



(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)



1-0024818

(51)⁷ A61K 39/215; A61K 39/12; A61K
39/39; A61K 39/00; A61K 39/17

(13) B

(21) 1-2012-02815

(22) 15/03/2011

(86) PCT/FR2011/050515 15/03/2011

(87) WO2011/117507 29/09/2011

(30) 1052113 24/03/2010 FR

(45) 25/08/2020 389

(43) 25/01/2013 298A

(73) SOCIÉTÉ D'EXPLOITATION DE PRODUITS POUR LES INDUSTRIES
CHIMIQUES SEPPIC (FR)

75 Quai d'Orsay F-75007 Paris (FR)

(72) BERTRAND, François (FR); DUPUIS, Laurent (FR); DEVILLE, Sébastien (FR).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VACXIN DÙNG TẠI CHỖ ĐỂ ĐIỀU
TRỊ BỆNH VIRUT Ở GIA CẦM

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm vacxin dùng tại chỗ để điều trị bệnh virut ở gia cầm, trong đó phương pháp này có ít nhất bước: a) trộn ngẫu nhiên vacxin, trong đó có ít nhất một virut sống được chọn từ virut thuộc một hoặc nhiều chủng của bệnh gia cầm với chất pha loãng làm chất phụ trợ (DA), khác biệt ở chỗ chất pha loãng làm chất phụ trợ là vi nhũ tương dầu trong nước.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất chế phẩm vacxin dùng tại chỗ để điều trị bệnh virus ở gia cầm và cụ thể là, bệnh viêm phế quản truyền nhiễm ở gia cầm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh viêm phế quản truyền nhiễm ở gia cầm là bệnh lây nhiễm và cấp tính ảnh hưởng đến gia cầm chủ yếu thông qua các triệu chứng hô hấp. Virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm ở gia cầm (hoặc infectious bronchitis virus - IBV) là thành viên của chi *Coronavirus*, họ *Coronaviridae*, bộ *Nidovirales*. Virus ARN sợi đơn này có khả năng tiến hóa mạnh, và các phần tử virus có thể sống sót trong khoảng thời gian một tháng ở môi trường bên ngoài.

IBV ảnh hưởng đến gia cầm ở mọi lứa tuổi và không chỉ nhắm vào đường hô hấp. Thực sự, ban đầu, IBV sao chép trong khí quản và sau đó, có thể lan ra khắp cơ thể của gia cầm bị nhiễm bệnh, ảnh hưởng đến các cơ quan nội tạng khác nhau.

Tỷ lệ bệnh cao và tỷ lệ tử vong có thể thay đổi theo nông trại, theo các điều kiện chăn nuôi và đồng thời vào vùng siêu nhiễm vi khuẩn.

Các dấu hiệu lâm sàng thì thuộc các loại dưới đây:

- hô hấp (ho, tiếng ran khí quản, xoang bị sưng, viêm kết mạc, v.v.);
- sinh sản (để trứng giảm, để trứng có vỏ mỏng, dị dạng hoặc thay đổi màu);
- thận, khát nước quá mức, v.v..

IBV được truyền đặc biệt bằng đường hô hấp, hoặc thông qua sol khí. Các chất liệu độc hại được cấu thành từ chất xả và chất nhả ra từ mũi. Sự truyền này là truyền ngang, trực tiếp (từ chim bệnh sang chim nhạy cảm), hoặc gián tiếp (thông qua nước, chất liệu, v.v.).

IBV là nhạy cảm với hầu hết chất khử khuẩn, nhưng phương tiện ngăn chặn tốt nhất bao gồm tiêm chủng kết hợp với việc thực hiện các bước an toàn sinh học (các bước tẩy uế, các bước khử khuẩn, v.v.).

Tiêm chủng bao gồm việc tiêm loài sẽ được bảo vệ bằng một lượng mầm bệnh đã bị giết chết (vacxin bị bất hoạt) hoặc mầm bệnh mà độc tính của nó đã được làm giảm (vacxin sống được làm yếu) để kích hoạt đáp ứng sinh học trong vật chủ, bảo vệ nó trong suốt các lần xảy ra bệnh tiếp đó.

Các vacxin sống thường hữu hiệu đủ nên không đòi hỏi sử dụng các chất phụ trợ.

Chất phụ trợ vacxin là tá dược có tác dụng khuếch đại đáp ứng sinh học chống lại kháng nguyên mà nó được kết hợp lại với kháng nguyên này. Sẽ đề cập đến, ví dụ, nhôm hydroxit và các chất phụ trợ dạng dầu được bán dưới tên gọi Montanide™ bởi công ty SEPPIC. Các chất phụ trợ này có bản chất khác nhau. Chúng có thể bao gồm các liposom, nhũ tương chứa ít nhất một pha dầu và ít nhất một pha nước, loại chất phụ trợ “Freund’s”, hoặc thông dụng hơn là các muối vô cơ không tan trong nước. Trong số các muối vô cơ được sử dụng làm chất phụ trợ chế phẩm vacxin, có thể đề cập đến, ví dụ, nhôm hydroxit, xeri nitrat, kẽm sulfat, sắt hydroxit dạng keo hoặc canxi clorua. Nhôm hydroxit là chất phụ trợ được sử dụng phổ biến nhất. Các muối vô cơ này được sử dụng làm chất phụ trợ chế phẩm vacxin được mô tả cụ thể trong bài báo “Adjuvants, balance between toxicity and adjuvanticity” do Rajesh K. Gupta et al., Vacxin, quyển 11, số 3, 1993, các trang 293-306.

Các vacxin có thể được dùng bằng đường tiêm (tiêm dưới da hoặc vào trong cơ) hoặc tại chỗ (ví dụ, tiêm chủng hàng loạt bằng cách phun mù, bổ sung vào nước uống để cho tiếp xúc với mỏ và lỗ mũi và phức hệ mắt mũi).

Tiêm chủng bằng đường tiêm, ngay cả khi nó tỏ ra là hữu hiệu, thì cũng có sự bất cập là không thích hợp với hoàn cảnh kinh tế của nông trại gia cầm (phí nhân công cao), và nó còn gây ra căng thẳng cho gia cầm được điều trị, mà trong trường hợp gia cầm đẻ trứng có thể dẫn đến sự đứt quãng trong quá trình đẻ trứng sau chấn thương cơ thể do việc tiêm gây ra.

Việc sử dụng các chất phụ trợ hữu hiệu trong các chế phẩm vacxin, và trong chế phẩm vacxin dự định dùng để ngăn ngừa sự xuất hiện của bệnh viêm phế quản truyền nhiễm, có thể:

- làm tăng sức mạnh của đáp ứng bảo vệ, có thể đem lại mức bảo vệ tốt hơn;

- kéo dài khoảng thời gian bảo vệ do liều vaccin đem lại, đem lại thời gian bảo vệ kéo dài hơn cho động vật trong nông trại trong suốt thời gian sinh trưởng của chúng;

- đem lại sự bảo vệ đủ với phép điều trị đơn lẻ khi hai phép điều trị là cần thiết khi vắng mặt các chất khuếch đại đáp ứng miễn dịch này. Cho nên, sự tiết kiệm là ở chỗ con số các liều lượng sẽ được tiêm (giảm đi một nửa), bắt giữ động vật (công sức lao động) và căng thẳng gây ra trong suốt quá trình bắt giữ động vật (cũng được giảm đi một nửa);

- có khả năng thu được, bằng liều kháng nguyên thấp hơn, tính hiệu quả tương đương với tính hiệu quả do liều lượng hoàn chỉnh được sử dụng mà không có chất phụ trợ đem lại. Vì vậy, nhà máy sản xuất vaccin sẽ, bằng cùng một năng lực sản xuất, có khả năng sản xuất ra số liều vaccin cao hơn. Cũng vậy, có thể đề xuất kiểu đóng gói hiện có dùng cho việc tiêm chủng số động vật lớn hơn.

Không có chất phụ trợ nào được mô tả hoặc được sử dụng ở thời điểm hiện tại trong suốt quá trình thực hiện các kỹ thuật tiêm chủng bằng cách cho dùng thuốc tại chỗ có sử dụng các vaccin sống.

Có nhu cầu phát triển các chất pha loãng mà cũng có chức năng chất phụ trợ để cải thiện đáp ứng miễn dịch như được mô tả trên đây. Các chế phẩm này được gọi là các chất pha loãng làm chất phụ trợ (adjuvant diluent - AD).

Sự khó khăn chính gặp phải trong quá trình phát triển AD là khả năng của chất pha loãng làm chất phụ trợ (AD) đã nêu trong việc giữ cho vaccin sống được sống sao cho nó giữ lại được các thuộc tính sinh miễn dịch của nó.

Yếu tố quan trọng của sự phát triển các chất phụ trợ dùng cho các vaccin sống nằm ở tính đặc hiệu của các dạng chế phẩm chất phụ trợ để không giết chết các vi sinh vật sống cấu thành các kháng nguyên vaccin khi chúng được cho tiếp xúc trước khi tiêm. Các AD có mặt trên thị trường (như, ví dụ, tocopheryl axetat từ công ty Intervet được chứa trong Diluvac Forte®) và được đề nghị dùng cho các vaccin sống nhất định.

Ngoài ra, vaccin sống đã biết trong Đơn yêu cầu cấp Patent Pháp FR 2 385 401.

Tuy nhiên, vaccin sống này không được sản xuất bằng các chất nền phụ trợ. Cho đến nay, đã biết được rằng có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch lớn hơn bằng vaccin sống, ví dụ, bằng cách làm tăng hàm lượng của virus, hoặc bằng cách sử dụng chủng có tính miễn dịch tốt hơn.

Tài liệu sáng chế:

- Tài liệu sáng chế 1: US 4795 635 bộc lộ phương pháp sản xuất vaccin chứa virus gây bệnh Newcastle.

- Tài liệu sáng chế 2: WO 2005/009462 bộc lộ phương pháp sản xuất vaccin chứa virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm.

- Tài liệu sáng chế 3: WO 2009/053601 bộc lộ vaccin thể hiện tác dụng hỗ trợ được cải thiện đối với cả đáp ứng thể dịch và tế bào.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo sáng chế, đã tìm ra phương pháp sản xuất vaccin virus sống, phương pháp này khác biệt ở chỗ vaccin sống được sản xuất bằng cách là chất phụ trợ thuộc loại nhũ tương pha nước liên tục, ví dụ, vi nhũ tương hoặc nhũ tương nước trong dầu.

Một bất ngờ lưu ý rằng việc sử dụng nhũ tương dầu trong nước (O/W) làm “chất pha loãng” dùng cho các vaccin sống có tác dụng tích cực đối với đáp ứng huyết thanh và đáp ứng miễn dịch nơi động vật được tiêm chủng. Trong nhũ tương dầu trong nước này, pha nước ngoài cho phép vaccin (thường được đông khô) được hòa tan một cách dễ dàng.

Một khía cạnh khác của sáng chế là việc sử dụng nhũ tương dầu trong nước làm chất pha loãng làm chất phụ trợ dùng cho các vaccin sống gây ra đáp ứng huyết thanh rất cao nơi động vật non mà vẫn có khả năng miễn dịch của mẹ. Có thể tạo ra hiệu quả bất ngờ này nhờ tác dụng bảo vệ của nhũ tương, đối với virus sống, chống lại quá trình trung hòa bởi các kháng thể có mặt trong động vật.

Một mục tiêu của sáng chế là khắc phục tất cả hoặc một số bất cập của giải pháp kỹ thuật đã được biết đến trong phần tình trạng kỹ thuật được lưu ý trên đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Nhằm mục đích này, đối tượng của sáng chế là phương pháp sản xuất chế phẩm vaccin được dùng tại chỗ để điều trị đối với bệnh virus ở gia cầm, bao gồm ít nhất là bước:

a) trộn ngẫu nhiên vaccin, chứa ít nhất một virus sống được chọn từ virus thuộc về một hoặc nhiều chủng của bệnh gia cầm đã nêu, với chất pha loãng làm chất phụ trợ (AD), khác biệt ở chỗ chất pha loãng làm chất phụ trợ đã nêu là vi nhũ tương dầu trong nước bao gồm, tính theo 100% khối lượng của nó:

- từ 50% đến 97% nước, cụ thể hơn là từ 70% đến 97% nước, và cụ thể hơn nữa là từ 80% đến 97% nước;
- từ 1% đến 45% chất phụ trợ dạng dầu, cụ thể hơn là từ 1% đến 30% chất phụ trợ dạng dầu, và cụ thể hơn nữa là từ 2% đến 10% chất phụ trợ dạng dầu;
- từ 0,1% đến 10% ít nhất một muối vô cơ hóa trị hai, cụ thể hơn là từ 0,1% đến 8%, và cụ thể hơn nữa là từ 0,2% đến 3%;
- từ 0,1% đến 10% ít nhất một chất tạo phức, cụ thể hơn là từ 0,1% đến 8%, và cụ thể hơn nữa là từ 0,2% đến 3%;

ít nhất một chất tạo phức đã nêu được chọn từ axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA), natri gluconat, kali gluconat và natri polyacrylat.

Thuật ngữ “bệnh virus ở gia cầm” dùng để chỉ:

- bệnh hô hấp do virus, như, ví dụ, bệnh viêm thanh-khí quản truyền nhiễm, bệnh viêm phế quản truyền nhiễm ở gia cầm, bệnh nhiễm herpesvirus ở bò câu, bệnh viêm khoang mũi-khí quản ở gà tây;
- bệnh tiêu hóa do virus, như, ví dụ, bệnh dịch tả vịt, bệnh viêm gan virus ở vịt, bệnh hepadnavirus ở gia cầm;
- các bệnh về da do virus, như, ví dụ, bệnh đậu gia cầm;
- các bệnh hệ thần kinh do virus, như, ví dụ, bệnh viêm não-tủy ở gia cầm, bệnh viêm não ngựa miền Đông, sốt West Nile, bệnh dại, “bệnh nhảy” (bệnh viêm não tủy ở cừu);
- các bệnh toàn thân do virus như, ví dụ, bệnh giả dịch hạch ở gia cầm (bệnh Newcastle), bệnh Marek, bệnh Gumboro, bệnh dịch tả gia cầm, chứng tăng

sinh mô tạo bạch cầu ở gia cầm, chứng thiếu máu truyền nhiễm ở gà, bệnh Derszy, bệnh “trứng mềm”.

Thuật ngữ “chất pha loãng” dùng để chỉ một chất sẽ được bổ sung vào chất khác để làm giảm độ chuẩn, độ giàu hoặc tỷ lệ phần trăm của nó.

Chất pha loãng làm chất phụ trợ dùng cho vacxin được dùng tại chỗ (ADLAV) để phù hợp, thì sẽ phải:

- giữ cho vacxin được sống, sau khi hoàn nguyên, trong một khoảng thời gian đã cho;
- cho phép sản xuất công thức (chế phẩm vacxin) mà có thể xịt một cách dễ dàng và làm ướt cho màng nhầy niêm mạc (thuộc bản chất ưa nước) để cho phép có được sự điều trị hữu hiệu và dễ dàng;
- cải thiện một cách đáng kể hiệu quả miễn dịch của kháng nguyên so với hiệu quả miễn dịch của kháng nguyên được sử dụng mà không có chất phụ trợ, và không gây ra các tác dụng phụ.

Hơn nữa, các phương án của sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều đặc điểm dưới đây:

- phương pháp như được định nghĩa trên đây, khác biệt ở chỗ virus đã nêu được chứa trong vacxin đã nêu thuộc về một hoặc nhiều chủng của IBV (virus viêm phế quản truyền nhiễm);
- phương pháp như được định nghĩa trên đây, khác biệt ở chỗ virus đã nêu được chứa trong vacxin đã nêu là virus bệnh Newcastle;
- phương pháp như được định nghĩa trên đây, khác biệt ở chỗ virus đã nêu được chứa trong vacxin đã nêu thuộc về một hoặc nhiều chủng của IBV (virus viêm phế quản truyền nhiễm), virus bệnh Newcastle, hoặc hỗn hợp của các virus này.

Bệnh Newcastle, còn được gọi là “bệnh giả dịch hạch ở gia cầm”, “viêm não-phổi ở gia cầm” hoặc “bệnh Ranikhet”, là bệnh ở chim do virus gây ra.

Tỷ lệ bệnh và tỷ lệ tử vong thay đổi lớn, tùy thuộc vào độc tính của chủng, tính miễn dịch và tình trạng của động vật và các yếu tố môi trường khác.

Virut bệnh Newcastle là virut thuộc họ Paramyxoviridae, của chi Rubulavirus.

Đây là virut ARN có dải đơn (không giống virut cúm, virut này có tám dải), được gọi là dải đơn. Các virut ARN đột biến dễ dàng và thường xuyên, điều này có thể làm cho chiến lược vacxin và được phẩm phức tạp thêm và khó khăn hơn.

Vỏ, có đường kính là từ 150 đến 300nm, có hai loại gai glycoprotein. Nó được đặc trưng bởi:

- Glycoprotein HN, chất này có hoạt tính đông kết hồng cầu và hoạt tính neuraminidaza, cho phép gắn kết virion vào các thụ thể màng ở bề mặt của tế bào và cho phép giải phóng nó;
- Glycoprotein F mà cho phép có sự dung hợp giữa vỏ virut và màng tế bào.

Virut này được nuôi cấy một cách dễ dàng trong trứng gà đã có phôi hoặc *in vitro* (trên nguyên bào sợi phôi gà hoặc trên tế bào thận gà).

Virut này rất chống chịu ở nhiệt độ môi trường, nên nó vẫn truyền nhiễm:

- trong khoảng thời gian dài (vài tháng) trong phân,
- trong hai 2 đến 3 tháng trên mặt đất, trong chuồng gà,
- trong 7 đến 8 tháng trên lớp vỏ bám đất,
- trong từ 2 năm trở lên trong thịt gia súc chưa được nấu chín và thịt gia súc được đông lạnh.

Về cúm, các chủng được phân loại theo độc lực của chúng, bằng cách phân biệt :

- chủng có độc lực mạnh (có độc lực cao, gây ra tỷ lệ tử vong gần tới hoặc đạt tới 100%, với một lần tấn công mang tính toàn thân, hoặc ít nhất là nội tạng hoặc liên quan đến hệ thần kinh, có thể gắn liền với các vấn đề hô hấp),
- chủng có độc lực vừa (có độc lực vừa phải) gây ra bệnh hô hấp với các vấn đề hệ thần kinh, gây ra tỷ lệ tử vong đạt tới 50% ở chim non,
- chủng có độc lực nhẹ (có độc lực yếu, không gây chết, gây ra một số vấn đề hô hấp, và đôi khi không gây ra triệu chứng). Đây là, ví dụ, chủng Hitchner B1 và chủng La Sota.

Các nguồn của virus có liên quan đến các cơ quan mà virus nhắm tới, các nguồn thay đổi tùy thuộc vào chủng virus, và tình trạng và lịch sử miễn dịch của chim bị nhiễm bệnh, nguồn này sẽ biểu hiện virus trong:

- các chất tiết phế quản và phân,
- tất cả các phần của thịt gia súc.

Các virus được tiết từ giai đoạn đầu của quá trình ủ và trong một khoảng thời gian có thể thay đổi trong suốt quá trình hồi phục, một vài ngày đến hai tuần, trong ít trường hợp thì lâu hơn nữa.

Để chống lại virus, các biện pháp đề phòng và phòng ngừa đang có mà nông dân có thể thực hiện, các biện pháp này có thể, ví dụ, bao gồm cách ly động vật đã bị nhiễm, làm chết động vật đã bị nhiễm, các biện pháp vệ sinh, và khử khuẩn và làm sạch thông thường đối với các cơ sở bằng chất khử khuẩn thông thường.

Việc tiêm chủng còn cấu thành phương tiện phòng ngừa.

Đối tượng của sáng chế còn bao gồm:

- Phương pháp như được định nghĩa trên đây, khác biệt ở chỗ virus được chứa trong vacxin sống đã nêu được đông khô trước bước a).

Các vacxin sống thường được trữ đông khô và phải được tái tạo huyền phù một cách ngẫu nhiên với pha nước. Vì vậy, vacxin đã được hoàn nguyên phải được sử dụng trong khoảng thời gian tính bằng giờ sau khi bổ sung chất pha loãng.

- Phương pháp như được định nghĩa trên đây, khác biệt ở chỗ chất phụ trợ dạng dầu đã nêu bao gồm, tính theo 100% khối lượng của nó:

- từ 40% đến 95% ít nhất một dầu khoáng, cụ thể hơn là từ 50% đến 95% ít nhất một dầu khoáng, và cụ thể hơn nữa là từ 50% đến 90% ít nhất một dầu khoáng;
- từ 5% đến 60% ít nhất một chất hoạt động bề mặt, cụ thể hơn là từ 5% đến 50% ít nhất một chất hoạt động bề mặt, và cụ thể hơn nữa là từ 10% đến 50% ít nhất một chất hoạt động bề mặt.

- Phương pháp như được định nghĩa trên đây, khác biệt ở chỗ ít nhất một muối vô cơ hóa trị hai đã nêu được chọn từ mangan gluconat, canxi gluconat, canxi aspartat, kẽm gluconat, sắt gluconat và canxi clorua.

Các dầu khoáng được sử dụng để sản xuất các chất phụ trợ dạng dầu được chọn từ nhóm bao gồm các dầu khoáng hydrocarbon thu được bằng cách chưng cất dầu và bằng cách thực hiện các bước xử lý kế tiếp như, ví dụ, bước loại lưu huỳnh, loại asphan, chiết chất thơm và bước chiết sáp, và các bước xử lý hoàn thiện khác (có thể đề cập đến, ví dụ, các dầu thuộc loại Marcol 52, MARCOL 82, Drakeol 5 và Drakeol 6, v.v.).

Các chất hoạt động bề mặt có mặt trong các chất phụ trợ dạng dầu là các chất hoạt động bề mặt nhũ hóa có bản chất ưa nước được đặc trưng bởi trị số HLB là từ 8 đến 19, cụ thể hơn nữa là từ 8 đến 15.

Chất hoạt động bề mặt như vậy có thể bao gồm alkylpolyglycosit hoặc hỗn hợp của các alkylpolyglycosit; saponin; lexitin; alkanol được polyoxyetyl hóa; các polyme chứa polyoxyetylen và các khối polyoxypropylen; hoặc các este thu được bằng cách ngưng tụ axit béo, thuận lợi là axit béo mà ở dạng lỏng ở 20°C, với đường, sorbitol, mannitol hoặc glyxerol. Đường đã nêu có thể bao gồm glucoza hoặc sucroza, hoặc tốt hơn, nếu là mannitol. Đối với các este được ưu tiên, có thể đề cập đến các este của axit béo, ví dụ, axit oleic, axit stearic, axit palmitic hoặc axit lauric, và đề cập đến sorbitol hoặc mannitol, thu được bằng cách este hóa axit béo bằng sorbitol hoặc mannitol, hoặc bằng cách este hóa bằng các sản phẩm thu được từ quá trình khử nước chuỗi được polyhydroxyl hóa của sorbitol hoặc của mannitol mà tạo vòng ở vị trí 1-4 hoặc ở vị trí 2-6, hoặc bằng cách este hóa bằng sorbitol hoặc mannitol và bằng các sản phẩm thu được từ quá trình làm mất nước chuỗi được polyhydroxyl hóa của sorbitol hoặc của mannitol mà tạo vòng ở vị trí 1-4 hoặc ở vị trí 2-6. Về các este mannitol được ưu tiên một cách đặc biệt, có thể đề cập đến các mannitol oleat, mannitan oleat, mannitol oleat được etoxy hóa chứa 5mol hoặc 10mol hoặc 15mol hoặc 20mol etylen oxit, và mannitan oleat được etoxy hóa chứa 5mol hoặc 10mol hoặc 15mol hoặc 20mol etylen oxit. Các dẫn xuất đường polyetylen glycol, sorbitol hoặc glyxerol cũng có thể được sử dụng. Các loại chất hoạt động bề mặt được ưu tiên khác bao gồm các dầu thực vật được etoxy hóa, ví dụ, các dầu ngô được etoxy hóa có từ 3mol đến 40mol etylen oxit,

dầu hạt cải dầu được etoxy hóa có từ 3mol đến 40mol etylen oxit, hoặc dầu thầu dầu được etoxy hóa có từ 3mol đến 60mol etylen oxit.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Khả năng tương thích của công thức chất phụ trợ với khả năng sống của các vaccin được đông khô là liên quan đến chế phẩm của công thức chất phụ trợ này và đến mức mà tại đó nó được sử dụng. Các cấu tử tương hợp sinh học được kết hợp theo tỷ lệ đem lại quá trình thực hiện tốt và khả năng của chất phụ trợ được chọn lựa và sau đó, chọn lựa này được đánh giá theo quy trình nghiên cứu định lượng. Khả năng sống của các vaccin có chất phụ trợ (và do đó khả năng tương thích của các dạng chế phẩm với các vaccin sống) là nhất thiết phải tốt đối với các vaccin đã thể hiện tính hiệu quả lớn hơn loại tham chiếu thương mại.

Sự cải thiện của tính hiệu quả được phản ánh, đối với nông dân, bằng mức hiệu suất chăn nuôi tốt hơn, giá thành điều trị thấp hơn và tiết kiệm thời gian. Hiện tại, việc điều trị không sử dụng các chất phụ trợ kích thích hiệu suất.

A- Chứng minh trong trường hợp bệnh viêm phế quản truyền nhiễm

a) Các sản phẩm là đối tượng của nghiên cứu này

Các chất pha loãng làm chất phụ trợ khác nhau được sản xuất

Bảng I:

	AD1	AD2	AD3	AD4	AD5	AD6	AD7	AD8	AD9	AD10	AD11
<u>Nước</u>	83%	83%	86%	86%	86%	83%	89%	89%	86%	98%	75%
Chất phụ trợ: <i>Dầu</i>											
Marcol 52;	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	0%	15%
<i>mannitan oleat</i> được etoxyl hóa HLB = 12	5%	5%	2%	2%	5%	5%	2%	2%	5%	0%	10%
Chất tạo phức EDTA	0%	0%	0%	0%	2%	0%	2%	0%	2%	0%	0%
natri polyacrylat	5%	0%	5%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	2%	0%
Muối khoáng											
- mangan gluconat	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	2%	0%	0%	0%
- canxi gluconat	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	2%	0%	0%

Dạng vật lý của chất pha loãng làm chất phụ trợ	m O/W	m O/W	O/W	O/W	m O/W	m O/W	O/W	O/W	m O/W	-	O/W
---	-------	-------	-----	-----	-------	-------	-----	-----	-------	---	-----

- m O/W : vi nhũ tương O/W

- O/W: nhũ tương O/W

Chế phẩm vacxin khác nhau được sản xuất

Kháng nguyên được sử dụng: virut của dòng H-120 của virut B1 được chiết từ trứng gà có phôi không có mầm bệnh cụ thể (SPF) với độ chuẩn gây nhiễm hữu hiệu là 7,0 lg EID50/ml.

Mỗi vacxin thử nghiệm (từ VA1 đến VA11, lần lượt bao gồm chất pha loãng làm chất phụ trợ AD1 đến AD11) được sản xuất bằng cách bổ sung:

- xấp xỉ 5% kháng nguyên (tương ứng với chất liệu được làm đông khô của kháng nguyên được mô tả trên đây), và
- xấp xỉ 95% chất pha loãng làm chất phụ trợ thử nghiệm (AD1 đến AD11).

b) Các lần đo tính hiệu quả trên gà

Quy trình thử nghiệm

b1) Tính hiệu quả của mỗi chế phẩm trong các chế phẩm vacxin (VA1 đến VA11) được xác định trên các nhóm của 10 con gà tiếp nhận lượng điều trị là 100µl vacxin ở mỗi lỗ mũi (phương thức dùng thuốc vào trong mũi là 0,2cm³ vacxin đối với mỗi động vật).

Vì vậy, các con gà của nhóm i tiếp nhận lượng điều trị bao gồm vacxin VAI, với i = 1 đến 11. Các con gà được sử dụng trong hoàn cảnh thử nghiệm này đến từ một nông trại, là 22 ngày tuổi, là huyết thanh âm tính đối với bệnh viêm phế quản truyền nhiễm IB, và thuộc chủng nâu giới tính High (High sex brown strain).

Ngoài ra :

- nhóm gồm 10 con gà (nhóm 12), hoặc nhóm đối chứng dương, tiếp nhận sự điều trị, theo cùng một phương thức, vacxin thương mại chống lại bệnh viêm phế quản truyền nhiễm. Vacxin thương mại này chỉ chứa nước trong vai trò là chất pha loãng và không chứa chất phụ trợ và cũng không chứa dầu hoặc chất hoạt động bề mặt bất kỳ.

Về chuẩn tham chiếu dương, thì sử dụng vacxin thương mại được sản xuất bằng FGI “ARRIAH”: chủng IB H-120 mề 211;

- nhóm gồm 10 con gà (nhóm 13), hoặc nhóm đối chứng âm, không tiếp nhận tiêm chủng.

Đối với mỗi con trong số các con gà của mỗi nhóm, các mẫu máu được lấy 7/14/21/28/35/42/49/56 ngày sau khi bắt đầu tiêm chủng để định lượng độ chuẩn kháng thể được tạo ra.

b2) Thử nghiệm độc tính

56 ngày sau ngày tiêm chủng lần đầu tiên, sức bảo vệ do các vacxin tạo ra được đánh giá bằng cách thực hiện thử nghiệm độc tính: đối với thử nghiệm này, động vật được gây nhiễm bằng tải lượng được xác định trước của mầm bệnh (sử dụng chủng gây bệnh M-41 của virus IB ở mức liều lượng là 6,46 CD50 hoặc 6,3 lg EID 50).

Sức mạnh gây bệnh được đánh giá bằng cách đo:

1/ sức mạnh tích lũy của các điểm của mỗi động vật trong 7 ngày sau khi gây nhiễm, với thang chấm điểm (1 điểm: hơi thở ngắn / 2 điểm: hơi thở ngắn và các khó khăn khi quản / 3 điểm: tình trạng nguy cấp hô hấp, mặt phù, các chất tiết, các triệu chứng chung). Nhóm bị ốm càng lâu và nhóm bị ốm càng nhiều, thì điểm này càng cao;

2/ tổng các ngày của nhóm này mà trong suốt thời gian này các triệu chứng được quan sát: điểm này định lượng khả năng của động vật trong việc vượt qua bệnh;

3/ giá trị trung bình của các điểm với độ lệch chuẩn của nhóm có thể giúp đánh giá tính đồng nhất của nhóm;

4/ thời gian trì hoãn trong việc kích hoạt bệnh: một số dạng điều trị trì hoãn sự biểu hiện của các triệu chứng nhưng gây hại cho khả năng vượt qua bệnh;

5/ tốc độ động vật bị ốm.

Các đánh giá này được thực hiện bởi bác sĩ thú y đủ tư cách được đào tạo trong hoàn cảnh của quy trình thử nghiệm thường được thực hiện với mục đích đánh giá mức hiệu suất của các vacxin chống lại IB.

Các kết quả thử nghiệm

Độ chuẩn kháng thể:

Tập hợp các kết quả được trình bày trong bảng II.

Nhóm của động vật không được tiêm chủng (nhóm 13) không tạo ra các kháng thể một cách đáng kể (xấp xỉ 1 với độ lệch chuẩn là 0,2), điều này có nghĩa là không có sự nhiễm virus trong suốt quá trình thử nghiệm, vì thế mà, đánh giá các kết quả khác.

Vaccin thương mại (nhóm 12) tạo ra độ chuẩn lớn hơn 3 sau 28 ngày, với độ lệch chuẩn là 0,2 sớm đến mức là 14 ngày sau khi tiêm chủng và hiện tượng này là ổn định trong 56 ngày.

Các nhóm 1/3/5/7/9 tạo ra độ chuẩn kháng thể lớn hơn 3 (lên đến 4) bắt đầu từ 21 ngày và xuyên suốt khoảng thời gian thử nghiệm, với độ lệch chuẩn là 0,2.

Các nhóm này biểu hiện các kết quả mà tốt hơn đáng kể so với vaccin thương mại (P được ghi chú trong bảng).

Các nhóm khác biểu hiện các mức đáp ứng tương tự với hoặc nhỏ hơn vaccin thương mại.

P xác định ý nghĩa của các kết quả, nói cách khác, khả năng xảy ra hiện tượng mà có thể thiết lập được sự khác biệt là đáng kể hay không.

$P < 0,01$: sự khác biệt đáng kể so với vaccin thương mại.

$P < 0,001$: sự khác biệt rất đáng kể so với vaccin thương mại.

Bảng II : Các kết quả của độ chuẩn kháng thể của các nhóm 1 đến 13 trước khi thử nghiệm độc tính, trong 56 ngày

	Số ngày sau khi tiêm chủng								
	Trước khi tiêm chủng	7	14	21	28	35	42	49	56
Nhóm 1	2,11 ±0,13	1,40 ±0,23	2,31 ±0,13	2,65 ±0,07	2,89 ±0,13	3,19 ±0,13	3,99 ±0,04 ($P < 0,001$)**	4,01 ±0,04 ($P < 0,001$)	3,76 ±0,08 ($P < 0,001$)
Nhóm 2	1,46 ±0,27	1,18 ±0,25	2,42 ±0,12	2,60 ±0,14	3,22 ±0,17	3,23 ±0,14	3,21 ±0,15	3,24 ±0,13	3,15 ±0,16
Nhóm 3	2,11 ±0,13	1,40 ±0,23	2,31 ±0,13	2,65 ±0,07	2,89 ±0,13	3,19 ±0,13	3,99 ±0,04 ($P < 0,001$)**	4,01 ±0,04 ($P < 0,001$)	3,76 ±0,08 ($P < 0,001$)

Nhóm 4	2,08 ±0,23	1,39 ±0,29	2,48 ±0,15	2,74 ±0,2	2,55 ±0,44	3,03 ±0,18	3,10 ±0,14	3,11 ±0,19	3,68 ±0,11 (P<0,001)
Nhóm 5	1,68 ±0,32	1,85 ±0,22	2,61 ±0,17	3,24 ±0,17	3,64 ±0,10 (P≤0,01)	3,72 ±0,10 (P<0,02)	3,70 ±0,11 (P<0,001)	3,48 ±0,14	3,22 ±0,16
Nhóm 6	1,40 ±0,27	0,68 ±0,25	2,55 ±0,18	2,97 ±0,21	2,90 ±0,20	3,05 ±0,12	3,01 ±0,13	2,92 ±0,15	2,82 ±0,17
Nhóm 7	1,91 ±0,29	1,44 ±0,22	2,84 ±0,14	2,90 ±0,17	3,24 ±0,20	3,90 ±0,05 (P<0,001)	3,90 ±0,05 (P<0,001)	3,69 ±0,08 (P<0,01)	3,46±0,1 (P<0,01)
Nhóm 8	1,60 ±0,25	1,91 ±0,14	2,77 ±0,19	3,11 ±0,22	3,28 ±0,21	3,38 ±0,17	3,23 ±0,19 (P<0,01)	3,20 ±0,14	3,06 ±0,17
Nhóm 9	1,62 ±0,22	1,75 ±0,20	2,81 ±0,23	3,43 ±0,16	3,74 ±0,32 (P≤0,01)	3,82 ±0,15 (P<0,02)	3,75 ±0,19 (P<0,001)	3,48 ±0,14	3,22 ±0,16
Nhóm 10	1,97 ±0,10	1,33 ±0,18	2,62 ±0,12	2,91 ±0,12	3,14 ±0,11	3,09 ±0,15	3,08±0,14	2,85 ±0,13	2,63 ±0,14
Nhóm 11	1,11 ±0,13	1,54 ±0,08	2,32 ±0,23	3,01 ±0,11	3,04 ±0,21	3,11 ±0,12	3,12 ±0,19	2,52 ±0,23	2,53 ±0,54
Nhóm 12 vaccine thương mại	1,72 ±0,21	1,42 ±0,29	2,58 ±0,18	2,81 ±0,17	3,15 ±0,14	3,27 ±0,13	3,09 ±0,10	3,11 ±0,15	3,07 ±0,04
Nhóm 13 Động vật không được điều trị	1,65 ±0,26	0,50 ±0,21	1,00 ±0,22	0,44 ±0,23	0,79 ±0,20	0,80 ±0,21	0,76 ±0,18	0,58 ±0,24	0,38 ±0,21

Thử nghiệm độc tính:

Bảng III : Các kết quả của hành vi khi đáp ứng lại thử nghiệm độc tính của các nhóm 1 đến 13 về điểm chống chịu virus

Nhóm	Số gà	Điểm tích lũy	Ngày tích lũy của các triệu chứng lâm sàng	Giá trị trung bình của các điểm / gà ± độ lệch chuẩn	Thời gian trì hoãn trung bình trong quá trình bắt đầu các triệu chứng ± độ lệch chuẩn	Tỷ lệ kích hoạt bệnh
1	10	2	2	0,20±0,38	0,20±0,42	0,40
2	10	32	11	3,2±0,71	3,39±2,84	0,80
3	10	2	3	0,20±0,11	0,20±0,32	0,10
4	10	34	33	3,40±2,80	3,30±2,75	0,90
5	10	5	5	0,50±0,70	1,00±0,71	0,30
6	10	13	12	1,30±0,28	1,90±0,88	0,60

7	10	3	3	0,30±0,48	0,30±0,48	0,30
8	10	12	11	1,20±0,88	1,10±0,88	0,70
9	10	2	2	0,20±0,42	0,20±0,42	0,30
10	10	12	11	1,20±1,23	1,10±1,29	0,70
11	10	8	8	0,80±1,03	0,80±1,03	0,50
12 vacxin thương mại	9	22	21	2,44±1,94	2,33±1,73	0,50
13 Đối chứng âm	12	109	83	9,08±1,83	6,92±1,44	1,00

Nhóm đối chứng không được điều trị (nhóm 13) tạo ra điểm về sức mạnh triệu chứng rất cao (xấp xỉ 9 đối với mỗi con gà, đối với 100% động vật, với ngày bệnh, và thời gian trì hoãn trong kích hoạt các triệu chứng của bệnh là xấp xỉ 7 ngày). Các kết quả này xác nhận thử nghiệm độc tính.

Việc sử dụng vacxin thương mại (nhóm 12) làm giảm một cách đáng kể tất cả các thông số này, tuy nhiên, với 50% các con gà vẫn phát triển bệnh, sau chỉ hai ngày trì hoãn, nhưng với các triệu chứng vừa phải (22 điểm tích lũy) trong khoảng thời gian tương đối ngắn (chỉ 21 ngày tích lũy).

Các nhóm 1/3/5/7/9 biểu hiện điểm số tích lũy rất thấp (0,2 đến 0,5) trong khoảng thời gian ngắn (2 đến 5 ngày tích lũy) mà không trì hoãn một cách đáng kể các triệu chứng của bệnh và trong khi bảo vệ ít nhất 60% số động vật trong mỗi nhóm.

Các nhóm khác đem lại điểm số trung gian giữa vacxin thương mại và các nhóm 1/3/5/7/9, nhưng không gây ra sự bảo vệ lớn hơn 50% số động vật.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất chế phẩm vacxin dùng tại chỗ để điều trị bệnh virus ở gia cầm, trong đó phương pháp này bao gồm ít nhất là bước:

a) trộn ngẫu nhiên vacxin chứa ít nhất một virus sống được chọn từ virus thuộc một hoặc nhiều chủng của bệnh gia cầm với chất pha loãng làm chất phụ trợ (adjuvant diluent - AD), khác biệt ở chỗ, chất pha loãng làm chất phụ trợ là vi nhũ tương dầu trong nước bao gồm, tính theo 100% khối lượng của nó:

- từ 50% đến 97% nước, cụ thể hơn là từ 70% đến 97% nước, và cụ thể hơn nữa là từ 80% đến 97% nước;

- từ 1% đến 45% chất phụ trợ dạng dầu, cụ thể hơn là từ 1% đến 30% chất phụ trợ dạng dầu, và cụ thể hơn nữa là từ 2% đến 10% chất phụ trợ dạng dầu;

- từ 0,1% đến 10% ít nhất một muối vô cơ hóa trị hai, cụ thể hơn là từ 0,1% đến 8%, và cụ thể hơn nữa là từ 0,2% đến 3%;

- từ 0,1% đến 10% ít nhất một chất tạo phức, cụ thể hơn là từ 0,1% đến 8%, và cụ thể hơn nữa là từ 0,2% đến 3%;

ít nhất một chất tạo phức được chọn từ axit etylenđiamintetraaxetic (EDTA), natri gluconat, kali gluconat và natri polyacrylat.

2. Phương pháp theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, virus được chứa trong vacxin thuộc về một hoặc nhiều chủng của IBV (virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm - infectious bronchitis virus).

3. Phương pháp theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, virus được chứa trong vacxin là virus gây bệnh Newcastle.

4. Phương pháp theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, virus được chứa trong vacxin thuộc về một hoặc nhiều chủng của IBV (virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm), virus gây bệnh Newcastle hoặc hỗn hợp của các virus này.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, khác biệt ở chỗ, virus được chứa trong vacxin sống được đông khô trước bước a).

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, khác biệt ở chỗ, chất phụ trợ dạng dầu bao gồm, tính theo 100% khối lượng của nó:

- từ 40% đến 95% ít nhất một dầu khoáng, cụ thể hơn là từ 50% đến 95% ít nhất một dầu khoáng, và cụ thể hơn nữa là từ 50% đến 90% ít nhất một dầu khoáng;

- từ 5% đến 60% ít nhất một chất hoạt động bề mặt, cụ thể hơn là từ 5% đến 50% ít nhất một chất hoạt động bề mặt, và cụ thể hơn nữa là từ 10% đến 50% ít nhất một chất hoạt động bề mặt.

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, khác biệt ở chỗ, ít nhất một muối vô cơ hóa trị hai được chọn từ nhóm bao gồm mangan gluconat, canxi gluconat, canxi aspartat, kẽm gluconat, sắt gluconat và canxi clorua.