



(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)



1-0029408

(51)⁷ C12N 7/00; A61K 39/12

(13) B

(21) 1-2015-04581

(22) 28/05/2014

(86) PCT/EP2014/061014 28/05/2014

(87) WO 2014/191445 04/12/2014

(30) 13170063.5 31/05/2013 EP

(45) 25/09/2021 402

(43) 25/03/2016 336A

(73) INTERVET INTERNATIONAL B.V. (NL)

Wim de Körverstraat 35, NL-5831 AN Boxmeer, Netherlands

(72) GUELEN, Lars (NL); GROOF DE, Ad (NL); SCHRIER, Carla Christina (NL);
GRISEZ, Luc (NL); CHANG, Siow Foong (SG); MIYATA, Masato (JP); HOEK
VAN DER, Cornelia Maria (NL); DEIJS, Martin (NL); NG, Kah Sing (SG).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) VIRUT GÂY BỆNH RỤNG VÂY, VACXIN KHÁNG VIRUT NÀY, PHƯƠNG
PHÁP BẢO CHẾ VACXIN VÀ KIT PHÁT HIỆN KHÁNG THỂ

(57) Sáng chế đề cập đến virus được phân lập gây bệnh rụng vây ở cá, giống cấy tế bào bao gồm virus này, vacxin trên cơ sở virus này và phương pháp bào chế vacxin này, kháng thể phản ứng với virus này, kit xét nghiệm chẩn đoán để phát hiện ra virus và sử dụng virus này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến virus được phân lập gây bệnh rụng vảy ở cá, giống cây tế bào chứa virus này, vaccin trên cơ sở virus này và phương pháp bào chế vaccin này, kháng thể phản ứng với virus này, kit xét nghiệm chẩn đoán để phát hiện virus và sử dụng virus này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong nhiều thập kỷ qua, lượng tiêu thụ cá trên toàn cầu tăng mạnh. Điều này liên quan đến tiêu thụ cá nước lạnh như cá hồi, cá bơn, cá bơn halibut và cá tuyết, và tương đương như tiêu thụ cá nhiệt đới như cá chẻm châu Á (cá vược), cá rô phi, cá măng, cá đuôi vàng, cá cam, cá mú và cá bớp.

Kết quả là số lượng và quy mô các trang trại cá được tăng lên để đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của thị trường.

Như được biết, ví dụ, trong ngành chăn nuôi, rất nhiều động vật sống gần nhau dễ bị nguy hại bởi tất cả các loại bệnh, ngay cả các bệnh khó biết đến hoặc khó gặp hoặc thậm chí chưa được biết đến trước thời điểm chăn nuôi thương mại quy mô lớn. Đây cũng là trường hợp diễn ra trong ngành nuôi cá.

Gần đây, một hội chứng bệnh mới được phát hiện ở cá chẻm châu Á nuôi (Lates calcarifer). Bệnh này có đặc trưng dễ thấy nhất là hiện tượng mất vảy, vì thế thường được gọi là “Hội chứng rụng vảy” (Scale drop syndrome - SDS). Bệnh này được báo cáo lần đầu tiên ở cá chẻm châu Á được nuôi ở Penang, Malaysia. Sự bùng phát căn bệnh mới này sau đó được phát hiện là cũng xảy ra ở Singapore vào các năm 2002, 2006 và 2009. Các trường hợp gần đây hơn được báo cáo vào năm 2010 từ các trang trại cá ở Bantam,

Indonesia và một lần nữa từ Singapore, và vào năm 2011 cũng từ các trang trại ở Eo biển Malaka. Hiện nay tỷ lệ mắc bệnh này đang gia tăng.

Gần đây thì hội chứng bệnh này được mô tả bởi tác giả Gibson-Kueh, S., et al., (Journal of Fish Diseases 35; 19-27 (2012)).

Bệnh này ban đầu được gặp phải ở cá nuôi lồng trưởng thành, và cũng gặp phải ở cá con trong ao nuôi cá. Tỷ lệ chết được mô tả là thường xuyên, kéo dài và thay đổi từ ban đầu là 30% đến tổng số là 75%.

Các dấu hiệu lâm sàng chính của cá mắc hội chứng này đầu tiên là rụng vảy như đã được đề cập ở trên, sau đó là trạng thái lơ dờ và đôi khi là sung mắt. Đôi khi cá cũng biểu hiện các dấu hiệu thần kinh: một vài con bị nhiễm bệnh bơi xoắn ốc có thể là do sự tổn thương mạch trong não bộ dẫn đến bệnh nhũn não đa ổ.

Các dấu hiệu mô học chính, không bao gồm các dấu hiệu khác, là thoái hóa nội mô mạch (viêm mạch) ở tất cả các cơ quan chính bao gồm da. Sự viêm mạch này dẫn đến hoại tử mô mà cũng ảnh hưởng đến các tuyến dạ dày, lá lách, thận và tim. Gibson-Kueh cũng đã mô tả rằng hạ bì phủ lên nền vảy thường hoại tử và liên quan đến sự mất vảy.

Tuy nhiên, nguyên nhân của bệnh này đến nay vẫn chưa được phát hiện. Gibson-Kueh nêu rằng thông qua các thay đổi mô bệnh học ở cá bị bệnh và việc quan sát cả virion hình lục giác kích thước lớn và virion hình lục giác kích thước nhỏ hơn nhiều trong mô có thể đề xuất khả năng nguyên nhân gây bệnh là do virus, nhưng tác giả này kết luận rằng về tổng thể, số lượng virion trong các mô được xét nghiệm là thấp. Dựa trên kích thước và hình thái, một số virion quan sát được giống với iridovirut, nhưng kỹ thuật hóa mô miễn dịch sử dụng kháng thể đơn dòng M10 kháng Iridovirut của cá tráp đỏ (RSIV) (Nakajima, K. et al., Fish Pathology 30: 115-119 (1995)) cho kết quả âm tính.

Thử nghiệm PCR sử dụng đoạn môi RSIV được biết là nhắm đích vào một lượng lớn Iridovirut đã biết cũng cho kết quả âm tính.

Nỗ lực nhằm phân lập virut bằng cách cho mô của cá tiếp xúc với tế bào Haemulon sciurus Shaw (GF) và tế bào cá chêm châu Á. (Chong, S. et al., Singapore Vet. J. 1; 78-89 (1987)) cũng không thành công.

Căn cứ vào số lượng rất thấp các hạt giống như virus quan sát được, Gibson-Kueh đề xuất rằng bệnh này có thể là kết quả của phản ứng tăng quá miễn dịch với kháng nguyên virus thay vì do virus gây ra. Các phản ứng này, ví dụ, được đề xuất là nguyên nhân của bệnh dâu tây (strawberry disease) ở cá hồi.

Ngoài vấn đề này, sự viêm mạch và chứng hoại tử liên quan mà là các đặc điểm nổi bật của SDS không phải là dấu hiệu điển hình của bệnh mống mắt (Irido disease).

Hơn nữa, các thương tổn thấy được ở SDS khác biệt theo một số cách so với các thương tổn thấy được ở bệnh do iridovirus.

Thực tế là bắt chước các nỗ lực được đề cập ở trên, vẫn không phát hiện được nguồn gốc virus và thậm chí không phát hiện thấy có bằng chứng về sự liên quan của virus, đưa Gibson-Kueh đến với giải thích về sự có mặt của một số lượng nhỏ các virus khác nhau như sau: “Các hạt giống như virus tương đối đối khó phát hiện. Hơn nữa, bệnh do iridovirus toàn thân hiện nay là đặc hữu ở các trang trại L. calcarifer, vì thế sự có mặt của chúng có thể là sự phát hiện ngẫu nhiên của một tác nhân gây bệnh thông thường”.

Vì các lý do này, tác nhân gây bệnh này đến nay vẫn hoàn toàn chưa được biết rõ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vì các lý do nêu trên, mục đích của sáng chế là đề xuất tác nhân gây bệnh của bệnh “hội chứng rụng vây” này cũng như vaccin nhằm chống lại bệnh này. Hơn nữa, mục đích của sáng chế cũng đề xuất cách phát hiện và nhận biết tác nhân gây bệnh này.

Hiện nay người ta đã phát hiện được rằng tác nhân gây bệnh của bệnh này là virus có 20 mặt có đường kính khoảng 140 nm.

Virus được phát hiện ra là thuộc các virus có ADN mạch kép và phần lớn trình tự ADN của virus này hiện đã được xác định.

So sánh trình tự của virus mới này với các trình tự khác trong ngân hàng dữ liệu bộ gen đã bất ngờ tiết lộ rằng ở cấp độ nucleotit, thì virus này có mức độ giống nhất định, mặc dù là thấp, với virus thuộc họ Iridoviridae, là họ virus có hình dạng 20 mặt, có kích cỡ nằm trong khoảng từ 120 đến 350 nm và có bộ gen mạch kép.

Do tác nhân gây bệnh của bệnh này hiện đã được nhận biết, nên bệnh này sẽ không còn được gọi là Hội chứng rụng vảy nữa, mà được gọi là bệnh rụng vảy (scale drop disease - SDD) trong bản mô tả này (xem thêm dưới đây).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1: Kết quả của PCR virus SDD trên cá nghi nhiễm virus SDD và cá đối chứng (Thử nghiệm 1)

Fig.2: Kết quả của PCR iridovirus cá tráp đỏ trên cá nghi nhiễm virus SDD và cá đối chứng (Thử nghiệm 1)

Fig.3: Đường cong chuẩn QPCR virus SDD (Thử nghiệm 1).

Fig.4: CPE trong lớp đơn tế bào BF-2 vào ngày 5 sau khi lây nhiễm. Lưu ý là tế bào được làm tròn. Khung tỉ lệ 100 μm

Fig.5: Lớp đơn BF-2 (đối chứng) vào ngày 5 sau khi lây nhiễm. Khung tỉ lệ 100 μm

Fig.6: Trình tự ADN (a) và protein (b) protein capsit chính của virus SDD.

Fig.7: Trình tự ADN (a) và protein (b) ATPaza của virus SDD.

Fig.8: Cây phát sinh giống loài của ORF protein capsit chính của Iridovirus. Với mỗi trình tự tên loài, chi và số nột lưu được thể hiện. Hỗ trợ tỷ lệ % bootstrap là 2000 bản sao chép được quy định tại các nút. Thanh khoảng cách cho biết số lượng của nucleotit thay thế mỗi vị trí.

Fig.9: Sự phát sinh chủng loài của ORF ATPaza Iridovirus. Với mỗi trình tự tên loài và số nột lưu được thể hiện. Hỗ trợ tỷ lệ % bootstrap của 2000 bản sao chép được quy định tại các nút. Thanh khoảng cách cho biết số lượng của nucleotit thay thế mỗi vị trí.

Fig.10: Tỷ lệ chết tích lũy (%) sau thử thách virus SDD như được quan sát ở các nhóm khác nhau. Mỗi bể chứa 15 cá được tiêm (IP và / hoặc IM) bằng các liều khác nhau của giống cây tế bào được nhân giống virus SDD.

Fig.11: bản sao ADN virus SDD trong huyết thanh cá chẻm sau thử thách. Bản sao ADN virus SDD/ μ L được đo bằng qPCR trong huyết thanh được gộp từ 15 cá mỗi nhóm, được lấy mẫu vào ngày 1, 3, 7, 10 và 14.

Fig.12: Ảnh Cryo-TEM của tế bào & sản phẩm thu được từ môi trường được cô từ lần cấy chuyển SDDV 3 trong giống cấy mô.

Mô tả chi tiết sáng chế

Một đại diện của virus đã được nộp lưu trong Bảo tàng giống vi sinh vật quốc gia (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - CNCM), Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Pháp, với số nộp lưu CNCM I-4754.

Trên cơ sở so sánh trình tự, gen mã hóa protein capsit chính và gen mã hóa ATPaza của virus này có thể được nhận biết, nhưng hơi giống với Iridoviridae đã biết.

Một ví dụ về trình tự ADN của gen mã hóa protein capsit chính và gen mã hóa ATPaza được nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 3 tương ứng. SEQ ID NO: 2 là trình tự axit amin của protein capsit chính. SEQ ID NO: 4 là trình tự axit amin của ATPaza.

Họ Iridoviridae hiện nay bao gồm 5 chi: Ranavirus, Megalocytivirus, Lymphocystivirus, Chloriridovirus và Iridovirus (Jun Kurita and Kazuhiro Nakajima, Viruses 4; 521-538 (2012)).

Bài báo của Kurita và Nakajima trong số các tài liệu thể hiện tổng quan về 5 chi trong cây phát sinh giống loài gồm tổng số 20 loài đã biết của 5 chi (ngoài ba thể tương đồng Ascovirus được bổ sung là nhóm ngoài). Cây phát sinh giống loài này đưa ra chỉ dẫn về mối liên quan/khoảng cách chung của các loài khác nhau và hình dung tại sao mỗi virus trong số các virus này lại được phân loại là thành viên của một trong 5 chi.

Dựa trên trình tự ADN mã hóa MCP và ATPaza của tác nhân gây bệnh SDD mới được phát hiện theo sáng chế, các cây phát sinh giống loài mới dựa vào phương pháp liên kết lân cận có thể được tạo ra, và đã phát hiện ra rằng trình tự mã hóa MCP và ATPin thể hiện sự phù hợp nhất định trong cây phát sinh giống loài của Iridoviridae.

Các cây này được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình MEGA, phiên bản 5, sử dụng các thiết lập chuẩn. (MEGA5: Phân tích di truyền tiến hóa mức phân tử bằng cách sử dụng các phương pháp hợp lý cực đại (Maximum Likelihood), khoảng cách tiến hóa (Evolutionary Distance), và tiết kiệm tối đa (Maximum Parsimony). Koichiro Tamura, Daniel Peterson, Nicholas Peterson, Glen Stecher, Masatoshi Nei and Sudhir Kumar. *Mol. Biol. Evol.* 28(10): 2731–2739. 2011 doi:10.1093/molbev/msr121 Advance Access publication May 4, 2011).

Dựa trên hình dạng 20 mặt, kích thước bộ gen nằm trong khoảng từ 120 đến 350 nm và bộ gen mạch kép của virus mới, và trên cơ sở cây liên kết lân cận của protein capsit chính, thu được bằng cách sử dụng MEGA5 với sự hỗ trợ thống kê chỉ ra sự vững mạnh của mẫu hình phân nhánh được suy ra khi được đánh giá bằng cách sử dụng các thử nghiệm tự khởi động (bootstrap), các tác giả sáng chế coi virus là một thành viên thuộc họ Iridoviridae.

Cây trên cơ sở trình tự MCP được thể hiện trên Fig.8. Cây trên cơ sở trình tự ATPaza được thể hiện trên Fig.9.

Khá bất ngờ là dựa trên khoảng cách của nó với 5 chi đã biết, thì tác nhân gây bệnh mới được phát hiện của SDD dường như không khớp với bất kỳ một chi nào trong số 5 chi này, như có thể dễ dàng quan sát được từ Fig.8.

Vì thế, virus này, trong số các virus khác, có thể được phân biệt với các thành viên đã biết của Iridoviridae trên cơ sở trình tự ADN mã hóa của protein capsit chính và ATPaza của nó.

Hóa ra là protein capsit chính của virus theo sáng chế có mức độ đồng nhất trình tự chỉ bằng 65% so với MCP ngay cả của loài gần nhất trong số các loài còn lại của họ Iridoviridae.

ATPaza có mức độ đồng nhất trình tự bằng 68% so với ATPaza gần nhất trong số các loài còn lại của họ Iridoviridae.

Bằng cách sử dụng các trình tự ADN mã hóa ATPaza và protein capsit chính, các đoạn mỗi được phát triển là đặc hiệu đối với virus theo sáng chế.

SEQ ID NO: 1 là một ví dụ điển hình về trình tự nucleotit của gen mã hóa protein capsit chính của virus theo sáng chế.

Cần phải hiểu rằng, đối với protein cụ thể được đề cập trong bản mô tả này, có thể tồn tại sự biến đổi tự nhiên giữa các đại diện riêng biệt của tác nhân gây bệnh. Sự biến đổi di truyền dẫn đến các thay đổi nhỏ trong, ví dụ, trình tự protein capsit chính. Điều này cũng đúng đối với ATPaza. Trước tiên, hiện tượng được gọi là “sự dao động ở bazơ thứ hai và thứ ba” giải thích rằng sự thay đổi nucleotit có thể diễn ra mà không được để ý đến trong trình tự axit amin chúng mã hóa: ví dụ bộ ba TTA, TTG, TCA, TCT, TCG và TCC đều mã hóa Leuxin. Ngoài ra, sự thay đổi nhỏ giữa các đại diện của virus SDD theo sáng chế có thể được thấy trong trình tự axit amin. Sự thay đổi này có thể được phản ánh bằng (các) khác biệt axit amin trong toàn bộ trình tự hoặc bằng các đột biến làm khuyết, thay thế, xen vào, đảo ngược hoặc bổ sung (các) axit amin trong trình tự này. Đột biến thay thế axit amin mà không nhất thiết làm biến đổi hoạt tính sinh học và miễn dịch, đã được mô tả, chẳng hạn như bởi Neurath *et al* trong tài liệu “Protein” Academic Press New York (1979). Các đột biến thay thế axit amin giữa các axit amin liên quan hoặc thay thế diễn ra thường xuyên trong quá trình tiến hóa là, không kể những đột biến thay thế khác, Ser/Ala, Ser/Gly, Asp/Gly, Asp/Asn, Ile/Val (xem trong tài liệu Dayhof, M.D., Atlas of protein sequence and structure, Nat. Biomed. Res. Found., Washington D.C., 1978, vol. 5, suppl. 3). Các đột biến thay thế axit amin khác bao gồm Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Leu/Ile, Leu/Val và Ala/Glu. Dựa vào thông tin này, Lipman và Pearson đã phát triển phương pháp so sánh protein một cách nhanh và nhạy (Science 227, 1435-1441, 1985) và xác định sự tương tự chức năng giữa các protein đồng nhất. Các đột biến thay thế axit amin theo các phương án lấy làm ví dụ của sáng chế, cũng như các thay đổi bao gồm đột biến làm khuyết và/hoặc cài xen cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Điều này giải thích tại sao MCP và ATPaza, khi được phân lập từ các đại diện khác nhau của virus SDD theo sáng chế, có thể có độ đồng nhất thấp hơn đáng kể so với mức 100%, trong khi vẫn biểu hiện MCP hoặc ATPaza của virus SDD, là tác nhân gây bệnh của bệnh rụng vảy.

Điều này được phản ánh rõ ràng, ví dụ, trên Fig.4 trong bài báo của Kurita và Nakajima, trong đó đã nêu rằng ngay cả trong nhóm *Lymphocystivirus* gồm các virus bệnh nang lympho có liên quan ở mức cao (LCDV), thì tất cả các LCDV cũng vẫn đều có trình tự axit amin MCP khác biệt đáng kể.

Vì thế, theo phương án thứ nhất, sáng chế đề cập đến virus được phân lập, một thành viên thuộc họ Iridoviridae chứa gen MCP và gen ATPaza, đặc trưng ở chỗ:

- a) virus này là tác nhân gây bệnh của bệnh rụng vảy ở cá và
- b) trình tự nucleotit của gen MCP có độ đồng nhất là ít nhất 80% so với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1

Theo mục đích của sáng chế, độ đồng nhất được hiểu là độ đồng nhất của trình tự SEQ ID NO: 1 và vùng tương ứng của protein capsit chính của virus mà có độ đồng nhất cần được xác định.

Một chương trình thích hợp để xác định độ đồng nhất là chương trình blast nucleotit (blastn) của Công cụ tra cứu sắp thẳng hàng cục bộ và cơ sở thuộc NCBI, bằng cách sử dụng lựa chọn “sắp thẳng hàng hai hoặc nhiều trình tự” và các cài đặt chuẩn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Theo mục đích của sáng chế, được phân lập có nghĩa là giải phóng khỏi mô mà virus có liên quan trong tự nhiên. Một ví dụ về virus được phân lập là virus có mặt trong giống cây.

Theo một phương án ưu tiên của phương án này, sáng chế đề cập đến virus có gen protein capsit chính (MCP) có độ đồng nhất bằng ít nhất là 82%, tốt hơn nữa là 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc thậm chí là 100%, theo thứ tự ưu tiên, so với trình tự nucleotit của MCP được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Một cách thay thế khác để mô tả đặc điểm của virus theo sáng chế là liên quan đến trình tự ATPaza của virus đó.

SEQ ID NO: 3 là một ví dụ điển hình về trình tự nucleotit của gen ATPaza của virus theo sáng chế. Tuy nhiên, như đã giải thích ở trên, sự biến đổi tự nhiên dẫn đến các thay đổi nhỏ trong trình tự ATPaza đã được phát hiện.

Vì thế, theo một dạng khác của phương án này, sáng chế đề cập đến virus được phân lập là thành viên thuộc họ Iridoviridae chứa gen MCP và gen ATPaza, đặc trưng ở chỗ:

- a) virus là tác nhân gây bệnh của bệnh rụng vảy ở cá và
- b) trình tự nucleotit của gen ATPaza có độ đồng nhất ít nhất 80% với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 3

Theo một dạng ưu tiên của phương án này, sáng chế đề cập đến virus mang gen ATPaza có độ đồng nhất ít nhất là 82%, tốt hơn nữa là 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc thậm chí là 100%, theo thứ tự ưu tiên, so với trình tự nucleotit của gen ATPaza được nêu trong SEQ ID NO: 3.

Theo một dạng ưu tiên hơn của phương án này, sáng chế đề cập đến virus theo sáng chế trong đó trình tự nucleotit của gen MCP có độ đồng nhất ít nhất là 80% so với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 và trình tự nucleotit của gen ATPaza có độ đồng nhất ít nhất là 80% so với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 3.

Một cách thay thế khác nữa để mô tả đặc điểm virus theo sáng chế phụ thuộc vào thử nghiệm PCR sử dụng bộ đoạn mồi đặc hiệu với trình tự gen protein capsit chính hoặc trình tự gen ATPaza của virus theo sáng chế. Ba bộ đoạn mồi khác nhau mà trình tự của chúng được nêu trong SEQ ID NO: 5-6, SEQ ID NO: 7-8 và SEQ ID NO: 9-10 được chỉ định về tính đặc hiệu của chúng đối với virus. Thử nghiệm PCR sử dụng bộ đoạn mồi thứ nhất (SEQ ID NO: 5-6) phản ứng đặc hiệu với gen protein capsit chính của virus sử dụng hai đoạn mồi SDD-50-FW: CAGTGCATTACAAGAAAG và SDD-213-REV: GCTGAAACAACAATTTAG.

Thử nghiệm PCR sử dụng bộ đoạn mồi thứ hai (SEQ ID NO: 7-8) cũng phản ứng đặc hiệu với gen protein capsit chính của virus và sử dụng hai đoạn mồi SDD-MCP-277-FW: TCCTGTGCAGCTGTCTAAAC và SDD-MCP-1090-REV: ACTGGCAATGATGGGCGATG.

Thử nghiệm PCR sử dụng bộ đoạn mỗi thứ ba (SEQ ID NO: 9-10) phản ứng đặc hiệu với gen ATPaza của virus và sử dụng hai đoạn mỗi SDD-ATPaza-65-FW: TCGGAGGGATGAAATTGG và SDD-ATPaza-618-REV:AGCGTTGTCGATGTAGAG.

Các thử nghiệm, được mô tả chi tiết hơn trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế, là thử nghiệm PCR chuẩn.

Nếu phân tích sản phẩm PCR của bộ đoạn mỗi thứ nhất cho biết sản phẩm PCR có khoảng 164 cặp bazơ hoặc nếu phân tích sản phẩm PCR của bộ đoạn mỗi thứ hai cho biết sản phẩm PCR có khoảng 814 cặp bazơ hoặc nếu phân tích sản phẩm PCR của bộ đoạn mỗi thứ ba cho biết sản phẩm PCR có khoảng 554 cặp bazơ, và virus là tác nhân gây bệnh của bệnh rụng vảy, thì điều này rõ ràng chứng tỏ rằng virus được phân tích thuộc virus theo sáng chế.

Chỉ là ví dụ: sản phẩm PCR có khoảng 164 cặp bazơ là sản phẩm PCR có chiều dài nằm trong khoảng từ $164 + 10$ và $164 - 10$ cặp bazơ. Sản phẩm PCR có khoảng 814 cặp bazơ là sản phẩm PCR có chiều dài nằm trong khoảng từ $814 + 10$ và $814 - 10$ cặp bazơ.

Vì thế, lại theo một dạng khác của phương án theo sáng chế, sáng chế đề cập đến virus được phân lập là thành viên thuộc họ Iridoviridae chứa gen MCP và gen ATPaza, đặc trưng ở chỗ:

- a) virus này là tác nhân gây bệnh của bệnh rụng vảy ở cá và
- b) ADN virus phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn mỗi được nêu trong SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 để tạo ra sản phẩm PCR có 164 ± 10 cặp bazơ hoặc phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn mỗi được nêu trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 để tạo ra sản phẩm PCR có 814 ± 10 cặp bazơ hoặc phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn mỗi được nêu trong SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10 để tạo ra sản phẩm PCR có 554 ± 10 cặp bazơ.

Một dạng ưu tiên của phương án này đề cập đến virus theo sáng chế trong đó ADN virus phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn mỗi được nêu trong SEQ ID NO: 5 và

SEQ ID NO: 6 để tạo ra sản phẩm PCR có 164 +/- 10 cặp bazơ và phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 để tạo ra sản phẩm PCR có 814 +/- 10 cặp bazơ và phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10 để tạo ra sản phẩm PCR có 554 +/- 10 cặp bazơ.

Một dạng ưu tiên hơn của phương án này đề cập đến virus theo sáng chế trong đó trình tự nucleotit của gen MCP có độ đồng nhất ít nhất là 80% so với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 và trình tự nucleotit của gen ATPaza có độ đồng nhất ít nhất là 80% so với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 3 và trong đó ADN virus phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 để tạo ra sản phẩm PCR có 164 +/- 10 cặp bazơ và phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 để tạo ra sản phẩm PCR có 814 +/- 10 cặp bazơ và phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10 để tạo ra sản phẩm PCR có 554 +/- 10 cặp bazơ.

Virus theo sáng chế có thể là dạng sống, dạng sống bị giảm độc lực hoặc dạng bất hoạt.

Như đã nói ở trên, trình tự ADN của gen mã hóa MCP và ATPaza của virus ghiên đã được mô tả đặc điểm.

Việc nhận biết các gen này là rất hữu ích, do chúng có thể được sử dụng trong vacxin ADN, để biểu hiện các protein này, và nhằm mục đích chẩn đoán, như sẽ được giải thích kỹ hơn dưới đây.

Vì thế, theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến mảnh ADN chứa gen mã hóa protein capsit chính đặc trưng ở chỗ gen này có độ đồng nhất ít nhất là 80% so với trình tự nucleotit của gen MCP được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một dạng ưu tiên của phương án này, sáng chế đề cập đến mảnh AND chứa gen có độ đồng nhất ít nhất là 82%, tốt hơn nữa là 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc thậm chí là 100%, theo thứ tự ưu tiên, so với trình tự nucleotit của MCP được nêu trong SEQ ID NO: 1.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến mảnh ADN chứa gen mã hóa ATPaza đặc trưng ở chỗ gen này có độ đồng nhất ít nhất là 80% so với trình tự nucleotit của gen ATPaza được nêu trong SEQ ID NO: 3.

Theo một dạng ưu tiên của phương án này, sáng chế đề cập đến mảnh ADN chứa gen có độ đồng nhất ít nhất là 82%, tốt hơn nữa là 84%, 86%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc thậm chí là 100%, theo thứ tự ưu tiên, so với trình tự nucleotit của ATPaza được nêu trong SEQ ID NO: 3.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến protein capsit chính đặc trưng ở chỗ MCP này được mã hóa bởi mảnh ADN mã hóa protein capsit chính theo sáng chế.

Các MCP này của virus theo sáng chế rất thích hợp do chúng thích hợp dùng trong vaccine và chúng biến các thử nghiệm chẩn đoán trở nên khả thi, như được giải thích dưới đây.

Theo một dạng ưu tiên của phương án này, sáng chế đề cập đến MCP có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 2.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến ATPaza, đặc trưng ở chỗ ATPaza này được mã hóa bởi mảnh ADN mã hóa ATPaza theo sáng chế.

Các ATPaza này của virus theo sáng chế rất thích hợp trong số nhiều ATPaza khác do chúng biến các thử nghiệm chẩn đoán trở nên khả thi, như được giải thích dưới đây.

Theo một dạng ưu tiên của phương án này, sáng chế đề cập đến ATPaza có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4.

Theo một dạng ưu tiên của phương án này, sáng chế đề cập đến ATPaza có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 4.

Một vài dòng tế bào cá được nhận biết là có thể hỗ trợ việc sao chép của virus theo sáng chế.

Một ví dụ về dòng tế bào mà có thể được sử dụng để nuôi virus theo sáng chế là dòng tế bào từ tế bào não của cá chẻm Châu Á. Phương pháp phân lập dòng tế bào như vậy đã được mô tả bởi Hasoon et al., trong tài liệu *In vitro Cell. Dev. Biol. – Animal* 47: 16-25 (2011).

Một ví dụ khác về dòng tế bào mà có thể được sử dụng để nuôi virus theo sáng chế được nộp lưu trong bảo tàng giống cây vi sinh vật quốc gia (CNCM), Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Pháp, với số gia nhập CNCM I-4755.

Vì thế, theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến giống cây chứa virus, trong đó giống cây này chứa virus theo sáng chế.

Giờ đây nguyên nhân của bệnh đã được tìm ra và có thể được chứng minh là có nguồn gốc virus, bệnh này có thể được cảm ứng một cách có chủ ý và các dấu hiệu điển hình của bệnh được mô tả ở trên thực sự có thể được cảm ứng ở cá khỏe mạnh, như được thể hiện chi tiết trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Một lần nữa một trong các giá trị của sáng chế là, hiện đã biết được tác nhân gây bệnh, do đó sự phát triển vaccin trở nên khả thi.

Vì thế, theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến vaccin để chống lại bệnh rụng vây ở cá, trong đó vaccin này chứa virus theo sáng chế và chất mang được dụng.

Theo khía cạnh này, việc chống lại nên được hiểu theo nghĩa rộng: việc chống lại bệnh rụng vây được xem là bao gồm việc chủng ngừa để ngăn ngừa bệnh, chủng ngừa để giảm bớt các dấu hiệu bệnh và chủng ngừa điều trị sau khi bệnh được chẩn đoán.

Đối với mục đích làm vaccin thì virus này tốt hơn là phản ứng huyết thanh với kháng huyết thanh virus kháng SDD đang hồi phục hoặc với kháng huyết thanh sinh ra chống lại virus được nộp lưu.

Phản ứng huyết thanh nên được hiểu theo nghĩa rộng: phản ứng huyết thanh được coi là phản ứng trong thử nghiệm huyết thanh chuẩn như thử nghiệm ELISA.

Các ví dụ về chất mang được dụng thích hợp để sử dụng trong vaccin để sử dụng theo sáng chế là nước vô trùng, nước muối, dung dịch đệm chứa nước như PBS và các

chất tương tự. Ngoài ra, vaccin theo sáng chế có thể chứa các chất phụ gia khác như chất phụ trợ, chất ổn định, chất chống oxy hóa và các chất khác, như được mô tả dưới đây.

Vaccin theo sáng chế có thể chứa virus theo sáng chế ở dạng sống bị giảm độc lực hoặc dạng bất hoạt.

Vaccin virus sống bị giảm độc lực, tức là vaccin chứa virus theo sáng chế ở dạng sống bị giảm độc lực, có ưu điểm hơn so với các vaccin virus bất hoạt ở chỗ chúng bắt chước tốt nhất các lây nhiễm tự nhiên. Ngoài ra, khả năng sao chép của chúng cho phép có thể chủng ngừa với một lượng nhỏ virus; số lượng của chúng sẽ tự động tăng lên cho đến khi nó đạt đến mức độ kích hoạt của hệ miễn dịch. Từ thời điểm đó trở đi, hệ miễn dịch sẽ được kích hoạt và cuối cùng sẽ loại bỏ virus.

Tuy nhiên, một bất lợi nhỏ của việc sử dụng virus sống bị giảm độc lực có thể là sẽ còn lại một mức độ độc lực nhất định cố hữu. Điều này không nhất thiết được coi là một bất lợi thực sự miễn là độc lực ở mức chấp nhận được, tức là miễn là vaccin đó ít nhất là ngăn chặn để cá không bị chết. Tất nhiên là, độc lực còn lại của vaccin virus sống bị giảm độc lực càng thấp thì việc chủng ngừa càng ít ảnh hưởng đến sự tăng cân trong khi/sau khi chủng ngừa.

Virus sống bị giảm độc lực là virus có mức độc lực giảm khi so với virus được phân lập từ thực địa. Như đã được đề cập ở trên, độc lực của virus được phân lập từ thực địa khá cao: tỷ lệ chết thường vượt quá 30% tất cả các con cá bị nhiễm. Virus có mức độc lực giảm được xem là virus mà chỉ gây bệnh đến mức mà tỷ lệ chết không vượt quá 10%, và 90% hoặc hơn 90% trong tổng số lượng cá bị lây nhiễm sẽ còn sống được sau lây nhiễm.

Vì thế, theo một dạng ưu tiên của phương án này, sáng chế đề cập đến vaccin chứa virus theo sáng chế trong đó virus này ở dạng sống bị giảm độc lực.

Virus bị giảm độc lực có thể thu được bằng cách, ví dụ, nuôi virus theo sáng chế với sự có mặt của chất gây đột biến, sau đó chọn lọc virus thể hiện sự giảm mức nhân giống và/hoặc tốc độ sao chép. Nhiều tác nhân như vậy là đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Một phương pháp khác rất hay được sử dụng là cấy chuyển theo dây *in vitro*. Sau đó, virus được điều chỉnh phù hợp với dòng tế bào được sử dụng để cấy chuyển theo dây, sao cho chúng cho thấy là đã giảm độc lực khi được chuyển lại sang vật chủ tự nhiên dưới dạng vaccin.

Một cách khác nữa để thu được virus bị giảm độc lực là tiến hành nuôi chúng ở các nhiệt độ khác với nhiệt độ của môi trường sống tự nhiên của chúng. Phương pháp chọn lọc thể đột biến nhảy nhiệt (thể đột biến Ts) đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Phương pháp này bao gồm bước nuôi virus với sự có mặt của tác nhân gây đột biến sau đó nuôi ở nhiệt độ dưới tối ưu và ở nhiệt độ tối ưu, chuẩn độ virus thể hệ sau trên lớp tế bào và chọn lọc bằng mắt thường các mảng phát triển chậm hơn ở nhiệt độ tối ưu. Các mảng nhỏ như vậy chứa virus phát triển chậm và vì thế thu được virus sống bị giảm độc lực theo ý muốn.

Vaccin virus bị bất hoạt, trái ngược với bản sao sống bị giảm độc lực của chúng, vốn an toàn do không có độc lực nào còn lại. Mặc dù thực tế là chúng thường chứa liều lượng virus cao hơn phần nào so với vaccin virus sống bị giảm độc lực, chúng vẫn có thể là, ví dụ, dạng ưu tiên của vaccin cho cá đang mắc cả các bệnh khác. Cá được giữ trong các điều kiện dưới tối ưu, như dinh dưỡng không hoàn chỉnh hoặc nhiệt độ dưới tối ưu, cũng có thể được hưởng lợi từ vaccin virus bị bất hoạt.

Vì thế, theo một dạng ưu tiên khác của phương án này, sáng chế đề cập đến vaccin chứa virus theo sáng chế trong đó virus này ở dạng bất hoạt.

Nhiều phương pháp vật lý và hóa học để bất hoạt virus hiện đã được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các ví dụ về phương pháp bất hoạt vật lý là bức xạ UV, bức xạ tia X, bức xạ gama và gia nhiệt. Các ví dụ về hóa chất làm bất hoạt là β -propiolacton, glutaraldehyt, etylen-imin và formaldehyt. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết được cách áp dụng các phương pháp này.

Tốt hơn là virus này được bất hoạt bằng β -propiolacton, glutaraldehyt, etylen-imin hoặc formaldehyt. Hiển nhiên là các cách khác để bất hoạt virus cũng được lấy làm phương án trong sáng chế.

Về nguyên tắc, các phương pháp chuẩn để bào chế vaccin trên cơ sở iridovirut đã bất hoạt đều có thể được áp dụng như nhau vào virut theo sáng chế. Ví dụ về các phương pháp này là phương pháp bào chế vaccin trên cơ sở iridovirut cá mú Singapo đã bất hoạt toàn bộ đã được mô tả bởi Zhengliang Ou-yang et al., trong tài liệu *Developmental and Comparative Immunology* 38: 254-261 (2012).

Hơn nữa, trong phần ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây, các ví dụ về phương pháp bào chế vaccin trên cơ sở virut đã bất hoạt theo sáng chế sẽ được trình bày.

Một phương pháp khác để chống lại SDD là sử dụng vaccin cấu trúc siêu phân tử. Vaccin này không chứa virut toàn phần, mà chỉ chứa một hoặc nhiều thành phần kháng nguyên của virut đó.

Vaccin cấu trúc siêu phân tử có ưu điểm là việc bào chế chúng không cần phải nuôi virut. Nó đủ để biểu hiện cấu trúc siêu phân tử được chọn bằng việc tách dòng ADN mã hóa cấu trúc siêu phân tử đó trong hệ biểu hiện.

Đã phát hiện ra rằng MCP của virut theo sáng chế là protein miễn dịch rất phù hợp. Nó dường như chia sẻ đặc tính này với các thành viên đã biết trong họ Iridoviridae. Sự phù hợp miễn dịch của MCP của iridovirut ở biển từ cá mú được thể hiện bởi Qi Wei Qin (*J. Virological Methods* 106: 89-96 (2002)). Gần đây, Xiaozhe Fu et al., trình bày tính miễn dịch bảo vệ kháng bệnh do iridovirut ở cá trạng nguyên, gây ra bởi MCP tái tổ hợp của virut hoại tử lách và thận truyền nhiễm (*Fish and Shellfish Immunology* 33: 880-885 (2012)). Zhengliang Ou-yang et al., (*Veterinary Immunology and Immunopathology* 149: 38-45 (2012)) mô tả việc chủng ngừa trên cơ sở MCP khi được biểu hiện trong *E. coli*. Chúng đạt được sự bảo vệ đáng kể với protein MCP tái tổ hợp (50 microgam protein).

Vaccin trên cơ sở MCP để cho cá dùng qua đường miệng được mô tả bởi Yutaka Tamaru et al (*Biotechn. Prog.* 22: 949-953 (2006)). Các tác giả này mô tả sự biểu hiện của MCP của Iridovirut cá tráp đỏ trên bề mặt của tế bào nấm men là cơ sở để chủng ngừa qua đường miệng cho cá chống iridovirut.

Ngoài ra, hướng dẫn tổng quát hơn về lĩnh vực biểu hiện protein cũng được nêu trong nhiều tài liệu. Các sổ tay hướng dẫn cung cấp thông tin chuyên sâu về sự biểu hiện

trong hệ biểu hiện vi khuẩn là, ví dụ: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, tái bản lần thứ ba của Richard H. Baltz (Editor-in-Chief), Arnold L. Demain (Editor-in-Chief), Julian E. Davies (Editor-in-Chief) ISBN: 978-1-55581-512-7, *E. coli gene expression protocols* của Peter E. Vaillancourt trong tài liệu *Methods in Molecular Biology* 205 ISBN: 1-58829-008-5, *protein expression: a practical approach* của S. J. Higgins và B. D. Hames ISBN: 0-19-963624-9, *protein expression technologies: current status and future trends*, 2004 của François Baneyx, *Baculovirus expression vectors; a laboratory manual*, của O'Reilly, D et al., Oxford University Press 1994, ISBN 0-19-509131-0 và *Production of recombinant protein: novel microbial and eukaryotic expression systems* của Gerd Gellissen, ISBN: 3-527-31036-3.

Vì thế, theo dạng ưu tiên thứ ba của phương án này, sáng chế đề cập đến vaccin để chống lại bệnh rận vảy ở cá, trong đó vaccin này chứa protein capsit chính theo sáng chế và chất mang được dụng.

Cuối cùng, bất ngờ là các mảnh ADN chứa trình tự gen MCP như được mô tả trong sáng chế rất thích hợp để sử dụng trong vaccin ADN.

Các mảnh ADN như vậy, chứa ADN trong gen MCP của iridovirut cá mú Singapo trong vectơ biểu hiện nhân chuẩn, được mô tả bởi Zhengliang Ou-yang (Veterinary Immunology and Immunopathology 149: 38-45 (2012)) ngoài các tài liệu khác. Chúng đạt được sự bảo vệ chống lại bệnh nhiễm iridovirut cá mú Singapo nhờ chế độ chủng ngừa nhắc lại bằng việc chủng ngừa với 30 microgam ADN.

Sự bảo vệ mạnh mẽ cho cá tráp đỏ chống lại iridovirut ở cá tráp đỏ bằng cách sử dụng vaccin ADN được thể hiện bởi Caipang, C.M.A. *et al* (Fish and Shellfish Immunology 21: 130-138 (2006)). Các tác giả này sử dụng vaccin ADN chứa gen MHC của RSIV dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu gen tăng cường tức thời/sớm cytomegalovirut.

Vì thế, theo dạng ưu tiên thứ tư của phương án này, sáng chế đề cập đến vaccin để chống lại bệnh rận vảy ở cá, trong đó vaccin này chứa mảnh ADN chứa gen mã hóa protein capsit chính theo sáng chế và chất mang được dụng.

Nếu virus theo sáng chế được dùng làm thành phần vaccine để dùng qua đường miệng (chẳng hạn như qua quy trình ngâm hoặc tắm ngâm), thường thì không cần phải sử dụng chất phụ trợ.

Tuy nhiên nếu chế phẩm vaccine này được tiêm trực tiếp vào cá, thì việc sử dụng chất phụ trợ là tùy ý.

Đặc biệt là khi thành phần virus trong vaccine tiêm là dạng bất hoạt, thì việc bổ sung chất phụ trợ có thể được ưu tiên.

Nói chung, nhằm tăng cường đáp ứng miễn dịch, vaccine này có thể chứa nhiều loại chất phụ trợ khác nhau, đặc biệt là trong trường hợp chế phẩm được dự định để tiêm. Chất phụ trợ là chất kích thích miễn dịch tăng cường đáp ứng miễn dịch của vật chủ theo cách không đặc hiệu. Chất phụ trợ này có thể là chất phụ trợ ưa nước, ví dụ, nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat, hoặc chất phụ trợ kỵ nước, ví dụ như chất phụ trợ gốc dầu khoáng. Chất phụ trợ như muramyl dipeptit, avidin, nhôm hydroxit, nhôm phosphat, dầu, nhũ tương dầu, saponin, dextran sulphat, glucan, xytokin, co-polyme khối, oligonucleotit kích thích miễn dịch và các chất khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được phối trộn với virus theo sáng chế. Các ví dụ về chất phụ trợ thường được sử dụng ở vaccine dùng cho cá là muramyl dipeptit, lipopolysaccharit, một vài glucan và glycan và Carbopol® (homopolyme). Các chất phụ trợ thích hợp là, ví dụ, nhũ tương nước trong dầu (nước/dầu), nhũ tương dầu/nước và nhũ tương đôi nước/dầu/nước. Chất phụ trợ dầu thích hợp để sử dụng trong nhũ tương nước/dầu là, ví dụ, dầu khoáng hoặc dầu có thể chuyển hóa. Dầu khoáng là, ví dụ, Bayol®, Marcol® và Drakeol®; dầu có thể chuyển hóa là, ví dụ, dầu thực vật, như dầu lạc và dầu đậu nành, hoặc dầu động vật như squalan dầu cá và squalen. Theo cách khác, chất hòa tan vitamin E (tocopherol) như được mô tả trong EP 382,271 có thể được sử dụng một cách thuận lợi. Nhũ tương dầu/nước rất thích hợp thu được, ví dụ, bắt đầu từ pha nước với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 50% khối lượng/khối lượng và chất phụ trợ dầu với lượng nằm trong khoảng từ 95% đến 50% khối lượng/khối lượng, tốt hơn nữa là pha nước với lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 50% khối lượng/khối lượng và chất phụ trợ dầu với lượng nằm trong khoảng từ 80% đến 50% khối lượng/khối lượng được sử dụng. Lượng chất phụ trợ được bổ sung phụ thuộc

vào bản chất của chính chất phụ trợ đó, và thông tin liên quan đến các lượng này sẽ được cung cấp bởi nhà sản xuất.

Một ví dụ khác về chất phụ trợ không phải dầu khoáng là, ví dụ, Montanide-ISA-763-A.

Một ví dụ về chất phụ trợ gốc nước cỡ hạt nano là, ví dụ, Montanide-IMS-2212.

Thông tin tổng quan chuyên sâu về chất phụ trợ thích hợp cho vacxin dùng cho cá và động vật có vỏ được nêu trong tài liệu đánh giá của Jan Raa (Reviews in fisheries Science 4(3): 229-288 (1996)).

Vì thế, một dạng ưu tiên của vacxin theo sáng chế là đề cập đến vacxin chứa chất phụ trợ.

Đặc biệt là trong trường hợp vacxin này chứa virus sống bị giảm độc lực, thì vacxin theo sáng chế còn chứa chất làm ổn định. Chất làm ổn định có thể được bổ sung vào vacxin theo sáng chế chẳng hạn là để bảo vệ vacxin khỏi hiện tượng thoái biến, để tăng cường thời hạn bảo quản, hoặc để cải thiện hiệu quả đông khô. Các chất ổn định hữu dụng là, trong số các chất khác, SPGA (Bovarnik et al., 1950, J. Bacteriology, vol. 59, p. 509), sữa tách kem, gelatin, albumin huyết thanh bò, hydrat cacbon ví dụ sorbitol, mannitol, trehaloza, tinh bột, sucroza, dextran hoặc glucoza, lactoza, protein như albumin hoặc casein hoặc sản phẩm thoái biến của chúng, và chất đệm, như phosphat kim loại kiềm. Để hoàn nguyên chế phẩm đã đông khô, nó được tạo hỗn dịch trong chất pha loãng sinh lý dụng. Chất pha loãng như vậy có thể đơn giản như là nước vô trùng, hoặc dung dịch muối sinh lý chẳng hạn. Ở dạng phức tạp hơn thì vacxin đông khô có thể được tạo hỗn dịch trong nhũ tương chẳng hạn như được mô tả trong EP 1,140,152.

Thuốc kháng sinh như neomycin và streptomycin có thể được bổ sung để ngăn chặn sự phát triển tiềm ẩn của bào tử.

Ngoài ra, vacxin này có thể chứa một hoặc nhiều hợp chất hoặc nhũ tương có hoạt tính trên bề mặt thích hợp, ví dụ, Span® hoặc Tween®. Vacxin này cũng có thể chứa chất còn gọi là “chất dẫn thuốc”. Chất dẫn thuốc là hợp chất mà virus theo sáng chế bám vào nhưng không được liên kết cộng hóa trị với nó. Các chất dẫn thuốc như vậy là, trong số

các chất khác, vi nang sinh học, micro-alginat, liposom và macrosol, đều đã được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Dạng đặc biệt của chất dẫn thuốc như vậy là Iscom (phức hợp kích thích miễn dịch). Rõ ràng là việc phối trộn các chất ổn định khác, chất mang, chất pha loãng, nhũ tương, và các chất tương tự với vacxin theo sáng chế cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Các chất phụ gia này được mô tả trong, ví dụ, các sổ tay nổi tiếng như: "Remington: the science and practice of pharmacy" (2000, Lippincot, USA, ISBN: 683306472), và "Veterinary vaccinology" (P. Pastoret et al. ed., 1997, Elsevier, Amsterdam, ISBN: 0444819681).

Chế độ định liều để sử dụng vacxin theo sáng chế cho sinh vật mục tiêu có thể là sử dụng một hoặc nhiều liều, mà có thể được dùng đồng thời hoặc tuần tự, theo cách tương thích với liều lượng và dạng bào chế và ở lượng cho tác dụng miễn dịch.

Những gì tạo ra “lượng cho tác dụng miễn dịch” cho vacxin theo sáng chế mà dựa trên virus theo sáng chế (hoặc ví dụ, cấu trúc siêu phân tử của virus này như MCP hoặc vacxin ADN mã hóa MCP) là tùy thuộc vào hiệu quả mong muốn và sinh vật mục tiêu. Thuật ngữ "lượng cho tác dụng miễn dịch" như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến lượng virus gây miễn dịch theo sáng chế (hoặc ví dụ, cấu trúc siêu phân tử của virus này như MCP hoặc vacxin ADN mã hóa MCP) mà cần để cảm ứng đáp ứng miễn dịch ở cá đến mức mà nó làm giảm tác dụng bệnh lý do lây nhiễm virus SDD kiểu đại (SDDV) gây ra, khi so với tác dụng bệnh lý do lây nhiễm SDDV kiểu đại ở cá không được tạo miễn dịch.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định được liệu việc điều trị có “cho tác dụng miễn dịch” hay không, ví dụ, bằng cách cho động vật đã chủng ngừa sử dụng lây nhiễm thách thức thí nghiệm và sau đó xác định các dấu hiệu lâm sàng của bệnh trên động vật mục tiêu, các thông số huyết thanh hoặc bằng cách xác định sự tái phân lập của yếu tố gây bệnh, sau đó so sánh các kết quả này với các kết quả được thấy ở cá nhiễm bệnh cùng vùng.

Lượng virus được sử dụng sẽ phụ thuộc vào đường dùng, sự có mặt của chất phụ trợ và thời điểm sử dụng.

Lượng được ưu tiên của vacxin sống chứa virus theo sáng chế được trình bày dưới dạng, ví dụ, liều gây nhiễm giống cây mô (TCID₅₀). Ví dụ, đối với virus sống thì liều nằm trong khoảng từ 1 đến 10¹⁰ TCID₅₀ trên mỗi con vật có thể được sử dụng một cách thuận lợi; tốt hơn là liều nằm trong khoảng từ 10² đến 10⁶ TCID₅₀ được sử dụng.

Có thể áp dụng nhiều cách sử dụng khác nhau, tất cả các cách này đều đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tốt hơn là, vacxin theo sáng chế được sử dụng cho cá bằng cách tiêm (trong cơ hoặc trong màng bụng), nhúng, ngâm hoặc qua đường miệng. Quy trình sử dụng có thể được tối ưu hóa theo thực tiễn chủng ngừa tiêu chuẩn.

Nếu vacxin chứa virus bị bất hoạt theo sáng chế, thì liều này có thể được trình bày dưới dạng số lượng hạt virus được sử dụng. Liều này thường cao hơn đôi chút so với khi sử dụng hạt virus sống, do hạt virus sống sẽ sao chép đến một mức độ nhất định trong động vật mục tiêu, trước khi chúng bị loại bỏ bởi hệ miễn dịch. Đối với vacxin trên cơ sở virus bị bất hoạt, lượng hạt virus nằm trong khoảng từ 10⁴ đến 10⁹ hạt thường là phù hợp, tùy thuộc vào chất phụ trợ được sử dụng.

Trong trường hợp vacxin chứa cấu trúc siêu phân tử, ví dụ như MCP theo sáng chế, thì liều lượng sẽ được trình bày dưới dạng microgam protein. Đối với vacxin trên cơ sở cấu trúc siêu phân tử, liều lượng thích hợp sẽ thường nằm trong khoảng từ 5 đến 500 microgam protein, tùy thuộc vào chất phụ trợ được sử dụng.

Trong trường hợp vacxin chứa mảnh ADN gồm gen mã hóa protein capsit chính, thì liều lượng sẽ được trình bày dưới dạng microgam ADN. Đối với vacxin trên cơ sở cấu trúc siêu phân tử, liều lượng thích hợp thường nằm trong khoảng từ 5 đến 500 microgam ADN, tức là tùy thuộc vào hiệu quả của plasmit biểu hiện được sử dụng. Trong nhiều trường hợp thì lượng plasmit nằm trong khoảng từ 20 đến 50 microgam trên mỗi con cá là đủ để chủng ngừa hiệu quả.

Vacxin theo sáng chế có thể có dạng bất kỳ thích hợp để sử dụng trong phạm vi nuôi trồng thủy sản, và hợp với đường dùng mong muốn và hiệu quả mong muốn. Việc bào chế vacxin theo sáng chế được thực hiện theo cách thông thường với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Tốt hơn là vaccin theo sáng chế được bào chế ở dạng thích hợp để tiêm hoặc để chủng ngừa bằng cách ngâm, như hỗn dịch, dung dịch, thể phân tán, nhũ tương, và dạng tương tự.

Dùng trong màng bụng là cách sử dụng hấp dẫn trong trường hợp vaccin virus bị bất hoạt hoặc vaccin cấu trúc siêu phân tử được sử dụng. Đặc biệt là trong trường hợp dùng trong màng bụng thì sự có mặt của chất phụ trợ được ưu tiên. Tuy nhiên, cách chủng ngừa này cần người có chuyên môn cao hơn so với cách sử dụng như ngâm.

Chủng ngừa qua đường miệng và bằng cách ngâm được ưu tiên do nó giúp dễ dàng sử dụng được vaccin.

Để dùng qua đường miệng thì tốt hơn là vaccin được trộn với chất mang thích hợp để dùng qua đường miệng, tức là, xenluloza, thức ăn hoặc chất có thể chuyển hóa như alpha-xenluloza hoặc các dầu khác nhau có nguồn gốc từ thực vật hoặc động vật. Một phương pháp hấp dẫn nữa là sử dụng vaccin cho một mật độ lớn các sinh vật thức ăn sống, sau đó cho cá ăn các sinh vật thức ăn sống này. Chất mang thức ăn đặc biệt ưu tiên để đưa vào cơ thể qua đường miệng của vaccin theo sáng chế là sinh vật thức ăn sống có thể bao lấy vaccin. Sinh vật thức ăn sống thích hợp bao gồm loài ăn lọc không chọn lọc giống sinh vật phù du, tốt hơn là thành viên thuộc *Rotifera*, *Artemia*, giáp xác chân chèo, tảo và dạng tương tự.

Độ tuổi của cá cần được chủng ngừa không bị giới hạn, mặc dù rõ ràng là muốn chủng ngừa cho cá chống lại bệnh nhiễm virus SDD ở giai đoạn càng sớm càng tốt, tức là trước khi có khả năng tiếp xúc với yếu tố gây bệnh.

Việc chủng ngừa bằng cách ngâm có thể là lựa chọn chủng ngừa đặc biệt khi cá vẫn còn nhỏ, ví dụ, dưới 5 gam. Cá từ 5 gam trở lên có thể, nếu cần hoặc nếu muốn, cũng được chủng ngừa bằng cách tiêm.

Mặt khác, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ tìm được hướng dẫn thích hợp trong các tài liệu tham khảo được đề cập ở trên và trong thông tin nêu dưới đây, đặc biệt là trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế.

Các bài báo tổng hợp về vaccin cho cá và việc sản xuất chúng là, trong số nhiều tác giả khác, của các tác giả Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E. và Frost, P. trong *Expert Review of Vaccines* 4: 89-101 (2005), của các tác giả Buchmann, K., Lindenstrøm, T. và Bresciani, trong *J. Acta Parasitologica* 46: 71-81 (2001), của các tác giả Vinitnantharat, S., Gravningen, K. và Greger, E. trong *Advances in veterinary medicine* 41: 539-550 (1999) và Anderson, D.P. trong *Developments in Biological Standardization* 90: 257-265 (1997).

Hơn nữa, người có hiểu biết trung bình sẽ tìm được hướng dẫn cụ thể trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Rõ ràng là tính đến nay thì virus SDD không phải là yếu tố gây bệnh cho cá duy nhất: các ví dụ về vi sinh vật và virus gây bệnh cho cá nước ấm có tầm quan trọng đối với kinh tế là *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela* phân loài *piscicida*, *Tenacibaculum maritimum*, *Flavobacterium sp.*, *Flexibacter sp.*, *Streptococcus sp.*, *Lactococcus garvieae*, *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, virus hoại tử thần kinh, iridovirus khác virus theo sáng chế mà chia sẻ một số đặc tính của Iridoviridae, và Koi Herpesvirus.

Vì thế, có thể có lợi khi kết hợp vaccin theo sáng chế với ít nhất một vi sinh vật hoặc virus gây bệnh cho cá khác và/hoặc ít nhất một thành phần tạo miễn dịch và/hoặc vật liệu di truyền mã hóa thành phần tạo miễn dịch khác đó của vi sinh vật hoặc virus khác gây bệnh cho cá: việc chủng ngừa duy nhất một lần sau đó có thể bảo vệ chống lại cả bệnh nhiễm virus SDD và bệnh nhiễm vi sinh vật hoặc virus khác gây bệnh cho cá.

Vì thế, theo dạng ưu tiên của phương án này, sáng chế đề cập đến vaccin theo sáng chế, trong đó vaccin này chứa ít nhất một thành phần tạo miễn dịch khác và/hoặc kháng nguyên hoặc vật liệu di truyền mã hóa thành phần tạo miễn dịch khác đó, của vi sinh vật hoặc virus gây bệnh cho cá.

Tốt hơn là vi sinh vật gây bệnh cho cá hoặc virus gây bệnh cho cá có thể được chọn từ nhóm bao gồm *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela* phân loài *piscicida*, *Tenacibaculum maritimum*, *Flavobacterium sp.*, *Flexibacter sp.*, *Streptococcus sp.*,

Lactococcus garvieae, *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, virus hoại tử thần kinh, iridovirus khác virus theo sáng chế mà chia sẻ một số đặc tính của Iridoviridae, và Koi Herpesvirus.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp bào chế vaccine theo sáng chế, trong đó phương pháp này bao gồm bước trộn virus theo sáng chế và/hoặc MCP theo sáng chế và/hoặc mảnh ADN mã hóa MCP theo sáng chế, và chất mang được dùng.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến virus theo sáng chế và/hoặc MCP theo sáng chế và/hoặc mảnh ADN mã hóa MCP theo sáng chế, để sử dụng trong vaccine.

Như đã được đề cập ở trên, khả năng chết sau khi bị nhiễm virus SDD có thể dễ dàng lên tới 30% và cũng dễ dàng đạt đến 75%. Ngoài ra, bệnh này còn bùng phát ở tốc độ khá cao. Vì thế, để bảo vệ hiệu quả chống lại bệnh thì việc chẩn đoán SDD nhanh và chính xác là rất quan trọng.

Vì thế một mục đích khác của sáng chế là đề xuất công cụ chẩn đoán thích hợp để phát hiện bệnh SDD và virus SDD.

Các công cụ này dựa một phần vào khả năng của kháng thể trong việc kháng virus. Kháng thể như vậy có thể được sử dụng, ví dụ, trong thử nghiệm chẩn đoán bệnh SDD và virus SDD.

Một nguồn kháng thể rất thích hợp kháng virus theo sáng chế là máu hoặc huyết thanh của, ví dụ, cá chêm đã nhiễm virus theo sáng chế.

Kháng thể hoặc huyết thanh kháng virus theo sáng chế cũng có thể thu được một cách nhanh chóng và dễ dàng bằng việc chủng ngừa cho, ví dụ, lợn, gia cầm hoặc ví dụ cho thỏ bằng virus theo sáng chế trong hỗn dịch nước trong dầu chẳng hạn sau đó, sau khoảng bốn tuần, bằng cách lấy máu, ly tâm máu đông và gạn lọc huyết thanh. Các phương pháp như vậy đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Các phương pháp khác để tạo ra kháng thể, có thể là đa dòng, đặc hiệu đơn hoặc đơn dòng (hoặc dẫn xuất của chúng) là đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Nếu

muốn có kháng thể đa dòng, thì kỹ thuật tạo ra và xử lý huyết thanh đa dòng đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này trong nhiều thập kỷ (ví dụ, Mayer and Walter, eds. *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology*, Academic Press, London, 1987).

Kháng thể đơn dòng, có tính phản ứng kháng virus theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách tạo miễn dịch cho chuột thuần chủng bằng kỹ thuật đã được biết từ lâu trong lĩnh vực kỹ thuật này (Kohler and Milstein, *Nature*, 256, 495-497, 1975).

Vì thế, theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể hoặc kháng huyết thanh có tính phản ứng với virus theo sáng chế.

Kit xét nghiệm chẩn đoán mà dựa trên việc phát hiện virus theo sáng chế hoặc vật liệu kháng nguyên của virus đó và vì thế thích hợp để phát hiện bệnh nhiễm virus SDD có thể bao gồm thử nghiệm ELISA chuẩn chẳng hạn. Theo một ví dụ của thử nghiệm, các thành của lỗ trong đĩa ELISA được phủ kháng thể được định hướng kháng virus. Sau khi ủ với vật liệu cần được thử nghiệm thì kháng thể đã được đánh dấu phản ứng với virus được bổ sung vào lỗ. Nếu vật liệu được thử nghiệm thực sự chứa virus SDD, thì virus này sẽ gắn kết với kháng thể đã được phủ lên lỗ của đĩa ELISA. Kháng thể đã được đánh dấu phản ứng với virus mà sau đó được bổ sung vào lỗ sẽ lần lượt gắn kết với virus và phản ứng màu sau đó sẽ chỉ ra sự có mặt của vật liệu kháng nguyên của virus.

Vì thế, theo phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến kit xét nghiệm chẩn đoán để phát hiện ra virus theo sáng chế hoặc vật liệu kháng nguyên của virus đó, mà chứa kháng thể phản ứng với virus theo sáng chế hoặc với vật liệu kháng nguyên của chúng. Vật liệu kháng nguyên của virus được hiểu theo nghĩa rộng. Nó có thể là, ví dụ, virus ở dạng tan rã, hoặc vật liệu bao virus bao gồm protein màng ngoài virus. Miễn là vật liệu của virus phản ứng với kháng huyết thanh sinh ra chống lại virus, vật liệu này được coi là vật liệu kháng nguyên.

Kit xét nghiệm chẩn đoán dựa trên việc phát hiện ra huyết thanh của kháng thể phản ứng với virus theo sáng chế hoặc vật liệu kháng nguyên của virus đó và vì thế thích hợp để phát hiện ra bệnh nhiễm virus SDD cũng có thể bao gồm thử nghiệm ELISA tiêu

chuẩn chẳng hạn. Trong thử nghiệm này, các thành của lỗ trong đĩa ELISA có thể được phủ bằng, ví dụ, virus theo sáng chế hoặc vật liệu kháng nguyên của chúng. Sau khi ủ với vật liệu cần được thử nghiệm, ví dụ như huyết thanh của cá nghi nhiễm virus SDD, thì kháng thể đã được đánh dấu phản ứng với virus theo sáng chế được bổ sung vào lỗ. Nếu kháng thể kháng virus SDD có mặt trong huyết thanh được thử nghiệm, thì các kháng thể này sẽ gắn kết với virus đã được phủ lên lỗ của đĩa ELISA. Kết quả là, kháng thể đã được đánh dấu và bổ sung sau đó và phản ứng với virus sẽ không gắn kết và không phát hiện thấy phản ứng màu nào. Việc thiếu phản ứng màu vì thế sẽ chỉ ra sự có mặt của kháng thể phản ứng với virus theo sáng chế.

Vì thế, theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến kit xét nghiệm chẩn đoán để phát hiện ra kháng thể phản ứng với virus theo sáng chế hoặc với vật liệu kháng nguyên của virus mà chứa virus theo sáng chế hoặc vật liệu kháng nguyên của chúng.

Việc thiết kế thử nghiệm miễn dịch có thể thay đổi. Ví dụ, thử nghiệm miễn dịch có thể là dựa trên sự cạnh tranh hoặc phản ứng trực tiếp. Hơn nữa, các quá trình có thể sử dụng giá thể rắn hoặc có thể sử dụng vật liệu xenluloza. Việc phát hiện phức hợp kháng thể-kháng nguyên có thể bao gồm việc sử dụng kháng thể được đánh dấu; các chất đánh dấu có thể là, ví dụ, enzym, phân tử có hoạt tính huỳnh quang, phân tử có hoạt tính phát quang hóa học, có hoạt tính phóng xạ hoặc phân tử thuốc nhuộm.

Phương pháp thích hợp để phát hiện ra kháng thể phản ứng với virus theo sáng chế trong mẫu bao gồm, ngoài ELISA được đề cập ở trên, thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang (IFT) và phân tích thẩm tách Western.

Một thử nghiệm chẩn đoán thay thế nhưng nhanh và dễ dàng để chẩn đoán sự có mặt hoặc không có mặt của virus theo sáng chế là thử nghiệm PCR như được mô tả ở trên, bao gồm bộ đoạn mồi PCR phản ứng với vùng đặc hiệu của, ví dụ, gen MCP hoặc ATPaza của virus SDD. Đặc hiệu trong bối cảnh này có nghĩa là duy nhất đối với, ví dụ, gen MCP hoặc ATPaza của virus SDD, tức là, không có trong các thành viên khác của họ Iridoviridae.

Tốt hơn là thử nghiệm như vậy nên sử dụng bộ đoạn môi (SEQ ID NO: 5-6) mà phản ứng đặc hiệu với protein capsit chính của virus bằng cách sử dụng hai đoạn môi SDD-50-FW:CAGTGCATTACAAGAAAG và SDD-213-REV:GCTGAAACAACAATTTAG hoặc bộ đoạn môi (SEQ ID NO: 7-8) cũng phản ứng đặc hiệu với protein capsit chính của virus và sử dụng hai đoạn môi SDD-MCP-277-FW:TCCTGTGCAGCTGTCTAAAC và SDD-MCP-1090-REV:ACTGGCAATGATGGGCGATG hoặc bộ đoạn môi (SEQ ID NO: 9-10) mà phản ứng đặc hiệu với ATPaza của virus và sử dụng hai đoạn môi SDD-ATPaza-65-FW:TCGGAGGGATGAAATTGG và SDD-ATPaza-618-REV:AGCGTTGTCGATGTAGAG.

Rõ ràng là có thể sử dụng nhiều đoạn môi ngoài đoạn môi được nhận biết ở trên. Lần đầu tiên sáng chế đề xuất trình tự duy nhất của gen MCP và ATPaza của virus SDD. Điều này cho phép người có hiểu biết trung bình không cần nỗ lực gì thêm mà chọn lọc được đoạn môi chọn lọc khác. Bằng cách phân tích đơn giản bằng máy tính trình tự gen MCP hoặc ATPaza đề cập trong sáng chế với, trình tự gen MCP hoặc ATPaza đã biết của các thành viên khác của họ Iridoviridae, người có hiểu biết trung bình có thể phát triển các đoạn môi PCR đặc hiệu khác cho thử nghiệm chẩn đoán để phát hiện ra virus SDD và/hoặc phân biệt virus SDD và các yếu tố gây bệnh (cho cá) là virus khác.

Đoạn môi PCR phản ứng đặc hiệu với gen MCP hoặc ATPaza của virus SDD được hiểu là đoạn môi chỉ phản ứng với gen MCP hoặc ATPaza của virus SDD và không phản ứng gen MCP của virus gây bệnh (cho cá) khác, hoặc nhóm virus gây bệnh (cho cá).

Vì thế, theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến kit xét nghiệm chẩn đoán để phát hiện ra virus theo sáng chế, đặc trưng ở chỗ kit xét nghiệm này chứa bộ đoạn môi PCR phản ứng với vùng đặc hiệu của gen MCP hoặc ATPaza của virus SDD.

Theo một dạng ưu tiên của phương án này, sáng chế đề cập đến kit xét nghiệm chẩn đoán để phát hiện ra virus theo sáng chế, đặc trưng ở chỗ thử nghiệm này bao gồm bộ đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 5-6 hoặc bộ đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 7-8 hoặc bộ đoạn môi được nêu trong SEQ ID NO: 9-10.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập và nuôi cấy *in vitro* virus SDD

Thu gom các mẫu huyết thanh, tim, lách, và thận để phân lập virus, phân tích PCR và nuôi cấy virus *in vitro*

Thử nghiệm 1

Các mẫu được thu gom từ cá có các dấu hiệu điển hình của bệnh rụng vảy và cá không có triệu chứng của bệnh rụng vảy tại trang trại ở Singapo. Các mẫu này bao gồm một mẫu tim, hai mẫu lách, ba mẫu thận và bốn mẫu huyết thanh từ cá bị bệnh. Ngoài ra, hai mẫu lách, bốn mẫu thận và hai mẫu huyết thanh được thu gom từ cá khỏe mạnh.

Thử nghiệm 2

Trong thử nghiệm này, các mẫu huyết thanh, thận và lách được thu gom từ ba nhóm cá thu được từ trang trại ở Indonesia. Nhóm 1 gồm ba con cá đối chứng từ lồng không có cá mang các triệu chứng của bệnh rụng vảy (SDD). Nhóm 2 gồm năm con cá từ lồng có bệnh SDD ở giai đoạn sớm, khi mà tỷ lệ chết vừa mới bắt đầu. Nhóm 3 gồm năm con cá từ lồng có các dấu hiệu nghiêm trọng của bệnh SDD, khi tỷ lệ chết đạt tới đỉnh.

Thử nghiệm 3

Trong thử nghiệm này, các mẫu huyết thanh được thu gom từ hai nhóm cá thu được từ trang trại ở Indonesia. Nhóm 1 gồm ba con cá đối chứng từ lồng không có cá mang các triệu chứng của bệnh SDD. Nhóm 2 gồm 20 con cá từ lồng bùng phát bệnh SDD ở giai đoạn đầu. Cá không biểu hiện triệu chứng hoặc các triệu chứng cũng khó phát hiện.

Chuẩn bị mẫu/đồng nhất mô và phân lập ADN

Các mẫu mô (lách, thận và tim) được đồng nhất để thu được chất đồng nhất nồng độ 10% (trọng lượng/thể tích) trong PBS 0,01M bằng cách sử dụng hạt thủy tinh.

Huyết thanh được thu như sau: máu được thu gom bằng cách chọc tĩnh mạch đuôi, để đông lại và huyết thanh được thu gom sau khi quay lắng các tế bào máu bằng cách ly tâm chuẩn.

ADN được phân lập từ huyết thanh cá và các mẫu mô cá đã được đồng nhất bằng cách sử dụng kit Blood & Tissue Qiagen DNeasy theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các mẫu được xử lý như sau:

Đối với huyết thanh: 50 μ L huyết thanh được bổ sung vào 20 μ L Proteinaza K (kit Proteinaza K Blood & Tissue Qiagen DNeasy “600 mAU/ml dung dịch (hoặc 40 mAU/mg protein)”) trong ống Eppendorf dung tích 1,5ml và trộn đều. 150 μ L dung dịch nước muối đệm phosphat (PBS) được bổ sung vào hỗn hợp này và trộn đều. 20 μ L ARNaza A (20 mg/ml) được bổ sung vào hỗn hợp này, trộn đều, và được ủ trong 2 phút ở nhiệt độ trong phòng. Từ đây, tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Đối với các mẫu mô được đồng nhất: 50 μ L chất đồng nhất mô được bổ sung vào 20 μ L Proteinaza K trong ống Eppendorf dung tích 1,5ml và trộn đều. 130 μ L dung dịch ATL (Qiagen) được bổ sung vào hỗn hợp này, trộn đều, và được ủ trong 60 phút ở nhiệt độ trong phòng. 20 μ L ARNaza A (20 mg/ml) được bổ sung vào hỗn hợp này, trộn đều, và được ủ trong 2 phút ở nhiệt độ trong phòng. Từ đây, thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phát hiện virus bằng cách sử dụng VIDISCA-454 và PCR và định lượng tải lượng virus bằng cách sử dụng qPCR

Các mẫu huyết thanh trong thử nghiệm 1, thu được từ cá chẽm Châu Á có và không có các triệu chứng của bệnh rưng vảy được phân tích bằng cách sử dụng kỹ thuật phát hiện virus VIDISCA-454 (De Vries *et al.* (2011) PLoS ONE 6(1):e16118). Thu được nhiều trình tự mà nghi là có nguồn gốc từ yếu tố gây bệnh cho cá mới. Các trình tự này được sử dụng để tạo ra đoạn mồi PCR cho PCR thông thường và qPCR (xem Bảng 1). Việc chạy chương trình blast các trình tự mới đã cho thấy rằng yếu tố gây bệnh phát hiện ở cá mắc bệnh rưng vảy có mức tương đồng nhất định với virus thuộc họ Iridoviridae.

PCR sử dụng đoạn mồi đặc hiệu với virus SDD được thực hiện trên ADN chiết từ các mẫu tim, lách, thận và huyết thanh, được thu gom từ cá có và không có các triệu

chứng của bệnh rụng vảy (Thử nghiệm 1). Ngoài ra, PCR với bộ đoạn môi đặc hiệu với một thành viên khác thuộc họ Iridoviridae: Iridovirut cá tráp đỏ (Bảng 1 và các SEQ ID NO: 12 và 13) được thực hiện. PCR được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn với nhiệt độ ủ là 50°C đối với bộ đoạn môi virus SDD, và 57°C đối với bộ đoạn môi Iridovirut cá tráp đỏ. Các mẫu PCR được chạy trên gel agarosa. Sản phẩm PCR được cắt từ agarosa, được tinh chế bằng cách sử dụng kit chiết gel QIAquick (Qiagen) và được giải trình tự.

Như được thể hiện trên Fig.1, sản phẩm PCR virus SDD duy nhất được tạo ra trong các mẫu chứa ADN từ cá mắc bệnh rụng vảy. Chỉ có duy nhất một mẫu huyết thanh từ ADN của virus SDD ở cá bị bệnh (Huyết thanh cá rụng vảy 3) là không được khuếch đại. Không mẫu nào thu được từ các con cá khỏe mạnh tạo ra sản phẩm PCR. Việc giải trình tự các sản phẩm PCR này xác nhận rằng chúng có nguồn gốc từ virus SDD. Bằng cách sử dụng bộ đoạn môi cho virus SDD, không có sản phẩm PCR nào cho Iridovirut cá tráp đỏ có thể được tạo ra (Fig.1). Hơn nữa, bộ đoạn môi Iridovirut cá tráp đỏ không thể hiện khả năng phản ứng chéo với virus SDD (Fig.2).

Ngoài ra, đầu dò được thiết kế cho qPCR của virus SDD (Bảng 1 và SEQ ID NO: 11). qPCR được thực hiện bằng cách áp dụng phương pháp chuẩn và sử dụng đầu dò kết hợp với bộ đoạn môi virus SDD ở nhiệt độ ủ bằng 50°C. Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm Bio-Rad CFX Manager 2.0. Việc đo bản sao dây pha loãng của sản phẩm PCR virus SDD đã tách dòng trong pCR4-TOPO (Invitrogen) có chứng năng làm đường cong chuẩn. Việc phân loại dương tính và âm tính cho các mẫu và việc xác định số lượng ban đầu của vật liệu bộ gen virus SDD trong mỗi mẫu là dựa trên chu kỳ ngưỡng, so với đường cong chuẩn. Giới hạn phát hiện thấp hơn của qPCR này là khoảng 10^2 bản sao/ μ L (Fig.3). Như được thể hiện trong Bảng 2, kết quả qPCR hoàn toàn tương ứng với kết quả PCR (xem cột Kết quả PCR và cột Kết quả Q-PCR).

Tương tự, số lượng ban đầu của các bản sao bộ gen virus SDD trong các mẫu huyết thanh thu được từ cá không có triệu chứng rụng vảy, có triệu chứng rụng vảy ở giai đoạn sớm và ở giai đoạn muộn (Thử nghiệm 2) được xác định bằng cách sử dụng qPCR (Bảng 3). Ngoại trừ con số 8, tất cả các mẫu huyết thanh từ cá có cả bệnh giai đoạn sớm và giai

đoạn muện đều dương tính, trong khi tất cả các mẫu từ cá có vẻ ngoài khỏe mạnh là âm tính.

Ngoài ra, các mẫu huyết thanh từ thử nghiệm 3 được phân tích bằng qPCR. Trình tự bộ gen virus được phát hiện thấy ở 17 trong số 20 mẫu huyết thanh thu được từ cá mắc bệnh rụng vảy. Không mẫu huyết thanh nào được thu gom từ cá khỏe mạnh là dương tính đối với virus SDD.

Tóm lại, 40 mẫu huyết thanh và mô thu gom từ cá có các triệu chứng của bệnh rụng vảy từ nhẹ đến nghiêm trọng được phân tích. Trình tự bộ gen virus SDD được phát hiện ở 35 mẫu trong số các mẫu này. Ngược lại, không có virus nào được phát hiện trong 14 mẫu từ các con vật khỏe mạnh.

Giống cấy tế bào đối với dòng tế bào cá Koi (Bluegill fry) (BF-2) thiết lập trên MSD AH

Dòng tế bào BF-2 thu được từ đầu từ thể huyền phù được trypsin hóa của các phần cuối thân mình được gộp lại của cá giống 1 tuổi (Bluegill fry, *Lepomis macrochirus*, xem tài liệu Science 1966; 151:1004, J Virol 1968; 2:393, J Infect Dis 1968; 11:253, *In vitro* Cell Dev. Biol 1992; 28A:385). Dòng tế bào này có thể mua đọc trên thị trường qua ATCC và ECACC, nhưng dòng được sử dụng trong các thử nghiệm được mô tả dưới đây được nuôi cấy ở MSD AH trong +70 lần cấy chuyển.

Giống cấy tế bào BF-2 chứa 899ml E-MEM được bổ sung L-glutamin 2mM và 110 mg/L natri pyruvat, 100 ml FCS (10%) và 1ml dung dịch gốc 1000 lần của dung dịch thuốc kháng sinh Neomycin Polymyxin. Các tế bào được cho phát triển bình thường ở nhiệt độ 28°C và CO₂ 5% trong buồng ủ ẩm.

Giống cấy được giữ ở nhiệt độ 4°C trước khi bắt đầu nuôi cấy. Một ống chứa dung dịch gốc đông lạnh BF-2 được sử dụng để bắt đầu nuôi cấy. Tế bào trong nitơ lỏng được rã đông nhanh trong nước có nhiệt độ khoảng từ 20 đến 28°C. Thể huyền phù tế bào được hút bằng ống pipet vào trong ống dung tích 15ml và được pha loãng từ từ với 7ml giống cấy. Sau đó, các tế bào này được đếm. Thể huyền phù này được pha loãng thêm với giống cấy cho đến khi DMSO được pha loãng ít nhất 50 lần. Sau đó, thể huyền phù này được phân tán vào bình nuôi cấy hoặc chai lắc thích hợp và được ủ ở nhiệt độ 28°C và CO₂ 5%.

Sau thời gian từ 6 đến 24 giờ hoặc tế bào bám dính hoàn toàn, giống cấy được làm mới để loại bỏ môi trường DMSO còn lại (môi trường đông lạnh chứa 80% giống cấy cộng 20% DMSO). Các tế bào được ủ thêm trong thời gian từ 3 đến 7 ngày cho đến khi đạt được sự hợp dòng. Đối với chai lẫn, cần phải có tốc độ lẫn bằng từ 0,2 đến 0,5 vòng/phút. Các tế bào được kiểm tra ở các khoảng cách thời gian đều đặn dưới kính hiển vi đảo.

Khi đạt được sự hợp dòng, các tế bào được cấy chuyển. Việc cấy chuyển có thể được thực hiện mỗi 3 đến 4 ngày với mật độ gieo ban đầu là $2,0 \times 10^4$ tế bào/cm². Theo cách khác, các khoảng cách thời gian cấy chuyển ngắn hơn có thể thu được bằng cách gieo tế bào ở mật độ cao hơn lên đến $4,0 \times 10^4$ tế bào/cm². Chất phản ứng để cấy chuyển tế bào (môi trường, PBS, Trypsin/EDTA) được làm ấm từ trước đến nhiệt độ 28°C. Giống cấy được bỏ đi và lớp đơn hợp dòng được rửa một lần bằng PBS với lượng thích hợp (3ml đối với T25). Sau đó PBS được loại bỏ và các tế bào được ủ trong thể tích PBS giống hệt có bổ sung thêm 1% (thể tích/thể tích) dung dịch trypsin 2,5% và 1% (thể tích/thể tích) dung dịch EDTA 2% trong 15 phút ở nhiệt độ 28°C. Giống cấy mới với thể tích giống hệt được bổ sung vào và các tế bào được tạo huyền phù lại và được đếm. Bình mới được thiết lập mật độ tế bào mong muốn trong thể tích nuôi cấy thích hợp cho bình nuôi cấy hoặc chai lẫn nuôi cấy.

Để làm đông tế bào, giống cấy và môi trường đông lạnh (80% (thể tích/thể tích) của giống cấy cộng 20% (thể tích/thể tích) DMSO) được giữ ở nhiệt độ 4°C trước khi xử lý. Giống cấy tế bào hợp dòng được xử lý như được mô tả ở trên và bao gồm việc trypsin hóa. Các tế bào được tạo huyền phù lại, được đếm, được tạo huyền phù lại thêm nữa ở lượng giống cấy thích hợp, và hai thể tích bằng nhau của môi trường đông lạnh được bổ sung từng giọt vào hai lần trong khi trộn xoáy thể huyền phù. Các ống nhỏ để lưu giữ nitơ lỏng được nạp 5×10^6 tế bào trong mỗi ống nhỏ để bắt đầu T175 hoặc được nạp $7,5 \times 10^5$ tế bào trong mỗi ống nhỏ để bắt đầu T25.

Truyền nhiễm virus SDD vào tế bào BF-2

Các tế bào đã được nuôi cấy từ thiết bị lưu giữ nitơ lỏng được cấy chuyển ít nhất một lần trước khi thử nghiệm truyền nhiễm được thiết lập. Các tế bào này được cấy

chuyển và được nuôi cấy 24 giờ trước khi truyền nhiễm ở mật độ $5,0 \times 10^4$ tế bào/cm² trong lọ nuôi cấy T25. Nguyên liệu truyền nhiễm gồm dung dịch pha loãng tỷ lệ 1:10 của huyết thanh thu được từ con vật bị ảnh hưởng bởi bệnh SDD trong giống cây (mẫu huyết thanh đã được gộp lại của cá 4-7 trong thử nghiệm 2 được sử dụng để thiết lập giống cây virus). Giống cây này được loại bỏ khỏi bình. Bình này sau đó được truyền 0,5 ml giống cây/T25 ở nhiệt độ 28°C/CO₂ 5% trong thời gian tối thiểu 30 phút.

Có thể truyền nhiễm đồng đều các tế bào với sản phẩm được đông lạnh-rã đông của lần cấy chuyển trước đó của virus SDD trong tế bào được pha loãng trong giống cây.

Sau đó, nguyên liệu truyền nhiễm được loại bỏ (mặc dù bước này không phải là luôn cần thực hiện), giống cây mới được bổ sung vào và các tế bào được nuôi cấy trong thời gian lên đến 10 ngày, hoặc cho đến khi quan sát thấy CPE đầy đủ bằng cách sử dụng kính hiển vi ánh sáng đảo. Virus được thu hoạch bằng từ một đến ba chu trình đông lạnh-rã đông (từ -70°C đến 4°C), và sau đó sản phẩm thu được được làm sạch vụn tế bào bằng cách ly tâm ở 1000 x g trong 5 phút ở nhiệt độ 4°C. Việc sao chép của virus có thể được xác nhận bằng phân tích qPCR và/hoặc chuẩn độ sản phẩm thu được. Kỹ thuật giải trình tự ADN được sử dụng để xác nhận độ đồng nhất của virus.

ADN dùng cho qPCR được phân lập từ giống cây mô và sản phẩm tế bào đông lạnh-rã đông bằng cách sử dụng kit Blood & Tissue Qiagen DNeasy, theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Đối với sản phẩm thu được từ môi trường: 200µL sản phẩm thu được từ môi trường được bổ sung vào 20 µL Proteinaza K trong ống Eppendorf dung tích 1,5ml và trộn đều. 20µL ARNaza A (20 mg/ml) được bổ sung vào hỗn hợp này, trộn đều, và được ủ trong 2 phút ở nhiệt độ trong phòng. Từ đây, quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Đối với dịch tan bào: 50µL dịch tan bào được bổ sung vào 20µL Proteinaza K trong ống Eppendorf dung tích 1,5ml và trộn đều. 130µL dung dịch ATL (Qiagen) được bổ sung vào hỗn hợp này, trộn đều, và được ủ trong 60 phút ở nhiệt độ trong phòng. 20µL ARNaza

A (20 mg/ml) được bổ sung vào hỗn hợp này, trộn đều, và được ủ trong 2 phút ở nhiệt độ trong phòng. Từ đây, quy trình được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Không có virus nào có thể được nuôi cấy từ các mẫu huyết thanh thu được từ cá không có các triệu chứng của bệnh rụng vảy.

Bất hoạt virus SDD

Sản phẩm virus được bất hoạt bằng cách bổ sung formalin 10x đã được pha loãng từ trước (1 phần formalin được bổ sung vào 9 phần H₂O). Dung dịch pha loãng formalin theo thể tích cuối cùng là 1000x có hiệu quả trong việc bất hoạt virus SDD, sao cho 1 thể tích formalin 10x được pha loãng từ trước được bổ sung vào 99 thể tích sản phẩm thu được (nồng độ formaldehyt cuối cùng bằng 0,037%). Các thành phần trong lọ được khuấy nhẹ ở nhiệt độ 4°C. Ngay sau khi bổ sung formalin và khuấy, toàn bộ hỗn hợp được chuyển sang lọ mới để đảm bảo rằng tất cả virus đều được tiếp xúc với formalin. Các thành phần trong lọ được khuấy liên tục nhưng nhẹ trong ba ngày và sau đó được ủ trong 11 ngày không khuấy. Hỗn hợp này được giữ ở nhiệt độ 4°C trong toàn bộ thời gian bất hoạt là 14 ngày.

Cô virus bị bất hoạt

Phương pháp lọc luông chéo được sử dụng để thu được virus đã bất hoạt được cô. GE Healthcare Filter 56-4100-92, UFP-100-E-H22LA, 38cm², 100.000 NMWC được sử dụng để cô virus bị bất hoạt. Thiết bị lọc được rửa bằng nước siêu tinh khiết và được tiệt trùng bằng formalin 2% (thể tích/thể tích) trong nước. Sau đó, thiết bị lọc này được rửa bằng PBS và môi trường EMEM. Mẻ virus bị bất hoạt được bổ sung vào thiết bị lọc và được cô đến nồng độ bằng 1/10 thể tích ban đầu.

Chuẩn độ virus SDD trên tế bào BF-2

Tế bào BF-2 được nuôi cấy như được mô tả ở trên. Một ngày trước khi thử nghiệm, thể huyền phù tế bào BF-2 chứa 3×10^4 tế bào/ml trong giống cấy lạnh (từ 2 đến 8°C) được chuẩn bị. 96 lỗ của đĩa vi chuẩn được gieo thể huyền phù tế bào này với lượng 100 µL/lỗ. Các đĩa được ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ 28°C/CO₂ 5% trong không khí ẩm. Lốp đơn nên hợp dòng khoảng từ 30% đến 50% sau khoảng thời gian ủ này.

Vào ngày thử nghiệm, các dung dịch pha loãng theo dãy 10 lần của mỗi mẫu virus được chuẩn bị đến nồng độ 10^{-8} bằng cách chuyển 0,5 ml mẫu vào ống chứa 4,5 ml môi trường chuẩn độ lạnh (từ 0°C đến 20°C) (giống cây không chứa FBS), trộn và chuyển 0,5 ml sang ống tiếp theo chứa 4,5 ml môi trường chuẩn độ, sau đó trộn, chuyển cẩn thận, v.v.. Cột 1 và cột 12 và hàng A và hàng H được dùng làm mẫu đối chứng âm và được truyền môi trường chuẩn độ mới với lượng $100\ \mu\text{L}$ /lỗ. Đĩa vi chuẩn được truyền virus với lượng $100\ \mu\text{L}$ /lỗ, các dung dịch pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} được truyền trong các hàng từ B đến G (10 lỗ/dung dịch pha loãng). Trong thời gian xử lý, nhiệt độ của dung dịch pha loãng virus được giữ ở nhiệt độ trong khoảng từ 0°C đến 20°C . Các đĩa được ủ ở nhiệt độ $28^{\circ}\text{C}/\text{CO}_2\ 5\%$ trong 7 ngày. Sau khoảng thời gian ủ virus 7 ngày thì các đĩa được sàng lọc CPE đặc hiệu của virus SDD bằng kính hiển vi ánh sáng đảo. CPE đặc hiệu của virus SDD được mô tả đặc điểm bằng cách tập hợp tế bào lại trong lớp đơn, sau đó tách tế bào. Hiện tượng tập hợp tế bào lại sau đó tách có thể được thấy rõ trên Fig.4. Fig.5 thể hiện lớp đơn của các tế bào đối chứng không bị lây nhiễm. Các lỗ trong lớp đơn BF-2 được bao quanh bởi tế bào đã được tập hợp. Mỗi lỗ thể hiện CPE đặc hiệu của virus SDD được ghi là dương tính. TCID_{50} được xác định theo phương pháp và cách tính được mô tả trong Reed and Muench, Am. J. Epidemiol. (1938) 27(3): 493-497. Phân tích qPCR cho các mẫu ADN đã được phân lập từ các lỗ dương tính trong thử nghiệm chuẩn độ xác nhận sự có mặt của virus.

Phân tích trình tự và phát sinh giống loài của protein capsit chính và ATPaza của virus SDD

Fig.6 và Fig.7 lần lượt thể hiện các trình tự ADN và protein chiều dài đầy đủ của protein capsit chính của virus SDD (MCP) và ATPaza.

Các trình tự ADN của MCP và ATPaza của virus SDD được sử dụng để tạo ra cây phát sinh giống loài (Fig.8 và Fig.9). Các cây này được tạo ra bằng phần mềm MEGA5 bằng cách sử dụng phương pháp nối lân cận và áp dụng các cài đặt chuẩn. Chỉ có các trình tự ADN mã hóa các ORF liền kề mới được cho vào sắp thẳng hàng trình tự. Phân tích Bootstrap (2000 bản sao chép) được thực hiện và phần trăm hỗ trợ bootstrap được

định riêng ở các nút. Thanh khoảng cách cho biết số lượng các đột biến thay thế nucleotit tại mỗi vị trí.

Trình tự ADN của MCP của virus SDD được sắp thẳng hàng với trình tự ADN của MCP của iridovirus mà có trong phân tích phát sinh giống loài được mô tả bởi Kurita và Nakajima (Viruses 2012, 4:521-538). Như được thể hiện trên Fig.8, Virus SDD có thể được xem là một thành viên riêng biệt của họ Iridovirus. Trình tự MCP của virus SDD có liên quan gần nhất với trình tự MCP của thành viên thuộc chi Megalocytivirus. Tuy nhiên, khoảng cách từng cặp (phần các vị trí đã được thay thế) vẫn là 49%, so với trình tự MCP liên quan gần nhất (MCP ORF của Iridovirus cá tráp đỏ). (So sánh blast chỉ ra độ đồng nhất 65% so với RSIV MCP, sự chênh lệch với “khoảng cách từng cặp” 49% chủ là do sửa chữa các đột biến thay thế như đột biến từ, ví dụ, nucleotit A thành G và đột biến thứ hai trở lại là A).

Fig.9 thể hiện phân tích phát sinh giống loài của trình tự ADN mã hóa ATPaza của virus SDD. Rõ ràng là trình tự ATPaza của virus SDD là khác xa so với các trình tự ATPaza của Iridovirus khác được bao gồm trong phân tích này.

Bảng 1: Trình tự môi cho PCR virus SDD và RSIV

Đoạn môi:	Trình tự (5'-3'):
SDD-50-FW	CAG TGC ATT ACA AGA AAG
SDD-143-PROBE	6FAM-ATG CCG TCA TTG TAA CAC TG-BHQ1
SDD-213-REV	GCT GAA ACA ACA ATT TAG
IRIDO-FW-5	CGT GAG ACC GTG CGT AGT
IDIDO-REV-5	AGG GTG ACG GTC GAT ATG
SDD-ATPaza-65-FW	TCGGAGGGATGAAATTGG
SDD-ATPaza-618-REV	AGCGTTGTGCGATGTAGAG

SDD-MCP-277-FW	TCC TGT GCA GCT GTC TAA AC
SDD-MCP-1090-REV	ACT GGC AAT GAT GGG CGA TG

Bảng 2: qPCR cho virus SDD và kết quả PCR (Thử nghiệm 1).

Mẫu	Chu kỳ ngưỡng (Cq)	Số lượng ban đầu (bản sao/ μ l)	Kết quả q-PCR	Kết quả PCR
Lách cá rùng vảy 1	25,55	3,06E+04	POS	POS
Lách cá rùng vảy 2	22,50	2,91E+05	POS	POS
Lách cá khỏe mạnh 1	N/A	N/A	NEG	NEG
Lách cá khỏe mạnh 2	N/A	N/A	NEG	NEG
Huyết thanh cá rùng vảy 1	23,97	9,81E+04	POS	POS
Huyết thanh cá rùng vảy 2	22,95	2,09E+05	POS	POS
Huyết thanh cá rùng vảy 3	N/A	N/A	NEG	NEG
Huyết thanh cá rùng vảy 4	27,12	9,57E+03	POS	POS
Huyết thanh cá rùng vảy 1	N/A	N/A	NEG	NEG

Huyết thanh cá rưng vảy 2	N/A	N/A	NEG	NEG
Tim cá rưng vảy	23,42	1,47E+05	POS	POS
Thận cá rưng vảy 1	23,26	1,65E+05	POS	POS
Thận cá rưng vảy 2	23,81	1,11E+05	POS	POS
Thận cá rưng vảy 3	21,60	5,65E+05	POS	POS
Thận cá khỏe mạnh 1	N/A	N/A	NEG	NEG
Thận cá khỏe mạnh 2	N/A	N/A	NEG	NEG
Thận cá khỏe mạnh 3	N/A	N/A	NEG	NEG
Thận cá khỏe mạnh 4	N/A	N/A	NEG	NEG

N/A: không phát hiện được

POS: Dương tính

NEG: Âm tính

Bảng 6: QPCR cho virus SDD và kết quả PCR trên cá nghi nhiễm virus SDD và cá đối chứng (Thử nghiệm 2)

Cá	NC/Sốm/Muộn	Số lượng ban đầu (bản sao/ μ l)	Kết quả q-PCR
Cá 1	NC	N/A	NEG
Cá 2	NC	N/A	NEG
Cá 3	NC	N/A	NEG

Cá 4	Sớm	1,50E+04	POS
Cá 5	Sớm	5,13E+04	POS
Cá 6	Sớm	7,53E+04	POS
Cá 7	Sớm	1,23E+05	POS
Cá 8	Sớm	N/A	NEG
Cá 9	Muộn	9,08E+04	POS
Cá 10	Muộn	6,45E+02	POS
Cá 11	Muộn	2,01E+04	POS
Cá 12	Muộn	1,27E+04	POS
Cá 13	Muộn	4,83E+04	POS

NC: mẫu đối chứng âm

N/A: không phát hiện được

POS: Dương tính

NEG: Âm tính

Ví dụ 2: Thử nghiệm thách thức virus SDD ở cá

Tóm tắt thiết kế thử nghiệm:

(Từ viết tắt được sử dụng: IM: trong cơ, IP: trong màng bụng, ppt: phần nghìn)

Thử nghiệm được tiến hành với virus SDD được nhân giống làm giống cấy tế bào. Bốn trăm sáu mươi con cá chêm Châu Á (20 g) được sử dụng trong thử nghiệm này.

Chín mươi lăm con cá được thách thức bằng 1) tiêm trong màng bụng (IP) liều cao, 2) tiêm IP liều thấp, 3) tiêm trong cơ liều thấp (IM), và 4) kết hợp tiêm IP liều cao và tiêm

IM liều thấp. 80 con cá không được thách thức khác được dùng làm mẫu đối chứng âm nhằm mục đích so sánh mẫu.

Mười lăm (15) con cá một nhóm từ 5 nhóm được thu hoạch tại các thời điểm ngày 1, 3, 7, 10 và 14 sau thách thức. 15 con cá còn lại được được quan sát cho đến ngày 28 để đánh giá tỷ lệ chết từ mỗi phương pháp thách thức.

Tại mỗi thời điểm lấy mẫu, thận của các con cá đã thu hoạch được lấy mẫu riêng rẽ và huyết thanh được gộp lại thành nhóm. Các mẫu được kiểm tra để định lượng virus để xác định khoảng thời gian có độ chuẩn virus cao nhất trong huyết thanh hoặc thận cá.

Vật liệu thách thức

Virus SDD được nhân giống làm giống cấy tế bào được sử dụng làm vật liệu thách thức. Virus này đầu tiên được phân lập từ cá chẽm Châu Á ở Indonesia và được nhân giống *in vitro*. Độ chuẩn virus được xác định bằng cách sử dụng phương pháp chuẩn độ được mô tả trong Ví dụ 1.

Chất pha loãng vật liệu thách thức

Chất đệm pha loãng vacxin chuẩn: PBS + NaCl 1,5% được sử dụng làm chất pha loãng vật liệu thách thức.

Động vật

Loài: Cá chẽm Châu Á (*Lates calcarifer*)

Cân nặng trung bình khi đến: khoảng 2 gam/con (trung bình)

Cân nặng trung bình khi bắt đầu thử nghiệm: 20 g

Số lượng cá: tổng cộng 460 con cá

Các thông số quản lý

Nước: nước biển (30 ppt) ở nhiệt độ $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ sau thách thức

Cho ăn: cá được cho ăn tùy ý từ ngày sau thách thức.

Bể: Cá được nuôi nhốt trong bốn bể dung tích 250l. Lưới dọc được lắp đặt trong mỗi bể, tạo ra vách ngăn trong 1/3 bể. 1/3 bể này nhốt 15 cá được dùng để quan sát tỷ lệ chết. 2/3 bể nhốt 80 cá được sử dụng đến khi thu hoạch (xem Bảng 3). Cá đối chứng không được thách thức được nuôi nhốt một nửa trong bể dung tích 500l. Nhiệt độ nước của bể có cá đối chứng được cho ngang bằng với nhiệt độ của bể có cá được thách thức.

Phân nhóm và định liều:

Đánh giá động vật

Cần có tổng cộng 460 con cá chẻm cho thử nghiệm này. Cá có kích thước mong muốn (20 g) được chọn ngẫu nhiên khi chúng được cầm trên tay.

Thách thức:

Chuẩn bị cá và đo cân nặng của cá

Cá bị bỏ đói trong thời gian ít nhất 36 giờ trước thách thức. Trước khi thách thức, 20 con từ mỗi nhóm được cân cùng nhau để thu được cân nặng trung bình cho mỗi nhóm.

Bảng 3. Bể quan sát

Điều kiện		Cá trong thời gian lấy mẫu		Cá để quan sát tỷ lệ chết		Tổng
		Bể	Số lượng cá	bể	số lượng cá	
1	IP (liều cao ^{*1})	3F01A	80	3F01B	15	95
2	IP (liều thấp ^{*2})	3F02B	80	3F02A	15	95
3	IM (liều thấp ^{*2})	3F03A	80	3F03B	15	95
4	IP (liều cao) + IM (liều thấp)	3F04B	80	3F04A	15	95
5	Đối chứng (không thách thức)	5F08A ^{*3}	80	-	-	80

Tổng		400		60	460
------	--	-----	--	----	-----

*¹Liều cao = 0,1ml virus SDD không pha loãng/con.

*²Liều thấp = 0,1ml Virus SDD được pha loãng 10 lần/con.

*³Cá được lấy từ bể kiểm dịch trong mỗi khoảng thời gian.

Thách thức IP (Liều cao và liều thấp)

Tất cả các con cá được gây mê bằng cách sử dụng AQUI-S trước quy trình thách thức. Cá được tiêm IP trên bụng với 0,1 ml vật liệu thách thức. Hai điều kiện thách thức khác nhau, 1) vật liệu thách thức không được pha loãng (liều cao: $5,5 \times 10^6$ TCID₅₀/con), và 2) vật liệu thách thức được pha loãng 10 lần với vật liệu SVDB (liều thấp: $5,5 \times 10^5$ TCID₅₀/con) được áp dụng. Ngay sau khi thách thức, cá được chuyển trở lại bể chúng ở để hồi phục. Chi tiết về mỗi điều trị là như sau (cũng xem Bảng 3).

Thách thức IM (liều thấp)

Vật liệu dùng để thách thức IM được pha loãng 10 lần với SVDB (liều thấp: $5,5 \times 10^5$ TCID₅₀/con), và 0,1ml vật liệu thách thức được tiêm trong cơ cho mỗi con cá. Tất cả các con cá được gây mê bằng cách sử dụng AQUI-S trước khi thách thức IM.

Thách thức IP (liều cao) + thách thức IM (liều thấp)

Thách thức kết hợp được thực hiện bằng thách thức IP (liều cao) trước, sau đó thách thức IM (liều thấp). Sau hai lần tiêm, cá được nuôi nhốt vào bể chúng ở để hồi phục sau khi gây mê.

Lấy mẫu

Tối đa mười lăm con cá được thu gom từ 5 nhóm cá vào ngày 1, 3, 7, 10 và 14 sau thách thức (các Bảng 4, 5). Tất cả các con cá được thu hoạch được lấy máu trước. Sau đó, mô thận từ mỗi con cá được lấy mẫu riêng rẽ vào trong các ống vô trùng.

	Điều kiện		Lấy mẫu tại các thời điểm				
	bể		Ngày 1	Ngày 3	Ngày 7	Ngày 10	Ngày 14
1	IP (cao) 3F01A	số lượng cá lấy mẫu	15	15	15	15	15
		Số lượng cá còn lại	65	50	35	20	5
2	IP (thấp) 3F02B	số lượng cá lấy mẫu	15	15	15	15	15
		số lượng cá còn lại	65	50	35	20	5
3	IM (thấp) 3F03A	số lượng cá lấy mẫu	15	15	15	15	15
		số lượng cá còn lại	65	50	35	20	5
4	IP (cao) + IM (thấp) 3F04B	số lượng cá lấy mẫu	15	15	15	15	15
		số lượng cá còn lại	65	50	35	20	5
5	Mẫu đối chứng âm 5F08A	số lượng cá lấy mẫu	15	15	15	15	15
		số lượng cá còn lại	65	50	35	20	5

Bảng 4. Kế hoạch thời gian lấy mẫu

Điều kiện	Mô	Tên mẫu				
		Ngày 1	Ngày 3	Ngày 7	Ngày 10	Ngày 14
IP (liều cao)	Huyết thanh 1 ống	IPH-1	IPH-3	IPH-7	IPH-10	IPH-14
	Thận 15 ống	IPH- 1(1) -IPH- 1(15)	IPH- 3(1) -IPH- 3(15)	IPH- 7(1) -IPH- 7(15)	IPH-10 (1) -IPH-10 (15)	IPH- 14(1) -IPH- 14(15)
IP (liều thấp)	Huyết thanh 1 ống	IPL-1	IPL-3	IPL-7	IPL-10	IPL-14
	Thận 15 ống	IPL- 1(1) -IPL- 1(15)	IPL- 3(1) -IPL- 3(15)	IPL- 7(1) -IPL- 7(15)	IPL-10 (1) -IPL-10 (15)	IPL- 14(1) -IPL- 14(15)
IM (liều thấp)	Huyết thanh 1 ống	IML-1	IML-3	IML-7	IML-10	IML-14
	Thận 15 ống	IML- 1(1) -IML- 1(15)	IML- 3(1) -IML- 3(15)	IML- 7(1) -IML- 7(15)	IML-10 (1) -IML- 10 (15)	IML- 14(1) -IML- 14(15)
	Huyết thanh	IPIM-1	IPIM-3	IPIM-7	IPIM-10	IPIM-14

IP (liều cao) +IM (liều thấp)	1 ống					
	Thận 15 ống	IPIM- 1(1) -IPIM- 1(15)	IPIM- 3(1) -IPIM- 3(15)	IPIM- 7(1) - IPIM- 7(15)	IPIM-10 (1) - IPIM- 10 (15)	IPIM- 14(1) - IPIM- 14(15)
Mẫu đối chứng âm (không thách thức)	Huyết thanh 1 ống	NC-1	NC-S-3	NC-S-7	NC-S-10	NC-S-14
	Thận 15 ống	NC- 1(1) - NC- 1(15)	NC- 3(1) - NC- 3(15)	NC-7(1) - NC- 7(15)	NC-10 (1) - NC-10 (15)	NC- 14(1) - NC- 14(15)

Bảng 5. Kế hoạch lấy mẫu và ID ống mẫu

Tất cả các con cá được gây mê bằng cách sử dụng AQUÍ-S và máu được thu gom bằng cách chọc tĩnh mạch đuôi. Máu từ cùng một nhóm cá được gộp vào trong 1 ống và để đông lại ở nhiệt độ trong phòng. Máu được xử lý để phân lập huyết thanh vào cùng hôm đó hoặc vào ngày tiếp theo. Huyết thanh được phân lập bằng cách ly tâm máu ở tốc độ 3700 vòng/phút trong 20 phút. Huyết thanh thu được được chuyển sang ống vô trùng và được lưu giữ ở nhiệt độ $<-50^{\circ}\text{C}$.

Quan sát và kiểm tra sau mổ

Không có hiện tượng chết diễn ra trong khi thách thức hoặc trong vòng 5 ngày sau thách thức.

Tỷ lệ chết của cá trong các bể quan sát 3F01B, 3F02A, 3F03B và 3F04A (15 con/mỗi nửa bể) được ghi lại hàng ngày sau thách thức. Tỷ lệ chết được quan sát trong 28 ngày.

Đặc trưng triệu chứng của bệnh rụng vảy, bao gồm mòn vảy và mất vảy, được gặp ở trong số các con cá được thách thức. Hơn thế nữa, trong nhóm có cá tiếp nhận liều lượng thách thức cao (IP cao hoặc IP cao + IM thấp) thì tỷ lệ chết được quan sát từ 5 ngày sau thách thức. Các con cá được tiếp nhận thách thức IP liều thấp hoặc IM liều thấp cho thấy sự khởi phát hiện tượng chết khá trễ. Trong các nhóm khác nhau, tỷ lệ chết tích lũy đến 60% (IP cao), 47% (IP cao + IM thấp), 20% (IP thấp) và 13% (IM thấp). Không quan sát thấy có tỷ lệ chết ở cá đối chứng không được thách thức (Fig.10).

Các mẫu huyết thanh được gộp, được thu gom từ 15 con trong mỗi nhóm vào 1, 3, 7, 10 và 14 ngày sau thách thức, được phân tích bằng qPCR về sự có mặt của các trình tự ADN virus SDD. Như được thể hiện trên Fig.11, ADN virus SDD được phát hiện ra ở tất cả các nhóm, ngoại trừ nhóm đối chứng không được thách thức. Số lượng bản sao ADN virus tăng lên, đạt đỉnh và giảm từ 10 ngày sau thách thức. Mức ADN virus cao nhất được thấy vào ngày 10 trong huyết thanh được thu gom từ nhóm tiếp nhận liều lượng thách thức cao (IP cao hoặc IP cao + IM thấp). Trong các nhóm này cũng thấy tỷ lệ chết cao nhất (lần lượt là 60% và 47%).

Cuối cùng, huyết thanh của cá dương tính được sử dụng truyền nhiễm tế bào BF2. CPE được quan sát và qPCR xác nhận sự có mặt của ADN virus SDD, xác nhận rằng virus SDD là yếu tố gây bệnh gây ra bệnh rụng vảy.

Vì thế sau đây có thể kết luận rằng:

Định đề đầu tiên của Koch nêu rằng vi sinh vật phải được phát hiện ra ở các con vật bị ảnh hưởng bởi bệnh, mà không nên được thấy ở các con khỏe mạnh. Định đề này được hoàn thiện đối với SDDV, do VIDISCA-454 và qPCR đã phát hiện ra ADN của SDDV chỉ có ở cá bị nhiễm SDS. Hơn nữa, không phát hiện ra ADN trong kết quả PCR của RSIV megalocytivirus.

Định đề thứ hai nêu rằng vi sinh vật/virus phải được phân lập từ sinh vật có bệnh và được nuôi (tốt hơn là) trên dòng tế bào, cũng được hoàn thiện. Tác dụng gây bệnh cho tế bào được quan sát thấy sau khi dòng tế bào BF-2 được truyền nhiễm huyết thanh dương tính với SDDV. Độ chuẩn virus tăng theo thời gian, cho thấy rằng virus đã sao chép trên

các tế bào này. VIDISCA-454 và phân tích qPCR sau đó xác nhận rằng virus sao chép thực sự là SDDV. Việc phân lập được hoàn thành khi chuẩn độ, việc ly tâm vận tốc khác nhau và kính hiển vi điện tử truyền qua nhiệt độ thấp xác nhận sự có mặt của hạt virus lây nhiễm. Ba lần cấy chuyển huyết thanh âm tính với SDDV trên tế bào BF-2 vẫn không có CPE, chứng tỏ rằng virus thực sự không có mặt ở các con khỏe mạnh. Virus này có thể được thu hoạch và tinh chế từ giống cáy.

Định đề thứ ba của Koch được hoàn thành khi các tác giả sáng chế cho thấy rằng virus SDDV được nuôi cấy gây chết cá cũng như triệu chứng chính của bệnh SDD; rụng vây, sau khi lây nhiễm ở cá vược. Điều cần lưu ý là các mẫu đã được thu gom từ 15 con cá vào năm ngày khác nhau có thể khiến cho lượng ADN đo được là dưới lượng ước tính của hàm lượng ADN của cả nhóm. Điều này có thể là do cá chết không được bao gồm trong bước lấy mẫu, trong khi các con cá này có thể được cho là những con bị ảnh hưởng nhất và vì thế có thể có độ chuẩn virus cao nhất.

Cuối cùng, định đề cuối cùng của Koch được hoàn thành bằng việc phân lập lại tế bào BF-2 của SDDV từ các mẫu huyết thanh thu được từ cá trong đó virus đã cảm ứng bệnh SDD.

Các tác giả sáng chế tin rằng việc phát hiện và phân lập SDDV sẽ tiếp diễn trong số các quy trình khác do việc lựa chọn rất đặc hiệu các tế bào để phát triển yếu tố gây bệnh, việc lựa chọn (dựa trên tình trạng kỹ thuật) huyết thanh thay vì mô bị bệnh làm nguồn yếu tố gây bệnh, lựa chọn (dựa trên tình trạng kỹ thuật) để tránh sử dụng thiết bị lọc kích thước 0,22 micromet trong các bước phân lập virus từ huyết thanh của cá bị bệnh và lựa chọn cá ở các giai đoạn bệnh rất sớm làm nguồn yếu tố gây bệnh.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Virut được phân lập là thành viên của họ Iridoviridae chứa gen protein capsit chính (MCP) và gen ATPaza, đặc trưng ở chỗ:
 - a) virut này là tác nhân gây bệnh của bệnh rụng vảy ở cá và
 - b) trình tự nucleotit của gen MCP có độ đồng nhất ít nhất là 80% so với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc trình tự nucleotit của gen ATPaza có độ đồng nhất ít nhất là 80% so với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 3.
2. Virut được phân lập theo điểm 1, đặc trưng ở chỗ trình tự nucleotit của gen MCP có độ đồng nhất ít nhất là 80% so với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 và trình tự nucleotit của gen ATPaza có độ đồng nhất ít nhất là 80% so với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 3.
3. Virut được phân lập là thành viên của họ Iridoviridae chứa gen MCP và gen ATPaza, đặc trưng ở chỗ:
 - a) virut này là tác nhân gây bệnh rụng vảy ở cá và
 - b) gen MCP phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 để tạo ra sản phẩm PCR có 164 +/- 10 cặp bazơ hoặc phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 để tạo ra sản phẩm PCR có 814 +/- 10 cặp bazơ hoặc gen ATPaza phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10 để tạo ra sản phẩm PCR có 554 +/- 10 cặp bazơ.
4. Virut được phân lập theo điểm 3, đặc trưng ở chỗ gen MCP phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 để tạo ra sản phẩm PCR có 164 +/- 10 cặp bazơ và phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 để tạo ra sản phẩm PCR có 814 +/- 10 cặp bazơ và gen ATPaza phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10 để tạo ra sản phẩm PCR có 554 +/- 10 cặp bazơ.

5. Virut được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, đặc trưng ở chỗ trình tự nucleotit của gen MCP có độ đồng nhất ít nhất là 80% so với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 1 và trình tự nucleotit của gen ATPaza có độ đồng nhất ít nhất là 80% so với trình tự nucleotit được nêu trong SEQ ID NO: 3 và trong đó ADN virut phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6 để tạo ra sản phẩm PCR có 164 +/- 10 cặp bazơ và phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 để tạo ra sản phẩm PCR có 814 +/- 10 cặp bazơ và phản ứng trong phản ứng PCR với bộ đoạn mồi được nêu trong SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10 để tạo ra sản phẩm PCR có 554 +/- 10 cặp bazơ.
6. Giống cây tế bào chứa virut, đặc trưng ở chỗ giống cây này chứa virut theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.
7. Protein capsit chính (MCP) được phân lập đặc trưng ở chỗ MCP này được mã hóa bởi mảnh ADN chứa gen có độ đồng nhất ít nhất là 80% so với trình tự nucleotit của gen MCP được nêu trong SEQ ID NO: 1.
8. ATPaza được phân lập đặc trưng ở chỗ ATPaza này được mã hóa bởi mảnh ADN chứa gen có độ đồng nhất ít nhất là 80% so với trình tự nucleotit của gen ATPaza được nêu trong SEQ ID NO: 3.
9. Vacxin để chống lại bệnh rụng vảy ở cá, đặc trưng ở chỗ vacxin này chứa virut theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 và chất mang được dụng.
10. Vacxin theo điểm 9, đặc trưng ở chỗ virut này ở dạng sống bị giảm độc lực.
11. Vacxin theo điểm 9, đặc trưng ở chỗ virut này ở dạng bất hoạt.
12. Vacxin để chống lại bệnh rụng vảy ở cá, đặc trưng ở chỗ vacxin này chứa MCP theo điểm 7 và chất mang được dụng.
13. Vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 12, đặc trưng ở chỗ vacxin này chứa ít nhất một vi sinh vật khác gây bệnh cho cá hoặc virut khác gây bệnh cho cá và/hoặc ít nhất một thành phần tạo miễn dịch khác và/hoặc vật liệu di truyền mã hóa thành

phần tạo miễn dịch khác này của vi sinh vật gây bệnh cho cá hoặc virus gây bệnh cho cá đã nêu.

14. Vacxin theo điểm 13, đặc trưng ở chỗ virus gây bệnh cho cá hoặc vi sinh vật gây bệnh cho cá này được chọn từ nhóm bao gồm *Vibrio anguillarum*, *Photobacterium damsela* phân loài *piscicida*, *Tenacibaculum maritimum*, *Flavobacterium* sp., *Flexibacter* sp., *Streptococcus* sp., *Lactococcus garvieae*, *Edwardsiella tarda*, *E. ictaluri*, virus gây bệnh hoại tử thần kinh, iridovirus khác virus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, và Herpesvirus cá Koi.

15. Vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 14, đặc trưng ở chỗ vacxin này chứa chất phụ trợ.

16. Kháng thể hoặc kháng huyết thanh phản ứng với virus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5.

17. Phương pháp bào chế vacxin theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 15, đặc trưng ở chỗ phương pháp này bao gồm bước trộn virus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 và/hoặc MCP theo điểm 7, và chất mang được dùng.

18. Kit xét nghiệm chẩn đoán để phát hiện kháng thể phản ứng với virus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 hoặc phản ứng với vật liệu kháng nguyên của chúng, đặc trưng ở chỗ kit xét nghiệm này chứa virus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 hoặc MCP theo điểm 7 hoặc mảnh kháng nguyên của MCP này.

19. Kit xét nghiệm chẩn đoán để phát hiện virus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 hoặc vật liệu kháng nguyên của chúng, đặc trưng ở chỗ kit xét nghiệm này chứa kháng thể phản ứng với virus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5 hoặc phản ứng với vật liệu kháng nguyên của chúng.

20. Kit xét nghiệm chẩn đoán để phát hiện virus theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, đặc trưng ở chỗ kit xét nghiệm này chứa bộ đoạn mỗi PCR phản ứng với vùng đặc hiệu của gen MCP hoặc ATPaza của virus SDD.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Intervet International B.V.

<120> Virus gây bệnh rụng vảy, vắc xin kháng virus này, phương pháp bào chế vắc xin và kit phát hiện kháng thể

<130> 23503

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1362

<212> ADN

<213> virus bệnh rụng vảy

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1359)

<400> 1

atg tca tct att gca gga gct aat gtt acc agt ggg ttt atc gac ttg	48
Met Ser Ser Ile Ala Gly Ala Asn Val Thr Ser Gly Phe Ile Asp Leu	
1 5 10 15	
gct gcc tac gat gcc atg gag act cat ctc tac ggt ggc gat aat tca	96
Ala Ala Tyr Asp Ala Met Glu Thr His Leu Tyr Gly Gly Asp Asn Ser	
20 25 30	
atc acc tac ttc ttg cgt gaa act aca cga tct tct tgg ttc agt aaa	144
Ile Thr Tyr Phe Leu Arg Glu Thr Thr Arg Ser Ser Trp Phe Ser Lys	
35 40 45	
ctt cct gtg cag ctg tct aaa caa aca gga act gca aat ttc gga caa	192
Leu Pro Val Gln Leu Ser Lys Gln Thr Gly Thr Ala Asn Phe Gly Gln	
50 55 60	
gaa ttt agc gtg gtt gtg gcc aga gga ggt gac tat ctt atg aat gtt	240
Glu Phe Ser Val Val Val Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Leu Met Asn Val	
65 70 75 80	
tgg ctt cgc gtt aaa gtt cca gcc ctc aaa aat act aaa gca aat tca	288
Trp Leu Arg Val Lys Val Pro Ala Leu Lys Asn Thr Lys Ala Asn Ser	
85 90 95	
agc ata aga tgg acc gac aat ttt atg cac aat ctc gtt caa gaa gtt	336
Ser Ile Arg Trp Thr Asp Asn Phe Met His Asn Leu Val Gln Glu Val	
100 105 110	
aca atc tca ttt aac gat ctc act gca cag act att act agt gag ttt	384

Thr Ile Ser Phe Asn Asp Leu Thr Ala Gln Thr Ile Thr Ser Glu Phe	
115 120 125	
ctt gat ttt tgg tca aca tgt aac gtt ccc ggt gga aag tcg tca gga	432
Leu Asp Phe Trp Ser Thr Cys Asn Val Pro Gly Gly Lys Ser Ser Gly	
130 135 140	
tat gct aat atg ata gga tac act cat gac ttg gtt gga ggt act gtg	480
Tyr Ala Asn Met Ile Gly Tyr Thr His Asp Leu Val Gly Gly Thr Val	
145 150 155 160	
caa aat gca act atg cca tct aag tat ctc aat ctg cca att ccg ttc	528
Gln Asn Ala Thr Met Pro Ser Lys Tyr Leu Asn Leu Pro Ile Pro Phe	
165 170 175	
ttc ttt act cgt gat act gga ctt gct ctt cct act gca gca cta cct	576
Phe Phe Thr Arg Asp Thr Gly Leu Ala Leu Pro Thr Ala Ala Leu Pro	
180 185 190	
tac aat gaa att aaa att cat ttt aaa ttg aga gat tgg aag gat ttg	624
Tyr Asn Glu Ile Lys Ile His Phe Lys Leu Arg Asp Trp Lys Asp Leu	
195 200 205	
ctc att tct caa agc act aat gat aat gca att tct gta cct tta aca	672
Leu Ile Ser Gln Ser Thr Asn Asp Asn Ala Ile Ser Val Pro Leu Thr	
210 215 220	
agt gac atg gaa aac gtg aca ccc gct ctg act gaa gtt agt gtt atg	720
Ser Asp Met Glu Asn Val Thr Pro Ala Leu Thr Glu Val Ser Val Met	
225 230 235 240	
ggg act tat gct atc ctg acc aac gaa gag cgt gaa gca atg tct ctt	768
Gly Thr Tyr Ala Ile Leu Thr Asn Glu Glu Arg Glu Ala Met Ser Leu	
245 250 255	
gtc agt aga gat atg att att gaa cag tgt cag atg gca cct aga att	816
Val Ser Arg Asp Met Ile Ile Glu Gln Cys Gln Met Ala Pro Arg Ile	
260 265 270	
cct atc aga ccc ttg gaa aat gag atg ccc cat att gat ctg cga ttt	864
Pro Ile Arg Pro Leu Glu Asn Glu Met Pro His Ile Asp Leu Arg Phe	
275 280 285	
agt cat ccc att aaa gag ctc ttc ttt gct gtt aaa aat gta act cat	912
Ser His Pro Ile Lys Glu Leu Phe Phe Ala Val Lys Asn Val Thr His	
290 295 300	
cca aat att cac agt aat tat aca gct gca tcg ccc atc att gcc agt	960
Pro Asn Ile His Ser Asn Tyr Thr Ala Ala Ser Pro Ile Ile Ala Ser	
305 310 315 320	
ggg aca aac aaa gtt aca atg cct cca aaa gct caa aac cca ttg tca	1008
Gly Thr Asn Lys Val Thr Met Pro Pro Lys Ala Gln Asn Pro Leu Ser	

325	330	335	
cac gtg tca ctc att tat gaa aac aca gca cga ttg aac aat atg ggt His Val Ser Leu Ile Tyr Glu Asn Thr Ala Arg Leu Asn Asn Met Gly 340 345 350			1056
gtt gac tac ttt tcg tat gtt gat cca tac ttc ttt gca cca tgc att Val Asp Tyr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Tyr Phe Phe Ala Pro Cys Ile 355 360 365			1104
cct aaa atc gat ggg gtc atg gct tat tgt tat acc atg aac atg ggt Pro Lys Ile Asp Gly Val Met Ala Tyr Cys Tyr Thr Met Asn Met Gly 370 375 380			1152
cat gtc gat cct atg ggt tct aca aat ttc ggc cgg ttg tca aat att His Val Asp Pro Met Gly Ser Thr Asn Phe Gly Arg Leu Ser Asn Ile 385 390 395 400			1200
acg ctg tct gca aag gtt acc gca aat tca aaa aca acc tca gct gct Thr Leu Ser Ala Lys Val Thr Ala Asn Ser Lys Thr Thr Ser Ala Ala 405 410 415			1248
agc ggt aac aca gat gga cat aaa gtt gct caa aag ttt gaa ctg gtt Ser Gly Asn Thr Asp Gly His Lys Val Ala Gln Lys Phe Glu Leu Val 420 425 430			1296
gta att ggt gtt aat cat aat gtt gca cgt atc agc aat ggt tca ttt Val Ile Gly Val Asn His Asn Val Ala Arg Ile Ser Asn Gly Ser Phe 435 440 445			1344
gga ttt ccg atc ttg taa Gly Phe Pro Ile Leu 450			1362
<210> 2			
<211> 453			
<212> PRT			
<213> virut bệnh rụng vảy			
<400> 2			
Met Ser Ser Ile Ala Gly Ala Asn Val Thr Ser Gly Phe Ile Asp Leu 1 5 10 15			
Ala Ala Tyr Asp Ala Met Glu Thr His Leu Tyr Gly Gly Asp Asn Ser 20 25 30			
Ile Thr Tyr Phe Leu Arg Glu Thr Thr Arg Ser Ser Trp Phe Ser Lys 35 40 45			

Leu Pro Val Gln Leu Ser Lys Gln Thr Gly Thr Ala Asn Phe Gly Gln
 50 55 60

Glu Phe Ser Val Val Val Ala Arg Gly Gly Asp Tyr Leu Met Asn Val
 65 70 75 80

Trp Leu Arg Val Lys Val Pro Ala Leu Lys Asn Thr Lys Ala Asn Ser
 85 90 95

Ser Ile Arg Trp Thr Asp Asn Phe Met His Asn Leu Val Gln Glu Val
 100 105 110

Thr Ile Ser Phe Asn Asp Leu Thr Ala Gln Thr Ile Thr Ser Glu Phe
 115 120 125

Leu Asp Phe Trp Ser Thr Cys Asn Val Pro Gly Gly Lys Ser Ser Gly
 130 135 140

Tyr Ala Asn Met Ile Gly Tyr Thr His Asp Leu Val Gly Gly Thr Val
 145 150 155 160

Gln Asn Ala Thr Met Pro Ser Lys Tyr Leu Asn Leu Pro Ile Pro Phe
 165 170 175

Phe Phe Thr Arg Asp Thr Gly Leu Ala Leu Pro Thr Ala Ala Leu Pro
 180 185 190

Tyr Asn Glu Ile Lys Ile His Phe Lys Leu Arg Asp Trp Lys Asp Leu
 195 200 205

Leu Ile Ser Gln Ser Thr Asn Asp Asn Ala Ile Ser Val Pro Leu Thr
 210 215 220

Ser Asp Met Glu Asn Val Thr Pro Ala Leu Thr Glu Val Ser Val Met
 225 230 235 240

Gly Thr Tyr Ala Ile Leu Thr Asn Glu Glu Arg Glu Ala Met Ser Leu
 245 250 255

Val Ser Arg Asp Met Ile Ile Glu Gln Cys Gln Met Ala Pro Arg Ile
 260 265 270

Pro Ile Arg Pro Leu Glu Asn Glu Met Pro His Ile Asp Leu Arg Phe
 275 280 285

Ser His Pro Ile Lys Glu Leu Phe Phe Ala Val Lys Asn Val Thr His
 290 295 300

Pro Asn Ile His Ser Asn Tyr Thr Ala Ala Ser Pro Ile Ile Ala Ser
 305 310 315 320

Gly Thr Asn Lys Val Thr Met Pro Pro Lys Ala Gln Asn Pro Leu Ser
 325 330 335

His Val Ser Leu Ile Tyr Glu Asn Thr Ala Arg Leu Asn Asn Met Gly
 340 345 350

Val Asp Tyr Phe Ser Tyr Val Asp Pro Tyr Phe Phe Ala Pro Cys Ile
 355 360 365

Pro Lys Ile Asp Gly Val Met Ala Tyr Cys Tyr Thr Met Asn Met Gly
 370 375 380

His Val Asp Pro Met Gly Ser Thr Asn Phe Gly Arg Leu Ser Asn Ile
 385 390 395 400

Thr Leu Ser Ala Lys Val Thr Ala Asn Ser Lys Thr Thr Ser Ala Ala
 405 410 415

Ser Gly Asn Thr Asp Gly His Lys Val Ala Gln Lys Phe Glu Leu Val
 420 425 430

Val Ile Gly Val Asn His Asn Val Ala Arg Ile Ser Asn Gly Ser Phe
 435 440 445

Gly Phe Pro Ile Leu
 450

<210> 3

<211> 738
 <212> ADN
 <213> virut bệnh rụng vảy

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(735)

<400> 3
 atg tct gtt cct gtg aag gaa ttg tca atg acc gaa ata cga ccg aga 48
 Met Ser Val Pro Val Lys Glu Leu Ser Met Thr Glu Ile Arg Pro Arg
 1 5 10 15
 aca cac gac gat gaa atc gga ggg atg aaa ttg gtt gtt ttg ggc aaa 96
 Thr His Asp Asp Glu Ile Gly Gly Met Lys Leu Val Val Leu Gly Lys
 20 25 30
 ccg ggc cgt gga aaa tcg gtc ttg ata aaa tcg ata ata gca tca aaa 144
 Pro Gly Arg Gly Lys Ser Val Leu Ile Lys Ser Ile Ile Ala Ser Lys
 35 40 45
 cga cat ttg atc ccc gca gcg gtt gtc att tct ggt tca gaa gaa gcc 192
 Arg His Leu Ile Pro Ala Ala Val Val Ile Ser Gly Ser Glu Glu Ala
 50 55 60
 aat cat ttc tat tct ggg tta gtt cca gaa tgt tac att tat tcc aaa 240
 Asn His Phe Tyr Ser Gly Leu Val Pro Glu Cys Tyr Ile Tyr Ser Lys
 65 70 75 80
 ttt gac ccc gat att att acc aga gtc aag aaa cga caa cta gaa tta 288
 Phe Asp Pro Asp Ile Ile Thr Arg Val Lys Lys Arg Gln Leu Glu Leu
 85 90 95
 aaa cat cta gat cct aaa cat tct tgg ctc tta ttg gtc atc gat gat 336
 Lys His Leu Asp Pro Lys His Ser Trp Leu Leu Leu Val Ile Asp Asp
 100 105 110
 tgc atg gac aac acc aaa ttg ttt aat aat gaa gta gtt gct gat ttg 384
 Cys Met Asp Asn Thr Lys Leu Phe Asn Asn Glu Val Val Ala Asp Leu
 115 120 125
 ttt aaa aac ggt aga cat tgg aac ttg ttg gtc att att gct agt cag 432
 Phe Lys Asn Gly Arg His Trp Asn Leu Leu Val Ile Ile Ala Ser Gln
 130 135 140
 tac att atg gat tta aaa gcc gat tta aga tgt tca ata gat ggt gta 480
 Tyr Ile Met Asp Leu Lys Ala Asp Leu Arg Cys Ser Ile Asp Gly Val
 145 150 155 160
 ttt ctc ttt agc gaa tct aat ttg act agt caa gag aaa ata tac aaa 528
 Phe Leu Phe Ser Glu Ser Asn Leu Thr Ser Gln Glu Lys Ile Tyr Lys
 165 170 175

cag ttt gga ggt aaa att cca aag cct caa ttt atg cta ctt atg gag 576
 Gln Phe Gly Gly Lys Ile Pro Lys Pro Gln Phe Met Leu Leu Met Glu
 180 185 190
 aaa gtg aca ttg gat tac act tgt ctc tac atc gac aac gct agc caa 624
 Lys Val Thr Leu Asp Tyr Thr Cys Leu Tyr Ile Asp Asn Ala Ser Gln
 195 200 205
 acg cag cac tgg acc gaa tgc gtt cga tat tac aag gca cct atg tta 672
 Thr Gln His Trp Thr Glu Cys Val Arg Tyr Tyr Lys Ala Pro Met Leu
 210 215 220
 aca aac gag gat gtc aat ttt ggt ttt gca gat tat aaa aac agc gca 720
 Thr Asn Glu Asp Val Asn Phe Gly Phe Ala Asp Tyr Lys Asn Ser Ala
 225 230 235 240
 att gct gtt gtt gaa taa 738
 Ile Ala Val Val Glu
 245

<210> 4
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> virut bệnh rùng vảy

<400> 4

Met Ser Val Pro Val Lys Glu Leu Ser Met Thr Glu Ile Arg Pro Arg
 1 5 10 15

Thr His Asp Asp Glu Ile Gly Gly Met Lys Leu Val Val Leu Gly Lys
 20 25 30

Pro Gly Arg Gly Lys Ser Val Leu Ile Lys Ser Ile Ile Ala Ser Lys
 35 40 45

Arg His Leu Ile Pro Ala Ala Val Val Ile Ser Gly Ser Glu Glu Ala
 50 55 60

Asn His Phe Tyr Ser Gly Leu Val Pro Glu Cys Tyr Ile Tyr Ser Lys
 65 70 75 80

Phe Asp Pro Asp Ile Ile Thr Arg Val Lys Lys Arg Gln Leu Glu Leu
 85 90 95

Lys His Leu Asp Pro Lys His Ser Trp Leu Leu Leu Val Ile Asp Asp
 100 105 110

Cys Met Asp Asn Thr Lys Leu Phe Asn Asn Glu Val Val Ala Asp Leu
 115 120 125

Phe Lys Asn Gly Arg His Trp Asn Leu Leu Val Ile Ile Ala Ser Gln
 130 135 140

Tyr Ile Met Asp Leu Lys Ala Asp Leu Arg Cys Ser Ile Asp Gly Val
 145 150 155 160

Phe Leu Phe Ser Glu Ser Asn Leu Thr Ser Gln Glu Lys Ile Tyr Lys
 165 170 175

Gln Phe Gly Gly Lys Ile Pro Lys Pro Gln Phe Met Leu Leu Met Glu
 180 185 190

Lys Val Thr Leu Asp Tyr Thr Cys Leu Tyr Ile Asp Asn Ala Ser Gln
 195 200 205

Thr Gln His Trp Thr Glu Cys Val Arg Tyr Tyr Lys Ala Pro Met Leu
 210 215 220

Thr Asn Glu Asp Val Asn Phe Gly Phe Ala Asp Tyr Lys Asn Ser Ala
 225 230 235 240

Ile Ala Val Val Glu
 245

<210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> virut bệnh rụng vảy

<400> 5
 cagtgcatta caagaaag

18

<210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> virut bệnh rụng vảy

<400> 6 gctgaaacaa caatttag	18
<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> virus bệnh rụng vảy	
<400> 7 tcctgtgcag ctgtctaaac	20
<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> virus bệnh rụng vảy	
<400> 8 actggcaatg atgggcgatg	20
<210> 9 <211> 18 <212> ADN <213> virus bệnh rụng vảy	
<400> 9 tcggagggat gaaattgg	18
<210> 10 <211> 18 <212> ADN <213> virus bệnh rụng vảy	
<400> 10 agcgttgtcg atgtagag	18
<210> 11 <211> 18 <212> ADN <213> virus bệnh rụng vảy	
<400> 11 atgccgtcat tgtaacac	18
<210> 12 <211> 18 <212> ADN	

<213> iridovirus

<400> 12

cgtagagaccg tgcgtagt

18

<210> 13

<211> 18

<212> ADN

<213> iridovirus

<400> 13

agggtgacgg tcgatatg

18

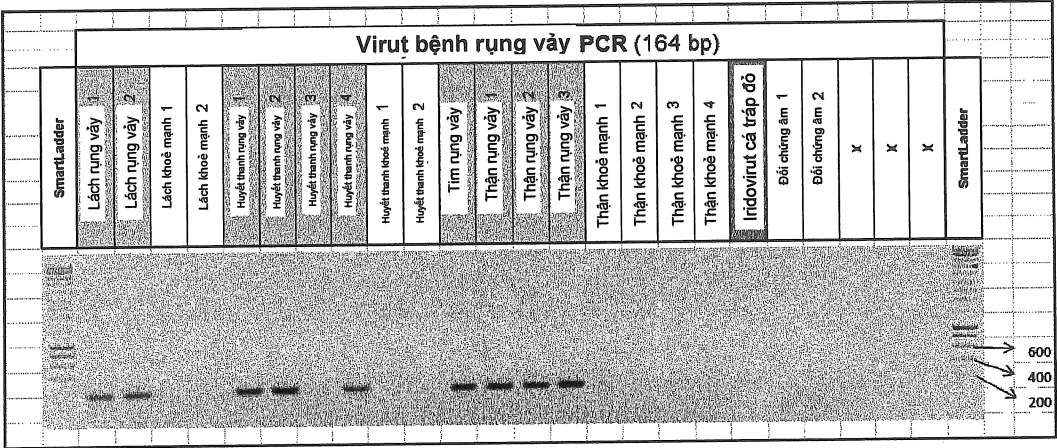


Fig. 1

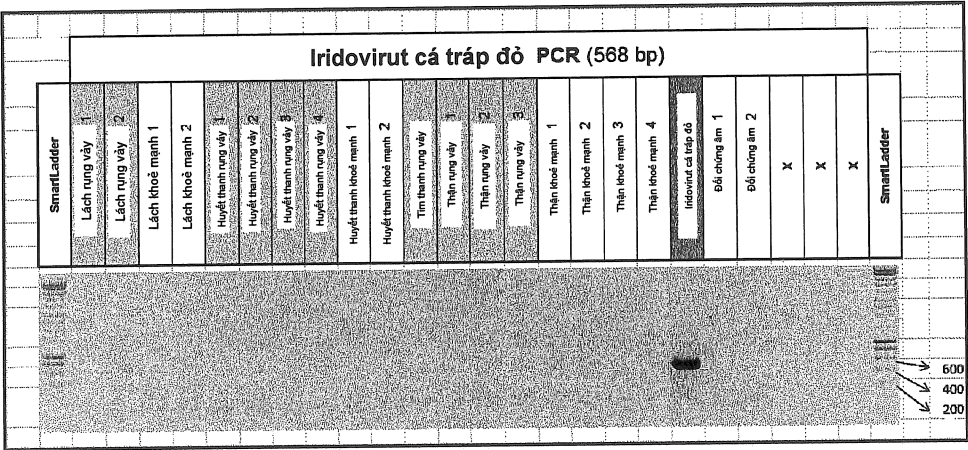


Fig. 2

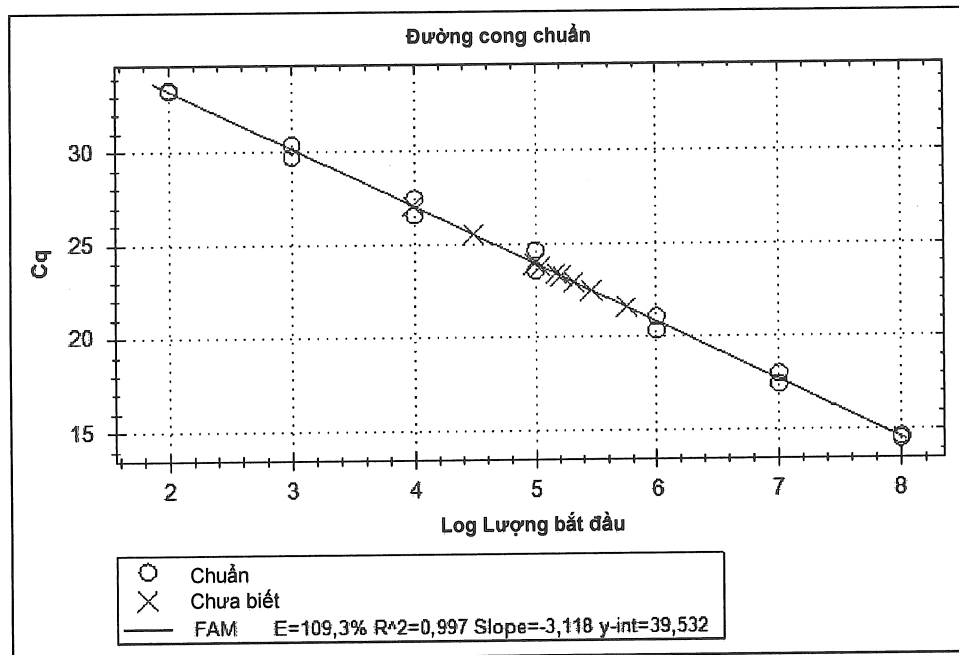


Fig. 3

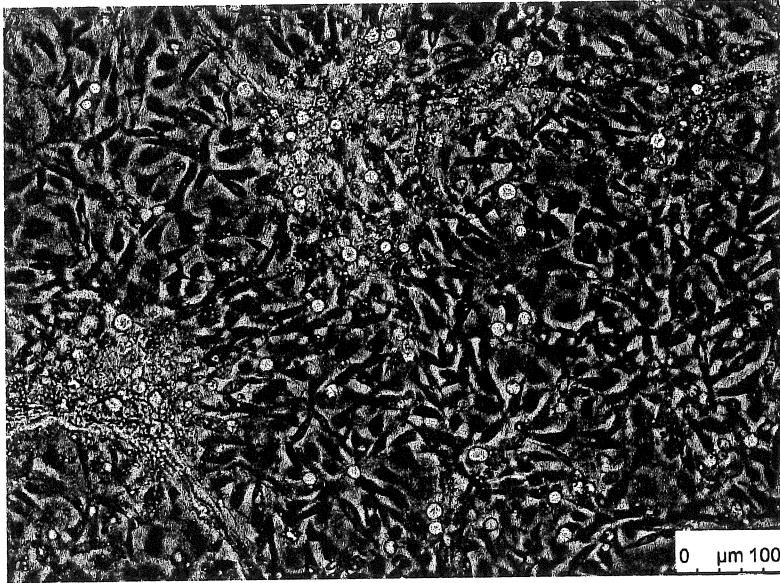


Fig. 4

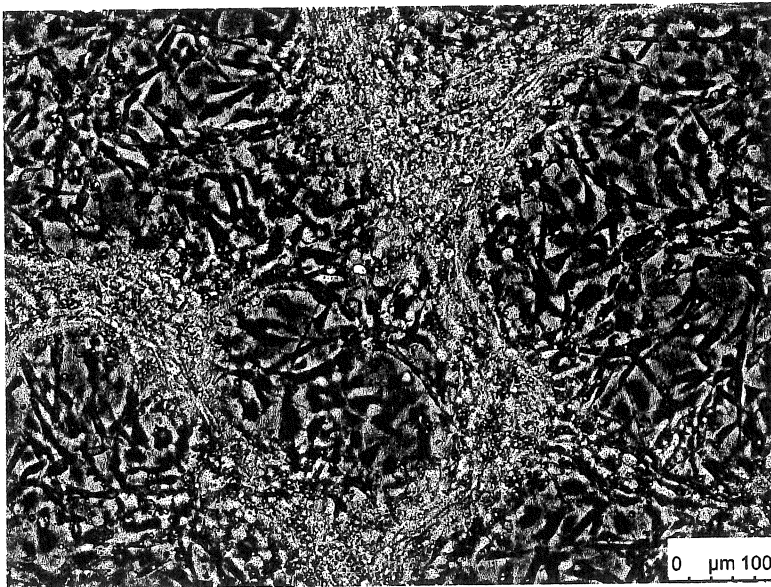


Fig. 5

a)

```

1  atgtcatcta ttgcaggagc taatgttacc agtgggttta tgcacttggc tgcctacgat
61 gccatggaga ctcatctcta cgggtggcgt aattcaatca cctacttctt gcgtgaaact
121 acacgatctt cttggttcag taaacttcct gtgcagctgt ctaaacaac aggaactgca
181 aatttcggac aagaatttag cgtggttggt gccagaggag gtgactatct tatgaatggt
241 tggcttcgcg ttaaagttcc agccctcaaa aatactaaag caaattcaag cataagatgg
301 accgacaatt ttatgcacaa tctcgttcaa gaagttacaa tctcatttaa cgatctcact
361 gcacagacta ttactagtga gtttcttgat ttttgggtcaa catgtaacgt tcccgggtgga
421 aagtcgtcag gatatgctaa tatgatagga tacactcatg acttgggttg aggtactgtg
481 caaaatgcaa ctatgccatc taagtatctc aatctgcca ttccgttctt ctttactcgt
541 gatactggac ttgctcttcc tactgcagca ctaccttaca atgaaattaa aattcatttt
601 aaattgagag attggaagga tttgctcatt tctcaaagca ctaatgataa tgcaatttct
661 gtacctttaa caagtgcacat ggaaaacgtg acaccgctc tgactgaagt tagtggtatg
721 ggtacttatg ctatcctgac caacgaagag cgtgaagcaa tgtctcttgt cagtagagat
781 atgattattg aacagtgtca gatggcacct agaattccta tcagaccctt ggaaaatgag
841 atgccccata ttgatctgag atttagtcat ccattaaag agctcttctt tgctgttaaa
901 aatgtaactc atccaaatat tcacagtaat tatacagctg catcgcccat cattgccagt
961 ggtacaaaca aagttacaat gcctccaaaa gctcaaaacc cattgtcaca cgtgtcactc
1021 atttatgaaa acacagcacg attgaacaat atgggtgttg actacttttc gtatgttgat
1081 ccatacttct ttgcaccatg cattcctaaa atcgatggg tcatggctta ttgttatacc
1141 atgaacatgg gtcagtgcga tcctatgggt tctacaaatt tcggccggtt gtcaaatatt
1201 acgctgtctg caaagggtac cgcaaattca aaaacaacct cagctgctag cggtaacaca
1261 gatggacata aagttgctca aaagtttgaa ctggttgtaa ttggtgtaa tcataatggt
1321 gcacgtatca gcaatggttc atttggattt ccgatcttgt aa

```

b)

```

MSSIAGANVTSGFIDLAAAYDAMETHLYGGDNSITYFLRETTSSWFSKLPVQLSKQTGTANFGQEFVSVVARGGDYIMN
VWLRVKVPALKNTKANSSIRWTDNFMHNLVQEVITISFNDLTAQITSEFLDFWSTCNVPGGKSSGYANMIGYTHDLVGG
TVQNATMPSKYLNLPIPIFFFTRDTGLALPTAALPYNEIKIHFKLRDWKDLLISQSTNDNAISVPLTSDMENVTALTEV
SVMGTYAILTNEEREAMSLVSRDMIIEQCQMAPRIPIRPLENEMPHIDLRFSHPIKELFFAVKNVTHPNHHSNYTAASP
IIASGTNKVTMPKQNPPLSHVSLIYENTARLNNMGVDYFSYVDPYFFAPCIPKIDGMAYCYTMNMGHVDPMGSTNFG
RLSNITLSAKVTANSKTTSAASGNTDGHKVAQKFELVVIGVNHNVARISNGSFGFPIL*

```

Fig. 6

a)

```

1 atgtctgttc ctgtgaagga attgtcaatg accgaaatac gaccgagaac acacgacgat
61 gaaatcggag ggatgaaatt ggtgttttg ggcaaaccgg gccgtggaaa atcggctctg
121 ataaaatcga taatagcatc aaaacgacat ttgatccccg cagcggttgt catttctggt
181 tcagaagaag ccaatcattt ctattctggg ttagttccag aatgttacat ttattccaaa
241 tttgaccccg atattattac cagagtcaag aaacgacaac tagaattaaa acatctagat
301 cctaaacatt cttggctctt attggtcacg gatgattgca tggacaacac caaattgttt
361 aataatgaag tagttgctga tttgtttaaa aacggtagac attggaactt gttggtcatt
421 attgctagtc agtacattat ggatttaaaa gccgatttaa gatgttcaat agatgggtga
481 tttctcttta gcgaatctaa tttgactagt caagagaaaa tatacaaaca gtttgagagt
541 aaaattccaa agcctcaatt tatgctactt atggagaaag tgacattgga ttacacttgt
601 ctctacatcg acaacgctag ccaaacgcag cactggaccg aatgcgttcg atattacaag
661 gcacctatgt taacaaacga ggatgtcaat tttggttttg cagattataa aaacagcgca
721 attgctgttg ttgaataa

```

b)

```

MSVPVKELSMTEIRPRTHDDEIGGMKLVVLGKPGRGKSVLIKSIISKRHLIPAAVVISGSEEHFYSGLVPECYIYS
KFDPDIITRVKKRQLELKHLDPKHSWLLVIDDMDNTKLFNNEVVADLFKNGRHWNLVLIASQYIMDLKADLRCSID
GVFLFSESNLTSQEKIYKQFGGKIPKPQFMLLMKVTLDYTCLYIDNASQTQHWTECVRYKAPMLTNEDVNFGEFADYK
NSAIAVVE*

```

Fig. 7

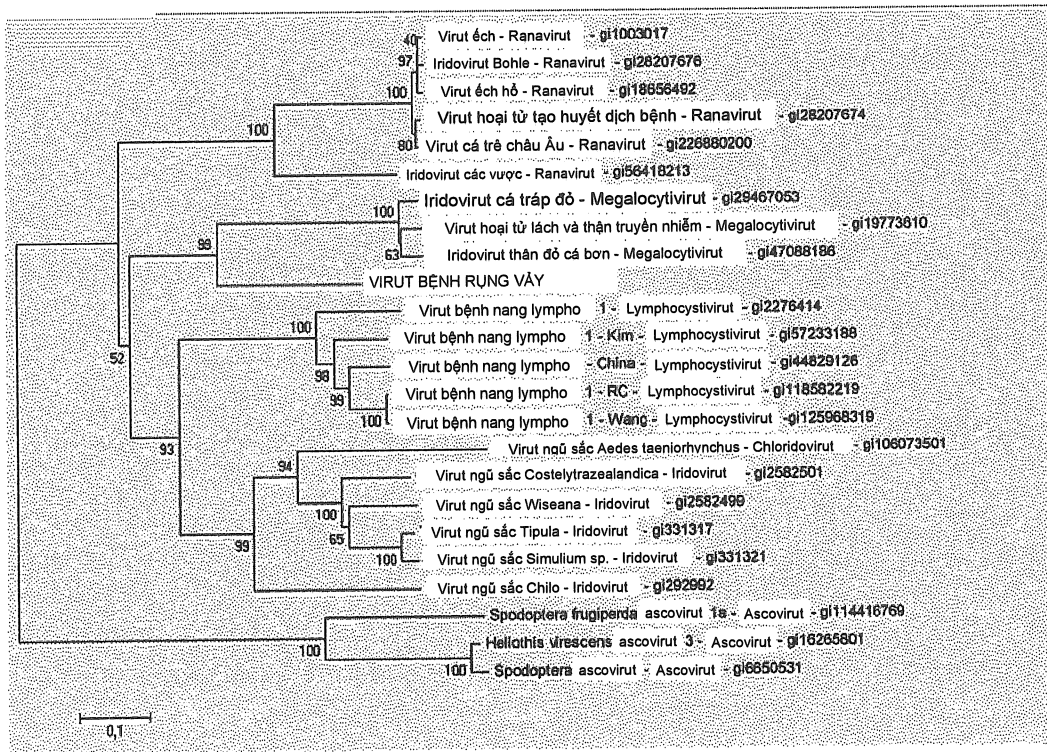


Fig. 8

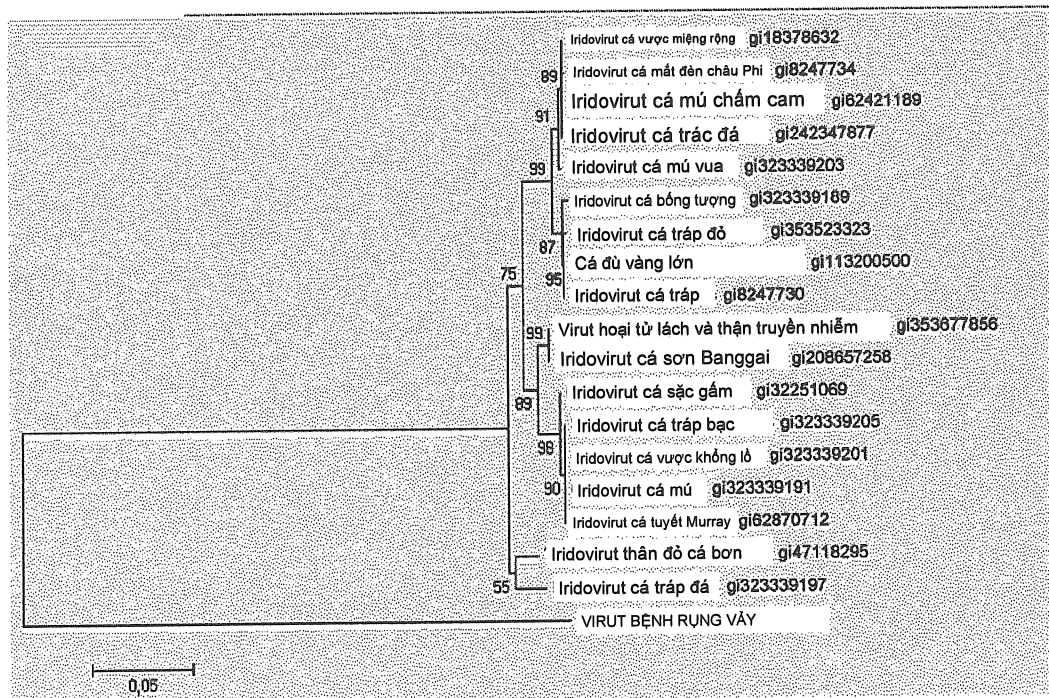


Fig. 9

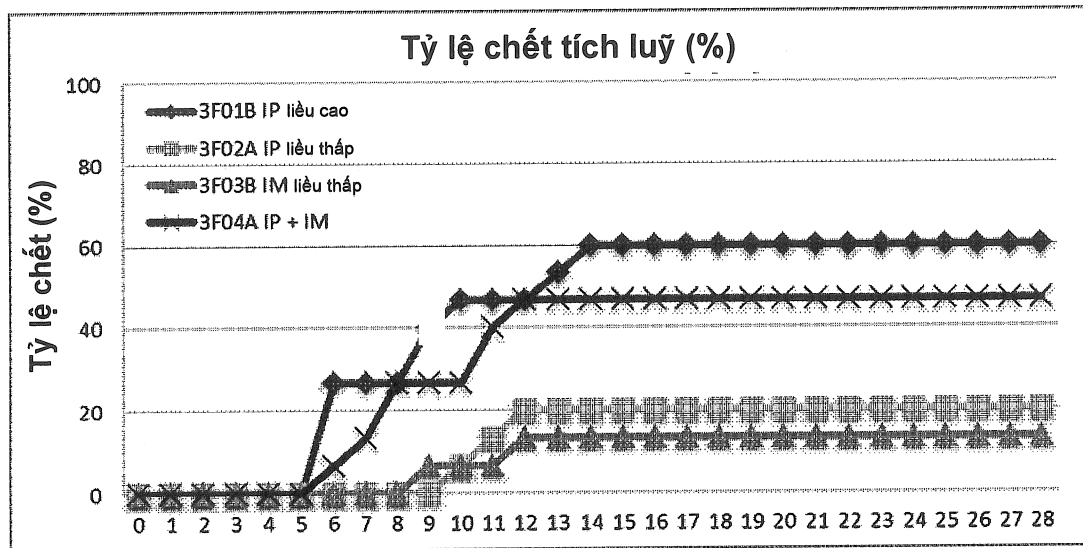


Fig. 10

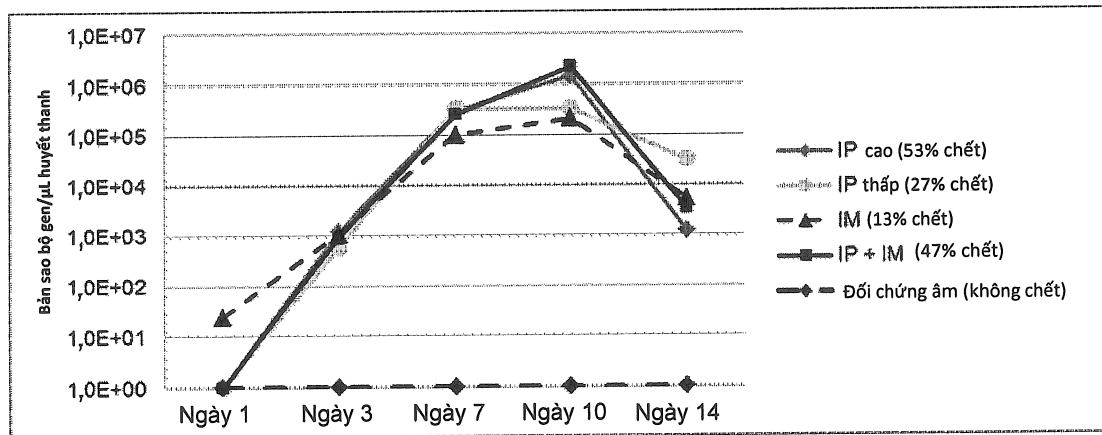


Fig. 11

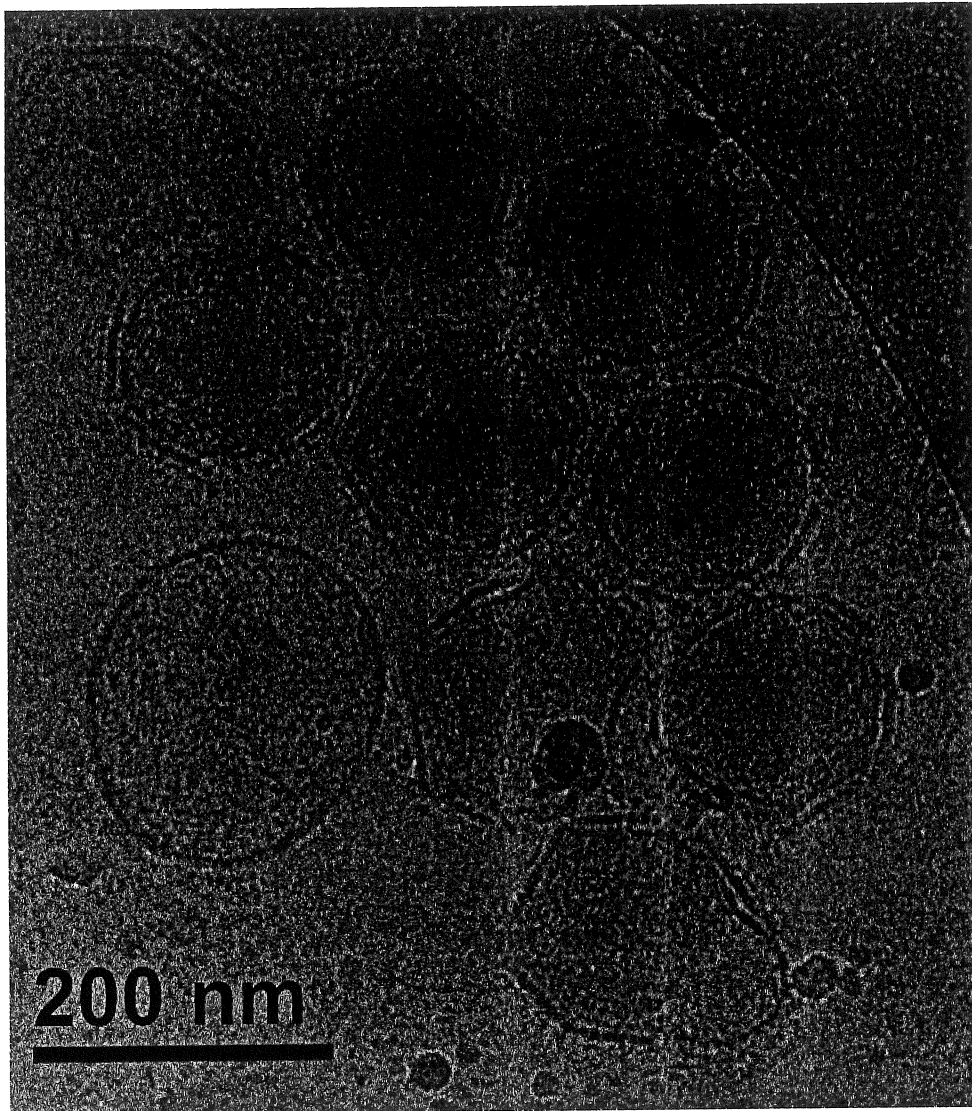


Fig. 12