



(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

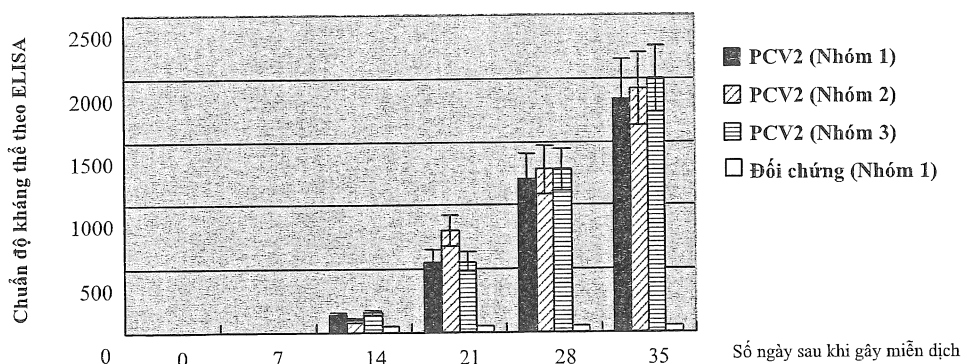
(11) 
1-0022816

(51)⁷ **C12N 7/00, 15/34, C07K 14/01, 16/08, (13) B**
A61K 39/12, A61P 31/20, G01N 33/53,
33/569, C12R 1/093

(21)	1-2013-01953	(22)	20.12.2011		
(86)	PCT/CN2011/084277	20.12.2011	(87)	WO2012/083837A1	28.06.2012
(30)	61/426,087	22.12.2010	US		
(45)	27.01.2020	382	(43)	25.09.2013	306
(73)	SBC Virbac Limited (CN) FLAT/RM 2201-2207, Tower Two Times Square, 1 Matheson Street, Causeway Bay, Hong Kong				
(72)	Tsun-Yung KUO (TW), Hsu Chung Gabriel CHEN (CA), Chung-Chin Wu (TW), Han-Ting Chen (TW)				
(74)	Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ WINCO (WINCO CO., LTD.)				

(54) **CHỦNG H CỦA CIRCOVIRUT TYP 2 Ở LỢN, CHẾ PHẨM GÂY MIỄN DỊCH CHỨA CHỦNG VIRUT NÀY VÀ KIT XÉT NGHIỆM CHỦNG VIRUT NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến chủng H của circovirut typ 2 ở lợn (Porcine Circovirus Type 2: PCV2), chủng này được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Trung Quốc (China Center for Type Culture Collection: CCTCC) với số hiệu lưu giữ là V20117. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch chứa chủng virut này, kit để phát hiện chủng virut này và ứng dụng của chủng virut này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này thuộc về lĩnh vực chăm sóc sức khỏe động vật, cụ thể là về chủng circovirus typ 2 ở lợn (Porcine Circovirus Type 2: PCV2), chế phẩm gây miễn dịch chứa chủng virus này, kit xét nghiệm PCV2 và ứng dụng của chủng virus này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Circovirus ở lợn (Porcine Circovirus: PCV) được phát hiện lần đầu tiên ở dòng tế bào thận của lợn (PK-15, ATCC CCL33). Mặc dù circovirus ở lợn có thể gây nhiễm liên tục tế bào PK-15, virus này không có hiệu ứng gây bệnh tế bào (cytopathic effect: CPE) trên các tế bào PK-15 bị nhiễm. Ngoài ra, virus PCV thu được từ PK-15 được cho là không gây bệnh. Mặc dù circovirus ở lợn có thể nhiễm vào lợn, nó không gây tổn thương ở lợn bị nhiễm virus này. Circovirus ở lợn có dạng hình khối hai mươi mặt, là virus ADN sợi đơn có hệ gen dạng vòng dài 1759 cặp bazơ (base pairs: bp). PCV thu được từ PK-15 được xếp vào họ *Circoviridae* vào năm 1995.

Vào năm 1991, hội chứng còi cọc sau cai sữa (post-weaning multisystemic wasting syndrome: PMWS) được ghi nhận lần đầu tiên trên lợn ở Canada. PMWS ảnh hưởng tới lợn con từ 5 đến 12 tuần tuổi. Hội chứng này được phân loại lâm sàng dựa vào các triệu chứng như sụt cân nhanh, khó thở, xanh xao và đôi khi có cả vàng da. Các tổn thương hiển vi đặc trưng của hội chứng này bao gồm sự cạn kiệt bạch huyết có sự thâm nhiễm mô bào trong các cơ quan bạch huyết, viêm phổi, viêm u hạt, viêm gan và viêm thận. Từ đại dịch năm 1991 ở Canada, PMWS đã được ghi nhận ở nhiều nước ở Bắc Mỹ, châu Âu và châu Á. Gần đây, đã phân lập được một loại circovirus mới từ lợn mắc PMWS. Trong khi hình thái học của circovirus ở lợn thu được từ PMWS là rất giống với hình thái học của PCV thu được từ PK-15, hai loại circovirus ở lợn này chỉ có độ tương đồng về trình tự hệ gen chỉ từ 68 đến 76%. PCV thu được từ PK-15 không gây bệnh và PCV thu được từ PMWS gây bệnh được phân loại tiếp thành circovirus ở lợn typ 1

(porcine circovirus type 1: PCV1) và circovirut typ 2 ở lợn (porcine circovirus type 2: PCV2) tương ứng.

Circovirut typ 2 ở lợn (PCV2) cũng thuộc họ *Circoviridae*. PCV2 là virus ADN mạch vòng, sợi đơn, có dạng hình khối hai mươi mặt và không có vỏ và có đường kính 17nm, đã được biết là một trong số các virus động vật nhỏ nhất. Hệ gen vòng của PCV2 chứa vùng khởi đầu sao chép có cấu trúc thân vòng, là đặc điểm chung của các circovirut. Hệ gen của PCV2 chứa từ 1767 đến 1768 nucleotit và được cho là có 11 khung đọc mở (open reading frame: ORF) tiềm năng. Trong số 11 khung ORF, các khung ORF 1 và ORF 2 dường như là các gen quan trọng nhất, chúng mã hoá protein sao chép (Rep và Rep') và protein capsit (capsid: cap) tương ứng. Protein capsit (cap) được mã hoá bởi gen ORF2 của PCV2 rất có thể sẽ là kháng nguyên gây ra sự sản sinh kháng thể trung hoà.

Bệnh nhiễm PCV2 lan rộng tới hầu hết các trang trại lợn trên thế giới. PCV2 đã được phát hiện là gây ra tỷ lệ sống sót thấp và tỷ lệ chuyển hoá thức ăn (feed conversion rate: FCR) thấp ở lợn bị nhiễm virus này và gây ra tổn thất lớn về kinh tế ở các trang trại lợn. Vì vậy, việc phát triển kit xét nghiệm PCV2 và vaccine kháng PCV2 là rất quan trọng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chủng PCV2 được phân lập từ lợn có các triệu chứng lâm sàng của hội chứng còi cọc sau cai sữa (PMWS), được phân tích thêm và khẳng định là thuộc chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2). Sợi dương (+) trên hệ gen của chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2) có trình tự ADN được thể hiện trong SEQ ID No: 1. Chủng PCV2 mới đã được lưu giữ Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Trung Quốc (China Center for Type Culture Collection: CCTCC) vào ngày 5/11/2011 với số hiệu lưu giữ là V20117.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch chứa chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2). Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm gây miễn dịch này là vaccine chứa virus đã bị giảm độc tính hoặc làm mất hoạt tính của chủng

PCV2 mới (chủng H của PCV2) và chất mang được dụng. Tuy nhiên, các dạng vaccin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vaccin bất hoạt, vaccin sống (đã bị giảm độc tính) (bằng cách làm giảm độc tính của virus), vaccin có cấu trúc dưới phân tử, vaccin ADN và các loại vaccin khác thu được và sản xuất được từ chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2) hoặc từ trình tự ADN hoặc trình tự axit amin của chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2).

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp bảo vệ lợn khỏi bị nhiễm PCV2, bao gồm bước cho lợn sử dụng liều có hiệu quả gây miễn dịch của chế phẩm gây miễn dịch chứa PCV2 nêu trên để làm gia tăng tính miễn dịch kháng lại sự nhiễm PCV2, làm giảm mức độ nặng các triệu chứng lâm sàng và virus huyết và làm tăng tỷ lệ sống và trọng lượng cơ thể.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất kháng thể kháng PCV2 thu được từ chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2). Kháng thể này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng và kháng thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền. Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể là kháng thể đa dòng thu được bằng cách tiêm chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2) vào động vật. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể là kháng thể đơn dòng thu được bằng cách sàng lọc thư viện thể lai của kháng thể đơn dòng.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất mảnh ADN của chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2). Các mảnh ADN này có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID No: 1, 2, 4, và 6. Các ứng dụng của mảnh ADN này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sản xuất vaccin ADN và vaccin có cấu trúc dưới phân tử và thiết kế đoạn mồi hoặc đoạn dò để phát hiện virus PCV2 trong mẫu. Theo một phương án được ưu tiên, mảnh ADN là trình tự hệ gen có chiều dài đầy đủ (SEQ ID No: 1) của chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2).

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất kit xét nghiệm PCV2. Kit này được dùng để phát hiện virus PCV2 hoặc kháng thể kháng PCV2 trong mẫu thử nghiệm. Kit này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, (1) kháng nguyên của chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2), theo một phương án được ưu tiên, kháng nguyên được lắng phủ

trên đĩa kháng nguyên và được làm bất hoạt bằng chất phản ứng làm bất hoạt; (2) kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng thu được từ chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2); (3) kháng nguyên hoặc kháng thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền thu được từ trình tự hệ gen có chiều dài đầy đủ (SEQ ID No: 1) hoặc mảnh nucleotit (SEQ ID No: 2, 4 và 6) của chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2); và (4) polynucleotit thu được từ trình tự hệ gen có chiều dài đầy đủ (SEQ ID No: 1) hoặc mảnh nucleotit (SEQ ID No: 2, 4 và 6) của chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2). Polynucleotit này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đoạn môi và đoạn dò. Theo một phương án được ưu tiên, polynucleotit này là các đoạn môi có thể dùng để phát hiện chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2) và các đoạn môi này có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID No: 8 - 11.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A là hình ảnh thể hiện các tế bào PK-15 không nhiễm, được nuôi cấy trong 4 ngày (độ phóng đại 100 lần); Fig.1B là hình ảnh thể hiện các tế bào PK-5 nhiễm chủng H của PCV2, được nuôi cấy trong 4 ngày (độ phóng đại 100 lần).

Fig.2 là hình ảnh thể hiện kết quả phân tích hệ phát sinh giống loài của trình tự hệ gen của chủng H của PCV2.

Fig.3 thể hiện kết quả so sánh trình tự axit amin ORF2 (SEQ ID No: 5) của chủng H của PCV2 và ba trình tự axit amin khác có tính tương đồng cao nhất với trình tự axit amin ORF2 của chủng H của PCV2 trong cơ sở dữ liệu GenBank của Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia (National Center for Biotechnology Information: NCBI).

Fig.4 thể hiện kết quả so sánh trình tự axit amin ORF2 của chủng H của PCV2 và trình tự axit amin ORF2 (số hiệu lưu giữ GenBank: ADD25772) của nguyên mẫu PCV2 2d (số hiệu lưu giữ GenBank: ZJ0955b).

Fig.5 thể hiện kết quả của thử nghiệm ELISA đối với PCV2 của các mẫu huyết thanh được lấy ở các thời điểm khác nhau từ chuột được tiêm vaccin bất hoạt chứa chủng H của PCV2.

Fig.6 thể hiện kết quả thử nghiệm IFA đối với PCV2 của các mẫu huyết thanh

được lấy ở các thời điểm khác nhau từ lợn con được tiêm vaccin bất hoạt chứa chủng H của PCV2.

Fig.7 thể hiện trọng lượng cơ thể của lợn con được tiêm vaccin bất hoạt chứa chủng H của PCV2.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chủng PCV2 được phân lập từ lợn có các triệu chứng lâm sàng của hội chứng còi cọc sau cai sữa (PMWS), được phân tích thêm và khẳng định là thuộc chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2). Sợi dương (+) trên hệ gen của chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2) có trình tự ADN được thể hiện trong SEQ ID No: 1. Chủng PCV2 mới đã được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Trung Quốc (CCTCC) vào ngày 5/11/2011 với số hiệu lưu giữ là V20117.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề cập đến chế phẩm gây miễn dịch chứa chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2). Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm gây miễn dịch này là vaccin chứa virut đã bị giảm độc tính hoặc làm bất hoạt thuộc chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2) và chất mang được dụng. Tuy nhiên, các loại vaccin bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, vaccin bất hoạt, vaccin sống (đã bị giảm độc tính) (bằng cách làm giảm độc tính của virut), vaccin có cấu trúc dưới phân tử, vaccin ADN và các loại vaccin khác thu được và sản xuất được từ chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2) hoặc từ trình tự ADN hoặc trình tự axit amin của chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2).

Quy trình bất hoạt (hoặc xử lý bất hoạt) theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, xử lý bằng chất phản ứng làm bất hoạt, xử lý bằng nhiệt và các cách xử lý khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết. Các chất phản ứng làm bất hoạt bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, formadehyt, paraformadehyt, beta-propiolacton (beta-propiolactone: BPL), etylenimin hai thành phần (binary ethyleneimine: BEI) hoặc các chất phản ứng làm bất hoạt khác thích hợp để sử dụng theo sáng chế.

Các chất mang được dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung môi, chất

nhũ hoá, chất tạo huyền phù, chất phân huỷ, chất gắn kết, tá dược, chất ổn định, chất chelat hóa, chất pha loãng, chất gel hóa, chất bảo quản, chất làm trơn, chất hoạt động bề mặt, chất bổ trợ hoặc các chất mang thích hợp khác.

Chất bổ trợ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất bổ trợ dạng dầu (như dầu khoáng, dầu thực vật, dầu động vật, tá dược Freund toàn vẹn, tá dược Freund không toàn vẹn, v.v), chất bổ trợ dạng dung dịch (như nhôm hydroxit), chất bổ trợ nhũ hóa hai pha (như nước trong dầu trong nước (water in oil in water: w/o/w), chất bổ trợ nhũ tương), chất bổ trợ sinh học (như CpG oligodeoxynucleotit và toxoit), v.v.. Chất bổ trợ nhũ hóa hai pha bao gồm chất hoạt động bề mặt và chất dạng dầu. Chất hoạt động bề mặt là một hoặc nhiều hơn một chất được chọn từ nhóm bao gồm este của axit béo và sorbitol; sản phẩm cô đặc của este của axit béo và sorbitol và etylen oxit (hoặc propylen oxit) đậm đặc; este của axit béo và manitol; sản phẩm cô đặc của este của axit béo và manitol và etylen oxit (hoặc propylen oxit); este của axit béo và manitol được cải biến bằng nhóm ưa nước là một hoặc nhiều hơn một nhóm được chọn từ nhóm bao gồm axit carboxylic, amin, amit, rượu, polyol, ete và oxit; este axit béo và anhydromanitol; este của axit béo và anhydromanitol được cải biến bằng nhóm ưa nước là một hoặc nhiều hơn một nhóm được chọn từ axit carboxylic, amin, amit, rượu, polyol, ete và oxit; este của axit béo và sacaroza; sản phẩm cô đặc của este của axit béo và sacaroza và etylen oxit (hoặc propylen oxit); este của axit béo và glycerol; sản phẩm cô đặc của este của axit béo và glycerol và etylen oxit (hoặc propylen oxit); sản phẩm cô đặc của axit béo và etylen oxit (hoặc propylen oxit); sản phẩm cô đặc của rượu béo và etylen oxit (hoặc propylen oxit); và glyxerophospholipit. Chất dạng dầu là một hoặc nhiều hơn một chất được chọn từ nhóm bao gồm dầu khoáng, dầu thực vật và dầu động vật.

Chế phẩm gây miễn dịch theo sáng chế còn chứa ít nhất một kháng nguyên gây bệnh. Kháng nguyên gây bệnh này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng nguyên của virus cúm lợn (swine influenza virus: SIV), kháng nguyên của virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus: PRRSV), kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma, kháng nguyên parvovirus ở lợn (porcine parvovirus: PPV), kháng nguyên của bệnh viêm quầng và kháng nguyên của

virut bệnh đại giả (bệnh Aujeszky). Các dạng kháng nguyên gây bệnh bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, protein tái tổ hợp, protein có cấu trúc dưới phân tử, các tác nhân gây bệnh có khuyết tật gen, kháng nguyên gây bệnh bất hoạt, v.v..

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp bảo vệ lợn khỏi bị nhiễm PCV2, bao gồm bước cho lợn sử dụng liều có hiệu quả gây miễn dịch của chế phẩm gây miễn dịch chứa PCV2 nêu trên để tăng cường tính miễn dịch kháng lại PCV2, làm giảm mức độ nặng của các triệu chứng lâm sàng và virut huyết và làm tăng tỷ lệ sống và trọng lượng cơ thể.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất kháng thể kháng PCV2 thu được từ chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2). Kháng thể này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng và kháng thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền. Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể là kháng thể đa dòng thu được bằng cách tiêm chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2) vào động vật. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể là kháng thể đơn dòng thu được bằng cách sàng lọc thư viện thể lai của kháng thể đơn dòng.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề xuất mảnh ADN của chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2). Mảnh ADN này có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID No: 1, 2, 4, và 6. Các ứng dụng của mảnh ADN này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, sản xuất vacxin ADN và vacxin có cấu trúc dưới phân tử và thiết kế đoạn môi hoặc đoạn dò để phát hiện virut PCV2 trong mẫu. Theo một phương án được ưu tiên, mảnh ADN là trình tự hệ gen có chiều dài đầy đủ (SEQ ID No: 1) của chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2). Theo phương án được ưu tiên khác, mảnh ADN là khung đọc mở (ORF) của chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2) bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở:

khung đọc mở 1 (open reading frame 1: ORF1) có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID No: 2, mã hoá trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 3,

khung đọc mở 2 (open reading frame 2: ORF2) có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID No: 4, mã hoá trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 5, và

khung đọc mở 3 (open reading frame 3: ORF3) có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID No: 6, mã hoá trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 7.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất kit xét nghiệm PCV2. Kit này được dùng để phát hiện virus PCV2 hoặc kháng thể kháng PCV2 trong mẫu thử nghiệm. Kit xét nghiệm này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, (1) kháng nguyên của chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2), theo một phương án được ưu tiên, kháng nguyên này được lắng phủ trên đĩa kháng nguyên và được làm bất hoạt bằng chất phản ứng làm bất hoạt; (2) kháng thể đơn dòng hoặc đa dòng thu được từ chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2); (3) kháng nguyên hoặc kháng thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền thu được từ trình tự hệ gen có chiều dài đầy đủ (SEQ ID No: 1) hoặc mảnh nucleotit (SEQ ID No: 2, 4 và 6) của chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2); và (4) polynucleotit thu được từ trình tự hệ gen có chiều dài đầy đủ (SEQ ID No: 1) hoặc mảnh nucleotit (SEQ ID No: 2, 4 và 6) của chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2). Polynucleotit này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đoạn mồi và đoạn dò. Theo một phương án được ưu tiên, polynucleotit này là các đoạn mồi có thể được dùng để phát hiện chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2) và các đoạn mồi này có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID No: 8-11.

Các dạng kit xét nghiệm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, kit dùng cho thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA), kit vi chip, kit dùng cho thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (immunofluorescent assay: IFA), kit dùng cho phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction: PCR) và các kit khác thu được từ chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2). Theo một phương án được ưu tiên, kit xét nghiệm bao gồm ít nhất một đĩa kháng nguyên chứa chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2) và kit này có thể được dùng để phát hiện kháng thể kháng PCV2 trong mẫu thử nghiệm.

Chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2) theo sáng chế bao gồm tất cả các chủng cây chuyển và thể đột biến có đặc tính virus, hệ gen hoặc tính gây bệnh giống với chủng PCV2 mới (chủng H của PCV2).

Thuật ngữ “ADN (axit nucleic)”, “polynucleotit”, “axit amin”, “peptit”, “polypeptit” được dùng trong sáng chế này có thể tồn tại ở dạng tự nhiên, được phân lập, tái tổ hợp hoặc tổng hợp.

Các thuật ngữ “phòng ngừa”, “bảo vệ” và “kháng” liên quan đến kết quả quan sát được khi so sánh với các động vật không được tiêm vacxin bằng chế phẩm gây miễn dịch được bộc lộ trong bản mô tả này, động vật được tiêm vacxin bằng chế phẩm gây miễn dịch được bộc lộ ở đây có thể có khả năng kháng nhiễm PCV2 và các bệnh liên quan do nhiễm PCV2 gây ra được tăng lên.

Ý nghĩa của các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được mô tả ở đây có thể được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này hiểu một cách rõ ràng.

Sáng chế này được mô tả chi tiết hơn trong các ví dụ minh họa. Mặc dù các ví dụ có thể chỉ thể hiện một phương án được chọn theo sáng chế, cần hiểu rằng các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa và không làm giới hạn phạm vi sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 – Phân lập và nhận biết virus PCV2

1. Nguồn gốc và phân lập virus giống

Lấy các mẫu mô từ phổi và hạch bạch huyết của lợn con ở trang trại lợn tại Hsin-chu, Đài Loan. Các con lợn này được 8 tuần tuổi và có các triệu chứng lâm sàng của hội chứng còi cọc sau cai sữa (PMWS). Các mẫu phổi và hạch bạch huyết được lấy và đông lạnh ở nhiệt độ -70°C.

Để phân lập virus, các mẫu mô được làm đồng nhất và mỗi 0,2ml thể đồng nhất này được cấy vào các tế bào đơn lớp PK – 15 hoặc các dòng tế bào thu được từ nó mà không mang circovirus ở lợn (PCV), virus gây sốt ở lợn cổ điển (classical swine fever virus: CSFV), adenovirus ở lợn, parvovirus ở lợn, virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV), virus bệnh dại giả (pseudorabies virus: PRV), virus gây bệnh mụn nước ở lợn (swine vesicular disease virus: SVDV), vi khuẩn mycoplasma và vi khuẩn. Sau khi ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C, CO₂ 5%, các tế bào được rửa ba lần bằng dung dịch nước muối đệm phosphat (phosphate buffered saline: PBS) vô khuẩn. Tiếp theo, các tế bào được ủ với môi trường MEM chứa 2% FBS trong 4 giờ ở nhiệt độ 37°C, CO₂ 5%. Sau đó, môi trường MEM được loại bỏ và các tế bào được ủ với 300mM D-glucosamin trong 30 phút. Tiếp theo, các tế bào được rửa ba lần bằng PBS vô khuẩn

và được ủ với môi trường MEM chứa 8% FBS trong 72 giờ ở nhiệt độ 37°C, CO₂ 5%. Cuối cùng, các môi trường nuôi cấy tế bào được xét nghiệm PCV2 bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (immunofluorescence assay: IFA).

Quy trình thử nghiệm IFA được mô tả như sau. Trước tiên, các tế bào mẫu được rửa ba lần bằng PBS vô khuẩn, mỗi lần 5 phút và được cố định bằng 75µl axeton 80% trong 30 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, axeton được loại bỏ và các tế bào được rửa ba lần bằng PBS vô khuẩn, mỗi lần 5 phút. Tiếp đó, các tế bào được ủ với 75µl kháng huyết thanh đa dòng kháng virus circovirus ở lợn (VMRD®) (kháng thể sơ cấp, pha loãng theo tỷ lệ 1:1500 trong PBS) trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, kháng huyết thanh được loại bỏ và các tế bào được rửa ba lần bằng PBS vô khuẩn, mỗi lần 5 phút. Tiếp đó, các tế bào được ủ với 75µl IgG-FITC của thỏ kháng lợn (phân tử toàn phần) (Sigma, F1638) (kháng thể thứ cấp, pha loãng theo tỷ lệ 1:1000 trong PBS) trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, kháng thể được loại bỏ và các tế bào được rửa ba lần bằng PBS vô khuẩn, mỗi lần 5 phút. Cuối cùng, mỗi mẫu tế bào trong đĩa nuôi cấy có 96 lỗ được cố định trong 200µl PBS để thử nghiệm hiển vi huỳnh quang.

Virus mà tế bào đã nhiễm và kết quả IFA dương tính nhất được chọn làm virus giống. Sau đó, trình tự hệ gen của virus giống này được xác định và thể hiện trong SEQ ID No: 1. Trình tự này được so sánh, phân tích và cuối cùng khẳng định là một chủng PCV2 mới (các phân tích và kết quả so sánh trình tự được mô tả dưới đây). Chủng PCV2 này được gọi là chủng H của PCV2.

2. Cấy chuyển virus giống

Tế bào PK-15 hoặc các dòng tế bào thu được từ nó được chuẩn bị mới được chủng virus PCV2 mới (chủng H của PCV2) và virus thu hoạch được từ các tế bào đã cấy là sản phẩm cấy chuyển lần thứ nhất (passage 1: P₁) của chủng H của PCV2. Dịch nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy tế bào, chứa P₁ của chủng H của PCV2, được thu gom, pha loãng (theo tỷ lệ 1:2) và cấy vào tế bào PK-15 hoặc các dòng tế bào thu được từ nó được chuẩn bị mới. Sau khi các tế bào đã cấy được ủ trong 3 ngày, dịch nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy tế bào, chứa sản phẩm cấy chuyển lần thứ 2 (passage 2: P₂) của chủng H của PCV2, được thu gom, pha loãng (theo tỷ lệ 1:2) và

cấy vào tế bào PK-15 hoặc các dòng tế bào thu được từ nó được chuẩn bị mới. Các tế bào đã cấy được ủ trong 3 ngày, dịch nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy tế bào, chứa sản phẩm cấy chuyển lần thứ 3 (passage 3: P₃) của chủng H của PCV2, được thu gom tiếp. Quy trình này được lặp lại nhiều hơn 3 lần để thu được sản phẩm cấy chuyển lần thứ 6 (passage 6: P₆) của chủng H của PCV2.

Trong quá trình nuôi cấy tế bào PK-15 hoặc các dòng tế bào thu được từ nó được cấy chủng H của PCV2, quan sát thấy có hiệu ứng gây bệnh tế bào (CPE) trong các tế bào đã cấy, như được thể hiện trên Fig.1B. Ngoài ra, Fig.1A thể hiện hình thái học và sự sinh trưởng của các tế bào PK-15 không được cấy sau 4 ngày nuôi cấy (độ phóng đại 100 lần), trong khi Fig.1B thể hiện hình thái học và sự sinh trưởng của tế bào PK-15 được cấy chủng H của PCV2 sau 4 ngày nuôi cấy (độ phóng đại 100 lần). Tương tự, quan sát được CPE ở các dòng tế bào thu được từ PK-15 được cấy chủng H của PCV2 có thể được thể hiện trên Fig.1B để tham khảo.

3. Nhận biết virus giống

Hệ gen của chủng H của PCV2 được phân lập theo sáng chế có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID No: 1. Trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID No: 1 được so sánh với các trình tự trong cơ sở dữ liệu của GenBank của Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia (NCBI). Các kết quả so sánh cho thấy rằng chủng H của PCV2 có độ tương đồng 99% với một số trình tự PCV2 (Bảng 1), nhưng không có trình tự nào trong cơ sở dữ liệu này giống hệt (độ tương đồng 100%) với trình tự hệ gen của chủng H của PCV2 (SEQ ID No: 1). Do đó, dựa vào các kết quả so sánh này, virus phân lập được theo sáng chế, chủng H của PCV2, đã được chứng minh là thuộc họ PCV2 và là một chủng mới. Dựa trên phép phân tích hệ phát sinh giống loài của trình tự hệ gen của chủng H của PCV2 được thể hiện trên Fig.2, chủng H của PCV2 đã được chứng minh là thành viên của nhóm phụ PCV2 2d.

Bảng 1 - Kết quả so sánh ADN hệ gen của chủng H của PCV2 và các trình tự trong cơ sở dữ liệu GenBank trên NCBI bằng cách sử dụng thuật toán NCBI BLAST

Số hiệu lưu giữ	Mô tả	Điểm số lớn nhất	Tổng điểm số	Độ tương đồng lớn nhất
-----------------	-------	------------------	--------------	------------------------

<u>HM038017.1</u>	Chủng BDH của circovirut typ 2 ở lợn	<u>3236</u>	3236	99%
<u>GU001710.1</u>	Thể phân lập BJ0901b của circovirut typ 2 ở lợn	<u>3236</u>	3236	99%
<u>EF675230.1</u>	Chủng GXHZ-1 của circovirut typ 2 ở lợn	<u>3236</u>	3236	99%
<u>GU083583.1</u>	Thể phân lập PCV2C53 của circovirut typ 2 ở lợn	<u>3230</u>	3230	99%
<u>GQ359002.1</u>	Chủng GX0839 của circovirut typ 2 ở lợn	<u>3230</u>	3230	99%
<u>FJ644929.1</u>	Thể phân lập GL08 của circovirut typ 2 ở lợn	<u>3230</u>	3230	99%
<u>FJ426398.1</u>	Chủng GXWZ-1 của circovirut typ 2 ở lợn	<u>3230</u>	3230	99%
<u>HM038030.1</u>	Chủng AH của circovirut typ 2 ở lợn	<u>3229</u>	3229	99%
<u>HM161710.1</u>	Thể phân lập BX-2 của circovirut typ 2 ở lợn	<u>3225</u>	3225	99%

Phân tích cho thấy rằng chủng H của PCV2 theo sáng chế có các khung đọc mở (ORF) 1, 2 và 3. Khung ORF1 có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID No: 2, mã hoá trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 3. Khung ORF2 có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID No: 4, mã hoá trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 5. Khung ORF3 có trình tự nucleotit nêu trong SEQ ID No: 6, mã hoá trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 7.

Do protein capsit được mã hoá bởi gen ORF2 của PCV2 có khả năng là kháng nguyên gây ra sự sản sinh kháng thể trung hoà lớn nhất, trình tự nucleotit (SEQ ID No: 4) và trình tự axit amin (SEQ ID No: 5) của khung ORF2 của chủng H của PCV2 được so sánh với trình tự trong cơ sở dữ liệu GenBank trên NCBI. Kết quả so sánh này cho thấy rằng không có trình tự nào trong cơ sở dữ liệu GenBank trên NCBI là giống hệt (độ tương đồng 100%) với trình tự nucleotit (SEQ ID No: 4) hoặc trình tự axit amin (SEQ ID No: 5) của khung ORF2 của chủng H của PCV2. Độ tương đồng cao nhất giữa trình tự axit amin của khung ORF2 của chủng H của PCV2 (SEQ ID No:

5) và trình tự trong cơ sở dữ liệu GenBank là 98%. Fig.3 thể hiện kết quả so sánh trình tự axit amin của khung ORF2 của chủng H của PCV2 (SEQ ID No: 5) và ba trình tự trên cùng có độ tương đồng cao nhất và sự so sánh này cho thấy rằng có 6 axit amin trong SEQ ID No: 5 là khác biệt với ba trình tự trên cùng. Trình tự axit amin của ORF2 của chủng H của PCV2 (SEQ ID No: 5) được so sánh tiếp với trình tự axit amin (Số hiệu lưu giữ GenBank: ADD25772) của ORF2 của nguyên mẫu nhóm phụ PCV2 2d (Số hiệu lưu giữ GenBank: ZJ0955b), và kết quả được thể hiện trên Fig.4 cho thấy rằng có 7 axit amin khác nhau giữa hai trình tự này và hai trình tự này có độ tương đồng là 97%.

Ngoài ra, trình tự nucleotit (SEQ ID No: 2 và 6) và trình tự axit amin (SEQ ID No: 3 và 7) của khung ORF1 và ORF3 của chủng H của PCV2 được so sánh với trình tự trong cơ sở dữ liệu của GenBank trên NCBI. Kết quả so sánh cho thấy rằng không có trình tự nào trong cơ sở dữ liệu GenBank trên NCBI là giống hệt (độ tương đồng 100%) với trình tự nucleotit hoặc trình tự axit amin của khung ORF1 và ORF3 của chủng H của PCV2.

Các phân tích này chỉ ra rằng chủng H của PCV2 theo sáng chế là chủng mới của circovirus typ 2 ở lợn (PCV2). Chủng PCV2 mới này đã được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Trung Quốc (CCTCC) vào ngày 5/11/2011 với số hiệu lưu giữ là V20117.

Ví dụ 2 – Bào chế vacxin chứa chủng H của PCV2

1. Nuôi cấy virus

Tế bào PK-15 không mang circovirus ở lợn (PCV), virus gây sốt ở lợn cổ điển (CSFV), adenovirus ở lợn, parvovirus ở lợn, virus gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (PRRSV), virus bệnh đại giả (PRV), virus gây bệnh mụn nước lợn (SVDV), vi khuẩn mycoplasma và vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường sinh trưởng nuôi cấy tế bào (môi trường MEM chứa FBS 5%, độ pH=7,2±0,2) ở nhiệt độ 37°C, CO₂ 5%. Sau khi một lớp tế bào PK-15 được tạo ra, các tế bào PK-15 được phân ly bằng trypsin 0,2%-EDTA và tạo huyền phù trong môi trường duy trì nuôi cấy tế bào (môi trường MEM chứa FBS 2%, độ pH=7,4±0.2) để đếm tế bào. Sau đó, các

tế bào được pha loãng bằng môi trường sinh trưởng nuôi cấy tế bào tới nồng độ cuối là $3,0 \times 10^5$ tế bào/ml và được chia vào các chai lặn để nuôi cấy trong thời gian từ 3 đến 4 ngày ở nhiệt độ 37°C để tạo thành lớp đơn nhập dòng. Sau đó, môi trường nuôi cấy tế bào trong chai lặn được loại bỏ và các tế bào được rửa bằng PBS. Nguyên liệu gốc chứa virus của chủng H của PCV2 được pha loãng bằng môi trường duy trì nuôi cấy tế bào tới nồng độ cuối là $10^{4,0}$ TCID₅₀/ml và được cấy vào đơn lớp tế bào PK-15 trong chai lặn. Để nuôi cấy virus, tế bào gây nhiễm được ủ trong thời gian từ 48 đến 96 giờ ở nhiệt độ 37°C . Chuẩn độ virus của chủng H của PCV2 được theo dõi bằng thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (IFA). Tiếp theo, để thu gom dung dịch virus chứa chủng H của PCV2, dịch nổi bề mặt của môi trường nuôi cấy tế bào được thu hoạch khi chuẩn độ virus đạt tới mức $10^{6,0}$ TCID₅₀/ml hoặc cao hơn, hoặc khi hiệu ứng gây bệnh tế bào (CPE) đạt tới 70 đến 80%.

2. Quy trình bất hoạt

Bổ sung ba mươi bảy phần trăm (37% theo trọng lượng) formaldehyt vào dung dịch virus chứa chủng H của PCV2 thu được từ các bước nêu trên để nồng độ cuối là 0,2% (trọng lượng/thể tích) và sau đó virus được làm bất hoạt bằng cách lắc liên tục với formaldehyt trong ít nhất 24 giờ, tốt hơn là trong 48 giờ ở nhiệt độ 37°C . Sau khi virus đã được làm bất hoạt hoàn toàn, dung dịch virus chứa chủng H của PCV2 chứa formaldehyt được ly tâm để loại bỏ formaldehyt. Sau đó, dung dịch virus đã ly tâm được tạo huyền phù trong dung dịch đệm, như nước cất hoặc nước muối đệm phosphat (PBS) và dung dịch virus đã tạo huyền phù này là nguồn kháng nguyên bất hoạt cho vaccin bất hoạt chứa chủng H của PCV2 và được bảo quản ở nhiệt độ 4°C để sử dụng sau đó.

3. Bào chế vaccin bất hoạt chứa chủng PCV3 H

Chất phụ trợ nhũ hóa hai pha vô khuẩn, như chất phụ trợ vaccin dạng dầu MONTANIDE™ ISA 206 dùng cho nhũ tương nước trong dầu trong nước (W/O/W) được bổ sung vào nguồn kháng nguyên bất hoạt cho vaccin bất hoạt chứa chủng H của PCV2 để nồng độ cuối là 50% (theo thể tích) trong thùng nhũ hoá để trộn lẫn và nhũ hoá. Sản phẩm nhũ hoá là vaccin bất hoạt chứa chủng H của PCV2 trong chất phụ trợ

là dầu.

Các chất phụ trợ thích hợp khác cho vacxin bất hoạt chứa PCV2 theo sáng chế là đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này cũng có thể được sử dụng làm chất phụ trợ trong sáng chế này. Chất phụ trợ nhũ hóa hai pha (như chất phụ trợ nhũ tương nước trong dầu trong nước) được sử dụng trong ví dụ này có thể được thay thế bằng, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất phụ trợ dạng dầu (như dầu khoáng, dầu thực vật, dầu động vật, tá dược Freund toàn vẹn, tá dược Freund không toàn vẹn, v.v), chất bổ trợ dạng dung dịch (như nhôm hydroxit) hoặc chất bổ trợ sinh học (như CpG oligodeoxynucleotit và toxoit).

Ví dụ 3 - Sản xuất kit xét nghiệm PCV2 – 1

Kit xét nghiệm PCV2 trong ví dụ này là đĩa kháng nguyên chứa kháng nguyên virut chủng H của PCV2. Trước tiên, tế bào PK-15 hoặc dòng tế bào đơn dòng của nó được nuôi cấy, trypsin hoá và tái tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy tế bào để nồng độ cuối là 2×10^5 tế bào/ml. Năm mươi microlit (μ l) tế bào PK-15 và 50 μ l nguồn virut chủng H của PCV2 (1×10^3 TCID₅₀/ml) được bổ sung vào mỗi lỗ của đĩa nuôi cấy tế bào có 96 lỗ (đáy phẳng) và được ủ trong 72 giờ ở nhiệt độ 37°C, CO₂ 5%. Các tế bào được gây nhiễm bằng chủng H của PCV2 được rửa hai lần bằng PBS vô khuẩn và ngâm trong 80% axeton trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp theo, axeton được loại bỏ và các tế bào được rửa ba lần bằng PBS tiệt trùng. Sau đó, đĩa được úp ngược và để khô ở nhiệt độ 37°C trong thiết bị ủ. Đĩa đã khô là đĩa kháng nguyên chứa kháng nguyên virut của chủng H của PCV2 và có thể được sử dụng cho thử nghiệm ELISA để phát hiện lượng kháng thể kháng PCV2 trong mẫu huyết thanh. Sau đó, đĩa này được bảo quản ở nhiệt độ -20°C để sử dụng sau đó (Tischer *et al.*, 1995).

Ví dụ 4 - Sản xuất kit xét nghiệm PCV2 – 2

Kit xét nghiệm PCV2 trong ví dụ này là đĩa kháng nguyên chứa protein capsit tái tổ hợp của chủng H của PCV2. Protein capsit tái tổ hợp này là kháng nguyên của đĩa kháng nguyên. Protein capsit được mã hoá bởi gen ORF2 của chủng H của PCV2 và có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID No: 5.

Trước tiên, trình tự nucleotit ORF2 của chủng H của PCV2 được khuếch đại

bằng phản ứng chuỗi polymeraza (polymerase chain reaction: PCR). ADN virus của chủng H của PCV2 được dùng làm ADN khuôn trong phản ứng PCR. Đoạn xuôi và đoạn mỗi ngược được thiết kế để khuếch đại trình tự nucleotit ORF2. Đoạn xuôi trong ví dụ này có vị trí phân cắt bằng *Hind*III và đoạn mỗi ngược trong ví dụ này có vị trí phân cắt bằng *Xho* I. Các đoạn mỗi có thể được thiết kế theo trình tự nucleotit ORF2 (SEQ ID No: 4) theo sáng chế bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Đối với phản ứng PCR, hỗn hợp PCR chứa 8 μ l ADN khuôn, 5 μ l dung dịch đệm PCR 10x (MDBio, Inc.), 8 μ l dNTP (mỗi loại 1,25mM), 1 μ l mỗi đoạn mỗi (mỗi loại 50 μ M) và 0,5 μ l Pfu ADN polymeraza (MDBio, Inc.) trong tổng thể tích cuối là 50 μ l được cho vào thiết bị phản ứng GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). Phản ứng PCR được bắt đầu với bước đầu tiên là gia nhiệt sơ bộ hỗn hợp PCR ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút và quá trình khuếch đại ADN được thực hiện theo 25 chu kỳ với các thông số sau đây; làm biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 30 giây, liên kết ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây và kéo dài mạch ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây. Phản ứng PCR được kết thúc với bước kéo dài cuối cùng trong 5 phút ở nhiệt độ 72°C. Các sản phẩm PCR được tinh chế bằng kit PCR -M Clean Up (Viogene).

Sau khi tinh chế, các sản phẩm PCR được tạo cấu trúc vào vật truyền biểu hiện pET24a. Sản phẩm PCR đã tinh chế và vật truyền biểu hiện pET24a (Novagen) được phân cắt bằng hai enzym giới hạn (New England Biolabs), *Hind* III và *Xho* I, tương ứng trong 8 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau phản ứng cắt enzym giới hạn, sản phẩm PCR đã phân cắt và vật truyền biểu hiện pET24a được tinh chế bằng kit PCR -M Clean Up (Viogene) tương ứng. Sản phẩm PCR đã tinh chế được gắn vào vật truyền biểu hiện pET24a đã tinh chế và sản phẩm gắn này được biến nạp vào tế bào chủ (*E. coli*). Thể biến nạp được chọn lọc và dòng vô tính có trình tự đúng được nhận biết bằng cách giải trình tự ADN và được gọi là pET24a-ORF2.

Vi khuẩn mang pET24a-ORF2 được nuôi cấy trong 2ml môi trường canh thang LB trong thời gian từ 16 đến 18 giờ ở nhiệt độ 37°C và sau đó môi trường này được bổ sung vào môi trường canh thang LB mới chứa 25 μ g/ml kanamycin theo tỷ lệ 1:50 và được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, 200 vòng/phút. Khi mật độ quang ở bước sóng

600nm (OD600) của môi trường nuôi cấy đạt giá trị 0,6, bổ sung isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) vào môi trường này để nồng độ cuối là 1mM và môi trường được nuôi cấy trong 6 giờ nữa ở nhiệt độ 37°C, 200 vòng/phút. Một mililit môi trường nuôi cấy được ly tâm (10000xg) và sau đó được xác định xem protein tái tổ hợp là protein hòa tan hay thể vùi bằng quy trình tách chiết protein vi khuẩn B-PERTM (do Pierce Protein Research sản xuất). Bốn mươi microlit (μ l) chất phản ứng được bổ sung vào vi khuẩn đã ly tâm và lắc trên thiết bị lắc rung trong một phút. Sau đó, hỗn hợp được ly tâm ở tốc độ 10000xg. Protein lơ lửng trong dịch nổi bề mặt là protein hòa tan, trong khi protein trong phần phía dưới (dạng hạt) là thể vùi. Protein hòa tan được hoà tan trong dung dịch đệm mẫu 1x để phân tích SDS-PAGE trong khi thể vùi được trộn lẫn với dung dịch đệm mẫu 2x để phân tích SDS-PAGE. Cả hai mẫu đều được đun sôi trong 20 phút và sau đó được ly tâm. Protein trong dịch nổi bề mặt của cả hai mẫu được hòa tan với 15% SDS-PAGE để phân tích sự biểu hiện protein capsit tái tổ hợp của chủng H của PCV2. Sau khi phân tích, protein capsit tái tổ hợp của chủng H của PCV2 được dùng để làm đĩa kháng nguyên.

Protein capsit tái tổ hợp của chủng H của PCV2 được pha loãng bằng PBS (độ pH=9,6) để nồng độ cuối bằng 10 μ g/ml. Protein tái tổ hợp đã pha loãng được phủ lên đĩa nuôi cấy tế bào có 96 lỗ (đáy phẳng) (100 μ l/lỗ) ở nhiệt độ 37°C trong 2 giờ và sau đó ở nhiệt độ 4°C qua đêm. Sau đó, mỗi lỗ của đĩa được rửa ba lần bằng PBS trong thời gian từ 3 đến 5 phút và bổ sung 200 μ l dung dịch phong bế BSA 0,15% để phong bế protein tái tổ hợp trong 2 giờ ở nhiệt độ 37°C. Tiếp đó, mỗi lỗ của đĩa được rửa bằng PBS, đĩa được bảo quản ở nhiệt độ 4°C để sử dụng sau đó.

Ví dụ 5 - Tạo ra kháng thể kháng chủng H của PCV2

1. Kháng thể đa dòng kháng chủng H của PCV2

Chủng H của PCV2 bất hoạt có chuẩn độ virus đủ được trộn với chất phụ trợ thích hợp, như tá dược Freund toàn vẹn. Hỗn hợp này được cấy lần đầu vào động vật, như chuột, lợn, dê và thỏ; và việc gây miễn dịch lần hai có thể được thực hiện sau một khoảng thời gian thích hợp (như từ 2 đến 3 tuần), nếu cần. Sau một khoảng thời gian thích hợp nữa (như từ 2 đến 3 tuần), huyết thanh từ các động vật đã cấy chủng virus

được thu gom làm kháng thể đa dòng kháng chủng H của PCV2.

Kháng thể đa dòng kháng PCV2 H có thể được liên hợp với dấu hiệu tạo màu hoặc tạo huỳnh quang, nếu cần.

Động vật đã cấy chủng virus có thể được tiêm chủng tiếp để làm gia tăng chuẩn độ kháng thể sau khi gây miễn dịch lần một và lần hai, nếu cần.

Các động vật có thể được cấy chủng virus để tạo kháng thể đa dòng kháng chủng H của PCV2 bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chuột, thỏ, gia cầm (trứng), lợn, dê, gia súc và động vật thủy sinh.

2. Kháng thể đơn dòng kháng chủng H của PCV2

Chủng H của PCV2 bất hoạt có chuẩn độ virus đủ hoặc mạnh kháng nguyên đặc hiệu (như ORF2) của chủng H của PCV2 được cấy lần đầu vào động vật (như chuột). Virus đã làm bất hoạt hoặc mạnh kháng nguyên này có thể được trộn lẫn với chất phụ trợ thích hợp, như tá dược Freund toàn vẹn, nếu cần. Tương tự, việc gây miễn dịch lần thứ hai có thể được thực hiện sau một khoảng thời gian thích hợp (như từ 2 đến 3 tuần), nếu cần. Sau một khoảng thời gian thích hợp nữa (như từ 2 đến 3 tuần), lấy huyết thanh của các động vật đã cấy chủng virus để đánh giá xem liệu tế bào lá lách của các động vật này có thích hợp để sản xuất kháng thể đơn dòng kháng chủng H của PCV2 hay không. Sự dung hợp tế bào của các tế bào lá lách thích hợp được thu gom từ động vật đã cấy chủng virus và tế bào u tuỷ (như dòng tế bào FO và dòng tế bào NS) được thực hiện bằng cách sử dụng polyetylen glycol (PEG, như PEG1500). Các tế bào lai sản sinh ra kháng thể có độ đặc hiệu thích hợp được chọn lọc từ các tế bào đã dung hợp và tiếp theo được tách dòng phụ thành các tế bào lai thích hợp để tạo kháng thể đơn dòng kháng chủng H của PCV2.

Kháng thể đơn dòng kháng chủng H của PCV2 có thể được sử dụng trong kit xét nghiệm, liệu pháp điều trị bệnh, thức ăn hoặc thực phẩm bổ sung để làm gia tăng tính miễn dịch ở động vật.

Ví dụ 6 - Thử nghiệm hiệu quả của vacxin chứa PCV2 bất hoạt – 1

1. Quy trình tiêm vacxin và lấy mẫu

Chuột Balb/c từ năm đến sáu tuần tuổi không mang tác nhân gây bệnh đặc hiệu

(specific pathogen free: SPF) được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm, mỗi nhóm 15 con. Thử nghiệm ELISA cho thấy tất cả 60 con chuột đều âm tính với kháng thể kháng PCV2. Chuột trong 3 nhóm sử dụng vacxin (các nhóm từ 1 đến 3) được tiêm qua đường trong cơ với liều 0,2ml của ba mẫu vacxin khác nhau chứa chủng H của PCV2 bất hoạt, tương ứng. Hai tuần sau khi gây miễn dịch lần đầu (primary immunization: p.i), chuột trong 3 nhóm này được tiêm nhắc lại với liều tương tự của 3 loại vacxin khác nhau nêu trên. Chuột trong nhóm 4 không được tiêm vacxin và được dùng làm mẫu đối chứng âm. Tại thời điểm 2, 3, 4 và 5 tuần sau khi gây miễn dịch lần đầu (p.i), 5 con chuột từ mỗi nhóm được chọn ngẫu nhiên để lấy mẫu huyết thanh. Tất cả các mẫu huyết thanh đều được thử nghiệm bằng thử nghiệm ELISA.

2. Phát hiện kháng thể kháng PCV2 bằng thử nghiệm ELISA

Các đĩa kháng nguyên được tạo ra theo ví dụ 3 hoặc 4 có thể được dùng làm đĩa ELISA trong ví dụ này. Đĩa ELISA được rửa 3 lần bằng PBS 50 mmol/l (độ pH=7,2) chứa Tween-20 500 μ l/l (nghĩa là PBST) trong thời gian từ 3 đến 5 phút mỗi lần. Để phong bế đĩa ELISA, bổ sung 200 μ l dung dịch phong bế BSA 0,15% vào mỗi lỗ của đĩa ELISA và sau đó đĩa ELISA được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, đĩa ELISA được rửa bằng PBS. Các mẫu huyết thanh của chuột được pha loãng năm mươi lần (1:50) bằng PBS và sau đó được pha loãng theo bậc hai lần. Các mẫu huyết thanh đã pha loãng được bổ sung vào các lỗ của đĩa ELISA (100 μ l/lỗ) và đĩa này được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau khi ủ, đĩa được rửa bằng PBS. Tiếp theo, kháng thể thứ cấp (như kháng thể thứ cấp của thỏ kháng chuột) liên hợp với peroxidaza của cây củ cải cay (horseradish peroxidase: HRP) được bổ sung vào các lỗ. Sau khi ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C, đĩa được rửa bằng PBS. Để hiển thị kết quả, bổ sung 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) vào các lỗ. Sau khi ủ, làm ngừng phản ứng bằng cách bổ sung H₂SO₄ 2mM. Kết quả được ghi lại dưới dạng tỷ lệ dương tính so với âm tính (positive to negative: P/N). Tỷ lệ P/N được tính toán bằng cách chia mật độ quang tại 450nm (OD₄₅₀) của mẫu thử nghiệm cho OD₄₅₀ của mẫu đối chứng âm chuẩn. Tỷ lệ P/N $\geq 2,1$ được cho là dương tính. Mẫu có độ pha loãng lớn nhất có tỷ lệ P/N $\geq 2,1$ được cho là chuẩn độ kháng thể theo ELISA của mẫu huyết thanh.

Ngoài HRP và TMB, các dấu hiệu tạo màu hoặc huỳnh quang khác có cùng chức năng, như phosphatasa kiềm (alkaline phosphatase: AP), 4-metylumbelliferyl phosphat (4-methylumbelliferyl phosphate: 4-MUP), và isothioxyanat floresxein (fluorescein isothiocyanate: FITC), cũng có thể được sử dụng trong ví dụ này.

3. Kết quả

Hai tuần sau khi gây miễn dịch lần đầu (p.i), các kháng thể kháng chủng H của PCV2 được phát hiện trong tất cả các chuột đã tiêm vaccin. Sau khi gây miễn dịch lần thứ hai, chuẩn độ kháng thể theo ELISA của chuột đã tiêm vaccin đạt mức từ 1800 đến 2000 ở ngày thứ 35 sau khi gây miễn dịch lần đầu (day after the primary immunization: d.p.i) (Fig.5). Vì vậy, các kết quả này cho thấy rằng vaccin chứa chủng H của PCV2 bất hoạt theo sáng chế có thể gây đáp ứng miễn dịch hiệu quả ở chuột.

Ví dụ 7 - Thử hiệu quả của vaccin chứa PCV2 bất hoạt – 2

1. Quy trình tiêm vaccin và lấy mẫu

Hai lợn con từ 5 đến 6 tuần tuổi khỏe mạnh được tiêm qua đường trong cơ bằng 1ml vaccin chứa chủng H của PCV2 bất hoạt tương ứng. Ba tuần sau khi gây miễn dịch lần đầu (p.i), lợn được tiêm nhắc lại với liều tương tự của vaccin này. Mẫu huyết thanh được lấy từ cả hai con lợn trước khi gây miễn dịch lần đầu (từ 5 đến 6 tuần tuổi), trước khi gây miễn dịch lần hai (từ 8 đến 9 tuần tuổi) và hai tuần sau khi gây miễn dịch lần hai (từ 10 đến 11 tuần tuổi). Cả hai con lợn được cân trọng lượng tại cùng thời điểm lấy huyết thanh. Tất cả các mẫu huyết thanh được xét nghiệm bằng thử nghiệm ELISA.

2. Phát hiện kháng thể kháng PCV2 bằng thử nghiệm ELISA

Đĩa kháng nguyên được tạo ra theo ví dụ 3 hoặc 4 có thể được dùng làm đĩa ELISA trong ví dụ này. Đĩa ELISA được rửa 3 lần bằng PBS 50 mmol/l (độ pH=7,2) chứa Tween-20 500µl/l (nghĩa là PBST) trong thời gian từ 3 đến 5 phút mỗi lần. Để phong bế đĩa ELISA, bổ sung 200µl dung dịch phong bế BSA 0,15% vào mỗi lỗ của đĩa ELISA và sau đó đĩa ELISA được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, đĩa ELISA được rửa bằng PBS. Các mẫu huyết thanh của lợn được pha loãng năm mươi lần (1:50) bằng PBS và sau đó được pha loãng theo bậc hai lần. Mẫu huyết thanh đã

pha loãng được bổ sung vào các lỗ của đĩa ELISA (100µl/lỗ) và đĩa này được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Sau khi ủ, đĩa được rửa bằng PBS. Tiếp theo, kháng thể thứ cấp (như kháng thể thứ cấp của dê kháng lợn) liên hợp với peroxidaza của cây củ cải cay (HRP) được bổ sung vào các lỗ. Sau khi ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C, đĩa được rửa bằng PBS. Để hiển thị kết quả, bổ sung 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) vào các lỗ. Sau khi ủ, làm ngừng phản ứng bằng cách cho thêm H₂SO₄ 2mM. Kết quả được ghi lại theo dạng tỷ lệ dương tính so với âm tính (P/N). Tỷ lệ P/N được tính toán bằng cách chia mật độ quang ở 450nm (OD₄₅₀) của mẫu thử nghiệm cho OD₄₅₀ của mẫu đối chứng âm chuẩn. Tỷ lệ P/N $\geq 2,1$ được cho là dương tính. Mẫu có độ pha loãng lớn nhất có tỷ lệ P/N $\geq 2,1$ được cho là chuẩn độ kháng thể theo thử nghiệm ELISA của các mẫu huyết thanh.

3. Kết quả

Ba tuần sau khi gây miễn dịch lần đầu (p.i), kháng thể kháng chủng H của PCV2 được phát hiện ở cả hai con lợn con đã tiêm vaccin. Hai tuần sau khi gây miễn dịch lần thứ hai, chuẩn độ kháng thể theo thử nghiệm ELISA của lợn đã tiêm vaccin là cao hơn 11000 (Bảng 2). Vì vậy, kết quả này cho thấy rằng vaccin chứa chủng H của PCV2 bất hoạt theo sáng chế có thể gây đáp ứng miễn dịch hiệu quả ở lợn.

Bảng 2 – Chuẩn độ kháng thể theo thử nghiệm ELISA ở lợn con được tiêm vaccin

Thời điểm lấy mẫu	Trước khi gây miễn dịch lần đầu (từ 5 đến 6 tuần tuổi)	Trước khi gây miễn dịch lần thứ hai (từ 8 tới 9 tuần tuổi)	Hai tuần sau khi gây miễn dịch lần đầu (từ 10 đến 11 tuần tuổi)
Lợn con 1	1	8490	11728
Lợn con 2	1	10263	13065

Ví dụ 8 - Thử hiệu quả của vaccin chứa PCV2 bất hoạt – 3

1. Quy trình tiêm vaccin và lấy mẫu

Bốn mươi lợn con hai tuần tuổi khỏe mạnh được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm, mỗi nhóm 10 con. Tại thời điểm 3 tuần tuổi, lợn thuộc 3 nhóm sử dụng vaccin (các nhóm từ 1 đến 3) được tiêm qua đường trong cơ với liều 1ml của ba mẫu vaccin chứa

chủng H của PCV2 bất hoạt khác nhau tương ứng. Ba tuần sau khi gây miễn dịch lần đầu (p.i), lợn thuộc 3 nhóm này được tiêm nhắc lại với liều tương tự của vacxin nêu trên. Lợn thuộc nhóm 4 không được tiêm vacxin và được dùng làm mẫu đối chứng âm. Mẫu huyết thanh được lấy từ tất cả lợn con một tuần trước khi gây miễn dịch lần đầu (2 tuần tuổi) và ở tuần thứ 1, 2, 3 và 5 sau khi gây miễn dịch lần đầu (4, 5, 6 và 8 tuần tuổi, tương ứng). Tất cả lợn đều được cân trọng lượng tại thời điểm 3, 4, 5, 6 và 8 tuần tuổi. Tất cả các mẫu huyết thanh đều được xét nghiệm bằng thử nghiệm ELISA.

Bảng 3 - Lịch tiêm vacxin và lấy mẫu

Tuổi (tuần)	2	3	4	5	6	8
Tiêm vacxin	-	Tiêm vacxin lần đầu	-	-	Tiêm vacxin lần hai	-
Thử nghiệm 1	Lấy mẫu máu, IFA	-	Lấy mẫu máu, IFA	Lấy mẫu máu, IFA	Lấy mẫu máu, IFA	Lấy mẫu máu, IFA
Thử nghiệm 2	-	Cân	Cân	Cân	Cân	Cân

2. Phát hiện kháng thể kháng PCV2 bằng thử nghiệm IFA

Đĩa kháng nguyên được tạo ra theo ví dụ 3 được sử dụng trong ví dụ này. Đĩa kháng nguyên được lấy ra ở nhiệt độ -20°C để rã đông và làm khô ở nhiệt độ 37°C . Các mẫu huyết thanh của lợn được pha loãng 50 lần (1:50) bằng PBS và sau đó pha loãng theo bậc hai lần. Các mẫu huyết thanh đã pha loãng được cho vào các lỗ của đĩa kháng nguyên ($50\mu\text{l}/\text{lỗ}$) và đĩa được ủ trong 30 phút ở nhiệt độ 37°C . Sau khi ủ, đĩa được rửa ba lần bằng PBS để loại bỏ kháng nguyên không liên kết. Bổ sung năm mươi microlít ($50\mu\text{l}$) IgG của thỏ kháng lợn liên hợp với FITC (1:100, Sigma) vào các lỗ. Sau khi ủ trong môi trường tối trong 30 phút, đĩa được rửa ba lần bằng PBS và kiểm tra bằng kính hiển vi huỳnh quang để tính chuẩn độ kháng thể kháng chủng H của PCV2 (Rodriguez-Arrioja *et al.*, 2000).

3. Kết quả

3.1 Chuẩn độ kháng thể

Tại thời điểm 2 tuần sau khi gây miễn dịch lần đầu (p.i), các mẫu huyết thanh

từ lợn đã tiêm vaccin (tại thời điểm 5 tuần tuổi) có chuẩn độ theo IFA khoảng 600, trong khi các mẫu huyết thanh từ nhóm đối chứng có chuẩn độ theo IFA khoảng 200 (Bảng 4 và Fig.6). Sau khi gây miễn dịch lần thứ hai, chuẩn độ theo IFA trong lợn đã tiêm vaccin (tại thời điểm 6 tuần tuổi) tăng lên đáng kể (chuẩn độ theo IFA cao hơn 13000). Tại thời điểm 8 tuần tuổi, lợn đã tiêm vaccin có chuẩn độ theo IFA cao hơn 46000, trong khi lợn không được tiêm vaccin chỉ có chuẩn độ theo IFA rất thấp, khoảng 170.

Bảng 4 – Chuẩn độ của kháng thể kháng chủng H của PCV2 ở lợn con được tiêm vaccin xác định theo IFA

Tuổi (tuần)	2	4	5	6	8
Nhóm 1	800	200	600	13440	48640
Nhóm 2	1680	230	620	20800	46720
Nhóm 3	1100	220	650	18660	49760
Nhóm 4 (đối chứng)	1880	210	190	300	170

3.2 Sự tăng trọng lượng

Lợn con được tiêm vaccin có mức tăng trọng lượng cao hơn so với lợn con không được tiêm vaccin thuộc nhóm đối chứng (Bảng 5 và Fig.7). Tại thời điểm 8 tuần tuổi, lợn được tiêm vaccin nặng hơn lợn không được tiêm vaccin khoảng 2kg.

Bảng 5 - Trọng lượng của lợn con được tiêm vaccin (kg)

Tuổi (tuần)	3	4	5	6	8
Nhóm 1	8,4461	9,9512	12,4207	16,1756	20,5284
Nhóm 2	7,3781	9,064	11,7594	15,2267	20,3755
Nhóm 3	7,9564	9,5413	12,3461	15,8561	20,4345
Nhóm 4 (đối chứng)	7,5906	8,9899	11,724	12,9102	18,6059

Do đó, các kết quả cho thấy rằng vaccin chứa chủng H của PCV2 bất hoạt theo sáng chế có thể gây đáp ứng miễn dịch ở lợn, tăng cường tính miễn dịch ở lợn và làm tăng trọng lượng ở lợn một cách hiệu quả.

Ví dụ 9 - Thử nghiệm hiệu quả của vacxin chứa PCV2 bất hoạt – 4

1. Quy trình tiêm vacxin và gây nhiễm bằng PCV2

Lợn con từ mười bốn đến mười sáu tuần tuổi được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm, mỗi nhóm 5 con. Tất cả 20 con lợn đều âm tính với kháng thể kháng PCV2. Lợn con thuộc 3 nhóm sử dụng vacxin (các nhóm từ 1 đến 3) được tiêm qua đường trong cơ với liều 1ml của ba mẫu vacxin chứa chủng H của PCV2 bất hoạt khác nhau tương ứng. Hai tuần sau khi gây miễn dịch lần đầu (p.i), các con lợn này được tiêm nhắc lại với liều tương tự của vacxin nêu trên. Lợn thuộc nhóm 4 không được tiêm vacxin và được dùng làm mẫu đối chứng âm. Tại thời điểm 5 tuần sau khi gây miễn dịch lần đầu, tất cả lợn được gây nhiễm bằng nguồn virus chứa chủng H của PCV2 (chủng có tính độc) với liều $10^{6,0}$ của liều có hiệu quả nuôi cấy mô 50% trong một ml ($10^{6,0}$ TCID₅₀/ml). Mỗi con lợn được gây nhiễm qua đường trong mũi với 1ml nguồn virus và qua đường trong cơ với 2ml nguồn virus. Các mẫu huyết thanh và gạc mũi được thu gom vào ngày thứ 7, 11, 19 và 25 sau khi gây nhiễm để phát hiện virus-huyết đối với PCV2 bằng phương pháp PCR.

2. Phát hiện virus huyết đối với PCV2 bằng phương pháp PCR

Nồng độ ADN virus trong mẫu huyết thanh lợn thu được sau khi gây nhiễm PCV2 được xác định bằng phương pháp PCR. ADN virus được tách bằng chất phản ứng DNAzol®. Trước tiên, 400µl chất phản ứng DNAzol® được bổ sung vào 200µl huyết thanh và hỗn hợp được ly tâm với tốc độ 12000 vòng/phút trong 15 phút. Dịch nổi bề mặt được trộn lẫn với thể tích gấp đôi của etanol tuyệt đối để làm kết tủa ADN. Sau khi hỗn hợp này được ly tâm với tốc độ 12000 vòng/phút trong 15 phút, dịch nổi bề mặt được loại bỏ. Viên vón ADN được rửa bằng etanol 75%, được ly tâm với tốc độ 12000 vòng/phút trong 15 phút để loại bỏ etanol và cuối cùng được hoà tan trong NaOH 8mM.

Các đoạn mồi PCR được sử dụng để phát hiện virus huyết đối với PCV2 có trình tự như sau:

PCV2-F1: 5' GTGAAGTGGTATTTTGGTGCC 3' (SEQ ID No: 8)

PCV2-R1: 5' GTCTTCCAATCACGCTTCTGC 3' (SEQ ID No: 9)

Các đoạn mồi PCV2-F1 (đoạn mồi xuôi) và PCV2-R1 (đoạn mồi ngược) được sử dụng để khuếch đại mảnh có chiều dài 284bp từ ORF1 của PCV2. Hỗn hợp PCR có thể tích cuối 25µl chứa 1µl đoạn mồi xuôi, 1µl đoạn mồi ngược, 1,5µl Mg^{2+} 25mM, 2,0µl dNTP 2,5mM, 2,5µl dung dịch đệm không chứa Mg^{2+} 10x, 0,2µl Taq ADN polymeraza, 11,8µl nước cất và 5µl ADN khuôn. Phản ứng PCR bắt đầu với bước khởi đầu là gia nhiệt sơ bộ hỗn hợp PCR ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút và bước khuếch đại ADN được thực hiện trong 38 chu kỳ với các thông số như sau: làm biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, liên kết ở nhiệt độ 55°C trong 30 giây và kéo dài mạch ở nhiệt độ 72°C trong 30 giây. Phản ứng PCR được hoàn tất với bước kéo dài cuối cùng trong 5 phút ở nhiệt độ 72°C và sau đó duy trì ở nhiệt độ 4°C. Tiếp theo, sản phẩm PCR được phân tích trên gel agarosa 1% và hiển thị kết quả bằng cách nhuộm bằng ethidi bromua.

Ngoài ra, cặp đoạn mồi PCR khác được sử dụng để phát hiện virus huyết đối với PCV2 có trình tự như sau:

PCV2-F2: 5' TGTTGGCGAGGAGGGTAATG '3 (SEQ ID No: 10)

PCV2-R2: 5' TGGGACAGCAGTTGAGGAGT '3 (SEQ ID No: 11)

Các đoạn mồi PCV2-F2 (đoạn mồi xuôi) và PCV2-R2 (đoạn mồi ngược) được sử dụng để khuếch đại mảnh có chiều dài 676bp từ PCV2.

3. Giải phẫu và phân tích bệnh học

Vào ngày thứ 25 sau khi gây nhiễm, lợn con bị giết và giải phẫu để quan sát các bất thường về bệnh học trong các cơ quan và thu gom hạch bạch huyết và phổi. Mẫu mô được cố định trong formaldehyt 4%, được gắn trong parafin và cắt lát. Các lát mô được nhuộm bằng hematoxylin và eosin (H&E) và quan sát bằng kính hiển vi.

4. Kết quả

4.1 Đánh giá virus huyết

Kết quả PCR cho thấy rằng ở ngày thứ 25 sau khi gây nhiễm, sự có mặt của virus huyết trong lợn con được tiêm vaccin (các nhóm từ 1 đến 3) là thấp hơn từ 40 đến 60% so với sự có mặt của virus huyết trong lợn con không được tiêm vaccin (nhóm 4) (Bảng 6). Kết quả này cho thấy rằng vaccin chứa chủng H của PCV2 bất

hoạt theo sáng chế có thể gây miễn dịch ở lợn, làm giảm mức độ nặng và thời gian tồn tại của virus-huyết trong lợn và bảo vệ lợn khỏi bị nhiễm PCV2.

Bảng 6 – Virus huyết trong huyết thanh của lợn được xác định bằng phương pháp PCR

Nhóm	Trước khi gây nhiễm	số ngày sau khi gây nhiễm			
		7	11	19	25
Nhóm 1	0/5 ^a	2/5	2/5	1/5	1/5
Nhóm 2	0/5	2/5	1/5	0/5	0/5
Nhóm 3	0/5	3/5	2/5	1/5	1/5
Nhóm 4 (đối chứng)	0/5	4/5	3/5	4/5	3/5

^a Mẫu số thể hiện số lượng lợn được thử nghiệm và tử số thể hiện số lượng lợn có virus huyết

4.2 Kiểm tra mô bệnh học

Lợn con bị giết và giải phẫu vào ngày thứ 25 sau khi gây nhiễm. Phát hiện thấy có sự tăng kích thước hạch bạch huyết bẹn, trung thất và màng treo ruột ở 2 con lợn không được tiêm vaccin và lát cắt hạch bạch huyết nhạt màu. Một lợn con không được tiêm vaccin khác có phổi đặc, không xẹp, phù phổi và thận có đốm trắng. Tất cả các lợn con được tiêm vaccin hoàn toàn không có sự bất thường bệnh học nào (Bảng 7 và 8)

Bảng 7 – Sự bất thường về bệnh học ở lợn được tiêm vaccin và không được tiêm vaccin

Nhóm	Tăng kích thước hạch bạch huyết	Sự bất thường về bệnh học			
		Phù phổi	Thận có đốm trắng	Lá lách tăng kích thước nhẹ	Bất thường khác ^b
Nhóm 1	0/5 ^a	0/5	0/5	0/5	0/5
Nhóm 2	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Nhóm 3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Nhóm 4 (đối chứng)	2/5	1/5	1/5	1/5	0/5

^a Mẫu số thể hiện số lượng lợn được giải phẫu và tử số thể hiện số lượng lợn có bất

thường giải phẫu học

^b Các bất thường khác bao gồm gan hoặc bàng quang tăng kính thước nhẹ và chương ruột

Bảng 8 thể hiện kết quả kiểm tra mô bệnh học hiển vi của lát cắt mô và kết quả đánh giá virus huyết đối với PCV2 bằng PCR. Quan sát thấy các tổn thương mô bệnh học ở hạch bạch huyết như sự cạn kiệt bạch cầu và sự thâm nhiễm đại thực bào ở gần như tất cả các con lợn không được tiêm vaccin (nhóm 4) và tất cả các mẫu hạch bạch huyết thu được từ lợn không được tiêm vaccin đều dương tính với virus huyết PCV2. Ngoài ra, quan sát được các tổn thương mô bệnh học ở phổi, như sự thâm nhiễm tế bào viêm ở 3 con lợn không được tiêm vaccin và 2 trong số các mẫu mô phổi được lấy mẫu từ các con lợn không được tiêm vaccin dương tính với virus huyết PCV2. So sánh với các con lợn không được tiêm vaccin, các con lợn được tiêm vaccin có mức độ tổn thương mô bệnh học và virus huyết PCV2 giảm đáng kể. Chỉ quan sát thấy có tổn thương mô bệnh học ở hạch bạch huyết của 1 con lợn được tiêm vaccin (lợn số A4) trong tổng số 15 con (nhóm 1 đến nhóm 3) và mẫu hạch bạch huyết được lấy mẫu từ lợn được tiêm chủng này (lợn số A4) là hạch bạch huyết duy nhất dương tính với virus huyết PCV3. Kết quả này cho thấy rằng vaccin chứa chủng H của PCV2 bất hoạt theo sáng chế có khả năng bảo vệ lợn khỏi bị nhiễm PCV2 và tỷ lệ bảo vệ đạt từ 80% đến 100%.

Bảng 8 - Kiểm tra mô bệnh học hiển vi các lát cắt mô và đánh giá virus huyết PCV2 bằng PCR sau khi gây nhiễm PCV2

Nhóm	Lộn số	Hạch bạch huyết					Phổi			Tỷ lệ mắc PWMS	Tỷ lệ bảo vệ (%)
		Biến đổi mô bệnh học tổng quát	Tiêu bạch cầu	Thâm nhiễm đại thực bào	PCR	Biến đổi mô bệnh học tổng quát	Thâm nhiễm tế bào viêm	PCR			
Nhóm 1	A1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	A2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	A3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	A4	-	+	+	+	-	-	-	-	+	
	A5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Tổng	1/5	1/5	0/5	1/5	0/5	0/5*	0/5*	0/5*	1/5	80
Nhóm 2	B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	B2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	B4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	B5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Tổng	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	100
Nhóm 3	C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	C3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	C4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	C5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Tổng	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	100
Nhóm 4 (đối chứng)	D1	+	+	+	+	-	+	-	+	+	
	D2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	D3	-	+	+	+	-	+	+	+	+	
	D4	-	+	+	+	-	-	-	-	+	
	D5	-	+	-	+	-	-	-	-	+	
	Tổng	2/5	5/5	4/5	5/5	1/5	3/5	2/5	5/5	5/5	

* Mẫu số là tổng số lợn được giải phẫu và tử số là tổng số lợn có bất thường mô bệnh học

Dựa vào tất cả các kết quả này, vaccin chứa chủng H của PCV2 bất hoạt theo sáng chế có thể gây miễn dịch hiệu quả ở lợn, bảo vệ lợn được tiêm vaccin không bị nhiễm PCV2, giảm mức độ nặng và thời gian tồn tại virus huyết ở lợn, giảm đến mức tối thiểu các triệu chứng lâm sàng và làm tăng trọng lượng cơ thể.

Tất nhiên là có thể tiến hành nhiều thay đổi và cải biến các phương án đã mô tả trên đây của sáng chế mà vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế này. Theo đó, để giúp tiến bộ khoa học và thông tin có ích, sáng chế được bộc lộ và chỉ bị giới hạn ở phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ đính kèm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng H của circovirut typ 2 ở lợn (porcine circovirus type 2: PCV2), trong đó trình tự hệ gen của chủng này là SEQ ID No: 1.
2. Chế phẩm gây miễn dịch chứa chủng H của circovirut typ 2 ở lợn theo điểm 1.
3. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 2, trong đó chế phẩm này còn chứa chất mang được dụng.
4. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 3, trong đó chất mang này là chất bổ trợ.
5. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 2, trong đó chủng H của virus PCV2 này được xử lý bằng quá trình bất hoạt.
6. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 2, trong đó chủng H của virus PCV2 này bị làm giảm độc tính; hoặc là cấu trúc dưới phân tử, ADN.
7. Chế phẩm gây miễn dịch theo điểm 2, trong đó chế phẩm này còn chứa ít nhất một kháng nguyên gây bệnh được chọn từ nhóm bao gồm kháng nguyên của virus cúm lợn (swine influenza virus: SIV), kháng nguyên gây hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus: PRRSV), kháng nguyên của vi khuẩn mycoplasma, kháng nguyên của parvovirut ở lợn (porcine parvovirus: PPV), kháng nguyên của bệnh viêm quầng và kháng nguyên của virus bệnh đại giả.
8. Kháng thể kháng chủng H của circovirut typ 2 ở lợn, trong đó kháng thể này có khả năng gắn kết với virus PCV2 chứa trình tự SEQ ID No: 4, và trong đó trình tự hệ gen của chủng H của virus PCV2 là SEQ ID No: 1.
9. Kháng thể kháng circovirut typ 2 ở lợn (PCV2) theo điểm 8, trong đó kháng thể này chứa ít nhất một kháng thể trong số kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng và kháng thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền.
10. Polynucleotit mã hóa polypeptit của chủng H của virus PCV2 theo điểm 1, trong đó

polynucleotit này có trình tự SEQ ID No: 5.

11. Polynucleotit theo điểm 10, trong đó polynucleotit này có trình tự SEQ ID No: 4.
12. Kit để phát hiện chủng H của circovirut typ 2 ở lợn, bao gồm dụng cụ phát hiện là một hoặc nhiều hơn một thành phần được chọn từ nhóm bao gồm kháng nguyên virut của chủng H của virut PCV2 theo điểm 1, kháng thể có khả năng gắn kết với chủng H của virut PCV2 theo điểm 1, trong đó trình tự hệ gen của chủng H của virut PCV2 là SEQ ID No: 1, polynucleotit có trình tự SEQ ID No: 4, và mảnh axit nucleic phát hiện trình tự của SEQ ID No: 1.
13. Kit theo điểm 12, trong đó kháng nguyên của virut được lắng phủ trên vi đĩa có 96 lỗ.
14. Kit theo điểm 13, trong đó kháng nguyên của virut được xử lý bằng quá trình bất hoạt.
15. Kit theo điểm 12, trong đó kháng thể chứa ít nhất một thành phần trong số kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng và kháng thể được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền.
16. Kit theo điểm 12, trong đó mảnh axit nucleic chứa ít nhất một trình tự trong số SEQ ID No: 8, SEQ ID No: 9, SEQ ID No: 10 và SEQ ID No: 11.

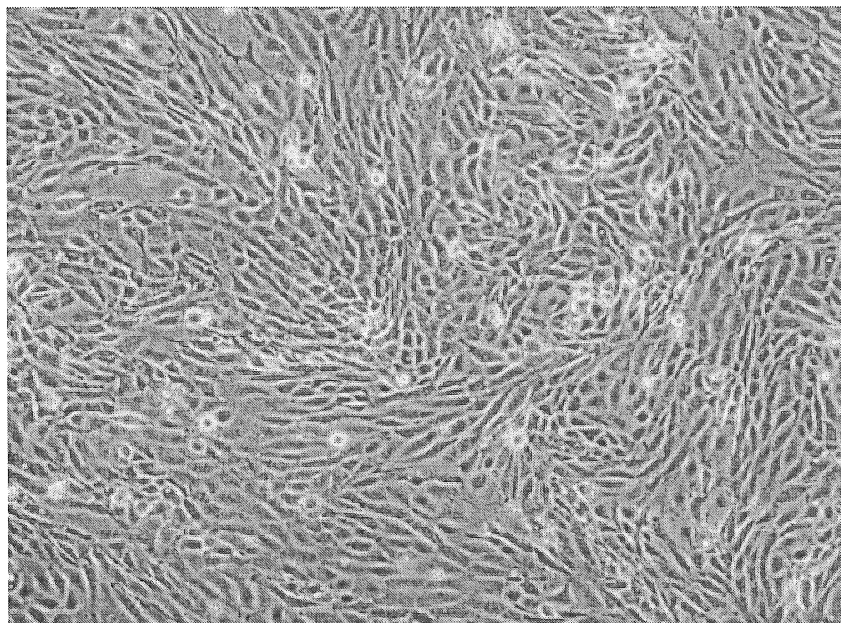


FIG.1A

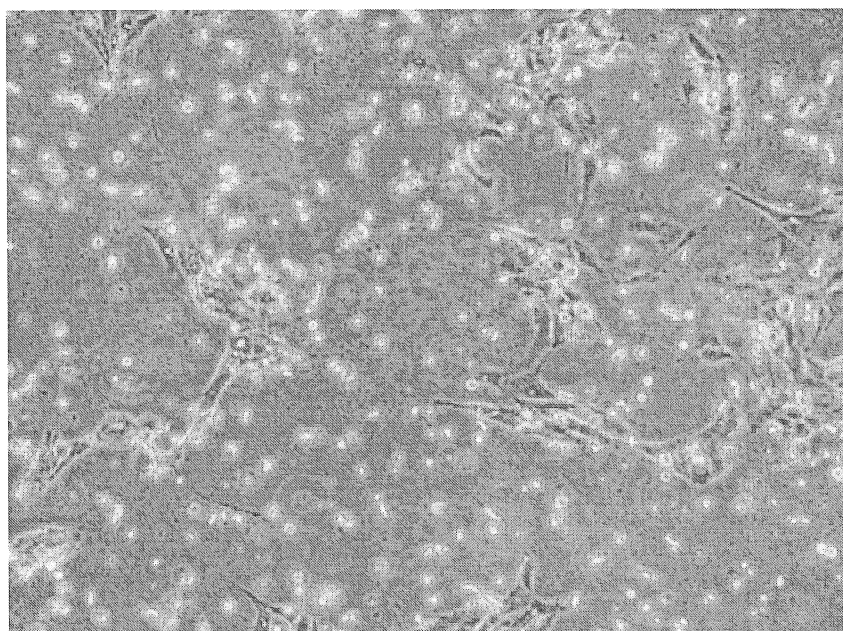


FIG.1B

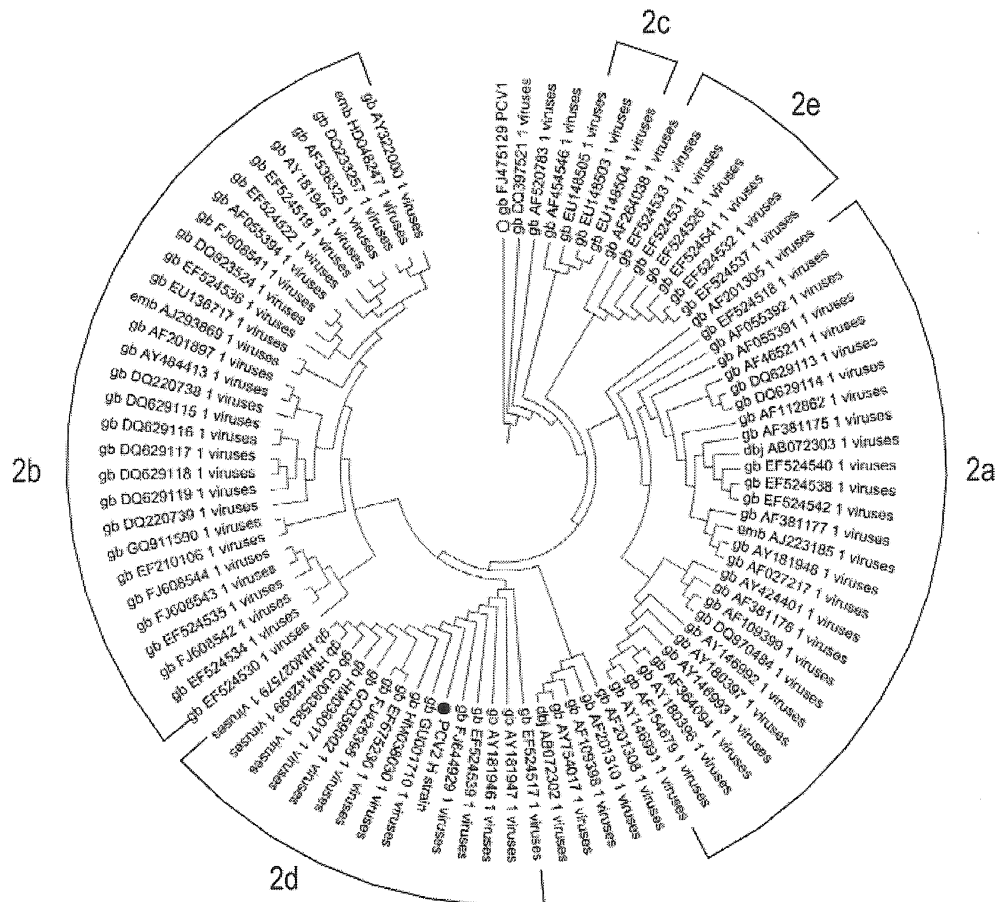


FIG. 2

Chung H_ORF2	MTYPRRRYRRRRHPRSHLGQILRRRPWLHVHPRHRYRWRKNGIFNTRLSRTIGYTVKKKT
ABV21950	MTYPRRRFRRRHPRSHLGQILRRRPWLHVHPRHRYRWRKNGIFNTRLSRTIGYTVKKKT
ADK34046	MTYPRRRFRRRHPRSHLGQILRRRPWLHVHPRHRYRWRKNGIFNTRLSRTIGYTVKKKT
ADD25772	MTYPRRRFRRRHPRSHLGQILRRRPWLHVHPRHRYRWRKNGIFNTRLSRTIGYTVKKKT
	*****:*****
Chung H_ORF2	TVRTPSWNVDMRFNINDFLPPGGSSPLTVPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVSS
ABV21950	TVRTPSWNVDMRFNINDFLPPGGGSNPLTVPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGS
ADK34046	TVRTPSWNVDMRFNINDFLPPGGGSNPLTVPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGS
ADD25772	TVRTPSWNVDMRFNINDFLPPGGGSNPLTMPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGS
	*****:*****
Chung H_ORF2	TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSHSRYFTPKPVLDRDRTIDYFQPNKKR
ABV21950	TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSHSRYFTPKPVLDRDRTIDYFQPN-KR
ADK34046	TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSHSRYFTPKPVLDRDRTIDYFQPNKKR
ADD25772	TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFYSHSRYFTPKPVLDRDRTIDYFQPNKKR
	*****:*****
Chung H_ORF2	NQLWLRQLTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMVVQFREFNKDPPLNPK
ABV21950	NQLWLRQLTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMVVQFREFNKDPPLNPK
ADK34046	NQLWLRQLTTGNIDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMVVQFREFNKDPPLNPK
ADD25772	NQLWLRQLTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMVVQFREFNKDPPLNPK
	*****:*****

FIG.3

Chung H_ORF2 ADD25772_2d	MTYPRRRYRRRRPRSHLGQILRRRPWLHPRHRYWRKNGIENTRLSRTIGYTVKKT MTYPRRRYRRRRPRSHLGQILRRRPWLHPRHRYWRKNGIENTRLSRTIGYTVKAT *****
Chung H_ORF2 ADD25772_2d	TVRTPSWNVDMRFNINDELPFGGSSPLTVPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVSS TVRTPSWAVDMRFNINDELPFGGGSNPLTVPFYYRIRKVKVEFWPCSPITQGDRGVGS *****
Chung H_ORF2 ADD25772_2d	TAVILDDNFVTKANALTYDPYVNYSSRHTITQPFSSYHSRYFTPKPVLDRDRTIDYFQPNKKR TAVILDDNFVTKATALTYDPYVNYSSRHTIPQPFSSYHSRYFTPKPVLDRDRTIDYFQPNKKR *****
Chung H_ORF2 ADD25772_2d	NQLWLRQLQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRITMYVQFREFNLKDPPPLNPK NQLWLRQLQTTGNVDHVGLGTAFENSIYDQDYNIRVTMYVQFREFNLKDPPPLNPK *****

FIG.4

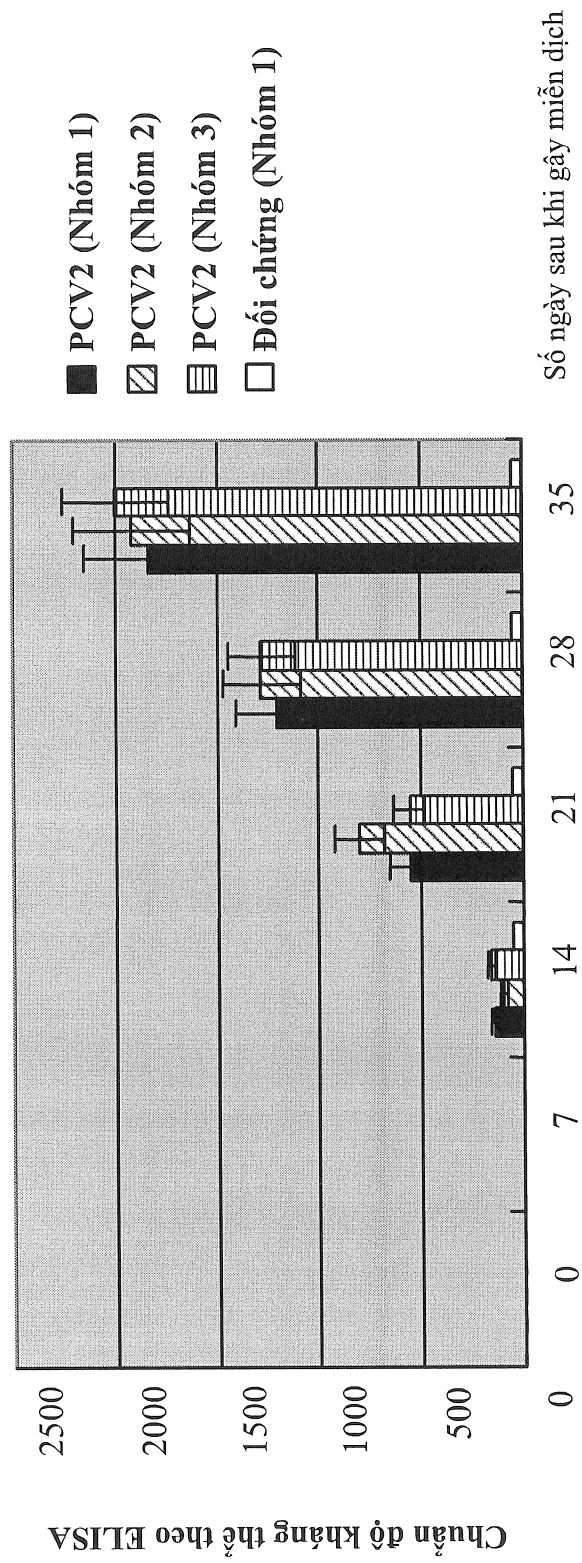


FIG.5

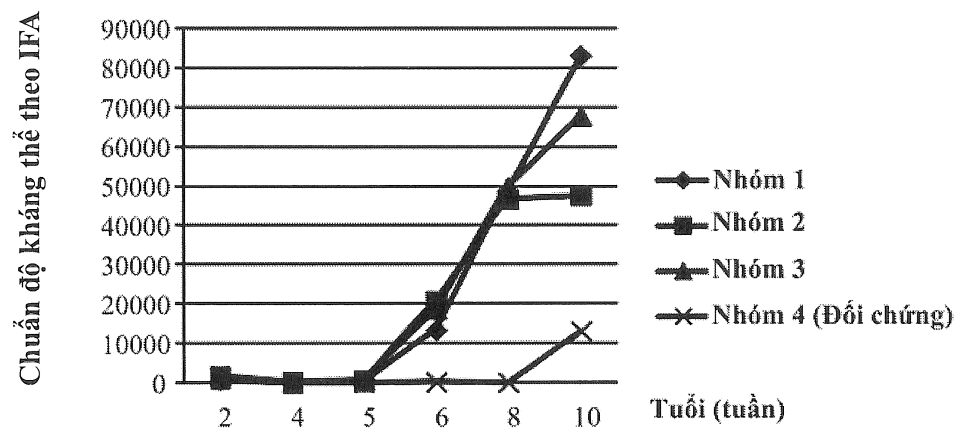


FIG.6

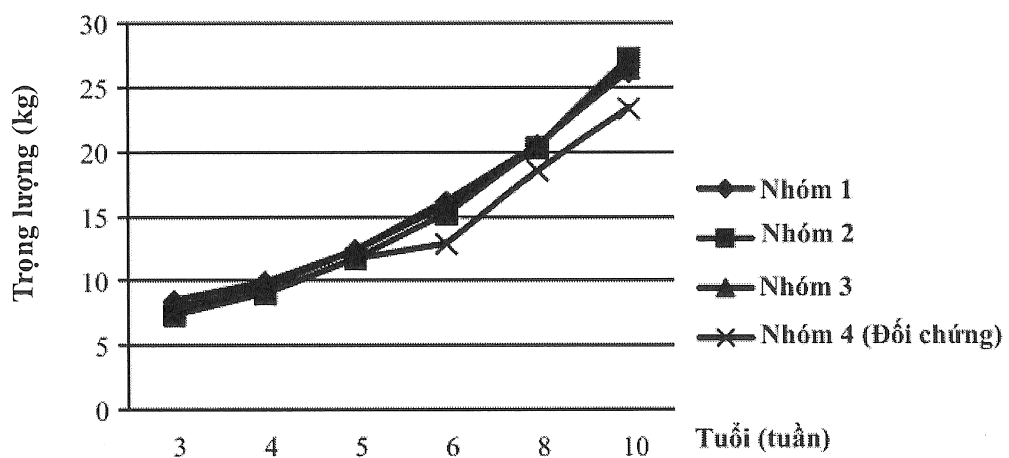


FIG.7

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> SBC Virbac Limited

<120> Chủng H của circovirut typ 2 ở lợn (PCV2), chế phẩm gây miễn dịch chứa chủng virut này, và kit xét nghiệm chủng virut này

<160> 11

<210> 1

<211> 1767

<212> ADN

<213> Chủng H của circovirut typ 2 ở lợn

<220>

<223> Trình tự hệ gen của chủng H của circovirut typ 2 ở lợn

<400> 1

```

accagcgcac  ttcggcagcg  gcagcacctc  ggcagcacct  cagcagcaac  atgcccagca  60
agaagagtgg  aagaagcgga  cccaaccac  ataaaaggtg  ggtgttcacg  ctgaataatc  120
cttcggaaga  cgagcgcaag  aaaatacggg  agctcccaat  ctccctatct  gattatctta  180
ttgttggcga  ggaaggtaat  gaggagggcc  gaacaccca  cctacagggg  ttcgctaatt  240
ttgtgaagaa  gcaaactttt  aataaagtga  agtgggtatt  tgggtgcccg  tgccacatcg  300
agaaagcgaa  aggaacagat  cagcagaata  aagaatattg  cagtaaagaa  ggcaacttac  360
tgatagaatg  tggagctcct  agatctcaag  gacaacggag  tgacctctct  actgctgtga  420
gtaccttggt  ggagagcggg  agtctggtga  ccgttgacga  gcagcacctc  gtaacgtttg  480
tcagaaattt  ccgcgggctg  gctgaacttt  tgaaagttag  cgggaaaatg  cagaagcgtg  540
attggaagac  gaatgtacac  gtcattgtgg  ggccacctgg  gtgtggcaaa  agcaaatggg  600
ctgctaattt  tgcagaccgg  gaaaccacat  actggaaacc  acctagaaac  aagtgggtgg  660
atgggtacca  tgggtgaagaa  gtggttggtt  ttgatgactt  ttatggctgg  ctgccgtggg  720
atgatctact  gagactctgt  gatcgatatc  ctttgactgt  tgagactaaa  ggtggaactg  780
tacctttttt  ggcccgcagt  attctgatta  ccagcaatca  gaccccggtg  gaatggtact  840
cctcaactgc  tgtcccagct  gtagaagctc  tctatcggag  gattacttcc  ttggtatttt  900
ggaagaatgc  tacagaacaa  tccacggagg  aagggggcca  gttcgtcacc  ctttcccccc  960
catgccctga  atttccatat  gaaataaatt  actgagtcct  ttttatcact  tcgtaatggg  1020
ttttattatt  cacttagggg  taagtggggg  gtctttaaga  ttaaattctc  tgaattgtac  1080
atacatggtt  atacggatat  tgtagtcctg  gtcgtatata  ctgttttcga  acgcagtgcc  1140
gaggcctaca  tgggtctacat  ttccagtagt  ttgtagtctc  agccagagtt  gatttctttt  1200
gttattgggt  tggaagtaat  cgattgtcct  atcaaggaca  ggtttcgggg  taaagtaccg  1260
ggagtggtag  gagaagggct  ggggttatgg  atggcgggag  gagtagttta  cataggggtc  1320
ataggttagg  gcattggcct  ttgttataaa  gttatcatct  agaataacag  cagtggagct  1380
cactccctcg  tcacctggg  tgattgggga  gcagggccag  aattcaacct  taaccttctt  1440
tattctgtag  tattcaaagg  gcacagttag  ggggcttgag  cccctcctg  ggggaagaaa  1500

```

```

atcattaata ttaaattctca tcatgtccac attccaggag ggcgttctga ctgtgggtttt 1560
cttgacagta taaccgatgg tgcgggagag gcgggtgttg aagatgccat ttttccttct 1620
ccagcggtaa cgggtggcggg ggtggactag ccaggggcgg cggcggagga tctggccaag 1680
atggctgcgg gggcgggtgc ttcgtctgcg gtaacgcctc cttggatacg tcatcgctga 1740
aaacgaaaga agtgcgctgt aagtatt 1767

```

<210> 2

<211> 945

<212> ADN

<213> Chủng H của circovirut typ 2 ở lợn

<220>

<223> Trình tự ADN của khung đọc mở 1 (open reading frame 1: ORF1) của chủng H của circovirut typ 2 ở lợn

<400> 2

```

atgccagca agaagagtgg aagaagcgga cccaaccac ataaaagggtg ggtgttcacg 60
ctgaataatc cttccgaaga cgagcgcaag aaaatacggg agctcccaat ctccctattt 120
gattatttta ttgttgccga ggaaggtaat gaggagggcc gaacaccca cctacagggg 180
ttcgctaatt ttgtgaagaa gcaactttt aataaagtga agtggatttt tgggtgccgc 240
tgccacatcg agaaagcgaa aggaacagat cagcagaata aagaatattg cagtaaagaa 300
ggcaacttac tgatagaatg tggagctcct agatctcaag gacaacggag tgacctctct 360
actgctgtga gtacctgtt ggagagcggg agtctggtga ccgttcaga gcagcaccct 420
gtaacgtttg tcagaaattt ccgcgggctg gctgaacttt tgaaagtga cgggaaaatg 480
cagaagcgtg attggaagac gaatgtacac gtcattgttg ggccacctgg gtgtggcaaa 540
agcaaatggg ctgctaattt tgcagaccgg gaaaccacat actggaaacc acctagaaac 600
aagtgggtgg atggttacca tgggtgaagaa gtggttgta ttgatgactt ttatggctgg 660
ctgccgtggg atgatctact gagactctgt gatcgatgc ctttgactgt tgagactaaa 720
ggtggaactg tacctttttt ggcccgcagt attctgatta ccagcaatca gacccggttg 780
gaatgttact cctcaactgc tgtcccagct gtagaagctc tctatcggag gattacttcc 840
ttggtatttt ggaagaatgc tacagaacaa tccacggagg aagggggcca gttcgtcacc 900
ctttccccc catgccctga atttccatat gaaataaatt actga 945

```

<210> 3

<211> 314

<212> PRT

<213> Chủng H của circovirut typ 2 ở lợn

<220>

<223> Trình tự axit amin của khung đọc mở 1 (ORF1) của chủng H của circovirut typ 2 ở lợn

<400> 3

Met Pro Ser Lys Lys Ser Gly Arg Ser Gly Pro Gln Pro His Lys Arg

```

1           5           10           15
Trp Val Phe Thr Leu Asn Asn Pro Ser Glu Asp Glu Arg Lys Lys Ile
           20           25           30
Arg Glu Leu Pro Ile Ser Leu Phe Asp Tyr Phe Ile Val Gly Glu Glu
           35           40           45
Gly Asn Glu Glu Gly Arg Thr Pro His Leu Gln Gly Phe Ala Asn Phe
           50           55           60
Val Lys Lys Gln Thr Phe Asn Lys Val Lys Trp Tyr Phe Gly Ala Arg
           65           70           75           80
Cys His Ile Glu Lys Ala Lys Gly Thr Asp Gln Gln Asn Lys Glu Tyr
           85           90           95
Cys Ser Lys Glu Gly Asn Leu Leu Ile Glu Cys Gly Ala Pro Arg Ser
           100          105          110
Gln Gly Gln Arg Ser Asp Leu Ser Thr Ala Val Ser Thr Leu Leu Glu
           115          120          125
Ser Gly Ser Leu Val Thr Val Ala Glu Gln His Pro Val Thr Phe Val
           130          135          140
Arg Asn Phe Arg Gly Leu Ala Glu Leu Leu Lys Val Ser Gly Lys Met
           145          150          155          160
Gln Lys Arg Asp Trp Lys Thr Asn Val His Val Ile Val Gly Pro Pro
           165          170          175
Gly Cys Gly Lys Ser Lys Trp Ala Ala Asn Phe Ala Asp Pro Glu Thr
           180          185          190
Thr Tyr Trp Lys Pro Pro Arg Asn Lys Trp Trp Asp Gly Tyr His Gly
           195          200          205
Glu Glu Val Val Val Ile Asp Asp Phe Tyr Gly Trp Leu Pro Trp Asp
           210          215          220
Asp Leu Leu Arg Leu Cys Asp Arg Tyr Pro Leu Thr Val Glu Thr Lys
           225          230          235          240
Gly Gly Thr Val Pro Phe Leu Ala Arg Ser Ile Leu Ile Thr Ser Asn
           245          250          255
Gln Thr Pro Leu Glu Trp Tyr Ser Ser Thr Ala Val Pro Ala Val Glu
           260          265          270
Ala Leu Tyr Arg Arg Ile Thr Ser Leu Val Phe Trp Lys Asn Ala Thr
           275          280          285
Glu Gln Ser Thr Glu Glu Gly Gly Gln Phe Val Thr Leu Ser Pro Pro
           290          295          300
Cys Pro Glu Phe Pro Tyr Glu Ile Asn Tyr
           305          310

```

<210> 4

<211> 705

<212> ADN

<213> Chủng H của circovirus typ 2 ở lợn

<220>

<223> Trình tự ADN của khung đọc mở 2 (open reading frame 2: ORF2) của chủng H của circovirus typ 2 ở lợn

<400> 4

```

atgacgtatc caaggaggcg ttaccgcaga cgaagacacc gccccgcag ccatcttggc   60
cagatcctcc gccgccgcc ctggctagtc ccccccgcc accgttaccg ctggagaagg   120
aaaaatggca tcttcaacac ccgcctctcc cgcaccatcg gttatactgt caagaaaacc   180
acagtcagaa cgccctcctg gaatgtggac atgatgagat ttaatatata tgattttctt   240
ccccaggag ggggtcaag cccctcact gtgccctttg aatactacag aataaggaag   300
gttaagggtt aattctggcc ctgctcccca atcaccagg gtgacagggg agtgagctcc   360
actgtgttta ttctagatga taactttgta acaaaggcca atgccctaac ctatgacccc   420
tatgtaaact actcctcccg ccataccata acccagccct tctcctacca ctcccgttac   480
tttaccocga aacctgtcct tgataggaca atcgattact tccaacccaa taacaaaaga   540
aatcaactct ggctgagact acaactact ggaaatgtag accatgtagg cctcggcact   600
gcggttcgaaa acagtatata cgaccaggac tacaatatcc gtataaccat gtatgtacaa   660
ttcagagaat ttaattctaa agacccccca cttaacccta agtga                       705

```

<210> 5

<211> 234

<212> PRT

<213> Chủng H của circovirus typ 2 ở lợn

<220>

<223> Trình tự axit amin của khung đọc mở 2 (ORF2) của chủng H của circovirus typ 2 ở lợn

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

<210> 6

<211> 315

<212> ADN

<213> Chủng H của circovirut typ 2 ở lợn

<220>

<223> Trình tự ADN của khung đọc mở 3 (open reading frame 3: ORF3) của chủng H của circovirut typ 2 ở lợn

<400> 6

atggttaacca tcccaccact tgtttctagg tggtttccag tatgtgggtt ccgggtctgc 60
 aaaattagca gccatttgc ttttgccaca cccaggtggc cccacaatga cgtgtacatt 120
 cgtcttccaa tcacgcttct gcattttccc gtcactttc aaaagttcag ccagcccgcg 180
 gaaatttctg aaaaacgtta cagggtgctg ctctgcaacg gtcaccagac tcccgtcttc 240
 caacaaggta ctacagcag tagagaggtc actccgttgt ccttgagatc taggagctcc 300
 acattctatc agtaa 315

<210> 7

<211> 104

<212> PRT

<213> Chủng H của circovirut typ 2 ở lợn

<220>

<223> Trình tự axit amin của khung đọc mở 3 (ORF3) của chủng H của circovirut typ 2 ở lợn

<400> 7

Met Val Thr Ile Pro Pro Leu Val Ser Arg Trp Phe Pro Val Cys Gly
 1 5 10 15
 Phe Arg Val Cys Lys Ile Ser Ser Pro Phe Ala Phe Ala Thr Pro Arg
 20 25 30
 Trp Pro His Asn Asp Val Tyr Ile Arg Leu Pro Ile Thr Leu Leu His
 35 40 45
 Phe Pro Ala His Phe Gln Lys Phe Ser Gln Pro Ala Glu Ile Ser Asp
 50 55 60
 Lys Arg Tyr Arg Val Leu Leu Cys Asn Gly His Gln Thr Pro Ala Leu
 65 70 75 80
 Gln Gln Gly Thr His Ser Ser Arg Glu Val Thr Pro Leu Ser Leu Arg
 85 90 95
 Ser Arg Ser Ser Thr Phe Tyr Gln
 100

<210> 8

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi/ đoạn dò để phát hiện circovirut typ 2 ở lợn

<400> 8

GTGAAGTGGT ATTTTGGTGC C

21

<210> 9

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi/ đoạn dò để phát hiện circovirut typ 2 ở lợn

<400> 9

GTCTTCCAAT CACGCTTCTG C

21

<210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi/ đoạn dò để phát hiện circovirut typ 2 ở lợn

<400> 10

TGTTGGCGAG GAGGGTAATG

20

<210> 11

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Đoạn môi/ đoạn dò để phát hiện circovirut typ 2 ở lợn

<400> 11

TGGGACAGCA GTTGAGGAGT

20