



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

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

(11)   
**1-0021827**

(51)<sup>7</sup> **A61K 39/02**

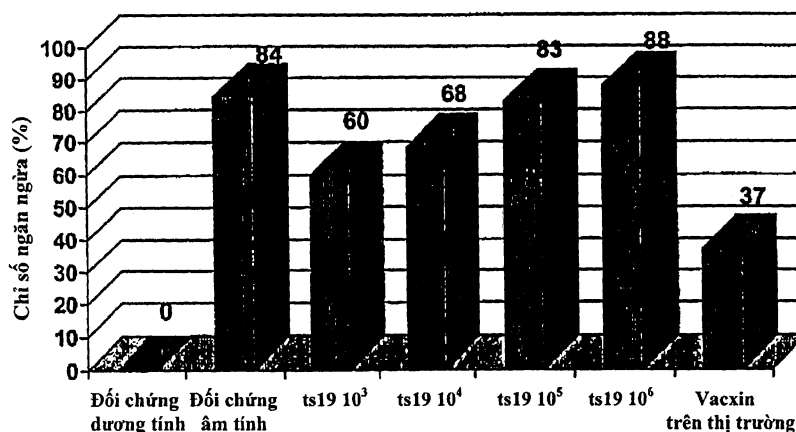
(13) **B**

(21)	1-2011-03524	(22)	19.05.2010
(86)	PCT/AU2010/000590	19.05.2010	(87) WO2010/132932
(30)	2009902255	19.05.2009	AU
(45)	25.10.2019	379	(43) 25.06.2012
(73)	1. BIOPROPERTIES PTY LTD. (AU) 36 Charter Street, Ringwood, Victoria 3134, Australia		
	2. THE UNIVERSITY OF MELBOURNE (AU) Grattan Street, Parkville, Victoria 3052, Australia		
(72)	YOUIL, Rima (AU), ABS EL-OSTA, Youssef (AU), BROWNING, Glenn (AU), MARKHAM, Phillip (AU)		
(74)	Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Thảo Thọ Quyến (INVENCO.,LTD)		

(54) **CHŨNG VACXIN MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE MẮN CẢM VỚI NHIỆT ĐỘ VÀ CHẾ PHẨM VACXIN CHỨA CHŨNG NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vacxin Mycoplasma hyopneumonia chứa đột biến ở ít nhất một trong số các gen được nêu hoặc như được nộp lưu tại Viện đo lường quốc gia Úc (National Measurements Institute, Australia) với số lưu giữ NM04/41259, chủng này miễn cảm với nhiệt độ và được giảm độc lực. Sáng chế cũng đề cập đến vacxin chứa chủng này và phương pháp sản xuất vacxin theo sáng chế.

Chỉ số ngăn ngừa (mức độ nghiêm trọng của tổn thương phổi)



### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến chủng *Mycoplasma hyopneumoniae*, vaccin chứa chủng này để ngăn ngừa bệnh viêm phổi do mycoplasma ở lợn.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

*Mycoplasma hyopneumoniae* là tác nhân gây bệnh viêm phổi do mycoplasma ở lợn (còn gọi là bệnh viêm phổi địa phương (enzootic pneumonia: EP)). Đây là một trong số các bệnh hô hấp phổ biến nhất và gây thiệt hại đáng kể về mặt kinh tế đối với ngành công nghiệp chăn nuôi lợn toàn cầu. Bệnh này liên quan đến các bệnh lây nhiễm thứ cấp, có tỷ lệ mắc bệnh cao và tỷ lệ tử vong thấp, chuyển hóa thức ăn kém và có thể gây thiệt hại kinh tế toàn cầu ước tính khoảng 1 tỷ đô la mỗi năm.

Đối với bệnh EP, vi khuẩn *Mycoplasma hyopneumoniae* tấn công các lông mao của tế bào biểu mô phổi của lợn và phá hủy các lông mao bình thường khỏe mạnh khiến cho các sinh vật cơ hội tự thiết lập trong mô hô hấp để gây bệnh. Một khi đã được thiết lập, *M. hyopneumoniae* gây ra các tổn thương ở phổi lợn.

Bệnh viêm phổi rất dễ lây và thường lây nhiễm thông qua việc tiếp xúc trực tiếp với các dịch tiết đường hô hấp bị nhiễm, ví dụ, các giọt bắn ra từ mũi hoặc miệng khi hắt hơi hoặc ho.

Hiện có một số vaccin để ngăn ngừa *M. hyopneumoniae*. Các vaccin mới nhất do 10 công ty cung cấp với 22 nhãn hiệu vaccin được đăng ký dưới dạng đơn giá hoặc hai giá/đa giá. Chúng đều là các chế phẩm *M. hyopneumoniae* chết hoặc bất hoạt.

Các ví dụ về vaccin *M. hyopneumoniae* bất hoạt dạng nguyên bào bao gồm RESPISURE™ và STELLAMUNET™ (Pfizer), SUVAXYN M. HYO™ (Fort Dodge), HYORESP™ (Meriel), M+PAC™ (Schering-Plough) và PORCILIS™ (Intervet).

Mặc dù một số vaccin có thể làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh EP, nhưng hiện chưa có vaccin chết hoặc bất hoạt dạng nguyên bào nào có thể ngăn ngừa bệnh nhiễm *M. hyopneumoniae* một cách triệt để. Do đó, cần có vaccin hữu hiệu hơn.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Theo phương án ưu tiên, sáng chế đề xuất chủng *Mycoplasma pneumoniae* sống thích hợp để sử dụng làm vaccin ngăn ngừa bệnh viêm màng phổi địa phương.

Nói chung, sáng chế đề xuất chủng *Mycoplasma hyopneumoniae* giảm độc lực có thể được sử dụng để sản xuất vaccin sống hữu hiệu để ngăn ngừa bệnh viêm màng phổi địa phương ở lợn.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất chủng vaccin *Mycoplasma hyopneumoniae* chứa đột biến ở ít nhất một trong số các gen nêu trong Bảng 1.

Theo một phương án, chủng vaccin này chứa đột biến ở tất cả các gen nêu trong Bảng 1.

Theo một phương án, chủng vaccin này miễn cảm với nhiệt độ.

Các vaccin giảm độc lực thường có lợi do chúng đều có các yếu tố quyết định gây miễn dịch phù hợp của tác nhân gây nhiễm ở dạng tự nhiên của nó với hệ miễn dịch của vật chủ và chỉ cần một lượng tác nhân gây miễn dịch tương đối nhỏ do tác nhân này có khả năng tăng gấp bội trong vật chủ được tiêm chủng. Các phương pháp làm giảm độc lực bao gồm cấy chuyển chủng độc nhiều lần hoặc cho chiếu xạ hoặc cho tiếp xúc với hóa chất. Các phương pháp này có thể đưa các đột biến vào hệ gen để tạo ra vi sinh vật có độc tính thấp hơn, nhưng vẫn có khả năng tạo ra các bản sao.

Hạn chế của các phương pháp này là ở chỗ chúng gây ra các đột biến ngẫu nhiên không xác định được ở cấp độ phân tử. Các phương pháp tương tự để chọn cách làm giảm độc lực, như bằng cách chọn độ miễn cảm với nhiệt độ liên quan, thường mất nhiều thời gian và thu được kết quả sai lệch do chủng miễn cảm với nhiệt độ không thể bị giảm độc lực và chủng giảm độc lực lại không nhất thiết miễn cảm với nhiệt độ, và cần nhiều thử nghiệm và hiệu chỉnh kết quả. Ngoài ra, chủng giảm độc lực có thể bị đột biến tiếp và chuyển thành chủng gây độc.

Nhằm tạo ra vaccin sống ngăn ngừa bệnh viêm màng phổi do mycoplasma, các tác giả sáng chế đã gây đột biến thể phân lập *Mycoplasma hyopneumoniae* bằng hóa chất và chọn các dòng miễn cảm với nhiệt độ. Các tác giả sáng chế đã làm đông khô vi khuẩn đột biến sống này ở nhiệt độ thấp và phát hiện ra rằng vi khuẩn này có thể được hoàn nguyên sau một tuần và vẫn sống sót sau loạt cấy chuyển và do đó thích hợp làm chủng vaccin

*Mycoplasma hyopneumoniae*. Chủng vaccin và chủng gốc được giải trình tự và việc so sánh trình tự đã xác nhận được các gen bị đột biến ở vaccin này, do đó cho phép xác định di truyền chủng giảm độc lực.

Theo khía cạnh thứ hai, sáng chế đề xuất chủng vaccin *Mycoplasma hyopneumoniae* giảm độc lực được nộp lưu tại Viện đo lường quốc gia Úc (National Measurements Institute, Australia) với số lưu giữ NM04/41259, chủng này là miễn cảm với nhiệt độ và giảm độc lực.

Chủng vaccin theo khía cạnh thứ hai được chứng minh là có tính miễn dịch ngăn ngừa và không chuyển thành chủng độc sau loạt cấy chuyển (số liệu không được thể hiện).

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất chủng vaccin theo khía cạnh thứ nhất và thứ hai, phương pháp này bao gồm bước gây đột biến thể phân lập ban đầu thích hợp của *Mycoplasma hyopneumoniae* bằng hóa chất và chọn các thể đột biến vẫn giữ được khả năng sống sau loạt cấy chuyển.

Theo một phương án, các thể đột biến trước hết được chọn trên cơ sở miễn cảm với nhiệt độ.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề xuất vaccin chứa chủng vaccin *M. hyopneumoniae* theo khía cạnh thứ nhất và thứ hai và chất mang, tùy ý chất phụ trợ, và tùy ý ít nhất một tác nhân gây nhiễm bổ sung, vaccin này với lượng gây miễn dịch có khả năng tạo ra tính miễn dịch ngăn ngừa bệnh do *M. hyopneumoniae* gây ra. Tác nhân gây nhiễm có thể là virus, vi khuẩn, nấm hoặc ký sinh trùng.

Theo khía cạnh thứ năm, sáng chế đề cập đến phương pháp ngăn ngừa bệnh do *Mycoplasma hyopneumoniae* gây ra ở lợn bao gồm việc cho lợn sử dụng vaccin theo khía cạnh thứ tư với lượng gây miễn dịch.

Theo khía cạnh thứ sáu, sáng chế đề xuất vaccin theo khía cạnh thứ tư dùng để ngăn ngừa bệnh do *Mycoplasma hyopneumoniae* gây ra ở lợn.

Theo khía cạnh thứ bảy, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất vaccin theo khía cạnh thứ tư bao gồm bước phối hợp chủng *Mycoplasma hyopneumoniae* theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai với chất mang, tá dược và/hoặc tùy ý, ít nhất một tác nhân gây nhiễm bổ sung. Tác nhân gây nhiễm có thể là virus, vi khuẩn, nấm hoặc ký sinh trùng.

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế đề cập đến việc sử dụng chủng vaccin *Mycoplasma hyopneumoniae* theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai để sản xuất được phẩm ngăn ngừa bệnh do *Mycoplasma hyopneumoniae* gây ra ở lợn.

Theo phương án của các khía cạnh từ thứ tư đến thứ bảy, "bệnh do *Mycoplasma hyopneumoniae* gây ra" là bệnh viêm phổi địa phương hoặc bệnh viêm phổi do mycoplasma gây ra ở lợn.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1: Mức tạo khuẩn lạc của chủng vaccin ts19 ở mũi của lợn được tiêm chủng với liều quá cao.

Fig.2: Mức tạo khuẩn lạc ở thời điểm 59 ngày sau tiêm chủng (DPV) ở khí quản của lợn được tiêm chủng vaccin ts19 với liều quá cao.

Fig.3: Mức tạo khuẩn lạc ở mũi của lợn được tiêm chủng chủng vaccin ts19 với các liều khác nhau.

Fig.4: Sự chênh lệch tổng thể trọng trong khoảng thời gian nghiên cứu (105 ngày).

Fig.5: Xác định liều ngăn ngừa tối thiểu đối với ts19.

Fig.6: Chỉ số ngăn ngừa của ts19 và vaccin trên thị trường trên cơ sở giảm mức độ nghiêm trọng của các tổn thương phổi.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Chủng *M. hyopneumoniae* "LKR" ban đầu được phân lập từ mẫu lò mổ (Lloyd and Etheridge 1981, J of Comp Path 91:77-83). Chủng này được tái phân lập từ lợn bị nhiễm theo kinh nghiệm trước khi cấy chuyển khoảng 10 lần trong môi trường vô bào để đạt được mức phân lập dòng (CSIRO, Victoria). Tiếp theo, dòng này được gửi tới bộ phận thu mẫu *Mycoplasma* của đại học Adelaide, Nam Úc, để phân tích. Tiếp theo, chủng phân lập LKR được thu bởi trường đại học Melbourne, Khoa khoa học thú y (*Mycoplasma* Group), bằng 3 đợt cấy chuyển *in vitro* trong môi trường canh thang Friss cải biến, để bảo quản. Các lọ nhỏ bảo quản được ký hiệu là "LKR P3 29/5/97". Dòng này là chủng gốc.

LKR P3 29/5/97 được cấy chuyển *in vitro* và gây đột biến NTG (200mg/mL) bằng cách sử dụng phương pháp đã được mô tả trước đó (Nonamura and Imada (1982)

Avian Diseases 26:763- 775). Dòng mẫu cảm với nhiệt độ ("ts-19") được chọn từ đĩa thạch và nuôi cấy trong 3ml môi trường canh thang Friss cải biến. Số đợt cấy chuyển đối với dòng này được ký hiệu là "P0" và sau đó thực hiện thêm 4 đợt cấy chuyển *in vitro* với độ pha loãng 1:4 thể tích/thể tích cho mỗi đợt cấy chuyển trong môi trường canh thang Friss cải biến. Mẫu cấy chuyển cuối cùng được ký hiệu là "LKR ts-19 P4 MS". LKR ts-19 P4 MS trải qua nhiều đợt cấy chuyển pha loãng *in vitro* trong môi trường canh thang Friss cải biến để đạt tới độ pha loãng  $3,2 \times 10^{-21}$ . Dòng đột biến cuối cùng được ký hiệu là "LKR ts-19  $3,2 \times 10^{-21}$ ".

LKR ts-19  $3,2 \times 10^{-21}$  được đông khô và gửi tới phòng thí nghiệm phân tích của Úc (Australian Government Analytical Laboratories) (Hiệp ước Budapest về nhận biết quốc tế đối với nguồn sinh vật dùng cho quy trình patent) với số lưu giữ NM04/41259.

*Mycoplasma* có kích thước bộ gen giảm đáng kể, điều này phản ánh các khả năng sinh tổng hợp hạn chế của chúng và sự phụ thuộc vào vật chủ kiểu ký sinh của chúng. Do có sự hạn chế về bộ gen nên việc gây đột biến NTG đối với thành phần cụ thể của một con đường có thể ảnh hưởng đáng kể đến sự sống sót của tế bào *Mycoplasma*. Việc gây đột biến NTG tạo ra các đột biến ngẫu nhiên (chuyển vị, đảo, mất hoặc thêm nucleotit) bên trong bộ gen. Kết quả là có thể tạo ra nhóm bộ gen biến thể mà mỗi bộ gen chứa một hoặc nhiều đột biến. Nhiều bộ gen biến thể trong số này có thể không sống được do gen hoặc các gen quan trọng bị loạn chức năng. Nếu các đột biến này không gây hại đến khả năng sinh trưởng của sinh vật thì các sinh vật biến thể sống sót có thể tiếp tục được chọn lọc (ví dụ, chọn lọc bởi nhiệt độ). Trong quá trình phát triển của ts19, việc chọn lọc được dựa trên khả năng chủng biến thể sinh trưởng với hiệu giá cao ở nhiệt độ 33°C và khả năng sinh trưởng giảm ở nhiệt độ 39,5°C. Trên cơ sở so sánh trình tự toàn bộ bộ gen giữa chủng vắc xin *Mycoplasma hyopneumoniae* ts19 và chủng gốc (LKR), đã xác định được nhiều đột biến (thay đổi nucleotit) trong bộ gen của ts19. Các đột biến này bao gồm thay thế nucleotit (chuyển vị hoặc đảo), cũng như mất hoặc thêm.

Các đột biến này nằm ở khắp bộ gen và bao gồm cả các gen được biểu hiện cũng như các protein giả thiết và các trình tự không mã hóa. Bảng 1 liệt kê các gen đã biết được đột biến bằng cách thay thế, làm mất hoặc thêm bazơ. Các gen này được phân loại theo chức năng chính của chúng. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này dễ dàng biết cách phát hiện liệu chủng *M. hyo* có chứa đột biến ở một trong số các gen

nêu trong Bảng 1 hay không bằng cách xác định sự khác biệt giữa trình tự đối chứng được cung cấp (ví dụ, YP\_278901.1) với trình tự của chủng giảm độc lực. Tsl9, như được nộp lưu với số lưu giữ NM04/41259, là chủng giảm độc lực chứa tất cả các đột biến nêu trong Bảng 1.

Theo một phương án, chủng giảm độc lực chứa ít nhất 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 hoặc tất cả các đột biến nêu trong bảng 1. Theo một phương án, chủng giảm độc lực chứa đột biến ở một hoặc mỗi một trong số các độc tố, và/hoặc một hoặc mỗi một trong số các gen liên quan đến cơ chế chuyển hóa hydrat cacbon, và/hoặc gen liên quan đến cơ chế chuyển hóa phospholipit, và/hoặc gen liên quan đến cơ chế chuyển hóa đồng nhân tố, và/hoặc một hoặc mỗi một trong số các gen liên quan đến quá trình phiên mã hoặc dịch mã, và/hoặc một hoặc mỗi một trong số các gen liên quan đến quá trình vận chuyển qua màng, và/hoặc một hoặc mỗi một trong số các gen liên quan đến quá trình sao chép, sửa chữa hoặc chuyển hóa ADN và/hoặc gen transposaza nêu trong bảng 1.

Theo một phương án, chủng giảm độc lực chứa đột biến ở mỗi một trong số các độc tố.

Bảng 1: Các đột biến làm giảm độc lực bên trong các gen của chủng vacxin *M. hyopneumoniae* ts19.

Độc tố	
Protein màng ngoài giả định P95	YP_278901.1
Lipoprotein giả định (MHJ_0213)	YP_279015.1
Lipoprotein giả định (MHJ__0362)	YP_279161.1
Protein bề mặt P216 giả định	YP_279290.1
Protein kiểu kết dính giả định P146	YP_279457.1
Chuyển hóa hydrat cacbon:	
Triosephosphat isomeraza	YP_278904.1
Transketolaza	YP_279223.1
Thành phần ABC đặc hiệu với N-axetylglucosamin II của hệ PTS giả định	YP_279370.1

Chuyển hóa phospholipit:	
CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphat-3-phosphatidyl transferaza	YP_279075.1
Chuyển hóa đồng nhân tố:	
Nicotinat phosphoribosyltransferaza	YP_279204.1
Phiên mã/dịch mã:	
Gen GidA [enzym cải biến uridin 5-carboxymethylaminometyl của ARN vận chuyển	YP_278808.1
Protein L3 của ribosom 50S	YP_278992.1
Leuxyl-tARN synthetaza	YP_279441.1
Isoleuxyl tARN synthetaza	YP_278833.1
Vận chuyển qua màng:	
Protein permeaza vận chuyển ABC giả định	YP_279164.2
Protein liên kết với ATP vận chuyển ABC giả định	YP_278823.1
Protein vận chuyển cromat giả định	YP_278943.1
Protein permeaza và liên kết với ATP vận chuyển ABC giả định	YP_278958.1
Thành phần protein nội màng translocaza giả định YidC	YP_279468.1
Protein permeaza giống p69 của hệ vận chuyển ABC giả định	YP_279157.1
Protein permeaza vận chuyển ABC giả định	YP_279176.1
Pr1 liên kết với ATP vận chuyển ABC giả định	YP_279419.1
Sao chép/sửa chữa/chuyển hóa ADN:	
ADN topoisomeraza I	YP_279077.1
Uraxil-ADN glycosylaza	YP_278929.1
GTPaza ObgE	YP_278842.1
ADN polymeraza IV	YP_278846.1
Cấu trúc dưới phân tử alpha của ribonucleotit-disulphat reductaza	YP_279017.1
Thymidylat kinaza	YP_279053.1
Cấu trúc dưới phân tử delta của ADN polymeraza III	YP_279054.1
ADN ligaza	YP_279060.1
Cấu trúc dưới phân tử A của ADN gyraza	YP_279326.1



Ribonucleaza HII	YP_279388.1
Pyrophosphataza vô cơ	YP_279400.1
Cấu trúc dưới phân tử C của Excinucleaza ABC	YP_278867.1
Transposaza	
Transposaza ISMHp1 giả định	YP_279110.1

YP\_ số chỉ trình tự đối chiếu của NCBI

Chủng vi khuẩn được mô tả theo sáng chế là chủng sống miễn cảm với nhiệt độ và giảm độc lực và có thể được sử dụng trong vaccin sống.

Chủng sống, giảm độc lực là chủng vi khuẩn sống đã được nuôi cấy trong các điều kiện làm giảm hoặc "làm giảm độc lực" độc tính của chúng. Vaccin sống thường kích thích đáp ứng miễn dịch bền hơn so với vi sinh vật bị bất hoạt hoặc chết.

Chủng vaccin theo khía cạnh thứ nhất có thể được sản xuất bằng cách gây đột biến hóa học đối với chủng phân lập *Mycoplasma hyopneumoniae*. Cụ thể là, việc gây đột biến hóa học bao gồm việc gây đột biến bằng cách xử lý bằng N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) (Nonamura and Imada (1982), Avian Diseases 26; 763-775). Các vi khuẩn đột biến miễn cảm với nhiệt độ có thể được chọn lọc về khả năng sinh trưởng của chúng ở nhiệt độ cho phép (33°C) và không thể sinh trưởng ở nhiệt độ không cho phép (39,5°C). Để sử dụng trong vaccin, các thể đột biến miễn cảm với nhiệt độ phải trải qua loạt cấy chuyển và pha loãng. Chủng vaccin vi khuẩn *Mycoplasma* theo khía cạnh thứ nhất là có khả năng sống (hoặc sống). Khả năng sống có nghĩa là "khả năng sống sót" nói chung và khả năng sống, phát triển hoặc nảy mầm nói riêng, trong các điều kiện thích hợp. Tế bào vi khuẩn là có khả năng sống nếu nó có khả năng sinh trưởng trong môi trường canh thang hoặc thạch thích hợp.

Chủng vi khuẩn được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest với số lưu giữ NM 04/41259 được tạo ra bằng cách cấy chuyển *in vitro* ba lần (3x) ở (1:4 thể tích/thể tích trong môi trường canh thang Friss cải biến) đối với chủng phân lập *Mycoplasma hyopneumoniae* Úc LKR (thu được từ bộ phận thu mẫu *Mycoplasma* của Đại học Adelaide bởi nhóm *Mycoplasma* của Đại học Melbourne) để sản xuất LKR P3. Tiếp theo, chủng phân lập LKR P3 được gây đột biến NTG. LKR P3 đã được gây đột biến được sinh trưởng trên thạch ở 33°C (nhiệt độ cho phép) và ở 39,5°C (nhiệt độ không

cho phép). Các dòng đột biến sinh trưởng được ở 33°C mà không sinh trưởng được ở 39,5°C được chọn. Các dòng được chọn trải qua một số đợt cấy chuyển *in vitro* và pha loãng theo bậc. Ở đợt cấy chuyển cuối, dòng được chọn (ts19) được lưu giữ theo Hiệp ước Budapest tại Viện đo lường quốc gia (khi đó gọi là Phòng thí nghiệm phân tích của chính phủ Úc) dưới dạng chủng nuôi cấy đông khô. Các mẫu này được hoàn nguyên sau một tuần bảo quản và được phát hiện là có khả năng sống.

Thuật ngữ "cấy chuyển theo loạt *in vitro*" để chỉ việc cấy chuyển vi khuẩn lặp lại trong môi trường. Việc cấy chuyển này bao gồm cấy vào môi trường canh thang chủng vi khuẩn sống, sau đó ủ một thời gian ở nhiệt độ thích hợp. Tiếp theo, một phần của chủng nuôi cấy đã ủ được sử dụng để cấy vào môi trường nuôi cấy vô trùng mới và lại ủ một thời gian. Chu kỳ tiếp tục cho đến khi đạt được số đợt cấy chuyển mong muốn. Mỗi vòng sinh trưởng và cấy lại được gọi là một đợt cấy chuyển.

Theo khía cạnh thứ ba, sáng chế đề xuất vaccin chứa chủng vi khuẩn theo khía cạnh thứ nhất và chất mang như môi trường sinh trưởng của *M. hyopneumoniae*, nước vô trùng hoặc dung dịch nước muối đẳng trương vô trùng.

Vaccin là chế phẩm sinh học thiết lập hoặc cải thiện tính miễn dịch đối với bệnh cụ thể. Vaccin có thể là để phòng bệnh (ví dụ, để ngăn ngừa hoặc làm giảm nhẹ các tác dụng của bệnh truyền nhiễm tương lai do tác nhân gây bệnh gây ra) hoặc để điều trị bệnh (ví dụ, để điều trị bệnh truyền nhiễm). Vaccin theo khía cạnh thứ hai là để phòng bệnh do *Mycoplasma hyopneumoniae* gây ra.

Chất mang thích hợp sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết rõ và sẽ phụ thuộc phần lớn vào đường sử dụng. Vaccin có thể còn chứa một hoặc nhiều thành phần bổ sung bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, chất tạo huyền phù, chất làm ổn định và chất phân tán.

Các thành phần bổ sung khác mà có thể có mặt trong vaccin, là tá dược, chất bảo quản, chất làm ổn định hóa học hoặc các protein kháng nguyên khác. Thông thường, chất làm ổn định, tá dược và chất bảo quản được tối ưu hóa để xác định chế phẩm tốt nhất về mặt hiệu quả ở động vật đích. Các chất bảo quản thích hợp được lấy làm ví dụ bao gồm clobutanol kali sorbat, axit sorbic, lưu huỳnh dioxit, propyl galat, paraben, etyl vanilin, glyxerin, phenol và paraclophenol. Các chất làm ổn định thích hợp có thể được sử dụng bao gồm, ví dụ, axit casamino, sucroza, gelatin, đỏ phenol, N-Z amin, monokali diphosphat, lactoza, lactalbumin hydrolysat và sữa bột. Tá dược thông

thường được sử dụng để thu hút tế bào bạch cầu hoặc tăng cường đáp ứng miễn dịch. Các tá được như vậy bao gồm, ví dụ, MPL™ (3-O-deacylated monophosphoryl lipid A; RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.), dầu khoáng và nước, nhôm hydroxit, Amphigen, Avridine, L121/squalen, D-lactit-poly lactit/glycosit, pluronic polyois, muramyl dipeptit, *Bordetella* chết, saponin, như Quil A hoặc Stitiulon. TM. QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Inc., Framingham, Mass.) và độc tố tả (ở dạng kiểu đại hoặc đột biến, ví dụ, trong đó axit glutamic ở vị trí axit amin 29 được thay thế bằng axit amin khác, tốt hơn là histidin, theo đơn quốc tế số PCT/US99/22520).

Theo một phương án, vaccin khi tiêm có ít hoặc không có bất lợi hoặc phản ứng không mong muốn ở vị trí tiêm, ví dụ, kích ứng da, sưng, phát ban, hoại tử, mẫn cảm da.

Theo khía cạnh thứ tư, sáng chế đề cập đến việc ngăn ngừa bệnh do *Mycoplasma hyopneumoniae* gây ra. Vaccin theo khía cạnh thứ ba là để phòng bệnh do *Mycoplasma hyopneumoniae* gây ra.

Liệu pháp "phòng bệnh" hoặc "ngăn ngừa" theo sáng chế bao gồm việc ngăn không cho bệnh truyền nhiễm xảy ra hoặc cản trở hoặc đề phòng hoặc bảo vệ không để xảy ra hoặc tình trạng nghiêm trọng của bệnh do *Mycoplasma hyopneumoniae* gây ra, bao gồm việc ngăn ngừa, bảo vệ hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng của triệu chứng hoặc dấu hiệu của bệnh ở đối tượng có thể dẫn đến bệnh, song chưa được chẩn đoán là mắc bệnh. Thuật ngữ này cũng bao gồm việc làm giảm thời gian nhiễm bệnh hoặc tỷ lệ mắc các triệu chứng và việc làm giảm kích thước của các tổn thương bất kỳ.

"Phòng bệnh" theo sáng chế chỉ toàn bộ việc ngăn ngừa bệnh hoặc việc làm giảm mức độ hoặc các triệu chứng của bệnh. Thuật ngữ này cũng chỉ việc làm giảm hoặc ức chế sự lây truyền của *Mycoplasma hyopneumoniae* hoặc ngăn ngừa vi khuẩn thiết lập ở vật chủ hoặc bảo vệ khỏi bị nhiễm thứ cấp bởi các chủng *Mycoplasma hyopneumoniae* khác hoặc các tác nhân gây nhiễm khác.

Vaccin theo khía cạnh thứ ba có thể được bào chế để sử dụng cho lợn ở dạng, ví dụ, lỏng, bột, sol khí, viên nén, viên nang, viên nén hoặc viên nang bao tan trong ruột, hoặc thuốc đạn. Đường dùng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ngoài đường tiêu hóa, qua đường trong màng bụng, qua đường trong tĩnh mạch, qua đường trong cơ, qua đường dưới da, qua đường trong da, qua đường miệng, sử dụng khu trú, qua

đường trong mũi, qua đường trong phổi, qua đường trực tràng, qua đường âm đạo, và đường tương tự.

Theo phương án được ưu tiên, vaccin được bào chế để sử dụng cho đường hô hấp, ví dụ, bằng cách sử dụng qua đường trong mũi, sử dụng sol khí hoặc sử dụng bằng cách xông bằng miệng hoặc mũi. Đường sử dụng này được ưu tiên do bản chất của tính miễn dịch bảo vệ đối với *Mycoplasma hyopneumonia* có thể là tính miễn dịch khu trú (phổi) và tính miễn dịch qua trung gian tế bào trong quá trình ngăn ngừa bệnh mà không phải từ kháng thể tuần hoàn. Sự có mặt của vaccin ở đường hô hấp có thể kích thích đáp ứng miễn dịch khu trú. Do đó, việc sử dụng khu trú vaccin này có thể là hữu hiệu hơn. Hơn nữa, việc sử dụng vaccin trong khoang hoặc không gian kín (sử dụng khối phun thô) và cho lợn hít nó sẽ làm giảm sức lao động liên quan đến việc tiêm chủng cho số lượng lớn con vật. Việc chủng ngừa bằng sol khí (hoặc chủng ngừa bằng hạt phun mù) hiện được sử dụng trên cơ sở thương mại để chủng ngừa hữu hiệu cho gia cầm ngăn ngừa một số bệnh và đã được trình bày trong các ví dụ của các tác giả sáng chế là thích hợp để tiêm chủng cho lợn.

Sử dụng qua đường trong mũi chỉ việc sử dụng bất kỳ thông qua đường mũi hoặc mõm. Vaccin có thể được sử dụng trong khoang mũi dưới dạng dung dịch, hỗn dịch hoặc bột khô. Các dung dịch và hỗn dịch có thể được sử dụng qua đường trong mũi, ví dụ, bằng cách sử dụng pipet, ống nhỏ giọt hoặc bình xịt, tùy ý bình xịt sol khí.

Sử dụng sol khí chỉ việc sử dụng vaccin ở dạng hỗn dịch chứa các hạt chất rắn mịn hoặc các giọt chất lỏng trong khí.

Xông (còn gọi là hít) là sự chuyển động của không khí từ môi trường bên ngoài, theo đường hô hấp, và vào các phế nang trong phổi.

Liều hữu hiệu của vaccin cần sử dụng để điều trị sẽ phụ thuộc vào, ví dụ, đối tượng điều trị, đường sử dụng và tình trạng bệnh của lợn.

Liều lượng của vaccin thường nằm trong khoảng từ  $10^4$  đến  $10^8$  đơn vị thay đổi màu (colour changing unit: CCU)/mL/liều, và tốt hơn là nằm trong khoảng từ  $10^5$  đến  $10^7$  CCU/mL/liều.

Tuy nhiên, cần phải hiểu rằng liều cụ thể đối với lợn cụ thể bất kỳ sẽ phụ thuộc vào nhiều yếu tố bao gồm hoạt tính của hợp chất cụ thể được sử dụng, độ tuổi, thể trọng, sức khỏe chung, giới tính, chế độ ăn, thời gian sử dụng và đường sử dụng.

Việc chọn và việc điều chỉnh tăng hoặc giảm liều hữu hiệu là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Theo phương án được ưu tiên, vaccin được sử dụng qua đường trong mũi, bằng sol khí hoặc bằng cách xông.

Thuật ngữ "lợn" theo sáng chế chỉ lợn con, lợn nái, lợn cái con, lợn thiên, lợn đực và các thành viên của họ Suidae.

Theo sáng chế, trừ khi có quy định khác, thuật ngữ "bao gồm" cần được hiểu là bao hàm yếu tố hoặc số nguyên hoặc nhóm các yếu tố hoặc các số nguyên được đề cập mà không loại trừ yếu tố hoặc số nguyên hoặc nhóm các yếu tố hoặc các số nguyên khác bất kỳ.

Cũng cần phải lưu ý rằng, theo sáng chế, trừ khi có quy định khác, các dạng số ít cũng bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi có quy định rõ ràng theo cách khác.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng hiểu rằng mặc dù sáng chế được mô tả chi tiết để hiểu rõ hơn, song các thay đổi và sửa đổi đối với các phương án và các các phương pháp được mô tả ở đây có thể được tiến hành mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này.

Sáng chế được mô tả chi tiết hơn dựa vào ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây. Ví dụ này được đề cập chỉ nhằm mục đích minh họa, và không được hiểu là làm giới hạn sáng chế trừ khi có quy định cụ thể. Do đó, sáng chế bao gồm thay đổi bất kỳ hoặc toàn bộ các thay đổi mà là hiển nhiên như kết quả thu được từ phần bộc lộ được đề cập trong sáng chế.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

Ví dụ 1: Tạo chủng vaccin

Chủng phân lập *Mycoplasma hyopneumoniae* Úc LKR là mẫu lò mổ của phổi lợn biểu hiện bệnh viêm phổi địa phương điển hình (Lloyd and Etheridge (1981), J. Comp. Path. 91:77-83). Chủng phân lập này được nuôi cấy và bảo quản tại bộ phận thu mẫu nuôi cấy đối chiếu *Mycoplasma* thuộc Đại học Adelaide, Nam Úc. Tiếp theo, chủng nuôi cấy của chủng phân lập này được thu bởi nhóm *Mycoplasma* tại Đại học Melbourne, Victoria.

Chúng nuôi cấy này được cấy chuyển *in vitro* ba lần trước khi gây đột biến bằng cách sử dụng N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG) ở 200mg/mL bằng phương pháp được mô tả trước đó (Nonamura and Imada (1982) Avian Diseases 26:763-775). Nói vắn tắt, chúng nuôi cấy của chủng *M. hyopneumoniae* LKR được sinh trưởng tới pha logarit muộn và làm lắng cặn bằng cách ly tâm. Tế bào được rửa trong nước muối đệm phosphat (phosphat buffered saline: PBS) và cho tiếp xúc với NTG. Tế bào được lắng cặn và tạo huyền phù lại trong môi trường Friis cải biến (Friis, N. F. 1975) và ủ ở 33°C trong 4 giờ. Tiếp theo, chúng nuôi cấy được chuyển qua màng lọc có kích thước lỗ lọc bằng 0,45µm, tạo ra các dung dịch pha loãng thích hợp và đặt các phần mẫu lên các đĩa thạch và ủ ở 33°C. Các khuẩn lạc đã sinh trưởng được tách dòng trong 3ml canh thang và ủ ở 33°C. Các ống chứa các dòng này được bảo quản ở -70°C và tính miễn cảm với nhiệt độ của mỗi dòng được xác định.

Tính miễn cảm với nhiệt độ của ts19 được xác định bằng cách tiến hành hai lần chuẩn độ và ủ ở 33°C và 39,5°C. Hiệu giá thường >1 x 10<sup>8</sup> CCU/mL ở 33°C và <1 x 10<sup>2</sup> CCU/mL ở 39,5°C.

Chúng ts19 được nộp lưu theo Hiệp ước Budapest với số lưu giữ NM 04/41259.

Chúng ts19 và chủng LKR được giải trình tự bằng các kỹ thuật chuẩn, do đó xác định được tính di truyền của chủng giảm độc lực. Chúng ts19 được phát hiện là chứa nhiều đột biến di truyền so với chủng gốc của nó và các gen chứa các đột biến này được nêu trong bảng 1.

Ví dụ 2 : Bào chế vaccin

Để bào chế vaccin, chúng nuôi cấy ts19 được sinh trưởng ở 33°C trong môi trường Friis cải biến chứa đỏ phenol (chất chỉ thị độ pH) cho đến khi quan sát thấy sự đổi sang màu axit. Vaccin được chuẩn độ trong môi trường Friis cải biến bằng cách sử dụng đĩa vi chuẩn độ có 96 giếng. Loạt pha loãng 10 lần được thực hiện đối với 10 cột đầu tiên trong số 12 cột của đĩa vi chuẩn độ. Hai lần cuối vẫn không được cấy và đóng vai trò đối chứng (âm tính) chỉ có môi trường. Sử dụng tối đa 6 đĩa vi chuẩn độ trong mỗi lần chuẩn độ.

Sau khi tối đa 3 tuần, các đĩa được tính điểm về sự chuyển màu và hiệu giá trung bình được xác định bằng cách sử dụng số xác suất lớn nhất (most probably number:

MPN). Hiệu giá trung bình cuối cùng được thể hiện dưới dạng đơn vị chuyển màu (CCU)/mL.

Chủng vaccin ts19 được bảo quản trong thời gian dài dưới dạng "đông ướt" ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -70 đến -80°C. Theo cách khác, chủng vaccin ts19 được làm đông khô (làm khô ở nhiệt độ thấp) và bảo quản trong thời gian dài ở -20°C.

Ví dụ 3: Nghiên cứu về độ an toàn và tạo khuẩn lạc của vaccin

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá profin an toàn của chủng vaccin ts19. Thiết kế nghiên cứu bao gồm việc sử dụng các con lợn 6 tuần tuổi từ đàn lợn không có *Mycoplasma*. Nghiên cứu này được thực hiện ở cấp độ an toàn sinh học PC2 tại CSIRO (Commonwealth Serum Industry Research Organisation), Werribee, Victoria, Úc. Tổng số 20 con được chia ngẫu nhiên thành hai nhóm với mỗi nhóm 10 con (xem Bảng 2).

Bảng 2: Nghiên cứu độ an toàn của chủng vaccin ts19

Nhóm	Mục đích	Số lợn được điều trị bằng môi trường <i>M. hyopneumonia</i> vào ngày đầu tiên của thử nghiệm	Số lợn được tiêm chủng bằng ts19 (CCU/liều) vào ngày đầu tiên của thử nghiệm	Tổng số lợn/nhóm
1	Giả tiêm chủng (đối chứng âm tính)	10	---	10
2	Độ an toàn (quá liều cao)	---	10	10
Tổng số				20

Vaccin được phân phối qua đường trong mũi chỉ để thử nghiệm độ an toàn đối với sự có mặt của vaccin ở niêm mạc. Nhóm 1 (đối chứng không được tiêm chủng) và nhóm 2 (lợn được tiêm chủng quá liều cao) được nhốt trong 59 ngày để quan sát lâm sàng (bảng 2).

Tất cả các con lợn trong nghiên cứu về độ an toàn này đều được theo dõi hai lần/ngày về nhiệt độ cơ thể qua trực tràng bắt đầu một ngày trước tiêm chủng cũng như bốn ngày sau tiêm chủng. Tất cả các con lợn cũng được theo dõi về các dấu hiệu hô hấp bao gồm cả ho, hắt hơi, khó thở và thở gấp. Tất cả các con lợn đều được đánh giá về các tổn thương phổi hiển vi và đại thể. Các tổn thương phổi đại thể được tính

điểm bằng cách sử dụng phương pháp của Hannan và các đồng tác giả, 1982. Ngoài ra, các mẫu gạc được lấy từ mũi, phổi và khí quản để phân tích PCR.

Các con lợn từ mỗi nhóm cũng được kiểm tra 3 tuần sau tiêm chủng về sự có mặt của *M. hyopneumoniae* trong khoang mũi của chúng bằng kỹ thuật PCR. Cuối cùng, lợn được theo dõi về sự tăng trọng trong khoảng thời gian nghiên cứu. Kết quả cho thấy rằng không thấy có dấu hiệu lâm sàng ở lợn bất kỳ. Không có sự gia tăng đáng kể về nhiệt độ giữa nhóm được tiêm chủng và nhóm đối chứng không được tiêm chủng. Hơn nữa, không thấy có khác biệt đáng kể về sự tăng trọng giữa nhóm được tiêm chủng và nhóm đối chứng không được tiêm chủng. Khi mổ khám nghiệm, hai trong số mười con lợn từ mỗi nhóm dùng quá liều cao có tổn thương đại thể nhỏ đặc trưng của bệnh viêm phổi địa phương. Không có tổn thương nào khác khi phân tích hiển vi mô phổi. Nói chung, chủng vaccin miễn cảm với nhiệt độ ts19 được chứng minh là an toàn ngay cả quá liều cao.

Phân tích PCR (bằng cách sử dụng các đoạn môi đặc hiệu với *M. hyopneumonia*) cho thấy sự có mặt của *M. hyopneumonia* trong đường mũi của lợn được tiêm chủng ở thời điểm 3 tuần và 8 tuần sau tiêm chủng (xem Fig.1). Các nghiên cứu về việc tạo khuẩn lạc *M. hyopneumonia* bằng phương pháp phân tích PCR cũng cho thấy sự có mặt của *M. hyopneumonia* trong khí quản (ở các vùng trên, giữa và dưới) và nói chung là ở ít nhất 60% khí quản của lợn được tiêm chủng (xem Fig.2). Các kết quả này chỉ ra việc tạo khuẩn lạc của chủng vaccin ts19 ở đường mũi và khí quản.

Ví dụ 4: Mô hình thử nghiệm nghiên cứu hiệu quả của vaccin - chứng tỏ sự ngăn ngừa

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá hiệu quả của chủng vaccin ts19. Thiết kế nghiên cứu bao gồm việc sử dụng các con lợn 6 tuần tuổi thu được từ đàn lợn không có *Mycoplasma*. Nghiên cứu này được thực hiện theo cấp độ an toàn sinh học PC2 tại CSIRO (Commonwealth Serum Industry Research Organisation), Werribee, Victoria, Úc. Tổng cộng 56 con lợn được chia ngẫu nhiên thành ba nhóm với mỗi nhóm được tiêm chủng 12 con và mỗi nhóm đối chứng 10 con (xem bảng 3).

Bảng 3: Nghiên cứu về hiệu quả của vaccin ts19

Nhóm	Mục đích	Số lợn được điều trị bằng môi trường <i>M. hyopneumonia</i>	Tiêm chủng bằng ts19 vào ngày đầu tiên của thử nghiệm	Số lợn được thử chủng phân lập thực địa úc vào ngày 22 của thử	Tổng số lợn/nhóm
------	----------	---	---	--	------------------



		vào ngày đầu tiên của thử nghiệm	(CCU/liều)	nghiệm	
1	Giả tiêm chủng (đối chứng âm tính)	10	---	---	10
2	Hiệu quả	---	$10^6$	12	12
3	Hiệu quả	---	$10^7$	12	12
4	Hiệu quả	---	$10^8$	12	12
5	Không được tiêm chủng (đối chứng dương tính)	---	---	10	10
Tổng số					56

Vacxin được phân phối qua đường trong mũi chỉ để thử nghiệm độ an toàn đối với sự có mặt của vacxin ở niêm mạc. Tất cả các nhóm, ngoại trừ nhóm âm tính không được thử, không được tiêm chủng, được thử ở thời điểm 22 ngày sau tiêm chủng bằng cách sử dụng qua đường trong mũi chủng phân lập thực địa Úc của *M. hyopneumoniae*. Các xét nghiệm sau tử vong được thực hiện trong 3 ngày (các ngày 57, 58 và 59 sau tiêm chủng). Trong suốt quá trình nghiên cứu, tất cả các nhóm đều được theo dõi hằng ngày về các dấu hiệu lâm sàng bao gồm cả ho, hắt hơi, khó thở và thở gấp. Thể trọng được đo khi bắt đầu và kết thúc nghiên cứu.

Vào thời điểm 22 ngày sau tiêm chủng (và trước khi thử), gạc ở mũi được lấy để phân tích PCR để xác định sự có mặt của *M. hyopneumonia* từ mỗi nhóm.

Kết quả cho thấy rằng không thấy có dấu hiệu lâm sàng và không có khác biệt đáng kể về sự tăng trọng ở tất cả các nhóm được thử nghiệm. Phân tích gạc ở mũi cho thấy sự có mặt của *M. hyopneumoniae* ở thời điểm 22 ngày sau tiêm chủng ở 60-70% số lợn được tiêm chủng trước khi thử (xem Fig.3). Tất cả các con lợn đối chứng giả tiêm chủng đều âm tính với *M. hyopneumoniae* theo phân tích PCR. Khi mổ khám nghiệm, phân tích tổn thương đại thể (Hannan et al., 1982) cho thấy không có tổn thương ở nhóm đối chứng giả tiêm chủng cũng như các nhóm được tiêm chủng ở  $10^6$  và  $10^7$  CCU/mL/liều. Một trong số 10 con lợn được tiêm chủng ở  $10^8$  CCU/mL/liều có tổn thương đại thể nhỏ. Tuy nhiên, 4 trong số 10 con lợn không được tiêm chủng song được thử lại có các dấu hiệu lâm sàng ho và hắt hơi. Khi mổ khám nghiệm, xét nghiệm

phổi từ 4 con lợn này cho thấy có các tổn thương phổi đại thể điển hình của sự lây nhiễm *M. hyopneumonia*.

Nói chung, chủng vaccin mẫn cảm với nhiệt độ ts19 được chứng minh là hữu hiệu để ngăn ngừa bệnh nhiễm *My. hyopneumonia*.

Ví dụ 5: Hiệu quả của vaccin ở các liều khác nhau và so sánh với vaccin chết trên thị trường

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá hiệu quả của chủng vaccin ts19 ở 4 liều khác nhau. Thiết kế nghiên cứu bao gồm việc sử dụng lợn spf 3-4 tuần tuổi. Nghiên cứu này được thực hiện ở khoa PC2 của Centro de Nacional de Servicios de Diagnostico en Salud Animal (CENASA) - khoa xét nghiệm của chính phủ ở Tecamac, Mexico. Tổng số 70 con lợn được chia ngẫu nhiên thành 7 nhóm với mỗi nhóm gồm 10 con (bảng 4).

Bảng 4: Liều ngăn ngừa tối thiểu và nghiên cứu về hiệu quả tương đối

Nhóm	Mục đích	Liều vaccin ccu/ml/liều	Số lợn được tiêm chủng	Số lợn được thử	Tổng số lợn/nhóm
1	Giả đối chứng	NA	0	0	10
2	Ts19 <sup>a</sup>	10 <sup>3,0</sup>	10	10	10
3	Ts19 <sup>a</sup>	10 <sup>4,0</sup>	10	10	10
4	Ts19 <sup>a</sup>	10 <sup>5,0</sup>	10	10	10
5	Ts19 <sup>a</sup>	10 <sup>6,0</sup>	10	10	10
6	Vaccin bất hoạt trên thị trường <sup>b</sup>	2ml	10	10	10
7	Đối chứng dương tính	NA	0	10	10
Tổng số	NA	NA	50	50	70

<sup>a</sup>Vaccin được phân phối bằng cách xịt trong mũi

<sup>b</sup>Vaccin được phân phối bằng cách sử dụng trong cơ

Bốn liều khác nhau của vaccin ts19 (10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> CCU/mL) được phân phối cho 4 nhóm lợn riêng biệt qua đường trong mũi. Nhóm thứ năm tiếp nhận 2ml vaccin bất hoạt trên thị trường qua đường trong cơ. Các nhóm dương tính (không được tiêm chủng nhưng được thử) và âm tính (không được tiêm chủng, không được thử) cũng được đưa vào nghiên cứu này. Tất cả các nhóm ngoại trừ nhóm đối chứng âm tính đều được thử ở hai thời điểm. Lần thử thứ nhất được thực hiện ở thời điểm 22 ngày sau

tiêm chủng qua đường trong mũi bằng cách sử dụng chủng phân lập *M. hyopneumoniae* Mỹ (chủng IOWA 194). Lần thử thứ hai được thực hiện ở thời điểm 84 ngày sau tiêm chủng bằng cách sử dụng cùng chủng đã thử. Trong suốt quá trình nghiên cứu, tất cả các nhóm đều được theo dõi hàng ngày về các dấu hiệu lâm sàng bao gồm cả ho, hắt hơi, khó thở và thở gấp. Thể trọng được đo khi bắt đầu và kết thúc nghiên cứu.

Các kết quả cho thấy rằng không có dấu hiệu lâm sàng trong suốt thời gian thử nghiệm 105 ngày. Phân tích phương sai thể trọng giữa nhóm đối chứng dương tính và mỗi nhóm trong số các nhóm được tiêm chủng đã chỉ ra rằng ts19 ở các liều  $10^5$  và  $10^6$  CCU/mL làm tăng đáng kể thể trọng so với nhóm đối chứng dương tính (Fig.4). Nhóm được tiêm chủng bằng vacxin trên thị trường không có khác biệt đáng kể về sự tăng trọng so với nhóm đối chứng dương tính (Fig.4, Bảng 5). Khi mổ khám nghiệm, việc phân tích tổn thương đại thể được thực hiện đối với mỗi nhóm. Tiêu chuẩn để xác định liều ngăn ngừa tối thiểu là trên cơ sở chỉ số ngăn ngừa (PI)  $\geq 70\%$  là làm giảm mức độ nghiêm trọng của tổn thương phổi. Liều ngăn ngừa tối thiểu đối với ts19 được xác định là  $10^4$  CCU/mL do chỉ số ngăn ngừa 70% đạt được ở liều này là làm giảm mức độ nghiêm trọng của tổn thương phổi (Fig.5). Liều cao hơn của ts19 ( $10^5$  và  $10^6$  CCU/mL) cũng được thử nghiệm và được nhận thấy là lần lượt có PI 83% và 88% trong việc làm giảm mức độ nghiêm trọng của tổn thương phổi (Fig.6). Vacxin bất hoạt thương mại tạo ra PI chỉ có 37%, thấp hơn cả liều thấp nhất của ts19 được sử dụng ( $10^3$  CCU/mL tạo ra PI 60%).

Bảng 5. Phân tích phương sai mức tăng trọng trung bình của các nhóm được tiêm chủng so với nhóm đối chứng dương tính đối với DPV-104/105

Nhóm	Điều trị	Phân tích phương sai (P) so với đối chứng dương tính
1	Đối chứng âm tính	0,001
2	ts19 $10^{3,0}$	0,394
3	ts19 $10^{4,0}$	0,175
4	ts19 $10^{5,0}$	0,033
5	ts19 $10^{6,0}$	0,004
6	Vacxin trên thị trường	0,315

7	Đối chứng dương tính	NA
---	----------------------	----

Các liều ts19 (ccu/mL). Không khác biệt đáng kể ( $P>0,05$ ), khác biệt đáng kể ( $P<0,05$ ).

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm vacxin chứa tá dược cùng với chủng *Mycoplasma hyopneumoniae* được nộp lưu tại Viện đo lường quốc gia Úc (National Measurements Institute, Australia) với số lưu giữ NM04/41259, chủng này là miễn cảm với nhiệt độ và được giảm độc lực, được tạo ra bằng cách gây đột biến hóa học chủng ban đầu thích hợp của *Mycoplasma hyopneumoniae* và chọn lọc chủng đột biến miễn cảm với nhiệt, nhưng vẫn có khả năng sống sau loạt cấy chuyển *in vitro*, trong đó chế phẩm vacxin này với lượng gây miễn dịch có khả năng tạo ra tính miễn dịch ngăn ngừa bệnh do *Mycoplasma hyopneumoniae* gây ra.

2. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó chủng vacxin *Mycoplasma hyopneumoniae* này còn chứa đột biến ở ít nhất một gen được chọn từ nhóm bao gồm: protein màng ngoài giả định P95, lipoprotein giả định MHJ\_0213, lipoprotein giả định MHJ\_0362, protein bề mặt P216 giả định, protein kiểu kết dính giả định P146, triosephosphat isomeraza, transketolaza, thành phần ABC đặc hiệu với N-acetylglucosamin II của hệ PTS giả định, CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphat-3-phosphatidyl transferaza, nicotinat phosphoribosyltransferaza, gen GidA (enzym cải biến uridin 5-carboxymethylaminometyl của ARN vận chuyển), protein L3 của ribosom 50S, leuxyl-tARN synthetaza, isoleuxyl tARN synthetaza, protein permeaza vận chuyển ABC giả định, protein liên kết với ATP vận chuyển ABC giả định, protein vận chuyển cromat giả định, protein permeaza và liên kết với ATP vận chuyển ABC giả định, thành phần protein nội màng translocaza giả định YidC, protein permeaza giống p69 của hệ vận chuyển ABC giả định, protein permeaza vận chuyển ABC giả định, Pr1 liên kết với ATP vận chuyển ABC giả định, ADN topoisomeraza I, uraxil-ADN glycosylaza, GTPaza ObgE, ADN polymeraza IV, cấu trúc dưới phân tử alpha của ribonucleotit-disulphat reductaza, thymidylat kinaza, cấu trúc dưới phân tử delta của ADN polymeraza III, ADN ligaza, cấu trúc dưới phân tử A của ADN gyraza, ribonucleaza HII, pyrophosphataza vô cơ, cấu trúc dưới phân tử C của excinucleaza ABC và transposaza ISMHp1 giả định.

3. Chế phẩm vacxin theo điểm 1, trong đó chủng vacxin *Mycoplasma hyopneumoniae* còn chứa các đột biến ở tất cả các gen sau đây: protein màng ngoài giả định P95, lipoprotein giả định MHJ\_0213, lipoprotein giả định MHJ\_0362, protein bề mặt P216 giả định, protein kiểu kết dính giả định P146, triosephosphat isomeraza, transketolaza,

thành phần ABC đặc hiệu với N-axetylglucosamin II của hệ PTS giả định, CDP-diacylglycerol-glycerol-3-phosphat-3-phosphatidyl transferaza, nicotinat phosphoribosyltransferaza, gen *GidA* (enzym cải biến uridin 5-carboxymethylaminometyl của ARN vận chuyển), protein L3 của ribosom 50S, leuxyl-tARN synthetaza, isoleuxyl tARN synthetaza, protein permeaza vận chuyển ABC giả định, protein liên kết với ATP vận chuyển ABC giả định, protein vận chuyển cromat giả định, protein permeaza và liên kết với ATP vận chuyển ABC giả định, thành phần protein nội màng translocaza giả định *YidC*, protein permeaza giống p69 của hệ vận chuyển ABC giả định, protein permeaza vận chuyển ABC giả định, Pr1 liên kết với ATP vận chuyển ABC giả định, ADN topoisomeraza I, uraxil-ADN glycosylaza, GTPaza *ObgE*, ADN polymeraza IV, cấu trúc dưới phân tử alpha của ribonucleotit-disulphat reductaza, thymidylat kinaza, cấu trúc dưới phân tử delta của ADN polymeraza III, ADN ligaza, cấu trúc dưới phân tử A của ADN gyraza, ribonucleaza HII, pyrophosphataza vô cơ, cấu trúc dưới phân tử C của excinucleaza ABC và transposaza *ISMHp1* giả định.

4. Chủng vaccin *Mycoplasma hyopneumoniae* được nộp lưu tại Viện đo lường quốc gia (Úc) với số lưu giữ NM04/41259, chủng này là miễn cảm với nhiệt độ và được giảm độc lực.

5. Chế phẩm vaccin chứa chủng *Mycoplasma hyopneumoniae* theo điểm 4, trong đó vaccin này với lượng gây miễn dịch có khả năng kích thích tính miễn dịch bảo vệ chống lại bệnh do *Mycoplasma hyopneumonia* gây ra.

6. Chế phẩm vaccin theo điểm 5, trong đó vaccin này còn chứa tác nhân gây nhiễm được chọn từ nhóm bao gồm virus, vi khuẩn, nấm hoặc ký sinh trùng.

7. Chế phẩm vaccin theo điểm 5, trong đó chế phẩm này ở dạng chế phẩm sol khí.

8. Chế phẩm vaccin theo điểm 5, trong đó vaccin có mặt với lượng gây miễn dịch có hiệu quả kháng bệnh viêm phổi địa phương hoặc bệnh viêm phổi do mycoplasma ở lợn.

9. Chế phẩm vaccin chứa chất mang cùng với chủng *Mycoplasma hyopneumoniae* theo điểm 4, trong đó vaccin này với lượng gây miễn dịch có khả năng kích thích tính miễn dịch bảo vệ chống lại bệnh do *Mycoplasma hyopneumonia* gây ra.

10. Chế phẩm vacxin theo điểm 9, trong đó chế phẩm này còn chứa tác nhân gây nhiễm được chọn từ nhóm bao gồm virus, vi khuẩn, nấm hoặc ký sinh trùng.

11. Chế phẩm vacxin theo điểm 9, trong đó chế phẩm này ở dạng chế phẩm sol khí.

12. Phương pháp sản xuất vacxin theo điểm 5, trong đó phương pháp này bao gồm bước kết hợp chủng *Mycoplasma hyopneumoniae* theo điểm 4 với chất mang, tá dược hoặc tác nhân gây nhiễm.

13. Chủng vacxin *Mycoplasma hyopneumoniae* theo điểm 4, trong đó chủng này còn chứa đột biến ở ít nhất một gen được chọn từ protein màng ngoài giả định P95, lipoprotein giả định MHJ\_0213, lipoprotein giả định MHJ\_0362, protein bề mặt giả định P216, protein kiểu kết dính giả định P146, triosephosphat isomeraza, transketolaza, thành phần ABC đặc hiệu với N-axetylglucosamin II của hệ PTS giả định, CDP-diaxylglycerol-glycerol-3-phosphat-3-phosphatidyal transferaza, nicotinat phosphoribosyltransferaza, gen *GidA* (enzym cải biến uridin 5-carboxymethylaminometyl của ARN vận chuyển), protein L3 của ribosom 50S, leuxyl-tARN synthetaza, isoleuxyl tARN synthetaza, protein permeaza vận chuyển ABC giả định, protein liên kết với ATP vận chuyển ABC giả định, protein vận chuyển cromat giả định, protein permeaza và liên kết với ATP vận chuyển ABC giả định, thành phần protein nội màng translocaza giả định *YidC*, protein permeaza giống p69 của hệ vận chuyển ABC giả định, protein permeaza vận chuyển ABC giả định, *Pr1* liên kết với ATP vận chuyển ABC giả định, ADN topoisomeraza I, uraxil-ADN glycosylaza, GTPaza *ObgE*, ADN polymeraza IV, cấu trúc dưới phân tử alpha của ribonucleotit-disulphat reductaza, thymidylat kinaza, cấu trúc dưới phân tử delta của ADN polymeraza III, ADN ligaza, cấu trúc dưới phân tử A của ADN gyraza, ribonucleaza HII, pyrophosphataza vô cơ, cấu trúc dưới phân tử C của excinucleaza ABC và transposaza *ISMHp1* giả định.

14. Chủng vacxin *Mycoplasma hyopneumoniae* theo điểm 4, trong đó chủng này còn chứa đột biến ở tất cả các gen sau: protein màng ngoài giả định P95, lipoprotein giả định MHJ\_0213, lipoprotein giả định MHJ\_0362, protein bề mặt P216 giả định, protein kiểu kết dính giả định P146, triosephosphat isomeraza, transketolaza, thành phần ABC đặc hiệu với N-axetylglucosamin II của hệ PTS giả định, CDP-diaxylglycerol-glycerol-3-phosphat-3-phosphatidyal transferaza, nicotinat

phosphoribosyltransferaza, gen GidA (enzym cải biến uridin 5-carboxymethylaminometyl của ARN vận chuyển), protein L3 của ribosom 50S, leuxyl-tARN synthetaza, isoleuxyl tARN synthetaza, protein permeaza vận chuyển ABC giả định, protein liên kết với ATP vận chuyển ABC giả định, protein vận chuyển cromat giả định, protein permeaza và liên kết với ATP vận chuyển ABC giả định, thành phần protein nội màng translocaza giả định YidC, protein permeaza giống p69 của hệ vận chuyển ABC giả định, protein permeaza vận chuyển ABC giả định, Pr1 liên kết với ATP vận chuyển ABC giả định, ADN topoisomeraza I, uraxil-ADN glycosylaza, GTPaza ObgE, ADN polymeraza IV, cấu trúc dưới phân tử alpha của ribonucleotit-disulphat reductaza, thymidylat kinaza, cấu trúc dưới phân tử delta của ADN polymeraza III, ADN ligaza, cấu trúc dưới phân tử A của ADN gyraza, ribonucleaza HII, pyrophosphataza vô cơ, cấu trúc dưới phân tử C của excinucleaza ABC và transposaza ISMHpl giả định.



Fig.1

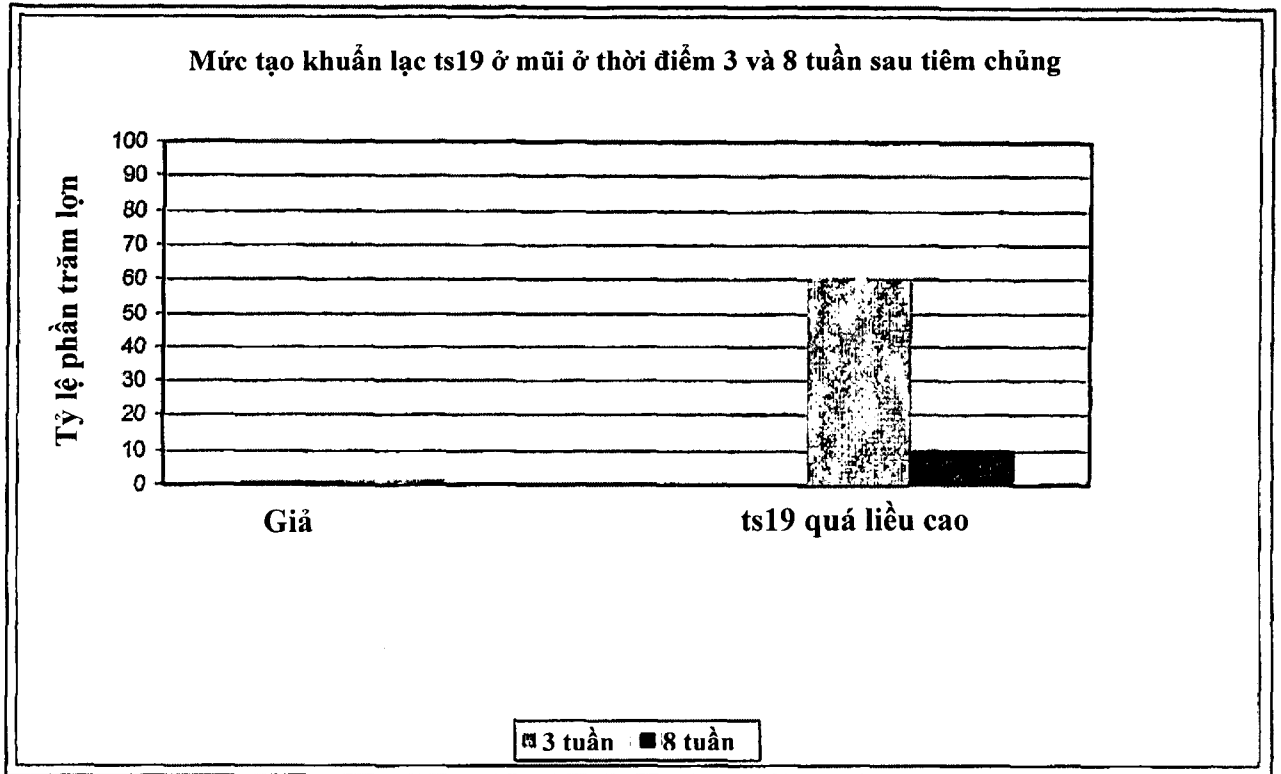
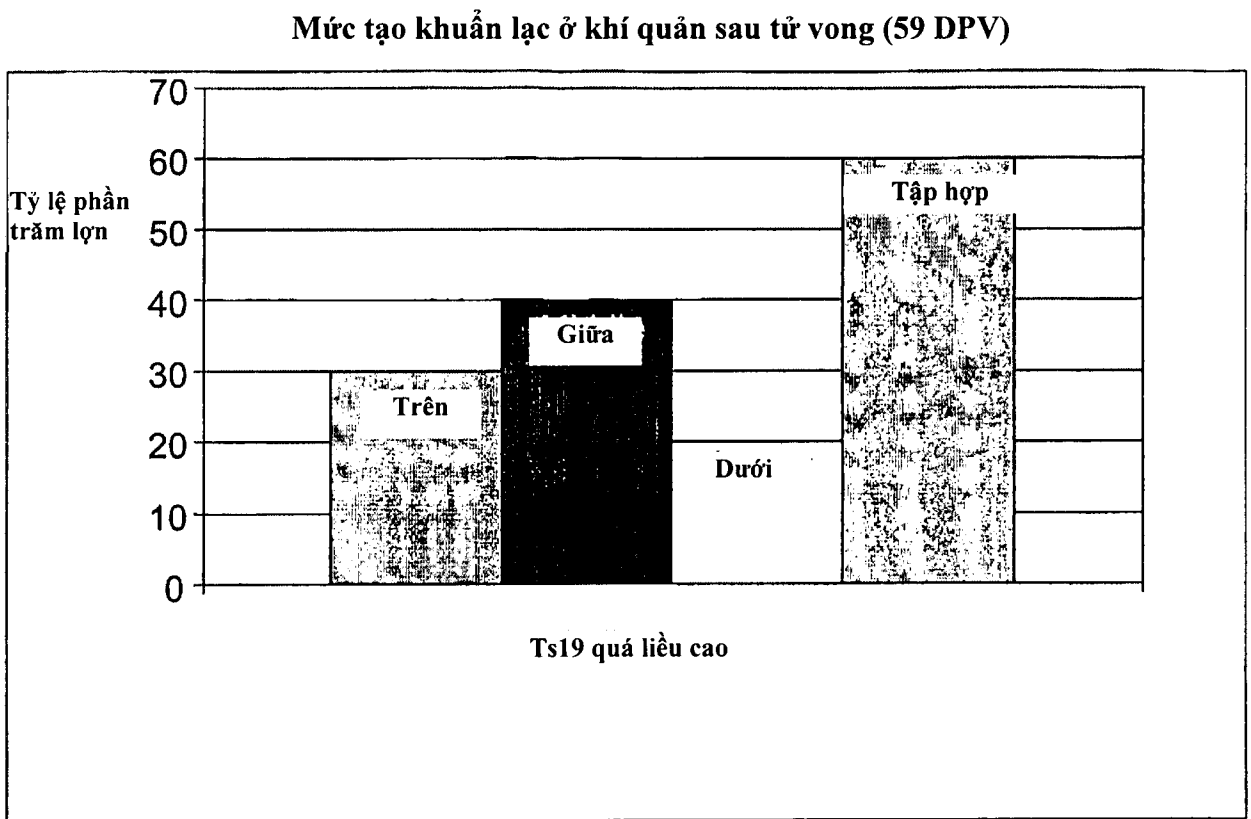


Fig.2



**Fig.3**

Mức tạo khuẩn lạc ts19 ở mũi ở thời điểm 3 tuần sau tiêm chủng

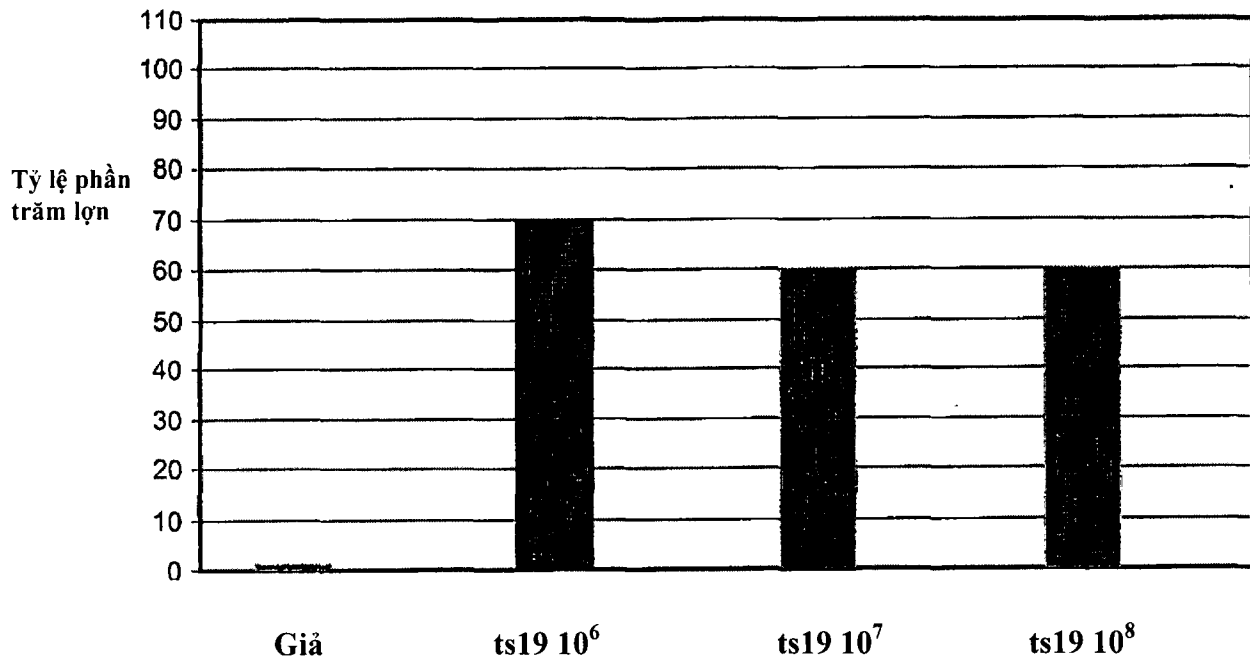


Fig.4

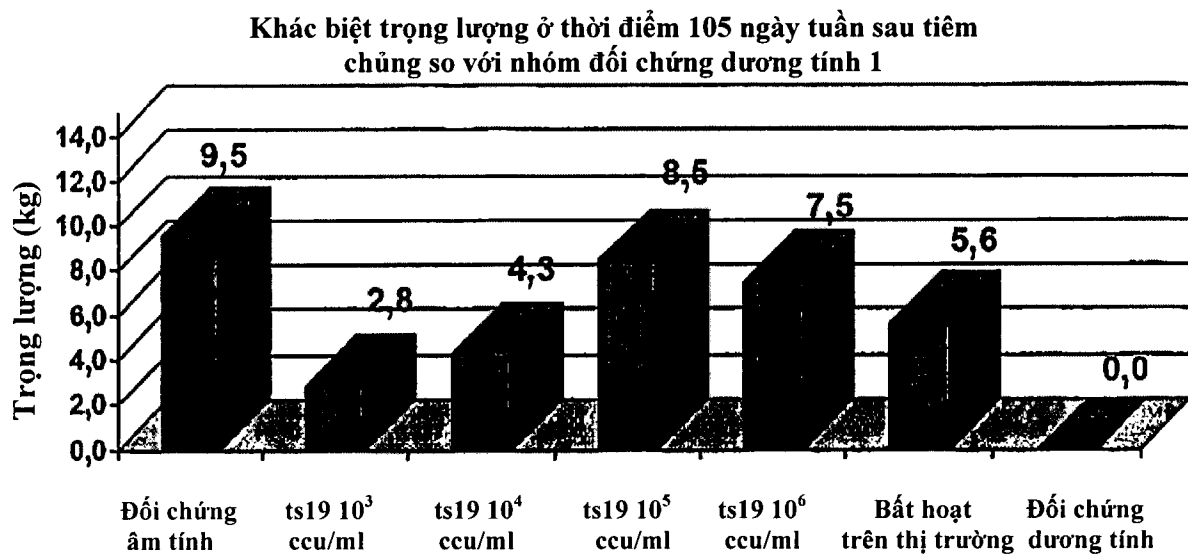


Fig.5

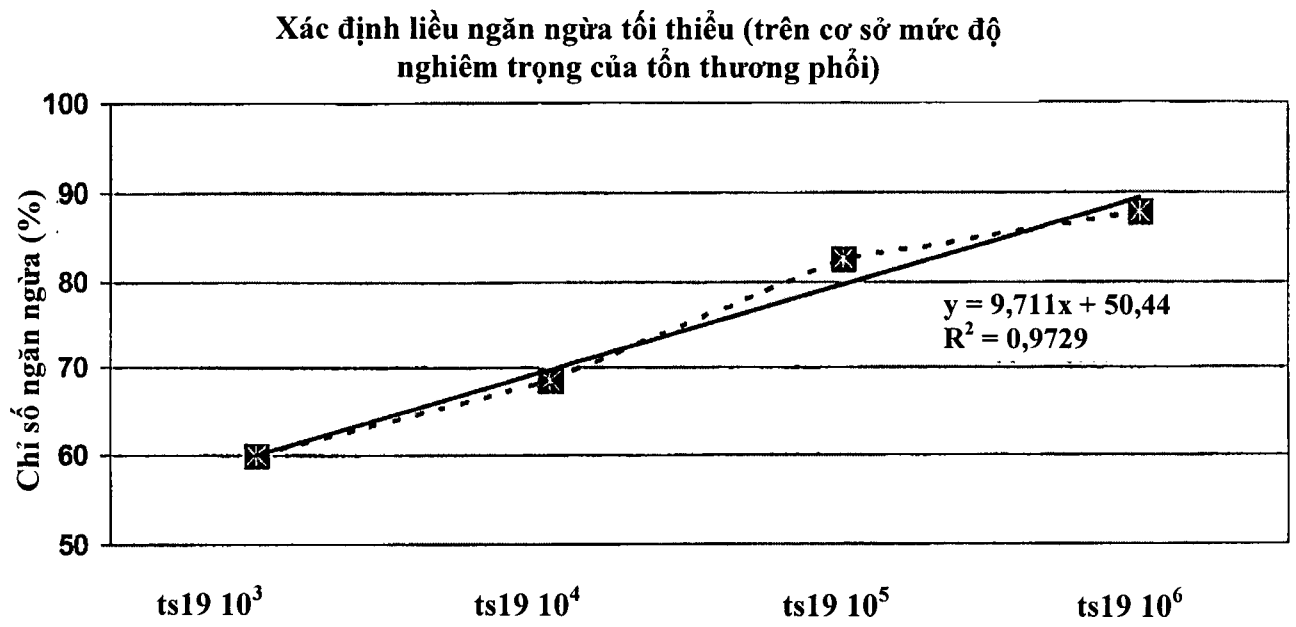


Fig.6

