



(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) 
1-0020066

(51)⁷ **A61K 39/05, 35/74, 39/39**

(13) **B**

(21)	1-2012-00452	(22)	05.08.2010		
(86)	PCT/EP2010/061387	05.08.2010	(87)	WO2011/015614	10.02.2011
(30)	09167342.6	06.08.2009	EP		
	61/231,820	06.08.2009	US		
(45)	26.11.2018	368	(43)	26.11.2012	296
(73)	INTERVET INTERNATIONAL B.V. (NL) Wim de Koerverstraat 35, NL-5831 AN Boxmeer, Netherlands				
(72)	KLAASEN, Henricus, Leo, Bernardus, Maria (NL)				
(74)	Công ty TNHH Tâm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)				

(54) **VACXIN CHỐNG LẠI BỆNH VIÊM MÀNG PHỔI-PHỔI Ở LỢN VÀ PHƯƠNG PHÁP THU NHẬN VACXIN NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến vacxin chống lại bệnh viêm màng phổi-phổi ở lợn, chứa lipopolysacarit, trong đó vacxin này chứa polymyxin để làm giảm các triệu chứng sốc nội độc tố phát sinh từ lipopolysacarit. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp thu nhận vacxin này và phương pháp sử dụng vacxin cho đối tượng động vật.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vacxin chống lại bệnh viêm màng phổi-phổi ở lợn, là bệnh gây ra sự tổn thất kinh tế đáng kể trên toàn cầu đối với ngành công nghiệp chăn nuôi lợn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tác nhân gây bệnh viêm màng phổi-phổi ở lợn là *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), là vi khuẩn gram âm thuộc họ *Pasteurellaceae*. Bệnh này được truyền qua đường sol khí hoặc tiếp xúc trực tiếp với lợn bị nhiễm bệnh, và đặc trưng bởi các thương tổn phổi xuất huyết, có tơ huyết và hoại tử. Toàn cảnh lâm sàng có thể thay đổi từ rất nhẹ đến mạn tính, và lợn mang bệnh nhưng không có triệu chứng có thể truyền bệnh khi được đưa vào đàn chưa bị nhiễm bệnh. Có 15 chủng huyết thanh (serovar) đã được mô tả dựa vào các polysacarit nang và các thành phần chuỗi O lipopolysacarit (LPS). Phương pháp định kiểu huyết thanh và các phương pháp định kiểu di truyền khác đối với *Actinobacillus pleuropneumoniae* góp phần đáng kể vào việc giám sát và trợ giúp các nghiên cứu dịch tễ học. Các công cụ này cung cấp thông tin quan trọng để ra quyết định trong các chương trình kiểm soát nhằm diệt trừ các typ độc hại của vi khuẩn này. Ở Bắc Mỹ, các chủng huyết thanh 1, 5 và 7 được báo cáo là phổ biến nhất, trong khi các chủng huyết thanh 2 và 9 được phân lập phổ biến nhất ở châu Âu, và chủng huyết thanh 15 là chủng phân lập chiếm ưu thế từ các con lợn ở Úc.

Các yếu tố độc hại đã được mô tả cho *A. pleuropneumoniae* bao gồm LPS, polysacarit nang, độc tố Apx I-IV (còn được gọi là đoạn lặp trong độc tố hoặc độc tố RTX), protein màng ngoài (OMP) và các hệ nhận sắt khác nhau. Tuy nhiên, sự đóng góp tổng thể của từng thành phần đối với quá trình gây nhiễm vẫn chưa được biết rõ, cũng như các cơ chế gây bệnh của vi khuẩn. Hầu như tất cả các vacxin chống lại *A. pleuropneumoniae* có sẵn hiện nay đều là các bacterin toàn tế bào đã được làm bất hoạt hoặc các tổ hợp cấu trúc dưới phân tử của độc tố Apx và protein, tùy ý ở dạng kết hợp với các phân đoạn màng ngoài. Trong trường hợp bất kỳ, thường hiểu rằng để đạt được sự bảo vệ đầy đủ, tốt hơn là trên các

chủng huyết thanh khác nhau, thì lipopolysacarit (LPS) phải có mặt trong vacxin (Julien Gouré et al.,: BMC Genomics 2009, 10:88, công bố ngày 24 tháng 2 năm 2009; Dubreuil et al.,: Animal Health Research Reviews 1 (2): 73-93, công bố vào tháng 12 năm 2000). Thậm chí rõ ràng hơn, đã biết từ những năm 1980 rằng vacxin chỉ dựa trên cơ sở lipopolysacarit đơn lẻ đã có tác dụng tích cực trong việc làm giảm mức độ nhiễm hoặc các dấu hiệu lâm sàng của bệnh và tạo ra tác dụng bảo vệ chéo (Fenwick et al., the American Journal of Veterinary Research, Volume 47, No 9, September 1986; Rapp et al., Canadian Veterinary Journal, 1988, Volume 29, Number 7, pp 585-587; Rioux et al., Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases 20(1):63-74, January 1997).

Nhược điểm lớn của lipopolysacarit là tính nội độc tố của nó, do đó có thể gây ra nhiều tác dụng phụ không mong muốn như ngủ lịm, tiêu chảy, nôn, mất cảm giác muốn ăn hoặc thậm chí tử vong. Do đó, ngay từ đầu đã cần phải giảm lượng LPS trong vacxin hoặc khử độc LPS. Tuy nhiên, vacxin APP thích đáng lại phụ thuộc vào sự có mặt của LPS, và do đó, như đã biết một cách rộng rãi, việc giảm lượng LPS sẽ làm giảm tác dụng của vacxin. Nhiều nỗ lực khác nhau cũng đã được thực hiện nhằm làm giảm tính nội độc tố của LPS mà vẫn thu được vacxin APP có hiệu quả. Rioux và cộng sự (trong tài liệu nêu trên) đã nghiên cứu tác dụng của việc khử độc LPS đối với tác dụng của vacxin chống lại APP và đã kết luận rằng chuột nhắt được gây miễn dịch bằng LPS (không được khử độc) được bảo vệ, trong khi vacxin dựa trên cơ sở LPS đã được khử độc không bảo vệ được chuột nhắt (xem trang 71 của tài liệu công bố của Rioux, đoạn thứ ba). Nghiên cứu này được lặp lại ở lợn (Research in Veterinary Science 1998, 65, 165-167). Đã chứng minh được rằng vacxin bacterin thương mại (chứa LPS không được khử độc) tạo ra tác dụng bảo vệ tốt chống lại sự kích thích bằng APP kiểu đại. Vacxin dựa trên cơ sở LPS đã được khử độc có vẻ kém hiệu quả hơn rất nhiều (60% số lợn vẫn bị thương tổn phổi). Điều này phù hợp với sự hiểu biết rộng rãi là LPS, khi được khử độc, có tính gây miễn dịch kém hơn rất nhiều.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất vacxin chống lại bệnh viêm màng phổi-phổi ở lợn, có tác dụng tương đương với các vacxin có trên thị trường, nhưng có các triệu chứng sốc nội độc tố giảm đáng kể, đặc biệt là không hoặc hầu như không thể hiện bất kỳ dấu hiệu nào

trong số các dấu hiệu tiêu chảy, nôn và gia tăng hô hấp ở lợn sau khi sử dụng liều hữu hiệu của vaccin.

Để đạt được điều này, vaccin được thiết kế dựa trên việc chứa lipopolysacarit, trong đó vaccin này còn chứa cả polymyxin để làm giảm các triệu chứng sốc nội độc tố phát sinh từ lipopolysacarit. Bất ngờ phát hiện ra rằng việc khử độc LPS bằng polymyxin không có tác động tiêu cực đáng kể đối với tính gây miễn dịch của LPS và vì vậy không có tác động tiêu cực đáng kể đối với tác dụng của vaccin. Có vẻ như nhờ sử dụng polymyxin mà các triệu chứng sốc nội độc tố, như tiêu chảy, nôn và gia tăng hô hấp, có thể được làm giảm đáng kể trong khi vẫn duy trì được tác dụng của vaccin ở mức thích đáng. Đặc biệt, có vẻ như vaccin này thậm chí có thể có tác dụng giống như vaccin mà không được bổ sung polymyxin.

Mô tả chi tiết sáng chế

Vaccin theo sáng chế là thành phần nhằm ngăn ngừa hoặc làm giảm sự nhiễm vi sinh vật hoặc các triệu chứng lâm sàng của bệnh hoặc rối loạn gây ra bởi sự nhiễm này nhờ tạo ra các kháng thể cản trở vi sinh vật hoặc các quá trình chuyển hóa của nó (trong vi sinh vật hoặc được gây ra bởi vi sinh vật) trong vật chủ. Vaccin có thể chứa cấu trúc dưới phân tử của vi sinh vật (như, ví dụ LPS) làm kháng nguyên cơ bản, nhưng cũng có thể chứa toàn bộ vi sinh vật đã được làm giảm độc lực hoặc đã bị làm chết, hoặc, ví dụ, chất chuyển hóa của sinh vật này (như độc tố được bài tiết ra). Vaccin chứa lượng hữu hiệu để gây miễn dịch của kháng nguyên (tức là lượng có khả năng kích thích hệ miễn dịch của động vật đích đủ để ít nhất là làm giảm các tác động tiêu cực của sự kích thích bằng vi sinh vật kiểu đại), thường được kết hợp với chất mang được dùng như chất lỏng chứa nước (thường là muối đệm phosphat), tùy ý chứa tác nhân kích thích miễn dịch (chất bổ trợ), chất làm ổn định, chất làm thay đổi độ nhớt hoặc các thành phần khác tùy thuộc vào mục đích sử dụng hoặc các tính chất cần thiết của vaccin. Các kháng nguyên bổ sung của các vi sinh vật khác cũng có thể có mặt sao cho vaccin bảo vệ chống lại nhiều sinh vật kiểu đại.

Polymyxin là hợp chất có tính chất kháng vi khuẩn, có thể được phân lập từ *Bacillus polymyxa* (*B. aerospira*) hoặc được sản xuất theo cách nhân tạo, và hợp chất có tính chất kháng vi khuẩn có thể thu được trực tiếp từ đó. Polymyxin được sản xuất bởi *B. polymyxa* có cấu trúc chung bao gồm peptit vòng với đuôi dài kỵ nước. Các polymyxin điển hình là:

polymyxin A (còn được gọi là aerosporin), polymyxin B (thường được gọi là polymyxin), polymyxin E (còn được gọi là colistin), polymyxin M (còn được gọi là mattaxin) và polymyxin nonapeptit.

Cần lưu ý là đã biết rằng polymyxin có thể được sử dụng để khử độc thành công các lipopolysacarit trong các hợp phần gây miễn dịch chứa vi khuẩn gram âm. Ví dụ, trong tạp chí "Infection and Immunity", July 1981, pp 315-318, Cooperstock và cộng sự bộc lộ rằng nhờ sử dụng polymyxin B, hoạt tính nội độc tố trong huyền phù chứa một số vi khuẩn gram âm (là *Bordetella pertussis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* và *Pseudomonas aeruginosa*) được làm giảm rõ rệt. Tuy nhiên, Cooperstock cũng lưu ý rõ ràng rằng "vẫn chưa chắc chắn là liệu các tính chất gây miễn dịch của vi khuẩn được xử lý bằng polymyxin vẫn còn nguyên vẹn hay không" và "khả năng của một vài ... thành phần màng ngoài trong việc liên kết với kháng thể đã được tạo ra trong hệ điện di miễn dịch bị mất một phần sau khi xử lý toàn bộ vi khuẩn hoặc màng đã được tách ra bằng nồng độ polymyxin B cao". Nói cách khác, các tính chất gây miễn dịch của LPS đã được khử độc đã trở thành vấn đề nghiêm trọng, và việc bị mất ít nhất một phần của các tính chất này đã được đoán trước.

Thật vậy, trong ấn phẩm Journal of Hygiene (Cambridge), 1981, 87, pp 377-381, Bannatyne và cộng sự cũng bộc lộ rằng polymyxin với nồng độ là 5000 µg (polymyxin B sulphat) trong mỗi mL (bằng khoảng 42000 đơn vị quốc tế trong mỗi liều vaccin) đã thành công trong việc ức chế tác động gây độc của LPS. Tuy nhiên, ông cũng trình bày rằng "tuy nhiên, vẫn còn các hạn chế về vaccin chứa polymyxin này. Điều quan trọng nhất là liệu sự giảm hàm lượng nội độc tố có đi kèm với sự giảm lượng kháng nguyên bảo vệ và đi kèm với sự giảm tác dụng bảo vệ hay không". Vài năm sau đó, Larter và cộng sự (trong tạp chí American Journal of Diseases of Children, Vol 138, March 1984) thực sự phát hiện ra rằng trong vaccin ho gà, hiệu giá kháng thể ở động vật nhận vaccin ho gà và polymyxin đồng thời (trên 150000 IU mỗi liều) là thấp hơn và tăng chậm hơn hoặc thậm chí là không có mặt.

Các phát hiện vào đầu những năm 1980 này có thể giải thích tại sao đối với vaccin APP hiệu quả, trong đó LPS đóng vai trò chi phối, việc khử độc bằng polymyxin chưa bao giờ được tin là có cơ hội thành công hợp lý để thu nhận được vaccin an toàn mà vẫn hiệu quả. Điều này được chứng minh rõ rệt bằng thực tế là đã trải qua 25 năm kể từ các quan sát

nêu trên, cho đến khi tạo ra sáng chế này về polymyxin trong vacxin APP chứa LPS làm thành phần thiết yếu.

Theo một phương án, vacxin chứa lipopolysacarit được tinh chế từ canh trường nuôi cấy vi khuẩn (tức là đặc so với các thành phần tế bào khác như hạt cơ quan tế bào, nhân, các thành phần thành tế bào v.v.) được tạo phức với một hoặc nhiều đoạn lặp trong độc tố. Đã biết rằng vacxin APP dựa trên cơ sở bacterin tạo ra sự bảo vệ kém hơn so với vacxin dựa trên cơ sở tổ hợp các cấu trúc dưới phân tử LPS và Apx ở dạng phức hợp. Do đó, vacxin cấu trúc dưới phân tử dạng tổ hợp này, chứa LPS được tinh chế từ canh trường nuôi cấy vi khuẩn được tạo phức với một hoặc nhiều độc tố Apx được ưu tiên. Đã biết rằng sự liên kết đặc hiệu giữa LPS và các độc tố này đóng vai trò chủ yếu đối với tính gây miễn dịch được cải thiện của các độc tố này (xem, ngoài các tài liệu khác, Ramjeet et al., Molecular Biology, 2008, 70(1), pp 221-235), điều này có thể giải thích cho tác dụng bảo vệ được cải thiện của vacxin cấu trúc dưới phân tử dạng tổ hợp này. Bất ngờ phát hiện ra rằng polymyxin, không kể đến tính chất liên kết LPS mạnh của nó, dường như không gây cản trở bất lợi đối với phức hợp LPS-độc tố này, vì vacxin cấu trúc dưới phân tử dạng tổ hợp chứa polymyxin tạo ra sự bảo vệ tương đương với vacxin cấu trúc dưới phân tử dạng tổ hợp giống như vậy mà không chứa polymyxin. Đoạn lặp trong độc tố có thể, ví dụ, là đoạn lặp trong độc tố đã biết trong EP 453 024. Đoạn lặp trong độc tố bất kỳ trong số các đoạn lặp trong độc tố còn lại là ApxII hoặc ApxIV cũng có thể có mặt. Điều này có thể phụ thuộc, ngoài các yếu tố khác, vào (các) chủng huyết thanh APP mà muốn bảo vệ chống lại chủng này. Đã biết rằng tiếp theo *Actinobacillus pleuropneumoniae*, các độc tố Apx (I và II) cũng được sản xuất bởi *Actinobacillus suis*. Các độc tố nêu sau cũng có thể được sử dụng trong vacxin theo phương án này. Tốt hơn là một hoặc nhiều độc tố trong số các độc tố Apx I, Apx II và Apx III được chứa trong vacxin, tốt hơn nữa là mỗi độc tố trong số này.

Theo một phương án, vacxin chứa nhỏ hơn 2000 IU polymyxin mỗi liều. Bất ngờ phát hiện ra rằng có thể làm giảm một cách hiệu quả các triệu chứng nội độc tố bằng cách sử dụng lượng nhỏ tới mức là 2000 IU/liều (mà có thể đạt được bằng cách, ví dụ, bổ sung khoảng 60 µg polymyxin B sulphat trong mỗi mL vacxin đối với liều 4 mL). Trong các tài liệu tham khảo được trích dẫn ở trên, lượng hữu hiệu khi chủng ngừa nằm trong khoảng từ 42000 đến 1600000 IU polymyxin mỗi liều, gần với khoảng giá trị để sử dụng polymyxin

làm chất bảo quản (xem thêm lần tái bản thứ 9 của ấn phẩm Merck Veterinary Manual, ed. 2005, ấn phẩm này khuyến nghị liều là ít nhất 50000 IU trong mỗi liều đối với động vật có thể trọng 10 kg). Chủ đơn bất ngờ phát hiện ra rằng chỉ một phần nhỏ (nhỏ hơn 5%) cũng dường như là đủ để làm giảm các triệu chứng sốc nội độc tố. Vì polymyxin thường không ổn định vô hạn định, lượng có mặt trong vaccin sẽ nhỏ hơn lượng được bổ sung, thường nằm trong khoảng từ 50 đến 80% khi được đo sau khi bào chế tới một năm. Lưu ý rằng có thể sử dụng lượng polymyxin cần thiết nhỏ nhất để làm giảm các triệu chứng lâm sàng. Có thể là, ví dụ, ở giống lợn mà ít phải chịu LPS trong vaccin hơn, lượng nằm trong khoảng từ khoảng 15 đến 30 IU mỗi liều sẽ có hiệu quả trong việc làm giảm đáng các triệu chứng sốc nội độc tố. Tác dụng tích cực của liều thấp như vậy đã được xác nhận bằng thực nghiệm. Lưu ý rằng liều hữu hiệu tối thiểu có thể không chỉ phụ thuộc vào giống lợn, mà còn phụ thuộc vào sự giảm các triệu chứng lâm sàng cần thiết, lượng LPS trong vaccin, loại polymyxin v.v.. Theo một phương án, vaccin chứa nhỏ hơn 1000, hoặc thậm chí nhỏ hơn 500 IU mỗi liều.

Theo một phương án, lipopolysaccharit có nguồn gốc từ *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Trên thực tế, như đã biết một cách rộng rãi, LPS trong vaccin không cần phải được chiết từ vi khuẩn APP để có hiệu quả trong vaccin chống lại bệnh viêm màng phổi-phổi ở lợn. Nó có thể có nguồn gốc, ví dụ, từ *Escherichia coli*, được biểu hiện tái tổ hợp ở vật chủ vi khuẩn, tế bào động vật hoặc các dạng vật chủ khác. Tuy nhiên, các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng LPS mà có nguồn gốc từ APP tạo ra các kết quả chủng ngừa rất tốt. LPS này có thể được chiết trực tiếp từ vi khuẩn APP, nhưng cũng có thể được biểu hiện bởi vật chủ thích hợp.

Theo một phương án, vaccin chứa protein màng ngoài có kích thước 42 kD của *Actinobacillus pleuropneumoniae* như đã biết trong EP 453 024.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp thu nhận vaccin chống lại bệnh viêm màng phổi-phổi ở lợn, bao gồm bước thu nhận lipopolysaccharit, trộn lipopolysaccharit với chất mang được dụng và khử độc lipopolysaccharit bằng cách bổ sung polymyxin. Việc khử độc trong bản mô tả này có nghĩa là lượng polymyxin được bổ sung thích hợp để ít nhất là làm giảm các triệu chứng sốc nội độc tố, cụ thể là tiêu chảy, nôn và gia tăng hô hấp. Tốt hơn là nhỏ hơn 2000, hoặc thậm chí là nhỏ hơn 1000 hoặc 500 IU polymyxin được sử dụng cho mỗi liều dự định

của vaccin. Theo một phương án, polymyxin được bổ sung khi lipopolysaccharit được trộn với chất mang.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp làm giảm các triệu chứng sốc nội độc tố khi sử dụng vaccin chống lại bệnh viêm màng phổi-phổi ở lợn chứa lipopolysaccharit, bao gồm bước sử dụng vaccin theo sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được minh họa bằng các ví dụ dưới đây.

Thiết kế thí nghiệm

Trong nghiên cứu thứ nhất, 150 con lợn 6 tuần tuổi không chứa mầm bệnh đặc hiệu (SPF: specific pathogen-free) được sử dụng, và ba nhóm gồm 50 con lợn mỗi nhóm được tạo thành. Mỗi nhóm được chủng ngừa một lần trong cơ bằng liều 4 mL ở độ tuổi là 6 tuần. Nhóm 1 nhận vaccin APP tiêu chuẩn (Porcilis APP, có bán từ Intervet International BV, Boxmeer, Hà Lan), không có polymyxin. Vaccin này chứa (trong mỗi mL) 25 đơn vị đoạn lặp trong độc tố ApxI, II và III cũng như protein màng ngoài có kích thước 42 kD. LPS có mặt với lượng khoảng 5 đến 6×10^5 IU/mL. Nhóm 2 nhận cùng vaccin như vậy nhưng có bổ sung polymyxin B (dưới dạng muối sulphat), với lượng là 30 µg/mL (khoảng 250 IU trong mỗi mL). Nhóm 3 nhận cùng vaccin tiêu chuẩn như vậy, nhưng có bổ sung polymyxin E (dưới dạng muối sulphat), cũng với lượng là 30 µg/mL (khoảng 250 IU trong mỗi mL). Các polymyxin được bổ sung vào giai đoạn cuối cùng của quy trình bào chế vaccin, tức là khi tất cả các kháng nguyên khác đang được trộn với chất mang Diluvac Forte (có bán từ Intervet International BV, Boxmeer, Hà Lan).

Nhiệt độ trực tràng được đo vào thời điểm 20 giờ trước khi chủng ngừa, ngay trước khi chủng ngừa, và 2, 4, 7 và 24 giờ sau khi chủng ngừa. Tất cả các con vật trong mỗi nhóm được theo dõi về các triệu chứng lâm sàng đặc hiệu (chỉ thị cho sốc nội độc tố) tại thời điểm 30 phút và 1, 2, 4, 7 và 24 giờ sau khi chủng ngừa. Cụ thể, các con vật được kiểm tra về các triệu chứng sau đây: kém hoạt động, run rẩy, ho, tiêu chảy, nôn, gia tăng tốc độ hô hấp, hô hấp bụng, khó thở và tử vong. Vào các ngày 2-6 sau khi chủng ngừa, chỉ thực hiện việc kiểm

tra hằng ngày. Giá trị nhiệt độ và triệu chứng lâm sàng của các nhóm 2 và 3 được so sánh với nhóm 1.

Trong nghiên cứu thứ hai, hai nồng độ polymyxin khác nhau được thử nghiệm. Nghiên cứu này được thực hiện với 42 con lợn, được gán ngẫu nhiên vào 3 nhóm điều trị gồm 14 con lợn mỗi nhóm. Nhóm 1 nhận Porcilis APP (không có polymyxin), nhóm 2 nhận cùng vacxin như vậy với 30 µg polymyxin B trong mỗi mL vacxin và nhóm 3 nhận cùng vacxin như vậy với 60 µg polymyxin B trong mỗi mL vacxin. Các thiết đặt thí nghiệm khác là giống như trong nghiên cứu thứ nhất.

Trong nghiên cứu thứ ba, tác dụng của vacxin APP dựa trên cơ sở LPS và chứa polymyxin B được thử nghiệm. Polymyxin B thường được biết đến là polymyxin có tính chất liên kết LPS tốt nhất, và do đó về lý thuyết, polymyxin B có tác động tiêu cực mạnh nhất đối với tác dụng của vacxin. Vì vậy, nếu vacxin được bào chế với polymyxin này có hiệu quả, đây sẽ là bằng chứng cho thấy rằng với polymyxin khác, có thể thu nhận được ít nhất là vacxin có hiệu quả tương đương. Vacxin trong nghiên cứu này được bào chế bằng cách bổ sung 30 µg polymyxin B cho mỗi mL vacxin vào vacxin Porcilis APP tiêu chuẩn. Mười bốn con lợn được chủng ngừa trong cơ ở độ tuổi là 6 và 10 tuần bằng 2 mL vacxin, do đó nhận liều là khoảng 500 IU polymyxin. Bảy con lợn nhận vacxin giả dược (đệm tris-HCl 40 mM). Hiệu giá kháng thể chống lại các độc tố RTX ApxI, ApxII và Apx III cũng như OMP được xác định tại thời điểm 13 tuần. Ba tuần sau lần chủng ngừa thứ hai, tất cả các con lợn được kích thích bằng chủng huyết thanh 2 của *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Trong nghiên cứu thứ tư, các tác giả sáng chế thử nghiệm độ an toàn của vacxin trong đó polymyxin được bổ sung trong khi chế biến xuôi dòng mẻ lên men *Actinobacillus pleuropneumoniae*, cuối cùng đạt được hàm lượng polymyxin thấp hơn rất nhiều trong vacxin (khoảng 2-4 µg/mL). Trong nghiên cứu này, vacxin được điều chế bằng cách bổ sung 30 µg polymyxin B hoặc polymyxin E sulphat trong mỗi mL dịch nổi bề mặt của canh lên men chứa giống cấy tương ứng, sau đó các độc tố ApxI, II, III được tạo phức với LPS, và OMP có kích thước 42 kD được phân lập từ các dịch nổi bề mặt này. Các cấu trúc dưới phân tử đã được phân lập này được bào chế trong Diluvac forte để đạt được khoảng 25 đơn vị đối với các độc tố và OMP và khoảng 1×10^6 IU LPS trong mỗi mL vacxin. Trong các vacxin

này, phát hiện thấy hàm lượng polymyxin là khoảng 22 IU (2,6 µg/mL) đối với polymyxin E và khoảng 35 IU (4,2 µg/mL) đối với polymyxin B trong mỗi mL. Để thử nghiệm độ an toàn, mỗi con lợn thuộc hai nhóm gồm mười con lợn SPF 6 tuần tuổi nhận 4 mL vaccin tương ứng. Các triệu chứng lâm sàng được đánh giá như trong nghiên cứu thứ nhất.

Các kết quả

Không thấy có tác động đáng kể nào của một trong hai polymyxin đối với nhiệt độ trực tràng.

Tuy nhiên, có các tác động đáng kể liên quan đến các triệu chứng sốc nội độc tố. Bảng 1 dưới đây đưa ra tóm tắt về các triệu chứng trong mỗi nhóm. Trong nhóm 1, các triệu chứng lâm sàng điển hình được quan sát thấy ở hơn một nửa số lợn, như nôn (60%) và gia tăng tốc độ hô hấp (66%). Trong nhóm này, hai con lợn (4%) tử vong do sốc nội độc tố. Ngược lại, chỉ quan sát thấy các triệu chứng rất nhẹ trong các nhóm 2 và 3. Trong cả hai nhóm, 2% số lợn (một trong số 50 con lợn) bị nôn. Ngoài ra, 2% số lợn của nhóm 3 gia tăng tốc độ hô hấp. Do đó, có thể kết luận rằng các polymyxin thích hợp để làm giảm các triệu chứng sốc nội độc tố nghiêm trọng gây ra bởi LPS trong vaccin APP.

Bảng 1. Các triệu chứng sốc nội độc tố sau khi chủng ngừa bằng các vaccin APP khác nhau

Vaccin	Tiêu chảy	Nôn	Gia tăng tốc độ hô hấp	Tử vong
Porcilis APP	10%	60%	66%	4%
Porcilis APP + polymyxin B 30 µg/mL	0%	2%	0%	0%
Porcilis APP + polymyxin E 30 µg/mL	0%	2%	2%	0%

Bảng 2 thể hiện các kết quả của nghiên cứu thứ hai. Trong nhóm 1 (vaccin tiêu chuẩn), quan sát thấy các triệu chứng lâm sàng điển hình như nôn (54%) và gia tăng tốc độ hô hấp (15%). Trong các nhóm 2 và 3, quan sát thấy các triệu chứng từ nhẹ đến gần như không có. Dựa vào các kết quả này, có thể kết luận rằng việc bổ sung lượng polymyxin nhỏ tới mức là 60 µg trong mỗi mL vaccin, hoặc thậm chí nhỏ tới mức là 30 µg/mL vẫn có hiệu quả ngăn chặn gần như hoàn toàn LPS để không gây ra các triệu chứng sốc nội độc tố nghiêm trọng.

Bảng 2. Các triệu chứng sốc nội độc tố sau khi chủng ngừa bằng các vaccin APP khác nhau

Vaccin	Tiêu chảy	Nôn	Gia tăng tốc độ hô hấp	Tử vong
Porcilis APP	15%	54%	15%	0%
Porcilis APP + polymyxin B 30 µg/mL	0%	0%	8%	0%
Porcilis APP + polymyxin B 60 µg/mL	0%	0%	0%	0%

Trong nghiên cứu thứ ba, thu được các kết quả tác dụng tốt (tương đương với các kết quả có thể thu được với vaccin Porcilis APP tiêu chuẩn có cùng chế phẩm giống như vậy, ngoại trừ polymyxin) với vaccin chứa polymyxin B. Các kết quả này được tóm tắt trong bảng 3. Trong nhóm đối chứng, gần 60% số lợn tử vong, trong khi tất cả các con lợn trong nhóm được chủng ngừa đều được bảo vệ chống lại sự kích thích. Hiệu giá trong nhóm được chủng ngừa tương đương với hiệu giá có thể thu được bằng vaccin Porcilis APP tiêu chuẩn không chứa polymyxin ("không xác định được" có nghĩa là không thể phát hiện được trong thử nghiệm được sử dụng). Dựa vào các kết quả đặc biệt tốt với vaccin APP chứa polymyxin B và dựa vào thực tế là polymyxin này có tính chất liên kết LPS mạnh nhất, có thể hiểu rằng với các polymyxin khác, có thể thu nhận được vaccin mà có hiệu quả ít nhất là tương đương.

Bảng 3. Các kết quả tác dụng trung bình của vaccin chứa polymyxin B

Vaccin	Hiệu giá Apx I	Hiệu giá Apx II	Hiệu giá Apx III	Hiệu giá OMP	Tử vong
Porcilis APP + polymyxin B 30 µg/mL	9,3	10,1	8,5	9,1	0/14
Đối chứng	không xác định được	không xác định được	không xác định được	không xác định được	4/7

Trong nghiên cứu thứ tư, có thể thấy rằng thậm chí với vaccin chứa lượng polymyxin nhỏ tới mức là khoảng 20 IU trong mỗi mL, vẫn có thể thu được các kết quả tốt về độ an toàn. Dữ liệu trung bình được thể hiện trong bảng 4. Dựa vào tác dụng mà thậm chí với lượng polymyxin cao hơn đáng kể (xem nghiên cứu 3) vẫn có thể thu được các kết quả tốt về tác dụng, có thể thấy rõ là với vaccin trong nghiên cứu thứ tư, cũng có thể thu được các kết quả tốt về tác dụng.

Bảng 4. Các triệu chứng sốc nội độc tố sau khi chủng ngừa bằng các vaccin APP khác nhau

Vacxin	Tiêu chảy	Nôn	Gia tăng tốc độ hô hấp	Tử vong
Porcilis APP	50%	90%	70%	0%
Porcilis APP + polymyxin B 4,2 µg/mL	0%	10%	10%	0%
Porcilis APP + polymyxin E 2,6 µg/mL	0%	20%	30%	0%

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vacxin chống lại bệnh viêm màng phổi-phổi ở lợn, trong đó vacxin này chứa polymyxin để làm giảm các triệu chứng sốc nội độc tố phát sinh từ lipopolysacarit, lipopolysacarit được tinh chế từ canh trường nuôi cấy vi khuẩn đã được tạo phức với một hoặc nhiều đoạn lặp trong độc tố, và protein màng ngoài có kích thước 42 kD, trong đó các đoạn lặp trong độc tố là ApxI, ApxII và ApxIII, và trong đó vacxin này chứa lần lượt là 25 đơn vị ApxI, ApxII và ApxIII trong mỗi mL, 25 đơn vị protein màng ngoài có kích thước 42 kD trong mỗi mL, 5 đến 6×10^5 IU lipopolysacarit trong mỗi mL và 30 μ g polymyxin B hoặc polymyxin E trong mỗi mL.
2. Vacxin theo điểm 1, trong đó lipopolysacarit có nguồn gốc từ *Actinobacillus pleuropneumoniae*.
3. Vacxin theo điểm 1 hoặc 2, trong đó protein màng ngoài có kích thước 42 kD có nguồn gốc từ *Actinobacillus pleuropneumoniae*.