là 5%, quan sát 3-7 ngày, liều gây nhiễm 50% tế bào (TCID₅₀) được tính theo tế bào hoặc huỳnh quang xanh và phương pháp Reed and Muench [4].

Thí nghiệm HAD₅₀ được tiến hành thao tác theo tài liệu [5] và được điều chỉnh thích hợp: Cấy PBMC lúc đầu vào đĩa nuôi cấy tế bào 96 giếng, tiến hành pha loãng 10 lần mẫu cần thử nghiệm, mỗi giếng cấy 0.02 ml, sự lây nhiễm virus có thể được tiến hành xác định dựa trên vòng hoa thị của các tế bào hồng cầu được hình thành xung quanh tế bào bị lây nhiễm, quan sát 7 ngày, liều hấp phụ hồng cầu (HAD₅₀) được tính theo phương pháp Reed and Muench [Reed, L. and H. Muench, A simple method of estimating fifty percent endpoints. American Journal of Epidemiology 1938. 27: p. 493-497].

Ví dụ 4. Thử nghiệm tiêm chủng miễn dịch động vật

Phòng thử nghiệm động vật an toàn sinh học cấp 4 của Viện nghiên cứu thú y Cáp Nhĩ Tân thuộc Học viện khoa học nông nghiệp Trung Quốc đã tiến hành nhập lợn SPF 7 tuần tuổi thuộc dòng cận lai Dabai và Changbai (mua từ Trung tâm động vật của Viện nghiên cứu thú y Cáp Nhĩ Tân thuộc Học viện khoa học nông nghiệp Trung Quốc). Đợi sau khi lợn thích nghi được 2-3 ngày thì tiến hành phân nhóm và tiêm chủng miễn dịch theo Bảng 2-1. Ngoài ra, thử nghiệm về sự phân bố virus trong nội tạng được thiết kế (Bảng 2-2). Sau khi được tiêm chủng, tiếp tục quan sát trạng thái tinh thần và tình trạng ăn uống của con vật, giám sát thân nhiệt của con vật, thu gom huyết tương chống đông EDTA và tách huyết thanh.

Bảng 2-1. Phân nhóm thử nghiệm

Virus	Liều lượng	Đường tiêm	Số lượng và số hiệu
Nhóm miễn dịch rASFV Δ 360-eGFP	10 ³ và 10 ⁵ TCID ₅₀	Tiêm bắp (IM)	Mỗi liều lượng 4 con, số 90-93 và 95-98

Nhóm miễn dịch rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry	10^3 và 10^5 TCID ₅₀	Tiêm bắp (IM)	Mỗi liều lượng 4 con, số 80-83 và 85-88
Nhóm đối chứng	—	—	2 con, số 101 và 102

Bảng 2-2. Thử nghiệm độc tính trong nội tạng sau khi tiêm chủng miễn dịch

Virus	Liều lượng	Đường tiêm	Số lượng và số hiệu
Nhóm miễn dịch rASFV Δ 360-eGFP	10^5	Tiêm bắp (IM)	Việc giải phẫu được tiến hành lần lượt vào các ngày thứ 5, 10, 15, 21 để lấy virus phân lập nội tạng, mỗi một thời gian lấy 4 con, số 121-136
Nhóm miễn dịch rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry	10^5	Tiêm bắp (IM)	Việc giải phẫu được tiến hành lần lượt vào các ngày thứ 5, 10, 15, 21 để lấy virus phân lập nội tạng, mỗi một thời gian lấy 4 con, số 137-152

Kiểm tra thân nhiệt sau khi được miễn dịch cho thấy (Fig.6), sau khi lợn được tiêm chủng miễn dịch rASFV Δ 360-eGFP, cho dù nhóm miễn dịch với liều lượng cao (10^5 TCID₅₀, số 90-93) hay miễn dịch với liều lượng thấp (10^3 TCID₅₀, số 95-98) đều không có hiện tượng tăng nhiệt độ cơ thể, tỷ lệ sống sót là 100% (Fig.8); trong đó lợn số 90 chết bất ngờ vào ngày thứ 16, không thấy rõ bệnh biến khi mổ kiểm tra nội tạng, kết quả độc tính máu là âm tính. Sau khi lợn được tiêm chủng miễn dịch rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry, cho dù nhóm miễn dịch với liều lượng cao (10^5 TCID₅₀, số 80-83) hay miễn dịch với liều lượng thấp (10^3 TCID₅₀, số 80-83) đều không có hiện tượng tăng nhiệt độ cơ thể. Ngoài ra, lợn đối chứng (số 101 và 102) cũng không có hiện tượng tăng nhiệt độ cơ thể. Trạng thái tinh thần và tình trạng ăn uống sau khi

miễn dịch của lợn tiêm chủng miễn dịch và lợn đối chứng đều không có bất thường, không có triệu chứng lâm sàng rõ ràng.

Kết quả phân lập virus của mẫu máu sau khi tiêm chủng miễn dịch (Bảng 3-1) cho thấy, lợn tiêm chủng miễn dịch với rASFV Δ 360-eGFP, rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry và lợn đối chứng sau 5, 9, 14, 19 ngày sau khi tiêm chủng đều không phân lập được virus.

Ngoài ra, phân lập virus trong các nội tạng của tất cả các con lợn tiêm chủng miễn dịch với rASFV Δ 360-eGFP, rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry và lợn đối chứng sau tiêm chủng trong vòng 21 ngày đều âm tính, trong thời gian quan sát đồng thời cũng không phát hiện thấy các hiện tượng bất thường về trạng thái tinh thần, trạng thái ăn uống, triệu chứng lâm sàng, v.v... (Bảng 3-2).

Tóm lại, 2 chủng virus xóa gen rASFV Δ 360-eGFP và rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry đều hoàn toàn suy yếu trong cơ thể của lợn.

Bảng 3-1. Kiểm tra phân lập virus trong máu của lợn sau khi tiêm chủng miễn dịch rASFV Δ 360-eGFP và rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry

Chủng virus và liều lượng miễn dịch	Số hiệu	Độc tính trong máu			
		5 ngày	9 ngày	14 ngày	19 ngày
rASFV Δ 360-eGFP, 10 ⁵ TCID ₅₀	90	N	N	N	/
	91	N	N	N	N
	92	N	N	N	N
	93	N	N	N	N
rASFV Δ 360-eGFP, 10 ³ TCID ₅₀	95	N	N	N	N
	96	N	N	N	N
	97	N	N	N	N
	98	N	N	N	N
rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry, 10 ⁵ TCID ₅₀	80	N	N	N	N
	81	N	N	N	N
	82	N	N	N	N

	83	N	N	N	N
rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry, 10 ³ TCID ₅₀	85	N	N	N	N
	86	N	N	N	N
	87	N	N	N	N
	88	N	N	N	N
Đối chứng	101	N	N	N	N
	102	N	N	N	N

Ghi chú: “N” thể hiện kết quả kiểm tra là âm tính; “/” thể hiện không có mẫu

Bảng 3-2. Tình trạng phân phối virus trong nội tạng của lợn sau khi được tiêm chủng miễn dịch rASFV Δ 360-eGFP và rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry

Chủng virus	Thời gian (ngày)	Số hiệu	Tuyến ức	Hạch bạch huyết phế quản	Kết tràng	Gan	Lá lách	Tá tràng	Phổi	Đáy dạ dày	Đoạn ruột rỗng	Thận	A - mi - đan	Hạch bạch huyết đường ruột	Hạch bạch huyết ổ bụng	Tim	Hạch bạch huyết dưới sụn	Đoạn ruột con	Hạch gan dạ dày
rASFV Δ 360-eGFP	5	121	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		122	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		123	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		124	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	10	125	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		126	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		127	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		128	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	15	129	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		130	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		131	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		132	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	21	133	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

											</							

Ghi chú: “N” thể hiện kết quả kiểm tra là âm tính.

Ví dụ 5. Thử nghiệm kích độc động vật

Đợt 21 ngày sau khi miễn dịch, tất cả các con lợn của nhóm miễn dịch rASFV Δ 360-eGFP và rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry đều được tiến hành kích độc mạnh ASFV, liều lượng kích độc là $10^{3.5}$ HAD₅₀, con đường kích độc là tiêm bắp, đồng thời nhập 2 con lợn SPF 8 tuần tuổi được đưa vào để làm đối chứng kích độc. Sau khi kích độc, tiếp tục quan sát trạng thái tinh thần, tình trạng ăn uống, giám sát thân nhiệt của con vật, thu thập máu chống đông EDTA và tách huyết thanh.

Các con lợn đối chứng cho tiêm chủng miễn dịch rASFV Δ 360-eGFP và rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry (số 101 và 102) bị chết ở ngày thứ 11 sau khi bị kích độc, nhưng nhóm tiêm chủng miễn dịch sau khi bị kích độc đều có tỷ lệ sống sót là 100% (Fig.8), đến ngày 21-22 thì giết mổ để kiểm tra. Tình trạng cụ thể về thân nhiệt và độc tính trong máu được mô tả như sau.

1. Những thay đổi về thân nhiệt và triệu chứng lâm sàng sau khi bị kích độc

Các con lợn đối chứng (số 101 và 102) sau khi bị kích độc, sang ngày thứ 5-7 thì xuất hiện các triệu chứng như thân nhiệt tăng cao ($40.5-42^{\circ}\text{C}$) (Fig.7), tinh thần ủ dột, ăn uống kém, v.v...

Các con lợn được miễn dịch rASFV Δ 360-eGFP sau khi bị kích độc thì chỉ có con lợn số 95 tới ngày thứ 7 bị tăng thân nhiệt rõ ràng, sau đó thì khôi phục bình thường, trạng thái tinh thần và ăn uống cũng được phục hồi lại bình thường, thân nhiệt, trạng thái tinh thần và tình trạng ăn uống của các con lợn khác đều không có bất thường, đều không có triệu chứng lâm sàng.

Các con lợn được miễn dịch ASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry sau khi bị kích độc thì chỉ có con lợn số 82 trong nhóm liều lượng cao (10^5 TCID₅₀) có một lần bị sốt cao đến 40.7°C , sau đó thì khôi phục lại bình thường; các con lợn số 85, 87, 88 trong nhóm liều lượng thấp (10^3 TCID₅₀) đều bị tăng thân nhiệt một vài lần lên đến trên 41°C vào ngày thứ 5-11, sau đó thì cũng khôi phục lại bình thường, riêng con lợn số 86 thì thân nhiệt bên ngoài hơi cao một chút nhưng vẫn thấp hơn 41°C . Con lợn có thân nhiệt tăng

cao sẽ có trạng thái tinh thần ủ rũ, ăn uống hơi kém, nhưng cùng với sự khôi phục lại thân nhiệt thì trạng thái tinh thần và tình trạng ăn uống cũng trở lại bình thường, ngoài ra không có triệu chứng lâm sàng rõ ràng nào khác.

2. Kiểm tra phân lập virus trong máu sau khi bị kích độc

Kết quả phân lập virus trong máu (Bảng 4) cho thấy, sau khi bị kích độc, các con lợn đối chứng (số 101 và 102) có kết quả phân lập virus ở ngày thứ 5 sau khi bị kích độc đều chuyển sang dương tính và chết vào ngày thứ 7; còn đối với những con lợn được miễn dịch rASFV Δ 360-eGFP sau khi bị kích độc thì chỉ có các con lợn (số 91 và 95) có kết quả phân lập virus sau khi bị kích độc chuyển sang dương tính, nhưng tới ngày thứ 21 thì đều chuyển sang âm tính. Những kết quả này cho thấy, những con lợn được miễn dịch rASFV Δ 360-eGFP và rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry đều có thể cung cấp sự bảo vệ miễn dịch đầy đủ đối với sự kích độc mạnh.

Bảng 4. Kiểm tra phân lập virus trong máu của lợn được miễn dịch rASFV Δ 360-eGFP và rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry sau khi bị kích độc

Chủng virus và liều lượng miễn dịch	Số hiệu	Độc tính trong máu			
		5 ngày	11 ngày	16 ngày	21 ngày
rASFV Δ 360-eGFP, 10 ⁵ TCID ₅₀	91	+	+	+	N
	92	N	N	N	N
	93	N	N	N	N
rASFV Δ 360-eGFP, 10 ³ TCID ₅₀	95	+	+	+	N
	96	N	N	N	N
	97	N	N	N	N
	98	N	N	N	N
rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry, 10 ⁵ TCID ₅₀	80	+	N	N	N
	81	+	N	N	N
	82	+	+	+	N
	83	+	N	N	N
rASFV Δ CD2V/360-eGFP-mCherry, 10 ³ TCID ₅₀	85	+	+	+	N
	86	+	+	+	N

	87	+	+	+	N
	88	+	+	+	N
Sóng thử	101	+	/	/	/
	102	+	/	/	/

Ghi chú: “+” thể hiện kết quả kiểm tra là dương tính; “N” thể hiện kết quả kiểm tra là âm tính.

Yêu cầu bảo hộ

1. Virut dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực do bị xóa gen, đặc trưng ở chỗ gen MGF360-505R của virut dịch tả lợn châu Phi kiểu gen II bị xóa, và virut bị xóa gen MGF360-505R đã bị xóa nucleotide thứ 27942-35500 so với trình tự bộ gen đầy đủ của chủng virut ban đầu, hoặc cả hai gen CD2V và MGF360-505R của virut dịch tả lợn châu Phi kiểu gen II bị xóa, và virut bị xóa kết hợp cả hai gen CD2V và MGF360-505R đã bị xóa nucleotide thứ 27942-35500 và thứ 73394-74476 so với trình tự bộ gen đầy đủ của chủng virut ban đầu, trong đó virut dịch tả lợn châu Phi kiểu gen II được mô tả là chủng Pig/CN/HLJ/2018 lưu hành ở Trung Quốc có trình tự gen có chiều dài đầy đủ được mô tả trong GenBank: MK333180.1

2. Virut dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực do bị xóa gen theo điểm 1, đặc trưng ở chỗ virut bị xóa gen MGF360-505R có mã lưu trữ là CCTCC NO:V201925.

3. Virut dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực do bị xóa gen theo điểm 1, đặc trưng ở chỗ virut bị xóa kết hợp gen CD2V và MGF360-505R có mã lưu trữ là CCTCC NO:V201924.

4. Vắc-xin phòng bệnh dịch tả lợn châu Phi, đặc trưng ở chỗ nó chứa virut dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực do bị xóa gen theo bất kỳ điểm nào trong số các điểm từ 1 đến 3.

5. Phương pháp điều chế virut dịch tả lợn châu Phi suy giảm độc lực do bị xóa gen theo bất kỳ điểm nào trong số các điểm từ 1 đến 3, đặc trưng ở chỗ: bằng phương pháp kỹ thuật gen chủng virut dịch tả lợn châu Phi ban đầu có thể bị suy giảm độc lực bằng cách xóa nucleotide thứ 27942-35500 hoặc xóa kết hợp nucleotide thứ 27942-35500 và thứ 73394-74476.

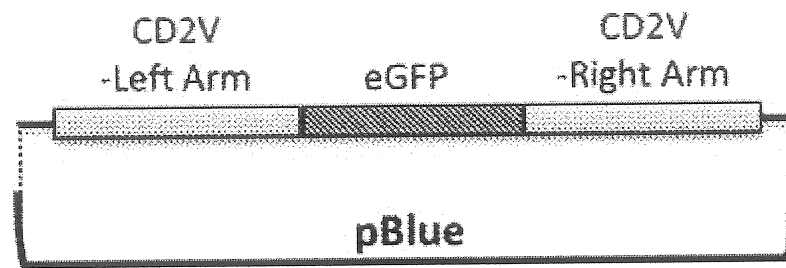


Fig.1

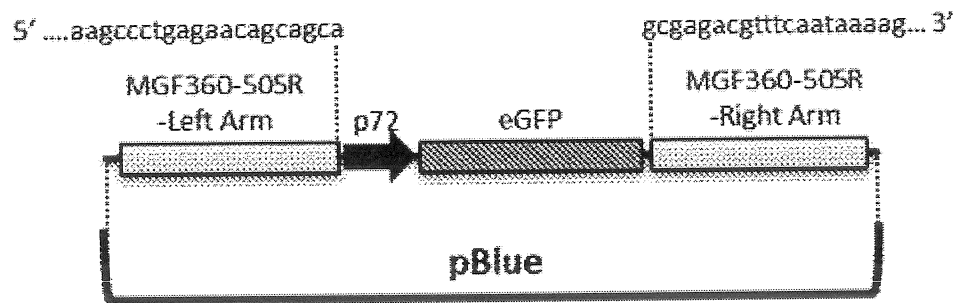


Fig.2

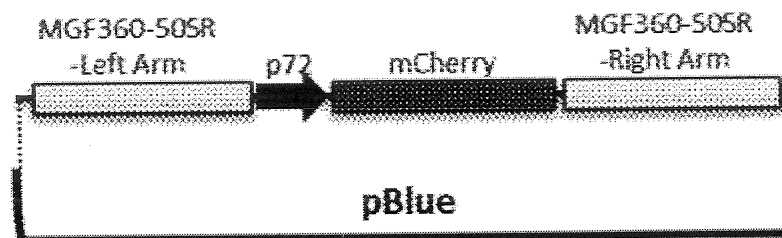


Fig.3

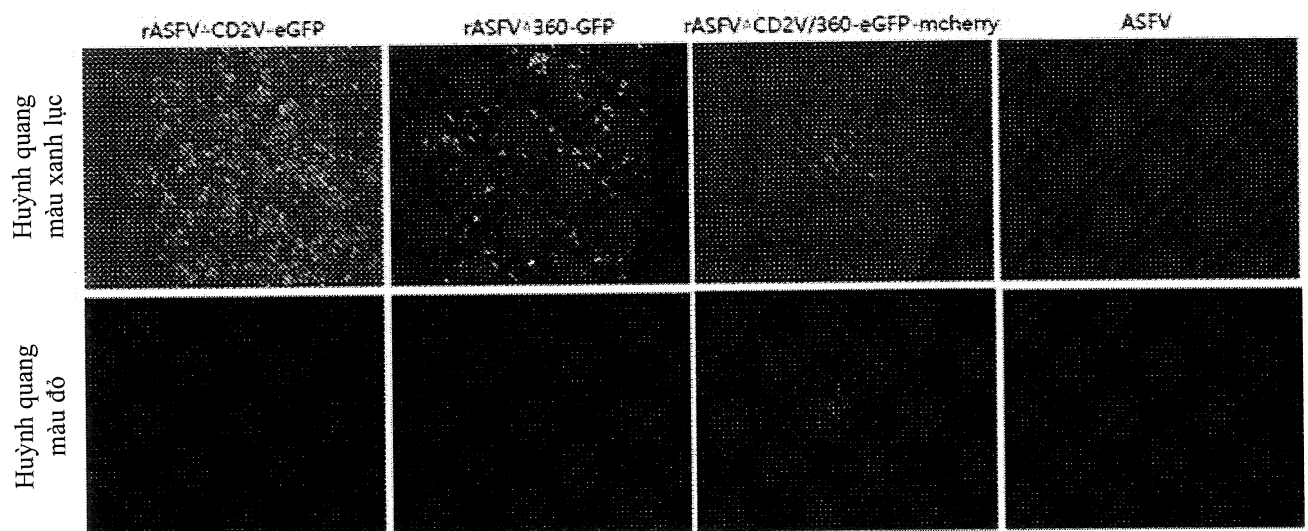


Fig.4

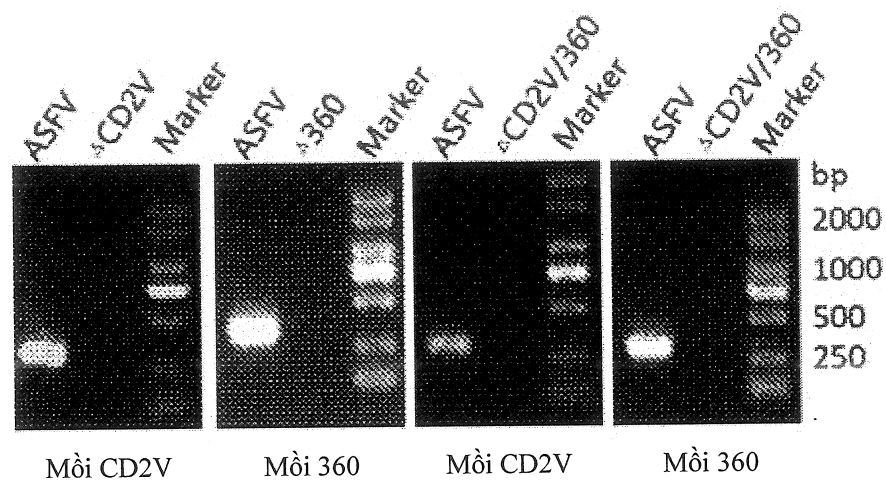


Fig.5

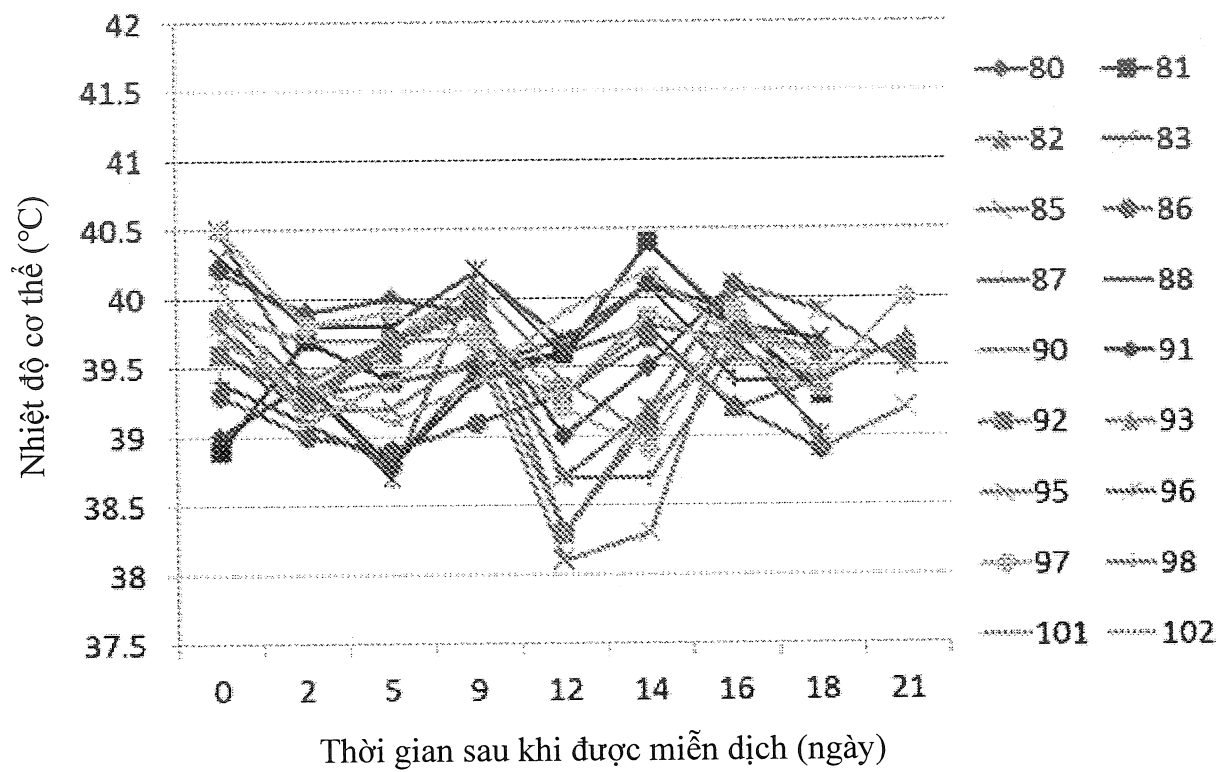


Fig.6

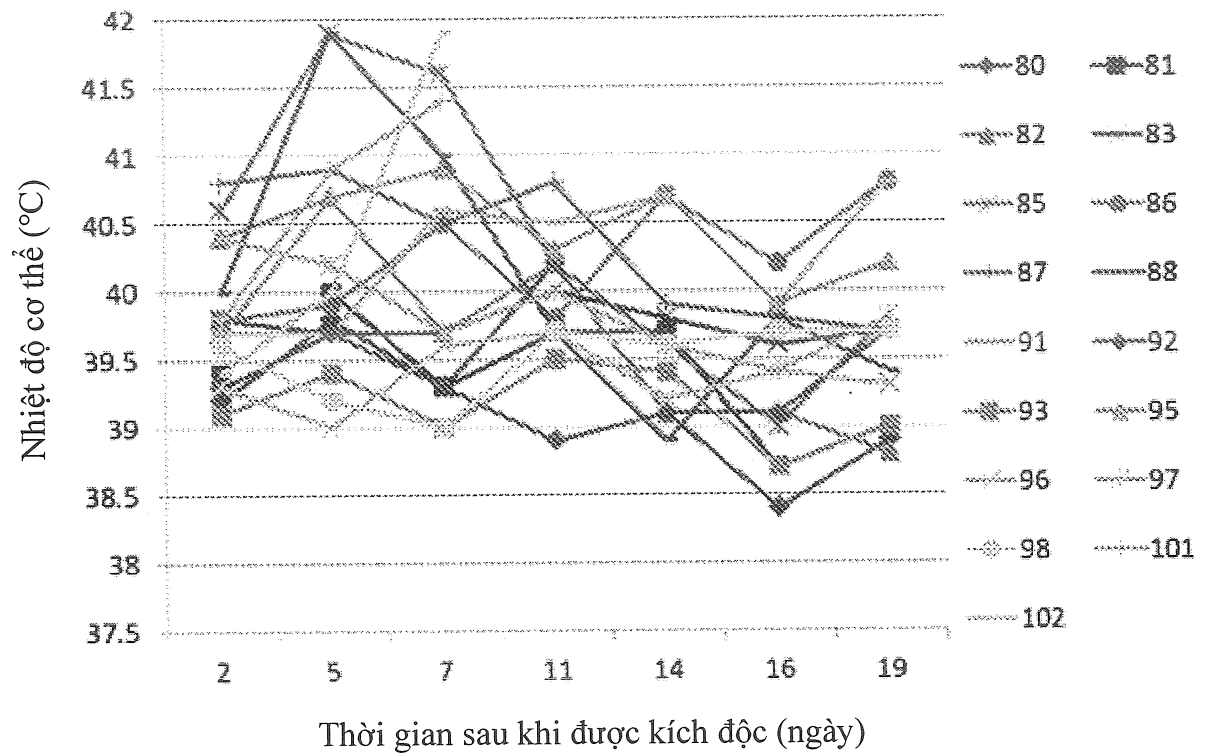


Fig.7

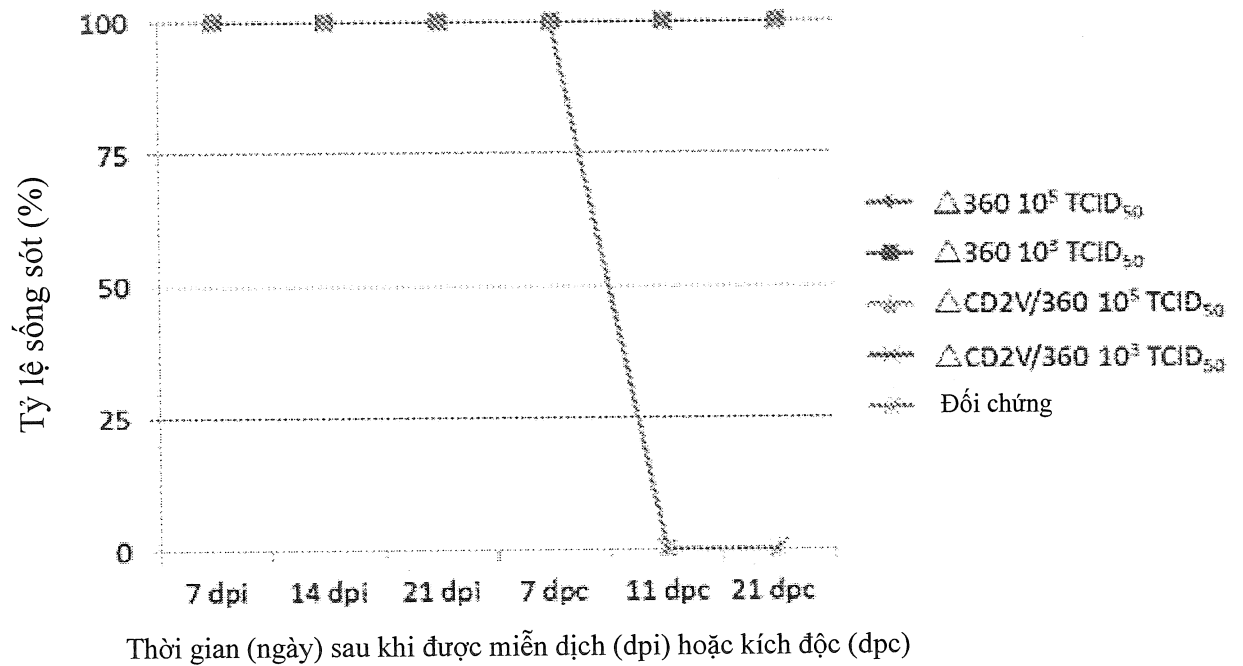


Fig.8