



(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)



1-0030021

(51)⁷ A61K 39/02; A61K 39/00

(13) B

(21) 1-2015-02768

(22) 31/01/2014

(86) PCT/US2014/014193 31/01/2014

(87) WO 2014/121096 07/08/2014

(30) 61/759,821 01/02/2013 US; 61/773,468 06/03/2013 US

(45) 25/11/2021 404

(43) 25/02/2016 335A

(73) AUBURN UNIVERSITY (US)

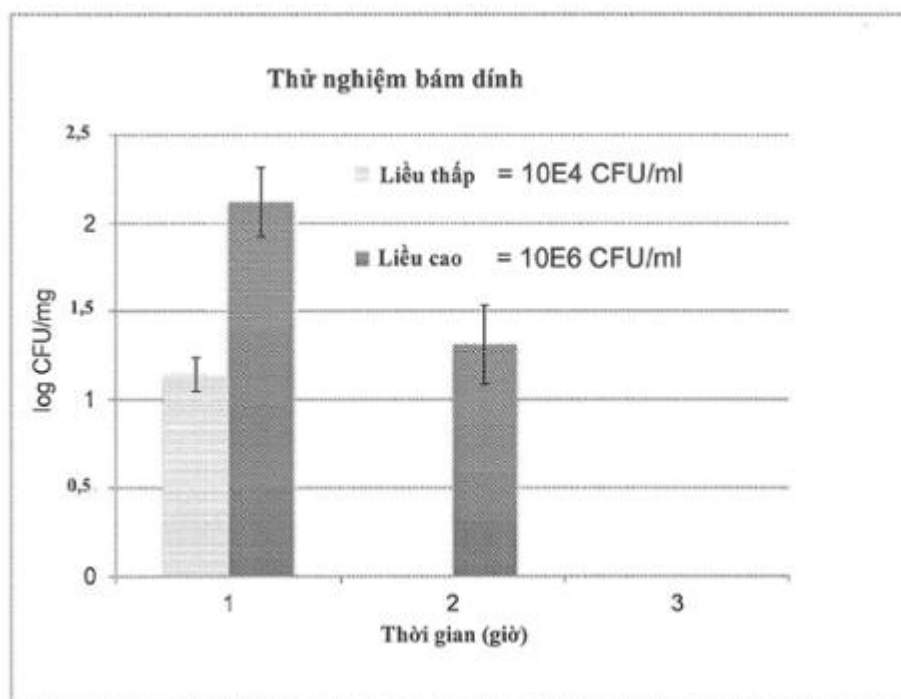
Office Of Technology Transfer, 570 Devall Drive, Suite 102, Auburn, AL 36832,
United States of America

(72) OLIVARES-FUSTER, Oscar (ES); ARIAS, Covadonga, R. (ES).

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

(54) CHỦNG FLAVOBACTERIUM SPP. ĐƯỢC GIẢM ĐỘC LỰC, CHẾ PHẨM VÀ
PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM CHỨA CHỦNG NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Flavobacterium* spp. sống được làm giảm độc lực kích thích đáp ứng miễn dịch ở động vật, cụ thể là cá. Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm miễn dịch chứa chủng vi khuẩn này. Sáng chế cũng đề cập đến chất đệm ổn định, cho phép chế phẩm miễn dịch được duy trì bảo quản ổn định ở nhiệt độ thường trong thời gian kéo dài.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập tới vacxin chứa vi khuẩn được giảm độc lực, cụ thể là các vacxin tạo sự bảo vệ rộng, an toàn và hiệu quả cho cá chống lại sự nhiễm khuẩn/bệnh gây ra bởi *Flavobacterium* spp., bao gồm *Flavobacterium columnare* (*F. columnare*). Sáng chế còn đề cập tới phương pháp sản xuất vi khuẩn được giảm độc lực, và việc xác định các biến đổi của axit nucleic liên quan tới tính độc giảm của vi khuẩn được giảm độc lực. Sáng chế còn đề cập tới chất đệm ổn định, và phương pháp sử dụng chúng, để ổn định vi khuẩn được giảm độc lực đã bọc lợ.

Do đó, sáng chế đề cập tới chế phẩm gây miễn dịch ổn định hoặc chế phẩm vacxin chứa vi khuẩn theo sáng chế; ví dụ, vi khuẩn sống được giảm độc lực. Vi khuẩn còn có thể được bất hoạt trong chế phẩm; nhưng đặc biệt có lợi là vi khuẩn là vi khuẩn *Flavobacterium* spp. sống được giảm độc lực. Do đó, sáng chế còn đề cập tới phương pháp điều chế và/hoặc bào chế chế phẩm này; ví dụ, nuôi cấy hoặc nuôi hoặc nhân giống vi khuẩn trên hoặc trong môi trường thích hợp, thu hoạch vi khuẩn, bất hoạt tùy ý vi khuẩn, và trộn lẫn tùy ý vi khuẩn với chất mang, chất phụ gia, chất pha loãng hoặc chất dẫn thuốc và/hoặc tá dược và/hoặc chất ổn định thích hợp chấp nhận được về mặt dược học và trong thú y. Do đó, sáng chế còn đề cập tới việc sử dụng vi khuẩn để bào chế chế phẩm này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Flavobacterium columnare, tác nhân gây bệnh trắng đuôi, gây ra thất thoát lớn về kinh tế hàng năm đối với ngành công nghiệp nuôi cá trê nuôi ở Mỹ và nhiều loài cá nuôi khác [1]. Đã được ghi nhận là tác nhân gây bệnh toàn cầu của cá nước ngọt ảnh hưởng tới quần thể cá tự nhiên, cá được nuôi và cá cảnh kể cả các loài quan trọng về thương mại [2-4]. Bệnh dịch động vật về bệnh trắng đuôi thường xảy ra trong các quần thể tự nhiên và phá hủy/gây khó khăn ở trang trại cá, trại giống, ao,

trạm và chuồng đặc biệt là cá giữ ở các điều kiện nuôi cấy tập trung với chất lượng nước thấp [5]. Trong ngành công nghiệp nuôi cá trê, bệnh trắng đuôi là nguyên nhân chính gây chết cá trê, tỉ lệ chết trong ao trong số các con trưởng thành và các con giống có thể đạt lần lượt là 60 và 90% [6]. Bệnh trắng đuôi là một trong số các bệnh xảy ra thường nhất ở cá trê, tương ứng với trung bình 41% trong tổng số các trường hợp được đưa ra để xem xét từ năm 2001 tới 2010 [7]. Bệnh trắng đuôi hoặc nhiễm khuẩn hỗn hợp bao gồm bệnh trắng đuôi được xem là nguyên nhân lớn nhất gây thất thoát kinh tế ở các trang trại cá trê với hơn 70% người nuôi cá trê được phỏng vấn ở 4 bang sản xuất cá trê lớn nhất [8]. Cá trê ở độ tuổi bất kỳ, trong tất cả các mùa, và trong hàng loạt các điều kiện nước nhạy cảm với sự nhiễm khuẩn bệnh trắng đuôi [9].

Việc tăng cường các hoạt động nuôi trồng thủy sản đã làm tăng tỉ lệ mắc phải các bệnh truyền nhiễm [10]. Sự phát triển bền vững của nuôi trồng thủy sản dựa vào sự phòng ngừa bệnh và sự tiêm chủng vacxin đã trở thành công cụ tốt nhất để đạt được mục tiêu đó. Vacxin hiệu quả cuối cùng là phương pháp phòng bệnh an toàn nhất để tránh bệnh truyền nhiễm. Hơn nữa, việc sử dụng thuốc kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản đã giảm đáng kể từ khi dùng vacxin [11].

F. columnare là nhóm không tương đồng về mặt di truyền của các tác nhân gây bệnh, được chia thành ba giống chính khác nhau và các chủng khác nhau về mặt di truyền trong các loài thể hiện mức độ khác nhau của tính độc đối với các loài cá khác nhau [12-15]. Các chủng giống II được tìm thấy có tính độc hơn đáng kể đối với cá trê sông so với các chủng giống I và cũng có khả năng bám dính cao hơn [14, 16]. Phương pháp kháng rifampixin được sử dụng thành công để phát triển vacxin chứa vi khuẩn sống được giảm độc lực được cải biến để dùng thương mại trong nuôi trồng thủy sản [17, 18]. Gần đây, vacxin chứa *F. columnare* sống được cải biến đã có để dùng cho thương mại để ngăn ngừa bệnh trắng đuôi với tên được cấp phép là AQUA VAC-COL™. Thành phần hoạt tính trong vacxin này là thể đột biến kháng rifampixin không độc của *F. columnare* giống I, nhóm ít tính độc hơn. Hiệu quả của vacxin này được bàn thảo công khai từ các trang trại. Gần đây, các tác giả sáng chế

đã phát triển các thể đột biến an toàn, và ổn định vĩnh viễn, kháng rifampixin từ các chủng giống II, nhóm có tính độc cao. Vì các chủng giống II có tính độc hơn, vaccin cụ thể nhắm đích giống này có khả năng làm tăng hiệu quả bảo vệ của việc dùng vaccin.

Do đó, mục đích của nghiên cứu này là để đánh giá hiệu quả ở cá ngựa vằn, cá trê sông, và cá rô phi sông Nile của vaccin chứa *F. columnare* sống được cải biến mới (thể đột biến) được phát triển bởi sự chuyển lặp lại của các chủng giống II có tính độc trên môi trường chứa nồng độ tăng dần rifampixin. Do đó, mục đích chính của sáng chế là tạo vaccin chứa *F. columnare* an toàn và hiệu quả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập tới các chủng *F. columnare* được giảm độc lực mới, có khả năng tạo cho cá tính miễn dịch bảo vệ an toàn, hiệu quả, và rộng. Liên quan tới chủng bố mẹ độc, chủng được giảm độc lực được bộc lộ là có một hoặc nhiều sự khác biệt di truyền, bao gồm chèn vào, xóa bỏ và thay thế, sự có mặt của chúng liên quan tới độc tính được làm giảm.

Mục đích khác của sáng chế là tạo chế phẩm vaccin chứa *F. columnare* an toàn và hiệu quả, cũng như phương pháp điều trị và phòng ngừa nhiễm khuẩn *F. columnare*. Cụ thể là, chế phẩm có thể còn chứa chất đệm ổn định, chứa hỗn hợp muối, bao gồm, ví dụ, sulfat, clorua, và phosphat. Chất đệm có thể cho phép vi khuẩn duy trì sự sống trong khoảng thời gian kéo dài, bao gồm tới ít nhất khoảng 1 năm, hoặc lâu hơn. Theo một phương án tối ưu, chất đệm cho phép sự ổn định trong bảo quản kéo dài này ở nhiều mức nhiệt độ, bao gồm nhiệt độ phòng, có thể là khoảng từ 18°C tới 24°C (từ 65 tới 75°F), hoặc nhiệt độ cao hơn, ví dụ như các nhiệt độ có thể thường gặp trong quá trình vận chuyển và bảo quản chế phẩm miễn dịch. Theo một phương án cụ thể, chất đệm chứa sắt sulfat, canxi clorua, kali phosphat monobazơ, và magie sulfat, với lượng đủ để đem lại sự ổn định bảo quản kéo dài.

Sáng chế còn đề cập tới phương pháp kích thích đáp ứng bảo vệ bao gồm miễn dịch ở cá chống lại *F. columnare*, cũng như các phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị *F. columnare*, hoặc tình trạng bệnh gây ra bởi *F. columnare*, bao gồm sử dụng chủng được giảm độc lực, hoặc chế phẩm chứa chủng được giảm độc lực cho cá cần điều trị. Bộ kit chứa ít nhất một chủng *F. columnare* được giảm độc lực và hướng dẫn sử dụng của nó cũng được cung cấp.

Các phương án này và các phương án khác được bộc lộ hoặc được làm rõ từ và được bao hàm bởi, phần mô tả chi tiết sau đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Bản mô tả đầy đủ và được bộc lộ theo sáng chế, bao gồm phương án tốt nhất của nó, với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, được quy định cụ thể hơn trong phần còn lại của bản mô tả, bao gồm viện dẫn đến hình vẽ đi kèm, trong đó:

FIG. 1 thể hiện mức trung bình/giá trị trung bình của tỉ lệ chết tích lũy hàng ngày của cá ngựa vằn được tiêm chủng vaccin theo cách ngâm với 17-23, 16-534, FCR hoặc tiêm chủng vaccin giả và được thách thức theo cách ngâm ở 28 dpv với BGFS-27 (chủng *F. columnare* giống II độc), tỉ lệ chết tích lũy được tính toán từ lần thử tiêm chủng vaccin 1;

FIG. 2 thể hiện mức trung bình/giá trị trung bình của tỉ lệ chết tích lũy hàng ngày của cá trê con được tiêm chủng vaccin theo cách ngâm với 17-23, FCRR hoặc tiêm chủng vaccin giả và được thách thức theo cách ngâm ở 28 dpv với ALG-530 (chủng *F. columnare* giống II độc), tỉ lệ chết tích lũy được tính toán từ lần thử tiêm chủng vaccin 2;

FIG. 3 thể hiện mức trung bình/giá trị trung bình của tỉ lệ chết tích lũy hàng ngày của cá rô phi sông Nile được tiêm chủng vaccin theo cách ngâm với 17-23, FCRR hoặc tiêm chủng vaccin giả và được thách thức theo cách ngâm ở 28 dpv với

BGFS-27 (chủng *F. columnare* giống II) hoặc ARS-1 (chủng *F. columnare* giống I), tỉ lệ chết tích lũy được tính toán từ lần thử tiêm chủng vaccin 3;

FIG. 4 thể hiện (panen bên trái) Cá ngựa vằn (*Danio rerio*), (panen ở giữa) cá trê sông (*Ictalurus punctatus*) và (panen bên phải) cá rô phi sông Nile (*Oreochromis niloticus*) thể hiện tổn thương đặc trưng của bệnh trắng đuôi;

FIG. 5 là biểu đồ thể hiện dữ liệu nghiên cứu sự kết dính.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập tới *F. columnare* được giảm độc lực, hữu dụng trong sản xuất vaccin để bảo vệ cá chống lại Bệnh trắng đuôi. Sáng chế còn bao trùm cả sản phẩm *Flavobacterium* (ví dụ, protein, kháng nguyên, chất gây miễn dịch, epitop), được mã hóa bởi trình tự nucleotit có trong vi khuẩn được giảm độc lực. Nucleotit nêu trên và các sản phẩm có thể là hữu dụng để sản xuất vaccin hoặc chế phẩm gây miễn dịch, và/hoặc để kích thích đáp ứng miễn dịch, bao gồm đáp ứng miễn dịch bảo vệ.

Các đột biến *F. columnare* được giảm độc lực được tạo ra bởi một loạt lần nhân giống của các chủng bố mẹ độc, như được mô tả trong Olivares-Fuster and Arias, 2011 [20]. Ngắn gọn là, để thu được chủng được giảm độc lực, bốn thể phân lập *F. columnare* được nuôi cấy ban đầu trên đĩa thạch MS có bổ sung rifampixin ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Các khuẩn lạc đơn được thu lấy và được chuyển nuôi ở nồng độ rifampixin tiếp theo ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Loạt chuyển sau đó được tiến hành ở 150, 200, 250 và $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ rifampixin. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể tiến hành theo các phương pháp được bộc lộ rõ ràng trong Olivares-Fuster để sản xuất các đột biến được giảm độc lực bổ sung, mà có thể được chứa trong chế phẩm miễn dịch theo bản mô tả này. Như được thảo luận ở đây, "sự giảm độc lực" bị giảm hoặc loại bỏ tính gây bệnh của vi khuẩn và sự nghiêm trọng của các dấu hiệu hoặc các tổn thương lâm sàng, làm giảm tốc độ tăng trưởng của vi khuẩn, và ngăn ngừa vi khuẩn chết.

Theo một phương án, các đột biến *Flavobacterium* spp. được giảm độc lực là hữu dụng để sản xuất chế phẩm gây miễn dịch sống được giảm độc lực, hoặc vaccin sống được giảm độc lực, có mức độ an toàn và tính gây miễn dịch cao. Theo một phương án cụ thể, sáng chế bao hàm cả các chủng được giảm độc lực *F. columnare* và vaccin chứa chúng, kích thích đáp ứng miễn dịch ở động vật, cụ thể là các chủng *F. columnare* được giảm độc lực mà gây nên, kích thích hoặc thúc đẩy đáp ứng ở cá.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chế phẩm miễn dịch hiệu quả và an toàn chứa ít nhất một chủng được giảm độc lực của *Flavobacterium* spp. giống II, trong đó chủng được giảm độc lực kháng rifampixin, và trong đó chủng được giảm độc lực có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch ở cá chống lại sự phơi nhiễm tự nhiên sau đó với, hoặc thách thức thử nghiệm với, ít nhất một chủng *Flavobacterium* ssp. độc. Theo một phương án cụ thể, đáp ứng miễn dịch là đáp ứng miễn dịch bảo vệ.

Theo một phương án cụ thể, chủng *F. columnare* được giảm độc lực có cùng các đột biến về mặt cơ bản và kháng rifampixin, liên quan tới chủng bố mẹ độc của nó, là chủng 17-23, được nộp lưu ở Colección Española de Cultivos TIPO (CECT), Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjassot, 4600 Burgassot (Valencia) España, tại Cơ quan Lưu trữ quốc tế ngày 25 tháng 6 năm 2010 dưới số truy cập được cho bởi Cơ quan Lưu trữ quốc tế: CECT-7737. Các đột biến này dẫn đến chủng được giảm độc lực có tính độc giảm liên quan tới chủng bố mẹ độc của nó.

Theo một phương án, chủng được giảm độc lực là chủng 17-23, được nộp lưu dưới tên CECT-7737 ở Colección Española de Cultivos TIPO (CECT), Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjassot, 4600 Burgassot (Valencia) España, tại Cơ quan Lưu trữ quốc tế ngày 25 tháng 6 năm 2010.

Theo một phương án cụ thể khác, chủng *F. columnare* được giảm độc lực có cùng các đột biến về mặt cơ bản và kháng rifampixin, liên quan tới chủng bố mẹ độc

của nó, là chủng 16-534, được nộp lưu ở Colección Española de Cultivos TIPO (CECT), Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjassot, 4600 Burjassot (Valencia) España, tại Cơ quan Lưu trữ quốc tế ngày 25 tháng 6 năm 2010 dưới dạng số truy cập. Các đột biến này dẫn đến chủng được giảm độc lực có tính độc giảm liên quan tới chủng bố mẹ độc của nó.

Theo một phương án, chủng được giảm độc lực là chủng 16-534, được nộp lưu dưới tên CECT-7736 ở Colección Española de Cultivos TIPO (CECT), Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjassot, 4600 Burjassot (Valencia) España, tại Cơ quan Lưu trữ quốc tế ngày 25 tháng 6 năm 2010 .

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập chế phẩm miễn dịch an toàn và hiệu quả, chứa ít nhất một chủng được giảm độc lực của *Flavobacterium* spp. giống II, trong đó chủng được giảm độc lực kháng rifampixin.

Theo một phương án, chế phẩm là chế phẩm vaccin, có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở cá chống lại sự phơi nhiễm tự nhiên sau đó với, hoặc thách thức thử nghiệm với, ít nhất một chủng *F. columnare* độc.

Theo một phương án khác, ít nhất một *F. columnare* độc là giống nhóm I, II hoặc cả hai nhóm này.

Theo một phương án, *Flavobacterium* ssp. được giảm độc lực là *F. columnare*.

Theo một phương án khác, vaccin chứa chủng được giảm độc lực có cùng profin kháng nguyên về cơ bản là chủng *Flavobacterium* được nộp lưu dưới tên CECT 7737.

Theo một phương án khác nữa, chế phẩm vaccin chứa chủng được giảm độc lực được nộp lưu ở Cơ quan lưu trữ quốc tế dưới tên CECT-7737.

Chế phẩm bất kỳ ở trên có thể còn chứa chất mang chấp nhận được về mặt dược học hoặc trong thú y.

Theo một phương án cụ thể, chế phẩm còn chứa chất đệm ổn định. Chất đệm có thể bao gồm muối khoáng, bao gồm sulfat, clorua, và phosphat. Theo một phương án, chất đệm gồm FeSO_4 , CaCl_2 , KH_2PO_4 , và MgSO_4 . Người có hiểu biết trung bình sẽ có khả năng tạo sự điều chỉnh lượng chính xác của các thành phần chất đệm này, sử dụng sự tối ưu hóa không bình thường, để phù hợp các mục đích cụ thể. Tuy nhiên, một chất đệm ổn định hữu dụng cụ thể bao gồm khoảng 0,4 μM FeSO_4 , khoảng 4,6 μM CaCl_2 , 100 μM KH_2PO_4 , và khoảng 120 μM MgSO_4 . Như được sử dụng ở đây, "khoảng" nghĩa là " $\pm 10\%$ " quanh lượng được nêu. Ví dụ, "khoảng 100 μM " bao hàm từ 90 tới 110 μM . Theo một phương án, muối được trộn và hấp khử trùng theo kỹ thuật tiêu chuẩn khử trùng chất lỏng (ví dụ 121°C, 1 atm, và trong ít nhất khoảng 20 phút).

Theo một phương án khác, bổ sung chất đệm vào (các) chế phẩm miễn dịch làm ổn định chế phẩm trong ít nhất khoảng 12 tháng, khi chế phẩm được bảo quản ở khoảng nhiệt độ phòng hoặc tới khoảng 30°C. Chế phẩm miễn dịch chứa chất đệm được mong đợi có thể duy trì sức sống ở các nhiệt độ này và các nhiệt độ khác, có thể xảy ra trong quá trình vận chuyển và bảo quản thông thường của chế phẩm miễn dịch đó.

Theo một phương án cụ thể, chất đệm là hữu dụng trong bảo quản tế bào sống ở nhiệt độ phòng.

Sáng chế còn bao hàm phương pháp bảo quản tế bào sống, bao gồm tế bào *Flavobacterium* sống được giảm độc lực, trong khoảng thời gian kéo dài bao gồm các bước bảo quản tế bào sống trong chất đệm ổn định được bộc lộ trong bản mô tả này.

Theo một phương án, phương pháp bảo quản bao gồm các bước tạo viên nhỏ của các tế bào sống bằng các kỹ thuật ly tâm thông thường, ví dụ, vào khoảng 5000

vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi, tạo huyền phù lại tế bào trong chất đệm bảo quản, và chuyển tế bào đến thùng chứa vô trùng, từ đó bảo quản tế bào.

Theo một phương án cụ thể, các tế bào được nuôi trong môi trường nuôi cấy phù hợp, tạo viên nhỏ ở ~ 5000 vòng/phút trong khoảng năm phút, và môi trường nuôi cấy đó được loại bỏ. Các tế bào sau đó được tạo huyền phù lại nhẹ nhàng (không khuấy xoáy) và chuyển sang vật chứa vô trùng, để lại phần không khí ít nhất cùng một thể tích như chất lỏng. Vật chứa có thể được niêm phong với nắp. Trước đây, *Flavobacterium* spp. có thể chỉ được bảo quản sử dụng kỹ thuật đông lạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa chất đệm với sự tăng cường độ ổn định khi bảo quản. Thay vì chết chỉ sau từ 24 tới 36 giờ (môi trường nuôi cấy lỏng) hoặc chỉ từ 48 tới 72 giờ (môi trường nuôi cấy rắn), chất đệm ổn định, *Flavobacterium* spp. được bộc lộ duy trì ổn định trong ít nhất hai tháng ở nhiệt độ phòng, giảm nhiều chi phí bảo quản và vận chuyển chế phẩm.

Sáng chế còn bao hàm phương pháp kích thích miễn dịch bảo vệ ở cá chống lại sự phơi nhiễm với, hoặc thách thức thử nghiệm với, chủng độc giống I hoặc II *Flavobacterium* spp. Theo một phương án, phương pháp kích thích gồm bước sử dụng cho cá nêu trên chế phẩm miễn dịch ổn định khi bảo quản hoặc miễn dịch được bộc lộ, từ đó kích thích miễn dịch bảo vệ.

Theo một phương án, chủng độc là *F. columnare* giống I hoặc II.

Theo một phương án, phương pháp kích thích được thực hành trên cá nước ngọt.

Theo một phương án khác, cá là cá rô phi, cá trê, cá ngựa vằn, cá hồi, cá hồi sông, cá chép, cá ngừ, động vật vỏ giáp, hoặc cá khác bất kỳ có khả năng được nuôi trong các nuôi trồng thủy sản.

Theo một số phương án, cách sử dụng là bằng tiêm chủng vaccin theo cách ngâm.

Theo một khía cạnh khác, chủng được giảm độc lực *F. columnare* mới được bào chế thành vaccin an toàn, hiệu quả chống lại *F. columnare* và sự nhiễm khuẩn/bệnh gây ra bởi *F. columnare*.

Theo một phương án, các đột biến này có thể còn được sử dụng làm vector, để các đột biến này mang và biểu hiện *in vivo* kháng nguyên không nguyên thể, hỗ trợ (ví dụ gen không tương đồng hoặc mảnh gen).

Thuật ngữ "kháng nguyên" hoặc "chất gây miễn dịch" có nghĩa là chất gây ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu trong động vật chủ. Kháng nguyên có thể bao gồm toàn bộ sinh vật, bị giết, được giảm độc lực hoặc sống; tiểu đơn vị hoặc một phần của sinh vật; vector tái tổ hợp có chứa đoạn chèn với các đặc tính sinh miễn dịch; mảnh hoặc đoạn ADN có khả năng gây đáp ứng miễn dịch khi xuất hiện tới vật chủ; polypeptit, epitop, bán kháng nguyên, hoặc sự kết hợp bất kỳ của chúng. Nói cách khác, các chất gây miễn dịch hay kháng nguyên có thể bao gồm chất độc hoặc thuốc kháng độc.

Các thuật ngữ "protein", "peptit", "polypeptit" và "mảnh polypeptit" được sử dụng thay thế cho nhau trong tài liệu này để chỉ các polyme của gốc axit amin chiều dài bất kỳ. Các polyme có thể thẳng hoặc phân nhánh, có thể bao gồm các axit amin cải biến hoặc các chất tương tự axit amin, và có thể bị gián đoạn bởi các gốc hóa học khác với các axit amin. Các thuật ngữ này cũng bao gồm polyme axit amin đã được biến đổi tự nhiên hoặc do can thiệp; ví dụ như hình thành liên kết disulfua, glycosyl hóa, lipit hóa, axetyl hóa, phosphoryl hóa, hoặc thao tác hoặc cải biến khác bất kỳ, chẳng hạn như liên hợp với thành phần dán nhãn hay hoạt tính sinh học.

Thuật ngữ "polypeptit miễn dịch hay kháng nguyên" như được sử dụng trong tài liệu này bao gồm các polypeptit có miễn dịch hoạt động trong ý nghĩa rằng một khi dùng với vật chủ, có thể gợi lên đáp ứng miễn dịch của các dịch thể và/hoặc các loại tế bào chống lại các protein. Tốt hơn là các mảnh protein sao cho có các hoạt động miễn dịch hầu như giống protein tổng. Do đó, mảnh protein theo sáng chế chứa hoặc chủ yếu bao gồm hoặc bao gồm ít nhất một epitop hoặc tác nhân quyết định

kháng nguyên. Protein "miễn dịch" hoặc polypeptit, như được sử dụng trong tài liệu này, bao gồm chuỗi dài đầy đủ của protein, các chất tương tự của chúng, hoặc các mảnh gây miễn dịch của chúng. Thuật ngữ "mảnh gây miễn dịch" có nghĩa là mảnh vỡ của protein trong đó bao gồm một hoặc nhiều epitop và do đó gọi ra những đáp ứng miễn dịch được mô tả ở trên. Mảnh vỡ này có thể được xác định bằng cách sử dụng số lượng bất kỳ kỹ thuật lập bản đồ epitop, được biết đến trong lĩnh vực. Xem, ví dụ, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Ví dụ, các epitop thẳng có thể được xác định bằng cách ví dụ, đồng thời tổng hợp số lượng lớn của các peptit trên chất trợ rắn, các peptit tương ứng với các phần của các phân tử protein, và phản ứng với các peptit kháng thể trong khi các peptit vẫn được gắn liền với các chất trợ. Kỹ thuật đó được biết đến trong lĩnh vực và mô tả trong, ví dụ như, Pat. Mỹ số 4708871; Geysen et al. , 1984; Geysen et al. , 1986. Tương tự như vậy, các cấu hình của epitop được dễ dàng xác định bằng cách xác định cấu tạo không gian của các axit amin như bởi, ví dụ, x-quang tinh thể và 2 chiều cộng hưởng từ hạt nhân. Xem, ví dụ, Epitope Mapping Protocols, trên đây. Phương pháp đặc biệt áp dụng đối với các protein của *T. parva* được mô tả đầy đủ trong PCT/ US2004/022605 được dùng trong bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung.

Thuật ngữ "epitop" đề cập đến các vị trí trên kháng nguyên hoặc bán kháng nguyên mà các tế bào B và/hoặc các tế bào T đáp ứng. Thuật ngữ này cũng được sử dụng thay thế cho nhau với "tác nhân quyết định kháng nguyên" hoặc "vị trí tác nhân quyết định kháng nguyên". Kháng thể nhận ra các epitop tương tự có thể được xác định trong thử nghiệm miễn dịch đơn giản cho thấy khả năng của một kháng thể để ngăn chặn sự liên kết của kháng thể khác với kháng nguyên đích.

"Đáp ứng miễn dịch" với chế phẩm hoặc vaccin là sự phát triển trong vật chủ của đáp ứng miễn dịch tế bào và/hoặc qua trung gian kháng thể với chế phẩm hoặc vaccin quan tâm. Thông thường, "đáp ứng miễn dịch" bao gồm nhưng không giới hạn ở một hoặc nhiều tác dụng sau: sản xuất kháng thể, tế bào B, tế bào T trợ giúp, và/hoặc tế bào T gây độc, cụ thể tới kháng nguyên hay các kháng nguyên được chứa

trong chế phẩm hoặc vacxin quan tâm. Tốt hơn là, vật chủ sẽ hiển thị đáp ứng miễn dịch hoặc điều trị hoặc bảo vệ sao cho khả năng chống nhiễm trùng mới sẽ được tăng cường và/hoặc mức độ nghiêm trọng lâm sàng của bệnh giảm. Sự bảo vệ đó sẽ được chứng minh bằng hoặc là giảm hoặc thiếu các triệu chứng và/hoặc các dấu hiệu lâm sàng bệnh thường được hiển thị bởi vật chủ bị nhiễm, thời gian phục hồi nhanh hơn và/hoặc hiệu giá virus hạ xuống trong vật chủ bị nhiễm khuẩn.

Thuật ngữ "động vật" chỉ động vật có vú, chim và các loại tương tự. Động vật hoặc vật chủ như được sử dụng trong tài liệu này bao gồm cá, bò sát, gia cầm, động vật có vú (bao gồm cả con người). Các động vật có thể được lựa chọn từ nhóm bao gồm họ ngựa (ví dụ, ngựa), họ chó (ví dụ như, chó, sói xám, cáo, sói đồng cỏ, chó rừng), họ mèo (ví dụ, sư tử, hổ, mèo nhà, mèo rừng, các mèo lớn khác, và các họ mèo khác bao gồm cả loài báo và linh miêu), họ cừu (ví dụ, cừu), họ bò (ví dụ, bò), cá (ví dụ, cá rô phi, cá trê, cá ngựa vằn và cá hồi), gia cầm (ví dụ, gà, vịt, ngỗng, gà tây, chim cút, chim trĩ, vịt, chim sẻ, chim ung, quạ, đà điểu, đà điểu châu úc và đà điểu đầu mào), linh trưởng (ví dụ, bộ bán hầu, khỉ lùn tarsier, khỉ, vượn, khỉ không đuôi), chồn, hải cẩu và cá. Thuật ngữ "động vật" cũng bao gồm cá thể động vật trong tất cả các giai đoạn phát triển, bao gồm cả trẻ sơ sinh, phôi thai và giai đoạn bào thai.

Trừ khi được xác định bằng cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật sử dụng ở đây có nghĩa tương tự như ý hiểu thông thường bởi một trong các kỹ năng thông thường trong lĩnh vực mà sáng chế có liên quan tới. Các thuật ngữ số ít bao gồm số nhiều trừ khi bối cảnh rõ ràng chỉ khác. Tương tự như vậy, từ "hoặc" được dự định để bao gồm "và" trừ khi bối cảnh rõ ràng chỉ khác.

Cần lưu ý rằng trong công bố này và đặc biệt là trong yêu cầu bảo hộ và/hoặc các đoạn trong bản mô tả, các thuật ngữ như "bao gồm", "được bao gồm", "chứa" và tương đương có thể có ý nghĩa được chỉ định trong luật sáng chế của Hoa Kỳ; ví dụ, chúng có thể có nghĩa là "bao gồm", "được bao gồm", "bao gồm cả", và tương đương; và rằng các thuật ngữ như "bao gồm chủ yếu là" và "chủ yếu bao gồm" có ý nghĩa đã quy cho chúng trong luật sáng chế Hoa Kỳ, ví dụ, chúng cho phép các tác

nhân không nêu rõ ràng, nhưng không bao gồm các tác nhân được tìm thấy trong tình trạng kỹ thuật hoặc có ảnh hưởng đến đặc tính cơ bản hoặc mới của sáng chế.

Chế phẩm

Sáng chế đề cập đến *Flavobacterium* spp. được giảm độc lực, bao gồm *F. columnare*, vacxin hoặc chế phẩm miễn dịch, trong đó có thể bao gồm chủng *F. columnare* được giảm độc lực và chất mang, tá dược, hay chất dẫn thuốc chấp nhận được về mặt dược học hoặc trong thú y, gây nên, kích thích hoặc thúc đẩy đáp ứng ở động vật.

Thuật ngữ "axit nucleic" và "polynucleotit" đề cập đến ARN hoặc ADN mạch thẳng hoặc phân nhánh, sợi đơn hoặc đôi, hoặc thể lai của chúng. Thuật ngữ này cũng bao gồm thể lai ARN/ADN. Sau đây là ví dụ không hạn chế của polynucleotit: gen hoặc mảnh gen, exon, intron, mRNA, tARN, rARN, ribozym, cADN, polynucleotit tái tổ hợp, polynucleotit phân nhánh, plasmit, vectơ, ADN bị phân lập của trình tự bất kỳ, ARN bị phân lập của trình tự bất kỳ, đoạn dò axit nucleic và đoạn mồi. Polynucleotit có thể bao gồm nucleotit cải biến, như nucleotit metyl hóa và chất tương tự nucleotit, uraxyl, các loại đường khác và nhóm liên kết như floriboza và thiolat, nhánh nucleotit. Trình tự của nucleotit có thể được tiếp tục cải biến sau khi polyme hóa, như bằng cách tiếp hợp, với thành phần dán nhãn. Các loại cải biến khác bao gồm trong định nghĩa này là bịt đầu, thay thế một hoặc nhiều nucleotit có trong tự nhiên bằng chất tương tự, và đưa phương tiện để gắn các polynucleotit với protein, ion kim loại, thành phần dán nhãn, các polynucleotit khác hoặc chất trợ rắn. Các polynucleotit có thể thu được bằng tổng hợp hóa học hoặc có nguồn gốc từ vi sinh vật.

Thuật ngữ "gen" được sử dụng rộng rãi để chỉ phân đoạn bất kỳ của polynucleotit liên kết với chức năng sinh học. Như vậy, các gen bao gồm các intron và exon như trong chuỗi gen, hay chỉ là chuỗi mã hóa như trong các cADN và/hoặc các trình tự điều cần thiết cho sự biểu hiện của chúng. Ví dụ, gen cũng đề cập đến

đoạn axit nucleic có biểu hiện mARN hoặc ARN chức năng, hoặc mã hóa protein cụ thể, và trong đó bao gồm các trình tự quy định.

Thành phần sinh học "phân lập" (chẳng hạn như axit nucleic và protein hoặc bào quan) là thành phần đã được tách chiết hoặc tinh chế từ các thành phần sinh học khác trong tế bào của sinh vật, trong đó các thành phần tự nhiên, ví dụ, nhiễm sắc thể khác và nhiễm sắc thể bổ sung ADN và ARN, protein, và các bào quan. Axit nucleic và protein đã được "phân lập" bao gồm các axit nucleic và protein tinh chế bằng phương pháp thanh lọc tiêu chuẩn. Thuật ngữ này cũng bao gồm các axit nucleic và protein bằng công nghệ tái tổ hợp cũng như tổng hợp hóa học.

Thuật ngữ "biến thể bảo toàn" biểu thị sự thay thế gốc axit amin bằng gốc sinh học tương tự khác, hoặc thay thế nucleotit trong chuỗi axit nucleic sao cho gốc axit amin mã hóa không thay đổi hoặc là gốc sinh học tương tự khác. Về vấn đề này, các thay thế được ưu tiên cụ thể sẽ thường được bảo toàn trong tự nhiên, như đã mô tả trên đây.

Thuật ngữ "tái tổ hợp" có nghĩa là polynucleotit bán tổng hợp, hoặc tổng hợp có nguồn gốc mà hoặc không xảy ra trong tự nhiên hoặc được liên kết với polynucleotit khác trong sự sắp xếp không tìm thấy trong tự nhiên.

"Không tương đồng" có nghĩa là được bắt nguồn từ thực thể riêng biệt về mặt di truyền từ phần còn lại của thực thể mà nó đang được so sánh. Ví dụ, polynucleotit có thể được đặt bởi kỹ thuật thao tác di truyền vào plasmit hoặc vector có nguồn gốc từ nguồn khác nhau, và là polynucleotit không tương đồng. Vùng khởi đầu được loại bỏ khỏi trình tự mã hóa tự nhiên của nó và được liên kết hoạt động với trình tự mã hóa khác với trình tự tự nhiên là vùng khởi đầu không tương đồng.

Các polynucleotit theo sáng chế có thể bao gồm các trình tự bổ sung, như trình tự mã hóa bổ sung trong cùng đơn vị phiên mã, tác nhân kiểm soát như vùng khởi đầu, vị trí gắn kết ribosom, 5'UTR, 3'UTR, vùng kết thúc phiên mã, vị trí polyadenyl hóa, đơn vị phiên mã bổ sung dưới sự kiểm soát của vùng khởi đầu giống

hoặc khác nhau, trình tự cho phép tách dòng, biểu hiện, tái tổ hợp tương đồng, và biến nạp tế bào chủ, và cấu trúc bất kỳ như có thể được mong muốn để tạo ra các phương án của sáng chế.

Phương pháp sử dụng và Đối tượng sản xuất

Sáng chế bao gồm các phương án phương pháp sau đây. Theo một phương án, phương pháp tiêm chủng vacxin động vật bao gồm việc dùng chế phẩm chứa ít nhất một chủng *F. columnare* được giảm độc lực và chất mang, tá dược, hay chất dẫn thuốc chấp nhận được về mặt dược phẩm hoặc trong thú y với động vật được tiết lộ. Theo một khía cạnh của phương án này, động vật là cá. Theo một phương án cụ thể, cá là cá rô phi, cá ngựa vằn, cá trê, hay cá hồi.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực phải hiểu là sáng chế được đề xuất bằng ví dụ và sáng chế không bị giới hạn ở đó. Từ sáng chế và các kiến thức trong lĩnh vực, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể xác định số lượng sử dụng, lộ trình sử dụng, và liều được sử dụng cho mỗi giao thức tiêm, không có thử nghiệm bất kỳ không đáng có. Đối với cá, tiêm chủng vacxin theo cách ngâm là lộ trình sử dụng được ưu tiên.

Phương án khác của sáng chế là bộ kit để thực hiện phương pháp gợi ý hoặc gây đáp ứng miễn dịch hoặc bảo vệ chống lại *F. columnare*, ở động vật chứa chế phẩm miễn dịch *F. columnare* được giảm độc lực hoặc vacxin và hướng dẫn thực hiện phương pháp phân phối lượng hiệu quả để kích thích đáp ứng miễn dịch ở động vật.

Phương án khác của sáng chế là bộ kit để thực hiện phương pháp gây đáp ứng miễn dịch hoặc bảo vệ chống lại *F. columnare* ở động vật bao gồm chế phẩm hoặc vacxin bao gồm chủng *F. columnare* được giảm độc lực theo sáng chế, và hướng dẫn thực hiện phương pháp phân phối lượng hiệu quả để kích thích đáp ứng miễn dịch ở động vật.

Các chất mang hoặc chất dẫn thuốc hoặc tá dược chấp nhận được về mặt dược học hoặc trong thú y cũng được biết đến bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ, chất mang hoặc chất dẫn thuốc hoặc tá dược chấp nhận được về mặt dược học hoặc trong thú y có thể là dung dịch NaCl 0,9% (ví dụ, nước muối) hoặc chất đệm phosphat. Chất mang hoặc chất dẫn thuốc hoặc tá dược khác chấp nhận được về mặt dược học hoặc trong thú y có thể được sử dụng cho phương pháp của sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, poly-(L-glutamat) hoặc polyvinylpyrrolidon. Chất mang hoặc chất dẫn thuốc hoặc tá dược chấp nhận được về mặt dược học hoặc trong thú y có thể là hợp chất hoặc sự kết hợp của các hợp chất bất kỳ tạo thuận lợi cho việc sử dụng vectơ (hoặc protein được biểu hiện từ vectơ sáng tạo *in vitro*); thuận lợi là, chất mang, chất dẫn thuốc hoặc tá dược có thể tạo điều kiện chuyển nạp và/hoặc cải thiện sự bảo quản của vectơ (hoặc protein). Liều dùng và thể tích liều trong bản mô tả này được thảo luận trong phần mô tả chung và cũng có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực, mà không có thử nghiệm bất kỳ không đáng có.

Các chế phẩm miễn dịch và vaccin theo sáng chế có thể chứa hoặc bao gồm về cơ bản một hoặc nhiều tá dược. Tá dược phù hợp để dùng trong việc thực hiện sáng chế là (1) polyme của acrylic hoặc axit metacrylic, anhydrit maleic và polyme dẫn xuất alkenyl, (2) trình tự kích thích miễn dịch (ISS), như trình tự oligodeoxyribonucleotit có một hoặc nhiều đơn vị CpG không metyl hóa (Klinman et al, 1996; W098 / 16.247), (3) nhũ tương dầu trong nước, như nhũ tương SPT được mô tả ở trang 147 của "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" published by M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, và nhũ tương MF59 được mô tả ở trang 183 của cùng tài liệu, (4) lipit cation chứa muối amoni bậc bốn, ví dụ, DDA (5) xytokin, (6) nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat, (7) saponin hoặc (8) các tá dược khác được thảo luận trong tài liệu trích dẫn bất kỳ và kết hợp bằng cách tham chiếu vào đơn ngay lập tức, hoặc (9) sự kết hợp hoặc hỗn hợp bất kỳ của chúng.

Sáng chế sẽ còn được minh họa bằng các ví dụ không giới hạn sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Vật liệu và phương pháp. Nuôi cá

Cá ngựa vằn trưởng thành không xác định giới tính, *Dania rerio*, ($n = 360$, khối lượng trung bình $= 0,45 \pm 0,04$ g) được mua từ Aquatica Tropicals (Plant City, FL, USA), chuyển giao cho các Phòng thí nghiệm Vi sinh vật thủy sản (Aquatic Microbiology Laboratory - AML), và nằm trong mười hai hồ (chín gallon/hồ) với 30 con cá mỗi thùng. Trước khi tiêm chủng vacxin, hai con cá ngựa vằn được lựa chọn ngẫu nhiên từ mỗi hồ cá, đồng nhất, và được kiểm tra vi sinh (đặt trên thạch agar Shieh được điều biến (MS) với tobramycin). Các hồ đồng nhất được xác nhận là nuôi cấy âm tính với sự có mặt của *F. columnare*. Theo cùng một cách, cá trê sông một tháng tuổi, *Ictalurus punctatus*, ($n = 480$; khối lượng trung bình $= 0,05 \pm 0,003$ g) được cung cấp bởi Dr. Newton, cá được chuyển giao cho AML, và đặt trong cùng hệ thống với bốn mươi con cá mỗi thùng. Trước khi tiêm chủng vacxin, năm con cá trê được lựa chọn ngẫu nhiên từ mỗi hồ cá, đồng nhất, và được kiểm tra vi sinh như đã đề cập trước đó. Các hồ đồng nhất được xác nhận là nuôi cấy âm tính với sự có mặt của *F. columnare*. Tương tự như vậy, tất cả cá rô phi sông Nile giới tính đực 6 tháng tuổi, *Oreochromis niloticus*, ($n = 600$, khối lượng trung bình $= 9,4 \pm 0,5$ g) thu được từ E. W. Shell Fisheries Center, North Auburn Fisheries experiment Station. Sau khi thuần hóa sơ bộ, cá này được chuyển từ thùng to và đặt vào ba mươi hồ (chín gallon/hồ) với hai mươi con cá mỗi thùng.

Trước khi tiêm chủng vacxin, ba con cá được lựa chọn ngẫu nhiên từ mỗi hồ cá, kiểm tra vi sinh bằng cách cấy vạch trên đĩa tobramycin thạch agar Shieh cải biến (modified Shieh - MS) từ da và mang cá và đã được xác nhận nuôi cấy âm tính đối với sự có mặt của *F. columnare*. Cá ngựa vằn, cá trê sông và cá rô phi sông Nile được thuần hóa với điều kiện phòng thí nghiệm trong hai tuần trước ngày tiêm chủng vacxin và được cho ăn hàng ngày cùng sự thỏa mãn rõ ràng với thực phẩm cá khô có bán trên thị trường AQUAMAX Grower 300, I 00 và 400 (Purina Mills), tương ứng. Mỗi hồ cá được sử dụng là hệ thống tuần hoàn khép kín và được trang bị bộ lọc

sinh học, bộ sưởi và đầu sục khí, và được cung cấp nước không clo mới nhân tạo (độ kiềm 80 ppm, độ cứng 70 ppm). Nhiệt độ được giữ ở $27 \pm 1^\circ \text{C}$ và độ pH $7,6 \pm 0,2$. Cá phải chịu chu kỳ sáng 12 giờ: tối 12 giờ. Các thông số chất lượng nước được kiểm tra hai ngày một lần. Nồng độ amoniac và nitrit không phát hiện được trong suốt thời gian nghiên cứu. Tại thời điểm tiêm chủng vaccin, hồ được chỉ định một cách mù quáng với mỗi nhóm điều trị.

Chủng vi khuẩn và điều kiện sinh trưởng

Các đột biến *F. columnare* kháng rifampixin được sử dụng trong các thí nghiệm này được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp kháng rifampixin sau cải biến của giao thức ban đầu được dùng với *Brucella abortus* [19]. Các đột biến này thu được từ các chủng giống II khác nhau về mặt di truyền. Các thay đổi trong profin lipopolysaccharit và protein của thể đột biến này được nghiên cứu kèm theo bằng đặc tính di truyền và kiểu hình hoàn chỉnh [20]. Tất cả các chủng *F. columnare* được sử dụng trong nghiên cứu này được bảo quản trữ ở -80°C dưới dạng kho dự trữ glyxerol và được nuôi cấy trên môi trường thạch MS hoặc trong canh MS và lắc ở 100 vòng/phút ở 28°C trong 24 giờ. Việc đếm đĩa của từng chủng (lặp lại 3 lần) được thực hiện để tính toán số lượng trung bình của đơn vị tạo khuẩn lạc trong một mililit (CFU/ml) của vi khuẩn dùng để tiêm chủng vaccin hoặc thách thức cá như báo cáo theo mỗi thử nghiệm. Các đột biến *F. columnare* được xác nhận vẫn kháng rifampixin bằng cách đặt trên môi trường thạch agar MS chứa $200 \mu\text{g/mL}$ rifampixin trước mỗi lần tiêm chủng vaccin (ba thử nghiệm được tiến hành, mỗi loài cá một con).

Sau mỗi thử nghiệm thách thức, *F. columnare* được phân lập từ cá chết bằng cách đặt trên môi trường thạch agar MS chứa $1 \mu\text{g/mL}$ tobramycin [21]. Các khuẩn lạc *F. columnare* giả định được xác định dựa vào màu của chúng và hình thái đặc trưng của các khuẩn lạc trên đĩa thạch agar.

Phân tích thống kê

Số liệu chết đã được phân tích bằng phương pháp phân tích một chiều (ANOVA) sử dụng mô hình tuyến tính tổng quát (PROC GLM) sau đó là thử nghiệm nhiều phạm vi của Duncan (SAS Institute, Cary, NC.) để xác định sự khác biệt đáng kể ($P < 0,05$) giữa tỷ lệ chết trung bình của các nhóm điều trị và các lần nhắc lại (hồ cá) trong các lần thử 1, và 2. Đối với lần thử thứ ba, thử nghiệm Tukey's Studentized Range (HSD) cho tất cả các so sánh theo cặp được sử dụng để xác định sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$) giữa cá tiêm chủng vaccin (hoặc với các loại vaccin thử nghiệm giống II hoặc FCRR) và không tiêm chủng vaccin thách thức với *F. columnare* giống I hoặc giống II.

Kết quả

Đột biến giống II *F. columnare* kháng rifampixin mới là an toàn để dùng như là vaccin ở cá ngựa vằn, cá trê song và cá rô phi trong tất cả các thử nghiệm, do không có hiện tượng chết được ghi nhận trong thời gian tiêm chủng vaccin. Khi cá tiêm chủng vaccin được thách thức với chủng *F. columnare* độc tại 28 dpv, kết quả của các thách thức được thể hiện dưới dạng tỷ lệ chết tích lũy (% chết) và dưới dạng RPS như mô tả trước đây [22].

Tỷ lệ chết tích lũy được tính bằng cách chia số lượng cá chết trong một khoảng thời gian cho tổng số lượng cá mỗi lần điều trị và nhân với 100. RPS đã được tính toán theo công thức sau: $RPS = [1 - (\text{tỷ lệ chết ở cá đã được tiêm chủng vaccin} / \text{tỷ lệ chết ở cá đối chứng})] \times 100$.

Ví dụ 1 – Tiêm chủng vaccin ở cá ngựa vằn và thách thức

Tổng 336 cá ngựa vằn trưởng thành được tiêm chủng vaccin bằng DI trong bể 2L chứa vaccin thực nghiệm 17-23 và 16-534, hoặc trong FCRR (thành phần hoạt tính được sử dụng trong vaccin thương mại, AQUAVAC-COL™) ở các nồng độ là $7,8 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$ hoặc $9,1 \times 10^6$ CFUml⁻¹, tương ứng, trong ba mươi phút. Nhóm đối chứng được giả tiêm chủng vaccin bằng cách ngâm trong canh MS vô trùng và phơi nhiễm với cùng quy trình và cùng điều kiện môi trường như cá được tiêm chủng

vacxin ngoại trừ bổ sung vào thành phần vacxin chủ động. Bốn điều trị/ba nhắc lại cho mỗi con. Sau khi tiêm chủng vacxin, cá trong mỗi nhóm điều trị được tách khỏi bể vacxin, thay thế trở lại hồ giữ chúng theo các nhóm điều trị tương ứng cho đến khi thách thức, và hàng ngày cho ăn theo 2% trọng lượng cơ thể. Ở 28 dpv, cả hai loại cá được tiêm chủng vacxin và được giả tiêm chủng vacxin được thách thức ngâm trong bể 2L chứa chủng *F. columnare* rất độc (BGFS-27, giống II) ở nồng độ là $6,4 \times 10^6$ CFUml⁻¹ trong ba mươi phút sau giao thức chuẩn. Sự cho ăn được phục hồi 24 giờ sau khi thách thức. Cá thách thức được giám sát ở mỗi thùng trong mười lăm ngày. Cá chết biểu lộ các dấu hiệu tiêu biểu là bệnh trắng đuôi, bao gồm chứng uốn cột sống và tổn thương ở mang, được loại bỏ hai lần mỗi ngày và nuôi cấy như nêu trên để phân lập lại và khẳng định *F. columnare* là nguyên nhân cái chết. *F. columnare* được thu hồi từ tất cả các con cá chết.

Tỷ lệ chết tích lũy quan sát được ở cá ngựa vằn được giả tiêm chủng vacxin sau 15 ngày sau khi thách thức là 88,1%, cao hơn đáng kể ($p < 0,05$) khi so sánh với tỷ lệ chết tích lũy là 63,1% ở cá được tiêm chủng vacxin bằng biến thể giống II (17-23) (Bảng 1). Các tỷ lệ chết tích lũy 63,1 và 70,2% quan sát được trong cá được tiêm chủng vacxin bằng cả hai biến thể giống II 17-23 và 16-534, tương ứng, thấp hơn 81,0% quan sát được ở cá được tiêm chủng vacxin bằng biến thể giống I của vacxin thương mại (FCRR) (FIG. 1). Mặc dù cả hai biến thể giống II dẫn đến tỷ lệ chết tích lũy thấp hơn biến thể giống I của vacxin thương mại, chỉ 17-23 thể hiện tỷ lệ chết tích lũy thấp hơn FCRR đáng kể, đề xuất là các biến thể giống II 9 mới này tạo ra sự bảo vệ cao hơn cho cá ngựa vằn chống lại chủng *F. columnare* kiểu đại độc so với được tạo ra bởi biến thể giống I. Phần trăm sống sót tương ứng (relative percent survival - RPS) là 28,4, 20,3 và 8,1% ở cá được tiêm chủng vacxin bằng 17-23, 16-534 và FCRR, tương ứng (Bảng 1). Sau khi thách thức, tất cả cá chết được khẳng định dương tính với *F. columnare* là nguyên nhân cái chết bằng nuôi cấy.

Bảng 1. Tỷ lệ chết tích lũy (giá trị trung bình $\pm$ S.E.) và phần trăm sống sót tương ứng của cá ngựa vằn được tiêm chủng vacxin sau khi thách thức ngâm với chủng *F.*

columnare độc ở 28 dpv (lần thử 1). Trong cột, các chữ cái viết bên trên khác nhau cho thấy sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$).

Vaccin	Lộ trình tiêm chủng vaccin	Liều vaccin	Chủng và liều thách thức	Số lượng chết/được thách thức	Tỷ lệ chết (%) $\pm$ SE	RBS ^b (%)
17-23	DI ^a	$7,8 \times 10^6$ CFU/mL	BGFS-27 (Giống II) $6,4 \times 10^6$ CFU/mL	53/84	$63,1 \pm 0,38^A$	28,4
16-534	DI ^a	$1,5 \times 10^6$ CFU/mL		59/84	$70,2 \pm 0,87^{AB}$	20,3
FCRR	DI ^a	$9,1 \times 10^6$ CFU/mL		68/84	$81,0 \pm 0,32^{AB}$	8,1
Đối chứng	DI ^a	Giả tiêm chủng vaccin		74/84	$88,1 \pm 1,8^B$	-

^a DI, ngâm trực tiếp

^b RPS, phần trăm sống sót tương ứng

Ví dụ 2 – Tiêm chủng vaccin ở cá trê sông con và thách thức

Tổng 420 con cá trê sông con được tiêm chủng vaccin bằng DI như nêu trên ngoại trừ chỉ sử dụng vaccin thực nghiệm 17-23 và FCRR ở các nồng độ là $6,7 \times 10^4$ và $5,7 \times 10^7$ CFU/mL⁻¹, tương ứng trong 30 phút. Nhóm đối chứng được giả tiêm chủng vaccin bằng cách ngâm trong canh Shieh được điều biến vô trùng và phơi nhiễm với cùng quy trình và cùng điều kiện môi trường với cá được tiêm chủng vaccin ngoại trừ việc bổ sung thành phần vaccin chủ động. Ba lần điều trị/bốn lần nhắc lại mỗi con. Sau khi tiêm chủng vaccin, cá con được tiêm chủng vaccin hoặc giả tiêm chủng vaccin ở mỗi nhóm điều trị được thay thế trở lại hồ giữ chúng và được cho ăn 2-3 lần hàng ngày với ~3-4 phần trăm trọng lượng cơ thể 7 mỗi ngày cho đến thời điểm thách thức. Các điều kiện thách thức là giống như điều kiện ở Lần thử 1, vắn tắt là, ở 28 dpv, cá trong mỗi thùng được thách thức ngâm trong bể 2L chứa chủng *F. columnare* rất độc (ALG-530, giống II) ở nồng độ là $9,3 \times 10^6$

CFU/mL¹ trong 30 phút. Sự cho ăn được phục hồi 24 giờ sau khi thách thức. Cá thách thức được giám sát trong mỗi thùng trong 15 ngày. Cá chết biểu lộ các dấu hiệu tiêu biểu là bệnh trắng đuôi, bao gồm chứng ươn cột sống và tổn thương ở mang, được loại bỏ hai lần mỗi ngày và được nuôi cấy như nêu trên đây để phân lập lại và khẳng định *F. columnare* là nguyên nhân cái chết. *F. columnare* được thu hồi từ tất cả các con cá chết.

Tương tự, khi cá trê con tiêm chủng vaccin thách thức với *F. columnare* ALG- 530 ở 28 dpv, các giá trị tỷ lệ chết tích lũy sau 15 ngày sau khi thách thức là 43,6, 54,3 và 61,4% ở cá da trơn được tiêm chủng vaccin bằng 17-23, FCRR và được giả tiêm chủng vaccin, tương ứng (Bảng 2). Tỷ lệ chết tích lũy quan sát được ở cá con được giả tiêm chủng vaccin cao hơn đáng kể ($P < 0,05$) tỷ lệ chết tích lũy của cá được tiêm chủng vaccin bằng biến thể giống II (17-23) (FIG. 2). Các giá trị RPS là 29,0 và 11,6% trong cá được tiêm chủng vaccin bằng 17-23 và FCRR, tương ứng (Bảng 2).

Bảng 2. Tỷ lệ chết tích lũy và phần trăm sống sót tương ứng của cá trê sông con được tiêm chủng vaccin sau khi thách thức ngâm bằng chủng *F. columnare* độc ở 28 dpv (lần thử 2). Trong cột, các chữ cái viết bên trên khác nhau thể hiện sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$).

Vaccin	Lộ trình tiêm chủng vaccin	Liều vaccin	Chủng và liều thách thức	Số lượng chết/được thách thức	Tỷ lệ chết (%) $\pm$ SE	RBS ^b (%)
17-23	DI ^a	$6,7 \times 10^6$ CFU/mL	ALG-30 (Giống II) $9,3 \times 10^6$ CFU/mL	61/140	$43,6 \pm 1,62^A$	29,0
FCRR	DI ^a	$5,7 \times 10^6$ CFU/mL		76/140	$54,3 \pm 0,86^{AB}$	11,6
Đối chứng	DI ^a	Giả tiêm chủng vaccin		86/140	$61,4 \pm 0,28^B$	-

^a DI, ngâm trực tiếp

^b RPS, phần trăm sống sót tương ứng

Bảng 3. Phần trăm tỷ lệ chết tích lũy và RPS của cá trê sông con được tiêm chủng sau thách thức ngâm bằng các chủng *F. columnare* độc hoặc là giống I (ARS-1, liều thách thức là $9,8 \times 10^6$ CFU/ml) hoặc là giống II (BGFS-27, liều thách thức là $7,6 \times 10^6$ CFU/ml) ở 28 dpv (Thực nghiệm 2). Trong cột, các chữ cái viết bên trên khác nhau thể hiện sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$).

Chủng được cải biến	Liều vaccin (CFU/ml)	Chủng thách thức	Phần trăm tỷ lệ chết tích lũy (giá trị trung bình $\pm$ SE)	RPS
17-23	$6,5 \times 10^6$ CFU/mL	ARS-1 ^a	$1,5 \pm 0,01^a$	90,9
		BGFS-27 ^b	$41,5 \pm 0,08^b$	37,0
FCRR	$5,3 \times 10^6$ CFU/mL	ARS-1 ^a	$4,5 \pm 0,01^a$	72,7
		BGFS-27 ^b	$63,0 \pm 0,05^c$	4,4
Đối chứng	-	ARS-1 ^a	$16,5 \pm 0,03^a$	-
		BGFS-27 ^b	$65,9 \pm 0,03^c$	-

^a giống I *F. columnare*

^b giống II *F. columnare*

^c RPS, phần trăm sống sót tương ứng

Ví dụ 3 – Tiêm chủng vaccin ở cá rô phi sông Nile và thách thức

Tổng 510 con cá giống loài cá rô phi sông Nile được phân bố vào ba nhóm xử lý, 170 con cá được sử dụng trong mỗi nhóm (17 con mỗi bể cá, mười lần làm lại thí nghiệm). Cá rô phi được tiêm chủng vaccin bằng DI như nêu trong Ví dụ 2, sử dụng vaccin thử nghiệm 17-23 và FCRR ở các nồng độ là $2,2 \times 10^6$ và $7,3 \times 10^6$ CFU/mL⁻¹, tương ứng trong 30 phút. Nhóm đối chứng được giả tiêm chủng vaccin bằng cách ngâm trong canh MS vô trùng và phơi nhiễm với cùng quy trình và cùng điều kiện môi trường như cá được tiêm chủng vaccin ngoại trừ việc bổ sung thành

phần vacxin chủ động. Hỗn dịch vacxin là hai lít nước + 20 mL giống cấy đột biến tương ứng hoặc MS vô trùng cho cá đối chứng. Sau khi tiêm chủng vacxin, cá ở mỗi nhóm xử lý được tách ra khỏi bể vacxin, thay thế trở lại hồ giữ chúng ban đầu theo nhóm xử lý tương ứng của chúng cho đến ngày thách thức, và được cho ăn hàng ngày với 3% trọng lượng cơ thể. Ở 28 dpv, cá ở mỗi nhóm xử lý được chia thành 2 nhóm, 5 lần làm lại thí nghiệm/mỗi hồ cá. Cá ở mỗi nhóm được thách thức ngâm trong bể chứa hoặc là chủng *F. columnare* (BGFS- 27, giống II) hoặc (ARS-1, giống I) với nồng độ là $2,7 \times 10^6$ hoặc $5,5 \times 10^6$ CFU/mL⁻¹, tương ứng trong 30 phút. Việc cho ăn được phục hồi 24 h sau khi thách thức. Cá đã thách thức được giám sát trong mười lăm ngày sau khi thách thức và tỷ lệ chết được ghi lại hàng ngày. Cá chết được tách ra hai lần mỗi ngày và được nuôi cấy để khẳng định sự có mặt hoặc vắng mặt của *F. columnare* trong cá chết là nguyên nhân cái chết. Giống cấy vi khuẩn có nguồn gốc từ da và các mô ở mang và được cấy thành vạch vào đĩa thạch agar tobramycin MS. Kết quả của thách thức được đưa ra dưới dạng RPS.

Khi cá rô phi sông Nile được tiêm chủng vacxin bằng 17-23, FCRR hoặc được giả tiêm chủng vacxin được thách thức bằng BGFS-27, giống II *F. columnare*, ở 28 dpv, tỷ lệ chết tích lũy là 11,8, 55,3 hoặc 65,9% tương ứng (Bảng 4). Trong khi tỷ lệ chết tích lũy là 8,2, 15,3 hoặc 62,4% khi cá rô phi được tiêm chủng vacxin bằng 17-23, FCRR hoặc được giả tiêm chủng vacxin tương ứng, thách thức bằng ARS-1, giống I *F. columnare*, ở 28 dpv. Tỷ lệ chết tích lũy quan sát được với cá được giả tiêm chủng vacxin được thách thức với giống và tỷ lệ chết tích lũy quan sát được ở cá được tiêm chủng vacxin bằng FCRR thách thức bằng BGFS-27, giống II, cao hơn đáng kể ($p < 0,05$) tỷ lệ chết tích lũy quan sát được với cá được tiêm chủng vacxin bằng 17-23 thách thức với giống và tỷ lệ chết tích lũy quan sát được với cá được tiêm chủng vacxin bằng FCRR thách thức với ARS-1, giống I (Bảng 3). Tỷ lệ chết tích lũy của cá đột biến giống II được tiêm chủng vacxin thấp hơn đáng kể ($P < 0,05$) tỷ lệ của cá được giả tiêm chủng vacxin MS (FIG. 3), đề xuất là đột biến này tạo ra sự bảo vệ đáng kể cho cá rô phi sông Nile chống lại chủng *F. columnare* độc kiểu dại. Sau 15 ngày sau khi thách thức, các giá trị RPS là 82,1 và 16,1% quan sát được ở cá rô phi sông Nile được tiêm chủng vacxin bằng 17-23 và 10 FCRR, tương ứng,

khi cá được thách thức ở 28 dpv bằng BGFS-27, chủng giống II của *F. columnare* (Bảng 2). Tuy nhiên, khi cá được tiêm chủng vaccin bằng 17-23 và FCRR được thách thức với ARS-1, chủng giống I của *F. columnare* ở 28 dpv, các giá trị RPS là 86,9 và 75,5%, tương ứng (Bảng 3). *F. columnare* được phân lập lại từ da và mang của cá chết. Tương tự với kết quả của lần thử 1 và 2, việc tiêm chủng vaccin của cá rô phi sông Nile bằng vaccin/giống II được cải biến, 17-23, trao việc bảo vệ chống lại chủng *F. columnare* độc của cả hai giống (I và II) như tiết lộ bởi các khác biệt đáng kể trong tỷ lệ chết tích lũy giữa các nhóm xử lý (FIG. 3).

Bảng 4. Tỷ lệ chết tích lũy và phần trăm sống tương ứng của cá con rô phi sông Nile được tiêm chủng vaccin theo cách ngâm sau khi thách thức ngâm với chủng *F. columnare* giống I hoặc giống II tại 28 dpv (lần thử 3). Trong cột, các chữ cái viết bên trên khác nhau thể hiện sự khác biệt đáng kể ($p < 0,05$).

Vaccin	Liều vaccin	Chủng thách thức	Liều thách thức	Số lượng chết/được thách thức	Tỷ lệ chết (%) $\pm$ SE	RBS ^b (%)
17-23	$2,2 \times 10^6$ CFU/mL	ARS-1 ^a	$5,5 \times 10^6$ CFU/mL	7/85	$8,2 \pm 0,63^A$	86,9
		BGFS-27 ^b	$2,7 \times 10^6$ CFU/mL	10/85	$11,8 \pm 1,58^A$	82,1
FCRR	$7,3 \times 10^6$ CFU/mL	ARS-1 ^a	$5,5 \times 10^6$ CFU/mL	13/85	$15,3 \pm 1,2^A$	75,5
		BGFS-27 ^b	$2,7 \times 10^6$ CFU/mL	47/85	$55,3 \pm 0,36^B$	16,1
Đối chứng	Tiêm chủng vaccin giả	ARS-1 ^a	$5,5 \times 10^6$ CFU/mL	53/85	$62,4 \pm 0,85^B$	-
		BGFS-27 ^b	$2,7 \times 10^6$ CFU/mL	56/85	$65,9 \pm 0,47^B$	-

^a *F. columnare* giống I

^b *F. columnare* giống II

^c RPS, phần trăm sống sót tương ứng

Ví dụ 4 - Thử nghiệm bám dính

Cá (~ 4 g cá rô phi x 30 con cá mỗi liều) được tiếp xúc với hai liều vaccin: $1,7 \times 10^4$ CFU/ml và $1,7 \times 10^6$ trong 30 phút (tiếp xúc được tiến hành theo các giao thức thách thức được mô tả trên đây). Các đoạn mang được lấy từ 3 con cá được chọn ngẫu nhiên ở 30 phút sau khi ngâm trong bể vaccin, và 6 và 24 giờ sau khi ngâm (cá đã được chuyển từ bể vaccin tới thùng ban đầu của chúng sau 30 phút tiếp xúc). Ba mẫu (1 mẫu = 3 con cá) được phân tích theo thời gian lấy mẫu. Mô ở mang được cân và pha loãng trong 500 μ l canh MS, đồng nhất với chất đồng hóa mô cầm tay, và được pha loãng liên tiếp trong canh MS. Từ mỗi mẫu pha loãng, 100 μ l được đặt lên đĩa thạch 3 MS, và ủ trong 48 giờ ở nhiệt độ 28°C. Các khuẩn lạc được đếm, và CFU/mg trung bình được thể hiện trên FIG. 5. Theo đồ thị, đã có đáp ứng liều ở 30 phút sau khi ngâm, và vaccin đã được thu hồi từ các liều cao ở 6 giờ, nhưng chỉ có một vài tế bào được thu hồi từ liều 10^6 CFU/ml ở 24 giờ. Với mỗi giao thức đếm, ít hơn 30 khuẩn lạc mỗi tấm được chú thích là "không".

Thảo luận

Vaccin thương mại AQUAVAC-COL™ có đột biến kháng rifampixin không độc hại của *F. columnare* giống I (tương đối ít độc so với giống II). Như được bộc lộ trong bản mô tả này, hiệu quả của các chủng *F. columnare* giống II đột biến được giảm độc lực mới (17-23 và 16-534), và các vaccin thương mại, được đánh giá ở ba loài cá khác nhau. Kết quả cho thấy các chủng được giảm độc lực an toàn và tạo khả năng miễn dịch bảo vệ (khác nhau giữa các loài cá) đối với thách thức sau đó. Ví dụ, tiêm chủng vaccin của cá ngựa vằn với 17-23, 16-534 và FCRR ở nồng độ $7,8 \times 10^6$, $1,5 \times 10^6$ và $9,1 \times 10^6$ CFUml⁻¹, tương ứng, dẫn đến tỷ lệ chết tích lũy 63,1%, 70,2% và 81,0% và 28,4 %, 20,3% và 8,1%, RPS, tương ứng, sau thách thức với BGFS-27 (giống II) tại 28 dpv. Chủng 17-23 thực hiện tốt hơn đáng kể so với vaccin thương mại.

Kết luận tổng quát

Khi cá đã được thách thức với BGFS-27, giá trị tỷ lệ chết tích lũy là 11,8, 55,3 và 65,9% cho 17-23, FCRR và đối chứng, tương ứng và giá trị RPS là 82,1 và

16,1% cho 17-23 và FCRR, tương ứng. Mặc dù, khi cá đã được thách thức với ARS-1, giá trị tỷ lệ chết tích lũy là 8,2, 15,3 và 62,4% cho 17-23, FCRR và đối chứng, tương ứng và giá trị RPS là 86,9 và 75,5% cho 17-23 và FCR, tương ứng. Nhìn chung, kết quả chứng minh rằng vacxin thử nghiệm vượt trội so với 17-23 FCRR trong việc bảo vệ cá đối với thách thức sau đó với các chủng có độc cao của *F. columnare*, và chỉ ra rằng việc sử dụng các biến thể giống II dưới dạng vacxin điều biến sống tiềm năng là an toàn và kích thích bảo vệ tốt hơn chống lại bệnh trắng đuôi so với việc sử dụng các biến thể giống I.

Như được mô tả chi tiết trong các phương án được ưu tiên của sáng chế, phải hiểu rằng sáng chế được xác định bởi các đoạn trên đây không bị giới hạn bởi các chi tiết cụ thể được quy định trong phần mô tả trên đây do có nhiều biến thể rõ ràng và không rời khỏi phạm vi của sáng chế.

Tài liệu tham khảo

- [1] Wagner BA et al. The epidemiology of bacterial diseases in food-size channel catfish. *Journal of Aquatic Animal Health* 2002; 14(4):263- 72.
- [2] Austin B, Austin DA. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish: Springer Verlag, 1999.
- [3] Bader JA et al. Rapid detection of columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with a new species-specific 16-S rARN gene-based PCR primer for *Flavobacterium columnare*. *Journal of Microbiological Methods* 2003;52(2):209-20.
- [4] Thomas-Jinu S, Goodwin A. Morphological and genetic characteristics of *Flavobacterium columnare* isolates: correlations with virulence in fish. *Journal of Fish Diseases* 2004;27(1):29-35.

- [5] Schachte JH. Columnaris disease. A guide to integrated fish health management in the Great Lakes basin Great Lakes Fishery Commission, Special Publication 1983(83-2): 199-203.
- [6] Plumb JA. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes: Iowa State University Press, Ames, IA, 1999.
- [7] MSU. 2010 Annual Case Summary Report, Aquatic Research and Diagnostic Laboratory, Mississippi State University, Stoneville, MS. tcnwac.msstate.edu/cvm2010.pdf.
- [8] Khoo L. Annual fish diagnostic laboratory report for 2000. NWAC News 2001;4(1):6-7.
- [9] Griffin B. Columnaris disease: recent advances in research. Aquacult. '87; 13:48-50.
- [10] Bondad-Reantaso MG et al. Disease and health management in Asian aquaculture. Veterinary Parasitology 2005; 132(3):249-72.
- [11] Evensen O. Development in fish vaccinology with focus on delivery methodologies, adjuvants and formulations. Options Mediterraneennes 2009; 86: 177-86.
- [12] Arias CR et al. Genetic fingerprinting of *Flavobacterium columnare* isolates from cultured fish. Journal of Applied Microbiology 2004; 97(2) :421-8.
- [13] Darwish AM, Ismaiel AA. Genetic diversity of *Flavobacterium columnare* examined by restriction fragment length polymorphism and sequencing of the 16S ribosomal RNA gene and the 16S-23S rDNA spacer. Molecular and Cellular Probes 2005; 19(4):267-74.

- [14] Shoemaker CA et al. *Flavobacterium columnare* genomovar influences mortality in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Veterinary Microbiology 2008 Mar; 127(3-4):353-9.
- [15] Triyanto A, Wakabayashi H. Genotypic diversity of strains of *Flavobacterium columnare* from diseased fishes. Fish Pathology 1999;34:65-71.
- [16] Olivares-Fuster O, Bullard SA, McElwain A, Llosa MJ, Arias CR. Adhesion dynamics of *Flavobacterium columnare* to channel catfish *Ictalurus punctatus* and 15 zebrafish *Dania rerio* after immersion challenge. Diseases of Aquatic Organisms 2011; 96(3):221.
- [17] Klesius PH, Shoemaker CA. Development and use of modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccin against enteric septicemia of catfish. Advances in Veterinary Medicine 1999;41 :523-37.
- [18] Shoemaker CA et al. Immunization of eyed channel catfish, *Ictalurus punctatus*, eggs với monovalent *Flavobacterium columnare* vaccin and bivalent *F. columnare* and *Edwardsiella ictaluri* vaccine. Vaccine 2007; 25(6): 1126-31.
- [19] Schurig GG et al. Biological properties of RB51; a stable rough strain of *Brucella abortus*. Veterinary Microbiology 1991; 28(2): 171-88.
- [20] Olivares-Fuster O, Arias CR. Development and characterization of rifampicin resistant mutants from high virulent strains of *Flavobacterium columnare*. Journal of Fish Diseases 2011 May; 34(5):385-94.
- [21] Decostere A et al. Shieh medium supplemented với tobramycin for selective isolation of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) from diseased fish. Journal of clinical microbiology 1997; 35(1):322-4.
- [22] Amend DF. Potency testing of fish vaccines. Fish biologies: serodiagnostics and vaccines 1981.

- [23] Klesius PH et al. *Flavobacterium columnare* chemotaxis to channel catfish mucus. *Ferns Microbiology Letters* 2008 Nov; 288(2):216-20.
- [24] Kirkland S. Evaluation of the Live-Attenuated Vaccine AquaVac-COL® on Hybrid Channel x Blue Catfish Fingerlings in Earthen Ponds: Auburn University; 2010.
- [25] McCallum N et al. In vivo survival of teicoplanin-resistant *Staphylococcus aureus* and fitness cost of teicoplanin resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2006;50(7):2352- 60.
- [26] Shoemaker CA et al. *Flavobacterium columnare* genomovar influences mortality in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Veterinary Microbiology* 2008; 127 353-9.
- [27] Olivares-Fuster O et al. Host-specific association between *Flavobacterium columnare* genomovars and fish species. *Systematic & Applied Microb.* 2007;30(8):624-33.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng *Flavobacterium* spp. được giảm độc lực thích hợp để dùng làm thành phần hoạt tính của chế phẩm miễn dịch an toàn và hiệu quả, thích hợp để kích thích đáp ứng miễn dịch chống lại ít nhất một *Flavobacterium* spp. độc ở cá, trong đó chủng này được chọn từ nhóm bao gồm chủng 17-23 được nộp lưu dưới tên CECT 7737, và chủng 16-534 được nộp lưu dưới tên CECT 7736.
2. Chế phẩm miễn dịch an toàn và hiệu quả chứa ít nhất một chủng được giảm độc lực giống II *Flavobacterium* spp., trong đó chủng được giảm độc lực này kháng rifampixin, và trong đó chủng được giảm độc lực này có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch ở cá chống lại sự phơi nhiễm tự nhiên, hoặc thách thức thử nghiệm sau đó với, ít nhất một chủng *Flavobacterium* spp. độc, trong đó chủng được giảm độc lực này được chọn từ nhóm bao gồm chủng 17-23 được nộp lưu dưới tên CECT 7737, và chủng 16-534 được nộp lưu dưới tên CECT 7736.
3. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó chế phẩm này là chế phẩm vaccin, có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở cá chống lại sự phơi nhiễm tự nhiên, hoặc thách thức thử nghiệm sau đó với, ít nhất một chủng *Flavobacterium* spp. độc.
4. Chế phẩm theo điểm 2, còn chứa chất mang chấp nhận được trong thú y hoặc về mặt dược học.
5. Chế phẩm theo điểm 2, còn chứa chất đệm ổn định.
6. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó chất đệm ổn định này chứa:
 - a. FeSO_4 ;
 - b. CaCl_2 ;
 - c. KH_2PO_4 ; và
 - d. MgSO_4 .

7. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó chất đệm ổn định này chứa:

- a. khoảng $0,4\mu\text{M}$ FeSO_4 ;
- b. khoảng $4,6\mu\text{M}$ CaCl_2 ;
- c. khoảng $100\mu\text{M}$ KH_2PO_4 ; và
- d. khoảng $120\mu\text{M}$ MgSO_4 .

8. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó chất đệm này ổn định chế phẩm trong ít nhất khoảng hai tháng khi chế phẩm này được bảo quản ở nhiệt độ môi trường.

9. Phương pháp sản xuất chế phẩm theo điểm 5 chứa chất đệm ổn định, phương pháp này bao gồm bước tạo huyền phù lại ít nhất một chủng *Flavobacterium* spp. được giảm độc lực trong chất đệm ổn định.

10. Phương pháp theo điểm 9, bao gồm các bước:

- a. phát triển chủng *Flavobacterium* spp. được giảm độc lực trong môi trường và tạo viên chủng *Flavobacterium* spp. bằng cách ly tâm ở tốc độ khoảng 5000 vòng/phút trong 5 phút;
- b. loại bỏ môi trường;
- c. tạo huyền phù lại chủng *Flavobacterium* spp. trong chất đệm ổn định;
- d. chuyển các tế bào đã được tạo huyền phù lại vào thùng chứa vô trùng, bằng cách đó tạo ra chế phẩm chứa chất đệm ổn định.

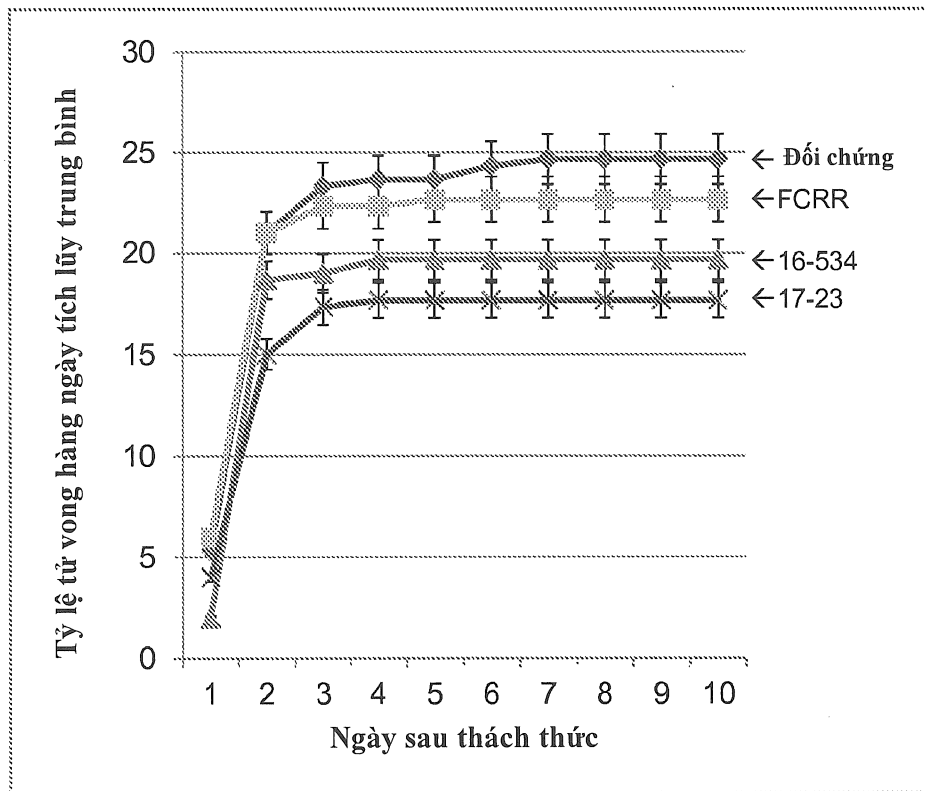


FIG. 1

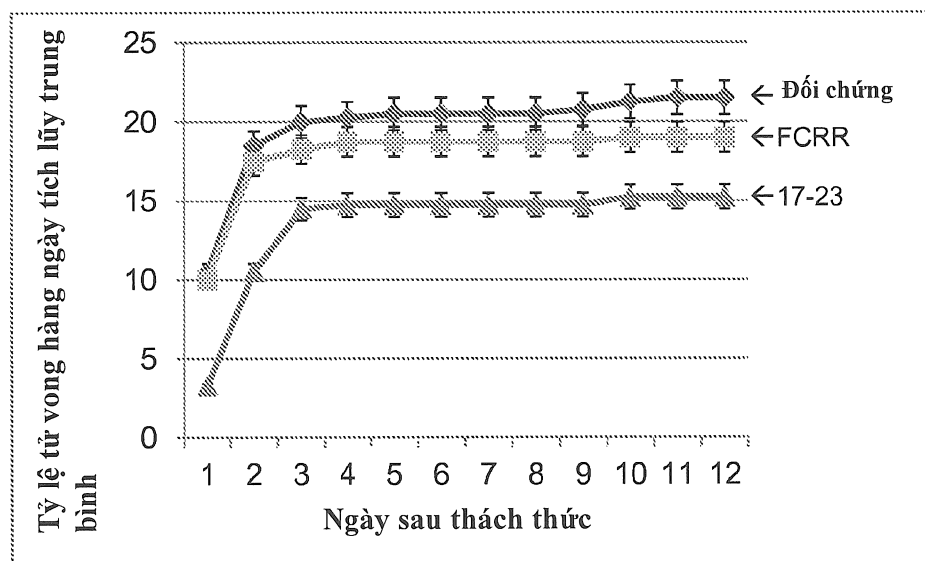


FIG. 2

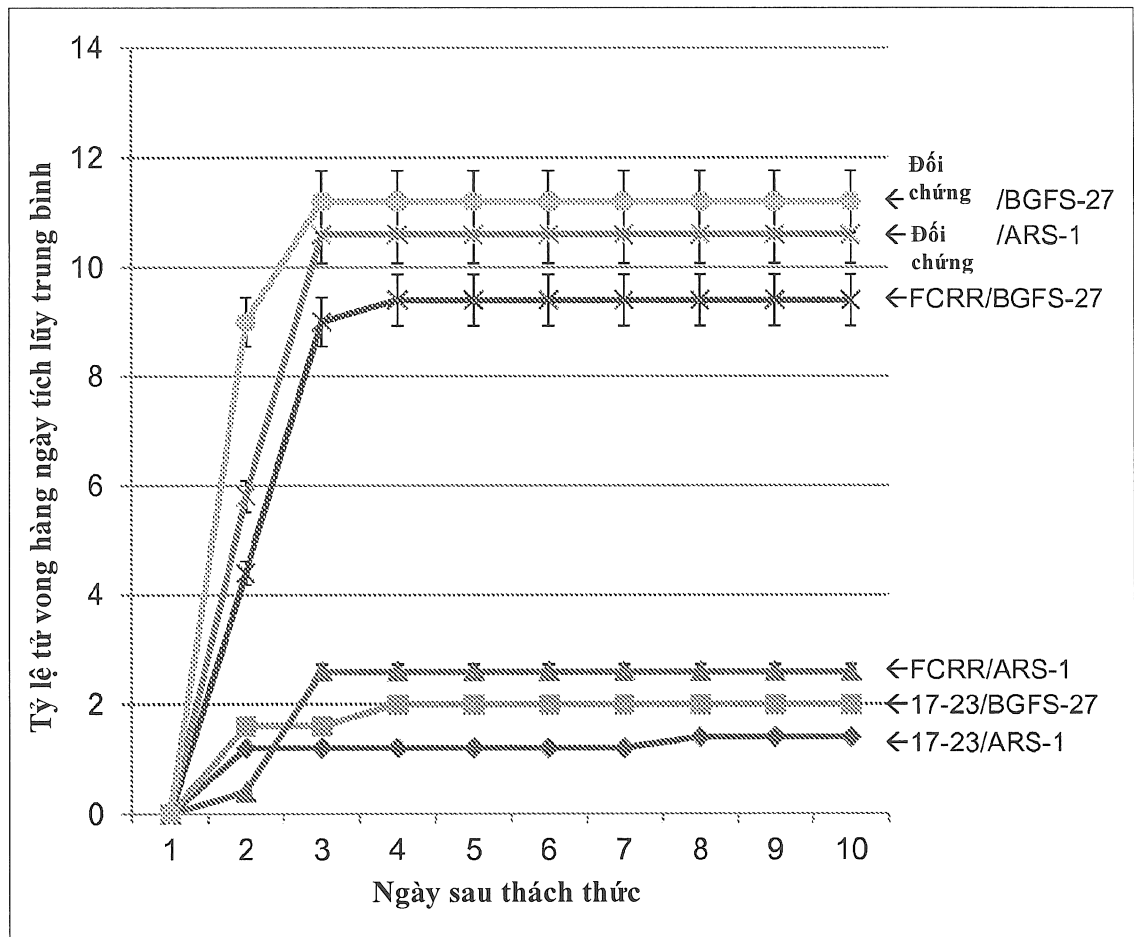
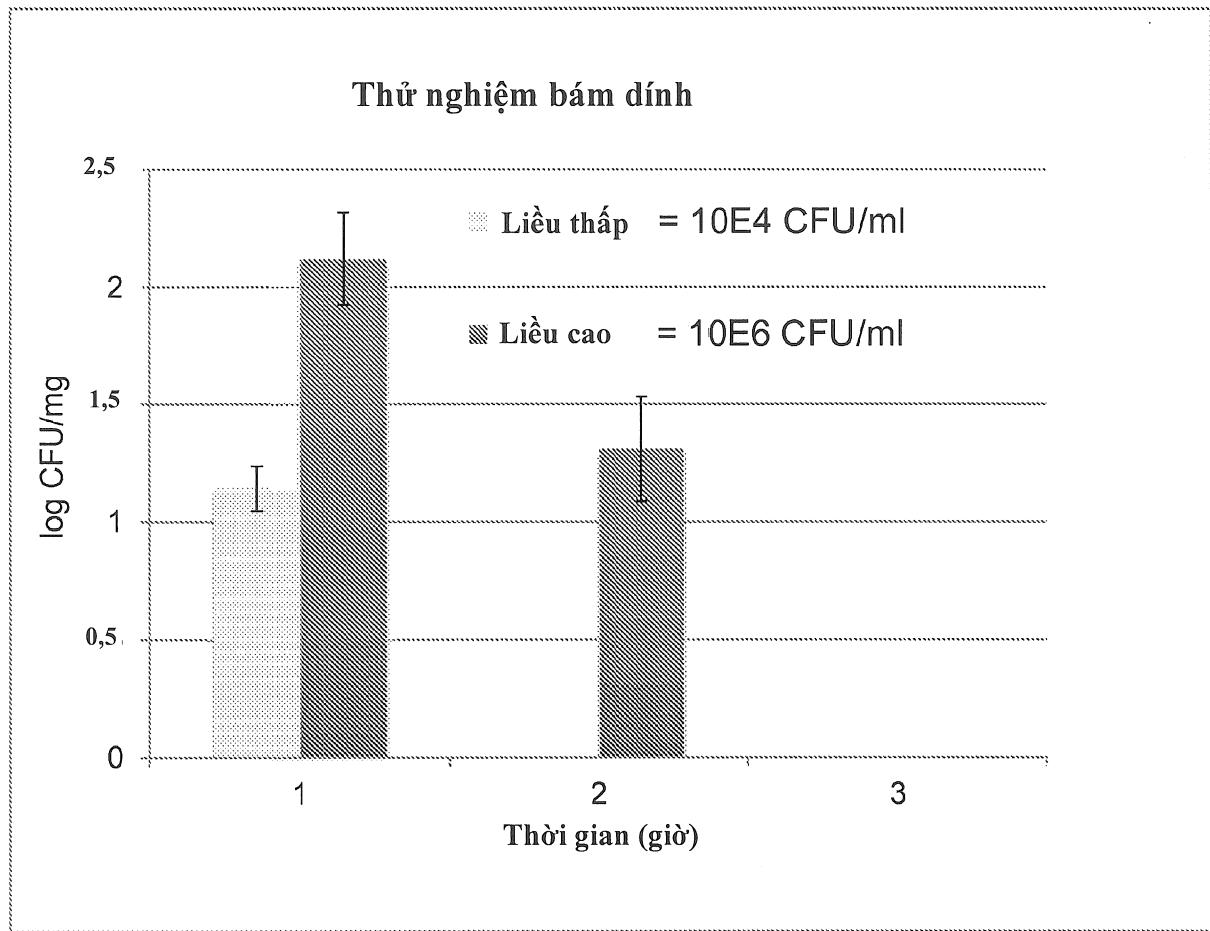


FIG. 3



FIG. 4

*FIG. 5*