



(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)



1-0029370

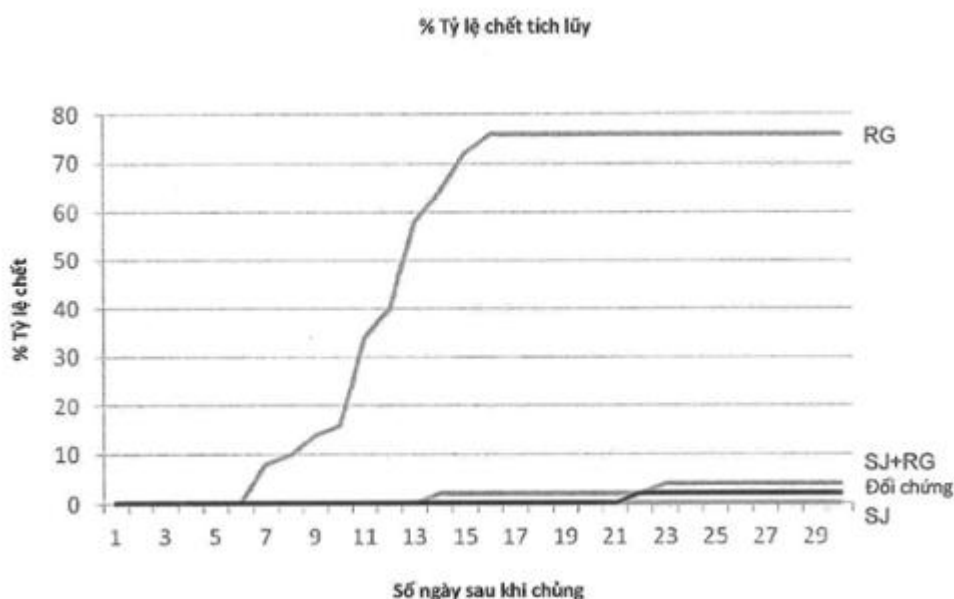
(51)⁷ A61K 39/12

(13) B

- (21) 1-2015-04515 (22) 26/05/2014
(86) PCT/EP2014/060852 26/05/2014 (87) WO2014/191363 04/12/2014
(30) 13169591.8 28/05/2013 EP; 13169590.0 28/05/2013 EP
(45) 25/09/2021 402 (43) 25/05/2016 338A
(73) Elanco Tiergesundheit AG (CH)
Mattenstrasse 24A, 4058 Basel, Switzerland
(72) BORREGO, Juan Jose (ES); CARBALLO PEREZ, Carlos (ES); DEL CARMEN
ALONSO, Maria (ES); GARCIA-ROSADO, Esther (ES); LOPEZ-JIMENA,
Benjamin (ES); RODRIGUEZ, Jose F. (CA).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) VACXIN CHỨA VIRUT GÂY HOẠI TỬ THẦN KINH CÁ MĂNG SỌC (SJNNV)

(57) Sáng chế đề cập đến virus gây bệnh hoại tử thần kinh cá măng sọc (SJNNV) dùng để bảo vệ cá chống lại bệnh liên quan đến việc nhiễm virus gây hoại tử thần kinh cá mú chấm đỏ (RGNNV) và vacxin để xử lý sự nhiễm RGNNV ở cá, trong đó vacxin này chứa SJNNV. Sáng chế bộc lộ sự tương tác giữa các betanodavirus khác nhau trong quá trình gây nhiễm các tế bào “in vitro” và ở cá mú Châu Âu. Cụ thể hơn, cá được cho dùng SJNNV, và sau đó được phơi nhiễm với RGNNV, có ít triệu chứng của bệnh hơn liên quan đến RGNNV và/hoặc khả năng sống sót tăng lên khi so với cá không được dùng SJNNV trước khi phơi nhiễm với RGNNV.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến virus gây bệnh hoại tử thần kinh cá măng sọc (Striped jack nervous necrosis virus - SJNNV) dùng để bảo vệ cá chống lại sự nhiễm bệnh liên quan đến virus gây hoại tử thần kinh cá mú chấm đỏ (Red-spotted grouper nervous necrosis virus - RGNNV). Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất vaccin chứa SJNNV, trong đó vaccin này bảo vệ cá chống lại việc nhiễm RGNNV, và vaccin chứa axit nucleic SJNNV. Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp bảo vệ cá chống lại sự nhiễm bệnh liên quan đến RGNNV, bao gồm bước sử dụng SJNNV cho cá, trong đó cá sau đó được phơi nhiễm với RGNNV có ít triệu chứng của bệnh hơn hoặc có triệu chứng bệnh giảm đi so với cá được phơi nhiễm với RGNNV mà trước đó không được dùng SJNNV.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các virus họ *Nodaviridae*, giống *Betanodavirus* (đó là, betanodavirus) gây bệnh cho nhiều loài cá nước ngọt và nước mặn khác nhau trên toàn cầu và là các tác nhân gây bệnh não và bệnh màng lưới do virus (viral encephalopathy and retinopathy - VER) ở cá. Bệnh này cũng được gọi là bệnh hoại tử thần kinh do virus (sự hoại tử thần kinh do virus - VNN), có thể gây ra tỷ lệ chết đáng kể ở cá.

Các betanodavirus gây bệnh là không có màng bao và hệ gen của chúng chứa hai dải đơn, phân tử ARN dương, ARN1 và ARN2. Các tế bào bị nhiễm chứa ba ssARNs: ARN1, ARN2 và ARN3 dưới di truyền thu được từ ARN1. Vùng biến đổi T4 trong đoạn ARN2 đã được sử dụng để phân loại các betanodavirus thành bốn kiểu gen khác nhau: virus gây hoại tử thần kinh cá măng sọc (striped jack nervous necrosis virus - SJNNV), virus gây hoại tử thần kinh cá nóc hổ (tiger puffer nervous necrosis virus - TPNNV), virus gây hoại tử thần kinh cá bơn và virus gây hoại tử thần kinh cá mú chấm đỏ (red-spotted grouper nervous necrosis virus - RGNNV) (Nishizawa và các đồng tác giả 1997). Tên NNV đề cập đến virus gây hoại tử thần kinh và phần đầu của tên đề cập đến cá mà từ đó virus được phân lập. Các loài này đã trở thành các loài được chấp nhận, với loài cá măng sọc được xem là loài, dựa trên các đặc tính của SJNag93 phân lập. (Iwamoto et al, 2001) Các loài khác có thể là thành phần của chi *Betanodavirus*, nhưng chưa được chấp nhận là loài riêng, và có thể hoặc không thể là biến thể của bất kỳ trong số bốn loài được chấp nhận và được liệt kê trên đây bao gồm:

vi rút gây gây hoại tử thần kinh cá tuyết Đại Tây Dương, nodavirus cá bơn lưỡi ngựa Đại Tây Dương, virus gây viêm não cá vược Châu Âu, virus gây hoại tử thần kinh cá mú rồng, virus gây hoại tử thần kinh cá mú mỡ, virus gây hoại tử thần kinh cá mú Nhật Bản, virus viêm não cá vược, virus gây hoại tử thần kinh cá mú điểm gai, virus gây hoại tử thần kinh cá mú, virus gây hoại tử thần kinh cá bơn và nodavirus cá bơn Turbot. (Virus Taxonomy, 2012).

Các kiểu gen khác nhau của các betanodavirus thường gây bệnh ở nhiều loại cá khác nhau. Tuy nhiên, sự có mặt của cả SJNNV và RGNNV, trong một loài cá trong tự nhiên là đã thấy ở cá đù hoang dã (*Argyrosomus regius*). Sự phân tích di truyền dựa trên cả ARN1 và ARN2 cũng đã chứng minh sự tồn tại của các virus có hệ gen từ hai hoặc nhiều loại virus (reassortant viruses) (RGNNV/SJNNV và SJNNV/RGNNV) trong cá bị nhiễm bệnh. Các chủng virus này hoặc các chủng phân lập bao gồm một phân tử ARN của hệ gen từ SJNNV và một phân tử ARN từ RGNNV, đã được phân lập từ cá bơn Senegalese và cá tráp đầu vàng. Các chủng virus có hệ gen từ hai hoặc nhiều loại virus tương tự này liên quan đến sự bùng phát lâm sàng của bệnh. Các virus này có thể gây ra sự đồng nhiễm trên cùng tế bào với SJNNV và RGNNV. Mặc dù bằng chứng này chỉ ra rằng cả ARN SJNNV và ARN RGNNV có thể cùng tồn tại trong một tế bào nhiễm bệnh, không có hiểu biết gì về việc điều này ảnh hưởng đến sự sao chép và/hoặc sản xuất ra các virus con cháu, hoặc điều này ảnh hưởng đến khả năng gây ra các triệu chứng hoặc bệnh như thế nào.

SJNNV và RGNNV đã được phát hiện một cách riêng rẽ trong các loài cá sinh sống ở I-bê-ri, Peninsula, như cá mú châu Âu (*Dicentrarchus labrax*), cá bơn Senegalese (*Solea senegalensis*), cá tráp đầu vàng (*Sparus aurata*), cá tráp đỏ (*Pagrus auriga*), cá tráp thường (*Pagrus pagrus*), cá tráp Shi drum, (*Umbrina cirrosa*) và cá tráp trắng (*Diplodus sargus*).

Kiểu gen RGNNV được thấy là phổ biến nhất ở vùng Địa Trung Hải và gây ra những tổn thất lớn đến ngành công nghiệp đánh bắt cá, đặc biệt là ở Hy Lạp, tổn thất đối với ngành cá mú Châu Âu đã được ghi nhận là tới 60%. Do đó có nhu cầu khẩn cấp đối với các phương pháp bảo vệ cá, đặc biệt là cá tráp khỏi các ảnh hưởng do nhiễm RGNNV.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề cập đến virus gây bệnh hoại tử thần kinh cá măng sọc (Striped jack nervous necrosis virus - SJNNV) dùng để bảo vệ cá chống lại sự nhiễm bệnh liên quan đến virus gây hoại tử thần kinh cá mú chấm đỏ (Red-spotted grouper nervous necrosis virus - RGNNV).

Để đạt được mục đích trên đây, theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến virus gây hoại tử thần kinh cá măng sọc (Striped jack nervous necrosis virus - SJNNV) để bảo vệ cá chống lại bệnh liên quan đến sự nhiễm virus gây hoại tử thần kinh cá mú chấm đỏ (Red-spotted grouper nervous necrosis virus - RGNNV).

Trong phương án ưu tiên, SJNNV là:

i) SJNNV với trình tự nucleotit hoặc axit amin mà tốt hơn là có ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95%, đặc biệt tốt hơn là ít nhất 97%, hoặc đặc biệt tốt hơn nữa là ít nhất 99% giống với trình tự nucleotit hoặc axit amin của SJNNV phân lập SJNag93,

hoặc ii) SJNNV phản ứng về mặt huyết thanh với SJNag93 phân lập,

hoặc iii) SJNNV với trình tự nucleotit hoặc axit amin mà tốt hơn là giống ít nhất là 90%, tốt hơn nữa là giống ít nhất 95%, đặc biệt tốt hơn là giống ít nhất 97%, hoặc đặc biệt tốt hơn nữa là giống ít nhất 99% với trình tự nucleotit hoặc axit amin của SJNNV phân lập SJNag93 và phản ứng về mặt huyết thanh với huyết thanh miễn dịch với SJNag93 phân lập.

Trong phương án được ưu tiên khác, phần trăm mức độ giống về trình tự nucleotit hoặc axit amin của SJNNV là tương ứng với vùng biến đổi T4 trong ARN2 của SJNNV phân lập SJNag93.

Trong phương án được ưu tiên khác, phần trăm mức độ giống về trình tự nucleotit của SJNNV có liên quan đến trình tự từ các nucleotit 604 đến 1030 của ARN2 của SJNNV SJNag93, hoặc phần trăm mức độ giống về trình tự axit amin của SJNNV có liên quan đến các axit amin từ 204 đến 331 của protein được mã hóa bởi ARN2 của SJNNV SJNag93, tốt hơn là từ các axit amin 223 đến 331 của protein được mã hóa bởi ARN2 của SJNNV SJNag93, tốt hơn nữa là từ các axit amin 235 đến 315 của protein được mã hóa bởi ARN2 của SJNNV SJNag93.

Tốt hơn là SJNNV được lựa chọn từ nhóm bao gồm SJNag93, Jp/06/SJ, SJOri, SJ91Nag, SJ92Nag, SJ94Nag và- RS95Hir 3, tốt hơn là SJNag93.

Trong phương án ưu tiên, SJNNV được dùng cho cá với lượng ít nhất khoảng 1×10^4 TCID₅₀/con.

Cũng tốt hơn là, bảo vệ cá chống lại bệnh liên quan đến việc làm giảm tỷ lệ chết ở cá do nhiễm RGNNV.

Tốt hơn nữa là cá được lựa chọn từ nhóm bao gồm cá mú Châu Âu, cá bon Senegalese, cá tráp đầu vàng, cá tráp đỏ, cá tráp thường, cá tráp trắng và cá đù tự nhiên, tốt hơn là cá mú Châu Âu.

Trong phương án được ưu tiên khác, RGNNV là:

i) RGNNV với trình tự nucleotit hoặc axit amin mà tốt hơn là giống ít nhất 90%, tốt hơn nữa là giống ít nhất 95%, đặc biệt tốt hơn là giống ít nhất 97%, hoặc đặc biệt tốt hơn nữa là giống ít nhất 99% với ERV378/102-5/04 phân lập của RGNNV,

hoặc ii) RGNNV phản ứng về mặt huyết thanh với huyết thanh miễn dịch đối với ERV378/102-5/04 phân lập,

hoặc iii) RGNNV với trình tự nucleotit hoặc axit amin mà tốt hơn là giống ít nhất 90%, tốt hơn nữa là giống ít nhất 95%, đặc biệt tốt hơn là giống ít nhất 97%, đặc biệt tốt hơn nữa là giống ít nhất 99% với trình tự nucleotit hoặc axit amin của RGNNV ERV378/102-5/04 phân lập và phản ứng về mặt huyết thanh với huyết thanh miễn dịch đối với ERV378/102-5/04 phân lập.

Trong phương án ưu tiên, phần trăm mức độ giống về trình tự nucleotit hoặc axit amin của RGNNV có liên quan đến vùng biến đổi T4 trong đoạn ARN2 của RGNNV ERV378/102-5/04 phân lập.

Trong phương án được ưu tiên khác, sáng chế đề cập đến SJNNV để sử dụng bao gồm bước dùng SJNNV cho cá, trong đó cá sau đó được phơi nhiễm với RGNNV có ít triệu chứng bệnh hơn hoặc có triệu chứng bệnh giảm đi so với cá được phơi nhiễm với RGNNV mà trước đó không được dùng SJNNV.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến SJNNV dùng để chống lại sự hoại tử thần kinh do virus hoặc bệnh não và bệnh màng lưới do virus ở cá gây ra bởi sự nhiễm RGNNV.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp bảo vệ cá chống lại bệnh liên quan đến sự nhiễm RGNNV, bao gồm bước dùng SJNNV cho cá, trong đó cá sau đó được phơi nhiễm với RGNNV có ít triệu chứng bệnh hơn hoặc có triệu

chúng bệnh giảm đi so với cá được phơi nhiễm với RGNNV mà trước đó không được cho dùng SJNNV.

Trong phương án ưu tiên, SJNNV được dùng để làm giảm sự chết ở cá, tốt hơn là cá mú, mà sau đó được phơi nhiễm với RGNNV, so với cá, tốt hơn là cá mú, mà không được cho dùng SJNNV hoặc virus mà tốt hơn là giống ít nhất là 90%, tốt hơn nữa là giống ít nhất 95%, đặc biệt tốt hơn là giống ít nhất 97%, hoặc đặc biệt tốt hơn nữa là giống ít nhất 99% với SJNNV phân lập SJNag93.

Theo khía cạnh được ưu tiên khác, sáng chế bộc lộ phương pháp làm giảm tỷ lệ chết ở cá, tốt hơn là cá mú, liên quan đến sự nhiễm RGNNV, bao gồm bước chủng cá, tốt hơn là cá mú, với SJNNV, trong đó cá, tốt hơn là cá mú, sau đó được phơi nhiễm với chủng hoặc các chủng RGNNV, mà có khả năng gây chết, có tỷ lệ chết giảm đi khi so sánh với cá mú mà không được chủng với SJNNV và được phơi nhiễm với chủng hoặc các chủng RGNNV.

Tốt hơn là trong phương pháp theo sáng chế, RGNNV là có khả năng gây chết cá. Tốt hơn là cá cũng được dùng SJNNV và sau đó được phơi nhiễm với RGNNV có tỷ lệ chết thấp hơn khi so với cá được phơi nhiễm với RGNNV mà trước đó không được dùng SJNNV.

Trong phương án ưu tiên của phương pháp theo sáng chế, cá được phơi nhiễm với RGNNV tới khoảng 6 tuần sau khi dùng SJNNV. Tốt hơn nữa là cá được phơi nhiễm với RGNNV tới khoảng 3 tuần sau khi dùng SJNNV. Đặc biệt tốt hơn là cá được phơi nhiễm với RGNNV tới khoảng 72 giờ sau khi dùng SJNNV. Đặc biệt tốt hơn nữa là cá được phơi nhiễm với RGNNV tới khoảng 24 giờ sau khi dùng SJNNV. Trong phương án được ưu tiên khác, SJNNV bao gồm SJ93Nag phân lập. Trong phương án được ưu tiên khác, trong khi SJNNV và RGNNV có khả năng gây nhiễm cùng các loại cá, tốt hơn là bao gồm cá mú Châu Âu, cá *bon Senegalese*, cá tráp đầu vàng, cá tráp đỏ, cá tráp thường, cá tráp trắng và cá đù tự nhiên. Trong phương án được ưu tiên khác của phương pháp theo sáng chế, việc sử dụng SJNNV được thực hiện bằng cách tiêm trong cơ hoặc màng bụng cá virus hoặc nhúng cá vào bể chứa virus. Trong phương án được ưu tiên khác của phương pháp theo sáng chế, lượng SJNNV được dùng cho cá là ít nhất khoảng 1×10^4 TCID₅₀/con. Tốt hơn nữa là lượng SJNNV dùng cho cá là giữa khoảng 1×10^4 và khoảng $1,5 \times 10^4$ TCID₅₀/con. Trong phương án ưu tiên của phương pháp theo sáng chế, việc dùng SJNNV dẫn đến sự biểu

hiện phiên mã tăng lên của ít nhất một gen cảm ứng interferon, trong đó tốt hơn là gen cảm ứng interferon bao gồm Mx. Tốt hơn là trong phương pháp theo sáng chế cá mú đã được chủng với SJNNV và sau đó được phơi nhiễm với RGNNV có tỉ lệ chết giảm tới khoảng 72 giờ sau khi chủng với SJNNV.

Trong phương án ưu tiên của phương pháp theo sáng chế SJNNV là:

i) SJNNV với trình tự nucleotit hoặc axit amin mà tốt hơn là giống ít nhất là 90%, tốt hơn nữa là giống ít nhất 95%, đặc biệt tốt hơn là giống ít nhất 97%, hoặc đặc biệt tốt hơn nữa là giống ít nhất 99% với trình tự nucleotit hoặc axit amin của SJNNV phân lập SJNag93,

hoặc ii) SJNNV mà phản ứng về mặt huyết thanh với huyết thanh miễn dịch với SJNag93 phân lập,

hoặc iii) SJNNV với trình tự nucleotit hoặc axit amin mà tốt hơn là giống ít nhất 90%, tốt hơn nữa là giống ít nhất 95%, đặc biệt tốt hơn là giống ít nhất 97%, đặc biệt tốt hơn nữa là giống ít nhất 99% với trình tự nucleotit hoặc axit amin của SJNNV phân lập SJNag93 SJNNV và phản ứng về mặt huyết thanh với huyết thanh miễn dịch với SJNag93 phân lập.

Trong phương án ưu tiên của phương pháp theo sáng chế phần trăm mức độ giống về trình tự nucleotit hoặc axit amin có liên quan đến vùng biến đổi T4 trong đoạn ARN2 của SJNNV phân lập SJNag93.

Trong phương án được ưu tiên khác của method theo sáng chế, RGNNV có trình tự nucleotit hoặc axit amin mà tốt hơn là giống ít nhất là 90%, tốt hơn nữa là giống ít nhất 95%, đặc biệt tốt hơn là giống ít nhất 97%, hoặc đặc biệt tốt hơn nữa là giống ít nhất 99% với ERV378/102-5/04 phân lập của RGNNV

hoặc ii) RGNNV mà phản ứng về mặt huyết thanh với huyết thanh miễn dịch đối với ERV378/102-5/04 phân lập,

hoặc iii) RGNNV với trình tự nucleotit hoặc axit amin mà tốt hơn là giống ít nhất 90%, tốt hơn nữa là giống ít nhất 95%, đặc biệt tốt hơn là giống ít nhất 97%, đặc biệt tốt hơn nữa là giống ít nhất 99% với trình tự nucleotit hoặc axit amin của RGNNV ERV378/102-5/04 phân lập và phản ứng về mặt huyết thanh với huyết thanh miễn dịch to ERV378/102-5/04 phân lập.

Trong phương án ưu tiên của phương pháp theo sáng chế phần trăm mức độ giống về trình tự nucleotit hoặc axit amin có liên quan đến vùng biến đổi T4 trong đoạn ARN2 của RGNNV ERV378/102-5/04 phân lập.

Trong phương án được ưu tiên khác theo sáng chế, RGNNV có trình tự nucleotit mà tốt hơn là giống ít nhất là 90%, tốt hơn nữa là giống ít nhất 95%, đặc biệt tốt hơn là giống ít nhất 97%, hoặc đặc biệt tốt hơn nữa là giống ít nhất 99% với ARN1 và ARN2 của RGNNV. Ví dụ đại diện về ARN1 của RGNNV được thấy trong ngân hàng gen với số tiếp cận là NC_008040.1. Ví dụ đại diện về ARN2 của RGNNV được thấy trong ngân hàng gen với số tiếp cận là NC_008041.1.

Trong phương án ưu tiên, phần trăm mức độ giống về trình tự nucleotit có liên quan đến vùng biến đổi T4 trong đoạn ARN2 của RGNNV. ví dụ đại diện về ARN2 của RGNNV được thấy trong ngân hàng gen với số tiếp cận là NC_008041.1.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vaccin chứa SJNNV để sử dụng trong phòng ngừa hoặc điều trị sự nhiễm RGNNV ở cá. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vaccin để bảo vệ cá chống lại sự hoại tử thần kinh do virus hoặc bệnh não và bệnh màng lưới do virus ở cá gây ra bởi sự nhiễm RGNNV, trong đó vaccin chứa SJNNV.

Tốt hơn là trong vaccin này, SJNNV là:

i) SJNNV với trình tự nucleotit hoặc axit amin mà tốt hơn là giống ít nhất là 90%, tốt hơn nữa là giống ít nhất 95%, đặc biệt tốt hơn là giống ít nhất 97%, hoặc đặc biệt tốt hơn nữa là giống ít nhất 99% với trình tự nucleotit hoặc axit amin của SJNNV phân lập SJNag93,

hoặc ii) SJNNV mà phản ứng về mặt huyết thanh với huyết thanh miễn dịch với SJNag93 phân lập,

hoặc iii) SJNNV với trình tự nucleotit hoặc axit amin mà tốt hơn là giống ít nhất 90%, tốt hơn nữa là giống ít nhất 95%, đặc biệt tốt hơn là giống ít nhất 97%, đặc biệt tốt hơn nữa là giống ít nhất 99% với trình tự nucleotit hoặc axit amin của SJNNV phân lập SJNag93 và phản ứng về mặt huyết thanh với huyết thanh miễn dịch với SJNag93 phân lập. Tốt hơn nữa là phần trăm mức độ giống về trình tự nucleotit hoặc axit amin của SJNNV liên quan đến vùng biến đổi T4 trong đoạn ARN2 của SJNNV phân lập SJNag93. Trong phương án ưu tiên của vaccin SJNNV được dùng với cá với

lượng ít nhất khoảng 1×10^4 TCID₅₀/con. Trong phương án được ưu tiên khác của vacxin ARN2 của SJNNV được dùng cho cá. Tốt hơn là SJNNV cũng bao gồm ARN1 của SJNNV và ARN2 của SJNNV. Trong phương án khác, SJNNV là ARN2 của SJNNV, không có ARN1 của SJNNV. Trong phương án ưu tiên, vacxin SJNNV là ở dạng SJNNV được gây chết bởi nhiệt hoặc được bất hoạt bằng phương pháp hóa học. Thông thường, SJNNV được bất hoạt bằng phương pháp hóa học được bất hoạt sử dụng hợp chất aziridin, tốt hơn là etylenimin bậc hai. Tốt hơn là SJNNV được dùng ở dạng vacxin AND hoặc ARN, tốt hơn là vacxin ARN. Trong phương án được ưu tiên khác của vacxin theo sáng chế, cá được lựa chọn từ nhóm bao gồm cá mú Châu Âu, cá bon Senegalese, cá tráp đầu vàng, cá tráp đỏ, cá tráp thường, cá tráp trắng và cá đù tự nhiên, tốt hơn là cá mú Châu Âu. Tốt hơn là cũng trong vacxin theo sáng chế, SJNNV được lựa chọn từ nhóm bao gồm SJNag93, Jp/06/SJ, SJOri, SJ91Nag, SJ92Nag, SJ94Nag và RS95Hir 3, tốt hơn là SJNag93.

Trong khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng SJNNV trong sản xuất chế phẩm để làm giảm sự chết ở cá do nhiễm RGNNV.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp ức chế sự sao chép của SJNNV trong các tế bào, bao gồm bước gây nhiễm tế bào với RGNNV trước hoặc đồng thời với bước gây nhiễm tế bào với SJNNV.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp gây nhiễm cá với các virut, bao gồm các bước:

- a) dùng SJNNV cho cá; và
- b) phơi nhiễm cá với RGNNV;

trong đó cá có các triệu chứng liên quan đến sự nhiễm RGNNV ít hơn và/hoặc giảm đi so với cá được phơi nhiễm với RGNNV mà chưa được sử dụng SJNNV.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp kích thích sự sao chép của RGNNV trong các tế bào, trong đó các tế bào được gây nhiễm SJNNV trước hoặc đồng thời với việc gây nhiễm tế bào bằng RGNNV.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Trong các hình vẽ kèm theo, được kết hợp ở đây và tạo thành một phần của bản mô tả, các phương án của hoặc có liên quan đến các phương pháp và các chế phẩm được minh họa, cùng với sự mô tả chi tiết dưới đây, nhằm mô tả các ví dụ. Cần phải hiểu rằng, các phương án được minh họa trong các hình vẽ được thể hiện nhằm mục

đích minh họa mà không nhằm giới hạn. Cần phải hiểu rằng các thay đổi, biến đổi, và các khác biệt từ các phương án được minh họa trong các hình vẽ có thể được tạo mà không lệch khỏi phạm vi của sáng chế, như được bộc lộ dưới đây.

Fig. 1 minh họa dữ liệu ví dụ từ nghiên cứu trong đó các kiểu gen khác nhau của betanodavirus được dùng cho cá mú non trọng lượng 5g và tỷ lệ chết cá được theo dõi.

Fig. 2 minh họa dữ liệu ví dụ từ nghiên cứu trong đó các chủng và các chất chủng khác nhau của RGNNV được dùng cho cá mú và tỷ lệ cá chết được theo dõi. Đối chứng dương là RGNNV ERV378/102-5/04 phân lập.

Fig. 3 minh họa dữ liệu ví dụ từ nghiên cứu trong đó chủng RGNNV được dùng cho cá mú với cân nặng khác nhau và tỷ lệ cá chết được theo dõi.

Fig. 4 minh họa dữ liệu ví dụ từ nghiên cứu trong đó chủng RGNNV được dùng cho cá mú mà đã được dùng SJNNV (ví dụ, sự gây nhiễm lại RGNNV cá đã được gây nhiễm SJNNV). Tỷ lệ cá chết được theo dõi.

Fig. 5 minh họa dữ liệu ví dụ từ nghiên cứu trong đó ARN hệ gen của RGNNV được định lượng ở các thời điểm khác nhau sau khi cá được gây nhiễm với SJNNV mà đã được gây nhiễm bằng RGNNV. Cột thứ nhất ở mỗi thời điểm là nhóm đối chứng RG (nhóm 3) và cột thứ hai ở mỗi thời điểm là nhóm SJ/RG (nhóm 4).

Fig. 6 minh họa dữ liệu ví dụ từ nghiên cứu trong đó ARN hệ gen của SJNNV được định lượng ở các thời điểm khác nhau sau khi cá được gây nhiễm với SJNNV mà đã được gây nhiễm lại với RGNNV. Cột thứ nhất ở mỗi thời điểm là nhóm đối chứng SJ (nhóm 2) và cột thứ hai ở mỗi thời điểm là nhóm SJ/RG (nhóm 4).

Fig. 7 minh họa dữ liệu ví dụ từ các nghiên cứu trong đó ARN hệ gen của SJNNV được định lượng ở các thời điểm khác nhau sau khi: (A) các tế bào được đồng thời gây nhiễm với SJNNV và RGNNV, (B) các tế bào được gây nhiễm với SJNNV được gây nhiễm lại với RGNNV, và (C) các tế bào được gây nhiễm với RGNNV được gây nhiễm lại với SJNNV.

Fig. 8 minh họa dữ liệu ví dụ từ các nghiên cứu trong đó ARN hệ gen của RGNNV được định lượng ở các thời điểm khác nhau sau khi: (A) các tế bào được đồng thời gây nhiễm với SJNNV và RGNNV, (B) các tế bào được gây nhiễm với SJNNV được gây nhiễm lại với RGNNV, và (C) các tế bào được gây nhiễm với RGNNV được gây nhiễm lại với SJNNV.

Fig. 9 minh họa gen ARN 1 của SJNNV (SEQ ID No. 1) của virus gây hoại tử thần kinh cá măng sọc, mã hóa protein A và protein B, CDS đầy đủ, trình tự nucleotit.

Fig. 10a minh họa ARN1 của SJNNV (SEQ ID No. 2) trình tự axit amin của protein.

Fig. 10b minh họa ARN1 của SJNNV (SEQ ID No. 3) trình tự axit amin của protein B.

Fig. 11 minh họa gen ARN2 của SJNNV (SEQ ID No 4) của virus gây hoại tử thần kinh cá măng sọc mã hóa protein vỏ, CDS đầy đủ, trình tự nucleotit.

Fig. 12 minh họa ARN 2 SJNNV (SEQ ID No 5). trình tự axit amin của protein vỏ.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong bản mô tả này, “SJNNV” có nghĩa là betanodavirus của các loài hoặc kiểu gen của virus gây hoại tử thần kinh cá măng sọc. Các virus SJNNV bộc lộ trong bản mô tả này thường có khả năng gây nhiễm, hoặc ít nhất là hấp phụ lên, ít nhất một số các tế bào như một số virus thuộc loài hoặc kiểu gen RGNNV. Ví dụ về các SJNNV phân lập bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, SJ93Nag, Jp/06/SJ, SJOri, SJ91Nag, SJ92Nag, SJ94Nag và RS95Hir. Ví dụ được ưu tiên về SJNNV được phân lập SJ93Nag. (Xem trình tự ngân hàng gen AB056571, Fig. 9: SEQ ID No. 1 (RNA 1: các gen virus mã hóa protein A, protein B), Fig. 10a: SEQ ID NO. 2: trình tự axit amin của protein [virus gây hoại tử thần kinh cá măng sọc] ngân hàng gen: BAB64329, Fig. 10b: SEQ ID NO. 3: trình tự axit amin của protein B [virus gây hoại tử thần kinh cá măng sọc] ngân hàng gen: BAB64330. Fig. 11 SEQ ID No 4 gen của virus gây hoại tử thần kinh cá măng sọc mã hóa protein vỏ, CDS đầy đủ ngân hàng gen: AB056572. Fig. 12 SEQ ID No 5. trình tự axit amin của gen của của virus gây hoại tử thần kinh cá măng sọc mã hóa protein vỏ, CDS đầy đủ của ngân hàng gen: BAB64331)

Trong bản mô tả này, “RGNNV” có nghĩa là betanodavirus của các loài hoặc kiểu gen của virus gây hoại tử thần kinh cá mú chấm đỏ. Các virus RGNNV bộc lộ trong bản mô tả này thường có khả năng gây nhiễm, hoặc ít nhất là hấp phụ lên, ít nhất một số trong số các tế bào như một số virus có kiểu gen SJNNV. Các ví dụ về RGNNV phân lập bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, ERV378/102-5/04, SpDI-IAusc1688.08, Mt/01/Sba, Gr/02/Sba, Gr/12/Sba, Pt/08/Sba, It/23/Sba, It/24/Sdr,

It/19/Sba, Jp/15/Rp, Th/07/Bgr, Sg/14/Bar, Sp/20/Sba, Gr/16/Sba, SGWak97, SGMie95, RGoka94, JSOit98, KGOit97, HG0001, BGThA99, SBGre96, WSBUS99A, WSBUS99B, BAus94, JFHir92, JFHir96, JF93Hir, MR94Tha, RG94Oka, JF94Wak, JF95Oit, RG91Tok, SB95Ita, SG94Oit, JF95Tok, JS95Shi, JF95Sag, PA94Oit và KG95Oit. Ví dụ được ưu tiên về RGNNV phân lập là ERV378/102-5/04 hoặc SpDI-IAusc1688.08, đặc biệt tốt hơn là ERV378/102-5/04.

Trong bản mô tả này, “cá” nói chung là đề cập đến các loài cá có thể bị nhiễm SJNNV và RGNNV. Các loài này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, cá mú Châu Âu, cá bon Senegalese, cá tráp đầu vàng, cá tráp đỏ, cá tráp thường, cá tráp trắng Shi drum và cá đù tự nhiên.

Trong bản mô tả này, “có khả năng gây ra” nói chung là đề cập đến các virus, là that virus có khả năng tạo ra các hiệu quả đặc hiệu (ví dụ, các triệu chứng và/hoặc bệnh, và/hoặc sự chết) trong ít nhất các điều kiện hoặc trường hợp nhất định.

Trong bản mô tả này, “các triệu chứng” đề cập đến các đặc tính có thể quan sát và/hoặc đo được của hoặc ở động vật mà thường được cho là khoẻ bình thường đối động vật khoẻ mạnh. Các triệu chứng có thể chỉ ra bệnh. Trong bản mô tả này, động vật nói chung là cá và các triệu chứng có thể thay đổi ở các đặc tính của cá (ví dụ, các thay đổi vật lý, các thay đổi về hành vi, v.v.) khác với các đặc tính được cho là các đặc tính bình thường hoặc các đặc tính của động vật khoẻ mạnh. Trong bản mô tả này, các triệu chứng có thể là đặc trưng hoặc được xem là gây bởi sự nhiễm virus. Ví dụ, các betanodavirus có thể gây ra sự hoại tử thần kinh do virus (VNN) ở cá. Các triệu chứng của VNN có thể bao gồm sự tạo không bào trong các tế bào võng mạc và sự thoái hóa các neuron tế bào thần kinh của hệ thần kinh trung ương (central nervous system - CNS), chứng biếng ăn, sự bất thường về màu da, thị lực, sự kiểm soát bong bóng và hành vi bơi. VNN gây ra bởi các betanodavirus có thể dẫn đến sự chết cá bị nhiễm. Sự chết do đó có thể được xem là triệu chứng của VNN, mặc dù sự chết có thể được xem là đề cập đến kết quả của VNN. Các triệu chứng may có thể được đề cập sử dụng các thuật ngữ khác, như các dấu hiệu lâm sàng, sự biểu thị bệnh, và thuật ngữ tương tự.

Trong bản mô tả này, “sự giảm các triệu chứng,” “giảm sự chết”, “giảm tỉ lệ chết” và thuật ngữ tương tự, thường đề cập đến sự so sánh các đặc tính ở các loài cá khác nhau, các nhóm cá khác nhau, trong đó mức độ của các đặc tính được quan sát trong một nhóm cá là giảm đi trong nhóm khác. Nhìn chung, bệnh có thể là thuộc tính

của hành động hoặc đặc tính. Trong bản mô tả này, ví dụ, tập hợp các cá được gây nhiễm với RGNNV thường thể hiện các triệu chứng do bị nhiễm RGNNV. Con số đo được của cá bị nhiễm có thể chết, số lượng cá trong tập hợp cá so sánh thể hiện các triệu chứng hoặc chết, trong đó cá đã được dùng SJNNV trước khi nhiễm RGNNV, có thể ít hơn trong nhóm không được dùng SJNNV. Trong tình huống này, trước khi dùng SJNNV có thể được cho là có các triệu chứng và/hoặc sự chết giảm đi gây ra bởi hoặc liên quan đến RGNNV. Sự giảm bớt các đặc tính như các triệu chứng và sự chết, do việc dùng SJNNV, có thể chỉ ra sự bảo vệ chống lại bệnh liên quan đến hoặc gây ra bởi RGNNV.

Trong bản mô tả này, “việc dùng” hoặc “chúng,” thường đề cập đến các virus và các tương tác với cá và/hoặc các tế bào của chúng, có nghĩa là virus được chủ định dùng cho, áp dụng cho hoặc đưa vào, cá hoặc các tế bào, sao cho các virus có thể gây nhiễm, hoặc ít nhất là hấp phụ lên, các tế bào trong môi trường nuôi cấy cá hoặc các tế bào *in vitro*. Một phương pháp dùng hoặc chủng virus là bằng cách tiêm virus vào cơ thể cá.

Trong bản mô tả này, “sự phơi nhiễm với” hoặc “được phơi nhiễm với” nói chung là đề cập đến tình huống trong đó động vật (ví dụ, cá) ở gần tác nhân gây nhiễm (ví dụ, virus) sao cho có khả năng hoặc cơ hội cho virus gây nhiễm các tế bào động vật.

Trong bản mô tả này, “việc dùng tiếp theo” hoặc “hoặc việc chủng tiếp theo” nói chung là đề cập đến tình huống trong đó virus được dùng cho cá ở thời điểm sau khi một số sự kiện xảy ra. Trong một ví dụ, một virus (ví dụ, RGNNV) được dùng cho cá đúng thời điểm sau khi virus khác (ví dụ, SJNNV) được dùng cho cá. Trong tình huống này, RGNNV có thể được cho là đã được “dùng tiếp theo” liên quan đến việc dùng trước đó của SJNNV.

Trong bản mô tả này, “sự nhiễm” đề cập đến quy trình nhờ đó virus tương tác với tế bào vật chủ và được nhân lên, hoặc ít nhất có cơ hội nhân lên, trong tế bào vật chủ sao cho các virus bổ sung được tạo ra. Quy trình gây nhiễm có thể được làm gián đoạn hoặc dùng ở các giai đoạn khác nhau. Khi quy trình gây nhiễm bị làm gián đoạn hoặc dùng, sự sản xuất các virus bổ sung có thể được ức chế hoặc giảm đi.

Trong bản mô tả này, “sự đồng nhiễm” nói chung là đề cập đến quy trình nhờ đó các virus khác nhau (ví dụ, SJNNV và RGNNV) tương tác với cùng tế bào chủ ở

thời gian xấp xỉ giống hoặc đồng thời. Trong một ví dụ, sự đồng nhiễm của tế bào bởi hai virus khác nhau dẫn đến sự có mặt đồng thời trong hệ gen từ cả hai virus trong tế bào chủ.

Trong bản mô tả này, “sự gây nhiễm lại” đề cập đến tình huống trong đó hai virus tương tác với cùng tế bào chủ ở thời gian xấp xỉ khác nhau. Ví dụ, trong trường hợp trong đó các tế bào được phơi nhiễm với SJNNV sao cho sự nhiễm của các tế bào với SJNNV có thể được bắt đầu và, ở một vài thời điểm sau đó, các tế bào được phơi nhiễm với RGNNV sao cho sự nhiễm với RGNNV có thể được bắt đầu, SJNNV có thể là virus “gây nhiễm” và RGNNV có thể là virus “gây nhiễm lại”. Sự gây nhiễm lại, do đó, nói chung là đề cập đến sự gây nhiễm các tế bào với virus trong đó các tế bào đã được gây nhiễm với virus trước đó. Virus gây nhiễm có thể gây nhiễm các tế bào trước virus gây nhiễm lại. Virus gây nhiễm lại có thể gây nhiễm các tế bào sau virus gây nhiễm.

Trong bản mô tả này, “sự sao chép” nói chung là đề cập đến quy trình trong đó hệ gen của virus được sao chép trong tế bào chủ. Nhìn chung, sự sao chép bao gồm tập con của các sự kiện xảy ra trong khi gây nhiễm.

Trong bản mô tả này, “virus có gen từ hai hoặc nhiều virus tương tự” nói chung là đề cập đến virus có gen từ nhiều nguồn (ví dụ, hệ gen trong nhiều đoạn) trong đó nguồn gốc từ ít nhất hai đoạn gen tạo ra ở các virus không giống nhau. Ví dụ, các betanodavirus được thấy là có một phân tử ARN của hệ gen bắt nguồn từ SJNNV và phân tử ARN của hệ gen thứ có nguồn gốc từ RGNNV.

Trong bản mô tả này, “sự biểu hiện sao chép” đề cập đến sự tổng hợp ARN từ bản sao AND của gen. Trong một ví dụ, mức trạng thái ổn định của ARN được mã hóa bởi các gen cụ thể nhờ đó các tế bào có thể được đo và được sử dụng để phỏng đoán sự điều chỉnh biểu hiện của gen ở mức phiên mã. Trong một ví dụ, mức ARN được mã hóa bởi gen được đo trong các tế bào khác nhau, và sự khác biệt ở mức ARN tạo thành sự thay đổi ở tỷ lệ phiên mã của gen đó.

Được bộc lộ trong bản mô tả này là sự tương tác và tác dụng của sự tương tác giữa các betanodavirus đối với sự gây nhiễm cá, hoặc các tế bào *in vitro*. Các betanodavirus được mô tả thường là các virus thuộc các loài SJNNV và các virus của các loài RGNNV. Trong một ví dụ, sự gây nhiễm cá với SJNNV có thể làm giảm bớt bệnh, các triệu chứng của bệnh, tác động của bệnh, và các yếu tố tương tự, của

RGNNV gây nhiễm lại, khi so sánh với bệnh/con các triệu chứng/tác động của RGNNV mà không được gây nhiễm SJNNV trước đó.

Hiệu quả của SJNNV gây nhiễm đối với RGNNV gây nhiễm lại có thể được thấy ở nhiều loài cá. Nhìn chung, cá bao gồm bất kì loài nào có thể bị nhiễm SJNNV và RGNNV. Một số ví dụ bao gồm cá mú Châu Âu (*Dicentrarchus labrax*), cá bon Senegalese (*Solea senegalensis*), cá tráp đầu vàng (*Sparus aurata*), cá tráp đỏ (*Pagrus auriga*), cá tráp thường (*Pagrus pagrus*) và cá tráp trắng (*Diplodus sargus*).

Nhìn chung, SJNNV có thể là SJNNV mà có thể gây nhiễm các loài cá mà RGNNV cũng có thể gây nhiễm. Trong một ví dụ, SJNNV gây nhiễm có thể gây ra ít triệu chứng hơn hoặc ít nghiêm trọng hơn so với RGNNV gây nhiễm lại. Trong một ví dụ, SJNNV có thể là chủng SJ93Nag hoặc phân lập (Iwamoto et al, 2001). Các SJNNV phân lập khác có thể bao gồm SJOri, SJ91Nag, SJ92Nag, SJ94Nag và RS95Hir.

“Phản ứng về mặt huyết thanh với huyết thanh miễn dịch” có thể được thử nghiệm bằng các phương pháp được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ về các thử nghiệm để phát hiện phản ứng chéo huyết thanh là ELISA, thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (hemagglutination inhibition -HI), thử nghiệm trung hòa huyết thanh (serum neutralization -SN), thử nghiệm trung hòa chéo và thử nghiệm trung hòa virus. Ví dụ được ưu tiên là thử nghiệm trung hòa chéo. Xem tài liệu của Mori và các đồng tác giả, năm 2003, trang 21 về phương pháp sử dụng để thử nghiệm phản ứng huyết thanh chéo với huyết thanh miễn dịch đối với các nodavirus phân lập.

SJNNV có thể được tinh sạch từ ấu trùng mắc bệnh của cá măng sọc và ARN được chiết bởi các phương pháp được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật, ví dụ được mô tả bởi Nishizawa và các đồng tác giả năm 1995, trang 1564.

Sự xác định ARN virus thuộc kiểu gen của SJNNV theo sáng chế có thể được thiết lập bằng cách so sánh với vùng biến đổi của trình tự gen của protein vỏ với các nucleotit từ 604 đến 1030 của ARN2, hoặc ở mức axit amin aa từ 204 đến 331, tốt hơn là từ 223 đến 331, tốt hơn nữa là từ 235 đến 315, như được mô tả bởi Nishizawa và các đồng tác giả, năm 1997, đặc biệt là ở trang 1635, và Nishizawa và các đồng tác giả, năm 1995 và Skiliris và các đồng tác giả, trang 64.

ARN lây nhiễm phiên mã cho SJNNV có thể được tạo theo cách khác bằng các phương pháp đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực, dựa trên các trình tự đã biết của

SJNNV (xem Seq ID No. 1-5). Điều này đã được mô tả chi tiết trong tài liệu của Iwamoto và các đồng tác giả, năm 2001, trang 2654-2656.

Nhìn chung, RGNNV có thể gây nhiễm các loài cá mà SJNNV cũng có thể gây nhiễm. Trong một ví dụ, RGNNV gây ra các triệu chứng và/hoặc bệnh ở cá bị nhiễm. Trong một ví dụ, RGNNV có thể gây ra sự chết ở cá bị nhiễm. Chúng RGNNV hoặc phân lập ví dụ là ERV378/102-5/04 (Lopez-Jimena và các đồng tác giả, 2011).

Các betanodavirut có thể được nhân giống bằng nhiều phương pháp. Ví dụ, các virut có thể phát triển trong các tế bào được nuôi cấy. Nhiều tế bào được nuôi cấy có thể được sử dụng. Một số dòng tế bào ví dụ bao gồm dòng tế bào E-11 (ECACC, No. 01110916; Iwamoto và các đồng tác giả, 2000), SAF-1 các tế bào (ECACC, No. 00122301; Aquaculture 150:143-153, 1997) và SSN-1 các tế bào (J. Gen. Virol. 77, 2067-2071, 1996). Các kỹ thuật nhân giống các virut là đã được biết đến rộng rãi trong lĩnh vực.

Việc dùng các virut, bao gồm SJNNV, cho cá có thể được thực hiện sử dụng nhiều kỹ thuật. Ví dụ, SJNNV có thể được dùng cho ấu trùng và/hoặc các loài cá con. SJNNV có thể được dùng cho cá trưởng thành hoặc già. Trong một ví dụ, cá nằm trong khoảng từ 2,5 g đến 10 g khối lượng. Đường dùng của SJNNV có thể khác nhau. Các ví dụ bao gồm sự tiêm trong cơ, sự tiêm trong màng bụng, đường miệng trong thức ăn, ngâm cá trong bể chứa virus, và các cách khác.

Nhìn chung, lượng SJNNV được dùng đối với cá với lượng để làm giảm các triệu chứng, bao gồm sự chết cá, mà có thể gây ra bởi RGNNV. “Lượng” virut có thể được xác định bằng nhiều kỹ thuật. Nhìn chung, các thử nghiệm để đo hoạt tính lây nhiễm của các virut có thể được sử dụng. Trong một ví dụ, virut gây nhiễm có thể được đo bằng cách xác định TCID₅₀. Các phương pháp khác có thể đo các đơn vị tạo mảng. Các phương pháp bổ sung có thể được sử dụng. Lượng SJNNV sử dụng có thể là 10², 10³, 10⁵, 10⁶, 10⁷, hoặc nhiều hơn TCID₅₀/con. Trong một ví dụ, lượng SJNNV được dùng cho cá là ít nhất khoảng 1 x 10⁴ TCID₅₀/con. Trong một ví dụ, lượng SJNNV được dùng cho cá là nằm trong khoảng từ 1 x 10⁴ đến 1,5 x 10⁴ TCID₅₀/con. Các thể tích ví dụ được gây nhiễm vào cá có thể là 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250 hoặc 500 µl. Trong một ví dụ, thể tích là nằm trong khoảng từ 10 và 200 µl. Trong ví dụ khác, 50 hoặc 100 µl được tiêm vào.

Sự tạo dạng bào chế của các virus để dùng cho cá có thể được thực hiện sử dụng nhiều phương pháp. Nhìn chung, sự tạo dạng bào chế sẽ duy trì tính gây nhiễm của các virus cho đến khi các virus được dùng cho cá. Trong một ví dụ, các virus tạo dạng bào chế trong đệm sinh học.

Hiệu quả của SJNNV trong việc làm giảm các triệu chứng ở cá gây ra bởi RGNNV thường là bền lâu. Ví dụ, cá được dùng SJNNV có thể thể hiện các triệu chứng giảm do sự gây nhiễm RGNNV sau đó ở các thời gian khác nhau sau khi dùng SJNNV. Trong các ví dụ khác nhau, cá được dùng SJNNV có thể có các triệu chứng giảm đi do việc nhiễm RGNNV sau đó, so với cá không được sử dụng SJNNV, trong 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 tuần sau khi sử dụng SJNNV. Các triệu chứng giảm có thể kéo dài 6, 5, 4, 3, 2 hoặc 1 ngày sau khi dùng SJNNV. Các triệu chứng giảm có thể kéo dài 96, 72, 48, 24, 12 hoặc 6 giờ sau khi sử dụng SJNNV.

Không có cơ chế hoạt động nào cho hiệu quả của SJNNV đối với bệnh và/hoặc sự chết liên quan đến RGNNV được dựa trên hoặc đưa ra. Chỉ có bộc lộ rằng các kết quả ví dụ chỉ ra rằng sự nhiễm của cá và/hoặc các tế bào của hoặc từ cá có thể dẫn đến hoặc liên quan đến sự thay đổi sự biểu hiện của một hoặc nhiều gen đã được biết là được điều biến bởi interferon. Trong một ví dụ, sự nhiễm của cá với SJNNV liên quan đến mức tăng của ARN ở trạng thái dùng từ một hoặc nhiều gen cảm ứng interferon. Trong một ví dụ, gen cảm ứng interferon có thể là Mx. Trong một ví dụ, SJNNV liên quan đến sự phiên mã tăng của các gen cảm ứng interferon.

Trong một ví dụ, sự nhiễm của các tế bào với RGNNV trước, hoặc đồng thời với, SJNNV có thể dẫn đến sự ức chế sự sao chép của SJNNV trong các tế bào. Sự gây nhiễm lại SJNNV của các tế bào được gây nhiễm với RGNNV có thể gây ra sự ức chế sao chép hệ gen của SJNNV. Sự đồng gây nhiễm RGNNV và SJNNV của các tế bào có thể gây ra sự ức chế sao chép hệ gen của SJNNV.

Trong một ví dụ, sự gây nhiễm các tế bào với SJNNV trước, hoặc đồng thời với, RGNNV có thể dẫn đến sự thúc đẩy sao chép của RGNNV trong các tế bào. Sự gây nhiễm lại với RGNNV của các tế bào được gây nhiễm với SJNNV có thể gây ra sự kích thích sao chép hệ gen của RGNNV. Sự đồng gây nhiễm SJNNV và RGNNV các tế bào có thể gây ra sự kích thích sao chép hệ gen của RGNNV.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ là nhằm mục đích minh họa và không được hiểu là các giới hạn minh họa.

Ví dụ 1. Các betanodavirut, dòng tế bào và sự phát triển của virut

Các virut phân lập ERV378/102-5/04 (RGNNV genotype; Lopez-Jimena et al, 2011), SpDI-IAusc1688.08 (RGNNV genotype; Oliveira et al, 2009), SJ93Nag (SJNNV genotype, Iwamoto et al, 2001), và SpSs-IAusc160.03 (reassortant with RGNNV-type RAN1 and SJNNV-type RAN2; Oliveira et al, 2009) được phát triển ở 25°C trong dòng tế bào E-11 (European Collection of Cell Cultures, UK, Cat. No. 01110916) (Iwamoto và et al, 2000) theo Lopez-Jimena và các đồng tác giả, năm 2011. Các tế bào được phát triển ở 25°C trong môi trường Leibovitz (L-15) (Invitrogen) được bổ sung 1% penixilin-stroptomycin (Invitrogen) và 5% huyết thanh bào thai bò, đến khi bán hợp nhất, trước khi chủng virut. Chuẩn giá được xác định sử dụng sự pha loãng cao nhất gây ra hiệu quả gây bệnh cho tế bào ở 50% môi trường nuôi cấy được chủng (TCID₅₀) như được mô tả (Tissue Culture: Methods and Applications; Kruse and Patterson, eds.; pp. 527-532, Academic Press, New York, 1973).

Ví dụ 2. Cá mú

Cá mú Châu Âu (*Dicentrarchus labrax*) được giữ ở từ 21-25°C. Cá mú có khối lượng xác định được chủng với các virut bằng cách tiêm trong cơ (intramuscular - i.m.) (0,1 ml môi trường L-15 được sử dụng làm chất chủng đối chứng để đối chứng). Trong các nghiên cứu khác, cá mú được chủng bằng cách ngâm cá trong bể chứa virut (môi trường môi trường L-15 được sử dụng làm chất chủng đối chứng).

Ví dụ 3. Việc chết của cá mú gây ra bởi một số chủng RGNNV

Cá mú Châu Âu cân nặng trung bình 2,5 g được tiêm trong cơ với $1,0 \times 10^6$, $2,5 \times 10^5$, $1,0 \times 10^5$ hoặc $1,0 \times 10^4$ TCID₅₀/con virut phân lập SpDI-IAusc1688.08 (hệ gen RGNNV). Cá được tiêm một cách tương tự với $2,5 \times 10^5$ TCID₅₀/con virut ERV378/102-5/04 phân lập kiểu gen RGNNV (được liệt kê là đối chứng dương trên Fig. 2). ERV378/102-5/04 phân lập gây ra tỷ lệ chết tích lũy 69% trong thử nghiệm này.

Trong thử nghiệm khác (Lopez-Jimena et al, 2011) đã chỉ ra rằng, cá mú Châu Âu con (khối lượng trung bình $10 \pm 0,3$ g; n=100) được thử với 10^6 TCID₅₀

ERV378/102-5/04 RGNNV phân lập bằng cách tiêm i.m., tỷ lệ cá chết tích lũy là 37%. Sự phân tích dịch đồng nhất mô (não và mắt) từ cá chết bằng cách chủng môi trường nuôi cấy tế bào đã chứng minh sự có mặt của RGNNV trong tất cả các mẫu được phân tích. Sự xác định virus được xác nhận sau đó sử dụng RT-PCR.

Ví dụ 4. Các kiểu gen betanodavirus khác nhau và tỷ lệ cá chết

Cá mú khối lượng 5g được tiêm trong cơ với VNN phân lập: SJ93Nag (SJNNV genotype), ERV378/102-5/04 phân lập (RGNNV), và SpSs-IAusc160.03 (virus với ARN1 RGNNV và ARN2 SJNNV). Thử nghiệm 0,1 ml của môi trường L-15 được tiêm trong nhóm đối chứng, trong đó liều dùng $2,5 \times 10^5$ TCID₅₀/con của các virus được sử dụng. Nhiệt độ được đo hàng ngày và được duy trì trong khoảng xấp xỉ 22-25 °C. Các triệu chứng điển hình của VNN và tỷ lệ chết chỉ được ghi nhận ở cá được chủng với RGNNV (tỷ lệ chết tích lũy 47 %), và virus với hai hai ARN nêu trên (tỷ lệ chết tích lũy 33 %). Không ghi nhận được con cá nào bị chết từ nhóm SJ93Nag hoặc nhóm đối chứng (Fig. 1).

Ví dụ 5. Sự xác định các kháng thể kháng VNNV ở cá sống sót

Huyết thanh từ 5 con cá sống sót từ Ví dụ 4 được thu lại và được sàng lọc nhằm phát hiện kháng thể kháng betanodavirus bằng ELISA. Các đĩa ELISA được phủ với SJ93Nag (hệ gen SJNNV), SpSs-IAusc160.03 (ARN1 RGNNV/ARN2 SJNNV) hoặc RGNNV (Lopez-Jimena *et al*, 2011) và huyết thanh được tập hợp (pha loãng 1/32) được phân tích 3 lần. Mật độ quang (optical density - OD) được xác định ở 450 nm. OD trung bình của các giếng đối chứng âm (PBS thay cho huyết thanh cá) (lặp lại ba lần) là ở ngưỡng tới hạn được xem xét.

Bảng 1 chỉ ra các giá trị OD trung bình và độ lệch tiêu chuẩn (standard deviation - SD) của ba bản sao. Giá trị tới hạn là 0,305.

Bảng 1. Giá trị OD trung bình và độ lệch tiêu chuẩn của sự phát hiện kháng thể
kháng VNN sử dụng ELISA

	2g huyết thanh cá mú	2g huyết thanh cá mú	2g huyết thanh cá mú	2g huyết thanh cá mú
	Đối chứng	Đối chứng 30 dpi	Đối chứng 0 dpi	Kháng nguyên
Trung bình	0,026472222	0,041805556	0,037916667	SJ93Nag
SD	0,005738112	0,009912581	0,013670731	
Trung bình	0,026583333	0,040805556	0,04625	RG ARN1/SJ ARN2
SD	0,006437736	0,008921468	0,004714045	
Trung bình	0,039361111	0,052694444	0,061583333	RGNNV
SD	0,005853141	0,010286633	0,017913372	
	5g huyết thanh cá mú	5g huyết thanh cá mú	5g huyết thanh cá mú	Kháng nguyên
	SJ93Nag	RG ARN1/SJ ARN2	RGNNV	
Trung bình	0,83281944	0,871597222	0,83670833	SJ93Nag
SD	0,07542865	0,085379111	0,07819065	
Trung bình	0,82926389	0,86881944	0,84126389	RG ARN1/SJ ARN2
SD	0,10151373	0,067798995	0,11232756	
Trung bình	0,05815278	0,126152778	0,42470833	RGNNV
SD	0,02060295	0,079490973	0,09031488	

Mức cao của hệ gen virus và các hạt virus gây nhiễm được ghi nhận ở não của cá sống sót được chủng với SJNNV phân lập, mặc dù không có cá chết hoặc dấu hiệu lâm sàng. Đáp ứng kháng sinh đặc hiệu được đo bằng ELISA không trực tiếp, chỉ quan sát thấy ở các nhóm được chủng VNN, với chuẩn giá của 1/1024, 1/4096 và 1/8192 cho cá được chủng RGNNV, SJNNV và virus lai của hai loại này một cách tương ứng.

Ví dụ 6. Hiệu quả của kích thước của cá mủ đối với sự chết

Cá mủ Châu Âu khối lượng trung bình 2,5g được tiêm trong cơ với $2,5 \times 10^5$ TCID₅₀/con virus ERV378/102-5/04 phân lập (kiểu gen RGNNV). Số lượng cá chết được ghi chép hàng ngày. ERV378/102-5/04 phân lập của RGNNV gây ra tỷ lệ cá chết tích lũy là 69%. Như đề cập trong ví dụ 4, sự chủng tương tự của cá mủ khối lượng trung bình 5g gây ra tỷ lệ cá chết tích lũy là 47%. Dữ liệu cho 2,5 và 5g được thể hiện trên Fig. 3. Trong lần thử thứ ba, sự chủng 10^6 TCID₅₀ cùng virus với cá mủ khối lượng trung bình 10g thu được tỷ lệ cá chết tích lũy là 37%. Kích thước cá do đó liên quan một cách tỷ lệ nghịch với tỷ lệ chết đối với sự nhiễm gen RGNNV.

Ví dụ 7. Các thử nghiệm gây nhiễm lại ở cá

Các nghiên cứu được thực hiện để theo dõi tiến trình bệnh ở cá mủ được gây nhiễm với RGNNV, khi cá mủ trước đó đã được gây nhiễm với SJNNV.

Cá mủ non Châu Âu (khối lượng trung bình 10-15 g) được đưa vào bốn thùng thể tích 600l khác nhau:

Nhóm đối chứng không được gây nhiễm (n = 150): được tiêm trong cơ với môi trường L-15 (0,1 ml) ở thời điểm 0 và lặp lại 24 giờ sau;

- 1) Nhóm đối chứng không được gây nhiễm (n = 150): được tiêm trong cơ với 0,1 ml môi trường L-15 ở thời điểm 0 và 25 giờ sau;
- 2) Nhóm đối chứng được gây nhiễm SJNNV (n = 150): được tiêm trong cơ với $1,5 \times 10^6$ TCID₅₀ SJNNV (SJ93Nag phân lập) ở thời điểm 0 và với môi trường L-15 (0,1 ml) 24 giờ sau;
- 3) Nhóm đối chứng được gây nhiễm RGNNV (n = 150): được tiêm trong cơ với môi trường L-15 (0,1 ml) ở thời điểm 0 và với $1,5 \times 10^6$ TCID₅₀ RGNNV (ERV378/102-5/04 phân lập) 24 giờ sau;

- 4) Nhóm được gây nhiễm lại ($n = 150$): được tiêm trong cơ với $1,5 \times 10^6$ TCID₅₀ SJNNV (SJ93Nag phân lập) ở thời điểm 0 và sau đó với $1,5 \times 10^6$ TCID₅₀ RGNNV (ERV378/102-5/04 phân lập) 24 giờ sau.

Từ mỗi nhóm thử nghiệm, 50 con cá được giữ tách biệt để xác định tỷ lệ chết tích lũy. 100 con cá còn lại được sử dụng làm mẫu (xem dữ liệu trong Ví dụ 8-10). Nhiệt độ của nước được duy trì trong khoảng từ 22 đến 24°C trong tiến trình thử nghiệm. Số lượng chết được ghi chép hàng ngày và cá chết được làm đông tại -80°C để sử dụng trong các nghiên cứu virus sau đó.

Đối với nhóm đối chứng được gây nhiễm SJNNV (Nhóm 2), cũng như trong nhóm đối chứng không được gây nhiễm (Nhóm 1), không quan sát thấy cá bị chết (Fig. 4).

Đối với nhóm đối chứng được chủng RGNNV (Nhóm 3), cá chết đầu tiên được phát hiện ở thời điểm 6 ngày sau khi gây nhiễm. Tỷ lệ cá chết ổn định ở khoảng 76%, 15 ngày sau gây nhiễm.

Trong nhóm gây nhiễm lại (Nhóm 4), mặc dù cá thể hiện màu đậm và hành vi bơi bất thường, chỉ có 2 con cá bị chết (tỷ lệ chết tích lũy là 4%). Trong nhóm này, sự gây nhiễm SJNNV làm giảm một cách đáng kể sự chết cá quan sát thấy khi cá được gây nhiễm RGNNV mà không được gây nhiễm SJNNV trước đó (Nhóm 3).

Ví dụ 8. Virus từ cá bị nhiễm RGNNV đã chết trong thử nghiệm gây nhiễm lại

Cá chết từ nhóm đối chứng được gây nhiễm với RGNNV (Nhóm 3), từ thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 7, được thử nghiệm xác định sự có mặt của virus. Mô não và mắt từ cá chết vào ngày thứ sáu và ngày thứ 12 sau khi gây nhiễm được thu lại, và được làm đồng nhất 20% (khối lượng/thể tích) môi trường L-15 được bổ sung với 1% penicillin-streptomycin và 2% huyết thanh bào thai bò. Dịch đồng nhất được xử lý bằng 10% penicillin-streptomycin ở 4°C qua đêm. Dịch đồng nhất sau đó được ly tâm hai lần ở 7,500 x g ở 4°C trong 15 phút, và 100µl dịch nổi được sử dụng để chuẩn giá trên các tế bào E-11 để xác định TCID₅₀. Dữ liệu được thể hiện trong Bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Chuẩn giá virus từ cá chết từ nhóm đối chứng được gây nhiễm RGNNV

Số ngày sau khi gây nhiễm quan sát thấy cá chết	Chuẩn giá virus (TCID ₅₀ /g)
6	1,6 x10 ⁹
12	1,6 x10 ⁸

Các dữ liệu này chỉ ra rằng virus có thể phân lập được từ cá chết.

Ví dụ 9. Định lượng gen virus từ cá nhiễm SJNNV, được gây nhiễm lại RGNNV trong các thử nghiệm gây nhiễm lại

Sự định lượng gen virus ở cá từ nhóm gây nhiễm lại (Nhóm 4), từ thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 7, được thực hiện. 9 con cá sống được chọn ngẫu nhiên từ nhóm 4 ở 12 giờ, 3 ngày, và 7 ngày sau khi gây nhiễm lại RGNNV. Cá được gây chết bằng dùng quá liều thuốc gây mê (MS-222, Sigma), và não và mắt từ 3 con cá ở mỗi thời điểm được thu lại cùng nhau, được làm đông ngay lập tức trong nitơ lỏng và được lưu ở -80°C cho đến khi sử dụng.

Các cơ quan được thu lại được đồng nhất trong môi trường L-15 (20% khối lượng/thể tích) được bổ sung với 1% penixilin-streptomycin và 2% FBS. Dịch đồng nhất được ly tâm hai lần ở 7,500 x g ở 4°C trong 15 phút. Thể tích 200 µl của ba dịch đồng nhất trong, ở mỗi thời điểm lấy mẫu được sử dụng để chiết ARN tổng.

Sự chiết RNA được thực hiện sử dụng Trizol® (Invitrogen). Nồng độ ARN thu được được xác định ở 260nm sử dụng hệ ND-1000 (NanoDrop Thermo Scientific). ARN được lưu ở -80°C đến khi sử dụng.

Sự tổng hợp cADN từ ARN được thực hiện sử dụng bộ kit tổng hợp phiên mã cADN mạch thứ nhất (Roche). Phản ứng được thực hiện với 1µg ARN tổng. Nồng độ cADN được xác định ở 260nm sử dụng hệ ND-1000. cADN được lưu ở -20°C đến khi sử dụng.

Gen virus được định lượng sử dụng phương pháp PCR thời gian thực tuyệt đối dựa trên SYBR Green I (qPCR) phát hiện một cách tách biệt, các đoạn ARN2 của gen của RGNNV và SJNNV. Đặc biệt là, ARN2 của RGNNV được định lượng sử dụng quy trình đã được mô tả (Lopez-Jimena et al, 2011). Đoạn ARN2 của SJNNV được định lượng sử dụng môi SJ-ARN2-F (5'-GACACCACCGCTCCAATTACTAC-3', các nucleotit 665-687) (SEQ ID NO. 6) và SJ-ARN2-R (5'-

ACGAAATCCAGTGTAACCGTTGT-3', các nucleotit 739-717) (SEQ ID NO. 7), mà phóng đại đoạn 75-bp trong vùng T4 (số tiếp cận ở ngân hàng gen D30814), sử dụng các điều kiện PCR đã được mô tả (Lopez-Jimena và et al, 2011).

Các khác biệt đáng kể giữa số các bản sao của mỗi đoạn gen virus ở các thời điểm khác nhau, đó là được tính toán bằng ANOVA một con đường, theo sau bởi thử nghiệm sai khác nhỏ nhất có nghĩa của Fisher (Fisher's Least Significant Difference - LSD). Sự phân tích thống kê được thực hiện sử dụng phần mềm thống kê IBM SPSS. Trị số $p < 0,05$ được xem là có nghĩa.

Để định lượng hệ gen RGNNV, dữ liệu (Fig. 5) thể hiện sự giảm đáng kể ở việc sao chép RGNNV trong nhóm gây nhiễm lại (Nhóm 4) ở 7 ngày sau khi gây nhiễm lại với RGNNV (8 ngày sau khi gây nhiễm với SJNNV) khi so sánh với nhóm đối chứng được chủng RGNNV (Nhóm 3) (Fig. 5).

Ngược lại, không có sự khác biệt đáng kể nào quan sát thấy khi sự sao chép SJNNV ở nhóm gây nhiễm lại (Nhóm 4) so với nhóm đối chứng được gây nhiễm SJNNV (Nhóm 2) (Fig. 6).

Ví dụ 10. Biểu hiện gen gây nhiễm Interferon (IFN) trong các thử nghiệm gây nhiễm lại

Cá từ các thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 7 được kiểm tra biểu hiện phiên mã của gen cảm ứng IFN, Mx, sử dụng RT-qPCR (qPCR thời gian thực). Dữ liệu thể hiện không có sự biểu hiện phiên mã của Mx ở cá từ nhóm đối chứng được gây nhiễm RGNNV (Nhóm 3) từ 0 đến 48 giờ sau khi gây nhiễm. Ngược lại, sự biểu hiện phiên mã Mx là tăng ở cá từ nhóm đối chứng được gây nhiễm NJNNV (Nhóm 2) và từ nhóm gây nhiễm lại (Nhóm 4). Các dữ liệu này chỉ ra rằng sự nhiễm của cá bởi SJNNV có thể cảm ứng gen cảm ứng IFN, Mx, trong khi RGNNV không cảm ứng. Các kết quả này gợi ý rằng sự cảm ứng của hệ trung gian bởi IFN sự gây nhiễm trước đó với SJNNV có thể khiến giảm tỷ lệ chết được ghi nhận trong nhóm gây nhiễm lại, bảo vệ cá mủ khỏi ảnh hưởng của sự gây nhiễm sau đó với RGNNV.

Ví dụ 11. Các thử nghiệm gây nhiễm lại trong các tế bào được nuôi cấy

Các nghiên cứu được thực hiện để điều tra hiệu quả của sự đồng gây nhiễm với SJNNV và RGNNV đối với sự sao chép và nhân lên của mỗi virus. Số bản sao gen virus trong các tế bào bị nhiễm, và sự sản xuất các hạt virus lây nhiễm được tạo bởi các tế bào bị nhiễm được xác định. Các tế bào được phát triển trong các đĩa 24 giếng.

Các lớp đơn của tế bào theo con đường thứ hai, gồm ba mẫu, được gây nhiễm 0,1 lần ở 25°C, nhiệt độ tối ưu cho sự nhân lên của cả SJNNV và RGNNV. Các nhóm thử nghiệm được thể hiện trong Bảng 3 dưới đây. Trong mỗi nhóm thử nghiệm, các tế bào E-11 không được chủng được dùng làm đối chứng.

Bảng 3. Các nhóm thử nghiệm và thời gian lấy mẫu được phân tích

Nhóm	Gen virus được chủng	Giờ các mẫu gây nhiễm sau được lấy
1	Nhóm đối chứng được gây nhiễm SJNNV	0 ^a , 12, 24, 48, 72, 96
2	Nhóm đối chứng được gây nhiễm RGNNV	0 ^a , 12, 24, 48, 72, 96
3	Nhóm đồng gây nhiễm với SJNNV + RGNNV	0 ^a , 12, 24, 48, 72, 96
4	Nhóm gây nhiễm lại SJNNV → 24 giờ → RGNNV	0 ^{a,b} , 12 ^b , 24 ^b , 24 ^c , 48 ^c , 72 ^c (SJNNV) 0 ^{a,c} , 12 ^c , 24 ^c , 48 ^c , 72 ^c , 96 ^c (RGNNV)
5	Nhóm gây nhiễm lại RGNNV → 24 giờ → SJNNV	0 ^{a,d} , 12 ^d , 24 ^d , 24 ^e , 48 ^e , 72 ^e (RGNNV) 0 ^{a,e} , 12 ^e , 24 ^e , 48 ^e , 72 ^e , 96 ^e (SJNNV)
^a Các mẫu được lấy 1 giờ sau khi hấp phụ virus ^b Thời điểm sau khi gây nhiễm SJNNV ^c Thời điểm sau khi gây nhiễm lại RGNNV ^d Thời điểm sau khi gây nhiễm RGNNV ^e Thời điểm sau khi gây nhiễm lại SJNNV		

Ở các thời điểm được chỉ ra trong Bảng 3, cả các tế bào và dịch nổi được thu từ 2 giếng của mỗi nhóm thử nghiệm. Đối chứng âm được thu ở cuối thử nghiệm. ARN tổng được chiết từ các tế bào sử dụng Trizol®, như được mô tả trong Ví dụ 9. cADN

được tổng hợp sử dụng hệ thống tổng hợp giải thứ nhất SuperScript™ II cho RT-PCR (Invitrogen), theo hướng dẫn của nhà sản xuất và thêm các hexame ngẫu nhiên (50 ng) và 1 µg ARN tổng trong mỗi phản ứng. Gen virus được định lượng sử dụng PCR thời gian thực tuyệt đối dựa trên SYBR Green I (qPCR), và dữ liệu được phân tích, cũng như được mô tả trong Ví dụ 9.

Để xác định các chuẩn giá virus, một phần dịch nổi không chứa tế bào được chuẩn giá để xác định TCID₅₀ (Ví dụ 1). Trong nhóm từ 3 đến 5, các thử nghiệm trung hòa được thực hiện trước khi chuẩn giá sử dụng các kháng thể đa dòng sau đây (pha loãng 1/100 trong môi trường L-15, được bổ sung với 1% penixilin-streptomycin): (i) ab26812 kháng NNV (Abcam), mà trung hòa gen của RGNNV, và (ii) kháng thể kháng được phát triển trong thỏ (Dr T. Nakai, University of Hiroshima, Japan), mà trung hòa SJNNV.

Fig. 7 thể hiện việc đo số lượng bản sao ARN2 của SJNNV trong các tế bào bị nhiễm. Fig. 7A thể hiện số lượng bản sao SJNNV trong nhóm đồng gây nhiễm với SJNNV + RGNNV (Nhóm 3), so với số lượng bản sao SJNNV trong nhóm đối chứng được gây nhiễm NJNNV (Nhóm 1). Fig. 7B thể hiện số lượng bản sao SJNNV trong gây nhiễm với SJNNV, 24 giờ sau ở nhóm đồng gây nhiễm RGNNV (Nhóm 4), so sánh với số lượng bản sao trong nhóm đối chứng được gây nhiễm NJNNV (Nhóm 1). Fig. 7C thể hiện số lượng bản sao SJNNV trong gây nhiễm với RGNNV, 24 giờ sau ở nhóm gây nhiễm lại SJNNV (Nhóm 5), so với số lượng bản sao trong nhóm đối chứng được gây nhiễm NJNNV (Nhóm 1). Các cột thể hiện độ lệch tiêu chuẩn từ hai mẫu khác nhau. Các thay đổi đáng kể về mặt thống kê ($p < 0,01$) được thể hiện bằng dấu sao.

Fig. 8 thể hiện việc đo số bản sao của ARN2 của RGNNV trong các tế bào bị nhiễm. Fig. 8A thể hiện số bản sao RGNNV trong nhóm đồng gây nhiễm SJNNV + RGNNV (Nhóm 3), so với số bản sao RGNNV trong nhóm đối chứng được gây nhiễm RGNNV (Nhóm 2). Fig. 8B thể hiện số bản sao RGNNV trong sự gây nhiễm SJNNV, 24 giờ sau ở nhóm đồng gây nhiễm RGNNV (Nhóm 4), so với số lượng bản sao trong nhóm đối chứng được gây nhiễm RGNNV (Nhóm 2). Fig. 8C thể hiện số bản sao RGNNV trong gây nhiễm RGNNV, 24 giờ sau ở nhóm gây nhiễm lại SJNNV (Nhóm 5), so với số lượng bản sao trong nhóm đối chứng gây nhiễm RGNNV (Nhóm

2). Các cột thể hiện độ lệch tiêu chuẩn của hai mẫu khác nhau. Các thay đổi đáng kể về mặt thống kê ($p < 0,01$) được thể hiện bởi dấu sao.

Dữ liệu từ các thử nghiệm này chỉ ra rằng, trong các tế bào được gây nhiễm với SJNNV và RGNNV: i) sự sao chép gen của SJNNV được ức chế một phần với sự có mặt của RGNNV; ii) sự sao chép gen RGNNV được kích thích với sự có mặt của SJNNV, và iii) các hiệu quả đối với sự sao chép gen không tương quan với sự sản xuất virus lây nhiễm.

Các dữ liệu chỉ ra sự ức chế sao chép của SJNNV bởi RGNNV được mô tả như sau. Trong nhóm đồng gây nhiễm (Nhóm 3), dữ liệu (Fig. 7A) thể hiện sự giảm ở số lượng bản sao của gen SJNNV, khi so với nhóm đối chứng (Nhóm 1), ở thời điểm 12 và 48 giờ. Điều này là rõ ràng hơn trong thử nghiệm trong đó các tế bào được gây nhiễm RGNNV được gây nhiễm lại 24 giờ sau với SJNNV (Nhóm 5). Trong thử nghiệm này, dữ liệu (Fig. 7C) thể hiện sự giảm số lượng bản sao gen SJNNV, khi so với nhóm đối chứng (Nhóm 1), ở thời điểm 0, 12, 24, 48, 72 và 96 giờ. Sự giảm số lượng bản sao gen SJNNV là không tương quan một cách rõ ràng với các chuẩn giá của virus SJNNV bởi các tế bào.

Dữ liệu này chỉ ra sự thúc đẩy sao chép RGNNV bởi SJNNV được mô tả như sau. Trong nhóm đồng gây nhiễm (Nhóm 3), dữ liệu (Fig. 8A) thể hiện sự tăng số lượng bản sao gen RGNNV, khi so với nhóm đối chứng (Nhóm 2), ở thời điểm 24, 48 và 72 giờ. Điều này là rõ ràng hơn trong thử nghiệm trong đó các tế bào được gây nhiễm SJNNV được gây nhiễm lại 24 giờ sau với RGNNV (Nhóm 4). Trong thử nghiệm này, dữ liệu (Fig. 8B) thể hiện sự tăng số lượng bản sao gen RGNNV khi so với nhóm đối chứng (Nhóm 2), ở thời điểm 0, 12, 24 và 48 giờ. Tuy nhiên, ở 96 giờ, số lượng bản sao gen RGNNV bị giảm đi so với nhóm đối chứng. Sự tăng số lượng bản sao gen RGNNV là không tương quan một cách rõ ràng với các chuẩn giá của virus RGNNV tạo ra bởi các tế bào.

Chúng tôi cũng đã thấy rằng sự gây nhiễm của các tế bào với SJNNV, trước hoặc xấp xỉ đồng thời với sự gây nhiễm với RGNNV, ít nhất ban đầu thúc đẩy sự sao chép của ARN RGNNV trong các tế bào, khi so với sự sao chép của RGNNV trong các tế bào không chứa SJNNV. Hiệu quả đối với sự sao chép này có thể không tương quan với virus lây nhiễm được tạo ra bởi các tế bào bị gây nhiễm.

Chúng tôi cũng thấy rằng sự gây nhiễm các tế bào với RGNNV, trước hoặc xấp xỉ đồng thời với sự gây nhiễm SJNNV, ức chế một phần sự sao chép của ARN SJNNV trong các tế bào, khi so với sự sao chép của SJNNV trong các tế bào mà không chứa RGNNV. Hiệu quả đối với sự sao chép này có thể không tương quan với virut lây nhiễm được tạo ra bởi các tế bào bị gây nhiễm.

Trong khi các chế phẩm, các phương pháp ví dụ, và v.v. được minh họa bằng cách mô tả, và trong khi sự mô tả là chi tiết một cách đáng kể, các chủ đơn không nhằm giới hạn hoặc theo bất kì cách nào giới hạn phạm vi đơn. Tất nhiên, không thể mô tả các phối hợp có thể có của các thành phần và hoặc phương pháp cho mục đích mô tả các chế phẩm, các phương pháp và v.v. được mô tả trong bản mô tả này. Các lợi ích và biến đổi bổ sung sẽ là rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Do đó, sự bộc lộ không bị giới hạn ở các chi tiết cụ thể, thiết bị đại diện và các ví dụ minh họa được thể hiện và mô tả. Do đó, đơn sáng chế không nhằm bao gồm tất cả các sửa đổi, biến đổi và các biến thể nằm trong phạm vi của đơn. Ngoài ra, phần mô tả trên đây không có nghĩa giới hạn phạm vi của sáng chế. Ngoài ra, phạm vi của sáng chế được xác định bởi các yêu cầu bảo hộ kèm theo và các phương án tương đương của chúng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Vacxin chứa virus gây hoại tử thần kinh cá măng sọc (SJNNV), trong đó vacxin này bảo vệ cá chống lại việc nhiễm virus gây hoại tử thần kinh cá mú chấm đỏ (RGNNV); trong đó cá này được chọn từ nhóm bao gồm cá mú Châu Âu, cá bơn Senegalese, cá tráp đầu vàng, cá tráp đỏ, cá tráp thường, cá tráp trắng và cá đù tự nhiên; và trong đó SJNNV ở dạng SJNNV bị bất hoạt bằng nhiệt hoặc bằng phương pháp hóa học.
2. Vacxin theo điểm 1, trong đó SJNNV là SJNNV có trình tự nucleotit cADN có phần trăm mức độ giống ít nhất 95% với trình tự nucleotit của các nucleotit từ 604 đến 1030 của SEQ ID NO: 4.
3. Vacxin theo điểm 1, trong đó SJNNV là SJNNV có trình tự axit amin có phần trăm mức độ giống ít nhất 95% với trình tự axit amin của các axit amin từ 204 đến 331 của SEQ ID NO: 5.
4. Vacxin theo điểm 1, trong đó bao gồm ít nhất khoảng 1×10^4 TCID₅₀ SJNNV trên mỗi liều.
5. Vacxin theo điểm 1, trong đó SJNNV bao gồm SJNNV ARN2 có trình tự cADN của SEQ ID NO: 4.
6. Vacxin theo điểm 1, trong đó SJNNV bất hoạt bằng phương pháp hóa học được bất hoạt bằng cách sử dụng etylenimin bậc hai.
7. Vacxin chứa axit nucleic SJNNV; trong đó axit nucleic SJNNV này ở dạng vacxin ADN; và trong đó axit nucleic SJNNV bao gồm trình tự cADN có phần trăm mức độ giống ít nhất 95% với trình tự nucleotit của các nucleotit từ 604 đến 1030 của SEQ ID NO: 4.
8. Vacxin theo điểm 5, trong đó SJNNV còn bao gồm SJNNV ARN1 có trình tự cADN của SEQ ID NO: 1.

1/15

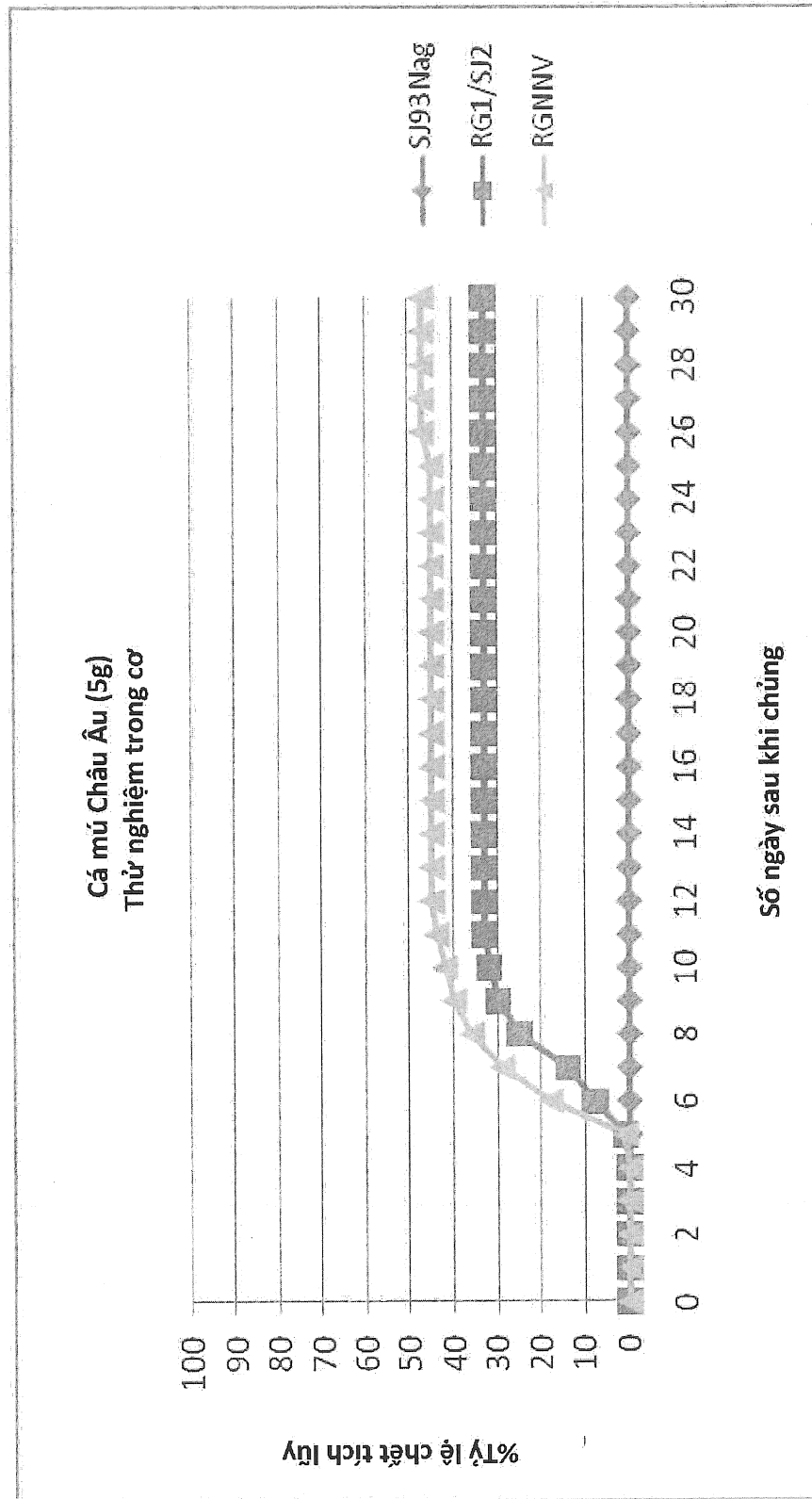
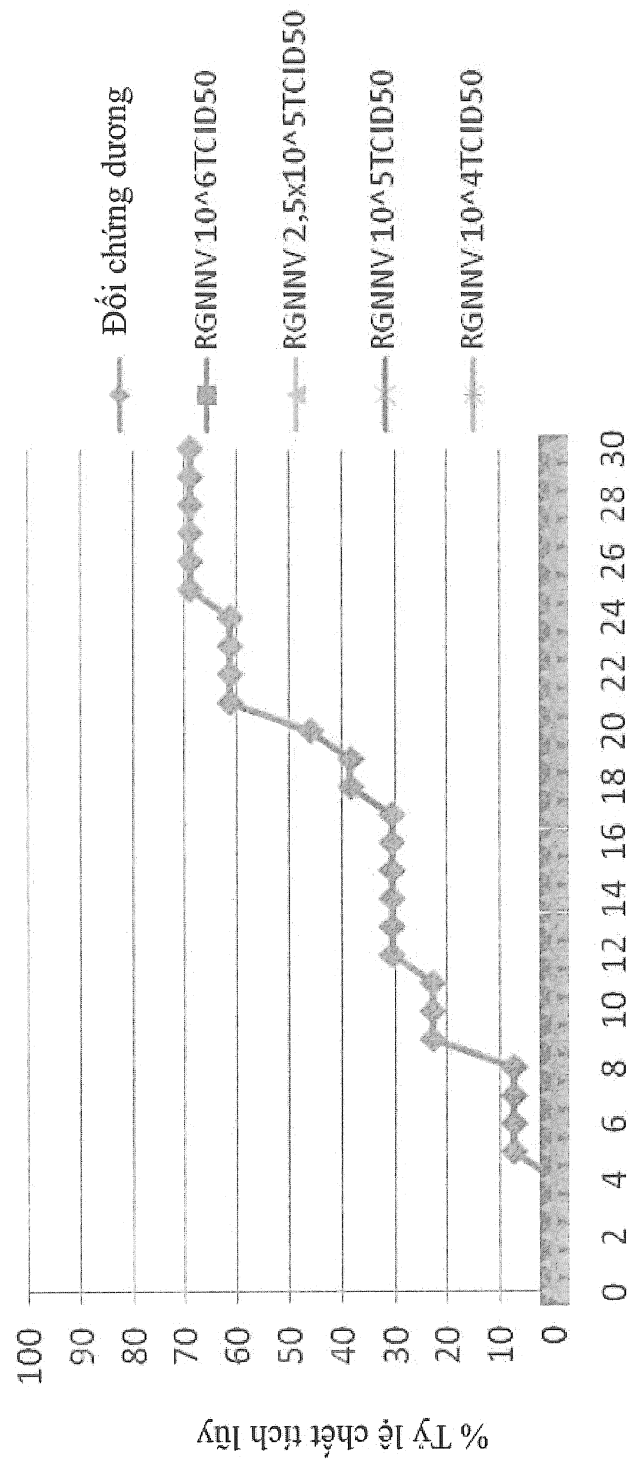


Fig. 1

2/15

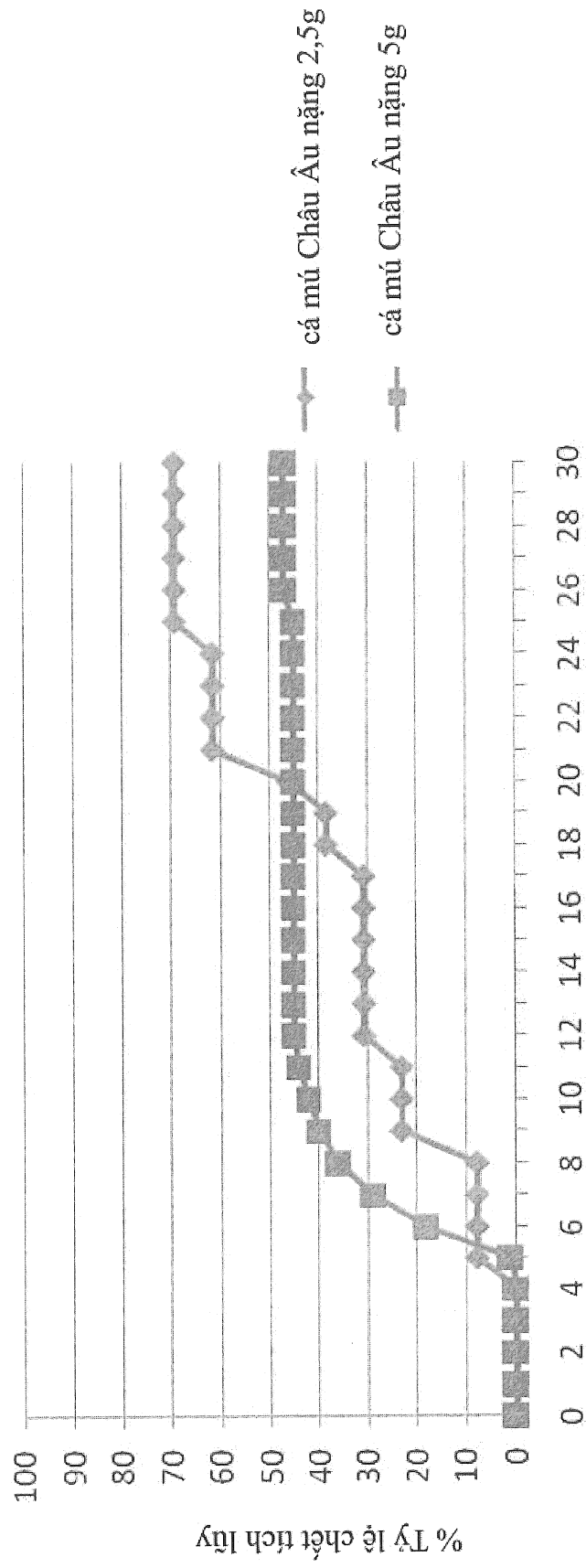
Tiêm trong cơ cá mú Châu Âu khối lượng 2,5g với các liều khác nhau của 2 RGNNV



Số ngày sau khi chủng

Fig. 2

3/15

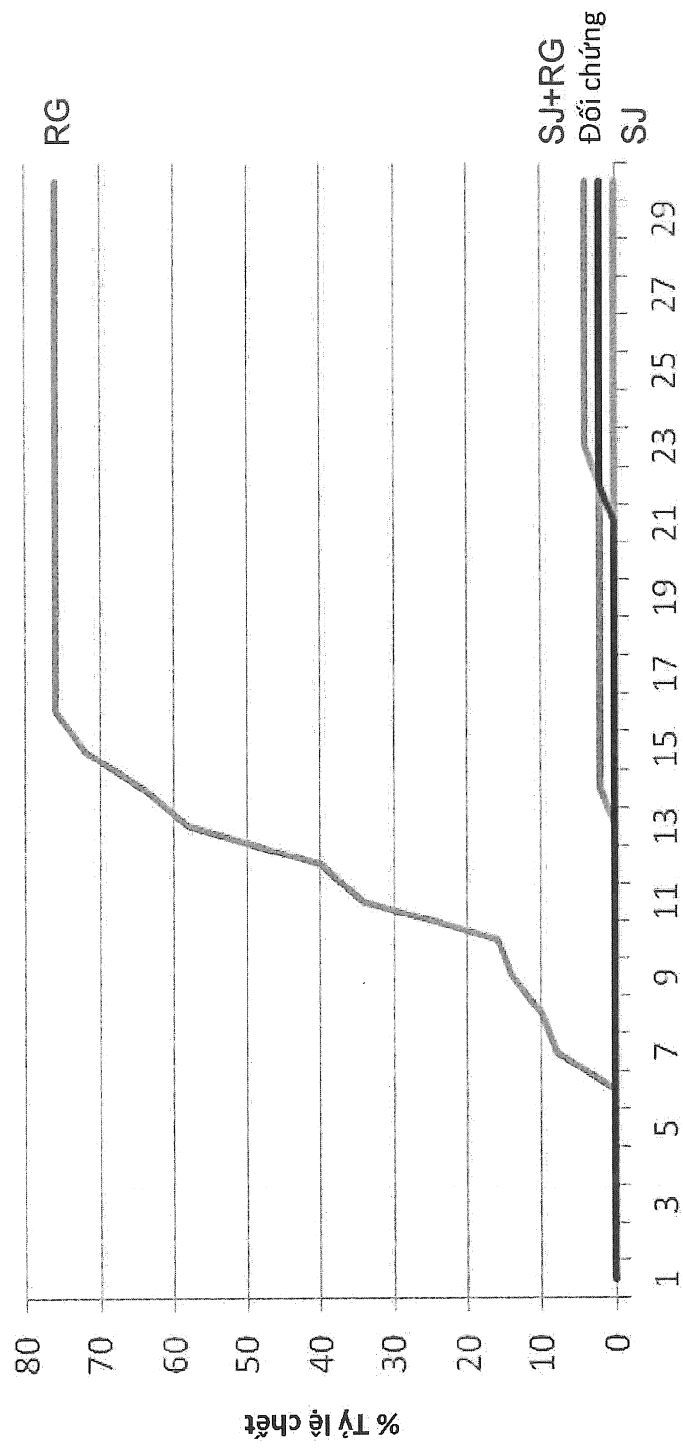
Tiêm trong cơ với liều 10^5 TCID₅₀/g

Số ngày sau khi chủng

Fig. 3

4/15

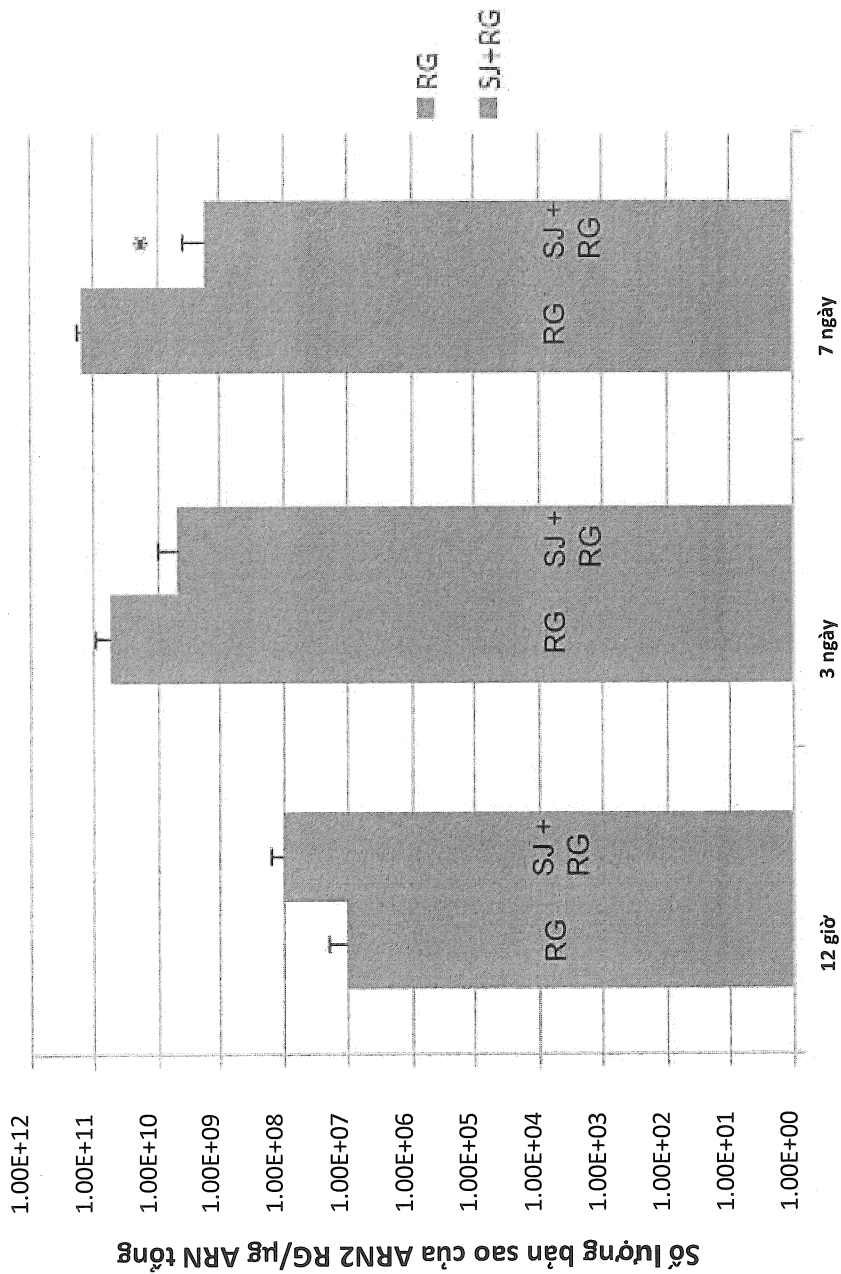
% Tỷ lệ chết tích lũy



Số ngày sau khi chủng

Fig. 4

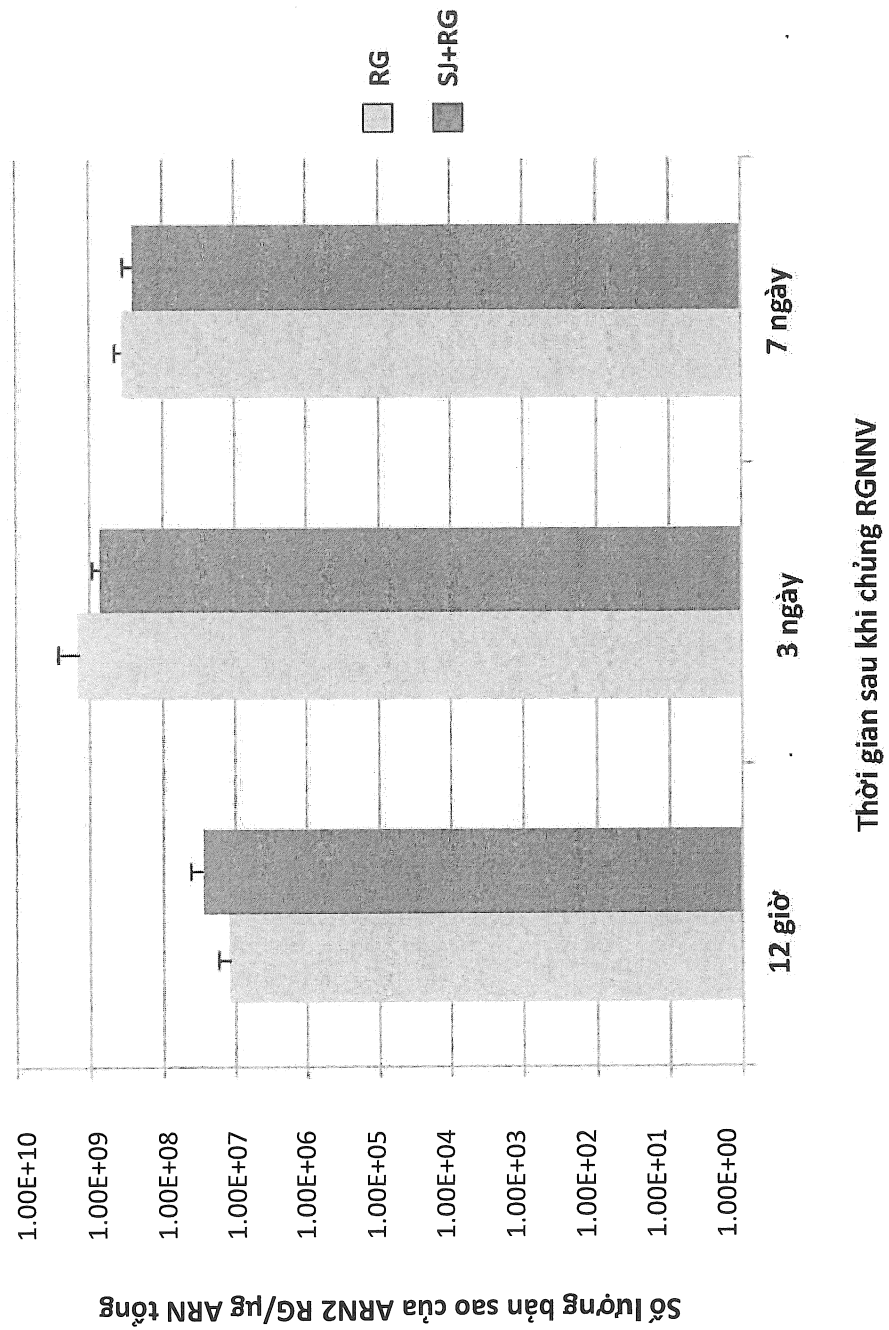
5/15



Thời gian sau khi chủng RGNNV

Fig.5

6/15



7/15

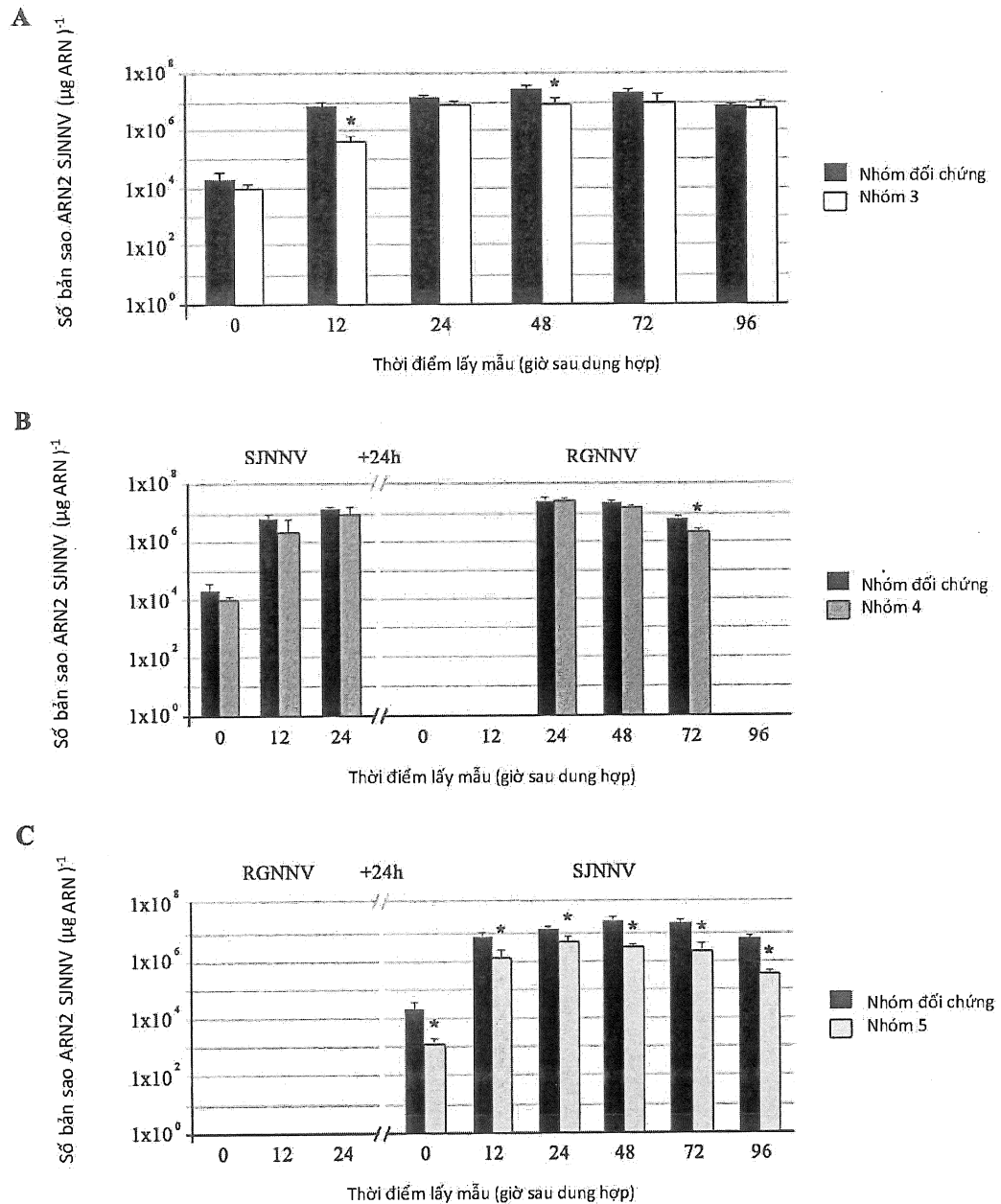


Fig. 7

8/15

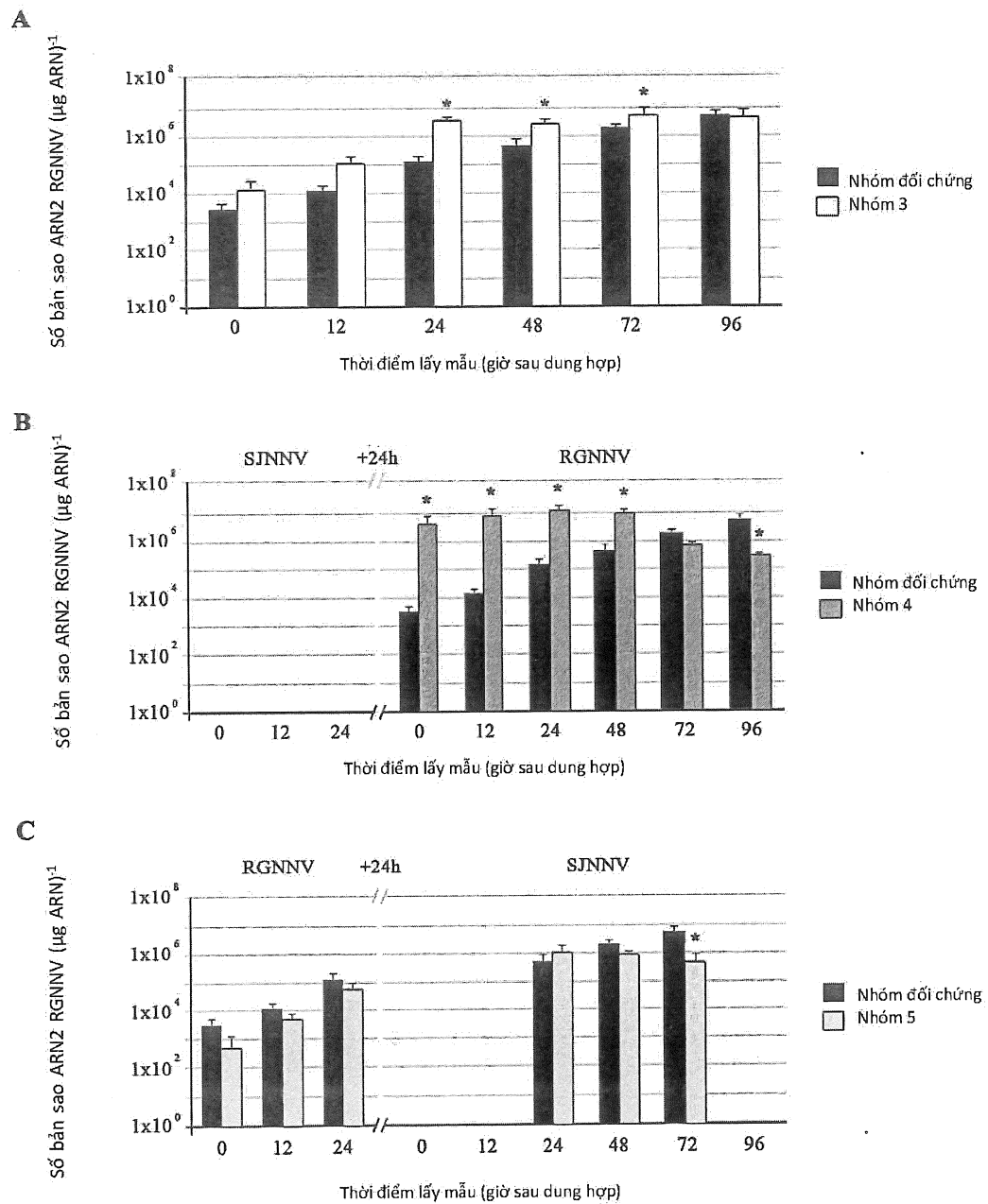


Fig. 8

Fig. 8 : SEQ ID No. 1

Gen virus gây hoại tử thần kinh cá măng sọc mã hóa protein A, protein B, CDS đầy đủ, số tiếp cận ngân hàng gen: AB056571.1

```

1 taacatcagc tcttgctctg ttgttttgaa cacttacgca aggttacgct
ttagcataca
61 atacgacaat tgtaagccat gcgccgcttt gagtttgaac tcgcacgcat
gtctggagca
121 gcattttgtg tcgttacggg ctaccgcctg ttgacatcaa aatggcttgc
ggatagggtt
181 gaggattatc gccaacgtgt cattgcggat cgaaaacaaa ttctccgcga
cgcggcggtg
241 atccgcacga gtatccagaa gcagatggaa ctagtgcgca tttcagtgcg
caagggccat
301 tcccaccagg aggctgctac cgagcggaac agcgctaccg acaccatgat
cgggtgtggtt
361 gagaaatgtg gctacgagcc atacattatc tcaccctcac cgcgtagaaa
ggagtaccac
421 ggggtcccgtc agttctatag tcttgccgac ttccgtcagg actaccgccc
tgatgaaatc
481 actgaccggc acgttatcgt gatgactgac gttgactatt acgtggatat
gcacgaattg
541 gttggccttg gcgttccgat cctgttgtag acgttccaac ccagcactgt
gtccggggaa
601 gttaaggatg gttattttac cattactgac gaccacgttc actaccgtgt
tgctggtggt
661 aaggacgtgc gccataggat ctggaactac aaccaggata ccatgttcgt
gcgctccaaa
721 ccccggtggtt tctgggcaag tctgaaacag attttgcgcg acattactgg
catcacgct
781 ttgtgtggct acctctatct caaacttggg atagccccgt ttggcgacca
ggttacgttg
841 ttaccgttg accagttcaa gatgggtgag caccgcaaca tcgtctccat
tgttcctttc
901 gcgacttgtc gctccaacct ccttaagatt agtgagtacg gtgctgaatt
ggactacatg
961 cgttaccaac aacgtaataa taacgccaat ttcaatgctg ttacttacat
ctctcaggag
1021 gggcccctga tcagcttggg cctggagggc aatttcgcta gtgtccaact
tccgcttcag

```

10/15

1081 gatttcgaaa acatccgtac tgcttatgaa ctgtcgaaga ataacaattt
 gtcagatact
 1141 gttegtcggc cggcacgttc gtgtaaggag gcagccataa ttcacaaatg
 ccttcaggcc
 1201 ggggtgcgatc tcgctagcga ggtcgtccac aagcctggag agctggcacg
 ccactaccaa
 1261 gctcttggtg acacgtacga catcgacccc tctgagcagg gcaaatgcta
 tgcccgtgag
 1321 taagctcctg ggccgctgac tcaaactgct gtatttccaa gtgagtcgag
 ttccaatgag
 1381 cttgccacga tcgacggcgc tatagcgggt ccgcaggcta aggcaaagag
 ccgcgagcac
 1441 atcactccaa agatgcacaa agtggctagg gatttcgtgc gccatttggc
 gccacggcc
 1501 ggggtcggcc gtccctatcc cctcacgtat gtcgaagagc accagaccaa
 gccgttacag
 1561 cgggcccgga atgatgctaa tcgatatcac gatgagttca ctatgatcgt
 caaggcgttc
 1621 caaaagaaag aagcatacaa tgcccaaac tatccgggga acatatcaac
 tgtcccgcac
 1681 acccaaaacg ttaagctgtc cagctacacc tacgctttca aagaagcagt
 cctccagcat
 1741 gttccgtggc acatgccaac tcacacaccg gctgaaattg ccgaggctgt
 gcagagtttg
 1801 gccgcaagtt ccactgagct ggttgagact gactatagca aattcgacgg
 caggttcctc
 1861 cgtttcatgc gggagaatgt cgaatttgcc atttacaagc gttgggtgca
 cctcgaccat
 1921 ttaacagaat tgtccacact attgggaaat gaactccaag cacctgctgt
 caccggctg
 1981 ggcacaaat atgaccaga ctgcagtcgt cttagcgggt ccgctctcac
 gactgacggg
 2041 aacagcattg caaatgcttt cgtctcatat cttgccggcc gccaaagctgg
 catggatgat
 2101 gacgaggcat ggacttgat tggattgtc tacggtgacg acggctcttag
 atccggaac
 2161 gtgtctgacg cgttgctgtc caaaactgct tcttctctcg gctttgactt
 gaaaatagtg
 2221 aatcgtgcac ctgcgggttc tccagtgcac ttctctctcg gagtttatct
 cgatccctgg
 2281 tcatcaccgg cttccgtgca gtcgccgttg cgcactttgc tcaaactaca
 tactacctgt

11/15

2341 gacacccaat ctgacatcga agacgtcggg tgggctaaga cgcaggcgta
tctagtcact
2401 gactgcttga caccttttat tggccattgg tgtcgggcct accaacgcaa
ttgcactgca
2461 cgtgtggtcc aatacgcaga ctacaacgac attccgttct gggtaagaa
tgaggatcat
2521 gttggaaact catggcctca gtctgactcc gtcgattgga atgacgttgt
tgccaatgag
2581 ctccggcctca ccacagctga gctactcaag cacctcgcgg cgcttgatgc
gtatactggt
2641 cccgtgagcg gacttccccg tctgacaaca tcactcgact tggaaccgaa
gatgcctgtc
2701 gcattagacg gcgaggtcca agccggtcct agtcaacaac ctcaaactga
caaggatgga
2761 acaagtccaa caggcgatcg atcagcacct cgtcgagcta gaacagctct
tcaagatgct
2821 gatggacgtg cgtgtcgctc tcggcggagt gaccgtagtc caggtaaacy
agatgcgaac
2881 gttcgtgata agcgccagcg ccgcagcaca acgcctccgc gctctcgccc
gtcggtaccc
2941 ggccccctcta gcagtggccg cagaaccgat ggagacagag tgagaggagg
agctgcacgc
3001 cagcgccagc gacgtcgctc tccagtgtag gcgagtcacc tgcccgtcc
tcccccccc
3061 ggaccattgg tcccctagtc agctttatgc tgtcctaagc ttcggcg

12/15

Fig. 10A: SEQ ID NO.2

Trình tự axit amin
protein A [virut gây hoại tử thần kinh cá măng sọc]
ngân hàng gen: BAB64329.1

```

1 mrrfefelar msgaafcvt gyrlltskwl adrvedyrqr viadrkqilr
daavirtsiq
61 kqmelvrisv rkghshqaaa ternsatdtm igvvekcgys pyiispspre
keyhgsrqfy
121 sladfrqdyr rdeitdrhvi vmtddvdyvd mhelvglgvp illytfqpst
vsgevkdgyf
181 titddhvhyr vaggkdvrhr iwnynqdtmf vrskprgfw slkqilrdit
gitalcgyly
241 lklgiapfgd qvtlftvdqf kmgehrnivs ivpfatcrsn llkiseygae
ldymryqgrn
301 nnanfnvty isqegplisl glegnfasvq lplqdfenir tayelsknnn
lsdtrrsar
361 sckeaaiihk clqagcdlas evvhkpgela rhyqalgdy didpseqgkc
yareyapgl
421 tqtavfpss rsnelatidg riagpqakak srehitpkmh kvardfvrhl
vptaglrpy
481 pltyveehqt kplqrarnda nryhdeftmi vkafqkkeay napnyprnis
tvphntqnvkl
541 ssytyafkea vlqhvpwypm thtpaeiaea vqslaasste lvetdyskfd
gtflrfmren
601 vefaiykrwv hldhltelst llgnelqapa vtrlgikydp dcsrlsgsal
ttdgnsiana
661 fvsylagrqa gmdddeawtw igivygddgl rsgnvsdall sktasslgfd
lkivnrprg
721 spvtflsrvy ldpwsspasv qsplrtllkl htcdtqsdi edvgwaktqa
ylvtdcltpf
781 ighwcrayqr nctarvvqya dyndipfwvk nedhvgnswp qsdsvdwndv
vanelglta
841 ellkhlaald aytgpvsglp rlttsldlep kmpvaldgev qagpsqqpqt
dkdgsptgd
901 rsaprrarta lqdadgracr srrsdrspgk rdanvrdrq rrsttpprsr
psvpgpsssg
961 rrtgdgdrvrg gaarqrqrrr spv

```

Fig. 10b: SEQ ID NO.2

Trình tự axit amin
protein A [virut gây hoại tử thần kinh cá măng sọc]
ngân hàng gen: BAB64330.1

```
1 meqvqqaidq hlveleqlfk mlmdvrvalg gvtvvqvnem rtfvisasaa  
aqlrlalarr  
61 ypaplavaae pmete
```

14/15

Fig. 10b: SEQ ID NO.4

Trình tự axit amin**virut gây hoại tử thần kinh cá măng sọc mã hóa protein vỏ, cds đầy đủ****ngân hàng gen: AB056572.1**

```

1 taatctaaca ccgctttgca agtcaaaatg gtacgcaaag gtgataagaa
attggcaaaa
61 ccccgacca caaaggccgc caattctcaa ccacgtcgac gtgcaacaca
gcgccgtcgc
121 agtggtaggg ctgatgcacc cttagctaag gcatcgacta tcacgggatt
tggacgtcgc
181 accaatgatg tccatatctc gggaatgtca cggatcgctc aagcagttgt
tccagccggg
241 acaggaacag atggaaagat tgtcgtcgat tccacaatcg ttccagaact
cctgccacgg
301 cttggacacg ctgctcgaat cttccagcga tacgctgttg aaacactgga
gttcgaaatt
361 cagccaatgt gccccgcaaa cacgggcggg ggttacgttg ctggcttcct
gcctgatcca
421 actgacaacg accacacctt cgatcgctc caagcaactc gtggtgcagt
cgtcgccaaa
481 tggtgggaaa gtcgaacagt ccggccccag tatactcgaa cgcttctctg
gacctcaacc
541 ggggaaggagc agcgattgac atcacctggc cggctggtag tcctgtgtgt
tggcagcaac
601 actgatgttg tcaacgtgtc agtcatgtgt cgctggagcg ttgccttag
tgtcccgtcc
661 cttgagacac ctgaggacac caccgctcca attactacc aggcgccact
ccacaacgat
721 tccattaaca acggttacac tggatttcgt tccattctct tgggcgcgac
ccaactcgac
781 ctcgctcctg caaacgctgt ctttgtcact gacaaaccgt tgcccattga
ttacaatctt
841 ggagtgggcg acgtcgaccg ggccgtgtac tggcacctgc ggaagaaagc
tggagacact
901 caggtacctg ctgggtactt tgactgggga ctgtgggatg actttaacaa
gacattcaca
961 gttggggcac cctactactc cgaccagcaa ccacggcaaa tcttgctgcc
ggctggcacg

```

15/15

1021 ctcttcaccc gtgttgactc ggaaaactaa ccgggtcatc cggatcccta
 gtgcgtatcg
 1081 tggatgacca attcgagaaa ttgattacgg cactaaccac tatcaaaatt
 gaaattgaca
 1141 acaacaagag cgaaattgaa gctatcgcta acaaattaa cgacaaagca
 cccaaggagg
 1201 gctcgattgc tattgttggt accattgacg gcgtacctgg aacagttgac
 ggcgcttacc
 1261 tcgccgaacc tgtctagcgt gcttgatacg gtgccagctt caccagtctt
 gtccaacgcc
 1321 gaggatttcc ctctttgggc ttgttgggtt accgtagct ccgcgcagtg
 agcaccaccg
 1381 ccatgtgggtt aaatggccgc tgatcgccac attactcggc g

Fig. 12: SEQ ID NO.5

Trình tự axit amin
protein vỏ [virut gây hoại tử thần kinh cá măng sọc mã]
ngân hàng gen: BAB64331.1

1 mvrkgdkkla kppttkaans qprrratqrr rsgradapla kastitgfr
 atndvhisgm
 61 sriaqavvpa gtgtdgkivv dstivpellp rlghaarifq ryavetlefe
 iqpmcpantg
 121 ggyvagflpd ptdndhtfda lqatrgavva kwesrtvrp qytrtllwts
 tgkeqrлтsp
 181 grlvllcvgs ntdvvnvsvm crwsvrlsvp sletpedtta pittqaplhn
 dsinngytgf
 241 rsillgatql dlapanavfv tdkplpidyn lgvgdvdrav ywhlrkkagd
 tqvpagyfdw
 301 glwddfnktf tvgapyydq qprqillpag tlftrvdsen

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110>	Novartis Tiergesundheit AG University of Malaga	
<120>	Vacxin chứa virus gây hoại tử thần kinh cá măng sọc (SJNNV)	
<130>	x20588	
<150>	EP 13/169590.0	
<151>	2013-05-28	
<150>	EP 13/169591.8	
<151>	2013-05-28	
<150>	PCT/EP2014/060852	
<151>	2014-05-26	
<160>	7	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	3107	
<212>	DNA	
<213>	Virus gây hoại tử thần kinh cá măng sọc	
<400>	1	
	taacatcagc tcttgctctg ttgttttgaa cacttacgca aggttaccgt ttagcataca	60
	atacgacaat tgtaagccat gcgccgcttt gagtttgaac tcgcacgcat gtctggagca	120
	gcattttgtg tcgttacggg ctaccgcctg ttgacatcaa aatggcttgc ggataggggtt	180
	gaggattatc gccaacgtgt cattgcggat cgaaaacaaa ttctccgcga cgcggcgggtg	240
	atccgcacga gtatccagaa gcagatggaa ctagtgcgca tttagtgcg caagggccat	300
	tcccaccagg aggctgctac cgagcggaac agcgctaccg acaccatgat cgggtgtgggtt	360
	gagaaatgtg gctacgagcc atacattatc tcaccctcac cgcgtgagaa ggagtaccac	420
	gggtcccgtc agttctatag tcttgccgac ttccgtcagg actaccgccg tgatgaaatc	480
	actgaccggc acgttatcgt gatgactgac gttgactatt acgtggatat gcacgaattg	540

gttggccttg gcgttccgat cctgttgtag acgttccaac ccagcactgt gtccggggaa	600
gttaaggatg gttatatttac cattactgac gaccacgttc actaccgtgt tgctgggtgg	660
aaggacgtgc gccataggat ctggaactac aaccaggata ccatgttcgt gcgctccaaa	720
ccccgtgggt tctgggcaag tctgaaacag attttgcgcg acattactgg catcaccgct	780
ttgtgtggct acctctatct caaacttggg atagccccgt ttggcgacca ggttacgttg	840
ttcaccgttg accagttcaa gatgggtgag caccgcaaca tcgtctccat tgttcctttc	900
gcgacttgct gtcceaact ccttaagatt agtgagtacg gtgctgaatt ggactacatg	960
cgttaccaac aacgtaataa taacgccaat ttcaatgctg ttacttacat ctctcaggag	1020
gggcccctga tcagcttggg cctggagggc aatttcgcta gtgtccaact tccgcttcag	1080
gatttcgaaa acatccgtac tgcttatgaa ctgtcgaaga ataacaattt gtcagatact	1140
gttcgtcggc cggcacgttc gtgtaaggag gcagccataa ttcacaaatg ccttcaggcc	1200
gggtgcgatc tcgctagcga ggtcgtccac aagcctggag agctggcacg cactaccaa	1260
gctcttggtg acacgtacga catcgacccc tctgagcagg gcaaagtcta tgcccgtgag	1320
tacgctcctg ggccgctgac tcaaactgct gtatttccaa gtgagtcgag ttccaatgag	1380
cttgccacga tcgacggctg tatagcgggt ccgcaggcta aggcaaagag ccgcgagcac	1440
atcactcaa agatgcacaa agtggctagg gatttcgtgc gccatttggt gcccacggcc	1500
gggtcggcc gtccctatcc cctcacgtat gtcgaagagc accagaccaa gccgttacag	1560
cgggcccgga atgatgctaa tcgatatcac gatgagttca ctatgatcgt caaggcggtc	1620
caaaagaaag aagcatacaa tgcccaaac tatccgcgga acatatcaac tgtccgcac	1680
acccaaaacg ttaagctgtc cagctacacc tacgctttca aagaagcagt cctccagcat	1740
gttccgtggc acatgccaac tcacacaccg gctgaaattg ccgaggctgt gcagagtttg	1800
gccgcaagtt cactgagct gggtgagact gactatagca aattcgacgg cacgttcctc	1860
cgtttcatgc gggagaatgt cgaatttgcc atttacaagc gttgggtgca cctcgaccat	1920

ttaacagaat tgtccacact attgggaaat gaactccaag cacctgctgt caccggctg 1980
 ggcatcaaat atgaccaga ctgcagtcgt cttagcgggt ccgctctcac gactgacggg 2040
 aacagcattg caaatgcttt cgtctcatat cttgccggcc gccaaagtgg catggatgat 2100
 gacgaggcat ggacttggat tggattgtc tacggtgacg acggtcttag atccgaaac 2160
 gtgtctgacg cgttgctgtc caaaactgct tcttctctcg gctttgactt gaaaatagt 2220
 aatcgtgcac ctgcgggttc tccagtgaac ttctctctgc gagtttatct cgatccctgg 2280
 tcatcaccgg cttccgtgca gtcgccgttg cgcactttgc taaaactaca tactacctgt 2340
 gacaccaat ctgacatcga agacgtcggg tgggctaaga cgcaggcgta tctagtcact 2400
 gactgcttga caccttttat tggccattgg tgtcgggcct accaacgcaa ttgactgca 2460
 cgtgtggtcc aatacgcaga ctacaacgac attccgttct gggtaagaa tgaggatcat 2520
 gttggaaact catggcctca gtctgactcc gtcgattgga atgacgttgt tgccaatgag 2580
 ctgggcctca ccacagctga gctactcaag cacctcgcgg cgcttgatgc gtatactgg 2640
 cccgtgagcg gacttccccg tctgacaaca tcaactcgact tggaaccgaa gatgcctgtc 2700
 gcattagacg gcgaggcca agccggctct agtcaacaac ctcaaaactga caaggatgga 2760
 acaagtcaa caggcgatcg atcagcacct cgtcgagcta gaacagctct tcaagatgct 2820
 gatggacgtg cgtgtcgtc tcggcggagt gaccgtagtc caggtaaagc agatgcgaac 2880
 gttcgtgata agcgccagcg ccgcagcaca acgcctccgc gctctcgccc gtcggtaccc 2940
 ggcccctcta gcagtggccg cagaaccgat ggagacagag tgagaggagg agctgcacgc 3000
 cagcgccagc gacgtcgtc tccagtgtag gcgagtcacc tgcccgtcc tcccccccc 3060
 ggaccattgg tcccctagtc agctttatgc tgctctacgc ttcggcg 3107

<210> 2

<211> 983

<212> PRT

<213> virus gây hoặi từ thần kinh cá mắng sọc

<400> 2

Met Arg Arg Phe Glu Phe Glu Leu Ala Arg Met Ser Gly Ala Ala Phe
 1 5 10 15

Cys Val Val Thr Gly Tyr Arg Leu Leu Thr Ser Lys Trp Leu Ala Asp
 20 25 30

Arg Val Glu Asp Tyr Arg Gln Arg Val Ile Ala Asp Arg Lys Gln Ile
 35 40 45

Leu Arg Asp Ala Ala Val Ile Arg Thr Ser Ile Gln Lys Gln Met Glu
 50 55 60

Leu Val Arg Ile Ser Val Arg Lys Gly His Ser His Gln Glu Ala Ala
 65 70 75 80

Thr Glu Arg Asn Ser Ala Thr Asp Thr Met Ile Gly Val Val Glu Lys
 85 90 95

Cys Gly Tyr Glu Pro Tyr Ile Ile Ser Pro Ser Pro Arg Glu Lys Glu
 100 105 110

Tyr His Gly Ser Arg Gln Phe Tyr Ser Leu Ala Asp Phe Arg Gln Asp
 115 120 125

Tyr Arg Arg Asp Glu Ile Thr Asp Arg His Val Ile Val Met Thr Asp
 130 135 140

Val Asp Tyr Tyr Val Asp Met His Glu Leu Val Gly Leu Gly Val Pro
 145 150 155 160

Ile Leu Leu Tyr Thr Phe Gln Pro Ser Thr Val Ser Gly Glu Val Lys
 165 170 175

Asp Gly Tyr Phe Thr Ile Thr Asp Asp His Val His Tyr Arg Val Ala
 180 185 190

Gly Gly Lys Asp Val Arg His Arg Ile Trp Asn Tyr Asn Gln Asp Thr
 195 200 205

Met Phe Val Arg Ser Lys Pro Arg Gly Phe Trp Ala Ser Leu Lys Gln
 210 215 220

Ile Leu Arg Asp Ile Thr Gly Ile Thr Ala Leu Cys Gly Tyr Leu Tyr
 225 230 235 240

Leu Lys Leu Gly Ile Ala Pro Phe Gly Asp Gln Val Thr Leu Phe Thr
 245 250 255

Val Asp Gln Phe Lys Met Gly Glu His Arg Asn Ile Val Ser Ile Val
 260 265 270

Pro Phe Ala Thr Cys Arg Ser Asn Leu Leu Lys Ile Ser Glu Tyr Gly
 275 280 285

Ala Glu Leu Asp Tyr Met Arg Tyr Gln Gln Arg Asn Asn Asn Ala Asn
 290 295 300

Phe Asn Ala Val Thr Tyr Ile Ser Gln Glu Gly Pro Leu Ile Ser Leu
 305 310 315 320

Gly Leu Glu Gly Asn Phe Ala Ser Val Gln Leu Pro Leu Gln Asp Phe
 325 330 335

Glu Asn Ile Arg Thr Ala Tyr Glu Leu Ser Lys Asn Asn Asn Leu Ser
 340 345 350

Asp Thr Val Arg Arg Ser Ala Arg Ser Cys Lys Glu Ala Ala Ile Ile

355

360

365

His Lys Cys Leu Gln Ala Gly Cys Asp Leu Ala Ser Glu Val Val His
 370 375 380

Lys Pro Gly Glu Leu Ala Arg His Tyr Gln Ala Leu Gly Asp Thr Tyr
 385 390 395 400

Asp Ile Asp Pro Ser Glu Gln Gly Lys Cys Tyr Ala Arg Glu Tyr Ala
 405 410 415

Pro Gly Pro Leu Thr Gln Thr Ala Val Phe Pro Ser Glu Ser Arg Ser
 420 425 430

Asn Glu Leu Ala Thr Ile Asp Gly Arg Ile Ala Gly Pro Gln Ala Lys
 435 440 445

Ala Lys Ser Arg Glu His Ile Thr Pro Lys Met His Lys Val Ala Arg
 450 455 460

Asp Phe Val Arg His Leu Val Pro Thr Ala Gly Leu Gly Arg Pro Tyr
 465 470 475 480

Pro Leu Thr Tyr Val Glu Glu His Gln Thr Lys Pro Leu Gln Arg Ala
 485 490 495

Arg Asn Asp Ala Asn Arg Tyr His Asp Glu Phe Thr Met Ile Val Lys
 500 505 510

Ala Phe Gln Lys Lys Glu Ala Tyr Asn Ala Pro Asn Tyr Pro Arg Asn
 515 520 525

Ile Ser Thr Val Pro His Thr Gln Asn Val Lys Leu Ser Ser Tyr Thr
 530 535 540

Tyr Ala Phe Lys Glu Ala Val Leu Gln His Val Pro Trp Tyr Met Pro
 545 550 555 560

Thr His Thr Pro Ala Glu Ile Ala Glu Ala Val Gln Ser Leu Ala Ala
 565 570 575

Ser Ser Thr Glu Leu Val Glu Thr Asp Tyr Ser Lys Phe Asp Gly Thr
 580 585 590

Phe Leu Arg Phe Met Arg Glu Asn Val Glu Phe Ala Ile Tyr Lys Arg
 595 600 605

Trp Val His Leu Asp His Leu Thr Glu Leu Ser Thr Leu Leu Gly Asn
 610 615 620

Glu Leu Gln Ala Pro Ala Val Thr Arg Leu Gly Ile Lys Tyr Asp Pro
 625 630 635 640

Asp Cys Ser Arg Leu Ser Gly Ser Ala Leu Thr Thr Asp Gly Asn Ser
 645 650 655

Ile Ala Asn Ala Phe Val Ser Tyr Leu Ala Gly Arg Gln Ala Gly Met
 660 665 670

Asp Asp Asp Glu Ala Trp Thr Trp Ile Gly Ile Val Tyr Gly Asp Asp
 675 680 685

Gly Leu Arg Ser Gly Asn Val Ser Asp Ala Leu Leu Ser Lys Thr Ala
 690 695 700

Ser Ser Leu Gly Phe Asp Leu Lys Ile Val Asn Arg Ala Pro Arg Gly
 705 710 715 720

Ser Pro Val Thr Phe Leu Ser Arg Val Tyr Leu Asp Pro Trp Ser Ser

725	730	735
Pro Ala Ser Val Gln Ser Pro Leu Arg Thr Leu Leu Lys Leu His Thr		
740	745	750
Thr Cys Asp Thr Gln Ser Asp Ile Glu Asp Val Gly Trp Ala Lys Thr		
755	760	765
Gln Ala Tyr Leu Val Thr Asp Cys Leu Thr Pro Phe Ile Gly His Trp		
770	775	780
Cys Arg Ala Tyr Gln Arg Asn Cys Thr Ala Arg Val Val Gln Tyr Ala		
785	790	795
Asp Tyr Asn Asp Ile Pro Phe Trp Val Lys Asn Glu Asp His Val Gly		
805	810	815
Asn Ser Trp Pro Gln Ser Asp Ser Val Asp Trp Asn Asp Val Val Ala		
820	825	830
Asn Glu Leu Gly Leu Thr Thr Ala Glu Leu Leu Lys His Leu Ala Ala		
835	840	845
Leu Asp Ala Tyr Thr Gly Pro Val Ser Gly Leu Pro Arg Leu Thr Thr		
850	855	860
Ser Leu Asp Leu Glu Pro Lys Met Pro Val Ala Leu Asp Gly Glu Val		
865	870	875
Gln Ala Gly Pro Ser Gln Gln Pro Gln Thr Asp Lys Asp Gly Thr Ser		
885	890	895
Pro Thr Gly Asp Arg Ser Ala Pro Arg Arg Ala Arg Thr Ala Leu Gln		
900	905	910

Asp Ala Asp Gly Arg Ala Cys Arg Ser Arg Arg Ser Asp Arg Ser Pro
 915 920 925

Gly Lys Arg Asp Ala Asn Val Arg Asp Lys Arg Gln Arg Arg Ser Thr
 930 935 940

Thr Pro Pro Arg Ser Arg Pro Ser Val Pro Gly Pro Ser Ser Ser Gly
 945 950 955 960

Arg Arg Thr Asp Gly Asp Arg Val Arg Gly Gly Ala Ala Arg Gln Arg
 965 970 975

Gln Arg Arg Arg Ser Pro Val
 980

<210> 3

<211> 75

<212> PRT

<213> Virut gây hoại tử thần kinh cá măng sọc

<400> 3

Met Glu Gln Val Gln Gln Ala Ile Asp Gln His Leu Val Glu Leu Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Phe Lys Met Leu Met Asp Val Arg Val Ala Leu Gly Gly Val
 20 25 30

Thr Val Val Gln Val Asn Glu Met Arg Thr Phe Val Ile Ser Ala Ser
 35 40 45

Ala Ala Ala Gln Arg Leu Arg Ala Leu Ala Arg Arg Tyr Pro Ala Pro
 50 55 60

Leu Ala Val Ala Ala Glu Pro Met Glu Thr Glu
 65 70 75

<210> 4
 <211> 1421
 <212> DNA
 <213> Virut gây hoặi từ thần kinh cá mắg sọc

<400> 4

taatctaaca ccgcttttgca agtcaaaatg gtacgcaaag gtgataagaa attggcaaaa	60
cccccgacca caaaggccgc caattctcaa ccacgtcgac gtgcaacaca gcgccgtcgc	120
agtggtaggg ctgatgcacc cttagctaag gcatcgacta tcacgggatt tggacgtgcg	180
accaatgatg tccatatctc gggaatgtca cggatcgctc aagcagttgt tccagccggg	240
acaggaacag atggaaagat tgtcgtcgat tccacaatcg ttccagaact cctgccacgg	300
cttgacacg ctgctcgaat cttccagcga tacgctgttg aaacactgga gttcgaaatt	360
cagccaatgt gccccgcaaa cacgggcggt ggttacgttg ctggcttcct gcctgatcca	420
actgacaacg accacacctt cgatgcgctc caagcaactc gtggtgcagt cgtcgccaaa	480
tgggtgggaaa gtcgaacagt ccggccccag tatactcgaa cgcttctctg gacctcaacc	540
gggaaggagc agcgattgac atcacctggc cggctggtag tcctgtgtgt tggcagcaac	600
actgatgttg tcaacgtgtc agtcatgtgt cgctggagcg ttcgccttag tgtcccgtcc	660
cttgagacac ctgaggacac caccgtcca attactacc aggcgccact ccacaacgat	720
tccattaaca acggttacac tggatttcgt tccattctct tgggcgcgac ccaactcgac	780
ctcgctcctg caaacgctgt ctttgtcact gacaaaccgt tgcccattga ttacaatctt	840
ggagtgggcg acgtcgaccg ggccgtgtac tggcacctgc ggaagaaagc tggagacact	900
caggtacctg ctgggtactt tgactgggga ctgtgggatg actttaacaa gacattcaca	960
gttggggcac cctactactc cgaccagcaa ccacggcaaa tcttgctgcc ggctggcacg	1020
ctcttcaccc gtgttgactc ggaaaactaa ccgggtcatc cggatcccta gtgcgtatcg	1080
tggatgacca attcgagaaa ttgattacgg cactaaccac tatcaaaatt gaaattgaca	1140

acaacaagag cgaaattgaa gctatcgcta acaaattaaa cgacaaagca cccaaggagg 1200
 gctcgaattgc tattgttggg accattgacg gcgtacctgg aacagttgac ggcgcttacc 1260
 tcgccgaacc tgtctagcgt gcttgatacg gtgccagctt caccagtctt gtccaacgcc 1320
 gaggatttcc ctctttgggc ttgttggggt accgtttagct ccgcgcagtg agcaccaccg 1380
 ccatgtgggtt aaatggccgc tgatcgccac attactcggc g 1421

<210> 5

<211> 340

<212> PRT

<213> Virut gây hoại tử thần kinh cá măng sọc

<400> 5

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

Ala Ala Asn Ser Gln Pro Arg Arg Arg Ala Thr Gln Arg Arg Arg Ser
 20 25 30

Gly Arg Ala Asp Ala Pro Leu Ala Lys Ala Ser Thr Ile Thr Gly Phe
 35 40 45

Gly Arg Ala Thr Asn Asp Val His Ile Ser Gly Met Ser Arg Ile Ala
 50 55 60

Gln Ala Val Val Pro Ala Gly Thr Gly Thr Asp Gly Lys Ile Val Val
 65 70 75 80

Asp Ser Thr Ile Val Pro Glu Leu Leu Pro Arg Leu Gly His Ala Ala
 85 90 95

Arg Ile Phe Gln Arg Tyr Ala Val Glu Thr Leu Glu Phe Glu Ile Gln
 100 105 110

Pro Met Cys Pro Ala Asn Thr Gly Gly Gly Tyr Val Ala Gly Phe Leu
 115 120 125

Pro Asp Pro Thr Asp Asn Asp His Thr Phe Asp Ala Leu Gln Ala Thr
 130 135 140

Arg Gly Ala Val Val Ala Lys Trp Trp Glu Ser Arg Thr Val Arg Pro
 145 150 155 160

Gln Tyr Thr Arg Thr Leu Leu Trp Thr Ser Thr Gly Lys Glu Gln Arg
 165 170 175

Leu Thr Ser Pro Gly Arg Leu Val Leu Leu Cys Val Gly Ser Asn Thr
 180 185 190

Asp Val Val Asn Val Ser Val Met Cys Arg Trp Ser Val Arg Leu Ser
 195 200 205

Val Pro Ser Leu Glu Thr Pro Glu Asp Thr Thr Ala Pro Ile Thr Thr
 210 215 220

Gln Ala Pro Leu His Asn Asp Ser Ile Asn Asn Gly Tyr Thr Gly Phe
 225 230 235 240

Arg Ser Ile Leu Leu Gly Ala Thr Gln Leu Asp Leu Ala Pro Ala Asn
 245 250 255

Ala Val Phe Val Thr Asp Lys Pro Leu Pro Ile Asp Tyr Asn Leu Gly
 260 265 270

Val Gly Asp Val Asp Arg Ala Val Tyr Trp His Leu Arg Lys Lys Ala
 275 280 285

Gly Asp Thr Gln Val Pro Ala Gly Tyr Phe Asp Trp Gly Leu Trp Asp
 290 295 300

Asp Phe Asn Lys Thr Phe Thr Val Gly Ala Pro Tyr Tyr Ser Asp Gln
 305 310 315 320

Gln Pro Arg Gln Ile Leu Leu Pro Ala Gly Thr Leu Phe Thr Arg Val
 325 330 335

Asp Ser Glu Asn
 340

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligo

<400> 6
 gacaccacg ctccaattac tac

23

<210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> oligo

<400> 7
 acgaaatcca gtgtaaccgt tgt

23