



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



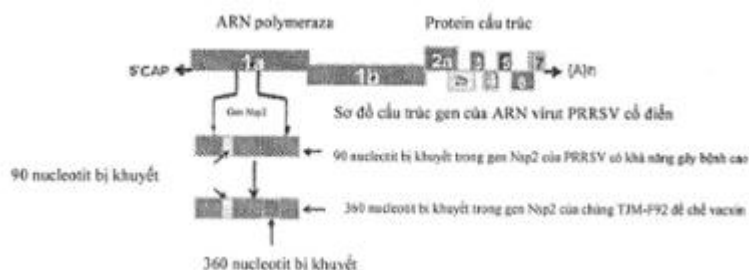
1-0024240

(51)⁷ A61K 39/295; A61P 31/14; A61K 39/12; (13) B
A61K 39/187

- (21) 1-2013-03822 (22) 25/05/2012
(86) PCT/CN2012/076125 25/05/2012 (87) WO2012/163258 06/12/2012
(30) 201110140951.5 27/05/2011 CN; 201110331206.9 27/10/2011 CN; 201110331159.8 27/10/2011 CN
(45) 25/06/2020 387 (43) 25/07/2014 316A
(73) Sinovet (Jiangsu) Biopharm Co., Ltd. (CN)
409 JiangGao Avenue, Taizhou, Jiangsu, P.R. China, 225300
(72) Hua WU (CN); Yanliang HE (CN); Mingqi XIA (CN).
(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)

(54) CHẾ PHẨM VACXIN ĐỂ PHÒNG NHIỄM VIRUT Ở LỢN VÀ PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ CHẾ PHẨM VACXIN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm vacxin chứa vacxin phòng PRRSV và vacxin phòng virut ở lợn thứ hai, mà về cơ bản không ức chế miễn dịch lẫn nhau. Vacxin phòng virut ở lợn thứ hai có thể là vacxin phòng CSFV và/hoặc phòng PRV. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp bào chế vacxin này và các chế phẩm bào chế của vacxin này. Các chế phẩm vacxin được đề xuất trong sáng chế tạo được khả năng miễn dịch bảo vệ cho lợn kháng lại được hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn, bệnh sốt cổ điển ở lợn và/hoặc bệnh giả dại ở lợn.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các sản phẩm sinh học thú y, cụ thể là vaccin tổ hợp sống để dự phòng hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn, bệnh sốt cổ điển ở lợn, bệnh nhiễm virus gây bệnh giả dại ở lợn và phương pháp bào chế các vaccin này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome - PRRS) là một trong các bệnh nhiễm virus nghiêm trọng đe dọa ngành công nghiệp chăn nuôi lợn ở nhiều nơi trên khắp thế giới. Suốt từ khi bùng nổ hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn với khả năng gây bệnh cao của virus (cũng được gọi là bệnh tai xanh với khả năng gây bệnh cao của virus) ở Trung Quốc vào năm 2006, PRRS đã gây ra thiệt hại lớn về kinh tế cho ngành công nghiệp chăn nuôi lợn của Trung Quốc; bệnh này được Bộ Nông nghiệp Trung Quốc liệt kê vào danh sách là một trong các bệnh bắt buộc phải được tiêm chủng để phòng ngừa.

Ngoài PRRS, lợn còn có thể bị mắc các bệnh nhiễm virus khác như bệnh sốt cổ điển (Classical Swine Fever - CSF) và bệnh giả dại (Pseudorabies – PR). Tuy nhiên, virus gây PRRS (PRRSV) được biết là gây giảm miễn dịch sau khi nhiễm vào vật chủ của virus đó và do vậy, thường dẫn tới sự đáp ứng miễn dịch giảm với các nhiễm trùng thứ cấp hoặc thậm chí khiến sự tiêm chủng thất bại. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng, PRRSV làm suy yếu hệ thống miễn dịch của vật chủ, ví dụ như bằng cách phá hủy các đại thực bào ở phế nang, là các tế bào có vai trò quan trọng cho việc tạo ra đáp ứng miễn dịch, và/hoặc làm giảm sự biểu hiện của xytokin là chất có tác dụng tạo ra sự phòng vệ miễn dịch đối với các nhiễm trùng thứ cấp. Ví dụ, sự nhiễm PRRSV đã được nhận thấy là gây ra sự ức chế đáng kể đáp ứng miễn dịch ở vật chủ đối với vaccin phòng virus gây bệnh sốt cổ điển ở lợn (CSFV), thậm chí còn gây ra việc tiêm chủng phòng CSFV bị thất bại (xem tài liệu Suradhat, S. et al., Vaccin, 24: 2634-3642 (2006); Li, H. et al., Veterinary Microbiology, 95: 295-301 (2003)). Tiêm chủng đồng thời PRRSV giảm độc lực và CSFV giảm độc lực được ghi nhận là có tỷ lệ bảo vệ

miễn dịch giảm khoảng 60%, không đáp ứng được yêu cầu của việc tiêm chủng. Để tiêm chủng phòng được hai tác nhân gây bệnh này, đòi hỏi phải tiến hành tiêm chủng riêng biệt để phòng từng tác nhân gây bệnh, cách nhau 14 ngày (chẳng hạn, xem bài báo Du, X. Z. et al., Zhejiang Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2: p5-6 (2011)). Một ví dụ khác, PRRSV đã được nhận thấy có tác dụng âm tính đối với ảnh hưởng của virus gây bệnh giả dại (PRV) và làm giảm đáng kể hoặc làm chậm đáp ứng miễn dịch kháng PRV ở vật chủ (xem tài liệu De Bruin, M. G. M. et al., Veterinary Immunology and Immunopathology, 76 (1-2): p 125-135 (2000)).

Sự ức chế miễn dịch của PRRSV có khuynh hướng phức tạp hoá chế độ tiêm chủng đối với lợn, làm giảm hiệu lực và hiệu quả của việc tiêm chủng. Khi lợn được tiêm chủng để phòng PRRSV và các virus khác, thì thường cần các lần tiêm nhắc lại và dùng nhiều liều lượng, khiến cho quy trình tiêm chủng tốn thời gian, mất nhiều công sức và tốn kém. Hơn nữa, với chế độ tiêm chủng nhiều lần, sự bỏ sót liều quên không tiêm chủng có thể có ảnh hưởng trực tiếp tới hiệu lực bảo vệ của các vaccin, trong khi sự tiêm chủng thường xuyên và lặp đi lặp lại thì lại có thể gây ra sự tê liệt miễn dịch và tạo nên áp lực miễn dịch.

Vì vậy, rất cần có chế phẩm vaccin kết hợp để phòng ngừa PRRSV và các bệnh nhiễm virus khác ở lợn, nhưng phải không gây ra sự ức chế miễn dịch đáng kể.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các chế phẩm vaccin chứa vaccin phòng virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV) và vaccin phòng virus ở lợn thứ hai, trong đó vaccin phòng PRRSV và vaccin thứ hai về cơ bản không ức chế miễn dịch lẫn nhau. Theo một số phương án, chế phẩm vaccin còn chứa vaccin phòng virus ở lợn thứ ba, trong đó vaccin phòng PRRSV, vaccin thứ hai và vaccin thứ ba về cơ bản không ức chế miễn dịch lẫn nhau.

Theo một số phương án, vaccin phòng virus ở lợn thứ hai được chọn từ nhóm gồm vaccin phòng virus gây bệnh sốt cổ điển ở lợn (CSFV) và vaccin phòng virus gây bệnh giả dại (PRV). Theo một số phương án, vaccin phòng virus ở lợn thứ ba được chọn từ nhóm gồm vaccin phòng virus gây bệnh sốt cổ điển ở lợn (CSFV) và vaccin

phòng virus gây bệnh giả dại (PRV). Trong đó, vacxin thứ hai khác với vacxin thứ ba.

Theo một số phương án, các chế phẩm vacxin chứa vacxin phòng PRRSV, vacxin phòng CSFV và vacxin phòng PRV, trong đó vacxin phòng PRRSV, vacxin phòng CSFV và vacxin phòng PRV về cơ bản không ức chế miễn dịch lẫn nhau.

Theo một số phương án, vacxin phòng PRRSV chứa PRRSV giảm độc lực. Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực chứa nucleotit Nsp2 được mã hoá bởi một trình tự ADN, mà khi so sánh với SEQ ID NO: 4, thì thiếu một đoạn ADN chứa ít nhất 50 nucleotit kề nhau, trong đó đoạn này tương đồng ít nhất khoảng 80% với phần có cùng độ dài trong SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, đoạn ADN đã nêu chứa ít nhất là 100, ít nhất là 120, ít nhất là 150, ít nhất là 180, ít nhất là 200, ít nhất là 210, ít nhất là 220, ít nhất là 230, ít nhất là 240, ít nhất là 250, ít nhất là 260, ít nhất là 270, ít nhất là 280, ít nhất là 290, ít nhất là 300, ít nhất là 310, ít nhất là 320, ít nhất là 330, ít nhất là 340, ít nhất là 350, hoặc ít nhất là 360 nucleotit kề nhau. Theo một số phương án, đoạn ADN đã nêu tương đồng ít nhất khoảng 81%, khoảng 82%, khoảng 83%, khoảng 84%, khoảng 85%, khoảng 86%, khoảng 87%, khoảng 88%, khoảng 89%, khoảng 90%, khoảng 91%, khoảng 92%, khoảng 93%, khoảng 94%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99% hoặc 100% với phần có cùng độ dài trong SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, đoạn ADN đã nêu bao gồm SEQ ID NO: 8.

Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực chứa nucleotit Nsp2 mã hoá cho trình tự axit amin của protein Nsp2, mà khi so sánh với SEQ ID NO: 11, thì thiếu đoạn peptit chứa ít nhất là 20 axit amin kề nhau, trong đó đoạn này tương đồng ít nhất khoảng 80% với phần có cùng độ dài trong SEQ ID NO: 9. Theo một số phương án, đoạn peptit này chứa ít nhất là 30, ít nhất là 40, ít nhất là 50, ít nhất là 60, ít nhất là 70, ít nhất là 75, ít nhất là 80, ít nhất là 85, ít nhất là 90, ít nhất là 95, ít nhất là 100, ít nhất là 105, ít nhất là 110, ít nhất là 115 hoặc ít nhất là 120 axit amin kề nhau. Theo một số phương án, đoạn peptit này tương đồng ít nhất khoảng 81%, khoảng 82%, khoảng 83%, khoảng 84%, khoảng 85%, khoảng 86%, khoảng 87%, khoảng 88%, khoảng 89%, khoảng 90%, khoảng 91%, khoảng 92%, khoảng 93%, khoảng 94%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99% hoặc 100% với phần có cùng độ dài trong SEQ ID NO: 9. Theo một số phương án, đoạn peptit này bao gồm

SEQ ID NO: 9.

Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực được giảm độc lực từ PRRSV có khả năng gây bệnh cao. Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực này chứa nucleotit Nsp2 được mã hoá bởi trình tự ADN, mà khi so sánh với SEQ ID NO: 5, thì thiếu 90 nucleotit không kề nhau với nhau trong SEQ ID NO: 6. Theo một số phương án, nucleotit Nsp2 này được mã hoá bởi trình tự tương đồng ít nhất là 90% với SEQ ID NO: 2. Theo một số phương án, nucleotit Nsp2 này được mã hoá bởi trình tự bao gồm SEQ ID NO: 2.

Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực còn chứa một trình tự nucleotit Nsp1, mà trình tự này được mã hoá bởi một trình tự tương đồng ít nhất là 90% với SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực chứa trình tự nucleotit Nsp1 được mã hoá bởi SEQ ID NO: 1 và trình tự nucleotit Nsp2 được mã hoá bởi SEQ ID NO: 2.

Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực chứa trình tự nucleotit PRRSV được mã hoá bởi trình tự tương đồng ít nhất là 90% với SEQ ID NO: 3. Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực chứa trình tự nucleotit PRRSV được mã hoá bởi SEQ ID NO: 3. Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực có số hiệu lưu giữ vi sinh vật tại CGMCC (Trung tâm lưu giữ nguồn vi sinh vật Trung Quốc) là 3121.

Theo một số phương án, vacxin phòng CSFV chứa CSFV giảm độc lực. Theo một số phương án, CSFV giảm độc lực được mã hoá bởi trình tự có sự tương đồng ít nhất là 80% với SEQ ID NO: 10. Theo một số phương án, CSFV giảm độc lực được mã hoá bởi SEQ ID NO: 10. Theo một số phương án, CSFV giảm độc lực có số hiệu lưu giữ vi sinh vật tại CGMCC là 3891.

Theo một số phương án, vacxin phòng PRV chứa PRV giảm độc lực. Theo một số phương án, PRV giảm độc lực có trình tự tương đồng ít nhất là 80% với trình tự có số tham chiếu NCBI (Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia) là NC_006151.

Theo một số phương án, PRV giảm độc lực chứa một hoặc vài gen bị bất hoạt được chọn từ nhóm gồm các gen TK, PK, RR, dUTPaza, gG, gC, gE, gD và gI. Theo một số phương án, PRV giảm độc lực chứa gen gE bị bất hoạt. Theo một số phương án, PRV giảm độc lực có số hiệu lưu giữ vi sinh vật tại CGMCC là 5076.

Theo một số phương án, chế phẩm vacxin được đề xuất trong sáng chế chứa lượng có hiệu lực miễn dịch của vacxin phòng PRRSV, vacxin phòng CSFV và/hoặc vacxin phòng PRV. Theo một số phương án, lượng có hiệu lực miễn dịch của vacxin phòng PRRSV ít nhất là $10^{4.5}$ TCID₅₀, $10^{5.0}$ TCID₅₀ hoặc $10^{5.5}$ TCID₅₀; lượng có hiệu lực miễn dịch của vacxin phòng CSFV ít nhất là $10^{0.5}$ FA-TCID₅₀ (kháng thể huỳnh quang -TCID₅₀), $10^{1.0}$ FA-TCID₅₀, $10^{1.5}$ FA-TCID₅₀, $10^{2.0}$ FA-TCID₅₀, $10^{2.5}$ FA-TCID₅₀, $10^{3.0}$ FA-TCID₅₀, $10^{3.5}$ FA-TCID₅₀, $10^{4.0}$ FA-TCID₅₀, $10^{4.5}$ FA-TCID₅₀ hoặc $10^{5.0}$ FA-TCID₅₀, hoặc ít nhất là 2,5 RID (liều gây nhiễm trên thỏ), 3 RID, 5 RID, 10 RID, 30 RID, 100 RID, 150 RID, 300 RID, 750 RID, 1000 RID, 3000 RID hoặc 7500 RID, và/hoặc lượng có hiệu lực miễn dịch của vacxin phòng PRV ít nhất là $10^{3.0}$ TCID₅₀, $10^{3.5}$ TCID₅₀, $10^{4.0}$ TCID₅₀, $10^{4.5}$ TCID₅₀, $10^{5.0}$ TCID₅₀, $10^{5.5}$ TCID₅₀ hoặc $10^{6.0}$ TCID₅₀.

Theo một số phương án, tỷ lệ TCID₅₀ giữa vacxin phòng PRRSV và vacxin phòng CSFV trong chế phẩm vacxin kết hợp nằm trong khoảng từ 10000:1 đến 1:1. Theo một số phương án, tỷ lệ TCID₅₀ giữa vacxin phòng PRRSV và vacxin phòng PRV trong chế phẩm vacxin kết hợp nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:30. Theo một số phương án, tỷ lệ TCID₅₀ giữa vacxin phòng PRRSV, vacxin phòng CSFV và vacxin phòng PRV trong chế phẩm vacxin kết hợp khoảng từ 10^4 : 1: 10^5 đến 5:1:6.

Theo một số phương án, các chế phẩm vacxin còn chứa tá chất. Theo một số phương án, các chế phẩm vacxin còn chứa tác nhân bảo vệ đông lạnh. Theo một số phương án, tác nhân bảo vệ đông lạnh gồm saccaroza, natri L-glutamat và/hoặc sản phẩm thủy phân albumin của sữa.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp bào chế các chế phẩm vacxin đã được đề xuất, bao gồm: a) thu lấy chủng virus để bào chế vacxin phòng PRRSV, chủng virus để bào chế vacxin phòng CSFV và/hoặc chủng virus để bào chế vacxin phòng PRV, mà các chủng này được nuôi cấy riêng trong các tế bào miễn cảm tương ứng của chúng, và b) trộn lẫn hai hoặc vài chủng virus đó theo tỷ lệ TCID₅₀ thích hợp.

Theo một số phương án, các tế bào miễn cảm với chủng virus để bào chế vacxin phòng PRRSV là dòng tế bào được chọn từ nhóm gồm các dòng tế bào Marc-145, MA-104, Vero và CL-2621 hoặc tế bào sơ cấp là tế bào PAM (đại thực bào phế nang lợn). Theo một số phương án, các tế bào miễn cảm với chủng virus để bào chế vacxin

phòng CSFV là dòng tế bào được chọn từ nhóm gồm các dòng tế bào BT, Vero, MPK, SK6, PK2a, CPK, RKC, MDBK, MDCK, CRFK, ST và PT hoặc tế bào sơ cấp là tế bào BT. Theo một số phương án, các tế bào miễn cảm với chủng virus để bào chế vaccin phòng PRV là dòng tế bào được chọn từ nhóm gồm các dòng tế bào ST, PK-15, Marc-145, MDBK, BT, Vero, BHK-21, dòng tế bào thận lợn (IBRS-2), dòng tế bào thận thỏ (RK) và dòng nguyên bào sợi phôi gà, hoặc tế bào sơ cấp là tế bào sơ cấp thận lợn.

Theo một số phương án, việc nuôi cấy bao gồm cấy từng chủng virus để bào chế vaccin vào các tế bào miễn cảm với chủng đó, với mật độ tế bào trong khoảng từ $1 \times 10^6/\text{ml}$ đến $5 \times 10^6/\text{ml}$ khi nuôi cấy trong lọ quay, hoặc với mật độ tế bào trong khoảng từ $5 \times 10^6/\text{ml}$ đến $1 \times 10^7/\text{ml}$ khi nuôi cấy trong huyền phù cùng với chất mang có tác dụng dính kết trong buồng phản ứng sinh học.

Theo một số phương án, chủng virus để bào chế vaccin phòng PRRSV được cấy với hệ số gây nhiễm (MOI) là 0,01-0,5, chủng virus để bào chế vaccin phòng CSFV được cấy với MOI là 0,1-0,5 và/hoặc chủng virus để bào chế vaccin phòng PRV được cấy với MOI là 0,005-0,5.

Theo một số phương án, bước b) bao gồm việc trộn virus để bào chế vaccin phòng PRRSV đã được thu thập với virus để bào chế vaccin phòng CSFV theo tỷ lệ TCID_{50} từ 10000:1 đến 1:1. Theo một số phương án, bước b) bao gồm việc trộn virus để bào chế vaccin phòng PRRSV đã được thu thập với virus để bào chế vaccin phòng PRV theo tỷ lệ TCID_{50} từ 1:1 đến 1:30. Theo một số phương án, bước b) bao gồm việc trộn virus để bào chế vaccin phòng PRRSV đã được thu thập với virus để bào chế vaccin phòng CSFV và virus để bào chế vaccin phòng PRV theo tỷ lệ TCID_{50} từ 10^4 :1: 10^5 đến khoảng 5:1:6.

Theo một số phương án, bước b) còn bao gồm việc trộn hỗn hợp các dung dịch virus đã thu thập được với tác nhân bảo vệ đông lạnh. Theo một số phương án, hỗn hợp các dung dịch virus đã thu thập được trộn với tác nhân bảo vệ đông lạnh theo tỷ lệ thể tích 75-80 : 25-20.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các chế phẩm vaccin được bào chế bằng các phương pháp được đề xuất trong sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất thuốc dự

phòng hoặc điều trị PRRS, CSF và/hoặc bệnh GD có sử dụng các chế phẩm vaccin được đề xuất trong sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp sản xuất thuốc miễn dịch cho lợn, có sử dụng chế phẩm vaccin được đề xuất trong sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các chủng virus để bào chế vaccin phòng CSFV mà chúng được nuôi cấy trên dòng tế bào được chọn từ nhóm gồm các dòng tế bào ST, PK-15, Marc-145, MDBK, BT, Vero, BHK-21, dòng tế bào thận lợn (IBRS-2), dòng tế bào thận thỏ (RK) và dòng nguyên bào sợi phôi gà, hoặc tế bào sơ cấp là các tế bào sơ cấp thận lợn. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng các dòng tế bào này trong nuôi cấy chủng virus để bào chế vaccin phòng CSFV.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện 360 nucleotit kề nhau, vắng mặt trong trình tự nucleotit mã hoá Nsp2 của chủng PRRSV TJM, nhưng có mặt trong trình tự nucleotit Nsp2 của chủng PRRSV TJ.

Fig.2 thể hiện trình tự gồm 120 axit amin, vắng mặt trong protein Nsp2 là protein được mã hoá bởi chủng PRRSV TJM, nhưng lại có mặt trong protein Nsp2 của chủng PRRSV TJ.

Fig.3 là biểu đồ biểu diễn sự thiếu đoạn 90 nucleotit trong trình tự nucleotit mã hoá Nsp2 của chủng PRRSV có khả năng gây bệnh cao, cũng như sự thiếu đoạn 90 nucleotit và sự thiếu đoạn 360 nucleotit trong chủng PRRSV TJM giảm độc lực.

Fig.4 thể hiện trình tự 90 nucleotit không kề nhau, vắng mặt trong chủng PRRSV TJ có khả năng gây bệnh cao, nhưng lại có mặt trong chủng PRRSV VR-2332.

Fig.5 lần lượt thể hiện hình ảnh điện di của chủng virus để bào chế vaccin phòng PRRSV TJM (dải 2), của chủng độc PRRSV TJ có khả năng gây bệnh cao (dải 1) và của nước (dải 3, làm đối chứng âm tính). M chỉ dấu chuẩn phân tử lượng.

Fig.6 lần lượt thể hiện hình ảnh điện di của chủng virus để bào chế vaccin phòng PRV (dải 1), của chủng độc (dải 2) và của nước (dải 3, làm đối chứng âm tính). M chỉ dấu chuẩn phân tử lượng.

Fig.7 thể hiện sự thay đổi (tính bằng %) tỷ lệ các tế bào T CD3+ ở các con lợn thử nghiệm được tiêm chủng vaccin đơn phòng PRRSV TJM, vaccin đơn phòng

chủng CSFV C (F16) và chế phẩm vaccin kết hợp, hoặc bằng đối chứng âm tính.

Fig.8 thể hiện sự thay đổi (tính bằng %) tỷ lệ các tế bào T CD4+ ở các con lợn thử nghiệm được tiêm chủng vaccin đơn phòng PRRSV TJM, vaccin đơn phòng chủng CSFV C (F16) và chế phẩm vaccin kết hợp, hoặc bằng đối chứng âm tính.

Fig.9 thể hiện sự thay đổi (tính bằng %) tỷ lệ các tế bào T CD8+ ở các con lợn thử nghiệm được tiêm chủng vaccin đơn phòng PRRSV TJM, vaccin đơn phòng chủng CSFV C (F16) và chế phẩm vaccin kết hợp, hoặc bằng đối chứng âm tính.

Fig.10 thể hiện sự thay đổi (tính bằng %) tỷ lệ các tế bào T CD4+CD8+ ở các con lợn thử nghiệm được tiêm chủng vaccin đơn phòng PRRSV TJM, vaccin đơn phòng chủng CSFV C (F16) và chế phẩm vaccin kết hợp phòng PRRSV và CSFV, hoặc bằng đối chứng âm tính.

Fig.11 thể hiện các hiệu giá kháng thể kháng PRRSV (được xác định bằng ELISA) ở các con lợn được tiêm chủng vaccin đơn phòng PRRSV TJM, chế phẩm vaccin kết hợp phòng PRRSV TJM và chủng CSFV C (F16), hoặc bằng đối chứng âm tính.

Fig.12 thể hiện các hiệu giá kháng thể kháng CSFV (được xác định bằng ELISA) ở các con lợn được tiêm chủng vaccin đơn phòng chủng CSFV C (F16), chế phẩm vaccin kết hợp phòng PRRSV TJM và chủng CSFV C (F16), hoặc bằng đối chứng âm tính.

Fig.13 thể hiện nhiệt độ trực tràng ở các con lợn sau tiêm chủng vaccin đơn phòng PRRSV TJM, vaccin đơn phòng chủng CSFV C (F16), chế phẩm vaccin kết hợp phòng PRRSV TJM và chủng CSFV C (F16), hoặc bằng các đối chứng âm tính.

Fig.14 thể hiện nhiệt độ trực tràng ở các con lợn sau thử nghiệm dùng liều cao bằng các virus độc PRRSV; lợn được tiêm chủng vaccin đơn phòng PRRSV TJM, chế phẩm vaccin kết hợp phòng PRRSV TJM và chủng CSFV C (F16), hoặc bằng đối chứng âm tính.

Fig.15 thể hiện nhiệt độ trực tràng ở các con lợn sau thử nghiệm dùng liều cao bằng các virus độc CSFV; lợn được tiêm chủng vaccin đơn phòng chủng CSFV C (F16), chế phẩm vaccin kết hợp phòng PRRSV TJM và chủng CSFV C (F16), hoặc bằng đối chứng âm tính.

Fig.16 thể hiện số điểm đánh giá triệu chứng lâm sàng ở các con lợn sau thử

nghiệm dùng liều cao bằng virus độc PRRSV; lợn được tiêm chủng vaccin đơn phòng PRRSV TJM, chế phẩm vaccin kết hợp phòng PRRSV TJM và phòng chủng CSFV C (F16), hoặc đối chứng âm tính.

Fig.17 thể hiện số điểm đánh giá triệu chứng lâm sàng ở các con lợn sau thử nghiệm dùng liều cao bằng các virus độc CSFV; lợn được tiêm chủng vaccin đơn phòng chủng CSFV C (F16), chế phẩm vaccin kết hợp phòng PRRSV TJM và chủng CSFV C (F16), hoặc bằng đối chứng âm tính.

Fig.18 thể hiện sự thay đổi (tính bằng %) tỷ lệ các tế bào T CD3+ ở lợn sau thử nghiệm dùng liều cao bằng các virus độc PRRSV; lợn được tiêm chủng vaccin đơn phòng PRRSV TJM, chế phẩm vaccin kết hợp phòng PRRSV TJM và chủng CSFV C (F16), hoặc bằng đối chứng âm tính.

Fig.19 thể hiện sự thay đổi (tính bằng %) tỷ lệ các tế bào T CD4+ sau thử nghiệm dùng liều cao bằng các virus độc PRRSV.

Fig.20 thể hiện sự thay đổi (tính bằng %) tỷ lệ các tế bào T CD8+ sau thử nghiệm dùng liều cao bằng các virus độc PRRSV.

Fig.21 thể hiện sự thay đổi (tính bằng %) tỷ lệ các tế bào T CD4+CD8+ sau thử nghiệm dùng liều cao bằng các virus độc PRRSV.

Fig.22 thể hiện sự thay đổi (tính bằng %) tỷ lệ các tế bào T CD3+ sau thử nghiệm dùng liều cao bằng các virus độc CSFV; lợn được tiêm chủng vaccin đơn phòng chủng CSFV C (F16), chế phẩm vaccin kết hợp phòng PRRSV TJM và CSFV, hoặc bằng đối chứng âm tính.

Fig.23 thể hiện sự thay đổi (tính bằng %) tỷ lệ các tế bào T CD4+ sau thử nghiệm dùng liều cao bằng các virus độc CSFV.

Fig.24 thể hiện sự thay đổi (tính bằng %) tỷ lệ các tế bào T CD8+ sau thử nghiệm dùng liều cao bằng các virus độc CSFV.

Fig.25 thể hiện sự thay đổi (tính bằng %) tỷ lệ các tế bào T CD4+CD8+ sau thử nghiệm dùng liều cao bằng các virus độc CSFV.

Fig.26 thể hiện hiệu giá của kháng thể trung hoà kháng PRV sau tiêm chủng bằng PRRSV và PRV. Nhóm I được tiêm tuần tự bằng vaccin đơn phòng PRRSV TJM và vaccin đơn phòng PRV Bartha K61; nhóm II được tiêm vaccin sống 2-combo; nhóm III được tiêm vaccin đơn phòng PRV Bartha K61; nhóm IV chỉ được tiêm PBS

(dung dịch NaCl có đệm phosphat) vô khuẩn.

Fig.27 thể hiện các hiệu giá virus của chủng CSFV C (F16) trong vaccine đơn phòng CSFV và trong vaccine 2-combo (phòng PRRSV và CSFV) sau khi bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 14 ngày. 200904, 200905 và 200906 là ba lô vaccine 2-combo, còn 200901, 200902 và 200903 là ba lô vaccine đơn phòng PRRSV TJM.

Fig.28 thể hiện các hiệu giá virus của chủng PRRSV TJM trong vaccine đơn phòng PRRSV và trong vaccine 2-combo (phòng PRRSV và CSFV) sau khi bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 14 ngày. 200904, 200905 và 200906 là ba lô vaccine 2-combo, còn 200907, 200908 và 200909 là ba lô vaccine đơn phòng chủng CSFV C (F16).

Fig.29 thể hiện các hiệu giá virus của chủng CSFV C (F6) trong vaccine đơn phòng CSFV và trong vaccine 2-combo (phòng PRRSV và CSFV) sau khi bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong thời gian 18 tháng. 200904, 200905 và 200906 là ba lô vaccine 2-combo, còn 200901, 200902 và 200903 là ba lô vaccine đơn phòng PRRSV TJM.

Fig.30 thể hiện các hiệu giá virus của chủng PRRSV TJM trong vaccine đơn phòng PRRSV và trong vaccine 2-combo (phòng PRRSV và CSFV) sau khi bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong thời gian 18 tháng. 200904, 200905 và 200906 là ba lô vaccine 2-combo, còn 200907, 200908 và 200909 là ba lô vaccine đơn phòng chủng CSFV C (F16).

Fig.31 thể hiện các hiệu giá virus của chủng PRRSV TJM trong vaccine 2-combo (phòng PRRSV và PRV) sau khi bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong thời gian 24 tháng. Tương ứng, SD001, SD002 và SD003 là ba lô khác nhau của vaccine sống 2-combo.

Fig.32 thể hiện các hiệu giá virus của chủng PRV Bartha K61 trong vaccine 2-combo (phòng PRRSV và PRV) sau khi bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong thời gian 24 tháng. Tương ứng, SD001, SD002 và SD003 là ba lô khác nhau của vaccine sống 2-combo.

Fig.33 thể hiện các hiệu giá virus của chủng PRRSV TJM trong vaccine 2-combo (phòng PRRSV và PRV) sau khi bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 14 ngày. Tương ứng, SD001, SD002 và SD003 là ba lô khác nhau của vaccine sống 2-combo.

Fig.34 thể hiện các hiệu giá virus của chủng PRV Bartha K61 trong vaccin 2-combo (phòng PRRSV và PRV) sau khi bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 14 ngày. Tương ứng, SD001, SD002 và SD003 là ba lô khác nhau của vaccin sống 2-combo.

Fig.35 thể hiện các hiệu giá virus của chủng PRRSV TJM trong vaccin sống 3-combo (phòng PRRSV TJM + chủng CSFV C (F16) + PRV Bartha K61) sau khi bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong thời gian 18 tháng. 031-01, 031-02 và 031-03 là ba lô của vaccin sống 3-combo, còn 031-04, 031-05 và 031-06 là ba lô vaccin đơn phòng PRRSV TJM.

Fig.36 thể hiện các hiệu giá virus của chủng CSFV C (F16) trong vaccin sống 3-combo (phòng PRRSV TJM + chủng CSFV C (F16) + PRV Bartha K61) sau khi bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong thời gian 18 tháng. 031-01, 031-02 và 031-03 là ba lô của vaccin sống 3-combo, còn 031-07, 031-08 và 031-09 là ba lô vaccin đơn phòng chủng CSFV C (F16).

Fig.37 thể hiện các hiệu giá virus của chủng PRV Bartha K61 trong vaccin sống 3-combo (phòng PRRSV TJM + chủng CSFV C (F16) + PRV Bartha K61) sau khi bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong thời gian 18 tháng. 031-01, 031-02 và 031-03 là ba lô của vaccin sống 3-combo, còn 031-10, 031-11 và 031-12 là ba lô của vaccin đơn phòng PRV Bartha K61.

Fig.38 thể hiện các hiệu giá virus của chủng PRRSV TJM trong vaccin sống 3-combo (phòng PRRSV TJM + chủng CSFV C (F16) + PRV Bartha K61) sau khi bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 14 ngày. 031-01, 031-02 và 031-03 là ba lô của vaccin sống 3-combo, còn 031-04, 031-05 và 031-06 là ba lô của vaccin đơn phòng PRRSV TJM.

Fig.39 thể hiện các hiệu giá virus của chủng CSFV C (F16) trong vaccin sống 3-combo (phòng PRRSV TJM + chủng CSFV C (F16) + PRV Bartha K61) sau khi bảo quản ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 14 ngày. 031-01, 031-02 và 031-03 là ba lô của vaccin sống 3-combo, còn 031-07, 031-08 và 031-09 là ba lô vaccin đơn phòng chủng CSFV C (F16).

Fig.40 thể hiện các hiệu giá virus của chủng PRV Bartha K61 trong vaccin sống 3-combo (phòng PRRSV TJM + chủng CSFV C (F16) + PRV Bartha K61) sau khi bảo

quản ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 14 ngày. 031-01, 031-02 và 031-03 là ba lô của vaccin sống 3-combo, còn 031-10, 031-11 và 031-12 là ba lô của vaccin đơn phòng PRV Bartha K61.

Mô tả chi tiết sáng chế

Phần mô tả dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án khác nhau của phân mô tả sáng chế. Theo như cách hiểu thông thường, các cải biến cụ thể được bàn đến không nhằm giới hạn phân mô tả này. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này thấy rõ rằng, có thể đưa vào sáng chế các điểm tương đương, các thay đổi và các cải biến khác nhau mà vẫn không đi chệch tinh thần hoặc phạm vi của các vấn đề được trình bày trong bản mô tả này, cũng như hiểu rằng, các phương án tương đương đó có thể được bao hàm vào bản mô tả này. Tất cả các công bố, patent hoặc các đơn yêu cầu cấp patent được trích dẫn nguyên văn trong bản mô tả này.

Một khía cạnh, sáng chế đề cập tới các chế phẩm vaccin chứa vaccin phòng hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV) và vaccin phòng virus ở lợn thứ hai, trong đó vaccin phòng PRRSV và vaccin thứ hai về cơ bản không ức chế miễn dịch lẫn nhau.

PRRSV là virus ARN sợi dương, mà đối với nó hiện nay có hai cấu trúc di truyền đã được nhận dạng: cấu trúc di truyền kiểu châu Âu và cấu trúc di truyền kiểu châu Mỹ. Hệ gen của PRRSV chứa nhiều khung đọc mở, trong đó khung đọc mở thứ nhất (ORF1a và ORF1b) chứa 80% trình tự nucleotit trong hệ gen của PRRSV và mã hoá ARN replicaza cần cho sự sao chép PRRSV (xem tài liệu Straw et al., Diseases of Swine, 9th edition, chapter 24 (2006)). Khung đọc mở ORF1a và ORF1b được dịch thành poly-protein, mà poly-protein này được phân cắt bởi vùng proteaza chứa trong proteaza thành vài protein không cấu trúc, bao gồm Nsp1 đến Nsp12 (xem các tài liệu Vries et al., Seminars in Virology, 8:33-47 (1997); Allende et al., Journal of General Virology, 80: 307-315 (1999)).

Vaccin phòng PRRSV và vaccin phòng virus ở lợn thứ hai về cơ bản không ức chế miễn dịch lẫn nhau.

Thuật ngữ “về cơ bản không ức chế miễn dịch”, theo như được sử dụng ở đây, có nghĩa là, tổ hợp của hai hoặc vài vaccin đơn không về cơ bản không làm giảm đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở cơ thể chủ đối với một trong các vaccin đơn đó hoặc đối với tất cả các vaccin đơn đó. Thuật ngữ “về cơ bản làm giảm”, theo như được sử dụng ở

đây, chỉ sự làm giảm $\geq 20\%$ (chẳng hạn như làm giảm $\geq 30\%$, làm giảm $\geq 40\%$, làm giảm $\geq 50\%$ hoặc làm giảm $\geq 60\%$).

Theo một số phương án, tổ hợp của hai hoặc vài vaccin đơn có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch bảo vệ cho mỗi vaccin đơn đến mức độ tương đương với mức độ do vaccin đơn tạo ra. Ví dụ, chế phẩm vaccin kết hợp gồm vaccin phòng PRRSV và vaccin phòng virus ở lợn thứ hai có thể kích thích đáp ứng miễn dịch đối với PRRSV ở mức độ tương đương với đáp ứng miễn dịch do vaccin đơn phòng PRRSV tạo ra, và/hoặc có thể kích thích đáp ứng miễn dịch cho vaccin phòng virus ở lợn thứ hai ở mức độ tương đương với đáp ứng miễn dịch tạo ra bởi vaccin đơn phòng virus ở lợn thứ hai.

Đáp ứng miễn dịch bảo vệ thường bao gồm đáp ứng miễn dịch dịch thể, đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và/hoặc đáp ứng miễn dịch ở niêm mạc; có thể xác định đặc điểm của các đáp ứng miễn dịch đó bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Đáp ứng miễn dịch dịch thể được tạo thành bằng cách sản xuất ra các kháng thể (chẳng hạn như IgG) trong huyết thanh để kháng lại kháng nguyên. Có thể dễ dàng xác định được các hiệu giá kháng thể nhờ sử dụng các thử nghiệm như ELISA (enzyme linked immunosorbent assay = thử nghiệm chất hấp phụ miễn dịch gắn enzym). Ví dụ, kháng nguyên virus có thể được phủ lên một giá mang rắn và sau đó được cho tiếp xúc với mẫu được cho là có chứa kháng thể, tiếp sau xác định sự tạo thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào thường xảy ra thông qua sự tạo các lympho bào T độc tế bào và có thể được xác định đặc điểm thông qua việc định lượng một số tiểu quần thể tế bào T, như các tế bào T CD3+, các tế bào T CD4+, các tế bào T CD8+ và các tế bào T CD4+CD8+, nhờ sử dụng các phương pháp như phương pháp đo tế bào dòng. Nói chung, các tế bào T được nhuộm màu bằng các kháng thể kháng một số kháng nguyên bề mặt làm dấu phân biệt và được tuyển, được định lượng như các tiểu quần thể tế bào T khác nhau dựa theo sự có mặt của các kháng nguyên bề mặt đó. Đáp ứng miễn dịch ở niêm mạc thường xảy ra do IgA chế tiết được sinh ra trên bề mặt niêm mạc.

Theo một số phương án, vaccin phòng PRRSV và vaccin phòng virus ở lợn thứ hai, khi được sử dụng làm chế phẩm vaccin kết hợp, thì về cơ bản không làm giảm sự sản xuất kháng thể ở cơ thể chủ để đáp ứng lại vaccin phòng PRRSV và/hoặc vaccin

phòng virus ở lợn thứ hai.

Theo một số phương án, vắc xin phòng PRRSV và vắc xin phòng virus ở lợn thứ hai, khi được sử dụng làm chế phẩm vắc xin kết hợp, thì về cơ bản không làm giảm số lượng các tế bào T CD3+, các tế bào T CD4+, các tế bào T CD8+ và/hoặc các tế bào T CD4+CD8+ trong cơ thể chủ để đáp ứng lại vắc xin phòng PRRSV và/hoặc vắc xin phòng virus ở lợn thứ hai.

Theo một số phương án, vắc xin phòng PRRSV chứa PRRSV giảm độc lực. Trong phần mô tả này, thuật ngữ “PRRSV giảm độc lực”, theo như được sử dụng ở đây, chỉ PRRSV có thể nhiễm vào cơ thể chủ nhưng không gây ra hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn, hoặc chỉ gây ra ít triệu chứng và/hoặc các triệu chứng nhẹ hơn. PRRSV giảm độc lực bao gồm PRRSV giảm độc lực còn sống và các sản phẩm bị bất hoạt của PRRSV giảm độc lực còn sống. Thuật ngữ “hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn” (PRRS), theo như được sử dụng ở đây, chỉ một loạt các triệu chứng sinh lý và bệnh lý sau khi bị nhiễm PRRSV có trong tự nhiên. Không giới hạn, ngoài các triệu chứng khác, các triệu chứng này bao gồm sốt, uể oải, chán ăn, mệt mỏi, khó thở, ho, rối loạn sinh sản ở lợn nái và chậm lớn ở lợn con.

Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực chứa nucleotit Nsp2 được mã hoá bởi một trình tự ADN, mà khi so sánh với SEQ ID NO: 4, thì thiếu đoạn nucleotit chứa ít nhất là 50 nucleotit kế nhau, trong đó đoạn này tương đồng ít nhất khoảng 80% với phần có cùng độ dài trong SEQ ID NO: 8.

Thuật ngữ “được mã hoá bởi một trình tự ADN”, theo như được sử dụng ở đây, chỉ trình tự ADN có thể được phiên mã thành trình tự nucleotit ARN tương ứng. Virus ARN đơn sợi, như PRRSV và CSFV, có hệ gen gồm phân tử ARN đơn sợi, có thể được mã hoá bởi phân tử ADN dựa trên quy tắc ghép đôi các bazơ của Watson Crick. Phân tử ADN này khi được phiên mã thì có thể sản ra phân tử ARN sợi dương đồng nhất với trình tự nucleotit ARN trong hệ gen virus.

Mặc dù chưa được chứng minh bằng lý thuyết, tuy nhiên cũng thấy rõ rằng, sự vắng mặt đoạn nucleotit như vậy trong trình tự Nsp2 trong phần tương đồng với SEQ ID NO: 8 có thể làm giảm tính độc cũng như khả năng ức chế miễn dịch của PRRSV, chẳng hạn như bằng cách sản xuất ra protein Nsp2 không hoạt động hoặc kém hoạt động, và/hoặc có ảnh hưởng xấu tới sự biểu hiện hoặc tới chức năng của các protein

PRRSV khác, và/hoặc có ảnh hưởng xấu tới vòng đời của PRRSV.

Đoạn nucleotit vắng mặt này có thể có độ dài thích hợp nào đó, chừng nào mà nó có thể làm giảm được tính độc cũng như làm giảm được sự ức chế miễn dịch của PRRSV tới mức độ đủ để làm mất tính độc của PRRSV và gây được tính miễn dịch bảo vệ kháng lại PRRSV mà không làm suy yếu tính miễn dịch kháng lại virus khác cùng bị nhiễm hoặc kháng lại các vacxin khác. Ví dụ, đoạn ADN vắng mặt có thể chứa ít nhất là 100, ít nhất là 120, ít nhất là 150, ít nhất là 180, ít nhất là 200, ít nhất là 210, ít nhất là 220, ít nhất là 230, ít nhất là 240, ít nhất là 320, ít nhất là 330, ít nhất là 340, ít nhất là 350, ít nhất là 360 nucleotit kề nhau. Độ dài của đoạn nucleotit vắng mặt cũng có thể nằm trong khoảng được xác định bởi hai giá trị bất kỳ nêu trên, xem như các khoảng giá trị này đã được liệt kê rõ ràng. Theo một số phương án, đoạn nucleotit vắng mặt chứa khoảng 300 nucleotit kề nhau, khoảng 310, khoảng 320, khoảng 330, khoảng 340, khoảng 350 hoặc khoảng 360 nucleotit kề nhau.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể dễ dàng tạo ra các virus tái tổ hợp có các đoạn khuyết khác nhau trong trình tự nucleotit Nsp2 nằm trong phần tương đồng với SEQ ID NO: 8, và thử nghiệm các virus tái tổ hợp này để nghiên cứu khả năng sống, tính độc và khả năng ức chế miễn dịch, nhờ sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, cũng như sử dụng các phương pháp được đề xuất trong phần mô tả sáng chế. Ví dụ, về việc sản xuất PRRSV tái tổ hợp và thử nghiệm tính độc của PRRSV chứa các đoạn khuyết trong Nsp2, thì đã có các phương pháp được nêu trong bài báo Kim, Dal-Young et al., *Virus Genes*, 38: 118-128 (2009). Về thử nghiệm sự ức chế miễn dịch của PRRSV tái tổ hợp, thì các phương pháp thử nghiệm đó đã được mô tả trong bài báo Suradhat, S. et al., *Vaccine*, 24: 2634-3642 (2006), cũng như trong các ví dụ của phần mô tả sáng chế. Bằng cách làm khuyết một đoạn trong phần tương đồng với SEQ ID NO: 8 (chẳng hạn, làm khuyết đoạn từ nucleotit thứ nhất đến nucleotit thứ 50 trong phần này, làm khuyết đoạn từ nucleotit thứ 2 đến nucleotit thứ 60, làm khuyết đoạn từ nucleotit thứ 5 đến nucleotit thứ 100, v.v.) thì có thể tạo ra được PRRSV tái tổ hợp chứa nucleotit Nsp2 đang xét, và tiếp theo thử nghiệm các chủng PRRSV tái tổ hợp có khả năng sống được để khảo sát các khả năng của chúng trong việc tạo ra các vết tan do gây bệnh cho tế bào, nhằm có thể chọn lọc được các chủng PRRSV tái tổ hợp giảm độc lực và tiếp theo thử nghiệm ở

lợn về khả năng ức chế miễn dịch đối với vaccin phòng virus ở lợn thứ hai.

Theo một số phương án, đoạn ADN vắng mặt tương đồng ít nhất là khoảng 81%, khoảng 82%, khoảng 83%, khoảng 84%, khoảng 85%, khoảng 87%, khoảng 88%, khoảng 89%, khoảng 90%, khoảng 91%, khoảng 92%, khoảng 93%, khoảng 94%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99% hoặc 100% với phần có cùng độ dài trong SEQ ID NO: 8. Theo một số phương án, đoạn ADN vắng mặt là SEQ ID NO: 8 (xem Fig.1).

Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực chứa nucleotit Nsp2 mã hoá cho trình tự axit amin của protein Nsp2, mà khi so sánh với SEQ ID NO: 11, thì thiếu đoạn peptit chứa ít nhất là 20 axit amin kề nhau, trong đó đoạn peptit này tương đồng ít nhất khoảng 80% với phần có cùng độ dài trong SEQ ID NO: 9.

Thuật ngữ “mã hoá cho”, theo như được sử dụng ở đây, có nghĩa là trình tự nucleotit ARN có thể được dịch mã thành các trình tự axit amin tương ứng, phù hợp với các đơn vị mã di truyền.

Không cần lệ thuộc vào lý thuyết, cũng thấy rõ rằng, protein Nsp2 thiếu đoạn peptit đó sẽ hoạt động ít hơn hoặc không hoạt động, do vậy sẽ làm suy yếu độc tính của PRRSV và cũng làm giảm sự ức chế miễn dịch đối với vaccin phòng virus ở lợn thứ hai.

Theo một số phương án, đoạn peptit vắng mặt chứa ít nhất là 30, ít nhất là 40, ít nhất là 50, ít nhất là 60, ít nhất là 70, ít nhất là 75, ít nhất là 80, ít nhất là 85, ít nhất là 90, ít nhất là 95, ít nhất là 100, ít nhất là 105, ít nhất là 110, ít nhất là 115 hoặc ít nhất là 120 axit amin kề nhau. Theo một số phương án, đoạn peptit vắng mặt tương đồng ít nhất khoảng 81%, khoảng 82%, khoảng 83%, khoảng 84%, khoảng 85%, khoảng 86%, khoảng 87%, khoảng 88%, khoảng 89%, khoảng 90%, khoảng 91%, khoảng 92%, khoảng 93%, khoảng 94%, khoảng 95%, khoảng 96%, khoảng 97%, khoảng 98%, khoảng 99% hoặc 100% với phần có cùng độ dài trong SEQ ID NO: 9. Theo một số phương án, đoạn peptit vắng mặt này bao gồm SEQ ID NO: 9. Theo một số phương án, đoạn peptit vắng mặt này là SEQ ID NO: 9 (xem Fig.2).

Sự vắng mặt đoạn peptit đó trong protein Nsp2 có thể được xác định thông qua trình tự nucleotit Nsp2. Ví dụ, nucleotit Nsp2 có thể được xác định trình tự nucleotit và được dịch ra trình tự axit amin, sau đó bằng cách so sánh hàng so sánh với SEQ ID

NO: 11 để xác định trình tự peptit vắng mặt.

Thuật ngữ “tính tương đồng” hoặc “tương đồng với”, theo như được sử dụng ở đây, chỉ sự tương tự giữa hai trình tự axit amin hoặc giữa hai trình tự nucleotit. Sự tương đồng giữa các trình tự axit amin hoặc giữa các trình tự nucleotit có thể được tính toán bằng các phương pháp thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ như trình tự axit amin (hoặc nucleotit) cần so sánh có thể được sóng hàng so sánh với trình tự axit amin (hoặc nucleotit) quy chiếu, đồng thời xen các chỗ khuyết vào nếu cần, để thu được số tối đa các gốc axit amin (hoặc các gốc nucleotit) đồng nhất giữa các trình tự được sóng hàng so sánh, trên cơ sở đó có thể tính toán được tỷ lệ phần trăm các gốc axit amin (hoặc các gốc nucleotit) đồng nhất giữa hai trình tự axit amin (hoặc nucleotit) đã nêu. Có thể thực hiện việc sóng hàng so sánh các trình tự axit amin (hoặc nucleotit) và tính toán tỷ lệ tương đồng của các trình tự đó khi sử dụng phần mềm đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ như, tuy không giới hạn, đó là chương trình BLAST (có thể lấy trên trang Web của Trung tâm Quốc gia Thông tin Công nghệ sinh học (NCBI): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, hoặc chẳng hạn xem các bài báo Altschul S.F. et al., J. Mol. Biol., 215: 403-410 (1990); Stephen F. et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997)); phần mềm ClustalW2 (lấy trên trang Web của Viện Thông tin sinh học châu Âu: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, cũng như, chẳng hạn, xem các bài báo Higgins D.G. et al., Methods in Enzymology, 266: 383-402 (1996); Larkin M.A. et al., Bioinformatics (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007); và phần mềm Toffee, v.v.(lấy trên trang Web của Viện Thông tin sinh học Thụy Điển: http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee_cgi/index.cgi, hoặc, chẳng hạn, xem các bài báo Poirot O. et al., Nucleic Acids Res., 31(13): 3503-6 (2003), Notredame C. et al., J. Mol. Biol., 302(1): 205-17 (2000)). Nếu phần mềm được sử dụng để sóng hàng so sánh các trình tự, thì các thông số mặc định do phần mềm cung cấp có thể được sử dụng hoặc được điều chỉnh theo tình huống thực tế và các thông số đó nằm trong khuôn khổ kiến thức của người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực được giảm độc lực từ PRRSV có khả năng gây bệnh cao.

Thuật ngữ “PRRSV có khả năng gây bệnh cao” chỉ PRRSV có chứa nucleotit

Nsp2 được mã hoá bởi trình tự ADN mà khi so sánh với SEQ ID NO: 5 thì thiếu 90 nucleotit không kề nhau nằm trong phần SEQ ID NO: 6 (tức là đoạn gồm nucleotit thứ 1440 đến nucleotit 1680 của SEQ ID NO: 5). Các đoạn đã tách biệt thiếu 90 nucleotit không kề nhau như thế từ PRRSV (xem Fig.3) được nhận thấy có khả năng gây bệnh cao hơn chủng PRRSV VR-2332 (chẳng hạn như xem tài liệu Tian et al., PLoS ONE 2(6) e526, (2007) doi:10.1371). Theo một số phương án, 90 nucleotit không kề nhau bao gồm “TTT” từ nucleotit thứ 1440 đến nucleotit 1442 của SEQ ID NO: 5 và trình tự như được chỉ ra trong SEQ ID NO: 7 (ví dụ, xem Fig.4).

Theo một số phương án, PRRSV có khả năng gây bệnh cao chứa nucleotit Nsp2 được mã hoá bởi trình tự chứa trình tự nucleotit của SEQ ID NO: 4 (tức là trình tự nucleotit Nsp2 của chủng PRRSV TJ). Theo một số phương án, PRRSV có khả năng gây bệnh cao là chủng PRRSV TJ, mà hệ gen của nó được mã hoá bởi trình tự có số truy cập ngân hàng gen là EU860248.

Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực thì được giảm độc lực từ PRRSV có khả năng gây bệnh cao, và chứa trình tự nucleotit Nsp2 thiếu 90 nucleotit không kề nhau khi so sánh với SEQ ID NO: 5, trong đó 90 nucleotit không kề nhau là nằm trong SEQ ID NO: 6.

Theo một số phương án, nucleotit Nsp2 của PRRSV giảm độc lực được mã hoá bởi trình tự có sự tương đồng ít nhất là 90% với SEQ ID NO: 2 (tức là trình tự mã hoá cho nucleotit Nsp2 của chủng PRRSV TJM). Theo một số phương án, nucleotit Nsp2 được mã hoá bởi trình tự bao gồm SEQ ID NO: 2.

Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực còn chứa trình tự nucleotit Nsp1, mà trình tự này được mã hoá bởi trình tự có sự tương đồng ít nhất là 90% với SEQ ID NO: 1 (tức là trình tự mã hoá nucleotit Nsp1 của chủng PRRSV TJM). Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực chứa trình tự nucleotit Nsp1 được mã hoá bởi SEQ ID NO: 1 và trình tự nucleotit Nsp2 được mã hoá bởi SEQ ID NO: 2.

Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực chứa trình tự nucleotit PRRSV được mã hoá bởi trình tự có sự tương đồng ít nhất là 90% với SEQ ID NO: 3 (tức là trình tự mã hoá hệ gen của chủng PRRSV TJM). Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực chứa trình tự nucleotit PRRSV được mã hoá bởi SEQ ID NO: 3. Theo một số phương án, PRRSV giảm độc lực có số hiệu lưu giữ vi sinh vật tại CGMCC là

3121 (chủng PRRSV giảm độc lực này ở đây cũng được gọi là chủng PRRSV TJM).

Vacxin phòng PRRSV được sáng chế đề xuất về cơ bản không ức chế miễn dịch kháng vacxin phòng virus ở lợn thứ hai. Theo một số phương án, vacxin phòng virus ở lợn thứ hai được chọn từ vacxin phòng virus gây sốt cổ điển ở lợn (CSFV) và vacxin phòng virus gây bệnh giả dại (PRV).

Bệnh sốt cổ điển ở lợn (CSF) là bệnh nhiễm virus có khả năng lây nhiễm cao và gây tử vong cho lợn do virus gây sốt cổ điển ở lợn (CSFV) gây ra. Tổ chức thú y thế giới (OIE) đã đưa bệnh này vào danh sách của OIE về các bệnh, xem như bệnh cần phải được thông báo theo luật. Ở Trung Quốc, bệnh sốt cổ điển ở lợn là một trong các bệnh nhiễm trùng chủ yếu và được xếp vào bệnh typ I ở động vật trong danh mục “Mục các bệnh typ I, II và III ở động vật”. Sự bùng phát và sự phổ biến của bệnh CSF đã gây ra thiệt hại lớn về kinh tế trong ngành công nghiệp chăn nuôi lợn ở Trung Quốc và trên thế giới.

Virus gây sốt cổ điển ở lợn (CSFV) được phân loại là một loài thuộc giống *Pestivirus* trong họ virus *Flaviviridae*. CSFV là một virus ARN sợi dương có vỏ ngoài. Virus này có hệ gen với tổng chiều dài là 12,5 kb, chỉ chứa một khung đọc mở (ORF) lớn mã hoá cho một poly-protein chứa xấp xỉ 4000 axit amin và có phân tử lượng khoảng 438 kD. Poly-protein này tiếp tục được các proteaza của virus và của cơ thể chủ xử lý biến thành 12 protein thành thực. Tất cả các protein cấu trúc và không cấu trúc của CSFV được mã hoá bởi khung đọc mở lớn này.

Một công cụ quan trọng để kiểm soát bệnh virus gây sốt cổ điển ở lợn là các vacxin, bao gồm các vacxin bất hoạt và các vacxin giảm độc lực. Việc bào chế các vacxin bất hoạt phòng CSFV đã đạt được đỉnh cao vào các thập niên 1950 và 1960; trong thời kỳ này các vacxin chứa CSFV bị bất hoạt bằng formalin và tím tinh thể đã được sử dụng rộng rãi. Tuy nhiên, các vacxin đó dần dần được thay thế bằng các vacxin chứa CSFV giảm độc lực, do các điểm bất lợi của chúng là phải dùng liều lớn, thời gian miễn dịch ngắn, chậm tạo ra các đáp ứng miễn dịch và chi phí lớn.

Theo một số phương án, vacxin phòng CSFV là vacxin giảm độc lực phòng CSFV. Có thể sản xuất các chủng dùng để bào chế vacxin giảm độc lực phòng CSFV bằng cách làm giảm độc lực các chủng CSFV tồn tại ở thực địa. Các thông báo tại các nước khác cho biết rằng, có thể sử dụng các phương pháp khác nhau để làm cho các

virut gây bệnh CSF thích ứng ở thỏ và để sản xuất ra các chủng đột biến giảm độc lực. Ví dụ, có ba chủng vaccin giảm độc lực hiện được chấp nhận rộng rãi là an toàn và hữu hiệu, nhưng không tồn dư khả năng gây bệnh, đó là: 1) chủng virut thích ứng ở thỏ để bào chế vaccin của Trung Quốc (chẳng hạn, xem bài báo Qiu, H.J. et al., *Scientia Agricultura Sinica*, 38(8): 1675-1685 (2005)); 2) chủng vaccin giảm độc lực dựa trên tế bào GPE (-) (Guinea pig embryo = phôi chuột lang) của Nhật Bản (chẳng hạn, xem bài báo Liu, C. et al., *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, Vol. 10, pp. 50-51 (2004)); và 3) chủng vaccin giảm độc lực lạnh “Thiveosal” của Pháp (chẳng hạn, xem bài báo Zhu, L. Q. et al., *Chinese Veterinary Journal*, 39 (2): 33-37 (2005)).

Theo một số phương án, vaccin giảm độc lực phòng CSFV là chủng virut được làm thích ứng ở thỏ để bào chế vaccin, của Trung Quốc, (chủng C). Trình tự nucleotit hệ gen của chủng CSFV C được thể hiện trong SEQ ID NO: 10. Vaccin thích ứng ở thỏ để phòng bệnh CSF của Trung Quốc (cũng gọi là vaccin chủng C) do các nhà khoa học Trung Quốc phát triển đã được sử dụng rộng rãi ở Trung Quốc kể từ năm 1957 và đã được đưa sang nhiều nước khác, giúp cho bệnh sốt cổ điển của lợn ở các nước này đã được kiểm soát hoặc được thanh toán. Vaccin này đã được công nhận là một trong các vaccin phòng CSFV hữu ích nhất trên thế giới.

Vaccin thích ứng ở thỏ để phòng bệnh CSF (chủng C) có thể được phân loại theo các phương pháp bào chế khác nhau. Phương pháp thứ nhất bao gồm việc bào chế vaccin ở thỏ. Thỏ được tiêm truyền CSFV và thu lấy hạch bạch huyết, lách hoặc mô bạch huyết của thỏ để bào chế vaccin phòng CSFV có nguồn gốc từ lách và mô bạch huyết, hoặc vaccin phòng CSFV có nguồn gốc từ thỏ. Phương pháp này có thể ngăn ngừa có hiệu quả sự nhiễm bẩn các virut ngoại sinh và đảm bảo tính ổn định di truyền của virut. Tuy nhiên, cần có nhiều thỏ nên khó kiểm soát chất lượng và giá thành sản xuất vaccin tương đối cao. Phương pháp thứ hai bao gồm việc sử dụng các tế bào sơ cấp của trâu, bò, ngựa hoặc cừu, hoặc dòng tế bào ở lợn để sản xuất vaccin, tức là vaccin phòng CSFV có nguồn gốc tế bào. Ví dụ, vaccin phòng CSFV có nguồn gốc tế bào có thể được bào chế bằng cách đưa virut gây bệnh CSF đã được làm thích ứng ở thỏ (có nguồn gốc ở lách) vào trong các tế bào và tiến hành hai vòng tinh chế vô tính bằng các dung dịch có được do pha loãng nhiều bậc. Phương pháp này không đòi hỏi

sử dụng nhiều con vật. Theo một số phương án, chủng CSFV C có nguồn gốc ở lách và mô bạch huyết. Theo một số phương án, chủng CSFV C là chủng CSFV C có nguồn gốc tế bào, có thể là từ các tế bào sơ cấp hoặc từ một dòng tế bào.

Theo một số phương án, CSFV giảm độc lực được mã hoá bởi trình tự nucleotit tương đồng ít nhất là 80% với SEQ ID NO: 10 (tức là trình tự mã hoá hệ gen của chủng CSFV C). Theo một số phương án, CSFV giảm độc lực được mã hoá bởi SEQ ID NO: 10.

Theo một số phương án, CSFV giảm độc lực có số hiệu lưu giữ vi sinh vật tại CGMCC là 3891 (chủng CSFV giảm độc lực này ở đây cũng được gọi là chủng CSFV C hoặc chủng F16, hoặc chủng CSFV C (F16)). Chủng CSFV C (F16) là chủng CSFV C có nguồn gốc tế bào.

Theo một số phương án, vacxin phòng virus ở lợn thứ hai là vacxin phòng virus gây bệnh giả dại (PRV).

PRV thuộc họ Herpesviridae và họ phụ Alpherpesvirinae. Hiện nay, chỉ có một typ huyết thanh của PRV đã được nhận dạng. Hệ gen của PRV là ADN hai sợi, có độ dài khoảng 150 kb. Hệ gen virus này có cấu tạo gồm một vùng dài duy nhất (UL), một vùng ngắn duy nhất (US), các trình tự lặp ở đầu mút nằm sát bên cạnh vùng US và các trình tự lặp nằm bên trong. Cho tới nay, có 65 gen đã xác định được vị trí trong hệ gen PRV và đa phần trong các gen đó đã được xác định đặc trưng về chức năng. Có 56 gen đã xác định được vị trí trong vùng UL, bao gồm các gen mã hoá các glycoprotein như gB, gC, gH, gK, gL, gM, gN, thymidin kinaza (TK), nucleaza kiềm (AN), ribonucleotit reductaza (RR), ADN polymeraza (POL), gen DBP, gen MCP, gen ICP18.5 và gen mã hoá protein sớm 0 (EP0), v.v. Vùng US đã được xác định trình tự hoàn toàn, trong đó 7 gen đã xác định được vị trí, bao gồm các gen mã hoá các glycoprotein là gD, gE, gG, gI và gen mã hoá protein kinaza (PK), gen mã hoá protein khối lượng 11 kD và 28 kD.

Theo một số phương án, vacxin phòng PRV chứa PRV giảm độc lực. Thuật ngữ “vacxin chứa PRV giảm độc lực” chỉ PRV có khả năng nhiễm vào vật chủ của nó nhưng không gây bệnh giả dại hoặc chỉ gây bệnh với các triệu chứng ít hơn hoặc ít nghiêm trọng hơn. PRV giảm độc lực gồm PRV giảm độc lực còn sống và sản phẩm bất hoạt của virus này. Bệnh “giả dại” chỉ một loạt các triệu chứng sinh lý và bệnh lý

do nhiễm PRV typ hoang dã gây ra. Các triệu chứng đó bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là: sảy thai, thai chết lưu, thai yếu, thai chết do cò ngót, sốt, chán ăn, các triệu chứng thần kinh, liệt, suy hệ thống và thậm chí là chết.

Theo một số phương án, PRV giảm độc lực chứa trình tự nucleotit tương đồng ít nhất là 80% với trình tự có số tham chiếu NCBI là NC_006151, ví dụ như có sự tương đồng ít nhất là 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%.

Theo một số phương án, PRV giảm độc lực có một hoặc vài gen bị làm bất hoạt có liên quan với khả năng gây bệnh. Gen “bị làm bất hoạt” chỉ gen mà chức năng của nó bị giảm hoặc bị loại bỏ do sự thiếu hoặc khuyết các trình tự trọn vẹn hoặc các trình tự không trọn vẹn, hoặc do có các trình tự xen vào hay các đột biến trong gen đó. Các ví dụ về các gen có liên quan với khả năng gây bệnh của PRV bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, gen TK (ví dụ như NCBI gen ID: 2952559), gen PK (ví dụ như NCBI gen ID: 2952530 hoặc 2952561), gen RR (ví dụ như NCBI gen ID: 2952535 hoặc 2952536), gen dUTPaza (ví dụ như NCBI gen ID: 2952537), gen gG (ví dụ như NCBI gen ID: 2952520), gen gC (ví dụ như NCBI gen ID: 2952505), gen gE (ví dụ như NCBI gen ID: 2952530 hoặc 2952517), gen gD (ví dụ như NCBI gen ID: 2952521) và gen gI (ví dụ như NCBI gen ID: 2952516).

Theo một số phương án, PRV giảm độc lực có một hoặc vài gen bị làm bất hoạt được chọn từ nhóm gồm các gen TK, PK, RR, dUTPaza, gG, gC, gE, gD và gI. Theo một số phương án, PRV giảm độc lực chứa một gen gE bị làm bất hoạt. Theo một số phương án, chỉ có gen gE bị làm bất hoạt trong PRV giảm độc lực. Theo một số phương án, PRV giảm độc lực có một gen gE bị làm bất hoạt và còn có một hoặc vài gen bị làm bất hoạt có liên quan với khả năng gây bệnh, ví dụ như các gen TK, PK, RR, dUTPaza, gG, gC, gD và/hoặc gI.

Có thể thu được vacxin giảm độc lực phòng PRV bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, sản phẩm tách biệt của chủng PRV kiểu dại có thể được làm giảm độc lực bằng cách cấy chuyển virus này vào các tế bào không phải của lợn hoặc vào các phôi trứng, hoặc bằng cách nuôi cấy ở nhiệt độ cao và/hoặc với sự có mặt của tác nhân gây đột biến. Nhiều vacxin giảm độc lực phòng PRV đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ như các vacxin chế từ chủng Bartha K61 (chẳng hạn,

xem tài liệu Bartha, A., Experiments to reduce the virulence of Aujeszky's virus. Magyar allatorvosok lapja 16, 42-45 (1961)), chủng BUK, chủng NIA4, chủng Alfort và chủng VGNKI, v.v.. Có thể sử dụng các vaccin giảm độc lực phòng PRV này trong sáng chế. Ví dụ, chủng PRV typ kiểu đại hoặc giảm độc lực có thể được cải biến tiếp, để cho một hoặc vài gen đích có liên quan với khả năng gây bệnh bị làm bất hoạt, nhưng vẫn còn khả năng sao chép. Nhiều vaccin giảm độc lực phòng PRV thu được bằng công nghệ di truyền đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ như các vaccin chế từ chủng PRV-BUK-d13 (chẳng hạn, xem bài báo Kit S. et al., Am. J. Vet. Res., 1985, 46 (6): 1359-1367), chủng PRV dlG/dITK (chẳng hạn, xem bài báo Kit S. et al., Am. J. Vet. Res., 1987, 48 (5): 780-793), chủng S-PRV-002 (chẳng hạn, xem patent Hoa Kỳ 4,514,497), chủng PRV783 (chẳng hạn, xem bài báo Van Oirschot J. T. et al., Am. J. Vet. Res., 1984, 45 (10): 2099-2103), chủng EL-001 và chủng PRV376, v.v.

Theo một số phương án, PRV giảm độc lực thiếu gen gE. Theo một số phương án, PRV giảm độc lực có số hiệu lưu giữ tại CGMCC là 5076 (ở đây chủng PRV giảm độc lực này cũng được gọi là chủng PRV Bartha K61).

Theo một số phương án, PRV giảm độc lực còn chứa một hoặc vài gen bị làm bất hoạt không ảnh hưởng tới sự sao chép virus hoặc không gây nhiễm cho cơ thể chủ. Theo một số phương án, PRV giảm độc lực còn chứa một hoặc vài gen không đồng nhất, không có mặt trong hệ gen của PRV. Các gen không đồng nhất được xen vào này có thể được dùng để phát hiện và/hoặc để chẩn đoán các vaccin.

Theo một số phương án, chế phẩm vaccin còn chứa vaccin lợn thứ ba, trong đó vaccin phòng PRRSV, vaccin phòng virus ở lợn thứ hai và vaccin phòng virus ở lợn thứ ba về cơ bản không ức chế miễn dịch lẫn nhau. Theo một số phương án, vaccin phòng virus ở lợn thứ ba được chọn từ vaccin phòng CSFV và vaccin phòng PRV, với điều kiện là vaccin thứ hai khác với vaccin thứ ba.

Theo một số phương án, các chế phẩm vaccin chứa vaccin phòng PRRSV, vaccin phòng CSFV và vaccin phòng PRV, trong đó vaccin phòng PRRSV, vaccin phòng CSFV và vaccin phòng PRV về cơ bản không ức chế miễn dịch lẫn nhau. Ba vaccin này, khi được phối hợp thành một chế phẩm vaccin, thì về cơ bản sẽ không làm giảm việc sản xuất kháng thể và/hoặc giảm lượng tiểu quần thể tế bào T trong cơ thể chủ khi đáp ứng lại vaccin phòng PRRSV, vaccin phòng CSFV và/hoặc vaccin phòng

PRV. Theo một số phương án, vaccin phòng PRRSV chứa chủng PRRSV TJM. Vaccin phòng CSFV chứa bất kỳ chủng CSFV giảm độc lực nào được đề xuất ở đây, bao gồm, nhưng không phải chỉ giới hạn là, chủng CSFV C. Vaccin phòng PRV chứa bất kỳ chủng PRV giảm độc lực nào được đề xuất ở đây, ví dụ như, nhưng không phải chỉ giới hạn là, chủng PRV Bartha K61.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin chứa chủng PRRSV TJM có số hiệu lưu giữ vi sinh vật tại CGMCC là 3121 và chủng CSFV C. Theo một số phương án, chủng CSFV C là CSFV F16 có số hiệu lưu giữ vi sinh vật tại CGMCC là 3891. Chủng PRRSV TJM và chủng CSFV C (F16) không thể hiện bất kỳ sự ức chế miễn dịch hoặc sự làm giảm miễn dịch nào đối với nhau. Cả hai chủng để bào chế vaccin này đều rất an toàn, có khả năng tạo miễn dịch và có tính đặc hiệu, cũng như có thể bảo vệ có hiệu quả kháng cả virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn có khả năng gây bệnh cao, cũng như virus gây sốt cổ điển ở lợn có khả năng gây bệnh cao; các bệnh do các virus này gây ra là hai trong số các bệnh dịch chủ yếu ở các đàn lợn.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin chứa chủng PRRSV TJM có số hiệu lưu giữ vi sinh vật tại CGMCC là 3121 và chủng PRV Bartha K61 có số hiệu lưu giữ vi sinh vật tại CGMCC là 5076. Chủng PRRSV TJM và chủng PRV Bartha K61 không thể hiện bất kỳ sự ức chế miễn dịch hoặc sự làm giảm miễn dịch nào đối với nhau. Cả hai chủng để bào chế vaccin này đều rất an toàn, có khả năng tạo miễn dịch và có tính đặc hiệu, cũng như có thể bảo vệ có hiệu quả kháng cả virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn có khả năng gây bệnh cao và virus gây bệnh giả dại; các bệnh do các virus này gây ra là hai trong số các bệnh dịch chủ yếu ở các đàn lợn.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm vaccin chứa chủng PRRSV TJM, chủng CSFV C (F16) và chủng PRV Bartha K61. Chủng PRRSV TJM, chủng CSFV C (F 16) và chủng PRV Bartha K61 không thể hiện bất kỳ sự ức chế miễn dịch hoặc sự làm giảm miễn dịch nào đối với nhau. Ba chủng để bào chế vaccin này đều rất an toàn, có khả năng tạo miễn dịch và có tính đặc hiệu, cũng như có thể bảo vệ có hiệu quả kháng virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn có khả năng gây bệnh cao, virus gây bệnh sốt cổ điển ở lợn và virus gây bệnh giả dại; các bệnh do các virus này gây ra là ba trong số các bệnh dịch chủ yếu ở các đàn lợn.

Thông tin chi tiết về ký gửi chủng PRRSV TJM như sau: Số ký gửi vi sinh vật tại CGMCC là 3121; Tên phân loại: Virus gây Hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn; Địa chỉ ký gửi: Viện Vi sinh vật học, Viện Hàn lâm Khoa học Trung Quốc, Số 1 đường Tây Beichen, Quận Chaoyang, Bắc Kinh, Trung Quốc; Đơn vị nhận ký gửi: Trung tâm lưu giữ sản phẩm nuôi cấy vi sinh vật thông thường; ngày ký gửi: 15 tháng 6 năm 2009.

Thông tin chi tiết về ký gửi chủng CSFV C (F16) như sau: Số ký gửi vi sinh vật tại CGMCC là 3891; Tên phân loại: Virus gây Sốt cổ điển ở lợn; Địa chỉ ký gửi: Viện Vi sinh vật học, Viện Hàn lâm Khoa học Trung Quốc, Số 1 đường Tây Beichen, Quận Chaoyang, Bắc Kinh, Trung Quốc; Đơn vị nhận ký gửi: Trung tâm lưu giữ sản phẩm nuôi cấy vi sinh vật thông thường; ngày ký gửi: 27 tháng 5 năm 2010.

Thông tin chi tiết về ký gửi chủng PRV Bartha K61 như sau: Số ký gửi vi sinh vật tại CGMCC là 5076; Tên phân loại: Virus gây bệnh giả dại; Địa chỉ ký gửi: Viện Vi sinh vật học, Viện Hàn lâm Khoa học Trung Quốc, Số 1 đường Tây Beichen, Quận Chaoyang, Bắc Kinh, Trung Quốc; Đơn vị nhận ký gửi: Trung tâm lưu giữ sản phẩm nuôi cấy vi sinh vật thông thường; ngày ký gửi: 21 tháng 7 năm 2011.

Theo một số phương án, chế phẩm vacxin được đề xuất trong sáng chế chứa lượng có hiệu lực miễn dịch của vacxin phòng PRRSV, vacxin phòng CSFV và/hoặc vacxin phòng PRV. Thuật ngữ "lượng có hiệu lực miễn dịch", theo như được sử dụng ở đây, chỉ lượng vacxin đủ để gây được đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở cơ thể chủ để kháng lại kháng nguyên hoặc tác nhân gây bệnh chủ định. Ví dụ, lượng có hiệu lực miễn dịch có thể đủ để gây được hoặc làm chậm được sự khởi phát một hoặc vài triệu chứng nhiễm virus, làm giảm được tỷ lệ ốm và/hoặc tỷ lệ chết của sinh vật chủ bị nhiễm virus, giúp tạo được đủ lượng các kháng thể kháng tác nhân gây bệnh, làm tăng lượng các tiểu quần thể tế bào T và gây được tổ hợp bất kỳ của các tác dụng vừa nêu. Có thể tiến hành xác định đặc tính và/hoặc đánh giá mức độ đáp ứng miễn dịch bảo vệ bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ như bằng cách xác định các hiệu giá kháng thể đối với tác nhân gây bệnh và/hoặc xác định lượng các tiểu quần thể tế bào T, như đã mô tả ở trên, hoặc bằng cách quan sát các biểu hiện lâm sàng của các con lợn được tiêm chủng sau khi tiến hành thử nghiệm dùng liều cao bằng virus độc.

Lượng có hiệu lực miễn dịch của một vacxin phòng virus có thể được đặc trưng

bằng hiệu giá virus, ví dụ bằng liều gây nhiễm nuôi cấy mô 50% (TCID₅₀). Theo một số phương án, lượng có hiệu lực miễn dịch của vaccin phòng PRRSV ít nhất là 10^{3,0} TCID₅₀, 10^{3,5} TCID₅₀, 10^{4,0} TCID₅₀, 10^{4,5} TCID₅₀, 10^{5,0} TCID₅₀ hoặc 10^{5,5} TCID₅₀. Theo một số phương án, lượng có hiệu lực miễn dịch của vaccin phòng PRRSV ít nhất là 10^{4,5} TCID₅₀, ít nhất là 10^{5,0} TCID₅₀ hoặc ít nhất là 10^{5,5} TCID₅₀. Theo một số phương án, các chế phẩm vaccin được đề xuất trong sáng chế chứa khoảng 10^{4,5} TCID₅₀ đến khoảng 10^{6,0} TCID₅₀ hoặc khoảng 10^{5,0} TCID₅₀ đến khoảng 10^{6,0} TCID₅₀ của vaccin phòng PRRSV.

Theo một số phương án, lượng có hiệu lực miễn dịch của vaccin phòng CSFV ít nhất là 10^{0,5} FA-TCID₅₀ (tức kháng thể huỳnh quang - TCID₅₀), 10^{1,0} FA-TCID₅₀, 10^{1,5} FA-TCID₅₀, 10^{2,0} FA-TCID₅₀, 10^{2,5} FA-TCID₅₀, 10^{3,0} FA-TCID₅₀, 10^{3,5} FA-TCID₅₀, 10^{4,0} FA-TCID₅₀, 10^{4,5} FA-TCID₅₀ hoặc 10^{5,0} FA-TCID₅₀. Theo một số phương án, lượng có hiệu lực miễn dịch của vaccin phòng CSFV ít nhất là 10^{4,0} FA-TCID₅₀/ml. Theo một số phương án, các chế phẩm vaccin do sáng chế đề xuất chứa khoảng 10^{0,5} FA-TCID₅₀ đến khoảng 10^{5,0} FA-TCID₅₀, hoặc khoảng 10^{4,0} FA-TCID₅₀ đến khoảng 10^{5,0} FA-TCID₅₀ của vaccin phòng CSFV. Thuật ngữ "FA-TCID₅₀" chỉ trị số TCID₅₀ được xác định bằng phương pháp dựa trên kháng thể huỳnh quang.

Theo một số phương án, lượng có hiệu lực miễn dịch của vaccin phòng CSFV ít nhất là 2,5 RID, 3 RID, 5 RID, 10 RID, 30 RID, 100 RID, 150 RID, 300 RID, 750 RID, 1000 RID, 3000 RID hoặc 7500 RID.

Theo một số phương án, lượng có hiệu lực miễn dịch của vaccin phòng PRV ít nhất là 10^{3,0} TCID₅₀, 10^{3,5} TCID₅₀, 10^{4,0} TCID₅₀, 10^{4,5} TCID₅₀, 10^{5,0} TCID₅₀, 10^{5,5} TCID₅₀ hoặc 10^{6,0} TCID₅₀. Theo một số phương án, lượng có hiệu lực miễn dịch của vaccin phòng PRV ít nhất là 10^{5,5} TCID₅₀, hoặc ít nhất là 10^{6,0} TCID₅₀. Theo một số phương án, các chế phẩm vaccin được đề xuất ở đây chứa khoảng 10^{5,0} TCID₅₀ đến khoảng 10^{6,5} TCID₅₀, hoặc khoảng 10^{5,5} TCID₅₀ đến khoảng 10^{6,5} TCID₅₀ của vaccin phòng PRV.

Có thể xác định TCID₅₀ của vaccin phòng virus bằng bất kỳ phương pháp thích hợp nào đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, vaccin phòng virus (vaccin phòng PRRSV và/hoặc vaccin phòng PRV) có thể được bào chế dưới dạng dung dịch chứa virus; các dung dịch loãng pha loãng 10 bậc có thể được pha chế từ dung dịch virus này

và được đưa lên phiên nuôi cấy 96 giếng đã gieo các tế bào miễn cảm. Các dung dịch virus của mỗi bậc pha loãng có thể được đưa lên 8 giếng với lượng 100 μ l/giếng. Các phiên nuôi cấy được đặt trong tủ áp ở nhiệt độ 37°C, có 5% CO₂, và được nuôi cấy trong thời gian 4 đến 5 ngày. Các tế bào được quan sát về hiệu quả gây bệnh tế bào và tính toán TCID₅₀ dưới dạng nồng độ virus mà tại đó 50% sản phẩm nuôi cấy mô thể hiện hiệu quả gây bệnh tế bào. Có thể tham khảo mô tả chi tiết phương pháp này trong tài liệu Reed LJ, Muench H, A simple phương pháp of estimating fifty percent end points. Am J Hyg 1938; 27:493-97.

CSFV là virus không có hiệu quả gây bệnh tế bào rõ ràng, và do đó, TCID₅₀ được xác định bằng phương pháp huỳnh quang miễn dịch hoặc bằng nghiên cứu gây nhiễm trên thỏ. Theo một số phương án, FA-TCID₅₀ đối với vaccine phòng CSFV được xác định bằng phương pháp huỳnh quang miễn dịch. Nói chung, vaccine phòng chủng CSFV được bào chế thành dạng dung dịch chứa 1 liều/ml và các dung dịch pha loãng 10 bậc được pha chế với môi trường nuôi cấy DMEM (môi trường của Eagle được cải tiến theo Dulbecco) có bổ sung 3,5% huyết thanh. Các dung dịch loãng chứa mật độ virus bằng 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ và 10⁻⁵ so với các mẫu virus ban đầu được cấy tương ứng lên đơn lớp tế bào BT với tỷ lệ 0,1 ml/giếng. Sau 3-4 ngày nuôi cấy, các tế bào được cố định và được cho tiếp xúc với một kháng thể đơn dòng huỳnh quang của CSFV (dành cho phương pháp huỳnh quang miễn dịch trực tiếp). Sau khi để phản ứng trong thời gian 45-60 phút, các tế bào được quan sát về sự hiện diện của huỳnh quang chỉ ra sự có mặt của virus. Hay theo cách khác, các tế bào đã cố định có thể được cho tiếp xúc với một kháng thể đơn dòng không được đánh dấu của CSFV (dành cho phương pháp huỳnh quang miễn dịch gián tiếp) và sau khi để phản ứng trong thời gian 45-60, các tế bào được cho phản ứng với kháng thể thứ cấp được đánh dấu huỳnh quang, trong thời gian 45-60 phút nữa. Các tế bào được quan sát về sự hiện diện của huỳnh quang chỉ ra sự có mặt của virus. FA-TCID₅₀ được tính toán theo phương pháp Reed-Muenc (chẳng hạn, xem tài liệu Reed LJ, Muench H, A simple method of estimating fifty percent end points. Am J Hyg 1938; 27:493-97).

Theo một số phương án, lượng vaccine phòng CSFV được xác định bằng liều có thể gây nhiễm virus cho thỏ. Nói chung vaccine phòng chủng CSFV được pha chế thành dung dịch chứa 1 liều, và sau đó được pha loãng 7500 lần để chuẩn bị mẫu thử

nghiệm. Hai thỏ có thể trọng 1,5-3 kg được tiêm cho mỗi con 1 ml dung dịch mẫu thử nghiệm; đo thân nhiệt của thỏ hai lần mỗi ngày trong 48 giờ đầu tiên, và sau đó cứ 6 giờ thì đo một lần. Các phản ứng thân nhiệt được theo dõi và được phân loại theo tiêu chuẩn sau: 1) phản ứng sốt điển hình (++) : thời kỳ tiềm khoảng 48-96 giờ, thân nhiệt tăng lên đáng kể, trong đó ít nhất có 3 trị số thân nhiệt tăng vượt quá thân nhiệt bình thường ít nhất là 1°C và kéo dài trong thời gian 18-36 giờ; 2) phản ứng sốt nhẹ (+) : thời kỳ tiềm khoảng 48-96 giờ, thân nhiệt tăng lên đáng kể, trong đó ít nhất có 2 trị số thân nhiệt tăng vượt quá thân nhiệt bình thường ít nhất là $0,5^{\circ}\text{C}$ và kéo dài trong thời gian 12-36 giờ; 3) phản ứng sốt còn chưa chắc chắn ($\pm$) : thời kỳ tiềm khoảng 48-96 giờ, thân nhiệt giao động, thân nhiệt cao kéo dài trong thời gian dưới 12 giờ, hoặc thời kỳ tiềm ít nhất là 24 giờ, và phản ứng sốt thể hiện trong vòng 48 giờ, hoặc sau 96 đến 120 giờ; và 4) không có phản ứng sốt (-) : thân nhiệt bình thường. Vacxin được xác định có lượng là 7500 RID, nếu như cả hai thỏ thử nghiệm đều thể hiện phản ứng sốt điển hình (++) , hoặc một trong các thỏ đó thể hiện phản ứng sốt điển hình (++) , còn thỏ kia thể hiện phản ứng sốt nhẹ (+). Trong trường hợp các thỏ này thể hiện các phản ứng khác khó xác định rõ, thì có thể lặp lại thử nghiệm, nhưng không nên làm lặp lại quá 3 lần.

Các vacxin đơn phòng virus có thể được trộn lẫn theo tỷ lệ thích hợp để cho các chế phẩm vacxin được mô tả trong sáng chế. Ví dụ, vacxin đơn phòng virus có thể được bào chế dưới dạng dung dịch virus chứa chủng virus để bào chế vacxin với một hiệu giá virus nào đó (chẳng hạn, một TCID_{50} nào đó) và hai hoặc vài vacxin đơn phòng virus được trộn lẫn theo tỷ lệ thích hợp để cho chế phẩm vacxin kết hợp chứa từng vacxin đơn với lượng (chẳng hạn, TCID_{50}) hoặc tỷ lệ đã định trước.

Theo một số phương án, trong thành phần chế phẩm vacxin kết hợp chứa vacxin phòng PRRSV và vacxin phòng CSFV, thì tỷ lệ TCID_{50} giữa vacxin phòng PRRSV và vacxin phòng CSFV nằm trong khoảng từ 10000:1 đến 1:1, 1000:1 đến 1:1, 100:1 đến 1:1, 10:1 đến 1:1 hoặc 5:1 đến 1:1. Ví dụ, chế phẩm vacxin có thể chứa $10^{4,5}$ TCID_{50} của vacxin phòng PRRSV và $10^{0,5}$ FA- TCID_{50} của vacxin phòng CSFV, hoặc $10^{4,5}$ TCID_{50} của vacxin phòng PRRSV và $10^{3,5}$ FA- TCID_{50} của vacxin phòng CSFV, hoặc $10^{5,0}$ TCID_{50} của vacxin phòng PRRSV và $10^{4,0}$ FA- TCID_{50} của vacxin phòng CSFV.

Theo một số phương án, trong thành phần chế phẩm vacxin kết hợp chứa vacxin phòng PRRSV và vacxin phòng PRV, thì tỷ lệ TCID₅₀ giữa vacxin phòng PRRSV và vacxin phòng PRV nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:30, 1:1 đến 1:25, 1:1 đến 1:20, 1:1 đến 1:15, 1:1 đến 1:10, 1:1 đến 1:9, 1:1 đến 1:8, 1:1 đến 1:7, 1:1 đến 1:6, 1:1 đến 1:5, 1:2 đến 1:10, 1:3 đến 1:10, 1:4 đến 1:10 hoặc 1:5 đến 1:10. Ví dụ, chế phẩm vacxin có thể chứa 10^{4,5} TCID₅₀ của vacxin phòng PRRSV và 10^{5,5} TCID₅₀ của vacxin phòng PRV, hoặc 10^{5,0} TCID₅₀ của vacxin phòng PRRSV và 10^{5,5} TCID₅₀ của vacxin phòng PRV, hoặc 10^{5,0} TCID₅₀ của vacxin phòng PRRSV và 10^{6,5} TCID₅₀ của vacxin phòng PRV.

Theo một số phương án, trong thành phần chế phẩm vacxin kết hợp chứa vacxin phòng PRRSV, vacxin phòng CSFV và vacxin phòng PRV, thì tỷ lệ TCID₅₀ vacxin phòng PRRSV : vacxin phòng CSFV : vacxin phòng PRV là bằng khoảng 10⁴: 1: 10⁵ đến khoảng 5:1:6. Ví dụ, chế phẩm vacxin có thể chứa 10^{4,5} TCID₅₀ của vacxin phòng PRRSV, 10^{0,5} FA-TCID₅₀ của vacxin phòng CSFV và 10^{5,5} TCID₅₀ của vacxin phòng PRV. Một ví dụ khác, chế phẩm vacxin có thể chứa 10^{4,5} TCID₅₀ của vacxin phòng PRRSV, 10^{4,0} FA-TCID₅₀ của vacxin phòng CSFV và 10^{5,5} TCID₅₀ của vacxin phòng PRV. Một ví dụ khác, chế phẩm vacxin có thể chứa 10^{5,7} TCID₅₀ của vacxin phòng PRRSV, 10^{5,0} FA-TCID₅₀ của vacxin phòng CSFV và 10^{5,8} TCID₅₀ của vacxin phòng PRV. Một ví dụ khác, chế phẩm vacxin có thể chứa 10^{6,0} TCID₅₀ của vacxin phòng PRRSV, 10^{5,0} FA-TCID₅₀ của vacxin phòng CSFV và 10^{6,5} TCID₅₀ của vacxin phòng PRV.

Các chế phẩm vacxin được đề xuất trong sáng chế có thể còn chứa tá chất. Tá chất này có thể bảo vệ vacxin khỏi bị xuống cấp *in vivo* và/hoặc có thể kích thích không đặc hiệu hệ miễn dịch, do đó có thể giúp làm tăng đáp ứng miễn dịch với vacxin này. Các ví dụ về tá chất là, nhưng không phải chỉ giới hạn ở, các muối vô cơ (chẳng hạn như nhôm hydroxit, nhôm phosphat, canxi hydroxit), nhũ tương nước trong dầu (chẳng hạn như tá chất Freund toàn vẹn, tá chất Freund không toàn vẹn, v.v.), các tá chất saponin (chẳng hạn như Stimulon™, v.v.), các dẫn xuất từ các vi khuẩn hoặc các vi sinh vật (chẳng hạn như LPS, các dẫn xuất lipid A, v.v.) và các vi hạt (chẳng hạn như poly-a-hydroxyaxit, v.v.).

Chế phẩm vacxin được đề xuất trong sáng chế còn có thể chứa tác nhân bảo vệ

đông lạnh. Tác nhân bảo vệ đông lạnh có thể giữ cho sản phẩm sinh học rất bền vững và làm giảm mức độ tổn hại hoạt tính sinh học của vacxin trong quá trình làm đông lạnh. Các ví dụ về tác nhân bảo vệ đông lạnh là saccaroza, L-natri glutamat hoặc sản phẩm thuỷ phân albumin sữa, v.v..

Các phương pháp bào chế vacxin:

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp bào chế các chế phẩm vacxin được đề xuất trong sáng chế, bao gồm các bước: a) thu lấy chủng virus để bào chế vacxin phòng PRRSV, chủng virus để bào chế vacxin phòng CSFV và/hoặc chủng virus để bào chế vacxin phòng PRV, mà các chủng này được nuôi cấy trên các tế bào miễn cảm tương ứng của chúng, b) phối trộn hai hoặc vài chủng virus vừa nêu theo tỷ lệ TCID₅₀ thích hợp.

Theo một số phương án, bước a) bao gồm các việc: cấy chủng virus để bào chế vacxin phòng PRRSV, chủng virus để bào chế vacxin phòng CSFV và/hoặc chủng virus để bào chế vacxin phòng PRV lên các tế bào miễn cảm tương ứng của chúng; nuôi cấy các tế bào này để tạo ra các virus giống dùng cho sản xuất vacxin, cấy các virus giống lên các tế bào miễn cảm tương ứng của chúng, nhân các tế bào này để thu được các dung dịch kháng nguyên chứa các virus tương ứng.

Theo một số phương án, chủng virus để bào chế vacxin phòng PRRSV là chủng để bào chế vacxin giảm độc lực của PRRSV có khả năng gây bệnh cao. Theo một số phương án, chủng để bào chế vacxin phòng PRRSV là chủng PRRSV TJM.

Theo một số phương án, chủng để bào chế vacxin phòng CSFV là CSFV giảm độc lực. Theo một số phương án, chủng để bào chế vacxin phòng CSFV là chủng CSFV C (F16).

Theo một số phương án, chủng để bào chế vacxin phòng PRV là PRV giảm độc lực. Theo một số phương án, chủng để bào chế vacxin phòng PRV là chủng Bartha K61.

Theo một số phương án, các tế bào miễn cảm với chủng vacxin phòng PRRSV là, nhưng không phải chỉ giới hạn là, các dòng tế bào như dòng tế bào Marc-145, dòng tế bào MA-104, dòng tế bào Vero hoặc dòng tế bào CL-2621, hoặc các tế bào sơ cấp như các tế bào PAM.

Theo một số phương án, các tế bào miễn cảm với chủng vacxin phòng CSFV là,

nhưng không phải chỉ giới hạn là, các các dòng tế bào như dòng tế bào BT, dòng tế bào Vera, dòng tế bào MPK, dòng tế bào SK6, dòng tế bào PK2a, dòng tế bào CPK, dòng tế bào RKC, dòng tế bào MDBK, dòng tế bào MDCK, dòng tế bào CRFK, dòng tế bào PT và dòng tế bào ST, hoặc các tế bào sơ cấp như các tế bào BT. Cả dòng tế bào PT và dòng tế bào ST đều là các dòng tế bào tinh hoàn lợn.

Theo một số phương án, các tế bào miễn cảm với chủng vacxin phòng PRV là, nhưng không phải chỉ giới hạn là, các dòng tế bào để cấy chuyển virus như dòng tế bào ST (ATCC No.: CRL-1746), dòng tế bào PK-15 (ATCC No.: CCL-33), dòng tế bào Marc-145 (ATCC No.: CRL-12219), dòng tế bào MDBK thận bò (ATCC No.: CCL-22), dòng tế bào hình xoắn BT ở bò (ATCC No.: CRL-1390), dòng tế bào Vera (ATCC No.: CCL-81), dòng tế bào BHK-21 (ATCC No.: CCL-10), dòng tế bào thận lợn (xem dòng tế bào IBRS-2, chẳng hạn như trong tài liệu DECASTRO, M. P. 1964. Behavior of foot and mouth disease virus in cell culture: susceptibility of the IB-RS-2 swine cell line. *Arquivos Instituto Biologica* 31 : 63-78) và dòng tế bào RK thận thỏ (ATCC No.: CCL-106); hoặc các tế bào sơ cấp như các nguyên bào sợi phôi gà và các tế bào thận lợn. Có thể thu được các tế bào sơ cấp bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ như bằng cách tách biệt các mô từ động vật và xử lý để thu được các tế bào đó.

Theo một số phương án, tốt hơn, các tế bào miễn cảm nêu trên được nuôi cấy ở nhiệt độ 33-37°C, với sự có mặt của 5% CO₂. Các phương pháp nuôi cấy các tế bào miễn cảm này có thể bao gồm các việc: cấy chuyển dòng tế bào sau khi tiêu giải bằng dung dịch EDTA-trypsin, tiếp tục nuôi cấy dòng tế bào đó trong môi trường nuôi cấy; khi các tế bào đạt đến độ hội kết 90-100%, thì chúng có thể tiếp tục được cấy chuyển hoặc được cấy virus giống. Tốt hơn, phương pháp nuôi cấy dòng tế bào này là phương pháp bất kỳ trong các phương pháp sau: nuôi cấy các tế bào trong chai lăn và để cho mật độ tế bào đạt đến 1x10⁶/ml - 5x10⁶/ml; hoặc đưa chất mang có tác dụng dính kết vào buồng phản ứng sinh học để nuôi cấy dạng huyền phù và để cho mật độ tế bào đạt đến 5x10⁶/ml - 1x10⁷/ml, trong đó, tốt hơn, chất mang có tác dụng dính kết là vật liệu vi mang hoặc giấy.

Theo một số phương án, chủng vacxin phòng PRRSV được cấy lên các tế bào miễn cảm với chủng đó với hệ số gây nhiễm (MOI) là 0,01-0,5, chủng vacxin phòng

CSFV được cấy lên các tế bào mẫn cảm với chủng đó với MOI là 0,1-0,5, hoặc lượng virus được cấy là 3%-5% virus có nguồn gốc tế bào, và/hoặc chủng vaccine phòng PRV được cấy lên các tế bào mẫn cảm với chủng đó với MOI là 0,005-0,5.

Theo một số phương án, các tế bào được cấy bằng chủng để tạo vaccine phòng virus tương ứng được nuôi cấy trong thời gian 3-5 ngày sau khi cấy, và sau đó có thể thu thập các virus giống để sản xuất vaccine. Đối với chủng PRRSV, virus giống được thu thập khi hiệu quả gây bệnh tế bào đạt được 70%. Đối với chủng CSFV, đợt thu thập đầu tiên được thực hiện bằng cách thay môi trường nuôi cấy vào ngày thứ 5 sau khi cấy virus và các đợt thu thập tiếp sau được thực hiện theo cách, cứ cách nhau 4 ngày thì thay môi trường nuôi cấy, với điều kiện là không thực hiện quá 5 đợt thu thập. Đối với chủng PRV, môi trường nuôi cấy tế bào chứa virus được thu thập 2-3 ngày sau khi cấy virus.

Theo một số phương án, virus giống để sản xuất vaccine phải có hiệu giá virus thích hợp. Ví dụ, virus giống đối với chủng PRRSV TJM có thể có hiệu giá không thấp hơn $10^{7,0}$ TCID₅₀ virus trong mỗi ml, virus giống đối với chủng CSFV C (F16) có thể có hiệu giá > 100000 liều gây nhiễm cho thỏ trong mỗi ml hoặc không thấp hơn $10^{6,0}$ FA-TCID₅₀ virus trong mỗi ml như được xác định bằng thử nghiệm dựa trên huỳnh quang miễn dịch, và/hoặc virus giống đối với chủng PRV Bartha K61 có thể có hiệu giá virus không thấp hơn $10^{8,0}$ TCID₅₀ virus trong mỗi ml.

Theo một số phương án, các virus giống được cấy trên các tế bào mẫn cảm tương ứng của chúng, và được nhân lên để thu được các dung dịch kháng nguyên chứa các virus tương ứng. Theo một số phương án, các dung dịch kháng nguyên, như đã thu được, có hàm lượng virus thích hợp, ví dụ như không thấp hơn $10^{7,0}$ TCID₅₀ virus trong mỗi ml đối với chủng PRRSV TJM; > 100000 RID trong mỗi ml hoặc không thấp hơn $10^{6,0}$ FA-TCID₅₀ virus trong mỗi ml, như được xác định bằng thử nghiệm dựa trên huỳnh quang miễn dịch, đối với chủng CSFV C (F16); và/hoặc không thấp hơn $10^{8,0}$ TCID₅₀ virus trong mỗi ml đối với chủng PRV Bartha K61.

Theo một số phương án, bước b) bao gồm việc phối trộn chủng để bào chế vaccine phòng PRRSV và chủng để bào chế vaccine phòng CSFV thu được theo tỷ lệ TCID₅₀ từ 10000:1 đến 1:1. Theo một số phương án, bước b) bao gồm việc phối trộn virus để bào chế vaccine phòng PRRSV với virus để bào chế vaccine phòng PRV thu

được theo tỷ lệ TCID₅₀ từ 1:1 đến 1:30. Theo một số phương án, bước b) bao gồm việc phối trộn virus để bào chế vaccin phòng PRRSV, virus để bào chế vaccin phòng CSFV và virus để bào chế vaccin phòng PRV theo tỷ lệ TCID₅₀ từ khoảng 10⁴: 1 : 10⁵ đến khoảng 5:1:6.

Theo một số phương án, bước b) còn gồm thêm việc trộn hỗn hợp của các dung dịch virus thu được với tác nhân bảo vệ đông lạnh. Theo một số phương án, hỗn hợp các dung dịch virus thu được được trộn với tác nhân bảo vệ đông lạnh theo tỷ lệ thể tích là 75-80 : 25-20.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các chế phẩm vaccin được bào chế bằng các phương pháp được đề xuất trong sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất thuốc dự phòng hoặc điều trị PRRS, CSF và/hoặc bệnh GD có sử dụng các chế phẩm vaccin được đề xuất trong sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất thuốc miễn dịch cho lợn, có sử dụng chế phẩm vaccin được đề xuất trong sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các chủng virus để bào chế vaccin phòng CSFV, mà các chủng này được nuôi cấy trên dòng tế bào được chọn từ nhóm gồm các dòng tế bào ST, PK-15, Marc- 145, MDBK, BT, Vera, BHK-21, dòng tế bào thận lợn (IBRS-2), dòng tế bào thận thỏ (RK) và dòng nguyên bào sợi phôi gà hoặc tế bào sơ cấp là các tế bào sơ cấp thận lợn. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng các dòng tế bào này trong nuôi cấy chủng vaccin phòng CSFV.

Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm vaccin được bào chế bằng phương pháp bào chế nêu trên; chế phẩm này chứa vaccin phòng PRRSV và vaccin phòng CSFV.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm sinh học để dự phòng hoặc điều trị hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn, cũng như dự phòng hoặc điều trị bệnh sốt cổ điển ở lợn, có sử dụng chế phẩm vaccin này.

Chế phẩm vaccin kết hợp được đề xuất trong sáng chế thể hiện hiệu lực đáng kể trong việc ngăn ngừa virus có khả năng gây bệnh cao gây ra hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn, cũng như virus có khả năng gây bệnh cao gây sốt cổ điển ở lợn. Các chủng có khả năng gây bệnh cao để bào chế vaccin phòng PRRSV và các chủng để bào chế vaccin phòng CSFV được đề xuất trong sáng chế hoàn toàn không thể hiện sự làm

giảm miễn dịch; các chế phẩm vaccin kết hợp bào chế từ các chủng đó không biểu hiện sự khác biệt với từng vaccin trong các vaccin đơn giá của chúng về tính an toàn, khả năng sinh miễn dịch, thời hạn miễn dịch, sự bảo vệ miễn dịch và tính ổn định. Các kết quả nghiên cứu về tính an toàn cho thấy rằng, các con vật được tiêm chủng một liều duy nhất, tiêm các liều nhắc lại, tiêm quá liều vaccin đều có thân nhiệt và trạng thái tinh thần bình thường, không thể hiện bất kỳ triệu chứng lâm sàng nào. Các kết quả nghiên cứu về hiệu lực chỉ ra rằng, vaccin được đề xuất trong sáng chế có thể đưa lại tác dụng bảo vệ đáng kể cho các con vật đối với thử nghiệm dùng liều cao bằng các chủng độc của PRRSV và CSFV có khả năng gây bệnh cao, cũng như có thể ngăn ngừa có hiệu quả sự nhiễm RRSV và CSFV có khả năng gây bệnh cao. Các kết quả nghiên cứu về thời hạn miễn dịch cho thấy rằng, thời hạn miễn dịch kéo dài trong 6 tháng, điều này có thể đảm bảo sự bảo vệ có hiệu quả cho lợn trong thời kỳ miễn dịch. Các kết quả nghiên cứu về tính ổn định cho thấy rằng, có thể bảo quản vaccin ở nhiệt độ 2-8°C trong thời gian 18 tháng, điều này cho thấy lợi thế của nó về thời hạn sử dụng dài và sự bảo quản ổn định. Có thể sử dụng các vaccin được đề xuất trong sáng chế để tiêm chủng cho các động vật và dự phòng được hai bệnh chỉ với một lần tiêm, do vậy làm giảm được công sức tiêm chủng và số lần tạo miễn dịch, giảm đến mức thấp nhất stress gây ra cho các đàn lợn, cũng như ngăn ngừa được sự dung nạp miễn dịch và sự mất miễn dịch do thường xuyên tiêm chủng gây ra.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp tạo miễn dịch cho lợn, bao gồm việc sử dụng cho lợn chế phẩm vaccin được đề xuất trong sáng chế. Có thể tạo miễn dịch cho lợn bằng cách tiêm vaccin, chẳng hạn. Việc tạo miễn dịch có thể chỉ là một lần sử dụng duy nhất một liều vaccin hoặc sử dụng lặp đi lặp lại nhiều liều vaccin. Các phương pháp tạo miễn dịch hoặc các chế độ liều lượng có thể được điều chỉnh bởi chuyên gia thú y có kinh nghiệm tùy theo tình hình thực tế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây nhằm minh họa tiếp sáng chế. Các ưu thế và các đặc điểm của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng theo sự mô tả sáng chế. Tuy nhiên, các minh họa này chỉ mang tính chất ví dụ và không nên được hiểu là các giới hạn phạm vi của sáng chế.

Công việc chung

Việc tiêm chủng các vaccin được thực hiện bằng cách tiêm vaccin vào cơ cổ của lợn. Thử nghiệm dùng liều cao bằng virus được thực hiện bằng cách nhỏ giọt virus vào mũi của các con lợn được thử nghiệm và/hoặc tiêm virus vào cơ của các con lợn được thử nghiệm. FA-TCID₅₀ chỉ lượng virus CSFV được xác định bằng phương pháp dựa trên huỳnh quang miễn dịch.

Thử nghiệm sử dụng FACS (máy tuyển tế bào hoạt hoá huỳnh quang) cho các tế bào T: các tế bào T được xác định bằng phương pháp đo tế bào dòng. Nói chung, các mẫu máu được xử lý bằng chất chống đông, sau đó phân giải các hồng cầu. Các mẫu máu đã xử lý được nhuộm màu bằng kháng thể đơn dòng (mAb) FITC-CD8 (= isothioxyanat florescein-CD8), PE-CD4 mAb, PECy5-CD3 mAb, tương ứng (tất cả các kháng thể này đều mua của hãng 51AB Biotech, Bắc Kinh). Sau khi ủ 45 phút, các kháng thể không phản ứng được loại bỏ, các tế bào được huyền phù hoá bằng PBS (dung dịch NaCl có đệm phosphat) và được phân tích trên máy đo tế bào dòng (BD FACS Aria).

Thử nghiệm ELISA (thử nghiệm chất hấp phụ miễn dịch gắn enzym): Các kháng thể kháng các kháng nguyên PRRSV, các kháng thể kháng các kháng nguyên CSFV được xác định bằng thử nghiệm ELISA, nhờ sử dụng các bộ đồ thử nghiệm để phát hiện tương ứng mua của công ty Beijing IDEXX Yuanheng Laboratories Co., Ltd.

Phần I: Bào chế chế phẩm vaccin

Ví dụ 1: Bào chế chế phẩm vaccin phòng PRRSV

Chuyển virus lên tế bào và nuôi cấy:

Các tế bào Marc-145, dùng nuôi cấy chủng TJM để bào chế vaccin phòng PRRSV, được xử lý bằng trypsin và được chia thành 3 phần đều nhau. Các tế bào được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong môi trường nuôi cấy. Sau khi các tế bào tạo thành đơn lớp, thì chúng được cấy chuyển hoặc được cấy một chủng virus

Nhân virus giống trong tế bào:

Chủng TJM để bào chế vaccin phòng PRRSV có độc lực cao được cấy lên các tế bào Marc-145 với MOI là 0,01-0,5. Các tế bào đã cấy virus được nuôi cấy trong thời gian 3-5 ngày và thu lấy dung dịch virus khi hiệu quả gây bệnh (CPE) đạt được 70%.

Sử dụng dung dịch virus thu được làm virus giống của chủng PRRSV TJM.

Virus giống này được xác định các số liệu đặc trưng theo Dược điển thú y của Cộng hoà Nhân dân Trung Hoa. Virus giống không chứa vi khuẩn, mốc và chất nấm. Các dung dịch virus giống PRRSV không thể hiện tác dụng có hại cho lợn. Dung dịch virus giống của chủng PRRSV TJM chứa không dưới $10^{7,0}$ TCID₅₀ virus trong mỗi ml.

Nhân dung dịch virus để sản xuất vaccine:

Các tế bào Marc-145 được nuôi cấy đến khi tạo thành đơn lớp hội kết tế bào 90-100%. Môi trường nuôi cấy tế bào được gạn ra và các tế bào được rửa hai lần bằng PBS. Dung dịch virus giống của chủng PRRSV TJM được cấy với MOI là 0,01-0,5. Các tế bào đã cấy chuyển virus được nuôi cấy trong thời gian 3-5 ngày và thu lấy dung dịch virus khi CPE đạt được 70%. Sử dụng dung dịch virus thu được làm dung dịch virus để sản xuất vaccine. Dung dịch virus này được xác định các số liệu đặc trưng, và không chứa vi khuẩn, mốc hoặc chất nấm; dung dịch virus này của chủng PRRSV TJM chứa không dưới $10^{7,0}$ TCID₅₀ virus trên mỗi 1 ml. Pha loãng dung dịch virus một cách thích hợp để thu được vaccine đơn phòng PRRSV, hoặc phối trộn với các vaccine khác để thu được các chế phẩm vaccine kết hợp.

Ví dụ 2: Bào chế chế phẩm vaccine phòng CSFV

Chuyển virus lên tế bào và nuôi cấy:

Các tế bào BT, được sử dụng để nuôi cấy chủng virus để bào chế vaccine phòng CSFV, được xử lý bằng trypsin và được chia làm 5 phần đều nhau. Các tế bào này được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong môi trường nuôi cấy. Sau khi các tế bào tạo thành đơn lớp, thì chúng được cấy chuyển hoặc được cấy bằng một chủng virus.

Chủng CSFV C (F16) được pha chế thành dung dịch virus 0,3% và được cấy vào đơn lớp tế bào BT. Các tế bào đã cấy được nuôi cấy trong thời gian 5 ngày và thu lấy dung dịch virus để làm virus giống của chủng chế vaccine phòng CSFV.

Xác định số liệu đặc trưng của các virus giống

Các virus giống được xác định các số liệu đặc trưng theo Dược điển thú y của Cộng hoà Nhân dân Trung Hoa. Các virus giống không chứa vi khuẩn, mốc và chất nấm. Chủng CSFV C (F16) đã được thử nghiệm là dung dịch virus giống có đủ chất lượng và không thể hiện tác dụng có hại cho lợn. Dung dịch virus giống của chủng

CSFV C (F16) chứa > 100000 liều gây nhiễm cho thỏ (RID), hoặc chứa không dưới $10^{6,0}$ FA-TCID₅₀ virus trong mỗi ml dung dịch virus, như được xác định bằng phương pháp dựa trên huỳnh quang miễn dịch.

Nhân dung dịch virus để sản xuất vaccine:

Các tế bào BT được nuôi cấy thành đơn lớp hội kết 90-100%. Môi trường nuôi cấy được gạn ra và rửa các tế bào hai lần bằng PBS. Dung dịch virus giống của chủng CSFV C (F16) được cấy với MOI là 0,1-0,5 hoặc với lượng bằng 3%-5%. Vào ngày thứ 5 sau khi ủ, tiến hành thu thập lần thứ nhất bằng cách thay môi trường nuôi cấy, và cứ cách nhau 4 tuần, tiến hành thu thập các lần tiếp theo, với điều kiện là không tiến hành quá 5 lần thu thập. Các dung dịch virus thu được được bảo quản ở nhiệt độ thấp hơn -20°C và được sử dụng làm dung dịch virus để sản xuất vaccine. Dung dịch virus này được xác định các số liệu đặc trưng; dung dịch virus giống của chủng CSFV C (F16) chứa > 100000 RID, hoặc không thấp hơn $10^{6,0}$ FA-TCID₅₀ virus trong mỗi ml dung dịch virus, như được xác định bằng phương pháp dựa trên huỳnh quang miễn dịch. Dung dịch virus được pha loãng thích hợp để tạo ra vaccine đơn phòng CSFV hoặc được phối trộn với các vaccine khác để được các chế phẩm vaccine kết hợp.

Ví dụ 3: Bào chế chế phẩm vaccine phòng PRV

Chuyển virus lên tế bào và nuôi cấy:

Các tế bào Marc-145, các tế bào MDBK và các tế bào BT, sử dụng cho nuôi cấy chủng Bartha K61 để bào chế vaccine phòng PRV, đã được xử lý bằng trypsin, và tương ứng, được chuyển vào môi trường nuôi cấy tế bào. Các tế bào này được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C trong môi trường nuôi cấy. Sau khi các tế bào tạo thành đơn lớp, thì, tương ứng, chúng được cấy chuyển hoặc được cấy bằng một chủng virus.

Nhân virus giống trong tế bào:

Chủng Bartha K61 dùng chế vaccine phòng PRV được cấy lên các đơn lớp tế bào Marc-145, tế bào MDBK hoặc tế bào BT trong môi trường MEM (môi trường thiết yếu tối thiểu) chứa 2-4% huyết thanh bò. Các tế bào đã cấy virus được nuôi cấy riêng từng thứ trong thời gian 2-3 ngày và các dung dịch virus được thu thập làm virus giống của chủng để bào chế vaccine phòng PRV.

Xác định các số liệu đặc trưng của các virus giống:

Các virus giống được xác định các số liệu đặc trưng. Các virus giống PRV được thử nghiệm là dung dịch giống có chất lượng và không thể hiện các tác dụng có hại đối với lợn. Dung dịch virus giống của chủng PRV chứa không dưới $10^{8,0}$ TCID₅₀ virus trong mỗi ml.

Nhân dung dịch virus của chủng virus để bào chế vaccine phòng PRV:

Chủng PRV được cấy lên đơn lớp hội kết của các tế bào Marc-145, các tế bào MDBK hoặc các tế bào BT với MOI là 0,005-0,5, có môi trường nuôi cấy được thêm vào. Các tế bào đã cấy virus này được nuôi cấy ở nhiệt độ 36-37°C và dung dịch virus được thu thập khi CPE đạt đến 70%.

Lượng dung dịch virus được xác định sau khi làm đông lạnh và tan đông lạnh trong hai chu trình. Dung dịch virus giống chứa không dưới $10^{8,0}$ TCID₅₀ virus trong mỗi ml. Dung dịch virus được xác định các số liệu đặc trưng theo Dược điển thú y của Cộng hòa Nhân dân Trung Hoa và không chứa vi khuẩn, mốc và chất nấm. Các dung dịch virus đảm bảo chất lượng được bảo quản ở nhiệt độ dưới -15°C và được sử dụng làm dung dịch virus để sản xuất vaccine. Dung dịch virus được pha loãng thích hợp để thu được vaccine đơn phòng PRV hoặc được phối trộn với các vaccine khác để được các chế phẩm vaccine kết hợp.

Ví dụ 4: Bào chế chế phẩm vaccine kết hợp để phòng PRRSV và CSFV

Dung dịch kháng nguyên được pha chế bằng cách phối hợp dung dịch virus của chủng PRRSV TJM (được pha chế theo Ví dụ 1) với dung dịch virus của chủng CSFV C (F16) (được pha chế theo Ví dụ 2).

Tác nhân bảo vệ đông lạnh, chịu được nhiệt, được pha chế bằng cách phối trộn sacaroza, L-natri glutamat và sản phẩm thủy phân albumin sữa theo tỷ lệ thích hợp, sau đó đun trong nồi hấp.

75-80 phần theo thể tích của dung dịch kháng nguyên được trộn với 25-20 phần theo thể tích của tác nhân bảo vệ đông lạnh và nạp hỗn hợp thu được vào các ống tiêm với lượng đã định trước. Các ống tiêm này được đậy nắp, để ở nhiệt độ thấp và tiến hành quá trình làm đông khô để thu được chế phẩm vaccine đông khô. Chế phẩm vaccine được kiểm tra tính vô khuẩn, tính an toàn và hiệu lực.

Trong mỗi liều chế phẩm vaccine kết hợp phòng PRRSV và CSFV, như đã bào chế, lượng chủng PRRSV TJM là $\geq 10^{5,0}$ TCID₅₀, và lượng chủng CSFV C (F16) là $\geq$

7500 RID (hoặc ≥ 750 RID, hoặc ≥ 150 RID), hoặc không dưới $10^{4,0}$ FA-TCID₅₀ virut, như được xác định bằng phương pháp dựa trên huỳnh quang miễn dịch.

Chế phẩm vaccin kết hợp này được xác định các số liệu đặc trưng theo quy định nêu ở các trang 15, 19 và 20 của phần phụ lục trong cuốn Dược điển thú y của Cộng hoà Nhân dân Trung Hoa. Chế phẩm vaccin kết hợp này không chứa vi khuẩn, mốc, chất nấm và virut ngoại sinh.

Ví dụ 5: Bào chế chế phẩm vaccin kết hợp phòng PRRSV và PRV

Dung dịch kháng nguyên được pha chế bằng cách phối hợp dung dịch virut của chủng PRRSV TJM (được pha chế theo Ví dụ 1) với dung dịch virut của chủng PRV Bartha K61 (được pha chế theo Ví dụ 3).

Tác nhân bảo vệ đông lạnh, chịu nhiệt, được pha chế bằng cách phối trộn saccharoza, L-natri glutamat và sản phẩm thủy phân albumin sữa theo một tỷ lệ thích hợp, sau đó đun trong nồi hơi.

6-8 phần theo thể tích của dung dịch kháng nguyên được trộn với 2-4 phần theo thể tích của tác nhân bảo vệ đông lạnh và nạp hỗn hợp thu được vào các ống tiêm với lượng định trước. Các ống tiêm được đậy nắp, để ở nhiệt độ thấp và tiến hành quá trình làm đông khô để thu được chế phẩm vaccin đông khô.

Trong mỗi liều chế phẩm vaccin kết hợp phòng PRRSV và PRV như đã pha chế, lượng chủng PRRSV TJM là $\geq 10^{5,0}$ TCID₅₀ và lượng chủng PRV Bartha K61 là $\geq 10^{5,5}$ TCID₅₀.

Chế phẩm vaccin kết hợp được xác định các số liệu đặc trưng theo quy định nêu ở các trang 15, 19 và 20 của phần phụ lục trong cuốn Dược điển thú y của Cộng hoà Nhân dân Trung Hoa. Chế phẩm vaccin kết hợp này không chứa vi khuẩn, mốc, chất nấm và virut ngoại sinh.

Ví dụ 6: Bào chế chế phẩm vaccin kết hợp để phòng PRRSV, CSFV và PRV

Dung dịch kháng nguyên được pha chế bằng cách phối trộn dung dịch virut của chủng PRRSV TJM (được pha chế theo Ví dụ 1), dung dịch virut của chủng CSFV C (F16) (được pha chế theo Ví dụ 2) và dung dịch virut của chủng PRV Bartha K61 (được pha chế theo Ví dụ 3).

Tác nhân bảo vệ đông lạnh, chịu nhiệt, được pha chế bằng cách phối trộn

saccharoza, L-natri glutamat và sản phẩm thủy phân albumin sữa theo một tỷ lệ thích hợp, sau đó đun trong nồi hấp.

75-80 phần theo thể tích của dung dịch kháng nguyên được trộn với 25-20 phần theo thể tích của tác nhân bảo vệ đông lạnh, và nạp hỗn hợp thu được vào các ống tiêm với lượng đã định trước. Các ống tiêm này được làm đông khô để cho chế phẩm vaccin. Chế phẩm vaccin được kiểm tra tính vô khuẩn, tính an toàn và hiệu lực.

Trong mỗi liều chế phẩm vaccin kết hợp phòng PRRSV, CSFV và PRV như đã bào chế, lượng virus chủng PRRSV TJM là $\geq 10^{5.0}$ TCID₅₀, lượng virus chủng CSFV C là ≥ 7500 RID (hoặc ≥ 750 RID, ≥ 150 RID), hoặc không thấp hơn $10^{4.0}$ FA-TCID₅₀ của virus như được xác định bằng phương pháp dựa trên huỳnh quang miễn dịch, còn lượng virus chủng PRV Bartha K61 là $\geq 10^{5.5}$ TCID₅₀.

Chế phẩm vaccin kết hợp được xác định các số liệu đặc trưng theo quy định nêu ở các trang 15, 19 và 20 của phần phụ lục trong cuốn Dược điển thú y của Cộng hòa Nhân dân Trung Hoa. Chế phẩm vaccin kết hợp này không chứa vi khuẩn, mốc, chất nấm và virus ngoại sinh.

Ví dụ 7: Xác định đặc điểm về gen của chủng PRRSV TJM

Chủng PRRSV TJM trong dung dịch virus, như được pha chế theo Ví dụ 1, và trong các chế phẩm vaccin kết hợp, như được pha chế theo các Ví dụ 4-6, được xác định đặc điểm bằng PCR (phản ứng dây chuyền có xúc tác polymeraza), nhờ sử dụng các đoạn mồi đặc trưng cho *nsp2* (protein không cấu trúc 2) của PRRSV (đoạn mồi thuận: 5'-GGCAAGAAGTTGAGGAAGT-3'; đoạn mồi nghịch: 5'-TGGCAGGTTGGTCACAGA-3'). Chủng PRRSV TJ là đối chứng dương và nước là đối chứng âm.

Các kết quả thu được chỉ ra dải 207bp đặc trưng trong các mẫu chứa chủng PRRSV TJM khi so sánh với dải 567bp trong đối chứng dương chứa chủng PRRSV TJ (Fig.5). Các kết quả này xác nhận rằng, chủng PRRSV TJM thiếu 360 nucleotit trong gen mã hoá *nsp2*, và còn xác nhận thêm rằng, các vaccin, như đã bào chế, không bị nhiễm bẩn bởi chủng PRRSV TJ.

Ví dụ 8: Xác định đặc điểm về gen của chủng PRV Bartha K61

Chủng PRV Bartha K61 trong dung dịch virus, như được pha chế theo Ví dụ 3,

và trong các chế phẩm vaccin kết hợp, như được pha chế theo các Ví dụ 5-6, được xác định các đặc điểm bằng PCR, nhờ sử dụng các đoạn mồi đặc trưng cho *gE* của PRV (đoạn mồi thuận: 5'-CGTCACGGTCACCAAGGAGC-3'; đoạn mồi nghịch: 5'-GCACAGCACGCAGAGCCAG-3'). Chủng PRV độc (chủng JL1) là đối chứng dương và nước là đối chứng âm.

Theo các kết quả thu được, thì không có dải nào tìm thấy trong các mẫu chứa chủng PRV Bartha K61 khi so sánh với dải 232bp trong chủng PRV độc (Fig.6).

Các kết quả này xác nhận rằng, chủng PRV Bartha K61 chứa đoạn khuyết trong gen mã hoá cho *gE*, và còn xác nhận thêm rằng, các vaccin, như được bào chế, không bị nhiễm bẩn bởi chủng PRV độc.

Phần II: Nghiên cứu hiệu lực của vaccin

Ví dụ 9: Xác định liều tối thiểu có hiệu lực miễn dịch đối với chủng PRRSV TJM

25 lợn đã cai sữa khoẻ mạnh được sử dụng trong nghiên cứu này. Các con lợn này âm tính về PRRSV có khả năng gây bệnh cao, xét theo cả kháng nguyên và kháng thể. Các lợn được phân ngẫu nhiên thành 5 nhóm. Các nhóm I đến IV được tiêm chủng các liều khác nhau của chủng PRRSV TJM, trong khi nhóm V được giữ là đối chứng âm (Bảng 1). Các lợn được dùng liều cao bằng chủng PRRSV TJ độc và tỷ lệ bảo vệ được tính toán sau đợt nghiên cứu. Theo Bảng 1, chủng PRRSV TJM với lượng $10^{4,5}$ TCID₅₀ hoặc cao hơn đủ để gây được miễn dịch bảo vệ ở lợn, với tỷ lệ bảo vệ là 4/5.

Bảng 1

Nhóm	Số lợn	Liều vaccin/lợn	Liều cao virus/lợn	Số lợn bị ốm/số lợn thí nghiệm	Số lợn bị chết/số lợn thí nghiệm	Tỷ lệ bảo vệ
I	5	$10^{5,5}$ TCID ₅₀	$2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	1/5	0/5	4/5
II	5	$10^{4,5}$ TCID ₅₀	$2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	1/5	0/5	4/5
III	5	$10^{3,5}$ TCID ₅₀	$2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	3/5	0/5	2/5
IV	5	$10^{2,5}$ TCID ₅₀	$2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	5/5	1/5	0/5
V	5	PBS	$2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	5/5	2/5	0/5

Ví dụ 10: Xác định liều tối thiểu có hiệu lực miễn dịch đối với chủng CSFV C (F16)

28 lợn đã cai sữa khoẻ mạnh được sử dụng trong nghiên cứu. Các con lợn này là âm tính đối với CSFV, xét cả về kháng nguyên và kháng thể. Các lợn được phân chia ngẫu nhiên thành 6 nhóm. Các nhóm I đến V được tiêm chủng bằng các liều khác nhau chủng CSFV C (F16), trong khi nhóm VI được giữ lại làm đối chứng âm tính (Bảng 2). Các con lợn được dùng liều cao bằng chủng CSFV Shimen độc và tỷ lệ bảo vệ được tính toán sau đợt nghiên cứu. Theo Bảng 2, chủng CSFV C (F16) với lượng $10^{0,5}$ TCID₅₀ hoặc với lượng cao hơn đủ để gây được miễn dịch bảo vệ ở lợn, với tỷ lệ bảo vệ là 5/5.

Bảng 2:

Nhóm	Số lợn	Liều tiêm chủng/lợn	Liều cao virus	Số bị ốm/số được thử nghiệm	Số bị chết/số được thử nghiệm	Tỷ lệ bảo vệ
I	5	$10^{4,5}$ FA TCID ₅₀	$10^{6,0}$ MLD	0/5	0/5	5/5
II	5	$10^{3,5}$ FA TCID ₅₀	$10^{6,0}$ MLD	0/5	0/5	5/5
III	5	$10^{2,5}$ FA TCID ₅₀	$10^{6,0}$ MLD	0/5	0/5	5/5
IV	5	$10^{1,5}$ FA TCID ₅₀	$10^{6,0}$ MLD	0/5	0/5	5/5
V	5	$10^{0,5}$ FA TCID ₅₀	$10^{6,0}$ MLD	0/5	0/5	5/5
VI	3	PBS	$10^{6,0}$ MLD	3/3	3/3	0/3

Ghi chú: MLD: Minimum lethal dose = Liều tối thiểu gây chết

Ví dụ 11: Xác định liều tối thiểu có hiệu lực miễn dịch đối với chế phẩm vaccin kết hợp phòng chủng PRRSV TJM và chủng CSFV C (F16)

40 lợn con khoẻ mạnh được sử dụng trong nghiên cứu. Các con lợn này âm tính đối với cả PRRSV có khả năng gây bệnh cao và cả CSFV có khả năng gây bệnh cao, xét theo cả hai: kháng nguyên và kháng thể. Các lợn được phân chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm. Các nhóm I đến III được tiêm chủng bằng các liều khác nhau của các chế phẩm vaccin kết hợp phòng chủng PRRSV TJM và chủng CSFV C (F16), trong khi

nhóm IV được giữ lại làm đối chứng âm tính. Một nửa số lợn trong mỗi nhóm được dùng liều cao bằng chủng PRRSV TJ và nửa kia được dùng liều cao bằng chủng CSFV Shimen. Tỷ lệ bảo vệ được tính toán sau đợt nghiên cứu.

Theo Bảng 3, chế phẩm vaccin kết hợp chứa $10^{4,5}$ TCID₅₀ của chủng PRRSV TJM và $10^{3,5}$ FA-TCID₅₀ của chủng CSFV C (F16) đủ để gây được miễn dịch bảo vệ ở lợn (xem các Bảng 3 và 4). Cụ thể, chủng CSFV C (F16) thể hiện tỷ lệ bảo vệ 100% ở tất cả các liều như được thử nghiệm trong chế phẩm vaccin kết hợp, cho thấy rằng, đáp ứng miễn dịch đối với chủng CSFV C (F16) không bị làm giảm bởi chủng PRRSV TJM. Hơn nữa, xét thấy các liều cực thấp có hiệu lực miễn dịch của chủng CSFV C (F16) như được trình bày ở Ví dụ 10, nên có thể sử dụng các liều thấp hơn của chủng CSFV C (F16) trong chế phẩm vaccin kết hợp, mà không làm giảm tỷ lệ bảo vệ.

Bảng 3:

Nhóm	Số lợn	Liều tiêm chủng/lợn	Liều cao PRRSV/lợn	Số lợn bị ốm/số thử nghiệm	Số lợn bị chết/số thử nghiệm	Tỷ lệ bảo vệ
I	5	PRRSV TJM: $10^{5,5}$ TCID ₅₀ ; chủng CSFV C (F16): $10^{4,5}$ FA-TCID ₅₀	$2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	0/5	0/5	5/5
II	5	PRRSV TJM: $10^{4,5}$ TCID ₅₀ ; chủng CSFV C (F16): $10^{3,5}$ FA-TCID ₅₀	$2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	0/5	0/5	5/5
III	5	PRRSV TJM: $10^{3,5}$ TCID ₅₀ ; chủng CSFV C (F16): $10^{2,5}$ FA-TCID ₅₀	$2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	2/5	0/5	3/5
IV	5	PBS	$2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	5/5	4/5	0/5

Bảng 4:

Nhóm	Số lợn	Liều tiêm chủng/lợn	Liều cao CSFV Shimen/lợn	Số lợn bị ốm/số thử nghiệm	Số lợn bị chết/số thử nghiệm	Tỷ lệ bảo vệ
I	5	PRRSV TJM: $10^{3,5}$ TCID ₅₀ ; chủng CSFV C (F16): $10^{4,5}$ FA-TCID ₅₀	$10^{6,0}$ MLD	0/5	0/5	5/5
II	5	PRRSV TJM: $10^{4,5}$ TCID ₅₀ ; chủng CSFV C (F16): $10^{3,5}$ FA-TCID ₅₀	$10^{6,0}$ MLD	0/5	0/5	5/5
III	5	PRRSV TJM: $10^{3,5}$ TCID ₅₀ ; chủng CSFV C (F16): $10^{2,5}$ FA-TCID ₅₀	$10^{6,0}$ MLD	0/5	0/5	5/5
IV	5	PBS	$10^{6,0}$ MLD	5/5	5/5	0/5

Ví dụ 12: Chủng PRRSV TJM và chủng CSFV C (F16) phối hợp không ức chế miễn dịch lẫn nhau

30 lợn khoẻ mạnh 21-28 ngày tuổi được sử dụng trong nghiên cứu. Các con lợn này âm tính đối với cả PRRSV có khả năng gây bệnh cao và CSFV có khả năng gây bệnh cao, xét theo cả kháng nguyên và kháng thể. Các lợn được chia ngẫu nhiên thành 7 nhóm, mỗi nhóm 5 con từ nhóm I đến nhóm V, nhóm VI có 3 con, nhóm VII có 2 con (Bảng 5). Mỗi lợn được tiêm 1 ml mẫu thử nghiệm, hoặc toàn bộ không được tiêm (tức là nhóm VII), theo như kế hoạch nghiên cứu nêu ở Bảng 5.

Bảng 5:

Nhóm	Số lợn	Mẫu thử nghiệm	Lượng	Liều vaccin
I	5	PRRSV TJM	1 ml	$10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml
II	5	chủng CSFV C (F16)	1 ml	7500 RID/ml (hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml)
III	5	PRRSV TJM + chủng C của CSFV (F16)	1 ml	PRRSV: $10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml CSFV: 7500 RID/ml (hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml)
IV	5	PRRSV TJM + chủng C của	1 ml	PRRSV: $10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml CSFV: 7500 RID/ml (hoặc $10^{4,0}$

		CSFV (F16)		FA-TCID ₅₀ /ml)
V	5	PBS	1 ml	ktc
VI	3	PBS	1 ml	ktc
VII	2	ktc	ktc	ktc

Ghi chú: RID: rabbit infective dose = liều gây nhiễm cho thỏ

ktc: không tiêm virus hoặc không tiêm chủng

Nhiệt độ ở trực tràng lợn được đo hàng ngày từ ngày thứ 3 trước khi tiêm chủng đến ngày thứ 14 sau khi tiêm chủng. Thể trọng được xác định cứ 7 ngày một lần. Các lợn cũng được theo dõi lâm sàng chặt chẽ. Lấy các mẫu máu của mỗi lợn nghiên cứu vào ngày thứ 3 trước tiêm chủng và vào các ngày 0, ngày thứ 3, ngày thứ 7, ngày thứ 10, ngày thứ 14, ngày thứ 21 và ngày thứ 28 sau tiêm chủng, tương ứng. Mỗi mẫu máu được chia làm hai phần. Một phần được xử lý bằng chất chống đông và được sử dụng để phát hiện các tế bào CD3+, CD4+, CD8+ và CD4+T CD8+. Phần còn lại được xử lý bằng chất chống đông và được sử dụng cho thử nghiệm xác định hiệu giá kháng thể.

Các kết quả cho thấy rằng, các thay đổi về các tế bào T CD3+, CD4+, CD8+ và CD4+CD8+ ở các con lợn được tiêm chủng tương tự với các thay đổi quan sát thấy ở các con lợn của các nhóm đối chứng (xem các Fig.7-10). Sau khi tiêm chủng bằng các chế phẩm vacxin kết hợp, lợn trong các nhóm III và IV đã sản xuất ra các kháng thể kháng cả hai virus và việc sản xuất các kháng thể đó không cản trở nhau (xem các Fig.11-12). Động học của sự sản xuất kháng thể kháng PRRSV đối với các con lợn ở các nhóm III và IV tương tự như động học của sự sản xuất kháng thể kháng PRRSV đối với các con lợn ở nhóm I, còn động học của sự sản xuất kháng thể kháng CSFV đối với lợn ở các nhóm III và IV thì tương tự với động học của sự sản xuất kháng thể kháng CSFV đối với lợn ở nhóm II. Các kết quả này chỉ ra rằng, việc tiêm chủng bằng chủng PRRSV TJM không ức chế đáp ứng miễn dịch kháng chủng CSFV C (F16) và ngược lại.

Nhiệt độ trực tràng và thể trọng của lợn trong mỗi nhóm không thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa (xem Fig.13).

Vào ngày thứ 28 sau tiêm chủng, các con lợn được dùng liều cao bằng các virus độc, theo như đề cương nghiên cứu nêu ở Bảng 6. Sau khi dùng liều cao bằng virus, nhiệt độ trực tràng của lợn được đo hàng ngày và theo dõi các biểu hiện lâm sàng ở

lợn, bao gồm cảm giác ngon khi ăn, hơi thở và trạng thái tinh thần. Các mẫu máu được lấy từ mỗi con lợn vào ngày 0, ngày thứ 3, ngày thứ 7, ngày thứ 10 và ngày thứ 14, tương ứng, sau khi dùng liều cao bằng virus; các mẫu máu này được xử lý bằng chất chống đông để phát hiện các tế bào CD3+, CD4+, CD8+ and CD4+T CD8+. Các mẫu máu cũng được lấy vào ngày dùng liều cao bằng virus và từng ngày khác sau khi dùng liều cao để tách lấy virus PRRSV và virus CSFV, cũng như để xác định sự có mặt virus huyết. Tỷ lệ bảo vệ theo lâm sàng, tỷ lệ ốm (tức là số lợn bị ốm/số lợn thử nghiệm) và tỷ lệ tử vong (tức là số lợn bị chết/số lợn thử nghiệm) được tính toán cho mỗi nhóm lợn trong 14 ngày sau nghiên cứu dùng liều cao bằng virus và kết quả được trình bày ở Bảng 6.

Bảng 6:

Nhóm	Số lợn	Mẫu virus dùng liều cao	Liều cao/lợn	Số lợn bị ốm/số thử nghiệm	Số lợn bị chết/số thử nghiệm	Tỷ lệ bảo vệ
I	5	PRRSV TJ	$2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	0/5	0/5	5/5
II	5	CSFV Shimen	$10^{6,0}$ MLD	0/5	0/5	5/5
III	5	PRRSV TJ	$2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	0/5	0/5	5/5
IV	5	CSFV Shimen	$10^{6,0}$ MLD	0/5	0/5	5/5
V	5	PRRSV TJ	$2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	5/5	3/5	0/5
VI	3	CSFV Shimen	$10^{6,0}$ MLD	3/3	3/3	0/3
VII	2	ktc	ktc	ktc	ktc	ktc

Ghi chú: MLD: minimum lethal dose = liều tối thiểu gây chết

ktc: không tiêm virus hoặc không tiêm chủng.

Các kết quả cho thấy rằng, sau dùng liều cao bằng virus, thân nhiệt tăng ở các con lợn không được tiêm chủng ở các nhóm V và VI, nhưng không tăng ở các con lợn được tiêm chủng của các nhóm I-IV (xem các Fig.14-15). Lợn ở nhóm V thể hiện các triệu chứng lâm sàng đối với tình trạng nhiễm PRRSV có khả năng gây bệnh cao, như trạng thái tinh thần suy giảm, hơi thở gấp, đỏ da, v.v. Lợn trong nhóm VI thể hiện các triệu chứng lâm sàng đối với bệnh sốt cổ điển ở lợn, bao gồm trạng thái tinh thần suy

giảm, táo bón tiếp sau là ỉa, đỏ da, v.v. Không có lợn nào trong các nhóm được tiêm chủng có các triệu chứng lâm sàng như thế (xem các Fig.16-17).

Sau dùng liều cao bằng virus, các con lợn không được tiêm chủng của các nhóm V và VI thể hiện sự giảm đáng kể các tế bào CD3+, CD4+, CD8+ và CD4+T CD8+, và bắt đầu chết từ ngày thứ 7 sau khi dùng liều cao bằng virus. Mặt khác, các con lợn được tiêm chủng bằng các chế phẩm vaccin kết hợp hoặc các vaccin đơn thì không thể hiện sự giảm có ý nghĩa như thế về các tế bào T và các chỉ số về tế bào T cũng vẫn xấp xỉ với các chỉ số đó ở các con lợn khỏe mạnh trong nhóm đối chứng mẫu trắng. Điều này cho thấy rằng các vaccin có hiệu lực trong việc gây ra các đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào. Ngoài ra, các con lợn được tiêm chủng bằng các chế phẩm vaccin kết hợp và các con lợn được tiêm chủng bằng các vaccin đơn thể hiện sự thay đổi tương tự về các tế bào T CD3+, CD4+, CD8+ và CD4+ CD8+, điều đó cho thấy rằng, các chế phẩm vaccin kết hợp không thể hiện sự ức chế lẫn nhau giữa các vaccin thành phần (xem các Fig.18-25)

Sau khi dùng liều cao bằng PRRSV có độc tính cao, các con lợn không được tiêm chủng ở nhóm V bắt đầu phát chứng virus huyết từ ngày thứ 2, kéo dài cho tới 11 ngày. Tuy nhiên, các con lợn được tiêm chủng bằng các chế phẩm vaccin kết hợp hoặc vaccin đơn kháng PRRSV đều không phát chứng nhiễm virus huyết cho tới ngày thứ 4, chứng nhiễm virus huyết kéo dài cho tới 5 ngày. Điều đó cho thấy rằng, các chế phẩm vaccin kết hợp và vaccin đơn tạo ra tác dụng bảo vệ có hiệu quả kháng lại sự nhiễm PRRSV có khả năng gây bệnh cao và các chế phẩm vaccin kết hợp không thể hiện sự ức chế miễn dịch lẫn nhau giữa các vaccin thành phần.

Sau khi dùng liều cao bằng CSFV độc, tất cả các con lợn của nhóm VI đều phát chứng virus huyết, nhưng không lợn nào được tiêm chủng phát chứng bệnh này. Điều đó cho thấy rằng, cả hai loại vaccin là các chế phẩm vaccin kết hợp và vaccin đơn đều tạo sự bảo vệ có hiệu quả kháng lại sự nhiễm CSFV độc, và các thành phần trong chế phẩm vaccin kết hợp không ức chế miễn dịch lẫn nhau.

Ví dụ 13: Nghiên cứu hiệu lực của vaccin 2-combo phòng PRRSV và CSFV

Việc nghiên cứu hiệu lực được thực hiện nhờ sử dụng ba lô vaccin 2-combo chế trong phòng thí nghiệm để phòng PRRSV và CSFV (các lô số: 200904, 200905 và 200906), được pha chế theo Ví dụ 4.

28 lợn khoẻ mạnh âm tính với cả PRRSV có độc lực cao và CSFV có độc lực cao, xét theo cả kháng nguyên và kháng thể, được sử dụng trong nghiên cứu đối với mỗi lô mẫu vaccin 2-combo. Các con lợn được chia ngẫu nhiên thành 6 nhóm, mỗi nhóm từ I đến IV và nhóm VI có 5 con, nhóm V có 3 con. Mỗi nhóm lợn được tiêm chủng mẫu thử tương ứng của nhóm đó và đến ngày thứ 28 sau tiêm chủng, các con lợn được dùng liều cao bằng một virus độc, theo kế hoạch nghiên cứu nêu ở Bảng 7.

Bảng 7:

Nhóm	Mẫu vaccin thử nghiệm và liều lượng	Liều cao virus và liều lượng/lợn	Các tỷ lệ bảo vệ		
			200904	200905	200906
I	vaccin 2-combo, 1 ml/lợn: PRRSV TJM ($10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml) + chủng CSFV C (F16) (7500 RID/ml, hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml)	CSFV Shimen: $10^{6,0}$ MLD	5/5	5/5	5/5
II	vaccin 2-combo, 1 ml/lợn: PRRSV TJM ($10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml) + chủng CSFV C (F16) (7500 RID/ml, hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml)	PRRSV TJ, $2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	4/5	4/5	4/5
III	chủng CSFV C (F16), 1ml/lợn: 7500 RID/ml, hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml	CSFV Shimen: $10^{6,0}$ MLD	5/5	5/5	5/5
IV	PRRSV TJM, 1 ml/lợn: $10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml	PRRSV TJ, $2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	5/5	4/5	4/5
V	PBS, 1 ml/lợn	CSFV Shimen: $10^{6,0}$ MLD	0/3	0/3	0/3
VI	PBS, 1 ml/lợn	PRRSV TJ, $2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	0/5	0/5	0/5

Ghi chú: RID: rabbit infective dose = liều gây nhiễm cho thỏ

MLD: minimum lethal dose = liều tối thiểu gây chết

Nghiên cứu dùng liều cao bằng virus CSFV kết thúc vào ngày thứ 16 sau dùng liều cao, còn nghiên cứu dùng liều cao bằng virus PRRSV kết thúc vào ngày thứ 21 sau dùng liều cao. Các tỷ lệ bảo vệ được tính toán và kết quả được trình bày ở Bảng 7. Tất cả ba lô vaccin 2-combo phòng PRRSV và CSFV thể hiện khả năng bảo vệ tốt đối với sự dùng liều cao bằng PRRSV có độc lực cao hoặc CSFV có độc lực cao. Sự bảo vệ bằng vaccin 2-combo không thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa so với các vaccin đơn đối chứng. Tất cả các con lợn không được tiêm chủng không có các triệu chứng lâm sàng rõ ràng của sự nhiễm virus.

Ví dụ 14: Nghiên cứu về thời hạn miễn dịch của vaccin 2-combo đối với PRRSV và CSFV

Nghiên cứu về thời hạn miễn dịch được tiến hành khi sử dụng vaccin 2-combo phòng PRRSV và CSFV (như được pha chế theo Ví dụ 4). Vaccin đơn phòng PRRSV (như được pha chế theo Ví dụ 1) và vaccin đơn phòng CSFV (như được pha chế theo Ví dụ 2) được sử dụng làm các đối chứng.

56 lợn khỏe mạnh được sử dụng trong nghiên cứu thời hạn miễn dịch. Tất cả các con lợn đều âm tính với PRRSV và CSFV, xét theo cả kháng nguyên và kháng thể. Các con lợn được chia ngẫu nhiên thành 6 nhóm và được tiêm chủng các mẫu thử nghiệm tương ứng như được trình bày ở Bảng 8. Lấy các mẫu máu để xác định hiệu giá kháng thể vào các tháng thứ nhất, thứ 2, thứ 3, thứ 4, thứ 5 hoặc thứ 6 sau tiêm chủng.

Vào tháng thứ 3 và tháng thứ 6 sau tiêm chủng, tương ứng, một nửa số lợn được lấy từ mỗi nhóm nghiên cứu. Các lợn này được dùng liều cao bằng virus độc tương ứng, như được trình bày ở Bảng 8.

Các kết quả cho thấy rằng (xem Bảng 8), các vaccin 2-combo tạo ra tác dụng bảo vệ cho lợn kháng lại sự dùng liều cao bằng virus trong vòng 6 tháng sau tiêm chủng; do đó vaccin này giúp củng cố khoảng thời gian miễn dịch là 6 tháng. Thời hạn miễn dịch đó của 2-combo được nhận thấy là ngang bằng với thời hạn miễn dịch của các vaccin đơn.

Bảng 8:

Nhóm	Vaxin tiêm chủng và liều lượng	Liều cao virus và liều lượng/lợn	Các tỷ lệ bảo vệ	
			3 tháng	6 tháng
I	vaxin 2-combo, 1 ml/lợn: PRRSV TJM ($10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml) + chủng CSFV C (F16) (7500 RID/ml, hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml)	chủng CSFV Shimen: $10^{6,0}$ MLD	5/5	5/5
II	vaxin 2-combo, 1 ml/lợn: PRRSV TJM ($10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml) + chủng CSFV C (F16) (7500 RID/ml, hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml)	chủng PRRSV TJ, $2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	5/5	5/5
III	chủng CSFV C (F16), 1ml/lợn: 7500 RID/ml, hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml	chủng CSFV Shimen: $10^{6,0}$ MLD	5/5	5/5
IV	PRRSV TJM, 1 ml/lợn: $10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml	PRRSV TJ, $2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	4/5	4/5
V	PBS, 1 ml/lợn	chủng CSFV Shimen: $10^{6,0}$ MLD	0/3	0/3
VI	PBS, 1 ml/lợn	chủng PRRSV TJ, $2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	0/5	0/5

Ghi chú: RID: rabbit infective dose = liều gây nhiễm cho thỏ

MLD: minimum lethal dose = liều tối thiểu gây chết

Ví dụ 15: Chủng PRRSV TJM và chủng PRV Bartha K61 phối hợp không ức chế miễn dịch lẫn nhau

Vaxin 2-combo phòng PRRSV TJM và PRV Bartha K61 (được pha chế theo Ví dụ 5) được sử dụng trong nghiên cứu. Lợn 4-5 tuần tuổi được chia ngẫu nhiên

thành 4 nhóm, 4 con trong mỗi nhóm. Tất cả lợn đều âm tính với PRRSV và PRV, xét theo cả kháng nguyên và kháng thể.

Lợn được tiêm chủng bằng mẫu thử nghiệm tương ứng, theo như kế hoạch nghiên cứu nêu ở Bảng 9. Lần tiêm chủng thứ hai được thực hiện sau lần tiêm chủng thứ nhất một tuần lễ.

Bảng 9:

Nhóm	Lần tiêm chủng thứ nhất	Lần tiêm chủng thứ hai
I	PRRSV TJM, 1 ml/lợn: $10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml	PRV Bartha K61, 1ml: $10^{5,5}$ TCID ₅₀ /ml
II	Ktc	Vacxin 2-combo, 1ml: PRRSV TJM ($10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml) + PRV Bartha K61 ($10^{5,5}$ TCID ₅₀ /ml)
III	Ktc	PRV Bartha K61, 1ml: $10^{5,5}$ TCID ₅₀ /ml
IV	Ktc	PBS

Ghi chú: Ktc = Không tiêm chủng

Sau tiêm chủng, lấy các mẫu máu của lợn hàng tuần, cho tới ngày thứ 28 sau tiêm chủng. Các mẫu máu được xử lý và sử dụng để phát hiện hiệu giá kháng thể kháng PRV.

Các kết quả (xem Fig.26) cho thấy rằng, hiệu giá kháng thể kháng PRV không khác nhau có ý nghĩa trong các nhóm lợn từ I đến III. Điều này chỉ ra rằng, chủng PRRSV TJM không ức chế miễn dịch đối với vacxin phòng PRV. Chủng PRRSV TJM không ảnh hưởng tới hiệu giá kháng thể phòng PRV, khi được sử dụng riêng biệt hoặc sử dụng dưới dạng chế phẩm vacxin kết hợp với PRV. Vacxin 2-combo phòng PRRSV và PRV có hiệu lực tương đương với hiệu lực của vacxin đơn phòng PRV.

Ví dụ 16: Nghiên cứu hiệu lực của chế phẩm vacxin kết hợp phòng PRRSV và phòng PRV

Nghiên cứu hiệu lực được tiến hành nhờ sử dụng ba lô vacxin 2-combo phòng PRRSV và PRV, được pha chế theo như trình bày ở Ví dụ 5.

Lợn 4-5 tuần tuổi được chia ngẫu nhiên thành 4 nhóm, mỗi nhóm 10 con. Các nhóm I đến III được tiêm một liều của lô vắc xin 2-combo tương ứng. Mỗi liều vắc xin này chứa $10^{5,0}$ TCID₅₀/ml chủng PRRSV TJM và $10^{5,5}$ TCID₅₀/ml chủng PRV Bartha K61. Nhóm IV là nhóm đối chứng và được tiêm bằng 1 ml MEM (môi trường thiết yếu tối thiểu).

Sau khi tiêm chủng, lợn được theo dõi các biểu hiện lâm sàng và tác dụng có hại. Lấy máu của lợn hàng tuần và tách lấy huyết thanh để xác định hiệu giá kháng thể. Hàng tuần xác định thể trọng của lợn.

4 tuần lễ sau tiêm chủng, 5 lợn trong mỗi nhóm được dùng liều cao bằng chủng PRRSV TJ với liều $2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID₅₀, còn 5 lợn khác được dùng liều cao bằng chủng PRV độc (chủng JL1) với liều $10^{3,0}$ - $10^{3,5}$ TCID₅₀. Sau khi dùng liều cao bằng virus, lợn được theo dõi các biểu hiện lâm sàng, bao gồm cảm giác ăn uống và trạng thái tinh thần. Đo nhiệt độ trực tràng của lợn hàng ngày. Lấy các mẫu máu và mẫu gạc thấm nước mũi để xác định virus.

Các kết quả cho thấy rằng, sau tiêm chủng, các con lợn được tiêm chủng ở các nhóm I đến III thể hiện thân nhiệt bình thường và trạng thái tinh thần tốt, có cảm giác ăn ngon. Sau khi dùng liều cao bằng virus, các con lợn tiêm chủng được bảo vệ với tỷ lệ bảo vệ 4/5 như nêu trên, trong khi tất cả các con lợn không được tiêm chủng trong nhóm đối chứng thì bị phát nhiễm virus và có tỷ lệ chết là 2/5 do dùng liều cao bằng PRRSV độc và có tỷ lệ chết là 3/5 do dùng liều cao bằng PRV độc. Các kết quả này cho thấy rằng, vắc xin 2-combo phòng PRRSV và PRV có hiệu lực tốt chống chịu được sự dùng liều cao của cả hai virus, cũng như có hiệu lực trong dự phòng nhiễm PRRSV và PRV.

Ví dụ 17: Chủng PRRSV TJM, chủng CSFV C và chủng PRV Bartha K61 phối hợp không ức chế miễn dịch lẫn nhau

46 lợn khỏe mạnh 21-28 ngày tuổi được sử dụng trong nghiên cứu. Các con lợn này âm tính đối với PRRSV có độc lực cao, CSFV có độc lực cao và PRV có độc lực cao, xét theo cả kháng nguyên và kháng thể. Lợn được chia ngẫu nhiên thành 10 nhóm, 5 con trong mỗi nhóm từ nhóm I đến nhóm VII và trong nhóm IX, và 3 con trong mỗi nhóm VIII và X. Lợn được tiêm 1 ml mẫu thử nghiệm như ấn định, hoặc hoàn toàn không được tiêm (tức là nhóm X), theo như kế hoạch nghiên cứu nêu ở

Bảng 10.

Bảng 10:

Nhóm	Số lợn	Mẫu thử nghiệm	Liều vacxin
I	5	PRRSV TJM, 1 ml/lợn	$10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml
II	5	Chủng CSFV C (F16), 1 ml/lợn	7500 RID/ml (hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml)
III	5	PRV Bartha K61, 1 ml/lợn	$10^{5,5}$ TCID ₅₀ /ml
IV	5	vacxin 3-combo, 1 ml/lợn: PRRSV TJM + chủng CSFV C (F16) + PRV Bartha K61	PRRSV: $10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml CSFV: 7500 RID/ml (hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml) PRV: $10^{5,5}$ TCID ₅₀ /ml
V	5	vacxin 3-combo, 1 ml/lợn: PRRSV TJM + chủng CSFV C (F16) + PRV Bartha K61	PRRSV: $10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml CSFV: 7500 RID/ml (hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml) PRV: $10^{5,5}$ TCID ₅₀ /ml
VI	5	vacxin 3-combo, 1 ml/lợn: PRRSV TJM + chủng CSFV C (F16) + PRV Bartha K61	PRRSV: $10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml CSFV: 7500 RID/ml (hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml) PRV: $10^{5,5}$ TCID ₅₀ /ml
VII	5	PBS, 1 ml/lợn	Ktc
VIII	3	PBS, 1 ml/lợn	Ktc
IX	5	PBS, 1 ml/lợn	Ktc
X	3	Ktc	Ktc

Ghi chú: RID: rabbit infective dose = liều gây nhiễm cho thỏ

Ktc = Không tiêm chủng

Nhiệt độ trực tràng của lợn được đo hàng ngày từ ngày thứ 3 trước khi tiêm chủng cho đến ngày thứ 7 sau tiêm chủng. Lợn cũng được theo dõi lâm sàng chặt chẽ. Lấy máu từ mỗi con lợn trong nghiên cứu vào ngày thứ 3 trước khi tiêm chủng và vào ngày 0, ngày thứ 3, ngày thứ 7, ngày thứ 10, ngày thứ 14, ngày thứ 21, ngày thứ 28, ngày thứ 31, ngày thứ 35, ngày thứ 38 và ngày thứ 42 sau tiêm chủng, tương ứng. Mỗi

mẫu máu được chia làm hai phần. Một phần được xử lý bằng chất chống đông và được sử dụng để phát hiện các tế bào T CD3+, CD4+ và CD8+. Phần còn lại được xử lý bằng chất gây đông tụ và được sử dụng cho thí nghiệm xác định hiệu giá kháng thể.

Vào ngày thứ 28 sau tiêm chủng, lợn được dùng liều cao bằng các virus độc theo như kế hoạch nghiên cứu nêu ở Bảng 11. Sau khi dùng liều cao bằng virus, đo nhiệt độ trực tràng ủa lợn hàng ngày và lợn được theo dõi các biểu hiện lâm sàng, bao gồm cảm giác ăn uống, hơi thở và trạng thái tinh thần. Nghiên cứu dùng liều cao bằng PRRSV kết thúc vào ngày thứ 21 sau dùng liều cao bằng virus, và nghiên cứu dùng liều cao bằng CSFV kết thúc vào ngày thứ 16 sau dùng liều cao bằng virus. Các tỷ lệ bảo vệ theo lâm sàng, tỷ lệ ốm (tức là số lợn bị ốm/số lợn thí nghiệm) và tỷ lệ chết (tức là số lợn bị chết/số lợn thí nghiệm) được tính toán cho mỗi nhóm sau nghiên cứu dùng liều cao bằng virus và các kết quả được trình bày ở Bảng 11.

Bảng 11:

Nhóm	Số lợn	Mẫu virus dùng liều cao	Liều cao/lợn	Số lợn bị ốm/số thí nghiệm	Số lợn bị chết/số thí nghiệm	Tỷ lệ bảo vệ
I	5	PRRSV TJ	$2 \times 10^{4,0} - 2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	0/5	0/5	5/5
II	5	CSFV Shimen	$10^{6,0}$ MLD	0/5	0/5	5/5
III	5	PRV JL1	$10^{3,0} - 10^{3,5}$ TCID ₅₀	0/5	0/5	5/5
IV	5	PRRSV TJ	$2 \times 10^{4,0} - 2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	0/5	0/5	5/5
V	5	CSFV Shimen	$10^{6,0}$ MLD	0/5	0/5	5/5
VI	5	PRV JL1	$10^{3,0} - 10^{3,5}$ TCID ₅₀	0/5	0/5	5/5
VII	5	PRRSV TJ	$2 \times 10^{4,0} - 2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	5/5	3/5	0/5
VIII	3	CSFV Shimen	$10^{6,0}$ MLD	3/3	3/3	0/3
IX	5	PRV JL1	$10^{3,0} - 10^{3,5}$ TCID ₅₀	5/5	5/5	0/5
X	3	Ktc	Ktc	Ktc	Ktc	Ktc

Ghi chú: MLD: minimum lethal dose = liều tối thiểu gây chết

Ktc = Không tiêm chủng

Các kết quả cho thấy rằng, chủng PRRSV TJM, khi được phối hợp với chủng CSFV C và chủng PRV Bartha K61, tạo được sự bảo vệ có hiệu quả chống chịu được sự dùng liều cao của tất cả ba virus độc đã nêu. Các chế phẩm vaccin kết hợp thể hiện hiệu lực tương đương với hiệu lực của từng vaccin đơn, cho thấy rằng, các thành phần trong chế phẩm vaccin kết hợp không ức chế miễn dịch lẫn nhau.

Ví dụ 18: Nghiên cứu hiệu lực của chủng PRRSV TJM, chủng CSFV C và chủng PRV Bartha K61 được phối hợp với nhau

Nghiên cứu hiệu lực vaccin được tiến hành nhờ sử dụng ba lô vaccin 3-combo được sản xuất trong phòng thí nghiệm (các lô số 031-01, 031-02 và 031-03), được pha chế theo Ví dụ 6.

43 lợn khoẻ mạnh, âm tính với PRRSV có độc lực cao, CSFV có độc lực cao và PRV có độc lực cao, xét theo cả kháng nguyên và kháng thể, được sử dụng trong nghiên cứu. Lợn được chia ngẫu nhiên thành 9 nhóm, 5 con trong mỗi nhóm từ nhóm I đến nhóm VI, nhóm VIII và nhóm IX, và 3 con trong nhóm VII. Mỗi nhóm lợn được tiêm chủng bằng mẫu thử nghiệm tương ứng và đến ngày thứ 28 sau tiêm chủng, lợn được dùng liều cao bằng virus độc tương ứng, như theo kế hoạch nghiên cứu trình bày ở Bảng 12. Nghiên cứu dùng liều cao bằng PRRSV kết thúc vào ngày thứ 21 sau dùng liều cao bằng virus; nghiên cứu dùng liều cao bằng CSFV kết thúc vào ngày thứ 16 sau dùng liều cao bằng virus, còn nghiên cứu dùng liều cao bằng PRV kết thúc vào ngày thứ 14 sau dùng liều cao bằng virus. Các tỷ lệ bảo vệ theo lâm sàng, tỷ lệ ốm và tỷ lệ chết được tính toán cho mỗi nhóm lợn sau nghiên cứu dùng liều cao bằng virus và các kết quả được trình bày ở Bảng 12.

Bảng 12:

Nhóm	Mẫu vaccin thử nghiệm và liều lượng	Liều cao virus và liều lượng/lợn	Các tỷ lệ bảo vệ		
			Lô số 1	Lô số 2	Lô số 3
I	vaccin 3-combo, 1 ml/lợn: PRRSV TJM ($10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml) + chủng CSFV C (F16) (7500 RID/ml, hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml) +	CSFV Shimen: $10^{6,0}$ MLD	5/5	5/5	5/5

	PRV Bartha K61 ($10^{5,5}$ TCID ₅₀ /ml)				
II	vacxin 3-combo, 1 ml/lợn: PRRSV TJM ($10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml) + chủng CSFV C (F16) (7500 RID/ml, hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml) + PRV Bartha K61 ($10^{5,5}$ TCID ₅₀ /ml)	PRRSV TJ, $2 \times 10^{4,0} - 2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	4/5	4/5	5/5
III	vacxin 3-combo, 1 ml/lợn: PRRSV TJM ($10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml) + chủng CSFV C (F16) (7500 RID/ml, hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml) + PRV Bartha K61 ($10^{5,5}$ TCID ₅₀ /ml)	PRV JL1: $10^{3,0} - 10^{3,5}$ TCID ₅₀	5/5	4/5	5/5
IV	chủng CSFV C (F16), 1 ml/lợn: (7500 RID/ml, hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml)	CSFV Shimen: $10^{6,0}$ MLD	5/5	5/5	5/5
V	PRRSV TJM, 1 ml/lợn: $10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml	PRRSV TJ, $2 \times 10^{4,0} - 2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	5/5	4/5	4/5
VI	PRV Bartha K61, 1 ml/lợn: $10^{5,5}$ TCID ₅₀ /ml	PRV JL1: $10^{3,0} - 10^{3,5}$ TCID ₅₀	4/5	4/5	5/5
VII	PBS, 1 ml/lợn	CSFV Shimen: $10^{6,0}$ MLD	0/3	0/3	0/3
VIII	PBS, 1 ml/lợn	PRRSV TJ, $2 \times 10^{4,0} - 2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	0/5	0/5	0/5
IX	PBS, 1 ml/lợn	PRV JL1: $10^{3,0} - 10^{3,5}$ TCID ₅₀	0/5	0/5	0/5

Ghi chú: RID: rabbit infective dose = liều gây nhiễm cho thỏ

MLD: minimum lethal dose = liều tối thiểu gây chết

Ba lô vacxin 3-combo phòng PRRSV, CSFV và PRV đều thể hiện tác dụng bảo vệ tốt chống chịu được sự dùng liều cao của PRRSV có độc lực cao, CSFV có độc lực

cao hoặc PRV có độc lực cao, trong khi tất cả các đối chứng âm tính đều biểu lộ các triệu chứng lâm sàng rõ ràng của nhiễm virus. Tác dụng bảo vệ của vaccin 3-combo không thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa so với các vaccin đơn đối chứng.

Ví dụ 19: Nghiên cứu thời hạn miễn dịch của chủng PRRSV TJM, chủng CSFV C và chủng PRV Bartha K61 được phối hợp với nhau

Nghiên cứu thời hạn bảo vệ được tiến hành nhờ sử dụng ba lô vaccin 3-combo sản xuất trong phòng thí nghiệm (các lô số 031-01, 031-02 và 031-03), được pha chế theo Ví dụ 6.

86 lợn khoẻ mạnh được sử dụng trong nghiên cứu thời hạn miễn dịch. Lợn âm tính với PRRSV có độc lực cao, CSFV có độc lực cao và PRV có độc lực cao, xét theo cả kháng nguyên và kháng thể. Lợn được chia ngẫu nhiên thành 9 nhóm, 6 con trong nhóm VII, và 10 con trong mỗi nhóm còn lại. Lợn được tiêm chủng hoặc không được tiêm chủng theo như kế hoạch nghiên cứu nêu ở Bảng 13. Lấy các mẫu máu của lợn để xác định hiệu giá kháng thể vào tháng thứ nhất, thứ 2, thứ 3, thứ 4, thứ 5 hoặc thứ 6 sau tiêm chủng.

Tương ứng, khi được 3 tháng và 6 tháng sau tiêm chủng, thì một nửa số lợn được lấy từ mỗi nhóm nghiên cứu và được dùng liều cao bằng virus độc tương ứng, như được trình bày ở Bảng 13.

Bảng 13:

Nhóm	Vaccin tiêm chủng và liều lượng	Liều cao virus và liều lượng/lợn	Các tỷ lệ bảo vệ	
			3 tháng	6 tháng
I	vaccin 3-combo, 1 ml/lợn: PRRSV TJM ($10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml) + chủng CSFV C (F16) (7500 RID/ml, hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml) + PRV Bartha K61 ($10^{5,5}$ TCID ₅₀ /ml)	CSFV Shimen: $10^{6,0}$ MLD	5/5	5/5
II	vaccin 3-combo, 1 ml/lợn: PRRSV TJM ($10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml) +	PRRSV TJ, $2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$	5/5	5/5

	chủng CSFV C (F16) (7500 RID/ml, hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml) + PRV Bartha K61 ($10^{5,5}$ TCID ₅₀ /ml)	TCID ₅₀		
III	vacxin 3-combo, 1 ml/lợn: PRRSV TJM ($10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml) + chủng CSFV C (F16) (7500 RID/ml, hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml) + PRV Bartha K61 ($10^{5,5}$ TCID ₅₀ /ml)	PRV JL1: $10^{3,0}$ - $10^{3,5}$ TCID ₅₀	5/5	5/5
IV	chủng CSFV C (F16), 1 ml/lợn: (7500 RID/ml, hoặc $10^{4,0}$ FA-TCID ₅₀ /ml)	CSFV Shimen: $10^{6,0}$ MLD	5/5	5/5
V	PRRSV TJM, 1 ml/lợn: $10^{5,0}$ TCID ₅₀ /ml	PRRSV TJ, $2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	4/5	4/5
VI	PRV Bartha K61, 1 ml/lợn: $10^{5,5}$ TCID ₅₀ /ml	PRV JL1: $10^{3,0}$ - $10^{3,5}$ TCID ₅₀	4/5	4/5
VII	PBS, 1 ml/lợn	CSFV Shimen: $10^{6,0}$ MLD	0/3	0/3
VIII	PBS, 1 ml/lợn	PRRSV TJ, $2 \times 10^{4,0}$ - $2 \times 10^{4,5}$ TCID ₅₀	0/5	0/5
IX	PBS, 1 ml/lợn	PRV JL1: $10^{3,0}$ - $10^{3,5}$ TCID ₅₀	0/5	0/5

Ghi chú: RID: rabbit infective dose = liều gây nhiễm cho thỏ

MLD: minimum lethal dose = liều tối thiểu gây chết

Các kết quả (xem Bảng 13) cho thấy rằng, các vacxin 3-combo tạo ra tác dụng bảo vệ cho lợn chống chịu được sự dùng liều cao bằng virus trong vòng 6 tháng sau tiêm chủng, và do đó có thời hạn miễn dịch là 6 tháng. Thời hạn miễn dịch của các vacxin 3-combo này được nhận thấy là tương đương với thời hạn miễn dịch của các vacxin đơn.

Phần III: Các nghiên cứu về tính an toàn của vacxin

Ví dụ 20: Nghiên cứu tính an toàn của chế phẩm vaccin kết hợp phòng PRRSV và CSFV

Nghiên cứu tính an toàn của vaccin được tiến hành với ba lô vaccin 2-combo phòng PRRSV và CSFV sản xuất trong phòng thí nghiệm (các lô số 200904, 200905 và 200906), như được pha chế theo Ví dụ 4.

Nghiên cứu này bao gồm nghiên cứu tính an toàn của liều duy nhất, nghiên cứu tính an toàn của liều nhắc lại, nghiên cứu tính an toàn khi dùng quá liều trên lợn có tuổi đã định, nghiên cứu tính an toàn khi dùng quá liều trên lợn chưa trưởng thành và nghiên cứu tính an toàn khi dùng quá liều trên lợn của các giống khác nhau.

Các kết quả cho thấy rằng, sau khi tiêm chủng, lợn trong mỗi nhóm nghiên cứu có thân nhiệt bình thường, trạng thái tinh thần tốt và ăn ngon. Không quan sát thấy có tác dụng bất lợi cục bộ hoặc toàn thân. Sử dụng quá liều các chế phẩm vaccin kết hợp này được chứng minh là an toàn đối với lợn tuổi chưa trưởng thành, cũng như đối với lợn của các giống khác nhau.

Ví dụ 21 : Nghiên cứu tính an toàn của chế phẩm vaccin kết hợp phòng PRRSV và PRV

Việc nghiên cứu tính an toàn được tiến hành với ba lô vaccin 2-combo phòng PRRSV và PRV, như được pha chế theo Ví dụ 5.

Lợn 4-5 tuần tuổi, âm tính đối với cả PRRS và bệnh GD, xét theo cả kháng nguyên và kháng thể, được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm, mỗi nhóm 15 con. Từng nhóm được tiêm chủng bằng vaccin 2-combo với liều duy nhất ($10^{5,0}$ - $10^{5,5}$ TCID₅₀ virut/ml), với các liều nhắc lại hoặc liều vượt quá 10 lần. 5 con lợn được sử dụng làm nhóm đối chứng và hoàn toàn không được tiêm gì.

Nhiệt độ trực tràng của lợn hàng ngày, cho đến ngày thứ 21 sau tiêm chủng. Lợn cũng được theo dõi lâm sàng chặt chẽ.

Các kết quả cho thấy rằng, mỗi nhóm lợn đều có thân nhiệt bình thường và không thấy có các thay đổi bệnh lý sau tiêm chủng. Vaccin 2-combo này là an toàn đối với lợn.

Ví dụ 22: Nghiên cứu tính an toàn của chế phẩm vaccin kết hợp phòng PRRSV, CSFV và PRV

Việc nghiên cứu tính an toàn được tiến hành với ba lô vaccin 3-combo phòng

PRRSV, CSFV và PRV sản xuất trong phòng thí nghiệm (các lô số 031-01, 031-02 và 031-03), như được pha chế theo Ví dụ 6. Nghiên cứu này bao gồm nghiên cứu tính an toàn của liều duy nhất, nghiên cứu tính an toàn của liều nhắc lại, nghiên cứu tính an toàn khi dùng quá liều trên lợn có tuổi đã định, nghiên cứu tính an toàn khi dùng quá liều trên lợn chưa trưởng thành và nghiên cứu tính an toàn khi dùng quá liều trên lợn của các giống khác nhau.

Các kết quả cho thấy rằng, sau khi tiêm chủng, lợn trong mỗi nhóm nghiên cứu có thân nhiệt bình thường, trạng thái tinh thần tốt và ăn ngon. Không quan sát thấy có tác dụng bất lợi cục bộ hoặc toàn thân. Sử dụng quá liều các chế phẩm vaccin kết hợp này được chứng minh là an toàn đối với lợn tuổi chưa trưởng thành, cũng như đối với lợn của các giống khác nhau.

Phần IV: Các nghiên cứu về tính ổn định của vaccin

Ví dụ 23: Nghiên cứu tính ổn định của vaccin 2-combo phòng PRRSV và CSFV

Các chế phẩm vaccin kết hợp phòng PRRSV và CSFV sản xuất trong phòng thí nghiệm (các lô số 200904, 200905 và 200906) được thử nghiệm về tính ổn định và được so sánh song song với ba lô vaccin đơn phòng PRRSV và ba lô vaccin đơn phòng CSFV (các lô số 200901, 200902, 200903, 200907, 200908 và 200909).

Ba lô của mỗi vaccin được giữ ở nhiệt độ 2-8°C. Tương ứng, các mẫu được lấy vào các tháng 3, 6, 9, 12 và 18 của đợt nghiên cứu. Các mẫu này được kiểm tra về các tính chất hoá lý, độ chân không, hàm lượng nước tồn lưu, hiệu lực và mức độ già hoá ở nhiệt độ 37°C.

Sau khi bảo quản 18 tháng ở nhiệt độ 2-8°C, ba lô vaccin 2-combo vón thành các cục xộp màu trắng; các cục này tan nhanh sau khi thêm đệm để pha loãng. Trong thử nghiệm kiểm tra độ chân không, các vaccin có sắc màu trắng hoặc tím. Hàm lượng nước tồn lưu trung bình của các vaccin thử nghiệm đáp ứng các yêu cầu do Dược điển Thú y Trung Quốc quy định.

Các hiệu giá virus của các chế phẩm vaccin được xác định và các kết quả thu được được trình bày ở các Fig.27-30. Sau khi bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong thời gian 18 tháng, thì thấy các hiệu giá virus của vaccin 2-combo không khác nhau có ý nghĩa so với các hiệu giá đó của mỗi vaccin đơn. Sau khi được giữ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 14 ngày, thì các vaccin 2-combo vẫn còn giữ được hiệu giá virus cao,

không khác nhau có ý nghĩa so với từng vacxin đơn trong các nghiên cứu song song. Hiệu giá virus của các vacxin này đáp ứng các yêu cầu đối với một vacxin đảm bảo chất lượng. Điều đó cho thấy rằng, tác nhân bảo vệ đông lạnh có tác dụng bảo vệ tốt chủng PRRSV trong vacxin và chủng CSFV trong vacxin trong quá trình làm đông khô.

Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, vacxin thông thường thường được bảo quản ở nhiệt độ dưới 0°C (-20°C), gây phức tạp cho việc bảo quản các vacxin đó. Các kết quả nêu ở ví dụ này cho thấy rằng, nhờ chất bảo vệ mới để tránh ảnh hưởng của nhiệt độ đông lạnh, thì có thể vận chuyển và bảo quản các chế phẩm vacxin ở nhiệt độ cao hơn, do đó giúp cho các vacxin có tính ổn định cao hơn.

Ví dụ 24: Nghiên cứu tính ổn định của vacxin 2-combo để phòng PRRSV và PRV

Ba lô vacxin 2-combo sản xuất trong phòng thí nghiệm để phòng PRRSV và PRV được giữ ở nhiệt độ 2-8°C. Tương ứng, thu các mẫu nghiên cứu vào các tháng thứ 3, thứ 6, thứ 9, thứ 12, thứ 18, thứ 21 và thứ 24 của đợt nghiên cứu. Các mẫu này được kiểm tra về các tính chất hoá lý, độ chân không, hàm lượng nước tồn lưu, hiệu lực và mức độ già hoá ở nhiệt độ 37°C.

Sau khi bảo quản 24 tháng ở nhiệt độ 2-8°C, ba lô vacxin bị vón thành các cục xộp; các cục này tan nhanh sau khi thêm đệm để pha loãng. Trong thử nghiệm kiểm tra độ chân không, các vacxin có sắc màu trắng hoặc tím. Các hiệu giá virus của các chế phẩm vacxin được xác định và các kết quả thu được được trình bày ở các Fig.31-34. Các chế phẩm vacxin kết hợp ổn định sau bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong thời gian 24 tháng và các hiệu giá virus không khác có ý nghĩa so với các hiệu giá đó trước khi bảo quản.

Ví dụ 25: Nghiên cứu tính ổn định của vacxin 3-combo để phòng PRRSV, CSFV và PRV

Các vacxin 3-combo để phòng PRRSV, CSFV và PRV sản xuất trong phòng thí nghiệm (các lô số 031-01, 031-02 và 031-03) được thử nghiệm về tính ổn định và được so sánh song song với ba lô vacxin đơn phòng PRRSV (các lô số 031-04, 031-05, 031-06), ba lô vacxin đơn phòng CSFV (các lô số 031-07, 031-08, 031-09) và ba lô vacxin đơn phòng PRV (các lô số 031-10, 031-11 và 031-12).

Các vacxin được giữ ở nhiệt độ 2-8°C. Tương ứng, thu các mẫu nghiên cứu vào

các tháng thứ 3, thứ 6, thứ 9, thứ 12 và thứ 18 của đợt nghiên cứu. Các mẫu này được kiểm tra về các tính chất hoá lý, độ chân không, hàm lượng nước tồn lưu, hiệu lực và mức độ già hoá ở nhiệt độ 37°C.

Sau khi bảo quản 18 tháng ở nhiệt độ 2-8°C, ba lô vacxin bị vón thành các cục xộp màu trắng; các cục này tan nhanh sau khi thêm đệm để pha loãng. Trong thử nghiệm kiểm tra độ chân không, các vacxin này có sắc màu trắng hoặc tím. Hàm lượng nước tồn lưu trung bình của các vacxin thử nghiệm đáp ứng các yêu cầu do Dược điển Thú y Trung Quốc quy định.

Các hiệu giá virus của các vacxin được xác định và các kết quả thu được được trình bày ở các Fig.35-40. Sau bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C trong thời gian 18 tháng, các hiệu giá virus của các chế phẩm vacxin kết hợp không khác có ý nghĩa so với các hiệu giá đó của các vacxin đơn. Sau khi được giữ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 14, các chế phẩm vacxin kết hợp vẫn còn giữ được hiệu giá virus cao, không khác có ý nghĩa so với các hiệu giá đó của các vacxin đơn trong các nghiên cứu song song. Điều đó chứng minh rằng, chất bảo vệ chịu nhiệt và tránh ảnh hưởng của nhiệt độ đông lạnh giúp bảo vệ tốt chủng PRRSV trong vacxin, chủng CSFV trong vacxin và chủng PRV trong vacxin trong quá trình làm đông khô.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm vaccin chứa vaccin phòng virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV) và vaccin phòng virus ở lợn thứ hai, trong đó vaccin phòng virus ở lợn thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm vaccin phòng virus gây bệnh sốt cổ điển ở lợn (CSFV) và vaccin phòng virus gây bệnh giả dại (PRV), và trong đó vaccin phòng PRRSV chứa PRRSV giảm độc lực chứa trình tự nucleotit Nsp2 được mã hoá bởi trình tự ADN, trong đó trình tự ADN này, khi so sánh với SEQ ID NO: 4, thì thiếu đoạn ADN chứa ít nhất 50 nucleotit kề nhau trong SEQ ID NO: 8, trong đó vaccin phòng PRRSV và vaccin thứ hai về cơ bản không ức chế miễn dịch lẫn nhau.
2. Chế phẩm vaccin theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa vaccin phòng virus ở lợn thứ ba được chọn từ nhóm gồm vaccin phòng CSFV và vaccin phòng PRV, và trong đó vaccin thứ ba khác với vaccin thứ hai, trong đó vaccin phòng PRRSV, vaccin thứ hai và vaccin thứ ba về cơ bản không ức chế miễn dịch lẫn nhau.
3. Chế phẩm vaccin theo điểm 1, trong đó PRRSV giảm độc lực được giảm độc lực từ PRRSV có khả năng gây bệnh cao.
4. Chế phẩm vaccin theo điểm 1, trong đó PRRSV giảm độc lực chứa trình tự nucleotit PRRSV được mã hoá bởi trình tự tương đồng ít nhất là 90% với SEQ ID NO: 3.
5. Chế phẩm vaccin theo điểm 4, trong đó PRRSV giảm độc lực chứa trình tự nucleotit PRRSV được mã hoá bởi SEQ ID NO: 3.
6. Chế phẩm vaccin theo điểm 4, trong đó PRRSV giảm độc lực có số hiệu lưu giữ vi sinh vật tại CGMCC là 3121.
7. Chế phẩm vaccin theo điểm 1, trong đó vaccin phòng CSFV chứa CSFV giảm độc lực.
8. Chế phẩm vaccin theo điểm 7, trong đó CSFV giảm độc lực được mã hoá bởi trình tự tương đồng ít nhất 80% với SEQ ID NO: 10.
9. Chế phẩm vaccin theo điểm 8, trong đó CSFV giảm độc lực được mã hoá bởi SEQ ID NO: 10.
10. Chế phẩm vaccin theo điểm 8, trong đó CSFV giảm độc lực có số hiệu lưu giữ vi sinh vật tại CGMCC là 3891.

11. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó vacxin phòng PRV chứa PRV giảm độc lực.
12. Chế phẩm vacxin theo điểm 11, trong đó PRV giảm độc lực chứa một hoặc nhiều gen bị bất hoạt được chọn từ nhóm gồm các gen TK, PK, RR, dUTPaza, gG, gC, gE, gD và gI.
13. Chế phẩm vacxin theo điểm 12, trong đó PRV giảm độc lực chứa gen gE bị bất hoạt.
14. Chế phẩm vacxin theo điểm 11, trong đó PRV giảm độc lực có số hiệu lưu giữ vi sinh vật tại CGMCC là 5076.
15. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó chế phẩm vacxin này chứa lượng có hiệu lực miễn dịch của vacxin phòng PRRSV, vacxin phòng CSFV và/hoặc vacxin phòng PRV.
16. Chế phẩm vacxin theo điểm 15, trong đó lượng có hiệu lực miễn dịch của vacxin phòng PRRSV ít nhất là $10^{4,5}$ TCID₅₀, $10^{5,0}$ TCID₅₀ hoặc $10^{5,5}$ TCID₅₀; lượng có hiệu lực miễn dịch của vacxin phòng CSFV ít nhất là $10^{0,5}$ FA-TCID₅₀ (kháng thể huỳnh quang -TCID₅₀), $10^{1,0}$ FA-TCID₅₀, $10^{1,5}$ FA-TCID₅₀, $10^{2,0}$ FA-TCID₅₀, $10^{2,5}$ FA-TCID₅₀, $10^{3,0}$ FA-TCID₅₀, $10^{3,5}$ FA-TCID₅₀, $10^{4,0}$ FA-TCID₅₀, $10^{4,5}$ FA-TCID₅₀ hoặc $10^{5,0}$ FA-TCID₅₀, hoặc ít nhất là 2,5 RID, 3 RID, 5 RID, 10 RID, 30 RID, 100 RID, 150 RID, 300 RID, 750 RID, 1000 RID, 3000 RID hoặc 7500 RID, và/hoặc lượng có hiệu lực miễn dịch của vacxin phòng PRV ít nhất là $10^{3,0}$ TCID₅₀, $10^{3,5}$ TCID₅₀, $10^{4,0}$ TCID₅₀, $10^{4,5}$ TCID₅₀, $10^{5,0}$ TCID₅₀, $10^{5,5}$ TCID₅₀ hoặc $10^{6,0}$ TCID₅₀.
17. Chế phẩm vacxin theo điểm 15, trong đó tỷ lệ TCID₅₀ giữa vacxin phòng PRRSV và vacxin phòng CSFV nằm trong khoảng từ 10000:1 đến 1:1.
18. Chế phẩm vacxin theo điểm 15, trong đó tỷ lệ TCID₅₀ giữa vacxin phòng PRRSV và vacxin phòng PRV nằm trong khoảng từ 1:1 đến 1:30.
19. Chế phẩm vacxin theo điểm 15, trong đó tỷ lệ TCID₅₀ giữa vacxin phòng PRRSV và vacxin phòng CSFV và vacxin phòng PRV nằm trong khoảng từ 10^4 : 1: 10^5 đến 5:1:6.
20. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó CSFV được nuôi cấy trong dòng tế bào

được chọn từ nhóm gồm các dòng tế bào ST, PK-15, Marc-145, MDBK, BT, PT, Vero, BHK-21, dòng tế bào thận lợn (IBRS-2), dòng tế bào thận thỏ (RK) và dòng nguyên bào sợi phôi gà, hoặc tế bào sơ cấp là tế bào sơ cấp thận lợn.

21. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó đoạn ADN chứa ít nhất là 100, ít nhất là 120, ít nhất là 150, ít nhất là 180, ít nhất là 200, ít nhất là 210, ít nhất là 220, ít nhất là 230, ít nhất là 240, ít nhất là 250, ít nhất là 260, ít nhất là 270, ít nhất là 280, ít nhất là 290, ít nhất là 300, ít nhất là 310, ít nhất là 320, ít nhất là 330, ít nhất là 340, ít nhất là 350 hoặc ít nhất là 360 nucleotit kề nhau.

22. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó đoạn ADN bao gồm SEQ ID NO: 8.

23. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó PRRSV giảm độc lực còn chứa trình tự nucleotit Nsp1 được mã hóa bởi trình tự tương đồng ít nhất 90% với SEQ ID NO: 1.

24. Chế phẩm vacxin theo điểm 23, trong đó PRRSV giảm độc lực chứa trình tự nucleotit Nsp1 được mã hóa bởi SEQ ID NO: 1 và trình tự nucleotit Nsp2 được mã hóa bởi SEQ ID NO: 2.

25. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa tá chất.

26. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó chế phẩm này còn chứa tác nhân bảo vệ đông lạnh.

27. Chế phẩm vacxin theo điểm 26, trong đó tác nhân bảo vệ đông lạnh là sucroza, L-natri glutamat và/hoặc sản phẩm thủy phân albumin sữa.

28. Phương pháp bào chế chế phẩm vacxin theo điểm 1, bao gồm các bước:

a) thu lấy chủng virus để bào chế vacxin phòng PRRSV, chủng virus để bào chế vacxin phòng CSFV và/hoặc chủng virus để bào chế vacxin phòng PRV, mà các chủng này được nuôi cấy trên các tế bào mẫn cảm tương ứng của chúng, và

b) phối trộn hai hoặc nhiều chủng virus này theo tỷ lệ TCID₅₀ thích hợp.

29. Phương pháp theo điểm 28, trong đó tế bào mẫn cảm với chủng vacxin phòng PRRSV là dòng tế bào được chọn từ nhóm bao gồm dòng tế bào Marc-145, MA-104, Vero hoặc CL-2621, hoặc tế bào sơ cấp là tế bào PAM.

30. Phương pháp theo điểm 28, trong đó tế bào mẫn cảm với chủng vacxin phòng

CSFV là dòng tế bào được chọn từ nhóm bao gồm dòng tế bào BT, Vero, MPK, SK6, PK2a, CPK, RKC, MDBK, MDCK, CRFK, ST và PT, hoặc tế bào sơ cấp là tế bào BT.

31. Phương pháp theo điểm 28, trong đó tế bào miễn cảm với chủng vaccin phòng PRV là dòng tế bào được chọn từ nhóm bao gồm dòng tế bào ST, PK-15, Marc-145, MDBK, BT, Vero, BHK-21, dòng tế bào thận lợn (IBRS-2) và dòng tế bào thận thỏ (RK), và dòng tế bào nguyên bào sợi phôi gà hoặc tế bào sơ cấp là tế bào sơ cấp thận lợn.

32. Phương pháp theo điểm 28, trong đó bước nuôi cấy bao gồm việc cấy từng chủng virus để bào chế vaccin lên các tế bào miễn cảm với chủng đó, với mật độ tế bào nằm trong khoảng từ 1×10^6 /ml đến 5×10^6 /ml khi nuôi cấy trong lọ quay, hoặc với mật độ tế bào nằm trong khoảng từ 5×10^6 /ml đến 1×10^7 /ml khi nuôi cấy trong huyền phù cùng với chất mang có tác dụng dính kết được đưa vào buồng phản ứng sinh học.

33. Phương pháp theo điểm 32, trong đó chủng virus để bào chế vaccin phòng PRRSV được cấy với hệ số gây nhiễm (MOI) là 0,01-0,5, chủng virus để bào chế vaccin phòng CSFV được cấy với hệ số gây nhiễm MOI là 0,1-0,5, và/hoặc chủng virus để bào chế vaccin phòng PRV được cấy với hệ số gây nhiễm MOI là 0,005-0,5.

34. Phương pháp theo điểm 28, trong đó bước b) bao gồm việc phối trộn virus PRRSV để bào chế vaccin thu được với virus CSFV để bào chế vaccin theo tỷ lệ TCID₅₀ từ 10000:1 đến 1:1.

35. Phương pháp theo điểm 28, trong đó bước b) bao gồm việc phối trộn virus PRRSV để bào chế vaccin thu được với virus PRV để bào chế vaccin theo tỷ lệ TCID₅₀ từ 1:1 đến 1:30.

36. Phương pháp theo điểm 28, trong đó bước b) bao gồm việc phối trộn virus PRRSV để bào chế vaccin, virus CSFV để bào chế vaccin và virus PRV để bào chế vaccin, đã thu được, theo tỷ lệ TCID₅₀ từ 10^4 :1:10⁵ đến khoảng 5:1:6.

37. Phương pháp theo điểm 28, trong đó bước b) còn bao gồm việc phối trộn hỗn hợp của các dung dịch virus thu được với tác nhân bảo vệ đông lạnh.

38. Phương pháp theo điểm 37, trong đó hỗn hợp của các dung dịch virus thu được được trộn với tác nhân bảo vệ đông lạnh theo tỷ lệ thể tích là 75-80 : 25-20.

39. Chế phẩm vacxin được sản xuất bằng phương pháp theo điểm 28.
40. Chế phẩm vacxin chứa vacxin phòng virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV) và vacxin phòng virus ở lợn thứ hai, trong đó vacxin phòng virus ở lợn thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm vacxin phòng virus gây bệnh sốt cổ điển ở lợn (CSFV) và vacxin phòng virus gây bệnh giả dại (PRV), và trong đó vacxin phòng PRRSV chứa PRRSV giảm độc lực chứa trình tự nucleotit Nsp2 mã hóa trình tự protein Nsp2, trong đó trình tự protein Nsp2, khi so sánh với SEQ ID NO: 11, thì thiếu đoạn peptit chứa ít nhất 20 axit amin kề nhau trong SEQ ID NO: 9, trong đó vacxin phòng PRRSV và vacxin thứ hai về cơ bản không ức chế miễn dịch lẫn nhau.
41. Chế phẩm vacxin theo điểm 40, trong đó đoạn peptit chứa ít nhất là 30, ít nhất là 40, ít nhất là 50, ít nhất là 60, ít nhất là 70, ít nhất là 75, ít nhất là 80, ít nhất là 85, ít nhất là 90, ít nhất là 95, ít nhất là 100, ít nhất là 105, ít nhất là 110, ít nhất là 115 hoặc ít nhất là 120 axit amin kề nhau.
42. Chế phẩm vacxin theo điểm 40, trong đó đoạn peptit bao gồm SEQ ID NO: 9.
43. Chế phẩm vacxin chứa vacxin phòng virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV) và vacxin phòng virus ở lợn thứ hai, trong đó vacxin phòng virus ở lợn thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm vacxin phòng virus gây bệnh sốt cổ điển ở lợn (CSFV) và vacxin phòng virus gây bệnh giả dại (PRV), trong đó vacxin phòng PRRSV chứa PRRSV giảm độc lực được giảm độc lực từ PRRSV có khả năng gây bệnh cao, và trong đó PRRSV giảm độc lực chứa trình tự nucleotit Nsp2 được mã hóa bởi trình tự ADN, trong đó trình tự ADN này, khi so sánh với SEQ ID NO: 5, thì thiếu 90 nucleotit không kề nhau trong SEQ ID NO: 6, trong đó vacxin phòng PRRSV và vacxin thứ hai về cơ bản không ức chế miễn dịch lẫn nhau.
44. Chế phẩm vacxin theo điểm 43, trong đó nucleotit Nsp2 được mã hóa bởi trình tự tương đồng ít nhất 90% với SEQ ID NO: 2.
45. Chế phẩm vacxin theo điểm 44, trong đó nucleotit Nsp2 được mã hóa bởi trình tự bao gồm SEQ ID NO: 2.
46. Chế phẩm vacxin chứa vacxin phòng virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV) và vacxin phòng virus ở lợn thứ hai, trong đó vacxin phòng virus ở lợn thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm vacxin phòng virus gây bệnh sốt cổ điển ở lợn

(CSFV) và vaccin phòng virus gây bệnh giả dại (PRV), và trong đó vaccin phòng PRRSV chứa PRRSV giảm độc lực chứa trình tự nucleotit Nsp2 được mã hóa bởi trình tự ADN có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO: 2, trong đó vaccin phòng PRRSV và vaccin thứ hai về cơ bản không ức chế miễn dịch lẫn nhau.

47. Chế phẩm vaccin chứa vaccin phòng virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV) và vaccin phòng virus ở lợn thứ hai, trong đó vaccin phòng virus ở lợn thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm vaccin phòng virus gây bệnh sốt cổ điển ở lợn (CSFV) và vaccin phòng virus gây bệnh giả dại (PRV), và trong đó vaccin phòng PRRSV chứa PRRSV giảm độc lực chứa trình tự nucleotit Nsp2 mã hóa trình tự protein Nsp2 có độ tương đồng trình tự ít nhất 90% với trình tự protein Nsp2 được mã hóa bởi SEQ ID NO: 2, trong đó vaccin phòng PRRSV và vaccin thứ hai về cơ bản không ức chế miễn dịch lẫn nhau.

360 nucleotit kế nhau, vắng mặt trong trình tự mã hoá Nsp2 của chủng PRRSV TJM

5	10	15	20	25	30	35	40	45
TCAAGTGT	TAAGATCACAC	GCCCAAA	ATACTCAG	CTCAAGCC	ATC			
ATCGACTC	TGGCGGGC	CTTGCAGT	GGGCATCT	CCAAAAGG	AAAAA			
GAAGCATG	CCTCAGCAT	CATGCGTG	AGGCTTGT	GATGCGT	CCAAG			
CTTGGTG	ATCCTGCT	ACGCAGG	AGTGGCTC	TCTCGCAT	GTGGG	GATA		
GGGTTG	ACATGCTG	ACTTGGCG	CAACACGT	CTGCTTAC	CAGGCGT			
TTTCGC	ATCTTAAAT	GGCAGTTT	GAGTTTCT	CCCAAAG	ATGATTCT	CG		
AGACAC	CGCCGCC	CCCCAC	CCGTGCG	GGTTTGT	GATGTTAC	CTCG	CAC	
GCCTGC	ACCTTCCG	TGAGTGC	AGAGAGT	GACCTCAC	CCATT			

Fig.1

Trình tự axit amin protein, vắng mặt trong protein Nsp2 của chủng PRRSV TJM

5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
SSVKITR	PKYSAQA	IIDSGG	PCSGHL	QKEKEA	CLSIMR	EACDAS	KLGDPA		
TQEWLS	SRMWD	RVDMLT	WRNTS	AYQAF	RILNGR	FEFLPK	MILETP	PPPHPC	
GFVML	PRTPA	PSVSA	ESDLTI						

Fig.2

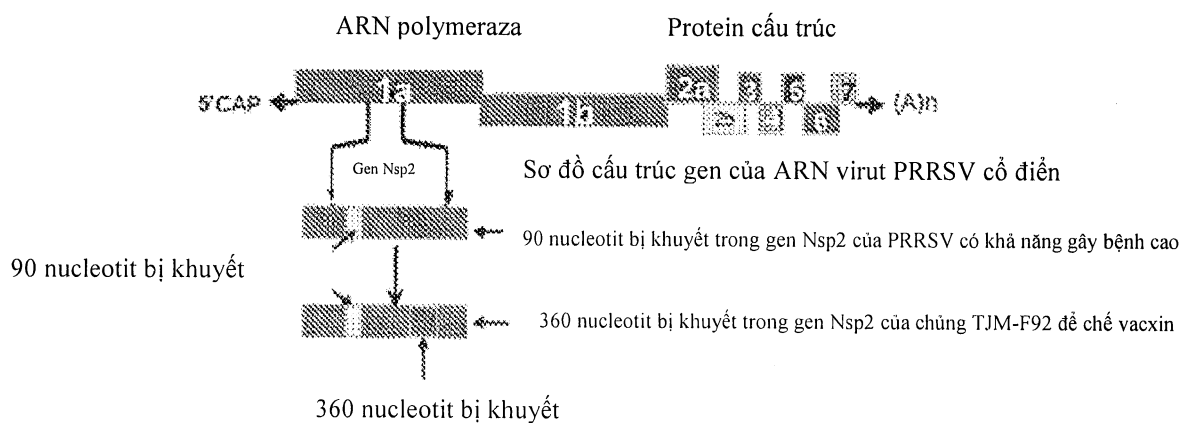


Fig.3

	C C T A A C G G T T C G G A A G A - - - A A C T G T C G G T	Đa phần
	2770 2780 2790	
2761	C C T A A C A G T T C G G A A G A T T T G G C T G T T A G T	VR-2332
2761	C C T A A C G G T T C G G A A G A - - - A A C T G T C G G T	TJ
2761	C C T A A C G G T T C G G A A G A - - - A A C T G T C G G T	TJM-F92
	C C T G C A C C G C G T A G A A C T G T - - - - - - - -	Đa phần
	2920 2930 2940	
2911	C C C G C A C C T C G C G G A A C T G T G T C T C S A C C G	VR-2332
2908	C C T G C A C C G C G T A G A A C T G T - - - - - - - -	TJ
2908	C C T G C A C C G C G T A G A A C T G T - - - - - - - -	TJM-F92
	- -	Đa phần
	2950 2960 2970	
2941	G T G A C A C C C T T G A G T G A G C C G A T C C C T G T G	VR-2332
2929	- -	TJ
2929	- -	TJM-F92
	- -	Đa phần
	2980 2990 3000	
2971	C C C G C A C C G C G C G T A A G T T T C A G C A G G T G	VR-2332
2929	- -	TJ
2929	- -	TJM-F92
	- -	Đa phần
	3010 3020 3030	
3001	A A A A G A T T G A G T T C G G C G G C G G C A A T C C C A	VR-2332
2929	- -	TJ
2929	- -	TJM-F92

Fig.4

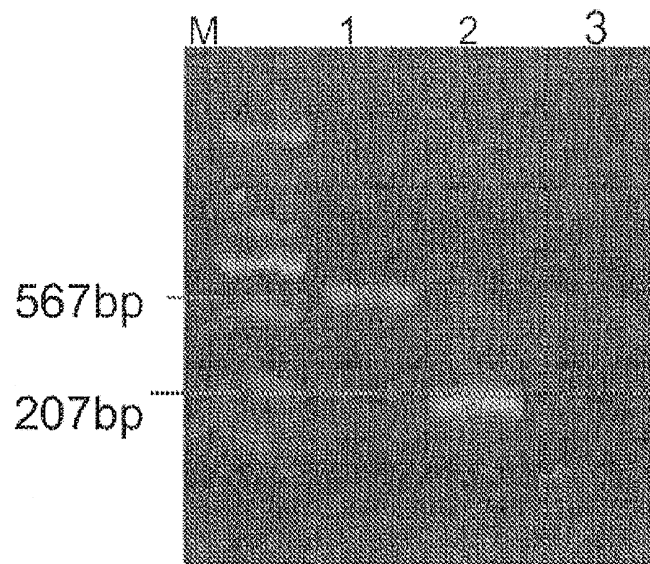


Fig.5

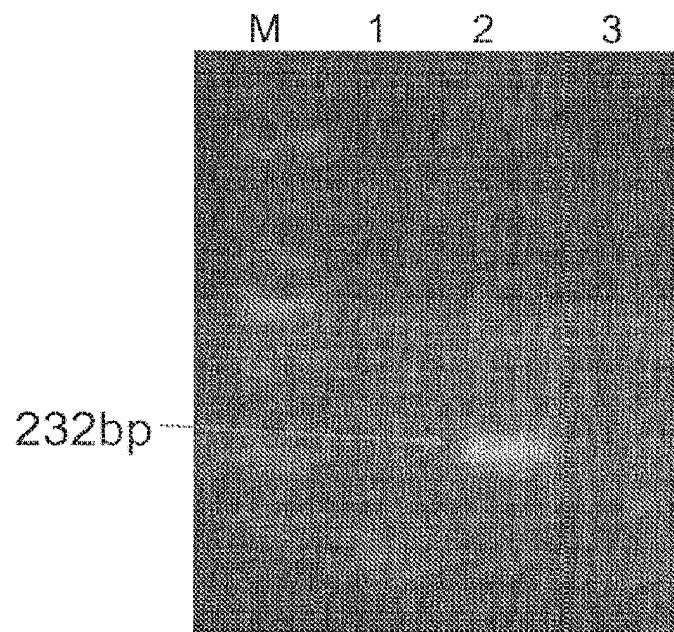


Fig.6

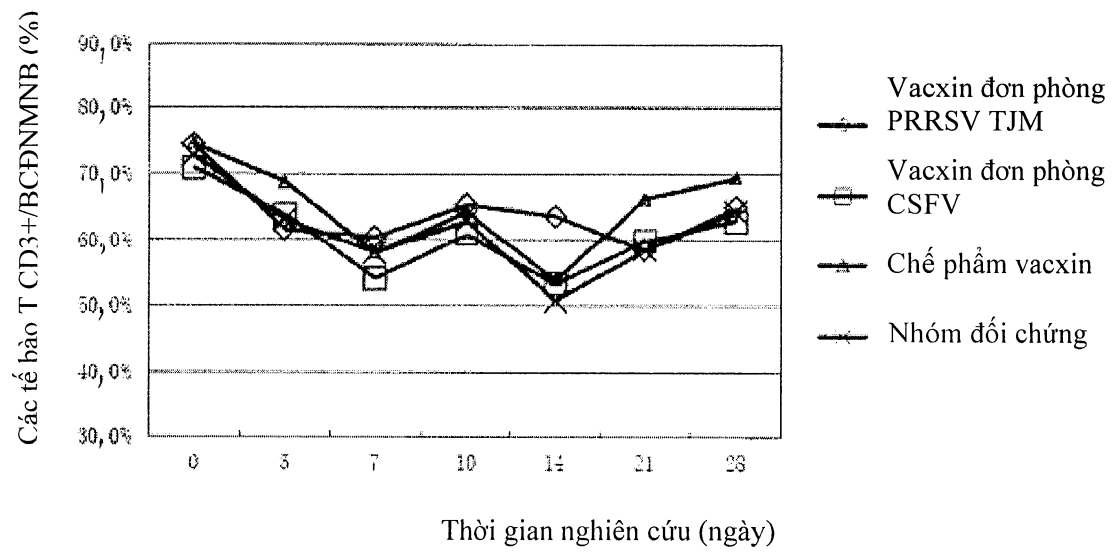


Fig.7

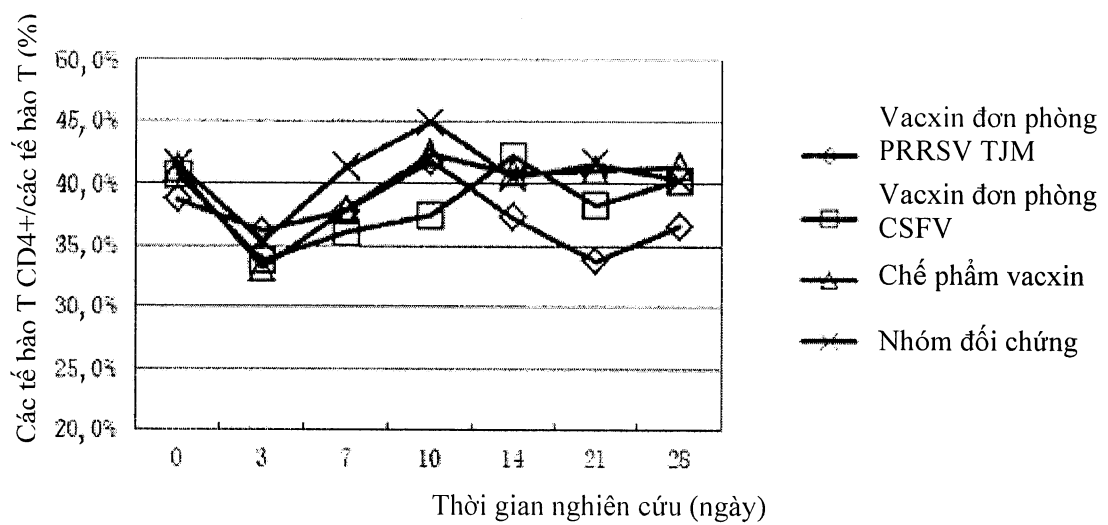


Fig.8

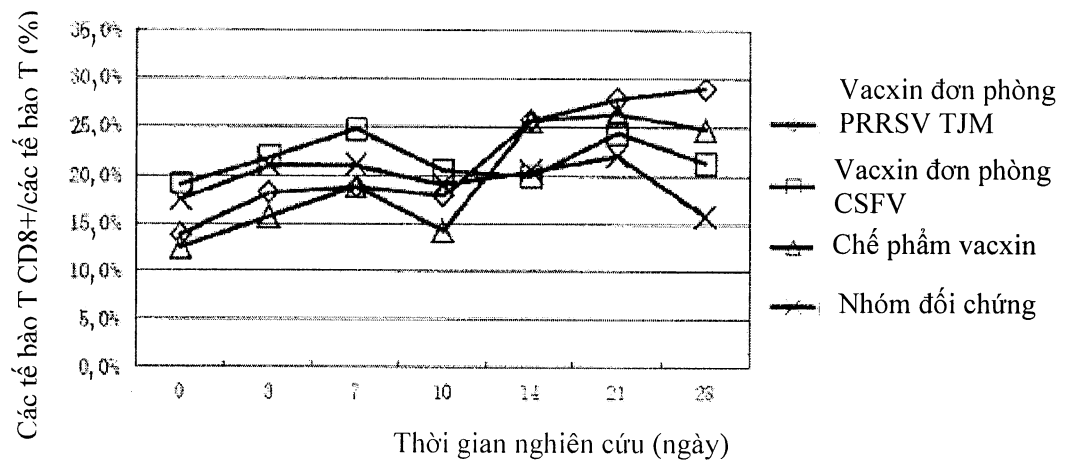


Fig.9

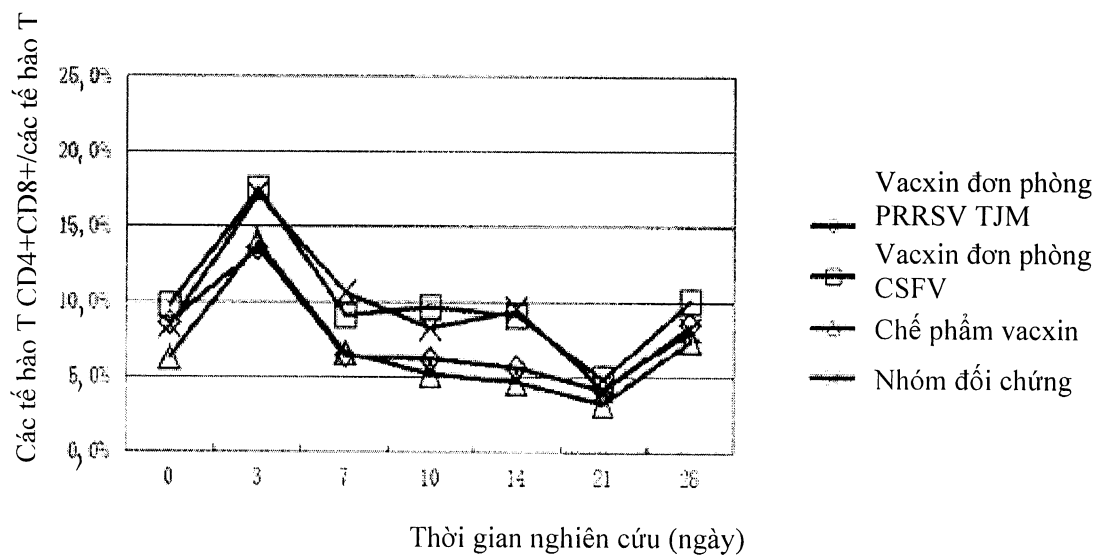


Fig.10

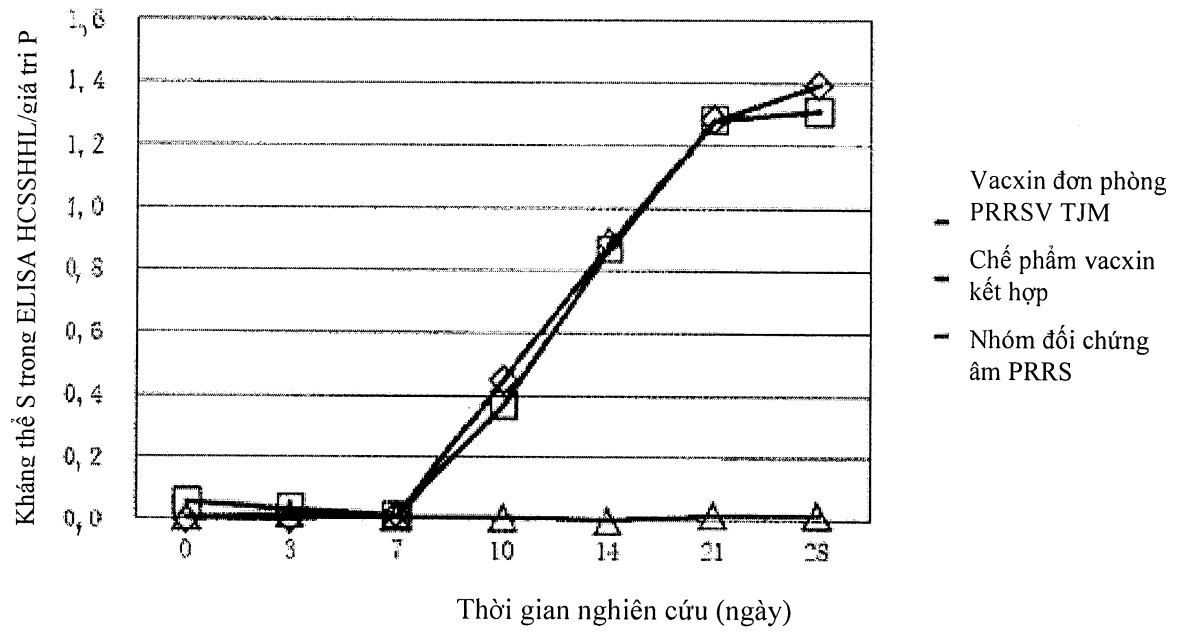


Fig.11

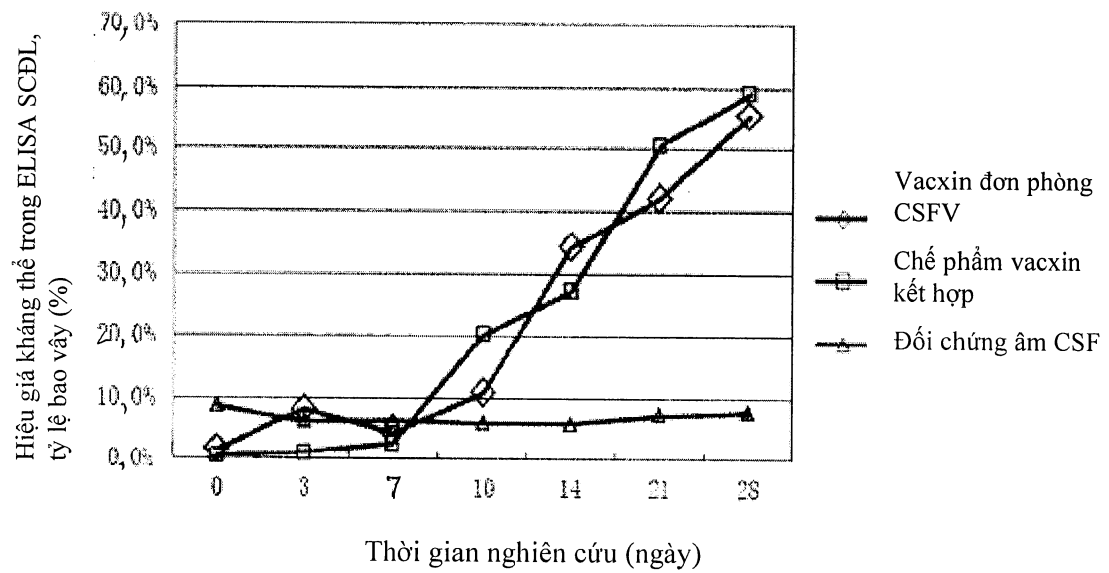


Fig.12

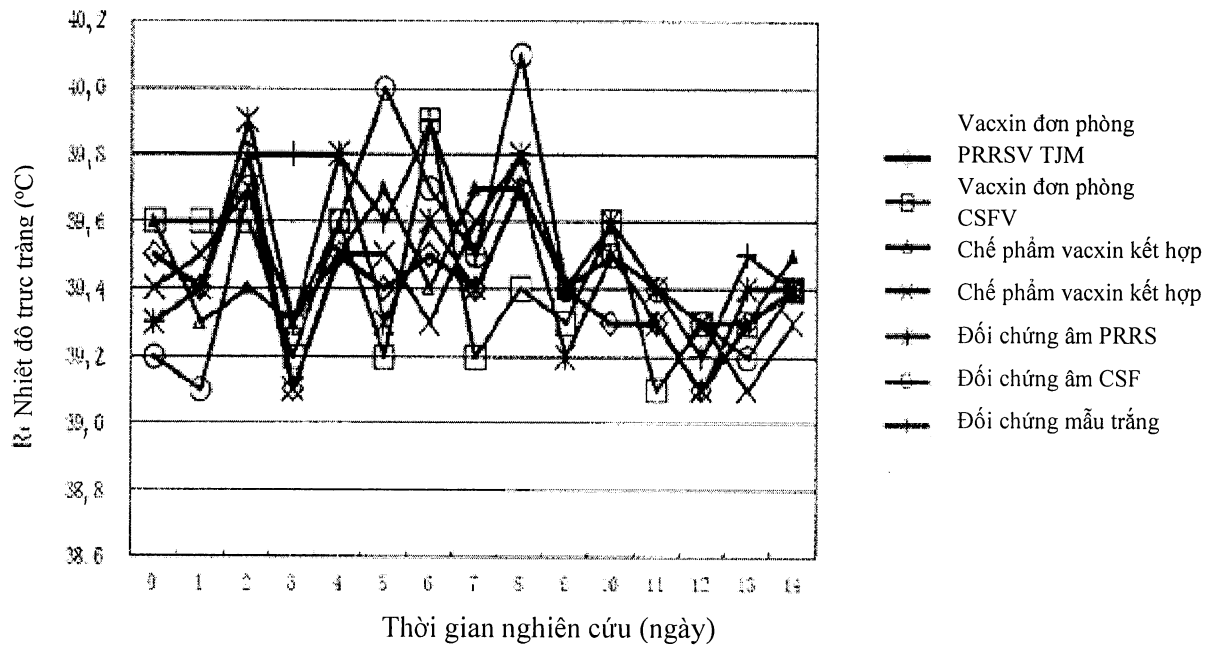


Fig.13

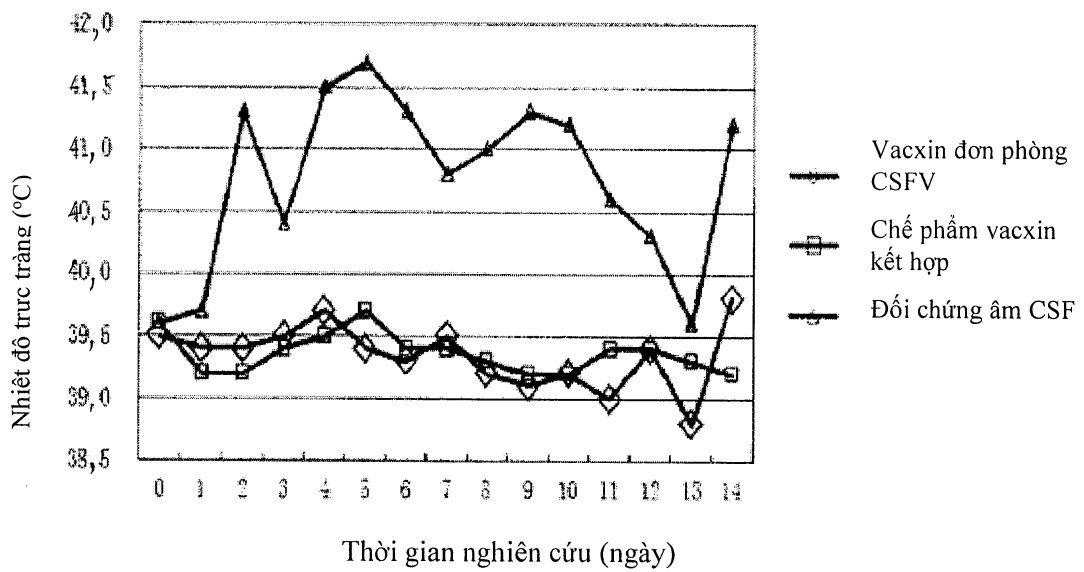


Fig.14

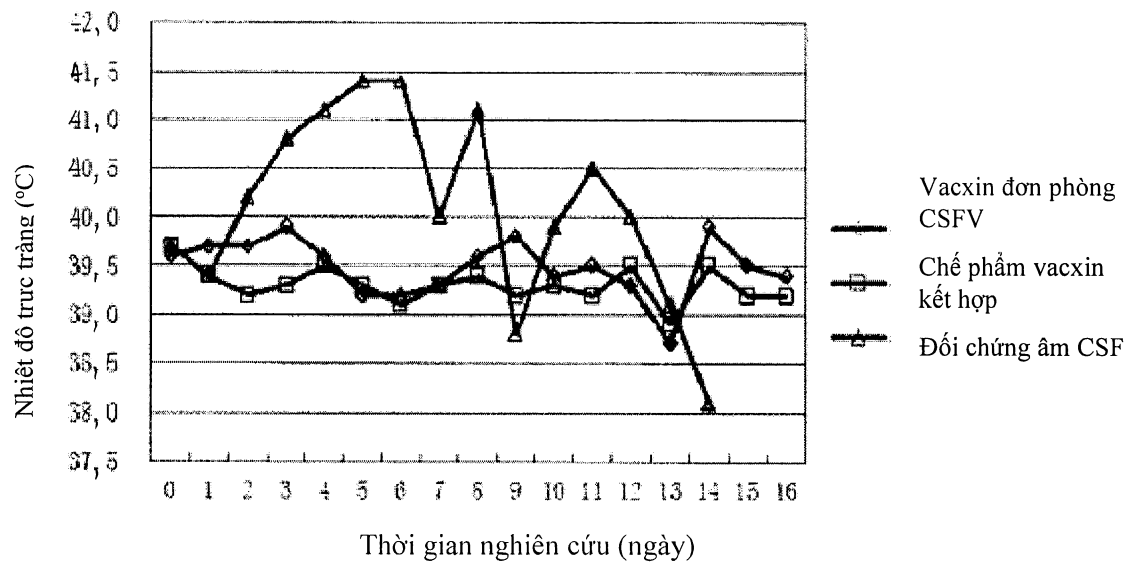


Fig.15

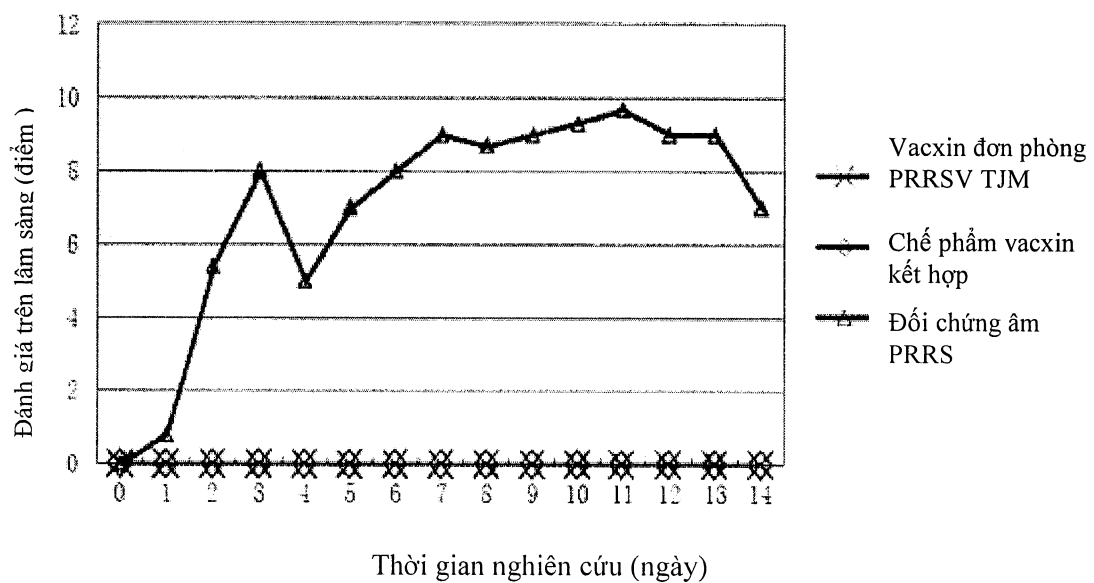


Fig.16

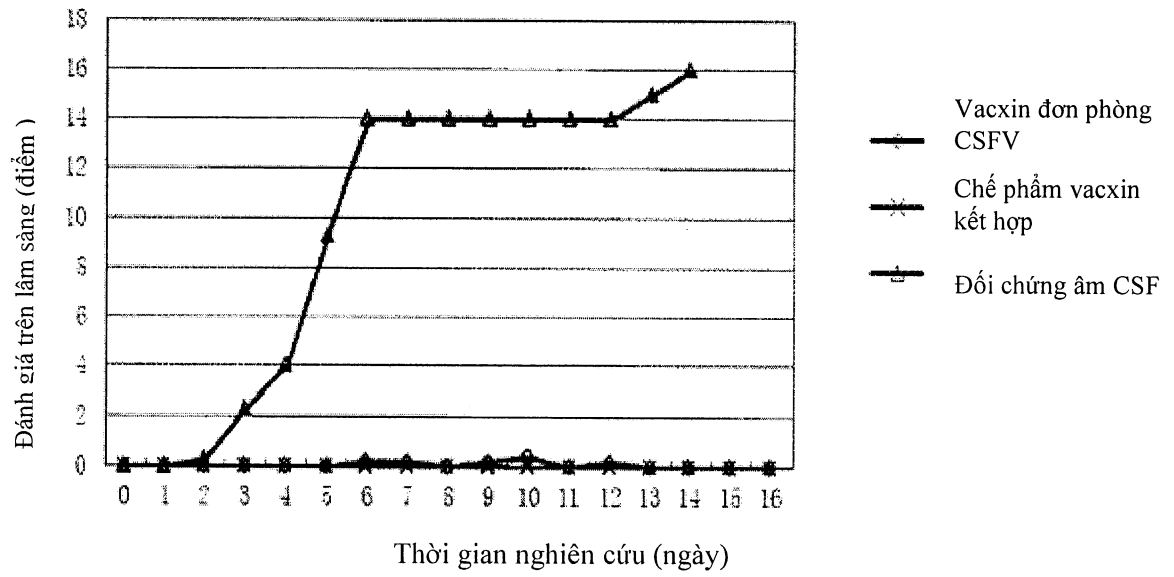


Fig.17

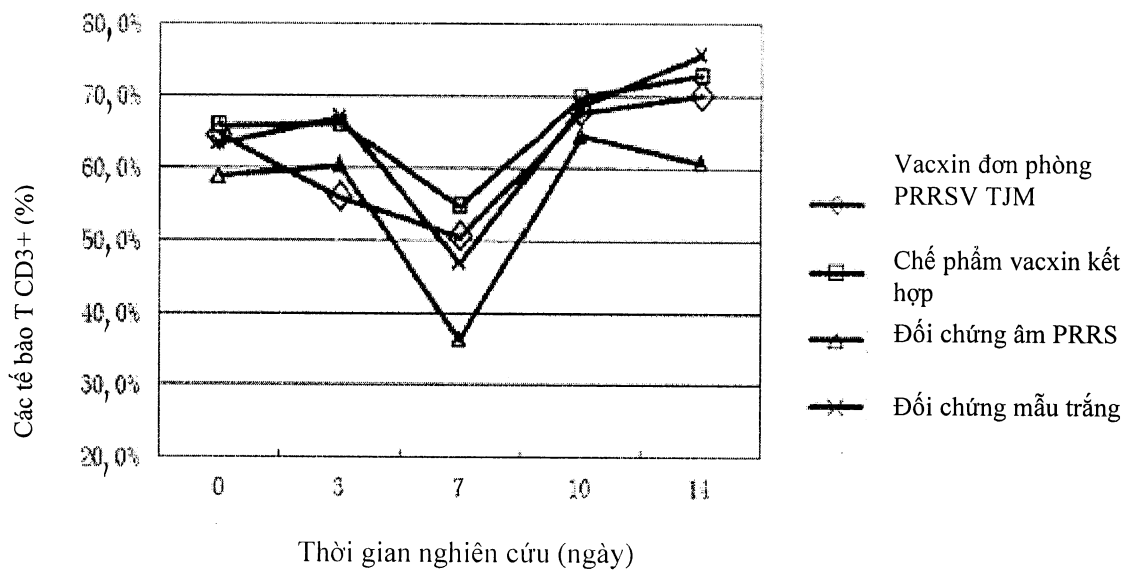


Fig.18

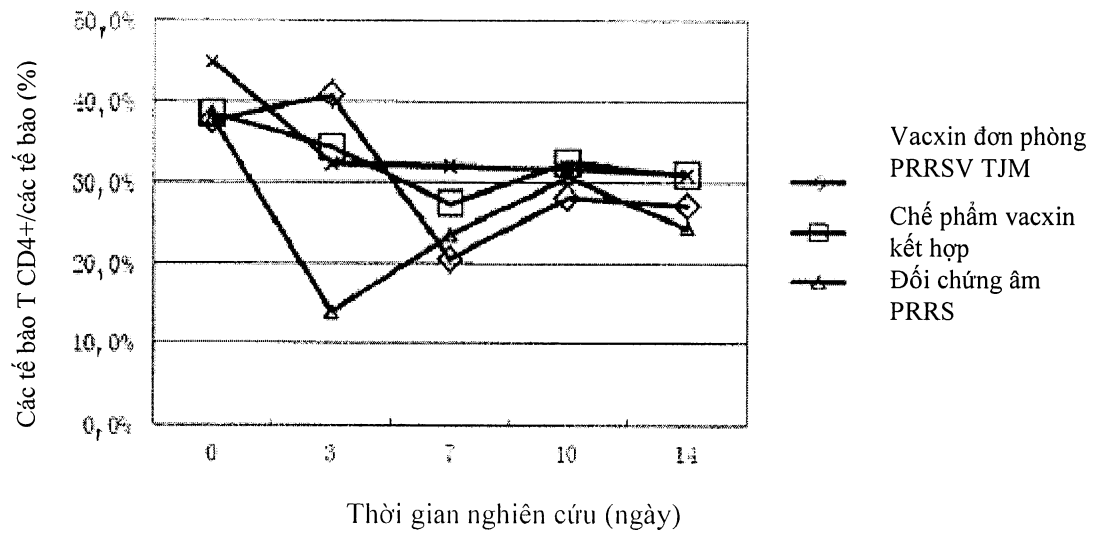


Fig.19

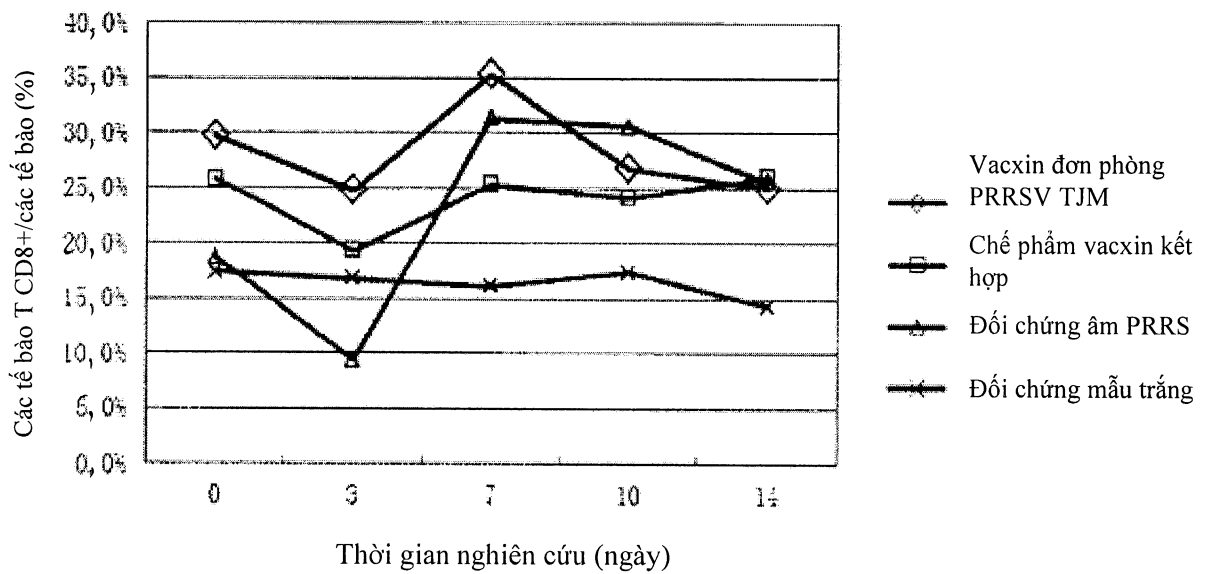


Fig.20

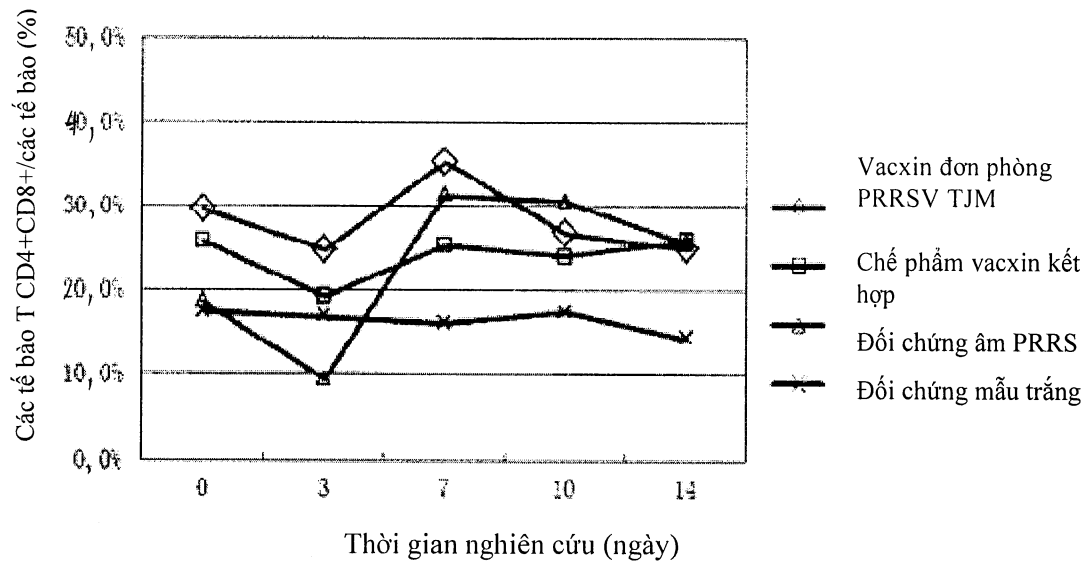


Fig.21

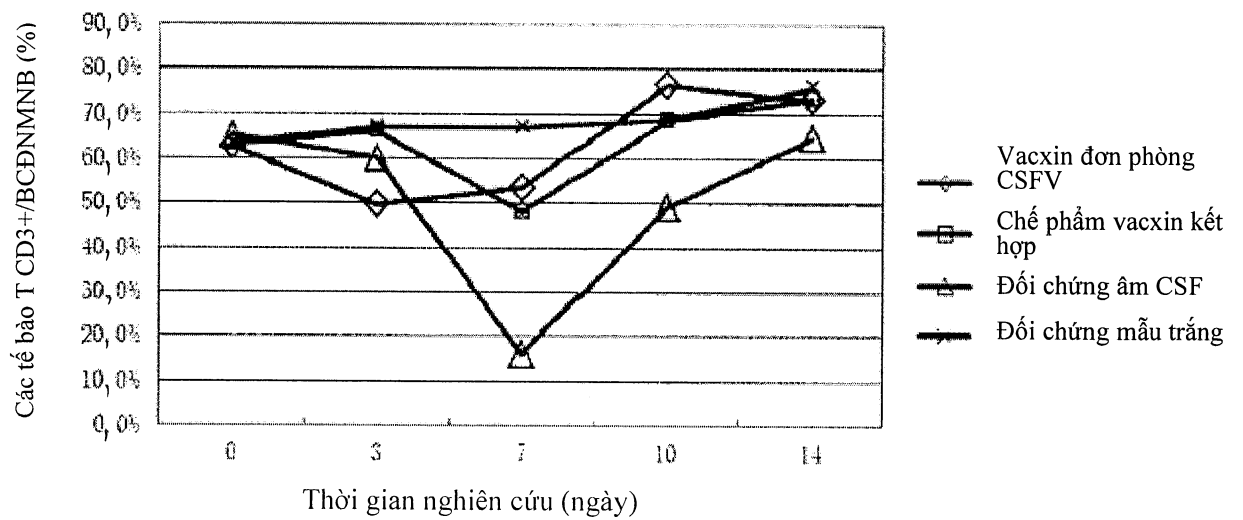


Fig.22

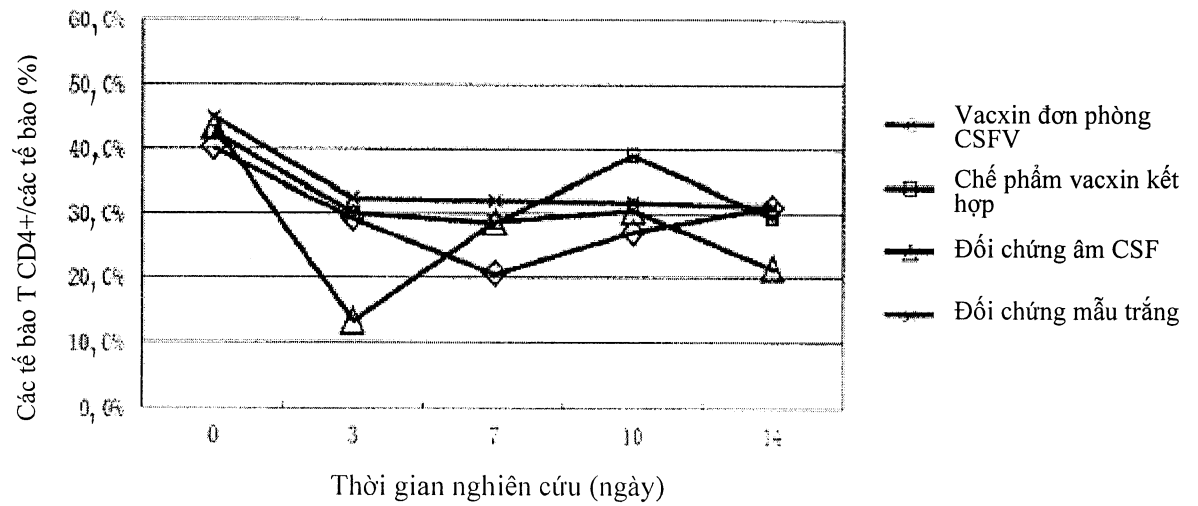


Fig.23

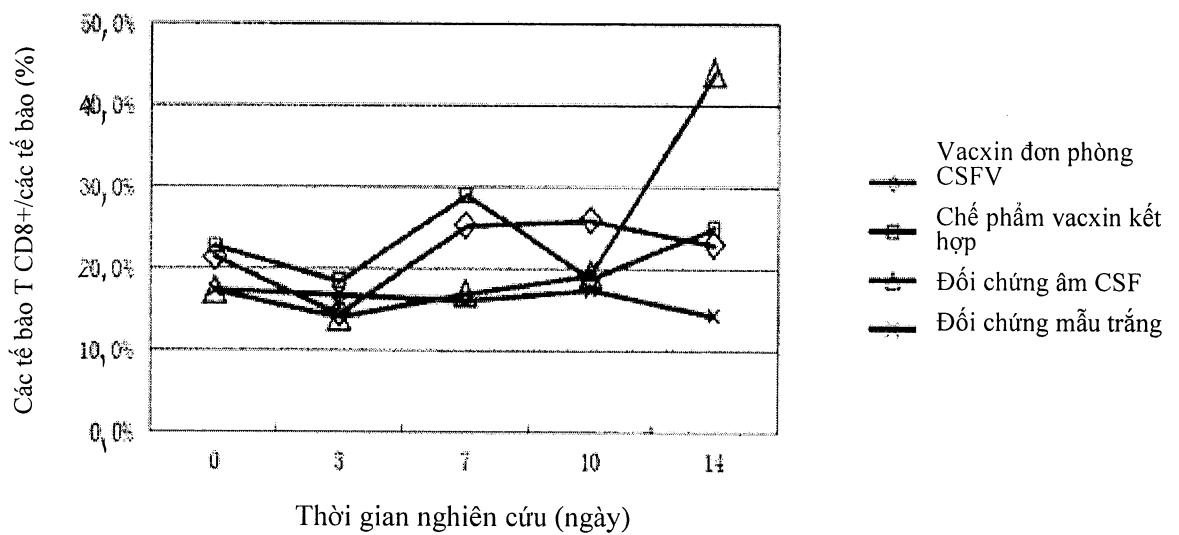


Fig.24

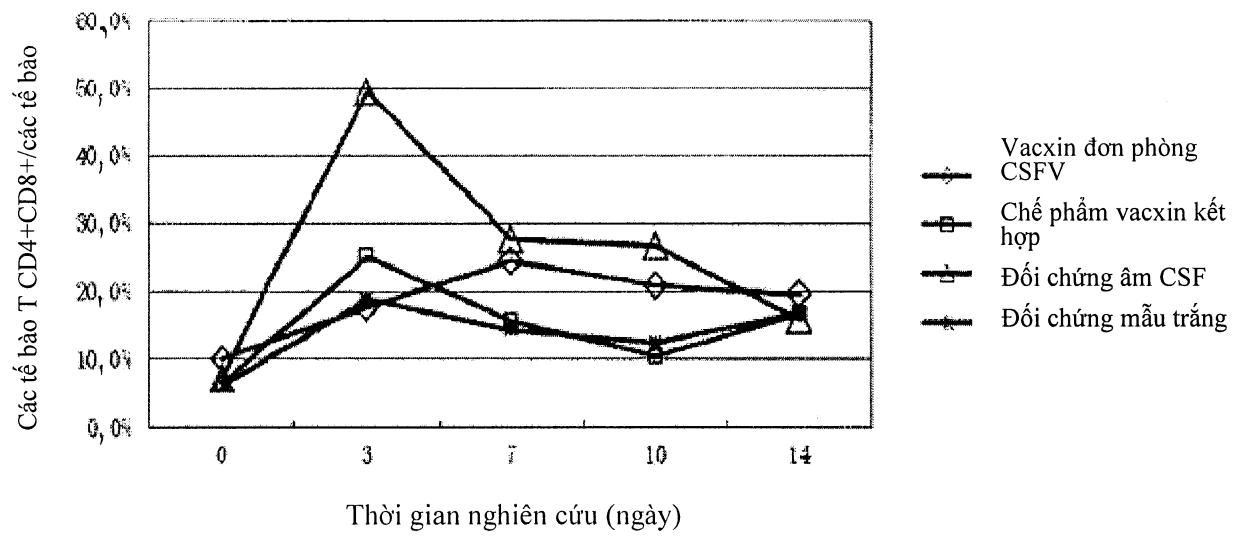


Fig.25

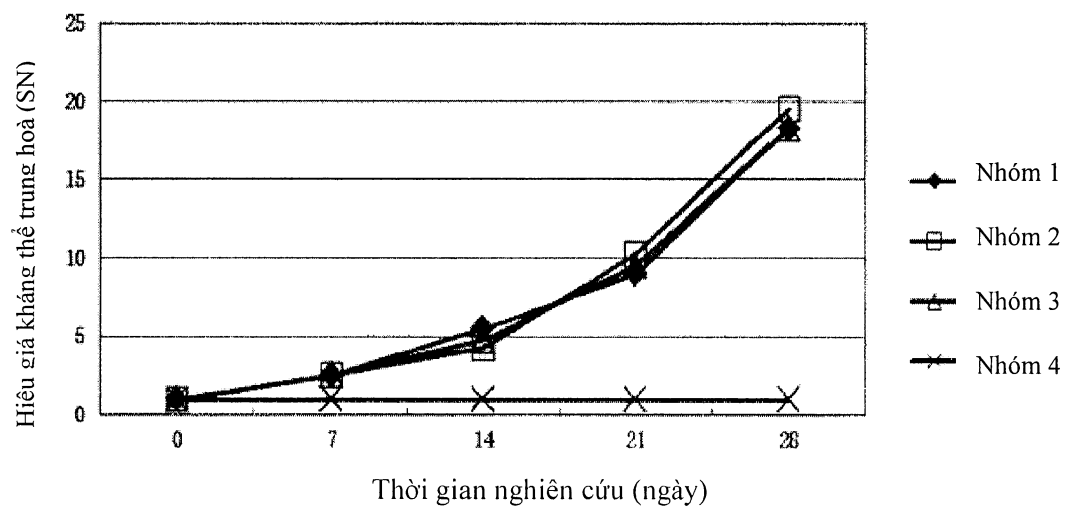


Fig.26

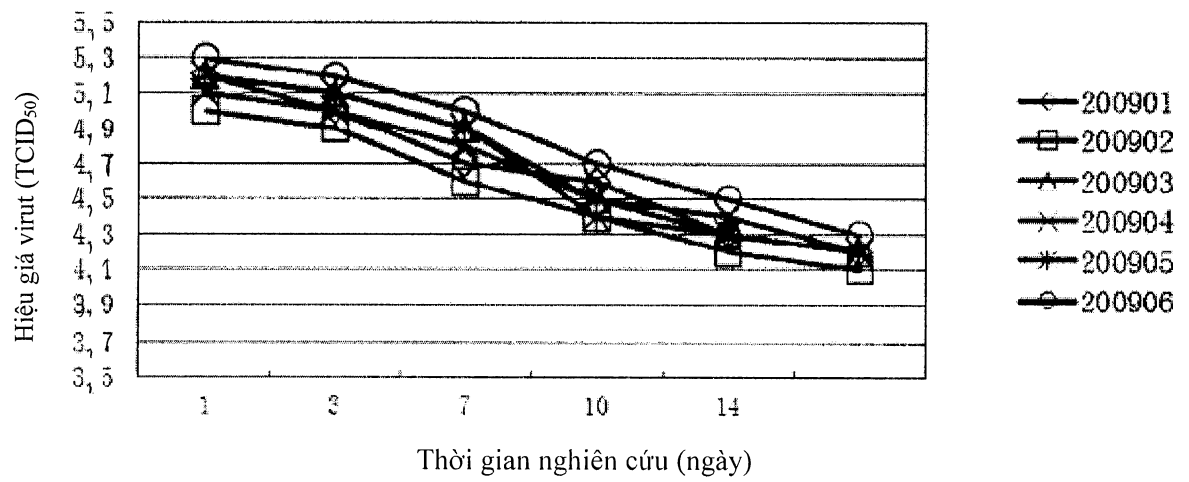


Fig.27

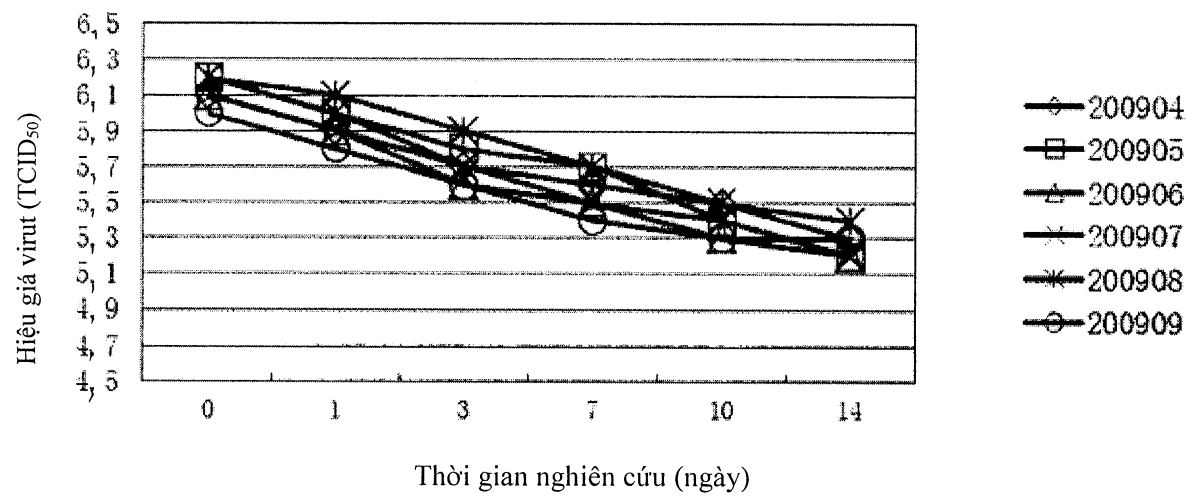


Fig.28

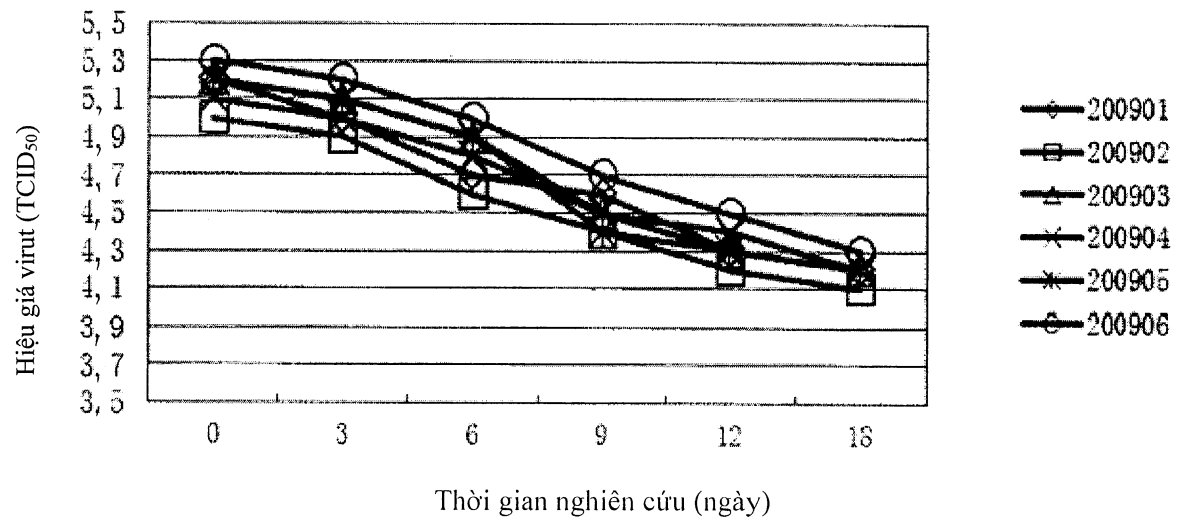


Fig.29

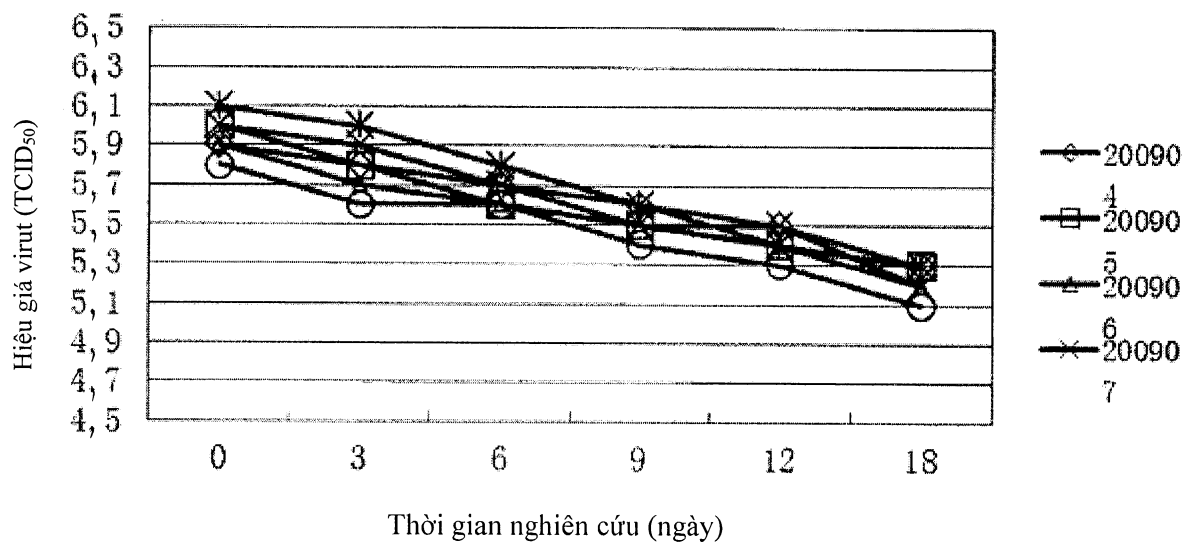


Fig.30

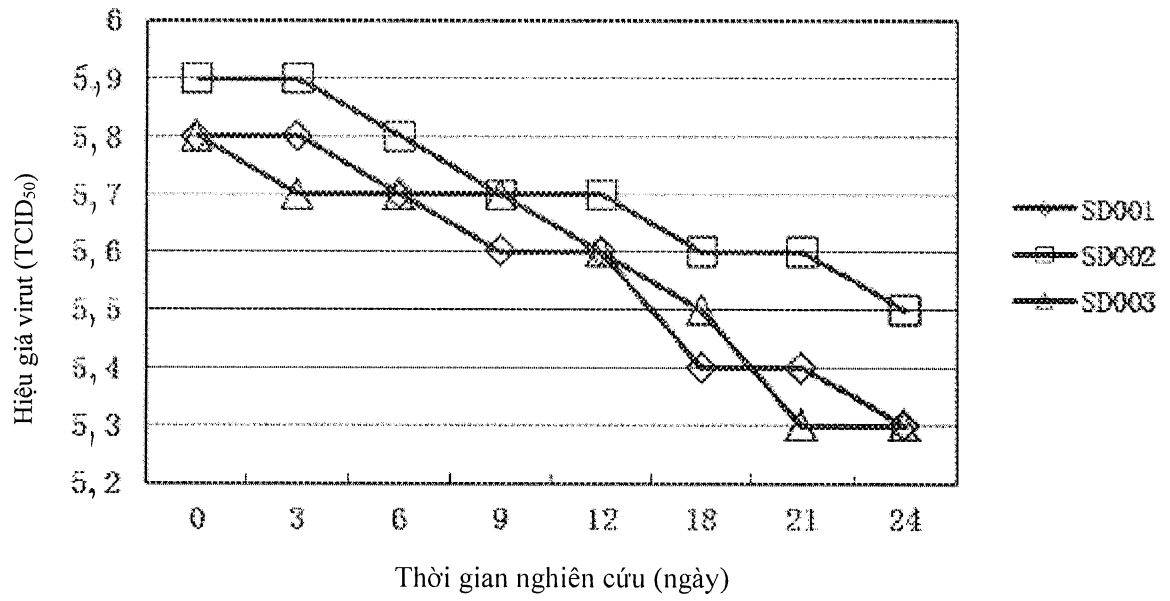


Fig.31

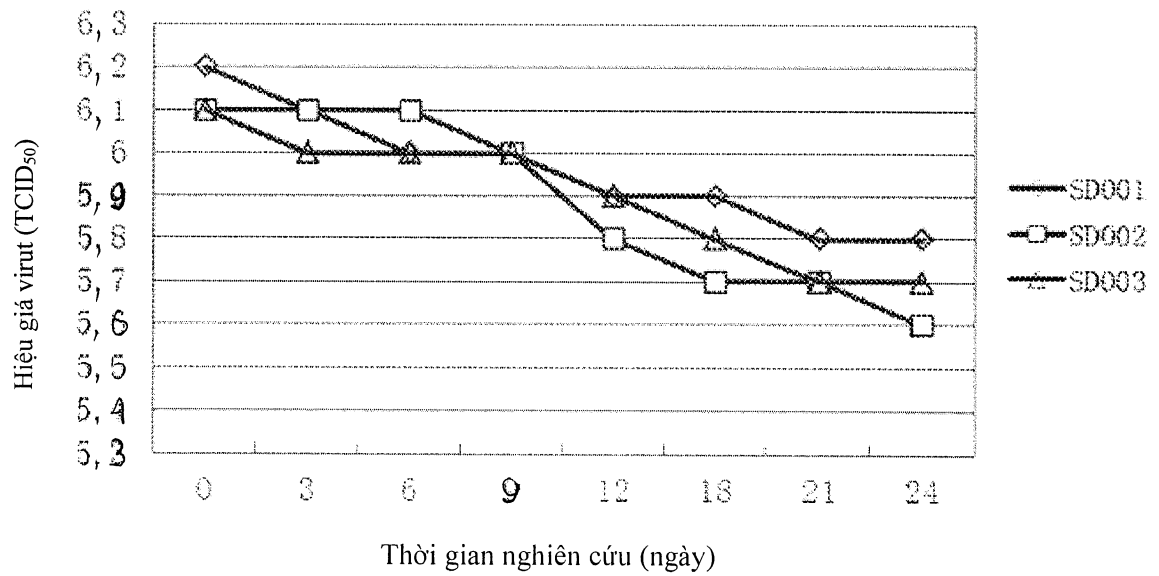


Fig.32

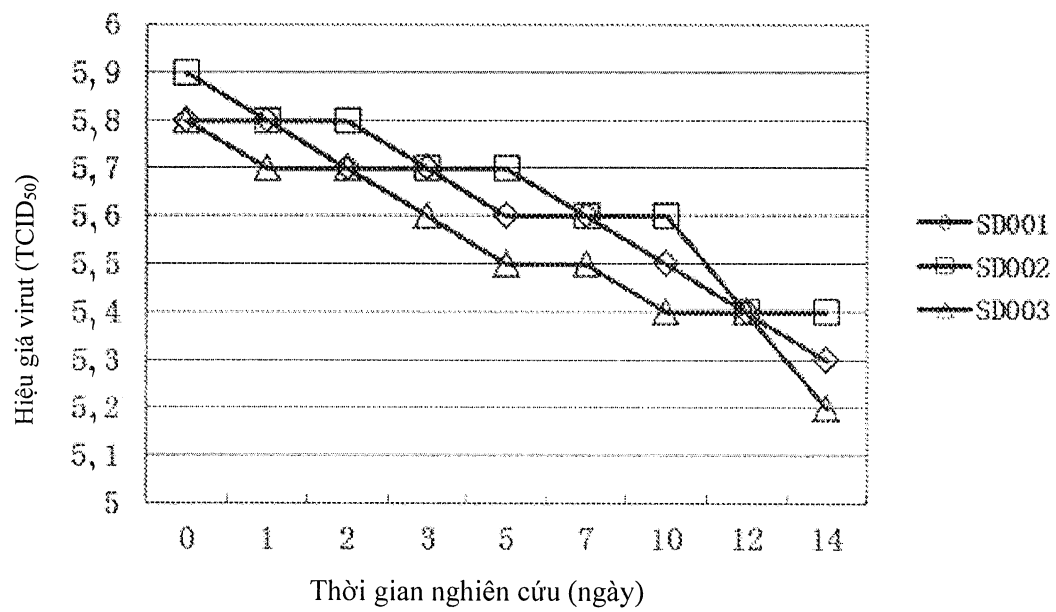


Fig.33

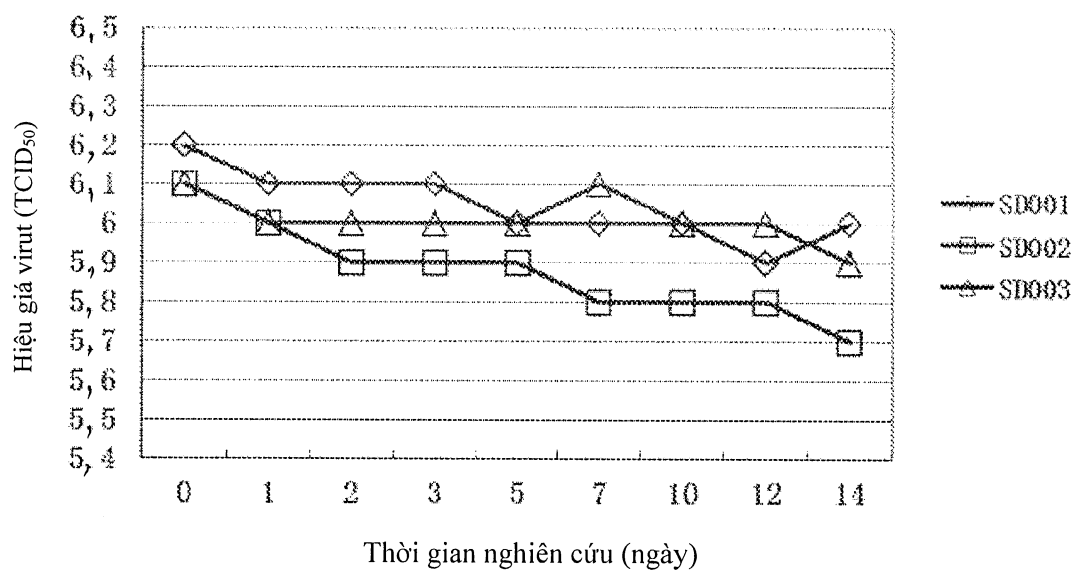


Fig.34

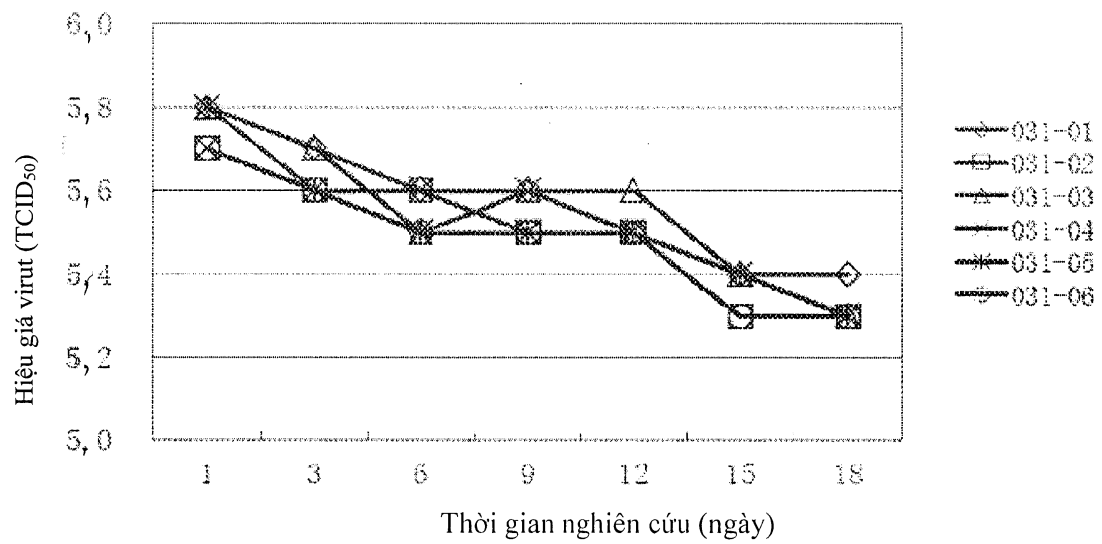


Fig.35

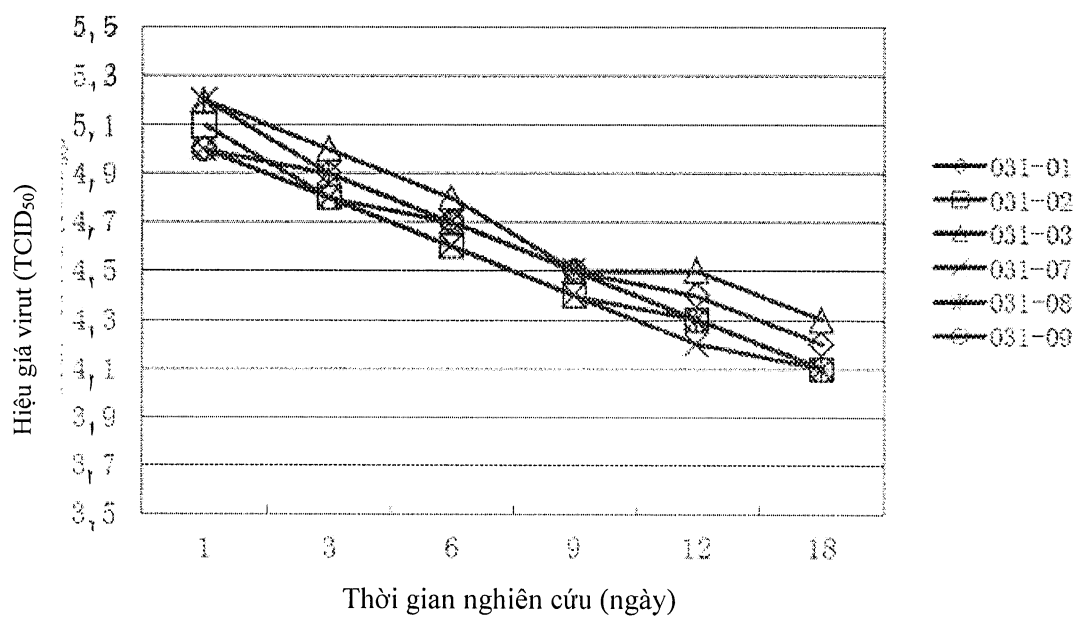


Fig.36

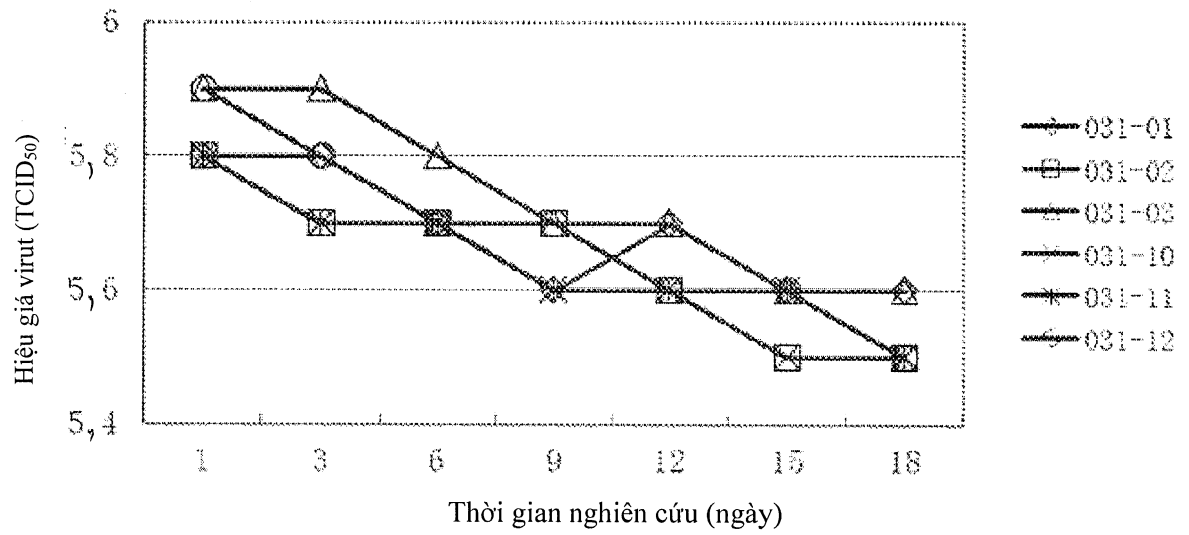


Fig.37

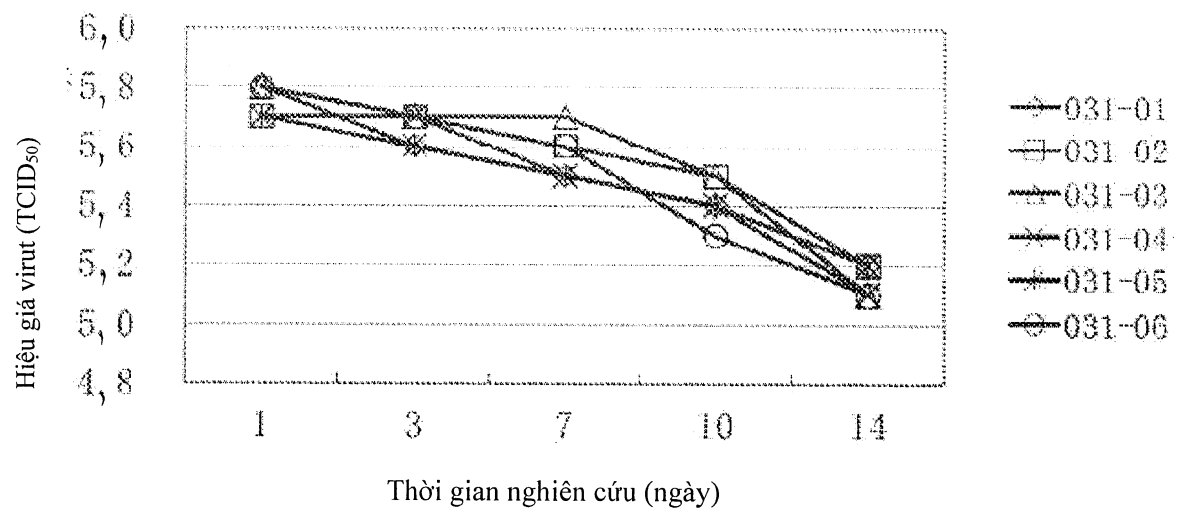


Fig.38

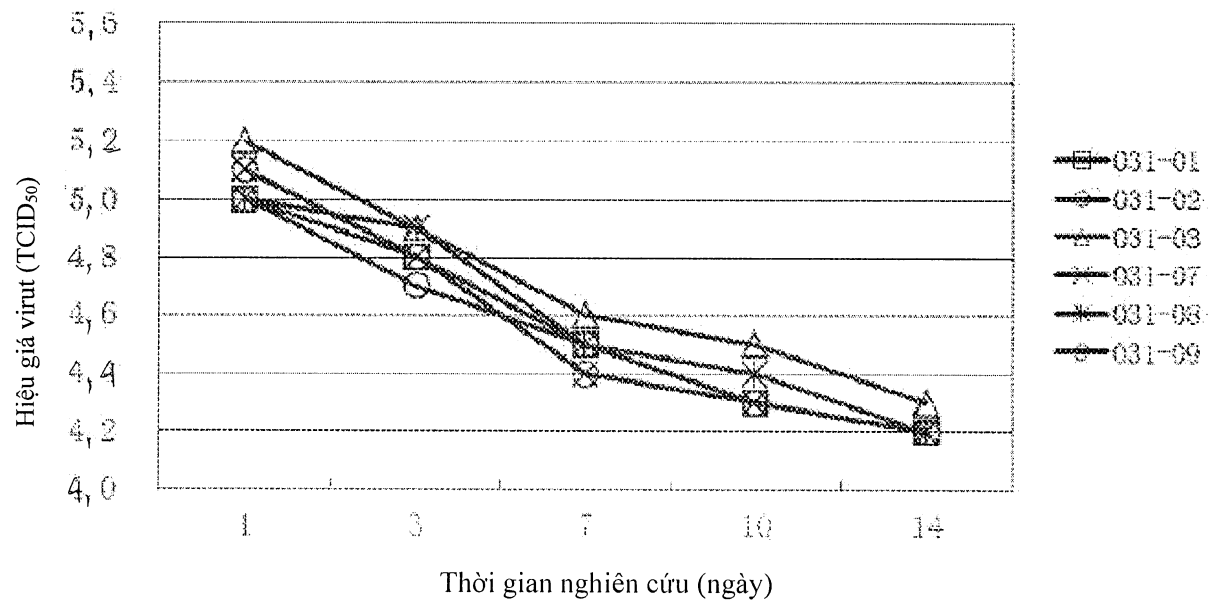


Fig.39

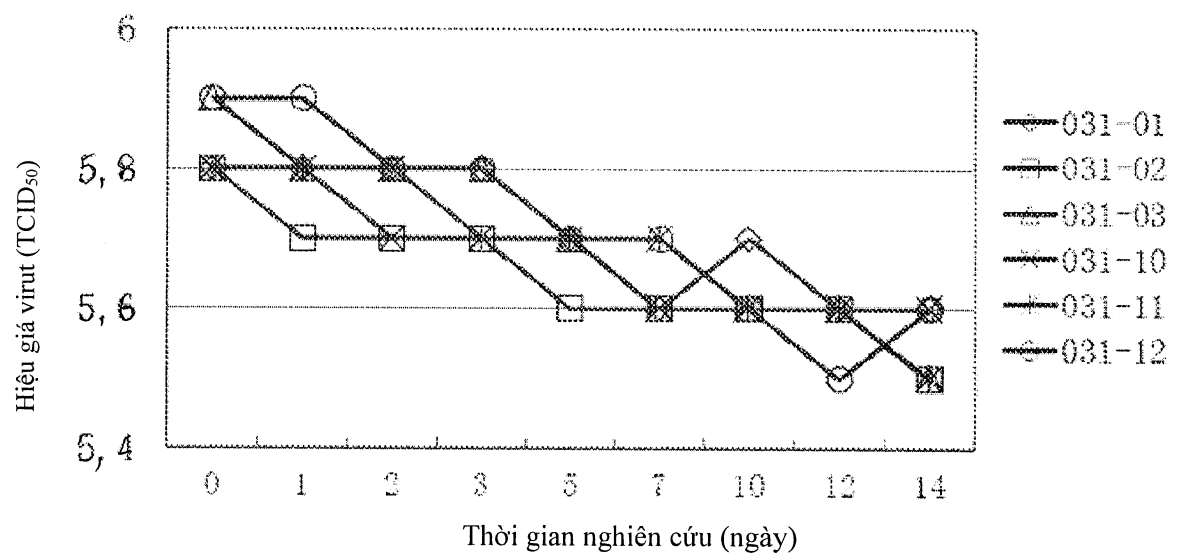


Fig.40

DANH SÁCH TRÌNH TỰ

<110> Sinovet (Beijing) Biotechnology Co. Ltd
Wu, Hua
Xia, Mingqi
He, Yanliang

<120> CHẾ PHẨM VACCIN ĐỂ PHÒNG NHIỄM VIRUT Ở LỢN VÀ PHƯƠNG PHÁP BẢO CHẾ CHẾ PHẨM VẮC XIN NÀY

<130> 038229-8002W001

<150> CN2011110140951.5

<151> 2011-05-27

<150> CN2011110331206.9

<151> 2011-10-27

<150> CN2011110331159.8

<151> 2011-10-27

<160> 11

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 1149

<212> ADN

<213> Virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn

<400> 1

```

atgtctggga tacttgatcg gtgcacgtgt accccaatg ccagggtgtt tgtggcggag      60
ggccagggtct actgcacacg atgtctcagt gcacgggtctc tccttcctct gaatctccaa    120
gttcctgagc ttgggggtgct ggggtctattc tataggcccg aagagccact ccgggtggacg    180
ttgccacgtg cattccccac tgtcgagtgc tccccgccg gggcctgctg gctttctgcg      240
atctttccga ttgcacgaat gactagtga aacctgaact ttcaacaaag aatgggtgcgg      300
gtcgcagctg aaatctacag agccggccaa ctcacccta cagttctaaa gactctacaa      360
gtttatgaac ggggttgtcg ctggtacccc attgtcgggc ccgtccctgg ggtgggcgtt      420
tacgccaact ccctgcatgt gagtgacaaa ctttcccg gagcaactca tgtgttaacc      480
aacttgccgc tcccgagag gcccaaacct gaggactttt gcccttttga gtgtgctatg      540
gctgacgtct atgacattgg tcgtggcgcc gtcattgatg tggccggagg aaaggtctct      600
tgggcccctc gtgggtggaa tgaagtgaat tttgaacctg tcccaagga gttgaagttg      660
gttgcaacc gactccacac ctcttccc cccatcacg tagtggacat gtccaggttt      720
accttcatga cccctgggag tgggtgtctc atgcgggttg agtaccaata cggctgcctc      780

```

cccgctgaca ctgtccctga aggaaactgc tgggtggcgct tgtttgactc gctcccaccg 840
 gaagttcagt acaaagaaat tcgccacgct aaccaatttg gctatcaaac caagcatggg 900
 gtccctggca agtacctaca gcggaggctg caagttaatg gtcttcggac agtgaccgac 960
 acacatggac ctatcgatcat acagtacttc tctgttaagg agagttggat ccgccacctg 1020
 aagttggtgg aagaaccag cctccccggg tttagaggatc tcctcagaat cagggttgag 1080
 cccaatacgt caccactggc tggaaaggat gagaagattt tccggtttgg cagtcataag 1140
 tggtaggt 1149

<210> 2

<211> 2490

<212> ADN

<213> Virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn

<400> 2

gccggaaaga gagcaaggaa aacacgctct ggtgcgacta ctatggtcgc tcatcacgct 60
 tcgtccgctc ataaaatccg gcaggccacg aagcacgagg gtgccggcgc taacaaggct 120
 gagcatctca agcgctactc tccgcctgcc gaagggaact gtggttggca ctgcatttcc 180
 gccatcgcca accggatggg gaattccaac tttagacca cccttcctga aagagtaagg 240
 ccttcagatg actgggccac tgacgaggat cttgtgaata ccatccaaat cctcaggctc 300
 cctgcccgtt tggacaggaa cggcgcttgc ggtagcgcca agtacgtgct taaactggag 360
 ggtgagcatt ggactgtctc tgtgatccct gggatgtccc ctactttgct cccccttgaa 420
 tgtgttcagg gttgttga acataagggc ggtcttgttt ccccgatgc ggtcgaaatt 480
 tccgatttg atcctgcctg ccttgaccga ctggctaagg taatgcactt gcctagcagt 540
 accatcccag ccgctctggc cgaattgtcc gacgactcca accgtccggg tccccggcc 600
 gctactacgt ggactgtttc gcaattctat gctcgtcata gaggaggaga tcatcatgac 660
 cagggtgtgct tagggaaaat catcagcctt tgtcaagtta ttgaggactg ctgctgccat 720
 cagaataaaa ccaaccgggc tactccggaa gaggtcgcgg caaagattga tcagtacctc 780
 cgtgacgcaa caagtcttga ggaatgcttg gccaaacttg agagagtttc cccgccgagc 840
 gcagcggaca cctcctttga ttggaatgtt gtgcttcctg gggttgaggc gacgaatcag 900
 acaaccgaac aacctcacgt caactcatgc tgcaccccg tccctcccgt gactcaagag 960
 cctttgggag aggactcggg ccctctgacc gccttctcac tgtccaattg ctattaccct 1020
 gcacaaggtg acgaggttca tcaccgtgag aggttaaatt ccgcactctc taagttggaa 1080

gaggttgtcc tggaagaata tgggctcatg tccactggac ttggcccgcg acccgtgctg 1140
 ccgagcgggc tcgacgagct taaagaccag atggaggagg atctgctaga actagccaac 1200
 acccaggcga cttcagaaat gatggcctgg gcggtgagc aggtcgattt aaaagcttgg 1260
 gtcaaaagct acccgcggtg gacaccacca cccctccac caagagttca acctgaaga 1320
 acaaagtctg tcaaaagttt gccagaggac aagcctgtcc ctgctccgag caggaaggctc 1380
 agatccgatt gcggcagccc ggttttgatg ggcgacaatg tccctaacgg ttcggaagaa 1440
 actgtcgggtg gtctcctcaa ttttccgaca ccatccgagc cgatgacacc tatgagttag 1500
 cccgtacttg tgcccgctc gcgacgtgtc cccaagctga tgacaccttt gagtgggtcg 1560
 gcaccagttc ctgcaccgag tagaactgtg acaacaacgc tgacgcacca ggatgagcct 1620
 ctggatttgt ctgctcctc acaaacggaa tatgaggctt cccccctaac accatcgag 1680
 aacatgggca tcctggaggc gggggggcaa gaagctgagg gagtcctgag tgaaatctcg 1740
 gatatactaa atgacaccaa ccctgcacct gtgtcatcaa gcagctccct gggttcagt 1800
 gccaccgagg atgttcacg catcctcggg aaaataggag aactgacga gctgcttgac 1860
 cgggggtccct cggcaccctc caaggagaa cgggtctgtg accaacctgc caaagatccc 1920
 cggatgtcgc cgcgggagtc tgacgagagc ataatagttc cggccgcaga tacaggtgg 1980
 gtcggctcat tcaactgattt gccgtcttca gatgggtgtg atgtggacgg gggggggccg 2040
 ttaagaacgg taaaaacaaa agcagaaagg ctcttagatc aactgagctg ccaggttttt 2100
 agcctcgttt cccatctccc tattttcttc tcacacctc tcaaactga cagtggttat 2160
 tctccgggtg attggggttt tgcagctttt actctatttt gcctcttttt atgttacagt 2220
 taccattct tcggttttgc tcccctcttg ggtgtatttt ctgggtcttc tcggcgtgtg 2280
 cgaatggggg tttttggctg ctggttggt tttgctgttg gtctgttcaa gcctgtgtcc 2340
 gaccagtcg gcactgcttg tgagtttgac tcgccagagt gtaggaacgt cttcattct 2400
 tttgagcttc tcaaaccctg ggaccctgtc cgagccttg ttgtgggccc cgtcgtctc 2460
 ggccttgcca ttcttggcag gttactgggc 2490

<210> 3

<211> 14966

<212> ADN

<213> Virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn

<400> 3

atgacgtata ggtgttggct ctatgccacg gcatttgtat tgtcaggagc tgtgaccata 60

ggcacagccc aaaacttgct gcacgggaac accctcctgt gacagccctc ttcaggggga	120
ttaggggtct gtccctaaca ccttgcttcc ggagttgcac tgctttacgg tctctccacc	180
cctttaacca tgtctgggat acttgatcgg tgcacgtgta cccccaatgc cagggtgttt	240
gtggcggagg gccaggtcta ctgcacacga tgtctcagtg cacggtctct ccttcctctg	300
aatctccaag ttcctgagct tggggtgctg ggtctattct ataggcccga agagccactc	360
cggtaggacgt tgccacgtgc attccccact gtcgagtgct ccccgccgg ggcctgctgg	420
ctttctgcga tctttccgat tgcacgaatg actagtggaa acctgaactt tcaacaaaga	480
atggtgcggg tcgcagctga aatctacaga gccggccaac tcaccctac agttctaaag	540
actctacaag tttatgaacg gggttgctgc tggtagccca ttgtcgggcc cgtccctggg	600
gtgggcgttt acgccaactc cctgcatgtg agtgacaaac ctttcccggg agcaactcat	660
gtgttaacca acttgccgct cccgcagagg cccaaacctg aggacttttg cccttttgag	720
tgtgctatgg ctgacgtcta tgacattggt cgtggcgccg tcatgtatgt ggccggagga	780
aaggtctctt gggccctcg tggtaggaat gaagtgaat ttgaacctgt cccaaggag	840
ttgaagttgg ttgcgaaccg actccacacc tccttccgc cccatcacgt agtggacatg	900
tccaggttta cttcatgac ccctgggagt ggtgtctcca tgcgggttga gtaccaatac	960
ggctgcctcc ccgctgacac tgtccctgaa ggaaactgct ggtggcgctt gtttgactcg	1020
ctcccaccgg aagttcagta caaagaaatt cgccacgcta accaatttgg ctatcaaacc	1080
aagcatggtg tccctggcaa gtacctacag cggaggctgc aagttaatgg tcttcggaca	1140
gtgaccgaca cacatggacc tatcgtcata cagtacttct ctgttaagga gagttggatc	1200
cgccacctga agttggtgga agaaccagc ctccccgggt ttgaggatct cctcagaatc	1260
agggttgagc ccaatacgtc accactggct ggaaaggatg agaagathtt ccggtttggc	1320
agtcataagt ggtacggtgc cggaaagaga gcaaggaaaa cacgctctgg tgcgactact	1380
atggtcgctc atcacgcttc gtccgctcat aaaatccggc aggccacgaa gcacgagggt	1440
gccggcgcta acaaggctga gcatctcaag cgctactctc cgcctgccga agggaactgt	1500
ggttggcact gcatttccgc catcgccaac cggatggtga attccaactt tgagaccacc	1560
cttcctgaaa gagtaaggcc ttcagatgac tgggccactg acgaggatct tgtgaatacc	1620
atccaaatcc tcaggctccc tgcggccttg gacaggaacg gcgcttgagg tagcgccaag	1680
tacgtgctta aactggaggg tgagcattgg actgtctctg tgatccctgg gatgtcccct	1740
actttgctcc cccttgaatg tgttcagggt tgttgtgaac ataaggcggt tcttgtttcc	1800

ccggatgcgg tcgaaatttc cggatttgat cctgcctgcc ttgaccgact ggctaaggta	1860
atgcacttgc ctagcagtac catcccagcc gctctggccg aattgtccga cgactccaac	1920
cgtccggttt ccccgccgc tactacgtgg actgtttcgc aattctatgc tcgtcataga	1980
ggaggagatc atcatgacca ggtgtgctta gggaaaatca tcagcctttg tcaagttatt	2040
gaggactgct gctgccatca gaataaaacc aaccgggcta ctccggaaga ggtcgcggca	2100
aagattgac agtacctccg tgacgcaaca agtcttgagg aatgcttggc caaacttgag	2160
agagtttccc cgccgagcgc agcggacacc tcctttgatt ggaatgttgt gcttcctggg	2220
gttgaggcga cgaatcagac aaccgaacaa cctcacgtca actcatgctg caccgccgtc	2280
cctcccgtga ctcaagagcc tttgggcgag gactcgggcc ctctgaccgc cttctcactg	2340
tccaattgct attacctgc acaaggtagc gaggttcac accgtgagag gttaaattcc	2400
gcactctcta agttggaaga ggttgcctg gaagaatatg ggctcatgtc cactggactt	2460
ggcccgcgac ccgtgctgcc gagcgggctc gacgagctta aagaccagat ggaggaggat	2520
ctgctagaac tagccaacac ccaggcgact tcagaaatga tggcctgggc ggctgagcag	2580
gtcgatttaa aagcttgggt caaaagctac ccgcggtgga caccaccacc ccctccacca	2640
agagttcaac ctcgaagaac aaagtctgtc aaaagtttgc cagaggacaa gcctgtccct	2700
gtccgcgca ggaaggtagc atccgattgc ggcagcccgg ttttgatggg cgacaatgtc	2760
cctaacggtt cggaagaaac tgtcgggtgt ctcctcaatt ttccgacacc atccgagccg	2820
atgacaccta tgagttagcc cgtacttgtg ccgcgctgc gacgtgtccc caagctgatg	2880
acacctttga gtgggtcggc accagttcct gcaccgcgta gaactgtgac aacaacgctg	2940
acgcaccagg atgagcctct ggatttgtct gcgtcctcac aaacggaata tgaggcttcc	3000
cccctaacac catcgcagaa catgggcatc ctggaggcgg gggggcaaga agctgaggga	3060
gtcctgagtg aaatctcgga tatactaaat gacaccaacc ctgcacctgt gtcacatgac	3120
agctccctgg gttcagtggc caccgaggat gttccacgca tcctcgggaa aataggagac	3180
actgacgagc tgcttgaccg ggggtccctcg gcaccctcca agggagaacc ggtctgtgac	3240
caacctgcc aagatccccg gatgtcgccg cgggagtctg acgagagcat aatagttccg	3300
cccgagata cagggtgtgt cggtcattc actgatttgc cgtcttcaga tgggtgtggat	3360
gtggacgggg gggggccgtt aagaacggta aaaacaaaag cagaaaggct cttagatcaa	3420
ctgagctgcc aggttttttag cctcgtttcc catctcccta ttttcttctc acacctcttc	3480

aaatctgaca gtggttattc tccgggtgat tggggttttg cagcttttac tctattttgc	3540
ctctttttat gttacagtta cccattcttc ggttttgctc ccctcttggg tgtattttct	3600
gggtctttctc ggcggtgtgcg aatgggggtt tttggctgct ggttggcttt tgctgttggt	3660
ctgttcaagc ctgtgtccga cccagtcggc actgcttggt agtttgactc gccagagtgt	3720
aggaacgtcc ttcattcttt tgagcttctc aaaccttggg accctgtccg cagccttggt	3780
gtgggccccg tcggtctcgg ccttgccatt cttggcaggt tactgggcgg ggcacgctac	3840
atctggcact ttttgcttag gcttggcatt gttgcagact gtgtcttggc tggagcttat	3900
gtgctttctc aaggtaggtg taaaaagtgc tggggatctt gtgtaagaac tgctccta	3960
gagatcgctt tcaacgtgtt cccttttaca cgtgcgacca ggctgtcact catcgacctg	4020
tgcgatcggg tttgcgcacc aaaaggcatg gaccccatth ttctcgccac tgggtggcgt	4080
gggtgctgga ccggccggag tcccattgag caaccttctg aaaaacccat cgcgttcgcc	4140
cagctggatg agaagaggat tacggctaga actgtggtcg ctcagcctta tgatcccaac	4200
caggccgtaa agtgcttgcg ggtattacag gcgggtgggg cgatggtggc cgaggcagtc	4260
ccaaaagtgg tcaaagtthc cgctattcca ttccgagctc ctttctttcc cgctggagt	4320
aaagttgatc ctgagtgag aatcgtggt gatcccgata cttttactac agccctccgg	4380
tctggctatt ccaccgcga cctcgtcctt ggtacggggg actttgccca gctgaatgga	4440
ctaaagatca ggcaaatttc caagccttca gggggaggcc cacacctcat tgctgccttg	4500
catgttgctt gctcgatggc gttacacatg cttgctggtg tttatgtaac tgcatgggg	4560
tcctgcggtg ccggtaccaa cgatccgtgg tgactaacc cgtttgctgt ccctggctat	4620
ggacctggct ctctttgcac gtctagattg tgcatctccc aacacggcct caccttgccc	4680
ttgacagcac ttgtggcggg attcggcctt caagagattg ccttggtcgt tttgatcttt	4740
gtctccatcg gaggcattgc tcatagggtg agttgtaagg ctgacatgtt gtgcatctta	4800
ctcgcaatcg ctagttatgt ttgggtacct cttacctggt tgctttgtgt gtttccttgt	4860
tggttgctgt ggtcctcttt gcacccctc accatcctgt gggttggtgt tttcttgatt	4920
tctgtaaata taccctcggg aatcttggcc gtggtgttat tggtttctct ctggctttta	4980
ggctgttata ctaacattgc tggctcgtc accccttatg acattcatca ttacaccagt	5040
ggccccgcg gtgtcgccgc cttggccacc gcgccagatg gaacctactt ggctgccgtc	5100
cgccgtgctg cgctgactgg tcgtaccatg ctgttcccc cgtctcagct tgggtccctc	5160
cttgagggcg ctttcagaac tcaaaaacc tcactgaaca ccgtcaatgt ggtcgggtcc	5220

tccatgggct ctggcggagt gttcactatt gacgggaaaa tcaagtgcgt gactgccgca	5280
catgtcctta cgggtaactc agctaggggt tccggggctg gcttcaatca aatgcttgac	5340
tttgatgtaa aaggggactt cgccatagct gattgcccga attggcaagg ggttgctccc	5400
aaggcccagt tctgcgagga tgggtggact ggtcgcgcct attggctgac atcctctggc	5460
gttgaacccg gtgttattgg gaatgggttc gccttctgct tcaccgcgtg tggcgattct	5520
ggatccccag tgattaccga agccggtgag cttgtcggcg ttcacacagg atcaaacaaa	5580
caaggaggag gcattgtcac gcgcccctca ggccagtttt gtaatgtgaa gcccataag	5640
ctgagcgagt tgagtgaatt cttcgtgga cctaaggctc cgctcgggtga tgtgaaaatt	5700
ggcagtcaca taattaatga cacatgcgag gtgccttcag atctttgtgc cctgcttgct	5760
gccaaacccg aactggaagg aggcctttcc acagttcaac ttctgtgtgt gtttttcctc	5820
ctgtggagaa tgatggggca tgcctggacg cccttggttg ctgtgggggt tttcatcctg	5880
aatgagattc tcccagctgt tctgggtccg agtgttttct cctttgggat gtttgtgcta	5940
tcttggtca caccatgggtc tgcgcaagtc ctgatgatca ggcttctgac agcagccctt	6000
aacagaaaca gatggtctct tggtttttac agccttggtg caataaccag ttttgtcgca	6060
gatcttgagg taactcaagg gcatccgtta cagggtggtaa tgaacttaag cacctatgcc	6120
ttcctgcccc ggatgatggt tgtgacctcg ccagtcaccag tgatcgcgtg tgggtgtgtg	6180
cacctccttg ccataatttt gtacttggtt aagtaccgct gccttcacaa tgtccttggt	6240
ggcgatgggg tgttctcttc ggctttcttc ttgcgatact ttgccgaggg aaagttgagg	6300
gaaggggtgt cgcaatcctg tgggatgagt catgagtcgc tgactggtgc cctcgccatg	6360
agactcactg acgaggactt ggatttcctt acgaaatgga ctgattttaa gtgctttggt	6420
tctgctcca acatgaggaa tgcagcgggc caatttatcg aggctgctta tgcaaaagca	6480
ctaagaattg aacttgctca gttggtacag gttgataagg tccgaggcac catggccaaa	6540
ctcgaggctt tcgccgatac cgtggcaccc caactctcgc ccggtgacat tgttgttgcc	6600
cttggccaca cgcctgttgg cagcatcttc gacctaaagg ttggtagcac caagcatact	6660
ctccaagcta ttgagactag agtccttgcc ggggtccaaaa tgactgtggc gcgtgtcgtt	6720
gacccaaccc ccgcaccccc gccgtacct gtgccatcc ctctcccacc gaaagtcttg	6780
gagaacggtc ccaatgcctg ggggatgag gaccgtttga acaagaagaa gaggcgcagg	6840
atggaagccg tcggcatttt tgtcatggac gggaaaaagt accagaaatt ttgggacaag	6900

aattccggtg atgtgtttta tgaggaggtc catattagca cagacgagtg ggagtgcctt	6960
agaactggcg accctgtcga ctttgatcct gagacaggga ttcagtgtgg gcatatcacc	7020
attgaagata aggtttacaa tgtcttcacc tccccatctg gtaggagatt cttggtcccc	7080
gccaaccccc agaatagaag agctcagtgg gaagccgcca agctttccgt ggagcaagcc	7140
cttggtatga tgaacgtcga cggcgaactg actgccaaag aactggagaa actgaaaaga	7200
ataattgaca aactccaggg cctgactaag gagcagtgtt taaactgcta gccgccagcg	7260
gcctgacccg ctgtggctgc ggcggttag ttgttactga gacagcggtg aaaatagtca	7320
aatttcacaa ccggaccttc accccaggac ctgtgaactt aaaagtggcc agtgaggttg	7380
agctaaaaga cgcggttgag cacaaccaac atccggttgc cagaccggtt gatggtggtg	7440
tcgtgctcct gcgctctgca gttccttcgc ttatagatgt cttgatctcc ggcgctgata	7500
catctcctaa gttactcgcc cgccacgggc cgggaaacac tgggattgat ggcacgcttt	7560
gggattttga ggccgaggct actaaagagg aagttgcact cagtgcgcaa ataatacagg	7620
cttgtgatat taggcgcggc gacgcacctg aaattggtct cccttataag ttgtaccctg	7680
ttaggggcaa ccctgagcgg gtaaaaggag ttttacagaa tacaaggttt ggagacatac	7740
cttacaaaac cccagtgac actggaagcc cgggtgcacgc ggctgcctgc ctcacgccta	7800
atgctactcc ggtgactgat gggcgctccg tcttggctac aacctgccc tctggctttg	7860
agttgtatgt gccgaccatt ccagcgtccg tccttgatta tcttgattct aggcctgact	7920
gccctaaaca gttaacagag cacggttggtg aggatgctgc attaagagac ctctccaagt	7980
atgatttgtc cacccaaggc tttgttttgc ctggagtctt tcgccttggt cggaagtacc	8040
tgttcgccca cgtgggtaag tgcccggccg ttcacggcc ttccacttac cctgctaaga	8100
attctatggc tggaataaat gggaacaggc ttccaaccaa ggacattcag agcgtccctg	8160
aaatcgacgt tctgtgcgca caggctgtgc gagaaaactg gcaaactgtt accccttgta	8220
ccctcaagaa acagtactgt gggaagaaga agactaggac aatacttggc accaataact	8280
tcattgcgtt ggcccatcgg gcagcgttga gtggtgttac ccagggttc atgaaaaaag	8340
cgttcaactc gcccacgcc ctcgggaaaa acaaatttaa ggagctacaa gccccggtcc	8400
taggcaggtg ccttgaagct gatcttgcgt cctgcgatcg atccacacct gcaattgtcc	8460
gctggtttgc cgccaatctt ctttatgaac tcgcctgtgc tgaggagcat ctaccgtcgt	8520
acgtgctgaa ctgctgccac gacttactgg tcacgcagtc cggcgcggtg actaagagag	8580
gtggcctgtc gtctggcgac ccgattacct ctgtgtcaaa caccatttac agcttagtga	8640

tatatgcaca gcacatggtg ctgagttact tcaaaagtgc tcaccctcat ggccttctgt	8700
ttctgcaaga ccagctgaag tttgaggaca tgctcaaggt tcaaccctg accgtctatt	8760
cggacgacct tgtgctgtat gccgagtctc cctccatgcc aaactaccac tgggtgggtt	8820
aacatctgaa ccttatgctg ggtttccaga cggacccaaa gaagacaacc atcacagact	8880
caccatcatt cctaggttgc aggataataa atgggcgcca gctgggtcct aaccgtgaca	8940
ggatcctcgc ggccctcgc taccacatga aggcgagcaa tgtttctgaa tactacgcct	9000
cggcggctgc aatactcatg gacagctgtg cttgtttgga gtatgatcct gaatggttt	9060
aagagctcgt ggttgggata gcgcagtgcg cccgcaagga cggctacagc tttcctggcc	9120
caccgttctt cttgtccatg tgggaaaaac tcaggtccaa tcatgagggg aagaagtcca	9180
gaatgtgcgg gtactgcggg gccccggctc cgtacgccac tgcctgtggt ctcgatgtct	9240
gtgtttacca caccacttc caccagcatt gtcctgttat aatctggtgt ggccaccg	9300
cgggttctgg ttctttagt gagtgcaac cccccctagg aaaaggcaca agccctctag	9360
atgaggtgtt agaacaagtt ccgtacaagc ctccgcggac tgtgatcatg catgtggagc	9420
agggtctcac ccctcttgac ccaggtagat accagactcg ccgcggattg gtctccgtta	9480
ggcgtggcat caggggaaat gaagtcgacc taccagacgg tgattacgcc agtaccgcct	9540
tgctccctac ttgtaaagag atcaacatgg tcgctgtcgc ctctaactg ttgcgcagca	9600
ggtttatcat cggccaccc ggtgctggga aaacacactg gcttcttcaa caagtccagg	9660
atggtgatgt catttacacg ccaactcacc agaccatgct cgacatgatt agggctttg	9720
ggacgtgccg gttcaacgtt ccagcaggta caacgtgca attccctgcc ccctccgta	9780
ccggcccatg ggttcgcatc ttggccggcg gttggtgtcc tggcaagaac tccttcctgg	9840
atgaagcggc gtattgcaat caccttgacg tcttgaggct tctcagtaaa acaactctca	9900
cttgcttagg ggacttcaaa caactccacc ctgtgggttt tgactcccat tgctatgtat	9960
ttgacatcat gcctcagacc caattaaaga ccatctggag gttcgggcag aatatctgtg	10020
atgccattca accagattac agggacaaac ttatggccat ggtcaacacg acccgtgtga	10080
cctacgtgga aaaacctgtc aggtacgggc aagtcctcac cccctaccac agggaccgag	10140
aggacggcgc cattactatc gactccagtc aaggcgccac atttgatgtg gttacactgc	10200
atgtgcccac taaagattca ctcaacaggc aaagagctct tgttgctatc accagggcaa	10260
ggcatgctat cttcgtgtat gaccacaca ggcaattgca gagcatgttt gatcttccc	10320

cgagaggcac acccgtcaac ctcgcagtgc accgtgacga acagctgatac gtattagaca	10380
gaaacaacag agaaatcacg gttgctcagg ctctaggcaa tggagataaa ttcaggggcca	10440
cagataagcg cgttgtagat tctctccgcg ctatttgccg agacctggaa gggctcgagct	10500
ccccgctccc caaggctcgcg cataacttgg gattccattt ctcacctgat ttgactcagt	10560
ttgctaaact cccggcagaa cttgcacccc actggcccgt ggtgacaacc cagaacaatg	10620
aaagggtggc agatcggtg gtagccagcc tccgccctat ccataaatat agccgcgcgt	10680
gcatttggtgc cggctatatg gtggggcccct cgggtgtttt aggcacccct ggggttgtgt	10740
catactatct cacaaaaattt gttagaggcg aggctcaagt gcttccggag acagtcttca	10800
gcaccggccg aattgaggta gattgtcgag agtatcttga tgatcgggag cgagaagttg	10860
ctgagtcctt cccacatgcc ttcacggcg atgtcaaagg taccaccgtt gggggatgtc	10920
atcacgttac ctcaaatac cttccgcgct tccttcccaa ggaatcagtt gcggtggctc	10980
gggtttcgag ccccgggaaa gccgcgaaag cagtttgac attgacggat gtgtacctc	11040
cagacctga agcgtacct caccagaga ccagtcag gtgctggaaa gtgatgttg	11100
actttaagga ggttcgactg atggtatgga aagacaagac ggctatattt caacttgaag	11160
gccgccattt tacctggtat caactgcaa gctacgcctc atacatccga gttcctgtta	11220
attctactgt gtacttgga cctgcatgg gccctgctct ttgcaacagg agggttgtcg	11280
gggccaccca ttggggagct gacctcgag tcacccctta tgattacggg gccaaaatta	11340
ttctgtctag tgcataccat ggtgaaatgc ctccagggtta caaaattctg gcgtgcgcgg	11400
agttctcgct tgatgatcca gtaaggatca aacacacctg gggatttgaa tcggatacag	11460
cgtatctgta cgagtttact ggaaatggtg aggactggga ggattacaat gatgcgtttc	11520
gggcgcgcca gaaagggaat attataaag ctaatgccac cagcatgagg tttcattttc	11580
ccccggggcc tgtcattgaa ccaactttag gcctgaattg aaatgaaatg gggctctatgc	11640
aaagcctctt tgacaaaatt ggccaacttt ttgtggatgc tttcacggaa tttctggtgt	11700
ccattgttga tatcatcata tttttggcca tttgttttg cttcacaatc gccggttggc	11760
tggtggtctt atgcatcaga ctggtttgct ccgcggtact ccgtgcgcgc tctaccgttc	11820
accctgagca attacagaag atcttatgag gcctttcttt ctcagtgtca ggtagacatt	11880
cccacctggg gcgtcaaaca ccctttgggg gtgctttggc accataaggt gtcaaccctg	11940
attgatgaaa tgggtgctcg tcgaatgtac cgcgtcatgg aaaaagcagg gcaggctgcc	12000
tggaaacagg tgggtgagcga ggctacattg tctcgcatta gtggtttgga tgtggtggct	12060

cattttcaac atcttgccgc tattgaagcc gagacttgta aatatttggc ttcccggcta	12120
cccatgctgc acaacctgcg cttgacaggg tcaaagttaa ccatagtgtg taatagtact	12180
ttggatcagg tgtttgccat tttcccaacc cctggttccc ggccaaagct tcatgatttt	12240
cagcaatggc taatagctgt acattcctcc atattttcct ccgttgacgc ttcttgctact	12300
ctttttgttg tgctgtgggt gcgaattcca atgctacgtt ctgtttttgg tttccgctgg	12360
ttaggggcaa cttttctttt gaactcatgg tgaattacac ggtatgcccg ctttgcccaa	12420
cccggcaggc agccgccgag atccttgaac cgggcaagtc tttttggtgc aggatagggc	12480
atgaccgatg tagtgagaac gatcatgacg aactaggggt catggttccg cctggcctct	12540
ccagcgaagg ccacttgacc agtgtttacg cctggttggc gttcctgtcc ttcagctaca	12600
cggcccagtt ccatcccag atattttggga tagggaatgt gagtcaagtt tatgttgaca	12660
tcaagcacca actcatctgc gctgttcacg acggggataa cgccaccttg cctcgccatg	12720
acaatatattc agccgtattt cagacctact accaacacca ggtcgacggc ggcaattgggt	12780
ttcacctgga atggctacgc cttttctttt cctcttggtt ggttttaaat gtttcgtgggt	12840
ttctcaggcg ttcgcctgca agccatgttt cagttcgagt ctttcggaca tcaaaaccaa	12900
caccaccgca gcatcaggct tcgttgtcct ccaggacatc agctgcctta ggcatggcga	12960
ctcgtcctct ccgacgattc gcaaaagttc tcagtgccgc acggcgatag ggacgcccg	13020
gtacatcacc atcactgcca atgtcacaga tgaaaattat ctacattctt ctgatctcct	13080
catgctttct tcttgctttt tctatgcttc cgagatgagt gaaaagggat tcaaagtgggt	13140
gtttggcaat gtgtcaggca tcgtggctgt gtgcgtcaac tttaccagct acgtccaaca	13200
cgtcaaggag tttacccaac gtccttagt ggctgatcat gtgcgactgc ttcatttcat	13260
gacacctgag accatgagggt gggcaaccgt tttagcctgt ctttttgcca tccctactgg	13320
caatttgaat gttcaagtat gttggggaag tgcttgaccg cgtgctgttg ctcgcgattg	13380
ctttttttgt ggtgtatcgt gccgtcctat cttgctgtgc tcgtcaacgc cagcaacaac	13440
aacagctctc atattcagtt gatttataac ttaacgctat gtgagctgaa tggcacagat	13500
tggctggcac aaaaatttga ctgggcagtg gagacttttg tcattttccc cgtgttgact	13560
cacattgttt cctatgtggc actcaccacc agccatttcc ttgacacagt tggctctggcc	13620
actgtgtcca ccgccggata ttatcacggg cggtatgtct tgagtagcat ttacgcagtc	13680
tgtgctctgg ctgcgctgat ttgctttgtc attaggcttg cgaagaactg catgtcctgg	13740

cgctactctt gtaccagata taccaacttc cttctggaca ctaagggcaa actctatcgt 13800
 tggcggtcgc ccgtcattgt ggagaaaggg ggtaagggtg aggtcgaagg tcacctgac 13860
 gacctcaaga gagttgtgct tgatgggtcc gcggcaaccc ctttaaccag agtttcagcg 13920
 gaacgatggg gtcgtctcta gacgacttct gcaatgatag cacagctcca cagaagggtg 13980
 ttttggcggt ttccattacc tacacgccag tgatgatata tgctctaaag gtaagtcgcg 14040
 gccgactgct agggccttctg caccttttga tctttctgaa ttgtgctttt accttcgggt 14100
 acatgacatt cgtgcacttt gagagcacia atagggtcgc gctcactatg ggagcagtag 14160
 ttgcacttct ttggggagtg tactcagcca tagaaacctg gaaattcatc acctccagat 14220
 gccgtttgtg cttgctaggc cgcaagtaca ttctggcccc tgcccaccac gtcgaaagt 14280
 ccgcgggctt tcatccgatt gcggcaaatg ataaccacgc atttgtcgtc cggcgtccc 14340
 gtcactac ggtcaacggc acattgggtg ccgggttgaa aagcctcgtg ttgggtggca 14400
 gaaaagctgt taagcaggga gtggtaaacc ttgttaaata tgccaaataa caacggcaag 14460
 cagcaaaaga aaaagaaggg gaatggccag ccagtcaatc agctgtgcca aatgctgggt 14520
 aagatcatcg cccaacaaaa ccagtccaga ggcaaggac cggggaagaa aaataggaag 14580
 aaaaacccgg ggaagcccca tttccctcta gcgactgaag atgacgtcag gcatcacttt 14640
 acccctagtg agcggcaatt gtgtctgtcg tcgatccaga ctgccttcaa tcagggtgct 14700
 ggaacttgtg ccctgtcaga ttcaggaggg ataagttaca ctgtggagt tagtttgccg 14760
 acgcaacata ctgtgcgtct gatccgcgcc acagcatcac cctcagcatg atgggctggc 14820
 attctttggc acctcagtgt tagaattggg agaattgtgt gtgaatggca ctgattgaca 14880
 ctgtgcctct aagtcaccta ttcaattagg gcgaccgtgt gggggtaaag ttttaattggc 14940
 gagaaccatg cggccgtaat taaaaa 14966

<210> 4

<211> 2850

<212> ADN

<213> Virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn

<400> 4

gccggaaaga gagcaaggaa accgcgtct ggtgcgacta ctatggtcgc tcatcacgct 60
 tcgtccgctc atgaaacccg gcaggccacg aagcacgagg gtgccggcgc taacaaggct 120
 gagcatctca agcgtactc tccgcctgcc gaagggaact gtggttgga ctgcatttcc 180
 gccatcgcca accgatggg gaattccaac tttgagacca cccttcctga aagagtaagg 240

ccttcagatg actgggccac tgacgaggat cttgtgaaca ccatccaaat cctcaggctc	300
cctgcggcct tggacaggaa cggcgcttgc ggtagcgcca agtacgtgct taaactggag	360
ggtaggcatt ggactgtctc tgtgatccct gggatgtccc ctactttgct cccccttgaa	420
tgtgttcagg gttgttgtga gcataagggc ggtcttgttt ccccggatgc ggtcgaaatt	480
tccggatttg atcctgcctg ccttgaccga ctggctaagg taatgcactt gcctagcagt	540
accatcccag ccgctctggc cgaattgtcc gacgactcca accgtccggc ttccccggcc	600
gctactacgt ggactgtttc gcaattctat gctcgtcata gaggaggaga tcatcatgac	660
caggtgtgct tagggaaaat catcagcctt tgtcaagtta ttgaggattg ctgctgccat	720
cagaataaaa ccaaccgggc tactccggaa gaggtcgcgg caaagattga tcagtacctc	780
cgtggcgcaa caagtcttga ggaatgcttg gccaaacttg agagagtttc cccgccgagc	840
gctcgggaca cctcctttga ttggaatgtt gtgcttcctg gggttgaggc ggcgaaatcag	900
acaaccgaac aacctcacgt caactcatgc tgcaccctag tccctcccgt gactcaagag	960
cctttgggca aggactcggc ccctctgacc gccttctcac tgtccaattg ctattaccct	1020
gcacaagggtg acgaggttca tcaccgtgag aggttaaatt ccgtactctc taagttggaa	1080
gaggttgtcc tggaagaata tgggctcatg tccactggac ttggcccgcg acccgtgctg	1140
ccgagcgggc tcgacgagct taaagaccag atggaggagg atctgctaaa actagccaac	1200
accaggcgga cttcagaaat gatggcctgg gcggctgagc aggtcgattt aaaagcttgg	1260
gtcaaaagct acccgcggtg gacaccacca cccccaccac caagagttca acctcgaaga	1320
acaaagtctg tcaaaagctt gccagagggc aagcctgtcc ctgctccgcg caggaaggctc	1380
agatccgatt gcggcagccc ggttttgatg ggcgacaatg tccctaacgg ttcggaagaa	1440
actgtcgggtg gtcccctcaa tcttccgaca ccatccgagc cgatgacacc tatgagttag	1500
cccgtacttg tgccagcgtc gcgacgtgtc cccaagctga tgacaccttt gagtgggtcg	1560
gcaccagttc ctgcaccgag tagaactgta acaacaacgc tgacgcacca ggatgagcct	1620
ctggatttgt ctgctcctc acagacggaa tatgaggctt tccccctagc accatcgag	1680
aacatgggta tcctggaggc gggggggcaa gaagttgagg aagtcctgag tgaaatctcg	1740
gatatactaa atgacaccaa ccctgcacct gtgtcatcaa gcagctccct gtcaagtgtt	1800
aagatcacac gccaaaata ctcagctcaa gccatcatcg actctggcgg gccttgagc	1860
gggcatctcc aaaaggaaaa agaagcatgc ctcagcatca tgcgtgaggc ttgtgatgcg	1920
tccaagcttg gtgatcctgc tacgcaggag tggctctctc gcatgtggga tagggttgac	1980

atgctgactt ggcgcaacac gtctgcttac caggcgtttc gcatcttaaa tggcaggttt 2040
 gagtttctcc caaagatgat tctcgagaca ccgccgcccc acccgtgcgg gtttgtgatg 2100
 ttacctcgca cgcctgcacc ttccgtgagt gcagagagtg acctcaccat tggttcagtg 2160
 gccaccgagg atgttccacg catcctcggg aaaataggag acaccgacga gctgcttgac 2220
 cggggtcctt cggcaccctc caagggagaa cgggtctgtg accaacctgc caaagatccc 2280
 cggatgtcgc cgcgggagtc tgacgagagc atgatatgctc cgcccgaga tacagggtgg 2340
 gtcggctcat tcaactgattt gccgtcttca gatgggtgtgg atgtggacgg gggggggccg 2400
 ttaagaacgg taaaaacaaa agcaggaagg ctcttagacc aactgagctg ccagggtttt 2460
 agcctcgttt cccatctccc tattttcttc tcacacctct tcaaactga cagtggttat 2520
 tctccgggtg attgggggtt tgacgctttt actctatatt gcctctttct atgttacagt 2580
 taccattctt tcggttttgc tcccctcttg ggtgtatttt ctgggtcttc tcggcgtgtg 2640
 cgaatggggg tttttggctg ctggttggct tttgctgttg gtctgttcaa gcctgtgtcc 2700
 gaccagtcg gcaactgctg tgagtttgac tcgccagagt gtaggaacgt ccttcattct 2760
 tttgagcttc tcaaaccctg ggaccctgtc cgcagccttg ttgtgggccc cgtcggcttc 2820
 ggccttgcca ttcttggcag gttactgggc 2850

<210> 5

<211> 2940

<212> ADN

<213> Virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn

<400> 5

gctggaaaga gagcaagaaa agcacgctct tgtgcgactg ctacagtcgc tggccgcgct 60
 ttgtccgttc gtgaaacccg gcaggccaag gagcacgagg ttgccggcgc caacaaggct 120
 gagcacctca aacactactc cccgcctgcc gaagggaatt gtggttggca ctgcatttcc 180
 gccatcgcca accggatggg gaattccaaa ttgaaacca cccttcccga aagagtgaga 240
 cctccagatg actgggctac tgacaggatg cttgtgaatg ccatccaaat cctcagactc 300
 cctgcggcct tagacaggaa cgggtgcttg actagcgcca agtacgtact taagctggaa 360
 ggtgagcatt ggactgtcac tgtgaccctt gggatgtccc cttctttgct ccctcttgaa 420
 tgtgttcagg gctgttgttg gcacaagggc ggtcttgggt cccagatgc agtcgaggtc 480
 tccggatttg accctgcctg ccttgaccgg ctggctgagg tgatgcacct gcctagcagt 540
 gctatcccag ccgctctggc cgaaatgtct ggcgattccg atcgttcggc ttctccgtc 600

accaccgtgt ggactgtttc gcagttcttt gcccgtcaca gcggaggga tcaccctgac	660
caagtgcgct tagggaaaat tatcagcctt tgtcagggtga ttgaggactg ctgctgtttc	720
cagaacaaaa ccaaccgggt caccgccgag gaggtcgag caaagattga cctgtacctc	780
cgtggtgcaa caaatcttga agaattgctt gccaggcttg agaaagcgcg cccgccacgc	840
gtaatcgaca cctcctttga ttgggatgtt gtgctccctg gggttgaggc ggcaaccag	900
acgatcaagc tgccccaggt caaccagtgt cgtgctctgg tccctgttgt gactcaaaag	960
tccttggaca acaactcggc ccccctgacc gccttttcac tggctaacta ctactaccgt	1020
gcgcaagggt acgaagtctg tcaccgtgaa agactaaccg ccgtgctctc caagttggaa	1080
aaggttgttc gagaagaata tgggctcatg ccaaccgagc ctggtccacg gccacactg	1140
ccacgcgggc tcgacgaact caaagaccag atggaggagg acttgctgaa actggctaac	1200
gccagacga cttcggacat gatggcctgg gcagtcgagc aggttgacct aaaaacttgg	1260
gtcaagaact acccgcggtg gacaccacca cccctccgc caaaagtca gcctcgaaaa	1320
acgaagcctg tcaagagctt gccggagaga aagcctgtcc ccgccccgcg caggaagggt	1380
gggtccgatt gtggcagccc ggtttcatta ggcgcgatg tccctaacag ttgggaagat	1440
ttggctgtta gtagccctt tgatctcccg accccacctg agccggcaac accttcaagt	1500
gagctggtga ttgtgtcctc accgcaatgc atcttcaggc cggcgacacc cttgagttag	1560
ccggtccaa ttccgcacc tcgcggaact gtgtctcgac cggtagacacc cttgagttag	1620
ccgatccctg tgccgcacc gcggcgtaag tttcagcagg tgaaaagatt gagttcggcg	1680
gcggcaatcc caccgtacca ggacgagccc ctggatttgt ctgcttcctc acagactgaa	1740
tatgaggcct ctccccagc accgccgag agcgggggcg ttctgggagt agaggggcat	1800
gaagctgagg aaaccctgag tgaaatctcg gacatgtcgg gtaacattaa acctgcgtcc	1860
gtgtcatcaa gcagctcctt gtccagcgtg agaattcacac gcccaaaata ctcagctcaa	1920
gccatcatcg actcgggcgg gccctgcagt gggcatctcc aagaggtaaa ggaaacatgc	1980
cttagtgtca tgcgcgaggc atgtgatgcg actaagcttg atgacctgc tacgcaggaa	2040
tggctttctc gcatgtggga tcgggtggac atgctgactt ggcgcaacac gtctgtttac	2100
caggcgattt gcaccttaga tggcagggtta aagttcctcc caaaaatgat actcgagaca	2160
ccgccgcct atccgtgtga gtttgtgatg atgcctcaca cgcctgcacc ttccgtaggt	2220
gcggagagcg accttaccat tggctcagtt gctactgaag atgttcacg catcctcgag	2280

aaaatagaaa atgtcggcga gatggccaac cagggaccct tggccttctc cgaggataaa 2340
 ccggtagatg accaacttgt caacgacccc cggatatcgt cgcggaggcc tgacgagagc 2400
 acatcagctc cgtccgcagg cacaggtggc gccggctctt ttaccgattt gccgccttca 2460
 gatggcgcgg atgcggacgg gggggggccg tttcggacgg taaaaagaaa agctgaaagg 2520
 ctctttgacc aactgagccg tcaggttttt gacctcgtct cccatctccc tgttttcttc 2580
 tcacgccttt tctaccctgg cggtggttat tctccgggtg attggggttt tgcagctttt 2640
 actctattgt gcctcttttt atgttacagt taccagcct ttggtattgc tcccctcttg 2700
 ggtgtgtttt ctgggtcttc tcggcgcgtt cgaatggggg tttttggctg ctggttggtc 2760
 tttgctgttg gtctgttcaa gcctgtgtcc gaccagtcg gcgctgcttg tgagtttgac 2820
 tcgccagagt gtagaaacat ctttcattct tttgagcttc taaaccttg ggaccctgtt 2880
 cgcagccttg ttgtgggccc cgtcggcttc ggtcttgcca ttcttggcag gttactgggc 2940

<210> 6
 <211> 241
 <212> ADN
 <213> Virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn

<400> 6
 tttggctgtt agtagcccct ttgatctccc gacccacct gagccggcaa caccttcaag 60
 tgagctgggtg attgtgtcct caccgcaatg catcttcagg ccggcgacac ctttgagtga 120
 gccggctcca attcccgcac ctgcggaac tgtgtctcga ccggtgacac ctttgagtga 180
 gccgatccct gtgcccgcac cgcggcgtaa gtttcagcag gtgaaaagat tgagttcggc 240
 g 241

<210> 7
 <211> 87
 <212> ADN
 <213> Virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn

<400> 7
 cccttgagtg agccgatccc tgtgcccga ccgcgcgta agtttcagca ggtgaaaaga 60
 ttgagttcgg cggcggcaat cccaccg 87

<210> 8
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn

<400> 8

tcaagtgtta agatcacacg cccaaaatac tcagctcaag ccatcatcga ctctggcggg 60
 ccttgacgtg ggcatctcca aaaggaaaaa gaagcatgcc tcagcatcat gcgtgaggct 120
 tgtgatgcgt ccaagcttgg tgatcctgct acgcaggagt ggctctctcg catgtgggat 180
 agggttgaca tgctgacttg gcgcaacacg tctgcttacc aggcgtttcg catcttaaatt 240
 ggacaggttg agtttctccc aaagatgatt ctcgagacac cgccgccccca cccgtgcggg 300
 tttgtgatgt tacctcgcac gcctgcacct tccgtgagtg cagagagtga cctcaccatt 360

<210> 9

<211> 120

<212> PRT

<213> Virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn

<400> 9

Ser Ser Val Lys Ile Thr Arg Pro Lys Tyr Ser Ala Gln Ala Ile Ile
 1 5 10 15

Asp Ser Gly Gly Pro Cys Ser Gly His Leu Gln Lys Glu Lys Glu Ala
 20 25 30

Cys Leu Ser Ile Met Arg Glu Ala Cys Asp Ala Ser Lys Leu Gly Asp
 35 40 45

Pro Ala Thr Gln Glu Trp Leu Ser Arg Met Trp Asp Arg Val Asp Met
 50 55 60

Leu Thr Trp Arg Asn Thr Ser Ala Tyr Gln Ala Phe Arg Ile Leu Asn
 65 70 75 80

Gly Arg Phe Glu Phe Leu Pro Lys Met Ile Leu Glu Thr Pro Pro Pro
 85 90 95

His Pro Cys Gly Phe Val Met Leu Pro Arg Thr Pro Ala Pro Ser Val
 100 105 110

Ser Ala Glu Ser Asp Leu Thr Ile
 115 120

<210> 10

<211> 12310

<212> ADN

<213> Virut gây bệnh sốt cổ điển ở lợn

```

<400> 10
gtatacgagg ttagttcatt ctctgtatata cgattggaca aatcaaaatt ataatttggt      60
tcagggcctc cctccagcga cggccgaact gggctagcca tgcccatagt aggactagca      120
aaacggaggg actagccata gtggcgagct ccctgggtgg tctaagtcct gagtacagga      180
cagtcgtcag tagttcgacg tgagcagaag cccacctga gatgctacgt ggacgagggc      240
atgccaaga cacaccttaa ccctagcggg ggtcgctagg gtgaaatcac accacgtgat      300
gggagtacga cctgataggg cgctgcagag gccactatt aggctagtat aaaaatctct      360
gctgtacatg gcacatggag ttgaatcact ttgaactttt atacaaaaca aacaaacaaa      420
aaccaatggg agtggaggaa ccggtgtacg atgccacggg gagaccattg ttcggagacc      480
cgagtgaggt acaccacaa tcaacactga agctaccaca tgataggggt agaggcaaca      540
ttaaaacaac actgaagaac ctacctagga aaggcgactg caggagcggc aaccatctag      600
gcccggctcag tgggatatat gtaaaacccg gccctgtctt ttaccaggac tacatgggcc      660
cggcttacca tagagcccct ctggagtttt ttgacgaagt gcagttctgc gaggtgacca      720
aaaggatagg tagggtgaca ggtagcgacg gaaagcttta ccatacatat gtgtgcatcg      780
atggctgcat actgctgaag ctggccaaga ggggtgagcc aagaaccctg aagtggatta      840
gaaatttcac cgactgtcca ttgtgggtta ccagttgctc cgatgatggc gcaagtggga      900
gtaaagagaa gaagccagat aggatcaaca aaggcaaatt aaaaatagcc ccaaagagc      960
atgagaagga cagcagaact aggccacctg acgctacgat cgtggtggaa ggagtaaaat     1020
accaggtcaa aaagaaaggt aaagttaaag gaaagaatac ccaagacggc ctgtaccaca     1080
acaagaataa accaccagaa tccaggaaga aattagaaaa agccctattg gcatgggcgg     1140
tgatagcaat tatgttgtac caaccagttg aagccgaaaa tataactcaa tggaacctga     1200
gtgacaacgg cactaatggt atccagcatg ctatgtacct tagagggggt aacagaagct     1260
tgcatgggat ctggccgggg aaaatatgca aaggagtccc aaccacctg gccacagacg     1320
tgagctgaa agaaatacag ggaatgatgg atgccagcga ggggacaaac tatactgct     1380
gtaagttaca gagacatgaa tggaacaaac atggatggtg taactggcac aatatagacc     1440
cctggataca gctgatgaat agaaccacag cagacttggc agaaggccct ccggtcaagg     1500
agtgcgctgt gacttgcagg tacgataaag atgctgacat caacgtggtc accaggcta     1560
gaaacaggcc aacaaccctg accggctgca agaaagggaa aaatttttct ttgctgggta     1620
cagttataga gagcccatgt aatttcaatg tttccgtgga ggataccttg tatggggatc     1680

```

atgagtgcgg cagtttactc caggacgcag ctctgtacct agtagatgga atgaccaaca	1740
ctatagagaa tgccagacag ggagcagcga ggggtgacatc ttggctcggg aggcaactca	1800
gcactgctgg gaagagggtg gagggtagaa gcaaaacctg gtttggcgct tatgccctat	1860
cgccttactg taatgtaaca agcaagatag ggtacatatg gtacactaac aactgcaccc	1920
cagcttgccct ccccaaaaac acaaagataa taggccctgg taaatttgac accaatgcag	1980
aagacggaaa gattctccat gagatggggg gccacctatc agaatttctg ctgctttctc	2040
tggttgttct gtctgacttc gcccctgaaa cagccagcgc gttatactc attttgact	2100
acgtgattcc tcaaccccat gatgaacctg aaggctgcga tacgaaccag ctgaatctaa	2160
cagtagaact caggactgaa gacgtaatac cgtcatcagt ctggaatgtt ggtgaatatg	2220
tgtgtattag accagactgg tggccatatg aaaccgaggt ggctctgtta tttgaagagg	2280
caggacaggt cgtaaagtta gtcttacggg cgctgaggga tttgactagg gtctggaata	2340
gcgcatcaac cattgcattc ctcatctgct tgataaaagt attaagggga cagatcgtgc	2400
aaggtgtgggt atggctgtta ctagtaactg gggcacaagg ccggctagcc tgcaaggaag	2460
attacaggta cgcaatatcg tcaaccgatg agatagggct acttggggcc ggaggctctca	2520
ccaccacctg gaaggaatac aaccacgatt tgcaactgaa tgacgggacc gtcaaggcca	2580
gttgcgtaggc aggttccttt aaagtcacag cacttaatgt ggtagtagg aggtatttgg	2640
cgtcattgca taagaaggct ttaccactt ccgtgacatt cgagctcctg ttcgacggga	2700
ccaacccatc aactgaggaa atgggagatg acttcaggtc cgggctgtgc ccgtttgata	2760
cgagtcctgt tgtaaggga aagtacaata cgacctgtt gaacggtagt gctttctatc	2820
ttgtctgccc aataggggtg acgggtgtca tagagtgcac agcagtgagc ccaacaactc	2880
tgaggacaga agtggtaaag accttcagga gagacaagcc ctttccgcac agaattgatt	2940
gtgtgaccac cacagtggaa aatgaagatt tattctattg taagttgggg ggcaactgga	3000
catgtgtgaa aggcgagcca gtggtctaca cagggggggg agtaaaacaa tgtagatggg	3060
gtggcttcga cttcgatggg cctgacggac tcccgcatta ccccataggt aagtgcattt	3120
tggcaaatga gacaggttac agaatagtag attcaacgga ctgtaacaga gatggcgttg	3180
taatcagcac agaggggagt catgagtgtc tgatcggtaa cacgactgtc aaggtgcatg	3240
catcagatga aagactgggc cctatgcat gcagacctaa agagattgtc tctagtgtg	3300
gtcctgtaat gaaaacctcc tgtacattca actacacaaa aactttgaag aacagggtact	3360
atgagcccag ggacagctac ttccagcaat atatgcttaa gggtagtat cagtactggg	3420

ttgacctgga tgcgactgac cgccactcag attacttcgc agaatttggt gtcttggtgg	3480
tggtagcact gttaggagga agatatgtcc tgtggctgat agtgacctac gtagttctaa	3540
cagaacaact cgccgctggt ttaccattgg gccagggtga ggtagtggtg atagggaact	3600
taatcaccca cacagacatt gaggtcgtag tatatTTTTT actactctat ttggtcatga	3660
gggatgaacc tataaagaaa tggatactgc tgctgttcca tgctatgact aacaatccag	3720
tcaagaccat aacagtggca ttgctcatgg ttagtggagt tgccaagggt ggaaagatag	3780
atggcggttg gcagcgactg ccggggacca gctttgacat ccaactcgcg ctgacagtta	3840
tagtagtcgc tgtgatgttg ctggcaaaga gagatccgac tacggtcccc ttggttataa	3900
cagtggcgac cctgagaaca gctaagatga ctaacggact tagtacggat atagccatag	3960
ccacagtgtc agcagcgttg ctaacctgga cctacattag tgactattac agatacaaga	4020
cctggctaca gtaccttatac agcacagtga caggtatctt ttttaataagg gtactgaagg	4080
gaataggtga gttggattta cacactccga ccttgccatc tcatagacc cttcttttca	4140
ttctcgtgta ccttatttcc actgcagtgg taacgagatg gaatctggac atagctggat	4200
tgctgttgca gtgtgttcca acccttttga tggtttttac gatgtgggca gacattctca	4260
ccctgatcct catactgccc acttacgagt taacgaagct atattatctt aaggaagtga	4320
agattggggc agaaaagggc tggttatgga agaccaactt caagagggtta aacgacatat	4380
acgaagttag ccaagctggt gaaggggtat acctattccc gtcaaaacaa aagacaagtt	4440
caatgacagg caccatgttg ccattgatca aagccatact tatcagctgc gtcagtaata	4500
agtggcagtt catatatcta ctgtacttga tatttgaagt atcttactac ctccacaaga	4560
agatcataga tgaaatagca ggagggacca acttcatctc aagacttgta gccgctttga	4620
tcgaagtcaa ttgggccttt gacaacgaag aagttagggg tttgaagaag ttcttcctgt	4680
tgtctagtag ggttaaagaa ctgatcatca aacacaaagt gaggaatgaa gtaatgggcc	4740
gctggtttgg tgacgaagag gtctatggga tgccgaagtt ggttggccta gtcaaggcag	4800
caacattgag taaaaataaa cattgtatTTT tgtgcaccgt ctgtgaagac agagagtgga	4860
gaggagaaac ctgccccaaa tgcgggcgtt ttgggccacc aatgacctgt ggcatgaccc	4920
tagccgactt tgaagagaaa cactataaga ggatcttttt tagagaggat caatcagaag	4980
ggccggtttag ggaggagtac gcagggtatc tgcaatatag agccagaggg caattgttcc	5040
tgaggaatct ccagtgcta gcaacaaaag ttaagatgct cctggtcggc aatcttgga	5100

cggaggtggg agatttgga cacccttggt ggggtgctcag agggcctgcc gtttgcaaga 5160
 aggtcactga acatgagaaa tgtaccacat ccatgatgga caaattgact gcttttttcg 5220
 gtgttatgcc gaggggcacc acacctagag cccctgtgag attccctacc tctctcttaa 5280
 agataagaag gggtttgga actggctggg cgtacacaca ccaaggtggc atcagttcag 5340
 tggaccatgt cacttggtga aaagacttac tggtatgtga cactatgggc cggacaaggg 5400
 ttgtttgcca gtcaaataat aagatgacag atgagtccga gtatggagt aaactgatt 5460
 ccggatgccc ggaaggagct aggtgttatg tgttcaacc agaggcagtt aacatatcag 5520
 ggactaaagg agccatggc cacttcaaaa aaactggagg agaattcacc tgtgtgacag 5580
 catcaggaac tccggctttc ttgatctta aaaaccttaa aggctgggtca gggctaccga 5640
 tatttgaggc atcaagtga agggtagtcg gcagggtcaa ggtcggtaag aatgaggact 5700
 ctaaaccaac caagcttatg agtggaatac aaacagtttc caaaagtacc acagacttga 5760
 cagaaatggt aaagaaaata acgacctga gcaggggaga attcagacaa ataacccttg 5820
 ctacaggtgc cggaaaaacc acggaactcc ctaggtcagt catagaagag atagggaggc 5880
 ataagagagt cttggtcttg atccctctga gggcggcagc agagtcagta taccaatata 5940
 tgagacaaaa gcatccaagc atcgcattha acctgaggat aggggagatg aaggaagggg 6000
 acatggccac agggataact tatgcttcat acggttactt ctgtcagatg ccacaacct 6060
 agttgcgagc cgcaatggtt gagtactcct tcatattcct tgatgagtac cactgtgcca 6120
 cccctgaaca attggctatc atgggaaaga ttcacagatt ttcagagAAC ctgcgggtgg 6180
 tggccatgac cgcaacacca gtaggcacgg taacgaccac agggcagaaa caccctatag 6240
 aagaattcat agcccagat gtgatgaaag gggaagactt aggttcagag tacttgga 6300
 ttgctggact aaagatacca gtagaggaga tgaagagcaa tatgctggtt tttgtgcca 6360
 ccaggaacat ggcatggag acagcaaaga aattgaaagc taagggttat aactcaggct 6420
 actattatag tggtaggat ccatctaacc tgagggtggt aacatcgag tccccgtacg 6480
 tgggtggtggc aaccaacgcg atagaatcag gtgttactct cccggacttg gatgtggtg 6540
 tcgatacagg gcttaagtgt gaaaagagaa tacggctgtc acctaagatg ctttcatag 6600
 tgacgggcct gaagagaatg gctgtcacga ttggggaaca agccagaga agggggagag 6660
 ttgggagagt aaagcctgga agatactaca ggagtcaaga aacccccgtt ggttctaaag 6720
 attaccatta tgatttactg caagcacaga ggtacggtat tgaagatggg ataaacatca 6780
 ccaaattcct tagagagatg aactatgatt ggagccttta tgaggaggac agtctgatga 6840

ttacacaatt ggaaattcctt aataatttgt tgatatcaga tgaactacca atggcagtaa	6900
aaaatataat ggccaggact gaccaccag aaccaattca gctggcgtag aacagctacg	6960
aaacacaagt gccagtgcta ttcccaaaaa taaagaatgg agaggtgact gacagttacg	7020
ataactatac cttcctcaac gcaagaaaat taggggatga tgtaccccct tacgtgtatg	7080
ccacagagga tgaggactta gcggtagagc tgctgggctt agactggccg gaccctggaa	7140
accaaggagc cgtagagact ggacagagcac taaaacaggt agttgggtcta tcaacagctg	7200
agaatgcctt gttagtagcc ttattcggct acgtaggata tcaggcgctt tcaaagaggc	7260
atataccagt agtcacagac atatactcaa ttgaagatca caggttggaa gacaccacac	7320
acctacagta cgccccaaat gctatcaaga cggaggggaa ggagacagaa ttgaaggagc	7380
tagctcaggg ggatgtgcag agatgtgtgg aagccatgac caattatgca agagagggta	7440
tccaatttat gaagtctcag gcactgaagg tgaaggaaac ccctacttac aaggagacaa	7500
tggacactgt gacggactat gtaaagaaat tcatggaggc gctggcagac agtaaagaag	7560
acatcataaa atatgggctg tgggggacgc acacagcctt atataagagc atcagtcca	7620
ggcttggggg tgagactgag ttctgctacc tggtagttaa gtggctggca tttgggggtg	7680
aatcaatagc agaccatgtc aaacaagcgg ccacagactt ggtcgtttac tatatcatca	7740
acagacctca gttcccagga gacacggaga cacaacaaga cggaaggaaa tttgtggcca	7800
gcctactggc ctacagctcta gctacttaca catacaaaag ctggaattac aataacctgt	7860
ccaagatagt tgaaccggct ttggccactc tgccctatgc cgccacagct ctcaaattat	7920
ttgccccac ccgattagag agcgttgtca tattaagtac cgcaatctac aagacctacc	7980
tatcaatcag gcgcggaaaa agcgttggtt tgctaggcac gggggttagt gcggctatgg	8040
agatcatgtc aaaaaatcca gtatccgtgg gcatagcagt catgctaggg gtaggggccg	8100
tggcagccca caatgcaatc gaagccagtg agcagaaaag aacactactc atgaaagtct	8160
ttgtaaagaa cttcttggac caggcagcca cagatgaatt agtcaaggag agtcctgaga	8220
aaataataat ggctttgttt gaggcagtgc agacagtcgg caaccctctt agacttgtat	8280
accaccttta tggagttttt tataaggggt gggaggcaaa agagttggcc caaaggacag	8340
ccggtaggaa ctttttact ttaataatgt tcgaggctgt ggaactgctg ggagtagaca	8400
gtgaaggaaa ggtccgccag ctatcaagta attacatact agagcttttg tataagttcc	8460
gtgacagtat caagtctagc gtgagggaga tggcaatcag ctgggcccct gcccctttca	8520

gttgtgattg gacaccgacg gatgacagaa tagggctccc ccaagacaac ttccaccaag	8580
tggagacgaa atgcccctgt ggttacaaga tgaaggcagt taagaattgt gctggagaac	8640
tgagactctt ggaggaggaa ggttcatttc tctgcagaaa taaattcggg agaggttcac	8700
ggaactacag ggtgacaaaa tattatgatg acaacctatt agaaataaag ccagtataa	8760
gaatggaagg gcatgtggaa ctctactaca agggggccac catcaaactg gatttcaaca	8820
acagcaaaac aatattggca accgataaat gggagggttg tcaactccact ctggtcaggg	8880
tgctcaagag gcacacaggg gctggatata atggggcata cctgggcgaa aaaccgaacc	8940
acaaacacct gatagagagg gactgtgcaa ccatcaccaa agataaggta tgttttctca	9000
aaatgaagag aggggtgcga ttactttatg acttatccct tcacaacctt acccgactga	9060
ttgaattggt acacaagaat aacttggaag acaaagagat tcccgtgct acggttacaa	9120
cctggctggc ttacacattt gtaaattagg atataggga cataaaacca gccttcgggg	9180
agaaagtaac gctggagatg caggaggaga taaccttgca gcctgccgtt gtggtggata	9240
caacagacgt agccgtgact gtggtagggg aagccccac tatgactaca ggggagacac	9300
cgacagtgtt cgccagctca gggtcaggcc tgaaaagcca acaagttttg aaactagggg	9360
taggtgaagg ccaatatcca gggactaatc cacagagggc aagcctgcac gaagccatac	9420
aagggtcaga tgagaggccc tcggtgctga tattgggggtc tgataaagcc acctctaata	9480
gagtgaagac tgcaaagaat gtaaaggat acagaggcag ggaccacta gaagtgaag	9540
atatgatgag gaggggaaa atcctggctg tagccctgtc tagggttgat aatgctctat	9600
tgaaatttgt tgactacaaa ggcacctttc taactaggga ggctctagag gcattaagtt	9660
tgggcaggcc taaaaagaaa aacataacca aggcagaagc gcagtgggtg ctgtgccccg	9720
aggaccaa at ggaagagcta cccgactggg tcgcagccgg ggaaccata tttttagagg	9780
ccaacattaa acatgacagg taccatctgg tgggggatata agctaccatc aaggaaaaag	9840
ccaaacagtt gggggctaca gactccacaa agatatctaa ggaggttggt gccaaagtgt	9900
attctatgaa actgagtaat tgggtgatgc aagaagaaaa taaacagggc aacctgacct	9960
ccttgtttga agagctcctg caacagtgtc caccggggg ccagaacaaa accgcacaca	10020
tgggtctctg ttaccaactg gctcaaggga actggatgcc gaccagctgc catgttttca	10080
tggggacat atctgccagg agaaccaaga cccaccata tgaagcatac gtaaagttaa	10140
gggagttggt agaggaacac aagatgaaaa cactgtgtcc cggatcaagc ctgggtaagc	10200
acaacgattg gataattgga aaaattaaat accaggga cctgaggacc aaacacatgt	10260

tgaaccccg	caaggtggca	gagcaactgt	gcagagaggg	acacagacac	aatgtgtata	10320
acaagacaat	aagctcagta	atgacagcta	ctggtatcag	gttgagagaag	ttgcccgtgg	10380
ttagggccca	gacagaccca	accaacttcc	accaagcaat	aaggataag	atagacaagg	10440
aagagaacct	acaaaccccg	ggtttacata	agaaattaat	ggaagttttc	aacgcattga	10500
aacgaccga	gtagagtcc	tcctacgacg	ccgtggaatg	ggaggaactg	gagagaggaa	10560
taaacaggaa	gggtgctgct	ggttttttcg	aacgcaaaaa	tataggggaa	atattggatt	10620
cagagaaaaa	taaagtcgaa	gagattattg	acaatctgaa	aaaaggtaga	aacattaaat	10680
attatgaaac	cgcgatccca	aagaatgaga	agaggacgt	caacgatgac	tggaccgccg	10740
gtgatttcgt	ggacgagaag	aaacctagag	tcatacaata	ccctgaagca	aaaacaagac	10800
tggccatcac	caaggtgatg	tataagtggg	tgaagcagaa	gccagtagtt	ataccgggt	10860
atgaagggaa	gacacctcta	ttccaaat	ttgacaaagt	gaagaaggaa	tgggatcaat	10920
ttcaaatcc	agtggcagt	agcttcgaca	ctaaggcgtg	ggacaccag	gtaaccacaa	10980
aagatttga	gctgataagg	gacatacaaa	agtattatt	caagaagaaa	tggcacaaat	11040
ttattgacac	cctgaccacg	catatgtcag	aagtaccgt	gattagtgt	gatggggaag	11100
tatacataag	gaaagggcaa	agaggcagt	gacaacctga	cacaagtgcg	ggcaacagca	11160
tgctaaatgt	cttaacaatg	gtttacgcct	tctgcgaggc	cacaggagta	ccctacaaga	11220
gctttgacag	ggtaggcaaaa	attcatgtgt	gcggggatga	tggcttcctg	atcacagaaa	11280
gagctctcgg	tgagaaat	gcaagtaagg	gagtcagat	cctttatgaa	gctgggaagc	11340
cccagaagat	cactgaagg	gacaaaatga	aagtggccta	ccaatttgat	gatattgagt	11400
tttgctcca	tacaccaata	caagtaagat	ggtcagataa	cacttctagt	tacatgccgg	11460
ggagaaatac	aaccacaatc	ctggcaaaga	tggccacgag	gtagattcc	agcgggtgaaa	11520
gggttaccat	agcatatgag	aaagcagtag	catttagctt	cctgctgatg	tattcctgga	11580
accactaat	tagaaggatc	tgcttactgg	tgctatcaac	tgaactgcaa	gtgaaaccag	11640
ggaagtcaac	tacttactat	tatgaaggag	acccgatatc	tgcttacaag	gaagtcatcg	11700
gccacaatct	ttttgatctt	aagagaacaa	gctttgagaa	gctggccaag	ttaaattcta	11760
gcatgtctgt	actcggggcc	tggactagac	acaccagtaa	aagactacta	caagactgtg	11820
tcaatatagg	tgtaaagag	ggcaactggc	tagtcaatgc	agacagacta	gtaagtagca	11880
agaccgggaa	taggtacata	cccggagagg	gtcacaccct	gcaaggaaga	cattatgaag	11940

```

aactggtggt ggcaagaaaa cagatcaaca actttcaagg gacagacagg tacaacctag 12000
gcccaatagt caacatggtg ttaaggaggc tgagagtcac gatgatgacg ctgataggga 12060
gaggggcatg agcgcgggta acccgggatc tgaacccgcc agtaggaccc tattgtagat 12120
aacactaatt ttcttttttc ttttttattt atttagatat tattatttat ttatttattt 12180
atttattgaa tgagtaagaa ctggtataaa ctacctcaag ttaccacact acactcattt 12240
ttaacagcac tttagctgga aggaaaattc ctgacgtcca cagttggact aaggtaattt 12300
ctaacggccc 12310

```

<210> 11

<211> 950

<212> PRT

<213> Virut gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn

<400> 11

```

Ala Gly Lys Arg Ala Arg Lys Pro Arg Ser Gly Ala Thr Thr Met Val
1           5           10          15

```

```

Ala His His Ala Ser Ser Ala His Glu Thr Arg Gln Ala Thr Lys His
20           25           30

```

```

Glu Gly Ala Gly Ala Asn Lys Ala Glu His Leu Lys Arg Tyr Ser Pro
35           40           45

```

```

Pro Ala Glu Gly Asn Cys Gly Trp His Cys Ile Ser Ala Ile Ala Asn
50           55           60

```

```

Arg Met Val Asn Ser Asn Phe Glu Thr Thr Leu Pro Glu Arg Val Arg
65           70           75           80

```

```

Pro Ser Asp Asp Trp Ala Thr Asp Glu Asp Leu Val Asn Thr Ile Gln
85           90           95

```

```

Ile Leu Arg Leu Pro Ala Ala Leu Asp Arg Asn Gly Ala Cys Gly Ser
100          105          110

```

```

Ala Lys Tyr Val Leu Lys Leu Glu Gly Glu His Trp Thr Val Ser Val
115          120          125

```

```

Ile Pro Gly Met Ser Pro Thr Leu Leu Pro Leu Glu Cys Val Gln Gly
130          135          140

```

Cys Cys Glu His Lys Gly Gly Leu Val Ser Pro Asp Ala Val Glu Ile
145 150 155 160

Ser Gly Phe Asp Pro Ala Cys Leu Asp Arg Leu Ala Lys Val Met His
165 170 175

Leu Pro Ser Ser Thr Ile Pro Ala Ala Leu Ala Glu Leu Ser Asp Asp
180 185 190

Ser Asn Arg Pro Val Ser Pro Ala Ala Thr Thr Trp Thr Val Ser Gln
195 200 205

Phe Tyr Ala Arg His Arg Gly Gly Asp His His Asp Gln Val Cys Leu
210 215 220

Gly Lys Ile Ile Ser Leu Cys Gln Val Ile Glu Asp Cys Cys Cys His
225 230 235 240

Gln Asn Lys Thr Asn Arg Ala Thr Pro Glu Glu Val Ala Ala Lys Ile
245 250 255

Asp Gln Tyr Leu Arg Gly Ala Thr Ser Leu Glu Glu Cys Leu Ala Lys
260 265 270

Leu Glu Arg Val Ser Pro Pro Ser Ala Ala Asp Thr Ser Phe Asp Trp
275 280 285

Asn Val Val Leu Pro Gly Val Glu Ala Ala Asn Gln Thr Thr Glu Gln
290 295 300

Pro His Val Asn Ser Cys Cys Thr Leu Val Pro Pro Val Thr Gln Glu
305 310 315 320

Pro Leu Gly Lys Asp Ser Val Pro Leu Thr Ala Phe Ser Leu Ser Asn
325 330 335

Cys Tyr Tyr Pro Ala Gln Gly Asp Glu Val His His Arg Glu Arg Leu
340 345 350

Asn Ser Val Leu Ser Lys Leu Glu Glu Val Val Leu Glu Glu Tyr Gly
355 360 365

Leu Met Ser Thr Gly Leu Gly Pro Arg Pro Val Leu Pro Ser Gly Leu
 370 375 380

Asp Glu Leu Lys Asp Gln Met Glu Glu Asp Leu Leu Lys Leu Ala Asn
 385 390 395 400

Thr Gln Ala Thr Ser Glu Met Met Ala Trp Ala Ala Glu Gln Val Asp
 405 410 415

Leu Lys Ala Trp Val Lys Ser Tyr Pro Arg Trp Thr Pro Pro Pro Pro
 420 425 430

Pro Pro Arg Val Gln Pro Arg Arg Thr Lys Ser Val Lys Ser Leu Pro
 435 440 445

Glu Gly Lys Pro Val Pro Ala Pro Arg Arg Lys Val Arg Ser Asp Cys
 450 455 460

Gly Ser Pro Val Leu Met Gly Asp Asn Val Pro Asn Gly Ser Glu Glu
 465 470 475 480

Thr Val Gly Gly Pro Leu Asn Leu Pro Thr Pro Ser Glu Pro Met Thr
 485 490 495

Pro Met Ser Glu Pro Val Leu Val Pro Ala Ser Arg Arg Val Pro Lys
 500 505 510

Leu Met Thr Pro Leu Ser Gly Ser Ala Pro Val Pro Ala Pro Arg Arg
 515 520 525

Thr Val Thr Thr Thr Leu Thr His Gln Asp Glu Pro Leu Asp Leu Ser
 530 535 540

Ala Ser Ser Gln Thr Glu Tyr Glu Ala Phe Pro Leu Ala Pro Ser Gln
 545 550 555 560

Asn Met Gly Ile Leu Glu Ala Gly Gly Gln Glu Val Glu Glu Val Leu
 565 570 575

Ser Glu Ile Ser Asp Ile Leu Asn Asp Thr Asn Pro Ala Pro Val Ser
 580 585 590

Ser Ser Ser Ser Leu Ser Ser Val Lys Ile Thr Arg Pro Lys Tyr Ser

595	600	605																	
Ala	Gln	Ala	Ile	Ile	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Cys	Ser	Gly	His	Leu	Gln				
610						615					620								
Lys	Glu	Lys	Glu	Ala	Cys	Leu	Ser	Ile	Met	Arg	Glu	Ala	Cys	Asp	Ala				
625					630					635					640				
Ser	Lys	Leu	Gly	Asp	Pro	Ala	Thr	Gln	Glu	Trp	Leu	Ser	Arg	Met	Trp				
				645					650					655					
Asp	Arg	Val	Asp	Met	Leu	Thr	Trp	Arg	Asn	Thr	Ser	Ala	Tyr	Gln	Ala				
			660					665					670						
Phe	Arg	Ile	Leu	Asn	Gly	Arg	Phe	Glu	Phe	Leu	Pro	Lys	Met	Ile	Leu				
		675					680					685							
Glu	Thr	Pro	Pro	Pro	His	Pro	Cys	Gly	Phe	Val	Met	Leu	Pro	Arg	Thr				
	690					695					700								
Pro	Ala	Pro	Ser	Val	Ser	Ala	Glu	Ser	Asp	Leu	Thr	Ile	Gly	Ser	Val				
705					710					715					720				
Ala	Thr	Glu	Asp	Val	Pro	Arg	Ile	Leu	Gly	Lys	Ile	Gly	Asp	Thr	Asp				
				725					730					735					
Glu	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Pro	Ser	Ala	Pro	Ser	Lys	Gly	Glu	Pro	Val				
			740					745					750						
Cys	Asp	Gln	Pro	Ala	Lys	Asp	Pro	Arg	Met	Ser	Pro	Arg	Glu	Ser	Asp				
		755					760					765							
Glu	Ser	Met	Ile	Ala	Pro	Pro	Ala	Asp	Thr	Gly	Gly	Val	Gly	Ser	Phe				
	770					775					780								
Thr	Asp	Leu	Pro	Ser	Ser	Asp	Gly	Val	Asp	Val	Asp	Gly	Gly	Gly	Pro				
785					790					795					800				
Leu	Arg	Thr	Val	Lys	Thr	Lys	Ala	Gly	Arg	Leu	Leu	Asp	Gln	Leu	Ser				
				805					810					815					
Cys	Gln	Val	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	His	Leu	Pro	Ile	Phe	Phe	Ser	His				
		820						825					830						

Leu Phe Lys Ser Asp Ser Gly Tyr Ser Pro Gly Asp Trp Gly Phe Ala
 835 840 845

Ala Phe Thr Leu Phe Cys Leu Phe Leu Cys Tyr Ser Tyr Pro Phe Phe
 850 855 860

Gly Phe Ala Pro Leu Leu Gly Val Phe Ser Gly Ser Ser Arg Arg Val
 865 870 875 880

Arg Met Gly Val Phe Gly Cys Trp Leu Ala Phe Ala Val Gly Leu Phe
 885 890 895

Lys Pro Val Ser Asp Pro Val Gly Thr Ala Cys Glu Phe Asp Ser Pro
 900 905 910

Glu Cys Arg Asn Val Leu His Ser Phe Glu Leu Leu Lys Pro Trp Asp
 915 920 925

Pro Val Arg Ser Leu Val Val Gly Pro Val Gly Leu Gly Leu Ala Ile
 930 935 940

Leu Gly Arg Leu Leu Gly
 945 950