(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

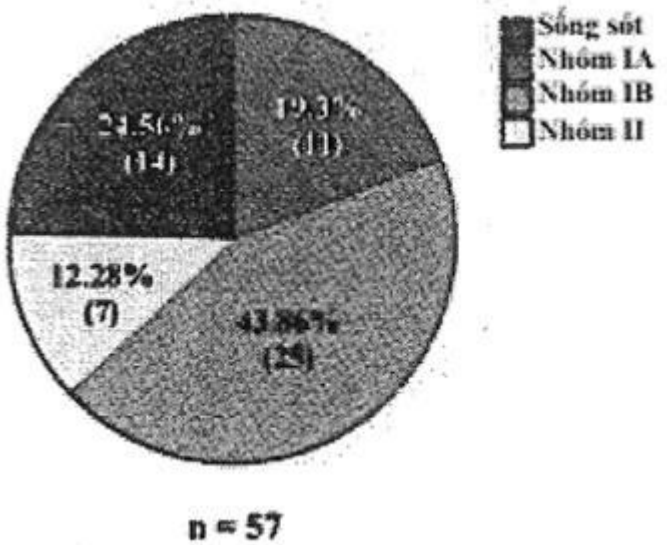
(11) **1-0037344**

(51)[8] **A01K 67/027**; G01N 33/15; C12N 7/00 (13) **B**

(21) 1-2017-03328 (22) 25/01/2016
(86) PCT/SG2016/050031 25/01/2016 (87) WO 2016/122403 04/08/2016
(30) 62/108,828 28/01/2015 US; 62/114,880 11/02/2015 US
(45) 27/11/2023 428 (43) 25/01/2018 358A
(73) TEMASEK LIFE SCIENCES LABORATORY LIMITED (SG)
1 Research Link, National University of Singapore, Singapore 117604, Singapore
(72) CHUA, Kaw Bing (MY).
(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) MẪU ĐỘNG VẬT ĐƯỢC LÂY NHIỄM THẦN KINH VIRUT ENTERO 71 VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT MẪU ĐỘNG VẬT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến mẫu động vật được lây nhiễm thần kinh virut entero 71 và phương pháp sản xuất sản xuất mẫu động vật này. Mẫu động vật được lây nhiễm thần kinh virut entero 71 theo sáng chế bao gồm chuột nhắt lên đến bốn tuần tuổi đã được lây nhiễm ở thời điểm giữa một tuần và hai tuần tuổi bằng virut entero 71 được cải biến để lây nhiễm chuột nhắt này, trong đó chuột nhắt này được lây nhiễm bằng cách tiêm liều lây nhiễm chủng tế bào trung nằm trong khoảng từ 10^5 đến 10^6 virut entero 71 được cải biến vào khoang màng bụng hoặc mô cơ, trong đó virut entero 71 được cải biến này là *EV71:TLLmv*, mà (a) được lưu giữ ở Ngân hàng giống và vi sinh vật Trung Quốc với mã lưu giữ là CCTCC V201438 hoặc (b) được thu nhận bằng phương pháp di truyền ngược cải tiến bao gồm bước tổng hợp ARN virut bằng cách sử dụng trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 và trong đó mẫu động vật này bị bệnh viêm não tủy cấp tính, tình trạng xuất huyết khu trú và có dịch protein trong phế nang phổi, nồng độ catecholamin trong huyết thanh cao và tổn thương mô rộng trong thân não, là dấu hiệu và triệu chứng của tình trạng phù phổi có nguồn gốc thần kinh.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến mẫu động vật được lây nhiễm thần kinh virut entero 71 (Enterovirus 71-EV71) và phương pháp sản xuất mẫu động vật này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các công bố và các tài liệu chuyên ngành khác dùng trong bản mô tả này để làm sáng tỏ tình trạng kỹ thuật của sáng chế, và cụ thể là các trường hợp để đưa ra chi tiết hơn liên quan đến thực tế, được đưa vào bản mô tả sáng chế này bằng cách viện dẫn, và để thuận tiện, được đưa ra dưới đây bởi tên tác giả và ngày và được liệt kê theo thứ tự bảng chữ cái theo tên tác giả trong danh mục gắn kèm.

Virut entero 71 là virut nhỏ không có vỏ bao có đường kính khoảng 30 nm. Vỏ capsit của virut có tính đối xứng nhị thập diện và bao gồm 60 đơn vị giống nhau (protome), với mỗi đơn vị được cấu thành bởi bốn protein cấu trúc virut VP1-VP4. Vỏ capsit bao quanh nhân là bộ gen ARN sợi đơn có nghĩa dương dài 7.450 nucleotit (nt). Bộ gen này chứa một khung đọc mở mà mã hóa polyprotein có 2193 axit amin (aa) và nằm bên sườn bởi vùng không được dịch mã (untranslated region - UTR) 5′ dài có 745 nt và UTR 3′ ngắn hơn có 85 nt với dải poly-A có chiều dài thay đổi ở đầu tận cùng 3′ của nó. Polyprotein được chia thành ba vùng, tức là P1, P2 và P3. P1 mã hóa bốn protein cấu trúc virut 1A-1D (VP4, VP2, VP3 và VP1); P2 và P3 mã hóa bảy protein không cấu trúc 2A-2C và 3A-3D [1-3]. Phân tích phát sinh loài về gen protein vỏ capsit chính (VP1) chia EV71 thành sáu kiểu gen (được ký hiệu bởi từ A đến F) [66], và kiểu gen B và C còn được chia nhỏ thành các kiểu gen phụ B1 đến B5 và C1 đến C5 [3].

EV71 gây ra một loạt bệnh lâm sàng bao gồm bệnh tay, chân và miệng (hand, foot and mouth disease - HFMD), bệnh viêm màng não vô trùng, bệnh viêm não và chứng liệt giống bệnh viêm tủy xám chủ yếu ở trẻ sơ sinh và trẻ nhỏ [4, 5]. Virut này đầu tiên đã được phân lập từ trẻ em bị bệnh viêm não cấp tính ở California, USA vào năm 1969, và tiếp theo đã được mô tả đặc điểm dưới dạng một kiểu huyết thanh mới của giống *Enterovirus* vào năm 1974 [6]. Vụ dịch HFMD có hoặc không có biến chứng thần kinh và các ca tử vong được báo cáo ở các vùng khác nhau trên thế giới [7-20]. Từ năm 1997, sự nhiễm EV71 đã trở thành gánh nặng sức khỏe cộng đồng chính và có lo ngại dịch tễ

học nhất định trong vùng châu Á-Thái Bình Dương. Vụ dịch HFMD do EV71 có tính độc não cao xuất hiện ở Malaysia gây ra 48 ca tử vong vào năm 1997 [21, 22], tiếp theo là vụ dịch lớn hơn xảy ra ở Đài Loan vào năm 1998 với hơn 129000 ca HFMD, 405 ca nhiễm nặng và 78 ca tử vong do bệnh viêm não tủy thân não cấp tính với sự suy tim và phù phổi có nguồn gốc thần kinh [23-26]. Ở Trung Quốc, 488.955 ca HFMD với 126 ca tử vong được ghi nhận vào năm 2008 [27] và đã tăng đến 1.155.525 ca với 353 ca tử vong vào năm 2009 [28]. Vào năm 2010, Trung Quốc đã trải qua dịch HFMD lớn nhất chưa từng có với hơn 1,7 triệu ca, 27000 bệnh nhân có biến chứng thần kinh nặng, và 905 ca tử vong [29].

Tương tự các virut entero khác của người, EV71 không thể nhiễm vào động vật không phải người, mặc dù khỉ nâu và khỉ cynomolgous có thể bị nhiễm trên thử nghiệm [30-32]. Điều này chủ yếu là do sự gắn kết không hiệu quả của EV71 với thụ thể của nó để tháo bỏ lớp vỏ và xâm nhập vào các tế bào của chuột nhắt, thụ thể này gần đây đã được nhận diện là protein thụ thể "thanh thải" nhóm B thành viên-2 (Scavenger Receptor Class B Member-2 - SCARB2) [47]. Các protein SCARB2 của người và chuột chỉ có độ đồng nhất trình tự axit amin là 84% và do đó, thể hiện mức độ khác biệt về cấu trúc đáng kể [49, 67], vì vậy sớm tạo ra sự không tương hợp virut-thụ thể làm cơ sở cho tính kháng tự nhiên của các tế bào không phải của người với sự nhiễm EV71. Ngay khi virut gắn thành công với thụ thể SCARB2 trên bề mặt tế bào và tháo bỏ lớp vỏ, đi vào trong tế bào chất, ARN virut được dịch mã, dẫn đến sự biểu hiện của các protein không cấu trúc khác nhau của virut. Tiếp theo, ARN virut được sao chép, được bao gói trong vỏ capsit, và được giải phóng vào môi trường tự do để nhiễm lại vào các tế bào khỏe mạnh.

Việc hiểu sinh bệnh học của nó và sự phát triển của các phép trị liệu đặc hiệu chống virut này bị cản trở bởi sự thiếu các mẫu động vật nhỏ thích hợp, do EV71 không thể nhiễm một cách tự nhiên vào các động vật gặm nhấm nhỏ. Nỗ lực để thiết lập mẫu chuột nhắt nhiễm và bị bệnh do EV71 gây ra đã được thực hiện, chủ yếu thông qua sự thích nghi của virut bằng cách cấy chuyển theo chuỗi vào chuột nhắt non còn bú [33-39]. Mặc dù một số mẫu có thể tóm lược các triệu chứng bệnh lâm sàng, nhưng không có mẫu nào được báo cáo là gây ra bệnh ở chuột nhắt có khả năng miễn dịch ở độ tuổi 2 tuần tuổi hoặc nhiều hơn. Hơn nữa, các dấu hiệu lâm sàng của bệnh và bệnh học của sự nhiễm EV71 ở người và khỉ thử nghiệm không thể được sao chép ở chuột nhắt, trừ chuột nhắt

AG129 không có thụ thể interferon bị suy giảm miễn dịch [35]. Gần đây hơn, chuột nhắt chuyển gen biểu hiện các protein PSGL-1 của người [68] và SCARB2 người [69, 70] đã có, nhưng chuột này chỉ thể hiện sự cải thiện cận biên về tính mẫn cảm với nhiễm EV71.

Các virut ARN, nhờ sự sao chép dễ bị sai của chúng và mức độ đột biến cao [40-42], sao chép dưới dạng một nhóm các trình tự biến thể có liên quan đã biết là *giả loài (quasispecies)* [43, 44]. Nó bao gồm loài chủ thể hiện mức độ thích ứng cao nhất trong môi trường nhất định, và có phổ đột biến hợp thành từ việc thu các trình tự đột biến có liên quan gần có sự phân bố xác suất nhất định [44, 45]. Điều này làm cho các virut ARN có tính mềm dẻo về bộ gen, mà được phản ánh ở khả năng của chúng thích ứng một cách nhanh chóng với sự thay đổi môi trường.

Cơ chế mà nhờ đó sự nhiễm EV71 gây ra bệnh thần kinh nguy hiểm đến tính mạng không được hiểu một cách đầy đủ, vì vậy một số nhóm nghiên cứu đã nỗ lực sao chép bệnh học của bệnh nhiễm trùng ở người trong các động vật thử nghiệm bao gồm khỉ nâu và khỉ cynomolgous [114-120], chuột nhắt phòng thí nghiệm [112, 121-129], và các động vật có vú khác [130-133]. Điều không may là không có mẫu nào trong số các mẫu này thể hiện phổ đầy đủ của các dấu hiệu thần kinh quan sát được trong trường hợp là người, đặc biệt là các dấu hiệu của bệnh viêm thân não cấp tính với tình trạng phù phổi có nguồn gốc thần kinh (neurogenic pulmonary edema - NPE) bạo phát [21, 22, 134-137]. Thực vậy, ngay cả trong các hệ thử nghiệm mà sao chép một cách chính xác hơn các dấu hiệu và các triệu chứng của bệnh nhiễm EV71 ở người, các cơ chế cơ sở hầu như là khác với các cơ chế gây bệnh ở người. Cho đến nay, không một mẫu động vật nào sao chép chắc chắn NPE do EV71 gây ra. Sự khác biệt then chốt là EV71 bị giới hạn ở các mô CNS ở người bệnh [92-94, 111], còn ở các mẫu động vật, virut cũng có thể được phát hiện trong các mô không phải thần kinh bao gồm cơ xương [33-36, 38, 98] và gan [119]. Trong khi cũng có các nỗ lực để tạo ra chuột nhắt chuyển gen mà biểu hiện các protein thụ thể EV71 của người PSGL-1 (phối tử glycoprotein P-selectin-1) và SCARB2 (thụ thể thanh thải S 66 nhóm B, thành viên 2) [68-70, 47, 138], không một mẫu nào trong số các mẫu này biểu hiện NPE, vì vậy, tính hữu ích của chúng để nhận diện các can thiệp mới đối với người bệnh bị hạn chế.

Không tồn tại mẫu động vật thích hợp để nghiên cứu sự nhiễm bệnh và tiến triển của bệnh ở các động vật được lây nhiễm EV71 hoặc có thể được sử dụng để sàng lọc các

hợp chất kháng virut hoặc các vacxin kháng virut. Việc phát triển mẫu động vật nhằm các mục đích này là điều mong muốn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề cập đến mẫu động vật được lây nhiễm thần kinh virut entero 71 và phương pháp sản xuất mẫu động vật này. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện chủng virut entero 71 (EV71) mà được làm thích ứng để nhiễm vào dòng tế bào của động vật gặm nhấm hoặc virut có nguồn gốc dòng vô tính virut entero 71 chứa các đột biến trong VP1 có thể gây bệnh ở động vật gặm nhấm có khả năng miễn dịch và động vật gặm nhấm bị suy giảm miễn dịch.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phương pháp phát triển mẫu đáng tin cậy trên lâm sàng của bệnh thần kinh do EV71 gây ra bằng cách lây nhiễm chuột nhắt BALB/c bằng chủng được cải biến (ví dụ, *EV71:TLLmv*) được làm thích ứng để nhiễm nguyên bào sợi NIH/3T3 của chuột nhắt. Bằng cách sử dụng phương pháp này, EV71 cải biến được sử dụng để gây ra bệnh viêm não tủy cấp tính kết hợp với tình trạng phù phổi có nguồn gốc thần kinh ở chuột nhắt, được đặc trưng bởi sưng phổi và tăng khối lượng cơ quan so với phổi được lây nhiễm giả. Mặc dù không có sự viêm mô phổi hoặc tim, sự xuất huyết khu trú và dịch có protein trong túi phổi, nồng độ catecholamin trong huyết thanh cao, và tổn thương mô sâu rộng trong thân não, đặc biệt là hành tủy não tủy đã quan sát được. Dữ liệu này chứng tỏ rằng mẫu này sao chép một cách chính xác các dấu hiệu và các triệu chứng của tình trạng phù phổi có nguồn gốc thần kinh do EV71 gây ra ở người.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến mẫu động vật bao gồm động vật gặm nhấm được lây nhiễm bởi virut entero 71 có khả năng lây nhiễm động vật gặm nhấm này, trong bản mô tả này đôi khi còn được gọi là virut entero 71 cải biến. Theo một phương án, virut entero 71 này là virut entero 71 được làm thích ứng với dòng tế bào của động vật gặm nhấm. Theo một phương án khác, virut entero 71 này là virut có nguồn gốc dòng vô tính (clone derived virus - CDV) chứa các đột biến trong VP1. Theo một số phương án, các đột biến trong VP1 cho phép CDV sử dụng các protein SCARB2 của động vật gặm nhấm để lây nhiễm các tế bào động vật gặm nhấm. Theo một phương án, động vật gặm nhấm này là động vật gặm nhấm có khả năng miễn dịch. Theo một phương án khác, động vật gặm nhấm này là động vật gặm nhấm bị suy giảm miễn dịch. Tốt hơn là, các động vật thích hợp để sử dụng làm mẫu là động vật có vú, tốt nhất là động vật thí

nghiệm thích hợp như thỏ, chuột cống, chuột nhắt, và các động vật tương tự. Theo một phương án, động vật này là chuột nhắt. Theo một số phương án, chuột nhắt này là chuột nhắt BALB/c. Theo một phương án khác, dòng tế bào của động vật gặm nhấm là dòng tế bào của chuột nhắt. Theo một phương án khác, dòng tế bào của chuột nhắt này là dòng tế bào NIH/3T3 của chuột nhắt. Theo một phương án khác, dòng tế bào của chuột nhắt này là dòng tế bào Neuro-2a của chuột nhắt. Theo một phương án, virut entero 71 được làm thích ứng với dòng tế bào của động vật gặm nhấm là *EV71:TLLm*. Theo một phương án khác, virut entero 71 được làm thích ứng với dòng tế bào của động vật gặm nhấm là *EV71:TLLmv*. Theo một phương án, virut có nguồn gốc dòng vô tính chứa đột biến trong VP1 là $CDV{:}BS_{VP1}[K98E/E145A/L169F]$. Mẫu động vật này là hữu ích để nghiên cứu sự phân tán toàn thân của virut và phổ bệnh ở người trong các mẫu động vật. Mẫu động vật này cũng hữu ích để sàng lọc các dược chất và các vacxin kháng virut.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất mẫu động vật có phổ đầy đủ của sự nhiễm, bệnh và bệnh học thần kinh do EV71 gây ra quan sát được ở người. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc lây nhiễm động vật gặm nhấm được mô tả trong bản mô tả này bằng virut entero 71 cải biến được mô tả trong bản mô tả này và nuôi động vật gặm nhấm đã được lây nhiễm này trong thời gian lên đến khoảng 4 tuần. Theo một số phương án, tuổi của động vật gặm nhấm cần lây nhiễm nằm trong khoảng từ 1 tuần đến 4 tuần. Theo các phương án khác, động vật gặm nhấm đã được lây nhiễm được nuôi trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 tuần đến 4 tuần. Theo một số phương án, động vật gặm nhấm là chuột nhắt như được mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án khác, động vật gặm nhấm được lây nhiễm bằng cách tiêm virut entero 71 cải biến vào động vật gặm nhấm này. Theo một phương án, sự tiêm là tiêm trong màng bụng (intraperitoneal - I.P.). Theo một phương án khác, sự tiêm là tiêm trong cơ (intramuscular - I.M.). Theo một số phương án, liều virut được tiêm vào động vật gặm nhấm là liều lây nhiễm 50% tế bào (median cell culture infectious dose - $CCID_{50}$) nằm trong khoảng từ 10^3 đến 10^7.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp sàng lọc các dược chất kháng virut. Theo khía cạnh này, phương pháp này bao gồm các bước sau: cung cấp nhóm động vật thử nghiệm và nhóm động vật đối chứng trong đó các động vật trong mỗi nhóm là các động vật của mẫu động vật được mô tả trong bản mô tả này; cho nhóm thử nghiệm này dùng dược chất

kháng virut chọn lọc; giám sát tiến triển của bệnh trong nhóm thử nghiệm và nhóm đối chứng; so sánh tiến triển của bệnh trong nhóm thử nghiệm với tiến triển của bệnh trong nhóm đối chứng; và chọn lọc dược chất kháng virut chọn lọc mà làm giảm sự tiến triển của bệnh trong nhóm thử nghiệm so với nhóm đối chứng. Theo một phương án, dược chất kháng virut trước tiên được sàng lọc trong dòng tế bào của động vật gặm nhấm thử nghiệm đã được lây nhiễm virut entero 71 được làm thích ứng với dòng tế bào của động vật gặm nhấm trước khi sàng lọc ở các động vật. Theo một phương án khác, dược chất kháng virut trước tiên được sàng lọc trong dòng tế bào của động vật gặm nhấm thử nghiệm được lây nhiễm virut có nguồn gốc dòng vô tính (clone derived virus - CDV) chứa các đột biến trong VP1 trước khi sàng lọc ở các động vật.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp sàng lọc các vacxin kháng virut có hiệu quả. Theo khía cạnh này, phương pháp này bao gồm các bước sau: cung cấp nhóm động vật thử nghiệm và nhóm động vật đối chứng trong đó các động vật trong mỗi nhóm là các động vật của mẫu động vật được mô tả trong bản mô tả này; cho nhóm thử nghiệm này dùng vacxin kháng virut chọn lọc; giám sát tiến triển của bệnh trong nhóm thử nghiệm và nhóm đối chứng; so sánh tiến triển của bệnh trong nhóm thử nghiệm với tiến triển của bệnh trong nhóm đối chứng; và chọn lọc vacxin kháng virut chọn lọc mà làm giảm sự tiến triển của bệnh trong nhóm thử nghiệm so với nhóm đối chứng. Theo một phương án, vacxin kháng virut chọn lọc trước tiên được sàng lọc trong dòng tế bào của động vật gặm nhấm thử nghiệm được lây nhiễm bởi virut entero 71 được làm thích ứng với dòng tế bào của động vật gặm nhấm trước khi sàng lọc ở các động vật. Theo một phương án khác, vacxin kháng virut chọn lọc trước tiên được sàng lọc trong dòng tế bào của động vật gặm nhấm thử nghiệm được lây nhiễm bởi virut có nguồn gốc dòng vô tính (clone derived virus - CDV) chứa các đột biến trong VP1 trước khi sàng lọc ở các động vật.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A-Fig.1O thể hiện các tác dụng gây bệnh tế bào (cytopathic effect - CPE) quan sát được sau khi nhiễm virut của các dòng tế bào động vật linh trưởng khác nhau. Các tế bào động vật linh trưởng: Tế bào RD (Fig.A1-1C), tế bào HeLa (Fig.1D-1F), tế bào HEp-2 (Fig.1G-1I), tế bào Vero (Fig.1J-1L), và tế bào COS-7 (Fig.1M-Fig.1O) bị nhiễm 1 MOI (multiplicity of infection - hệ số nhiễm) của mỗi virut EV71:BS (Fig.1A, 1D, 1G, 1J và 1M), EV71:TLLm (Fig.1B, 1E, 1H, 1K và 1N), hoặc EV71:TLLmv

(Fig.1C, Fig.1F, Fig.1I, Fig.1L và Fig.1O) được quan sát ở 48 hpi (hours post-infection - giờ sau nhiễm) về tác dụng gây bệnh tế bào hoặc sự chết của lớp đơn tế bào. Các ảnh là đại diện của các kết quả trong ba thử nghiệm độc lập.

Fig.2A-Fig.2O thể hiện sự phát hiện kháng nguyên virut trong các dòng tế bào đã được lây nhiễm EV71:BS, EV71:TLLm và EV71:TLLmv. Các dòng tế bào động vật có vú được nuôi cấy qua đêm: HeLa (Fig.2A-Fig.2C), HEp-2 (Fig.2D-Fig.2F), CHO-K1 (Fig.2G-Fig.2LI, NRK (Fig.2J-Fig.2L), và TCMK (Fig.2M-Fig.2O), bị nhiễm 1 MOI virut tương ứng. Các tế bào được thu hoạch ở 48 hpi, được phủ lên trên các phiến kính Teflon và được cố định trong axeton lạnh. Các tế bào được dò bằng kháng thể pan-virut entero và được nhuộm bằng kháng IgG của chuột nhắt được tiếp hợp với FITC. Các ảnh là đại diện của hai thử nghiệm độc lập.

Fig.3A-Fig.3D thể hiện động học sự sinh trưởng của *EV71:BS*, *EV71:TLLm*, và *EV71:TLLmv* được xác định trong các tế bào NIH/3T3 và Vero. Dịch nổi từ các tế bào của động vật có vú khác nhau bị nhiễm 1 MOI virut tương ứng được thu ở các thời điểm khác nhau và được chuẩn độ và đếm bằng cách sử dụng phương pháp Reed và Muench. Fig.3A: Hàm lượng virut EV71:BS xác định được trong các tế bào Vero. Fig.3B: Hàm lượng virut *EV71:TLLmv* xác định được trong các tế bào NIH/3T3. Fig.3C và 3D: Hàm lượng virut *EV71:TLLm* xác định được trong các tế bào NIH/3T3. Đường cong sự sinh trưởng từ các dòng tế bào mà không thể hiện sự nhiễm sinh sôi (productive infection) không được thể hiện.

Fig.4A-Fig.4O thể hiện các tác dụng gây bệnh tế bào (cytopathic effect - CPE) quan sát được sau khi nhiễm virut của các dòng tế bào của động vật gặm nhấm khác nhau. Các tế bào động vật gặm nhấm: Tế bào NIH/3T3 (Fig.4A-4C), tế bào Neuro-2A (Fig.4D-4F), tế bào TCMK (Fig.4G-4I), tế bào CHO-K1 (Fig.4J-4L), và tế bào NRK (Fig.4M-4O) bị nhiễm 1 MOI của mỗi virut *EV71:BS* (Fig.4A, 4D, 4G, 4J và 4M), *EV71:TLLm* (Fig.4B, 4E, 4H, 4K và 4N), hoặc *EV71:TLLmv* (Fig.4C, 4F, 4I, 4L và 4O) được quan sát ở 48 hpi về tác dụng gây bệnh tế bào hoặc sự chết của lớp đơn tế bào. Các ảnh là đại diện của các kết quả từ ba thử nghiệm độc lập.

Fig.5A-Fig.5D thể hiện thử nghiệm đánh giá phù hợp virut của *EV71:BS*, *EV71:TLLm*, và *EV71:TLLmv* trong NIH/3T3 được xác định theo tỷ lệ hàm lượng. Hàm lượng virut được xác định một cách riêng rẽ trong các tế bào NIH/3T3 và Vero được sử

dụng để tính mức độ thích ứng virut dưới dạng log[(hàm lượng trong tế bào NIH/3T3)/(hàm lượng trong tế bào Vero)]. Mức độ thích ứng virut của (Fig.5A) *EV71:BS*, (Fig.5B) *EV71:TLLmv*, và (Fig.5C và 5D) *EV71:TLLm* được tính từ các trị số hàm lượng virut được thể hiện trên Fig.3A-3D. Các thử nghiệm đánh giá sự phù hợp virut thu được từ các dòng tế bào mà không thể hiện sự nhiễm sinh sôi không được thể hiện.

Fig.6A và Fig.6B thể hiện quá trình chuyển nạp của NIH/3T3 bằng ARN virut *EV71:BS* gây ra sự nhiễm sinh sôi. Các tế bào NIH/3T3 và Vero được nuôi cấy qua đêm được tiêm dịch nổi virut thu được từ các tế bào NIH/3T3 đã được chuyển nạp trước bằng ARN virut chiết được từ *EV71:BS*, *EV71:TLLm*, và *EV71:TLLmv*. Fig.6A: Các tế bào được chụp ảnh bằng cách sử dụng kính hiển vi quang học đảo ngược ở 24 hpi để quan sát CPE được gây ra. Fig.6B: Các tế bào được thu ở 7 dpi (days post-infection - ngày sau nhiễm), được phủ lên trên các phiến kính Teflon, được dò bằng kháng thể pan-virut entero, và được nhuộm bằng kháng thể kháng chuột nhắt được tiếp hợp với FITC.

Fig.7A và Fig.7B thể hiện thử nghiệm đánh giá phù hợp virut của *EV71:BS*, *EV71:TLLm*, và *EV71:TLLmv* trong các tế bào NIH/3T3 và Vero ở nhiệt độ 30°C.Các tế bào (Fig.7A) NIH/3T3 và (Fig.7B) Vero được nuôi cấy qua đêm bị nhiễm *EV71:BS* (các bảng a, d, g), *EV71:TLLm* (các bảng b, e, h), hoặc *EV71:TLLmv* (các bảng c, f, i) được ủ ở nhiệt độ 30°C và được quan sát dưới kính hiển vi quang học có sự tương phản pha ở 24 hpi (các bảng a-c), 48 hpi (các bảng d-f), và 72 hpi (các bảng g-i). Các ảnh chụp được là đại diện của hai thử nghiệm độc lập.

Fig.8A và Fig.8B thể hiện thử nghiệm đánh giá phù hợp virut của *EV71:BS*, *EV71:TLLm*, và *EV71:TLLmv* trong các tế bào NIH/3T3 và Vero ở nhiệt độ 37°C.Các tế bào (Fig.8A) NIH/3T3 và (Fig.8B) Vero được nuôi cấy qua đêm đã được lây nhiễm *EV71:BS* (các bảng a, d, g), *EV71:TLLm* (các bảng b, e, h), hoặc *EV71:TLLmv* (các bảng c, f, i) được ủ ở nhiệt độ 37°C và được quan sát dưới kính hiển vi quang học có sự tương phản pha ở 24 hpi (các bảng a-c), 48 hpi (các bảng d-f), và 72 hpi (các bảng g-i). Các ảnh chụp được là đại diện của hai thử nghiệm độc lập.

Fig.9A và Fig.9B thể hiện thử nghiệm đánh giá phù hợp virut của *EV71:BS*, *EV71:TLLm*, và *EV71:TLLmv* trong các tế bào NIH/3T3 và Vero ở nhiệt độ 39°C.Các tế bào (Fig.9A) NIH/3T3 và (Fig.9B) Vero được nuôi cấy qua đêm đã được lây nhiễm *EV71:BS* (các bảng a, d, g), *EV71:TLLm* (các bảng b, e, h), hoặc *EV71:TLLmv* (các bảng

c, f, i) được ủ ở nhiệt độ 39°C và được quan sát dưới kính hiển vi quang học có sự tương phản pha ở 24 hpi (các bảng a-c), 48 hpi (các bảng d-f), và 72 hpi (các bảng g-i). Các ảnh chụp được là đại diện của hai thử nghiệm độc lập.

Fig.10A-Fig.10L thể hiện quá trình chuyển nạp của các dòng tế bào của chuột NIH/3T3, Neuro-2A, và TCMK bằng ARN virut *EV71:BS* làm bằng chứng của sự sao chép của virut. Các tế bào NIH/3T3, Neuro-2A, và TCMK được nuôi cấy qua đêm được lây nhiễm 1000 $CCID_{50}$ virut *EV71:BS* (Fig.10A, Fig.10C, và Fig.10E) hoặc được chuyển nạp bằng các lượng tương đương của ARN virut (Fig.10B, Fig.10D, và Fig.10F). và được thu ở 48 hpi để phát hiện kháng nguyên virut. Các virut trong dịch nổi được thu ở 7 dpi và được cấy chuyển lên trên các tế bào Vero (Fig.10G, Fig.10I, và Fig.10K) và NIH/3T3 (Fig.10H, 10J, và 10L) mới. Các tế bào được thu và được nhuộm các kháng nguyên virut ở 48 hpi.

Fig.11A-Fig.11D thể hiện quá trình xác định vị trí trong VP1 và VP2 của các đột biến phù hợp trong các bộ gen của *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv*. Các đột biến phù hợp quan sát được trong các vùng VP1 (Fig.11A và 11B) và VP2 (Fig.11C và Fig.11D) của *EV71:TLLm* (Fig.11A và Fig.11C) và *EV71:TLLmv* (Fig.11B và Fig.11D) được tạo mẫu bằng cách sử dụng DeepView/SwissPDBviewer v3.7 và cấu trúc 3D của vùng P1 vỏ capsit của EV71 (PDB ID 4AED). Các đột biến được quan sát để chủ yếu xác định vị trí đối với các vòng tiếp xúc bề mặt của protein như được thể hiện.

Fig.12 thể hiện tỷ lệ hàm lượng trong các tế bào NIH/3T3 so với hàm lượng trong các tế bào Vero của dịch nổi virut thu được từ các tế bào được chuyển nạp bằng ARN virut EV71:BS hoặc được lây nhiễm bằng virut sống. Dịch nổi từ NIH/3T3, Neuro-2A, Vero, và TCMK được chuyển nạp bằng ARN virut hoặc được lây nhiễm bằng virut sống được thu lại và được đếm virut bằng phương pháp Reed-and Muench. Tỷ lệ của log(hàm lượng) xác định được trong các tế bào NIH/3T3 so với hàm lượng xác định được trong các tế bào Vero được thể hiện. *3T3-TRANS:* các tế bào NIH/3T3 được chuyển nạp ARN; *3T3-INF:* các tế bào NIH/3T3 được lây nhiễm virut. Các dấu hoa thị biểu thị phép kiểm định t Student với trị số $p < 0,05$.

Fig.13A và Fig.13B thể hiện sự phân tích sự sống của các động vật được lây nhiễm. Các động vật đã được lây nhiễm được quan sát và được xác định thể trọng hằng ngày. Fig.13A: Đồ thị Kaplan-Meier của các động vật được lây nhiễm thể hiện số lượng

chết ở các ngày sau khi bệnh khác nhau. Fig.13B: Mức độ thay đổi thể trọng được vẽ đồ thị để xác định sức khỏe tổng quát của các động vật.

Fig.14A-Fig.14D thể hiện các triệu chứng và bệnh học của các động vật đã được lây nhiễm. Phần lớn các động vật đã được lây nhiễm biểu hiện các triệu chứng của bệnh. Fig.14A: Chứng liệt chân sau (mũi tên). Fig.14B: Giải phẫu toàn bộ phổi bị phồng sau khi giải phẫu (các mũi tên). Lát cắt mô cũng được nhuộm bằng Hematoxylin và Eosin (Fig.14C ở 10x và Fig.14D ở 20x). Các mũi tên màu đen chỉ vào chất nhầy thâm nhiễm khoang phế nang.

Fig.15A-Fig.15E thể hiện rằng quá trình chuyển nạp của ARN bộ gen của virut vào trong các tế bào của cả động vật linh trưởng và động vật gặm nhấm thu được virut có thể sống được. Fig.15A: ARN bộ gen chiết được từ mỗi *EV71:BS*, *EV71:TLLm*, hoặc *EV71:TLLmv* được chuyển nạp một cách riêng rẽ vào trong các tế bào Vero, NIH/3T3, và Neuro-2a (P0). Dịch nổi chuyển nạp được thu lại và được tiêm lên trên mỗi tế bào Vero hoặc NIH/3T3 (P1) để đánh giá khả năng sống của virut con cháu. Sự nhiễm của các tế bào P0 được đánh giá bằng cách quan sát tác dụng gây bệnh tế bào (CPE) (Fig.15B) và sự phát hiện huỳnh quang miễn dịch của các kháng nguyên virut (Fig.15C). Tương tự, sự nhiễm của các tế bào P1 từ các tế bào được chuyển nạp ARN *EV71:BS* được đánh giá bằng cách gây ra CPE (Fig.15D) và sự phát hiện huỳnh quang miễn dịch của các kháng nguyên virut được biểu hiện (Fig.15E).

Fig.16A-Fig.16F thể hiện rằng vùng mã hóa vỏ capsit của *EV71:TLLm* được làm thích ứng với tế bào chuột nhắt điều khiển sự nhiễm sinh sôi của các tế bào chuột nhắt có *EV71:BS*. Fig.16A: Các dòng vô tính cADN nhiễm có bộ gen đầy đủ của EV71:BS được tạo ra, và vùng P1 được thay thế bằng các trình tự từ vỏ capsit *EV71:TLLm* để tạo ra virut khảm, *EV71:BS[M-P1]*. Fig.16B: Các tế bào được lây nhiễm bằng virut có nguồn gốc dòng vô tính (CDV) từ *EV71:BS* hoặc *EV71:BS[M-P1]*, và sự nhiễm được đánh giá bằng cách gây ra tác dụng gây bệnh tế bào (CPE) tan bào (Fig.16C) và sự biểu hiện kháng nguyên virut (Fig.16D). Dịch nổi được tiêm lại lên trên các tế bào mới, và hàm lượng virut được đo từ tế bào cấy chuyển (P1 và P2) thu được từ tế bào Vero được lây nhiễm (Fig.16E), cũng như tế bào cấy chuyển P1 của NIH/3T3 (3T3) và Neuro-2A (N2a) (Fig.16F). Các thanh sai số biểu thị SD. * $p<0,05$.

Fig.17A-Fig.17G thể hiện rằng sự đột biến thay thế axit amin VP1-L169F trong vỏ capsit là đủ để cho phép *EV71:BS* xâm nhập vào trong các tế bào của chuột. Fig.17A: Các dòng vô tính cADN đột biến khác nhau được tạo ra bằng cách kết hợp các đột biến thay thế axit amin trong VP1: K98E, E145A, và L169F; và VP2: S144T và K149I; vào trong bộ gen *EV71:BS* có chiều dài đầy đủ. Các đột biến tương ứng với các đột biến thay thế axit amin được viết trong dấu ngoặc đơn. Sự nhiễm của các dòng tế bào khác nhau bởi virut có nguồn gốc dòng vô tính (CDV) được giám sát bằng cách đánh giá sự gây ra tác dụng gây bệnh tế bào (CPE) tan bào (Fig.17B và 17C) và sự biểu hiện của các kháng nguyên virut (Fig.17D và 17E). Hàm lượng virut từ các tế bào Vero đã được lây nhiễm (Fig.17F) và các tế bào NIH/3T3 và Neuro-2a (Fig.17G) được xác định để đánh giá sự sản sinh virut con cháu có thể sống được. Các thanh sai số biểu thị SD.

Fig.18A-Fig.18E thể hiện rằng virut *EV71:BS* có các đột biến thay thế axit amin VP1 được kết hợp trong vỏ capsit thể hiện sự nhiễm được cải thiện của các tế bào chuột nhắt. Fig.18A: Các dòng vô tính cADN đột biến khác nhau được tạo ra bằng cách kết hợp các tổ hợp của các đột biến thay thế axit amin trong VP1 và VP2 vào trong bộ gen *EV71:BS* có chiều dài đầy đủ. Các đột biến tương ứng với các đột biến thay thế axit amin được viết trong dấu ngoặc đơn. Sự nhiễm của các dòng tế bào khác nhau bởi virut có nguồn gốc dòng vô tính (CDV) được giám sát bằng cách đánh giá tác dụng gây bệnh tế bào (Fig.18B), sự biểu hiện của kháng nguyên virut (Fig.18C), và hiệu suất virut từ các tế bào Vero đã được lây nhiễm (Fig.18D), và các tế bào NIH/3T3 (3T3) và Neuro-2a (N2A) (Fig.18E). Các dòng vô tính khác không có hiệu suất virut không được thể hiện. Các thanh sai số biểu thị SD.

Fig.19A-Fig.19C thể hiện rằng virut EV71:BS có các đột biến thay thế axit amin VP1-K98E, E145A, L169F được kết hợp trong vỏ capsit có thể được cấy chuyển một cách ổn định trong dòng tế bào thần kinh của chuột nhắt Neuro-2a. Các virut có nguồn gốc dòng vô tính được cấy chuyển hai lần trong các tế bào Neuro-2a và NIH/3T3. Ở mỗi lần cấy chuyển, sự nhiễm được giám sát bằng cách đánh giá sự biểu hiện của kháng nguyên virut (Fig.19A) và hàm lượng virut được đo trong các tế bào Vero (Fig.19B). Các thanh sai số biểu thị SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$. Fig.19C: Các trình tự bộ gen của $CDV:BS_{VP1}[K98E/E145A/L169F]$ đại diện được xác định để đánh giá bằng

chứng của các đột biến thay thế axit amin K98E (A2734G), E145A (A2876C), và L169F (C2947T). Vị trí đột biến được đánh dấu bằng dấu hoa thị

Fig.20A-Fig.20F thể hiện rằng *EV71:TLLmv* sử dụng SCARB2 để lây nhiễm các tế bào của cả động vật linh trưởng và chuột. Việc ủ trước các tế bào NIH/3T3 (Fig.20A) và các tế bào Vero (Fig.20B) được cố định lên trên các phiến kính Teflon bằng kháng huyết thanh SCARB2 của chuột (mSCARB2) ức chế sự gắn kết *EV71:TLLmv*, như được xác định bởi sự giảm các tín hiệu huỳnh quang. Cường độ huỳnh quang trên các màng được đo bằng cách sử dụng phần mềm tạo ảnh Imaris (n = 100). *NSP* (huyết thanh của thỏ không đặc hiệu). Việc ủ trước *EV71:TLLmv* bằng protein hòa tan tái tổ hợp của mSCARB2 (Fig.20C) hoặc SCARB2 của người (hSCARB2) (Fig.20D) trước khi tiêm lên trên các tế bào NIH/3T3 làm giảm mức độ nghiêm trọng của sự nhiễm virut, như được đánh giá bằng thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch. Việc ủ trước các tế bào NIH/3T3 sống bằng kháng huyết thanh hSCARB2 (Fig.20E) hoặc mSCARB2 (Fig.20F) trước khi gây bệnh bằng *EV71:TLLmv* làm giảm hàm lượng virut trong dịch nổi môi trường nuôi cấy. * $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,0005$.

Fig.21A-Fig.21D thể hiện rằng việc ủ các tế bào Neuro-2A bằng kháng huyết thanh thỏ SCARB2 của chuột làm giảm mức độ nghiêm trọng của sự nhiễm bởi thể đột biến CDV. Mức độ nghiêm trọng của sự nhiễm trong các tế bào được ủ trước bằng kháng huyết thanh thỏ mSCARB2 trước khi lây nhiễm bằng $CDV:BS_{VP1}[K98E/E145A/L169F]$ (Fig.21A và 21B hoặc *CDV:BS[M-P1]* (Fig.21C và 21D) được giám sát bằng cách đánh giá sự gây ra tác dụng gây bệnh tế bào (CPE) (Fig.21A và 21C) và hiệu suất virut ở 7 ngày sau nhiễm (Fig.21B và 21D). Các thanh sai số biểu thị SD; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$. Mức độ của CPE: 1 (0-25% chết tế bào), 2 (25-50%), 3 (50-75%), 4 (75-100%).

Fig.22a-Fig.22c thể hiện rằng *EV71:TLLmv* có tính độc nhất trong số ba chủng virut được cải biến như được chứng minh bởi việc gây ra bệnh nặng ở chuột nhắt BALB/c 1 tuần tuổi. Fig.22a:Hiệu giá kháng thể trung hòa trong huyết thanh được gom lại từ chuột nhắt được lây nhiễm (trong màng bụng; I.P.) bằng EV71:BS (n=6), *EV71:TLLm* (n=5) hoặc *EV71:TLLmv* (n=7) như được đánh giá ở cuối giai đoạn quan sát. Fig.22b và 22c:Đường cong thời gian sống Kaplan-Meier của chuột nhắt được tiêm 10^6 $CCID_{50}$ (liều lây nhiễm 50% tế bào) của *EV71:BS*, *EV71:TLLm*, hoặc *EV71:TLLmv* thông qua đường I.P. (Fig.22b) hoặc trong cơ (I.M.) (Fig.22c). Ý nghĩa thống kê được xác định

bằng cách sử dụng phép kiểm định t với hiệu chỉnh Welch đối với phương sai không bằng nhau (Fig.22a) hoặc phép kiểm định log-rank Mantel-Cox (Fig.22b và 22c). *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005.

Fig.23a-Fig.23h thể hiện rằng sự nhiễm *EV71:TLLmv* ở chuột nhắt được đặc trưng bởi bệnh nặng cấp tính giống với phổ bệnh của người. Fig.23a và 23b:Khả năng gây chết phụ thuộc liều của sự nhiễm *EV71:TLLmv* ở chuột nhắt 1 tuần tuổi. Fig.23a: Đường cong thời gian sống Kaplan-Meier của chuột nhắt con 6 ngày tuổi được tiêm I.P. bằng các liều *EV71:TLLmv* khác nhau. Fig.23b:Điểm cuối nhân đạo trung bình (median humane endpoint - HD50) tương đương với liều virut là 3,98 x 10^3 $CCID_{50}$. Fig.23c:Đường cong thời gian sống Kaplan-Meier của chuột nhắt 1 tuần tuổi được tiêm *EV71:TLLmv* thông qua đường I.P. hoặc I.M.. Fig.23d:Khả năng gây chết phụ thuộc vào tuổi và đường tiêm gây ra bởi sự nhiễm *EV71:TLLmv* ở chuột nhắt được tiêm liều virut bằng 10^6 $CCID_{50}$. Fig.23e và 23f:Dấu hiệu lâm sàng quan sát được ở chuột nhắt ốm đến chết, một số trong số đó được biểu hiện bởi chứng liệt chân sau (*mũi tên màu xám*) và/hoặc chân trước. Các dấu hiệu khác còn là các tổn thương nhỏ trụi lông trên thân mình (*mũi tên màu đen*). Fig.23g và 23h:Sự phân loại bệnh của chuột nhắt 1 tuần tuổi được tiêm *EV71:TLLmv* thông qua đường I.P. (Fig.23g), hoặc đường I.M. (Fig.23h).

Fig.24a-Fig.24e thể hiện rằng mức độ nghiêm trọng của sự nhiễm *EV71:TLLmv* ở chuột nhắt BALB/c phụ thuộc vào tuổi của vật chủ, liều virut, và đường dùng. Fig.24a và 24b:Các nhóm gồm 8-10 chuột nhắt được tiêm 10^6 $CCID_{50}$ của virut qua đường I.P. (Fig.24a) hoặc đường I.M. (Fig.24b) và đường cong thời gian sống Kaplan-Meier được xác định đối với các chuột thuộc các nhóm tuổi khác nhau. Fig.24c và 24d:Hiệu giá kháng thể trung hòa trong huyết thanh thu được ở cuối giai đoạn quan sát từ chuột nhắt có các độ tuổi khác nhau được tiêm qua đường I.P. (Fig.24c) hoặc đường I.M. (Fig.24d); 1 tuần (I.P. n=7; I.M. n=4), 2 tuần (n=5, n=7), 3 tuần (n=4; n=8), và 4 tuần (n=4; n=6). Fig.24e:Hiệu giá kháng thể trung hòa trong huyết thanh thu được từ chuột nhắt được tiêm (I.P.) với các liều khác nhau của *EV71:TLLmv*; CCID50 102 (n=5), 103 (n=4), 104 (n=4), 105 (n=5), hoặc 106 (n=7). Ý nghĩa thống kê được xác định bằng phép kiểm định log-rank Mantel-Cox (Fig.24a và 24b) hoặc phép kiểm định t với hiệu chỉnh Welch đối với phương sai không bằng nhau (Fig.24c, 24d và 24e). *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005.

Fig.25a-Fig.25k thể hiện các dấu hiệu của tình trạng phù phổi có nguồn gốc thần kinh (neurogenic pulmonary edema - NPE) do EV71 gây ra ở chuột nhắt *nhóm IA*. Fig.25a-25d:Bệnh học toàn bộ đại diện của phổi thu được từ chuột nhắt được lây nhiễm giả (Fig.25a), hoặc chuột nhắt được lây nhiễm *EV71:TLLmv* thể hiện các dấu hiệu của bệnh *nhóm IA* (Fig.25b), *nhóm IB* (Fig.25c), hoặc *nhóm II* (Fig.25d). Các ảnh thể hiện góc nhìn từ trên xuống và từ bên cạnh. Lưu ý sự xẹp không hoàn toàn của phổi rõ rệt trên Fig.25b (*các mũi tên màu trắng*). Fig.25e:Sự so sánh khối lượng ướt của phổi thu được từ chuột nhắt được lây nhiễm giả (n=4), hoặc chuột nhắt được lây nhiễm bởi *EV71:TLLmv* biểu hiện các dấu hiệu của bệnh *nhóm IA* (n=8), *nhóm IB* (n=9), hoặc *nhóm II* (n=4). (Fig.25f-25i:Các ảnh đại diện của các lát cắt mô của phổi (5μm) được nhuộm bằng hematoxylin & eosin (H&E). Được thể hiện là các ảnh có độ phóng đại thấp và cao của phổi thu được từ chuột nhắt được lây nhiễm giả (Fig.25f) hoặc chuột nhắt được lây nhiễm bởi *EV71:TLLmv* biểu hiện các dấu hiệu của bệnh *nhóm IA* (Fig.25g), *nhóm IB* (Fig.25h), hoặc *nhóm II* (Fig.25i). Lưu ý sự có mặt của dịch có protein màu hồng trong khoang phế nang (các dấu hoa thị trên Fig.25g, độ phóng đại cao), một số trong chúng còn chứa đầy hồng cầu (các mũi tên màu xám trên Fig.25g, độ phóng đại cao). Fig.25j và 25k:Hàm lượng adrenalin/epinephrin trong huyết thanh (Fig.25j) và noradrenalin/norepinephrin (Fig.25k) như được xác định ở chuột nhắt được lây nhiễm giả (n=9), hoặc chuột nhắt được lây nhiễm bởi *EV71:TLLmv* biểu hiện các dấu hiệu của bệnh *nhóm IA* (n=8), *nhóm IB* (n=9), hoặc *nhóm II* (n=3). Các thanh sai số biểu thị *SEM*. Ý nghĩa thống kê được xác định bằng phép kiểm định Mann-Whitney (Fig.25e) hoặc phép kiểm định *t* với hiệu chỉnh Welch đối với phương sai không bằng nhau (Fig.25j và 25k). $*p<0,05$, $**p<0,005$.

Fig.26a và Fig.26b thể hiện việc không có sự sao chép virut hoặc chứng viêm trong mô phổi và tim của chuột nhắt *nhóm IA*. Fig.26a:Các ảnh đại diện của lát cắt mô phổi (5 μm) thu được từ các nhóm khác nhau của chuột nhắt được lây nhiễm bởi *EV71:TLLmv* và được nhuộm bằng Hematoxylin & Eosin (H&E) để kiểm tra mô bệnh học, hoặc được đánh dấu bằng cách sử dụng huyết thanh thỏ kháng các kháng nguyên EV71 (EV71 IHC) để xác định vị trí kháng nguyên virut. Fig.26b: Các ảnh đại diện của lát cắt mô tim (5 μm) được xử lý đối với H&E và EV71 IHC.

Fig.27a-Fig.27d thể hiện bản đồ đại diện minh họa vị trí và sự phân bố của các kháng nguyên EV71 và các tổn thương do virut gây ra ở các vùng khác nhau của não

chuột nhắt *nhóm IA* và *nhóm IB*. Vỏ tiểu não (CTX) (Fig.27a, 27b và 27c); dưới đồi (HY) (Fig.27a và 27b); hồi hải mã (HP) (Fig.27b và 27c); đồi não (TH) (Fig.27b); não giữa (MB) và cầu não (P) (Fig.27c); và tiểu não (CBX) và hành tủy não tủy (MY) (Fig.27d) được chỉ ra. Các vùng ở đó các kháng nguyên virut và tổn thương bệnh học được phát hiện được đánh dấu phù hợp. Các chấm lớn hơn biểu thị các tín hiệu/kích thước tổn thương mạnh hơn. Các ảnh mẫu được tải xuống từ brainstars.org1 và được cấp phép của Creative Commons của Nhật Bản. Bản đồ lát cắt vòng đầu mô não được thu từ tập bản đồ não chuột nhắt tương tác (http colon slash slash mouse dot brain-map dot org slash static slash atlas) [113].

Fig.28a-Fig.28n thể hiện rằng sự nhiễm *EV71:TLLmv* ở chuột nhắt liên quan đến sự phá hủy mô thần kinh và sự sao chép virut sâu rộng. Fig.28a-28l:Các ảnh đại diện của các lát cắt mô não (5μm) được nhuộm bằng hematoxylin và eosin (H&E) hoặc được nhuộm miễn dịch bằng huyết thanh thỏ kháng các kháng nguyên EV71 (EV71 IHC). Các lát cắt thu được từ chuột nhắt biểu hiện các dấu hiệu của bệnh *nhóm IA* (các bảng bên trái), hoặc nhóm IB (các bảng bên phải). Các tổn thương bệnh học trong não bao gồm chứng phù (các ô nét đứt), thâm nhiễm tế bào (vùng chéo trong góc phần tư phía trên bên trái của bảng bên trái và vùng chéo trong góc phần tư phía dưới bên phải của Fig.28k), thực bào thần kinh (trong các bảng bên trái của Fig.28a-28c), thoái hóa thần kinh (các dấu hoa thị màu đen), và thoái hóa các tế bào Purkinje (các dấu hoa thị màu xám). (Fig.28m và 28n:Bản đồ đại diện của các lát cắt vòng tủy sống từ chuột nhắt bị bệnh nhóm IA (Fig.28m) hoặc nhóm IB (Fig.28n). Được tô sáng là các vùng ở đó các kháng nguyên virut và các tổn thương bệnh học được phát hiện. Kích thước chấm lớn hơn biểu thị các tín hiệu/tổn thương sâu rộng hơn. V, mặt bụng; D, mặt lưng.

Fig.29a-Fig.29c thể hiện các kháng nguyên EV71 và các tổn thương do virut gây ra trong các vùng khác của não sau của chuột nhắt nhóm IA . Fig.29a:Các ảnh đại diện của nhân răng được nhuộm bằng Hematoxylin và Eosin (H&E) để kiểm tra mô bệnh học hoặc huyết thanh thỏ kháng các kháng nguyên EV71 (EV71 IHC) để xác định vị trí kháng nguyên virut. Các vùng được đóng khung được thể hiện phóng đại trong bản đồ lồng. Fig.29b:Các ảnh đại diện của phần đuôi thân não từ chuột nhắt nhóm I. Các ảnh thể hiện vỏ tiểu não (CBX) và hành tủy não tủy (MY). Vùng sau (area prostrema - AP; dấu hoa thị) và nhân của bó đơn độc (nucleus of the solitary tract - NTS; vòng tròn đứt) cũng

được đánh dấu để tham khảo. Các vùng ở đó các kháng nguyên virut và các tổn thương bệnh học được phát hiện được chỉ ra. Các chấm lớn hơn thể hiện các tín hiệu/kích thước tổn thương mạnh hơn. Các ảnh mẫu được tải xuống từ brainstars.org1 và được cấp phép của Creative Commons của Nhật Bản. Bản đồ lát cắt vòng đầu mô não được thu từ tập bản đồ não chuột nhắt (http colon slash slash mouse dot .brain-map dot org slash static slash atlas) [113]. Fig.29c:Các ảnh đại diện của hành tủy từ chuột nhắt nhóm IA minh họa các mẫu nhuộm H&E và EV71 IHC trong AP và NTS.

Fig.30a-Fig.30f thể hiện các lát cắt mô học của các mô thần kinh từ chuột nhắt được lây nhiễm giả (đối chứng khỏe mạnh). Các ảnh đại diện của các lát cắt mô chuột nhắt bình thường (5 μm) được nhuộm bằng Hematoxylin & Eosin (H&E) để kiểm tra mô bệnh học hoặc huyết thanh thỏ kháng các kháng nguyên EV71 (EV71 IHC) để xác định vị trí kháng nguyên virut. Các lát cắt não thể hiện các nơron tháp CA3 trong hồi hải mã (Fig.30a); các nơron lưới trong vùng dưới đồi (Fig.30b) và đồi não (Fig.30c); các nơron trong chất xám quanh đường thông não thất (Fig.30d); lớp tế bào Purkinje trong vỏ tiểu não (Fig.30e). Lưu ý hình thái học tế bào Purkinje bình thường (dấu hoa thị màu đen trong bảng bên trái của Fig.30e); và các nơron lưới trong hành tủy não tủy (Fig.30f).

Fig.31a-Fig.31e thể hiện bệnh học do *EV71:TLLmv* gây ra và sự phân bố kháng nguyên virut trong các mô thần kinh khác. Các ảnh đại diện của lát cắt mô của chuột nhắt (5 μm) được nhuộm bằng Hematoxylin & Eosin (H&E) để kiểm tra mô bệnh học hoặc huyết thanh thỏ kháng các kháng nguyên EV71 để phân tích hóa mô miễn dịch (EV71 IHC). Các mô não thu được từ chuột nhắt được lây nhiễm bởi *EV71:TLLmv* hoặc được lây nhiễm giả. Các lát cắt vòng đầu não thể hiện các nơron tháp vỏ não vận động (Fig.31a); nơron chất xám cầu não (Fig.31b); và các lát cắt vòng tủy sống từ cột sống cổ (Fig.31c), ngực (Fig.31d), và thắt lưng (Fig.31e). Lưu ý sự thâm nhiễm tế bào (góc phần tư phía dưới bên phải của bảng bên trái trên Fig.31a) và chứng hoại tử nơron thần kinh (dấu hoa thị màu đen trong bảng thứ hai của Fig.31a) rõ rệt trong vỏ não vận động. Các vùng được đóng khung trên Fig.31c-31e được thể hiện phóng đại trong bản đồ lồng tương ứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến mẫu động vật được lây nhiễm virut entero 71 và sàng lọc các hợp chất kháng EV71 chọn lọc. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện

chủng virut entero 71 (EV71) mà được làm thích ứng để nhiễm vào dòng tế bào của động vật gặm nhấm hoặc virut có nguồn gốc dòng vô tính virut entero 71 chứa các đột biến trong VP1 có thể gây bệnh ở động vật gặm nhấm có khả năng miễn dịch và động vật gặm nhấm bị suy giảm miễn dịch. Trong bản mô tả này, đôi khi các chủng EV71 này được gọi là virut entero 71 cải biến.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến phương pháp phát triển mẫu đáng tin cậy trên lâm sàng của bệnh thần kinh do EV71 gây ra bằng cách lây nhiễm chuột nhắt BALB/c bằng chủng được cải biến (ví dụ, *EV71:TLLmv*) được làm thích ứng để nhiễm nguyên bào sợi NIH/3T3 của chuột nhắt. Bằng cách sử dụng phương pháp này, EV71 cải biến được sử dụng để gây ra bệnh viêm não tủy cấp tính kết hợp với tình trạng phù phổi có nguồn gốc thần kinh ở chuột nhắt, được đặc trưng bởi sưng phổi và tăng khối lượng cơ quan so với phổi được lây nhiễm giả. Mặc dù không có sự viêm mô phổi hoặc tim, sự xuất huyết khu trú và dịch có protein trong túi phổi, nồng độ catecholamin trong huyết thanh cao, và tổn thương mô sâu rộng trong thân não, đặc biệt là hành tủy não tủy đã quan sát được. Dữ liệu này chứng tỏ rằng mẫu này sao chép một cách chính xác các dấu hiệu và các triệu chứng của tình trạng phù phổi có nguồn gốc thần kinh do EV71 gây ra ở người.

Do đó, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến mẫu động vật bao gồm động vật gặm nhấm được lây nhiễm bởi virut entero 71 có khả năng lây nhiễm động vật gặm nhấm này, trong bản mô tả này đôi khi còn được gọi là virut entero 71 cải biến. Theo một phương án, virut entero 71 virut entero 71 cải biến này là virut entero 71 được làm thích ứng với dòng tế bào của động vật gặm nhấm. Theo một phương án khác, virut entero 71 cải biến này là virut có nguồn gốc dòng vô tính (clone derived virus - CDV) chứa các đột biến trong VP1. Theo một số phương án, các đột biến trong VP1 cho phép CDV sử dụng các protein SCARB2 của động vật gặm nhấm để lây nhiễm các tế bào động vật gặm nhấm. Theo một phương án, động vật gặm nhấm này là động vật gặm nhấm có khả năng miễn dịch. Theo một phương án khác, động vật gặm nhấm này là động vật gặm nhấm bị suy giảm miễn dịch. Tốt hơn là, các động vật thích hợp để sử dụng làm mẫu là động vật có vú, tốt nhất là động vật thí nghiệm thích hợp như thỏ, chuột cống, chuột nhắt, và các động vật tương tự. Theo một phương án, động vật này là chuột nhắt. Theo một phương án khác, dòng tế bào của động vật gặm nhấm là dòng tế bào của chuột nhắt. Theo một phương án khác, dòng tế bào của chuột nhắt này là dòng tế bào NIH/3T3 của chuột nhắt.

Theo một phương án khác, dòng tế bào của chuột nhắt này là dòng tế bào Neuro-2a của chuột nhắt. Theo một phương án, virut entero 71 được làm thích ứng với dòng tế bào của động vật gặm nhấm là *EV71:TLLm*. Theo một phương án khác, virut entero 71 được làm thích ứng với dòng tế bào của động vật gặm nhấm là *EV71:TLLmv*. Theo một phương án, virut có nguồn gốc dòng vô tính chứa đột biến trong VP1 là *CDV:BS*$_{VP1}$*[K98E/E145A/L169F]*. Mẫu động vật này là hữu ích để nghiên cứu sự phân tán toàn thân của virut và phổ bệnh ở người trong các mẫu động vật. Mẫu động vật này cũng hữu ích để sàng lọc các dược chất và các vacxin kháng virut.

Mẫu động vật này được tạo ra dựa trên cơ sở cần thiết. Dung dịch gốc lớn được chuẩn hóa của chủng EV71 được làm thích ứng với dòng tế bào của động vật gặm nhấm được tạo ra, được chuẩn độ và được giữ trong tủ lạnh sâu (âm 80°C). Số lượng "được chuẩn hóa" (trên cơ sở tính toán thống kê) của động vật gặm nhấm, như chuột nhắt BALB/c hoặc chuột nhắt NSG, được lây nhiễm bằng chủng virut với hàm lượng được chuẩn hóa để tạo ra mẫu động vật. Mẫu động vật theo sáng chế phát triển các triệu chứng thần kinh (tương tự các triệu chứng mà có thể phát triển ở người) khi lây nhiễm. Như được thể hiện trong bản mô tả này, virut entero 71 cải biến, như chủng virut EV71 được làm thích ứng với dòng tế bào của động vật gặm nhấm, ảnh hưởng đến não và nhiều bệnh thần kinh được biểu hiện ở chuột nhắt.

Theo một số phương án, virut entero 71 được làm thích ứng với dòng tế bào của động vật gặm nhấm là *EV71:TLLm*. *EV71:TLLm* thu được sau khi cấy chuyển theo chuỗi chủng EV71 BS của người trong dòng tế bào chuột nhắt NIH/3T3 trong tối thiểu 60 chu kỳ. Theo một phương án, *EV71:TLLm* được lưu giữ vào ngày 12 tháng Giêng năm 2015 theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest ở Ngân hàng giống và vi sinh vật Trung Quốc nằm ở Trường đại học Wuhan, Wuhan 430072 Peoples Republic of China, và có số hiệu lưu giữ CCTCC V201437. Theo một phương án khác, *EV71:TLLm* có thể được thu lại bằng cách sử dụng di truyền ngược cải tiến nếu ARN virut được tổng hợp bằng cách sử dụng trình tự ARN virut (Mã ngân hàng gen KF514879; SEQ ID NO.1). Các kỹ thuật để di truyền ngược cải tiến là đã biết trong lĩnh vực này [84-87].

Theo một phương án khác, virut entero 71 được làm thích ứng với dòng tế bào của động vật gặm nhấm là *EV71:TLLmv*. *EV71:TLLmv* thu được từ việc cấy chuyển tiếp *EV71:TLLm* trong dòng tế bào chuột nhắt NIH/3T3 trong 40 chu kỳ nữa. Theo một

phương án, *EV71:TLLmv* được lưu giữ vào ngày 12 tháng Giêng năm 2015 theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest ở Ngân hàng giống và vi sinh vật Trung Quốc nằm ở Trường đại học Wuhan, Wuhan 430072 Peoples Republic of China, và có số hiệu lưu giữ CCTCC V201438. Theo một phương án khác, *EV71:TLLmv* có thể được thu lại bằng cách sử dụng di truyền ngược cải tiến nếu ARN virut được tổng hợp bằng cách sử dụng trình tự ARN virut (Mã ngân hàng gen KF514880; SEQ ID NO.2). Các kỹ thuật để di truyền ngược cải tiến là đã biết trong lĩnh vực này.

Theo một phương án khác, virut entero 71 cải biến là virut có nguồn gốc dòng vô tính (CDV) có các đột biến trong protein vỏ capsit VP1 mà cho phép virut entero 71 cải biến sử dụng các protein SCARB2 động vật gặm nhấm để lây nhiễm các tế bào động vật gặm nhấm. Virut entero 71 cải biến có các đột biến trong VP1 được tạo ra bằng cách chuẩn bị dòng vô tính cADN bộ gen có chiều dài đầy đủ bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình hoặc như được mô tả trong bản mô tả này. Các đột biến trong VP1 hoặc các protein khác của virut entero 71 được tạo ra bằng cách gây đột biến định hướng vị trí hoặc công nghệ CRISPR (xem, ví dụ, công bố đơn PCT số WO2014/127287). Virut sống (virut có nguồn gốc dòng vô tính (CDV)) được tạo ra từ các dòng vô tính cADN bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết đối với người có hiểu biết trung bình hoặc như được mô tả trong bản mô tả này. CDV có các đột biến hoặc bộ sưu tập các đột biến khác nhau sau đó được thử nghiệm khả năng của chúng lây nhiễm các tế bào động vật gặm nhấm. Theo cách khác, CDV có các đột biến hoặc bộ sưu tập các đột biến khác nhau sau đó được thử nghiệm khả năng của chúng gắn kết với các protein SCARB2 động vật gặm nhấm dưới dạng sàng lọc ban đầu. Các chủng virut entero 71 thích hợp bất kỳ có thể được sử dụng để phát triển các CDV có các đột biến trong VP1. Số lượng các đột biến có thể và các đột biến cụ thể thay đổi đối với mỗi chủng để tạo ra các CDV mà đủ để tạo ra sự nhiễm phát triển mạnh trong tế bào động vật gặm nhấm đích. Do đó, nhiều chủng EV71 có tính độc động vật gặm nhấm có thể được tạo ra mà có thể lây nhiễm một số, nhiều hoặc tất cả các loại dòng tế bào của động vật gặm nhấm, ví dụ, chuột nhắt. Theo một phương án, chủng EV71 được sử dụng để tạo ra CDV có các đột biến trong VP1 là chủng virut entero 71 BS. Theo một phương án, virut entero 71 cải biến là $CDV{:}BS_{VP1}[K98E/E145A/L169F]$.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất mẫu động vật có phổ đầy đủ của sự nhiễm, bệnh và bệnh học thần kinh do EV71 gây ra quan sát được ở người. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc lây nhiễm động vật gặm nhấm được mô tả trong bản mô tả này bằng virut entero 71 cải biến được mô tả trong bản mô tả này và nuôi động vật gặm nhấm đã được lây nhiễm này trong thời gian lên đến khoảng 4 tuần. Theo một phương án, virut entero 71 cải biến là *EV71:TLLmv*. Theo một phương án khác, virut entero 71 cải biến là *EV71:TLLm*. Theo một phương án khác, virut entero 71 cải biến là $CDV{:}BS_{VP1}[K98E/E145A/L169F]$. Theo một số phương án, tuổi của động vật gặm nhấm cần lây nhiễm nằm trong khoảng từ 1 tuần đến 4 tuần. Theo các phương án khác, tuổi của động vật gặm nhấm cần lây nhiễm nằm trong khoảng từ 1 tuần đến 3 tuần. Theo các phương án khác, tuổi của động vật gặm nhấm cần lây nhiễm nằm trong khoảng từ 1 tuần đến 2 tuần. Theo một phương án, tuổi của động vật gặm nhấm cần lây nhiễm là khoảng 1 tuần. Theo một phương án khác, tuổi của động vật gặm nhấm cần lây nhiễm là khoảng 2 tuần. Theo một phương án khác, tuổi của động vật gặm nhấm cần lây nhiễm là khoảng 3 tuần. Theo một số phương án, động vật gặm nhấm đã được lây nhiễm được nuôi trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 tuần đến 4 tuần. Theo các phương án khác, động vật gặm nhấm đã được lây nhiễm được nuôi trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 tuần đến 3 tuần. Theo các phương án khác, động vật gặm nhấm đã được lây nhiễm được nuôi trong thời gian nằm trong khoảng từ 1 tuần đến 2 tuần. Theo một phương án, động vật gặm nhấm đã được lây nhiễm được nuôi trong thời gian khoảng 1 tuần. Theo một phương án khác, động vật gặm nhấm đã được lây nhiễm được nuôi trong thời gian khoảng 2 tuần. Theo một phương án bổ sung, động vật gặm nhấm đã được lây nhiễm được nuôi trong thời gian khoảng 3 tuần. Theo một phương án khác, động vật gặm nhấm đã được lây nhiễm được nuôi trong thời gian khoảng 4 tuần. Theo một số phương án, động vật gặm nhấm là động vật gặm nhấm bị suy giảm miễn dịch. Theo một số phương án, động vật gặm nhấm là chuột nhắt như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một phương án, chuột nhắt bị suy giảm miễn dịch là chuột nhắt BALB/c. Theo các phương án khác, động vật gặm nhấm được lây nhiễm bằng cách tiêm virut entero 71 cải biến vào động vật gặm nhấm này. Theo một phương án, sự tiêm là tiêm trong màng bụng (intraperitoneal - I.P.). Theo một phương án khác, sự tiêm là tiêm trong cơ (intramuscular - I.M.). Theo một số phương án, liều virut được tiêm vào động vật gặm nhấm là liều lây nhiễm 50% tế bào (median cell culture infectious dose -

$CCID_{50}$) nằm trong khoảng từ 10^3 đến 10^7. Theo các phương án khác, liều virut được tiêm vào động vật gặm nhấm này là $CCID_{50}$ nằm trong khoảng từ 10^3 đến 10^6. Theo một phương án, liều virut được tiêm vào động vật gặm nhấm này là $CCID_{50}$ nằm trong khoảng từ 4 x 10^3 đến 10^6. Theo một phương án khác, liều virut được tiêm vào động vật gặm nhấm này là $CCID_{50}$ nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^6. Theo một phương án bổ sung, liều virut được tiêm vào động vật gặm nhấm này là $CCID_{50}$ nằm trong khoảng từ 10^5 đến 10^6. Theo một phương án, liều virut được tiêm vào động vật gặm nhấm này là $CCID_{50}$ khoảng 10^6.

Mẫu động vật được tạo ra theo cách này là mẫu chuột nhắt đáng tin cậy bị bệnh thần kinh do nhiễm EV71 mà thể hiện độ giá trị trực diện, *tức là* các con vật này biểu hiện các dấu hiệu lâm sàng ở phạm vi toàn bộ có thể quan sát được qua phổ đầy đủ của bệnh thần kinh do sự nhiễm EV71 gây ra ở người bệnh, bao gồm NPE. Mẫu động vật này còn thể hiện độ giá trị cấu trúc đối với đặc điểm toàn bộ và mô bệnh học của bệnh, mà gần giống với các đặc điểm được báo cáo trong các ca nguy hiểm đến tính mạng ở người. Mẫu *in vivo* mới này thể hiện là công cụ có hiệu lực để nhận diện các sự kiện then chốt trong sinh bệnh học thần kinh EV71, để phân tích kỹ cơ chế của NPE do EV71 gây ra, phát triển phương thức điều trị mới và phép trị liệu kháng virut tiềm năng, và để thực hiện đánh giá tiền lâm sàng các vacxin mới.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp sàng lọc các dược chất kháng virut. Theo khía cạnh này, phương pháp này bao gồm các bước sau: cung cấp nhóm động vật thử nghiệm và nhóm động vật đối chứng trong đó các động vật trong mỗi nhóm là các động vật của mẫu động vật được mô tả trong bản mô tả này; cho nhóm thử nghiệm này dùng dược chất kháng virut chọn lọc; giám sát tiến triển của bệnh trong nhóm thử nghiệm và nhóm đối chứng; so sánh tiến triển của bệnh trong nhóm thử nghiệm với tiến triển của bệnh trong nhóm đối chứng; và chọn lọc dược chất kháng virut chọn lọc mà làm giảm sự tiến triển của bệnh trong nhóm thử nghiệm so với nhóm đối chứng. Theo một phương án, dược chất kháng virut trước tiên được sàng lọc trong dòng tế bào của động vật gặm nhấm thử nghiệm được lây nhiễm bởi virut entero 71 được làm thích ứng với dòng tế bào của động vật gặm nhấm trước khi sàng lọc ở các động vật. Theo một phương án khác, dược chất kháng virut trước tiên được sàng lọc trong dòng tế bào của động vật gặm nhấm thử

nghiệm được lây nhiễm bởi virut có nguồn gốc dòng vô tính (clone derived virus - CDV) chứa các đột biến trong VP1 trước khi sàng lọc ở các động vật.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp sàng lọc các vacxin kháng virut có hiệu quả. Theo khía cạnh này, phương pháp này bao gồm các bước sau: cung cấp nhóm động vật thử nghiệm và nhóm động vật đối chứng trong đó các động vật trong mỗi nhóm là các động vật của mẫu động vật được mô tả trong bản mô tả này; cho nhóm thử nghiệm này dùng vacxin kháng virut chọn lọc; giám sát tiến triển của bệnh trong nhóm thử nghiệm và nhóm đối chứng; so sánh tiến triển của bệnh trong nhóm thử nghiệm với tiến triển của bệnh trong nhóm đối chứng; và chọn lọc vacxin kháng virut chọn lọc mà làm giảm sự tiến triển của bệnh trong nhóm thử nghiệm so với nhóm đối chứng. Theo một phương án, vacxin kháng virut chọn lọc trước tiên được sàng lọc trong dòng tế bào của động vật gặm nhấm thử nghiệm được lây nhiễm bởi virut entero 71 được làm thích ứng với dòng tế bào của động vật gặm nhấm trước khi sàng lọc ở các động vật. Theo một phương án khác, vacxin kháng virut chọn lọc trước tiên được sàng lọc trong dòng tế bào của động vật gặm nhấm thử nghiệm được lây nhiễm bởi virut có nguồn gốc dòng vô tính (clone derived virus - CDV) chứa các đột biến trong VP1 trước khi sàng lọc ở các động vật.

Theo các phương pháp theo sáng chế, dung dịch gốc lớn được chuẩn hóa của chủng EV71 được làm thích ứng với dòng tế bào của động vật gặm nhấm được tạo ra, được chuẩn độ và được giữ trong tủ lạnh sâu (âm 80°C). Theo cách khác, dung dịch gốc lớn được chuẩn hóa của chủng virut có nguồn gốc dòng vô tính (CDV) chứa các đột biến trong VP1 được tạo ra, được chuẩn độ và được giữ trong tủ lạnh sâu (âm 80°C). Số lượng "được chuẩn hóa" (trên cơ sở tính toán thống kê) của động vật, như chuột nhắt Balb/c hoặc chuột nhắt NSG, được lây nhiễm bằng chủng virut với hàm lượng được chuẩn hóa. Dược chất kháng virut hoặc vacxin kháng virut chọn lọc được dùng cho động vật gặm nhấm được lây nhiễm ở các liều được chuẩn hóa khác nhau vào trước khi xuất hiện bệnh (đối với thử nghiệm về tác dụng phòng ngừa) hoặc vào lúc khởi phát bệnh (đối với thử nghiệm về tác dụng điều trị bệnh của dược chất). Theo một phương án, việc sàng lọc *in vitro* hiệu suất cao các hợp chất kháng EV71 được thực hiện bằng cách sử dụng các dòng tế bào nuôi cấy mô dễ bị nhiễm gây tan bào bởi chủng virut EV71 được làm thích ứng với dòng tế bào của động vật gặm nhấm, như các chủng được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm các chủng được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Theo một phương

án khác, việc sàng lọc *in vitro* hiệu suất cao các hợp chất kháng EV71 được thực hiện bằng cách sử dụng các dòng tế bào nuôi cấy mô dễ bị nhiễm gây tan bào bởi chủng virut có nguồn gốc dòng vô tính (CDV) chứa các đột biến trong VP1, như các chủng được mô tả trong bản mô tả này, kể cả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Việc sàng lọc in vitro được thực hiện bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Các hợp chất đầy triển vọng được chọn từ việc sàng lọc *in vitro* sau đó được sàng lọc *in vivo* trong mẫu động vật được mô tả trong bản mô tả này.

Như được thể hiện trong các ví dụ 2-8, việc cấy chuyển lần lượt thể phân lập EV71 của người (*EV71:BS*) tạo ra các chủng virut mà đạt được khả năng lây nhiễm *in vitro* các dòng tế bào của động vật gặm nhấm được nuôi cấy. Dòng tế bào nguyên bào sợi bám dính của chuột nhắt NIH/3T3, mà có nguồn gốc từ phôi chuột nhắt NIH/Swiss [46], được sử dụng để làm thích ứng với chủng EV71 của người để lây nhiễm các tế bào động vật gặm nhấm. Hai chủng được làm thích ứng NIH/3T3 này được mô tả - *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv*, trong đó *EV71:TLLm* thể hiện giai đoạn ban đầu (số lượng cấy chuyển 60) và *EV71:TLLmv* thể hiện giai đoạn muộn (số lượng cấy chuyển 100) của quá trình làm thích ứng. Trên cơ sở sự xuất hiện CPE do virut gây ra, kết quả đo các giá trị hàm lượng cao, và sự phát hiện dương tính của kháng nguyên virut thông qua việc nhuộm miễn dịch, các tác giả sáng chế đã phân loại sự nhiễm do virut gây ra trong các tế bào dưới dạng sinh sôi hoặc không sinh sôi. Sự nhiễm sinh sôi biểu hiện sự phát hiện kháng nguyên virut dương tính cũng như hàm lượng virut cao, không phụ thuộc vào sự quan sát CPE. Mặt khác, sự nhiễm không sinh sôi được đặc trưng bởi hàm lượng virut không đo được ở giới hạn thử nghiệm ngưỡng mặc dù sự phát hiện kháng nguyên virut và/hoặc sự quan sát CPE.

Còn thể phân lập lâm sàng *EV71:BS* chỉ nhiễm các dòng tế bào động vật linh trưởng, *EV71:TLLm* nhiễm một cách có sinh sôi các dòng tế bào của cả động vật linh trưởng và động vật gặm nhấm. Đáng lưu ý rằng mặc dù virut *EV71:TLLm* đã đạt được một cách thành công khả năng lây nhiễm các tế bào động vật gặm nhấm, mức độ thích ứng với các tế bào NIH/3T3 là ít rõ rệt. Hàm lượng virut được xác định bằng cách sử dụng các tế bào Vero là cao hơn nhiều so với hàm lượng xác định được trong các tế bào NIH/3T3, như được biểu thị bởi các trị số âm tính trong thử nghiệm đánh giá mức độ sao chép tương đối (relative replication rate - RRR) (Fig.5C và 5D). Ngoài ra, *EV71:TLLm*

lây nhiễm thành công các tế bào Vero dẫn đến CPE đầy đủ ở các nhiệt độ ủ khác nhau còn nó chỉ có thể đạt được CPE đầy đủ trong NIH/3T3 bị nhiễm ở nhiệt độ 37°C (Bảng 1). Sự phù hợp hơn trong các tế bào chuột nhắt, đã thu được virut *EV71:TLLmv*, là chủng virut mà biểu hiện mức độ thích ứng cao hơn với các tế bào chuột nhắt (Fig.5B) nhưng với cái giá phải trả là thu hẹp phổ của các tế bào vật chủ cho phép nhiễm. *EV71:TLLmv* không lây nhiễm các dòng tế bào động vật linh trưởng một cách có hiệu quả bằng các tế bào chuột nhắt mặc dù nó thể hiện sự nhiễm thành công dẫn đến CPE đầy đủ của các tế bào NIH/3T3 được ủ ở phạm vi nhiệt độ rộng hơn (Bảng 1). Tuy nhiên, so với virut tìm ra trước *EV71:TLLm*, *EV71:TLLmv* dường như bị mất khả năng xâm nhập vào và sao chép trong các tế bào COS-7 thận khỉ, cũng như các tế bào HeLa và Hep-2 của người (Fig.3B-3C; Fig.2B-2C, 2E-2F, và 2H-2I). Nó còn bị mất khả năng sao chép một cách có hiệu quả trong các tế bào CHO-K1 của chuột đồng và NRK của chuột cống (Fig.3B-3D; Fig.2K-2L và 2N-2O). Các quan sát này cho thấy rằng việc cấy chuyển tiếp virut này trong các tế bào NIH/3T3 làm tăng mức độ thích ứng trong các tế bào chuột nhắt với các giá phải trả là mất khả năng nhiễm trong các dòng tế bào có nguồn gốc khác.

Mặc dù không thể chỉ ra các đột biến thay thế axit amin nào là phù hợp với tế bào vật chủ NIH/3T3 của chuột nhắt, việc giải trình tự toàn bộ bộ gen của virut có thể tỏa sáng các cơ chế phù hợp tiềm năng. Hầu hết các đột biến thay thế axit amin được nhận diện thuộc về protein P1 (vỏ capsit) và ARN polymeraza (vùng 3D) (Bảng 2, 3), gợi ý hoạt tính protein virut được biến đổi khả thi trong việc xâm nhập và sao chép tế bào vật chủ. Sự tích tụ các đột biến trong vùng P1 được kỳ vọng từ khả năng nhận được của các chủng *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv* để lây nhiễm các tế bào vật chủ mới. Protein vỏ capsit tạo ra thuộc tính cấu trúc mà nhờ đó virut bắt đầu tương tác với tế bào vật chủ cho phép nhiễm thông qua thụ thể virut, thụ thể này gần đây đã được nhận diện là thụ thể "thanh thải" nhóm B thành viên 2 (SCARB2) [47] và sau được mô tả đặc điểm dưới dạng thụ thể tháo bỏ lớp vỏ virut chính của EV71 [48] và protein vỏ capsit này còn được dùng bởi một số thành viên thuộc loài virut entero A của người (Human Enterovirus A - HEV-A). Protein SCARB2 của người có độ đồng nhất trình tự gần 99% so với protein SCARB2 của các động vật linh trưởng khác. Mặt khác, protein SCARB2 của chuột nhắt có độ không tương đồng trình tự 15% so với protein của động vật linh trưởng [49], ngụ ý độ lệch cấu trúc đáng kể so với SCARB2 của động vật linh trưởng và có lẽ góp phần vào khả năng chống lại của các tế bào động vật gặm nhấm với sự nhiễm EV71 nguyên thể.

Có vẻ hợp lý là các đột biến phù hợp trong vỏ capsit của virut có thể làm cho virut có khả năng gắn kết với thụ thể tế bào chuột nhắt và dẫn đến sự xâm nhập và lây nhiễm thành công vật chủ mới.

Việc lập bản đồ các đột biến của protein vỏ capsit cho thấy rằng phần lớn các đột biến thay thế axit amin được nhận diện trong vùng P1 của virut nằm ở vùng được tiếp xúc của protein (Fig.11A-11D), đặc biệt, trong các vòng B-C, D-E, E-F, và G-H trên bề mặt của VP1. Các gốc VP1 150-180 chứa hẽm vỏ capsit virut mà gắn với protein SCARB2. Vùng này có tâm ở Gln-172 chứa epitop trung hòa VP1 chính ở các axit amin 163-177 [32]. Cả hai EV71:TLLm và EV71:TLLmv có các thay thế E167D và L169F trong vòng E-F của hẽm VP1 (Fig.11A-11B), các locus mà chưa được báo cáo trước đây. Các đột biến thay thế axit amin quan trọng khác gần vị trí tiếp giáp SCARB2 bao gồm N104D trong vòng B-C và S241L trong vòng G-H, mà nằm trong vòng bán kính 20 Å từ Gln-172. Đột biến VP1 S241L, cùng với K244E, trước đây đã được báo cáo từ việc cấy chuyển EV71 được làm thích ứng với dòng tế bào CHO vào chuột nhắt [50]. Đột biến này, cùng với VP2 K149I, đã thấy là có liên quan đến kiểu hình không có tính độc ở chuột nhắt con 5 ngày tuổi. Tuy nhiên, đột biến ngược ở VP1 241 từ Leu thành Ser [51] đã được báo cáo từ sự phù hợp trong mô não chuột nhắt NOD/SCID và đã thấy là có liên quan đến kiểu hình có tính độc của chuột nhắt. Đột biến VP1 E145A, mà ở xa so với vị trí tiếp giáp SCARB2 và nằm trong vòng D-E, là một đột biến chọn lọc khác để mang lại khả năng lây nhiễm các tế bào của chuột. Đột biến VP1 145 trước đây đã được báo cáo [34, 37] và đột biến E145A đơn tạo ra độc lực ở chuột nhắt NOD/SCID [51]. Một đột biến khác trong VP1 của EV71 kiểu gen C4, Q145E, có liên quan đến độc lực ở chuột nhắt 5 ngày tuổi [52]. Các đột biến phù hợp với tế bào chuột nhắt trong VP2, đặc biệt là các đột biến trong epitop trung hòa của các gốc 136-150 [53], cũng có thể góp phần vào khả năng lây nhiễm các tế bào động vật gặm nhấm của virut. Hai thay thế trong vòng E-F của VP2 được quan sát thấy trong *EV71:TLLm* (Fig.11C), trong khi ba thay thế có mặt trong *EV71:TLLmv* (Fig.11D). Không đột biến nào trong số các đột biến này đã được mô tả trước đây, mặc dù locut lân cận ở VP2 149 trong vòng E-F đã được đề cập trong các ấn phẩm [34, 50, 54] và được mô tả là đột biến phù hợp để cấy chuyển trong các tế bào biểu hiện quá mức PSGL-1 [55].

Để khảo sát vai trò có thể của các đột biến trong vùng P1 trong việc gắn kết với thụ thể virut để xâm nhập vào tế bào vật chủ, ARN virut *EV71:BS* được chuyển nạp vào trong các tế bào của chuột. Việc đưa trực tiếp ARN *EV71:BS* vào trong tế bào chất tế bào chuột nhắt dẫn đến sự nhiễm sinh sôi trong các tế bào NIH/3T3, như được gợi ý bởi sự quan sát thấy CPE do virut gây ra và hàm lượng virut có thể đo được trong dịch nổi môi trường nuôi cấy như được thử nghiệm trong các tế bào Vero (Fig.12). Tuy nhiên, việc tiêm lại dịch nổi virut lên trên các tế bào NIH/3T3 mới không gây ra sự nhiễm sinh sôi (Fig.6A) và không có kháng nguyên virut được phát hiện (Fig.S4H). Tương tự, quá trình chuyển nạp ARN *EV71:BS* vào trong các tế bào Neuro-2A, nhưng không phải sự nhiễm virut trực tiếp, dẫn đến kết quả nhuộm kháng nguyên dương tính trong các tế bào Neuro-2A (Fig.10C và, 10D) và hàm lượng virut có thể đo được (Fig.12). Dịch nổi virut được cấy chuyển lên trên các tế bào Vero và NIH/3T3 mới dẫn đến kết quả nhuộm kháng nguyên dương tính trong tế bào Vero (Fig.10I) nhưng không phải trong tế bào NIH/3T3 (Fig.10J). Dữ liệu này cho thấy rằng việc phá vỡ yêu cầu gắn kết thụ thể đối với sự xâm nhập tế bào vật chủ dẫn đến sự nhiễm và sản sinh thành công virut con cháu trong các tế bào NIH3T3 và Neuro-2A. Dữ liệu này còn minh họa rằng *EV71:BS* của người không thể xâm nhập thành công vào các tế bào NIH/3T3 và Neuro-2A của chuột nhắt thông qua thụ thể tế bào của chuột. Hơn nữa, dữ liệu này gợi ý rằng các đột biến trong vùng P1 của bộ gen *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv* đem lại cho virut khả năng gắn kết thụ thể có hiệu quả, và do đó, xâm nhập tế bào vật chủ.

Một số đột biến axit amin cũng được quan sát trong các vùng P2 và P3, mà mã hóa các protein của virut có tính quyết định trong việc sao chép virut và chiếm đoạt bộ máy dịch mã protein của tế bào vật chủ [56]. Các đột biến thích ứng này có thể có chức năng trong việc tối ưu hóa sự sao chép và sự dịch mã bộ gen EV71 trong các tế bào chuột nhắt. Chỉ có protein 3D của virut tích lũy 8 đột biến thay thế axit amin trong *EV71:TLLmv* và 4 trong *EV71:TLLm*, và cả hai chủng mà mỗi chủng thể hiện 1 đột biến trong 3B và 2 đột biến trong 3C. Việc tiêm trực tiếp ARN virut vào trong các tế bào TCMK giúp hiểu vai trò có thể của các đột biến thích ứng trong các protein không cấu trúc của virut. Mặc dù các tế bào TCMK đã thể hiện là có thể cho phép nhiễm *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv* (Fig.3B và 3D; Fig.4Q và 4R), quá trình chuyển nạp của ARN virut EV71:BS vào trong các tế bào TCMK không đạt được sự nhiễm thành công. Các tín hiệu kháng nguyên virut không được phát hiện trong các tế bào đã được lây nhiễm và được chuyển nạp (Fig.10E-

10F), và việc cấy chuyển dịch nổi virut lên trên các tế bào NIH/3T3 và Vero mới không thu được sự phát hiện kháng nguyên virut dương tính (Fig.10K và 10L). Hơn nữa, không có hàm lượng virut có thể thử nghiệm được trong cả hai tế bào đã được lây nhiễm và được chuyển nạp (Fig.12). Dữ liệu này gợi ý rằng ngoài các đột biến trong vùng vỏ capsit ra, các đột biến trong các vùng P2 và P3, mà được tìm thấy trong *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv*, là cần thiết để lây nhiễm thành công các tế bào TCMK.

Tin tưởng rằng đây là báo cáo thứ nhất về chủng EV71 ban đầu có nguồn gốc từ mẫu lâm sàng của người mà đã đạt được thành công khả năng lây nhiễm sinh sôi một số dòng tế bào của động vật gặm nhấm sau khi cấy chuyển liên tiếp trong dòng tế bào chuột nhắt. Các mức độ đột biến tương đối cao trong quá trình sao chép ARN dẫn đến các bộ gen biến thể mà có chức năng như kho di truyền các tính trạng kiểu hình cho tiềm năng thích ứng tương lai, và sự sao chép kết quả như là sự phân bố giả loài [57, 58] dẫn đến tính mềm dẻo động lực của bộ gen ARN virut truyền khả năng thích ứng với sự thay đổi môi trường [59, 60]. Mặc dù EV71 lây nhiễm chuột nhắt còn bú [34, 37, 38, 51] và các động vật gặm nhấm khác (ví dụ, chuột nhảy) [39] đã được báo cáo trước đây, không tài liệu nào được báo cáo là lây nhiễm sinh sôi*in vitro* các tế bào động vật gặm nhấm được nuôi cấy. Điều này có thể là do hàng rào di truyền cao liên quan đến các thay đổi chủ yếu trong kiểu hình và phạm vi vật chủ [58]. Thú vị là, đây là báo cáo thứ nhất về một số lượng lớn các đột biến thích ứng trong trình tự bộ gen đầy đủ liên ứng của EV71. Còn EV71 được làm thích ứng với chuột nhắt được nêu trong tài liệu trước đây báo cáo ít hơn 10 đột biến thay thế axit amin trong bộ gen [34, 38, 51], các tác giả sáng chế báo cáo 21 thay thế trong *EV71:TLLm* và 36 thay thế trong *EV71:TLLmv*, vẫn nhiều hơn số lượng lớn nhất các đột biến thích ứng được xác định trước đây [37]. Điều này gợi ý rằng vài lần cấy chuyển của virut trong mô chuột nhắt [34, 36, 37] có thể không đủ để phá vỡ hàng rào di truyền và làm thích ứng thành công virut để lây nhiễm các tế bào chuột nhắt được nuôi cấy. Thay vào đó, hàng trăm lần cấy chuyển liên tiếp có thể cần thiết, như được tiến hành trong nghiên cứu này.

Sự giới hạn tế bào vật chủ của EV71 gần đây đã được giải thích với luận chứng rằng EV71 sử dụng thụ thể "thanh thải" nhóm B thành viên-2 (SCARB2) làm thụ thể chức năng của nó để xâm nhập tế bào vật chủ [47] và tháo bỏ lớp vỏ virut trong thể nội bào [72]. Các protein SCARB2 của người và chuột chỉ có độ đồng nhất trình tự axit amin

84% [67] gợi ý sự khác biệt cấu trúc giữa hai protein này. Tình huống này giải thích sự không có khả năng nói chung của các thể phân lập lâm sàng EV71 để lây nhiễm các tế bào có nguồn gốc chuột nhắt, cũng như tính kháng nói chung của chuột nhắt và các động vật gặm nhấm khác với sự nhiễm EV71 thử nghiệm, mà làm phức tạp các nỗ lực trong việc phát triển các mẫu động vật nhỏ nhiễm EV71. Tuy nhiên, mặc dù sự không tương hợp virut-thụ thể này, các tác giả sáng chế đã cho thấy rằng một số tế bào của chuột hỗ trợ cho sự nhiễm EV71 khi giai đoạn ban đầu của sự nhiễm, *tức là* quá trình xâm nhập tế bào gián tiếp qua thụ thể, được tránh thông qua quá trình chuyển nạp ARN virut vào trong tế bào. *EV71:BS* không lây nhiễm các tế bào Neuro-2a và NIH/3T3 [71], nhưng quá trình chuyển nạp của ARN bộ gen virut dẫn đến sự biểu hiện của các protein EV71, việc gây ra tác dụng gây bệnh tế bào (CPE) tan bào, và sản sinh virut con cháu có thể sống được. Tương tự, virut sống trước đây đã được tạo ra sau khi chuyển nạp ARN virut gây bệnh viêm tủy xám (Poliovirus) vào trong các tế bào của động vật có vú [73-75], mặc dù các tế bào được sử dụng (HeLa) đã biết là cho phép sự nhiễm virut gây bệnh viêm tủy xám. Trong các thử nghiệm theo sáng chế, các tế bào Neuro-2a và NIH/3T3 nguyên bào sợi của nơron thần kinh chuột nhắt không cho phép nhiễm được chứng minh là hỗ trợ cho sự sao chép virut và tạo ra virut sống con cháu khi chuyển nạp ARN *EV71:BS* vào trong tế bào chất, gợi ý rằng môi trường bên trong của các tế bào của chuột chứa các yếu tố vật chủ cần cho sự nhiễm EV71 và hỗ trợ sự hoàn thành chu trình nhiễm virut, và rằng các protein EV71 có chức năng trong chất nguyên sinh của chuột. Kết quả này còn hàm ý rằng sự không nhiễm tế bào NIH/3T3 và Neuro-2a khi tiêm virut có thể do sai sót trong việc xâm nhập tế bào vật chủ gián tiếp qua thụ thể và tháo bỏ lớp vỏ, mà chủ yếu là chức năng của protein vỏ capsit. Các kết quả này là tương tự như các quan sát trước đây của các tác giả (trên đây hoặc [71]) và dẫn đến giả thuyết rằng các đột biến thay thế axit amin nhất định trong protein vỏ capsit *EV71:BS* có thể cho phép nó gắn kết với thụ thể của nó, từ đó dẫn đến sự xâm nhập của virut và tháo bỏ lớp vỏ, và tiếp theo lây nhiễm các tế bào chuột nhắt. Hai công cụ duy nhất - các chủng EV71 được làm thích ứng với dòng tế bào chuột nhắt (NIH/3T3) (*EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv*) và hai dòng tế bào chuột nhắt (Neuro-2a và NIH/3T3), đưa ra cơ hội khảo sát giả thuyết này.

Kiểu hình nhiễm của virut khảm có nguồn gốc dòng vô tính thể hiện protein vỏ capsit *EV71:TLLm* nhưng biểu hiện protein không cấu trúc *EV71:BS* (*CDV:BS[M-P1]*) xác nhận rằng "kiểu hình xâm nhập tế bào chuột nhắt" có thể được đem lại bởi protein vỏ

capsit có nguồn gốc từ chủng EV71 được làm thích ứng với dòng tế bào chuột nhắt. CDV khảm này đối xử tương tự như chủng EV71 được làm thích ứng với tế bào chuột nhắt và gây ra sự nhiễm sinh sôi trong các tế bào Vero, cũng như NIH/3T3 và Neuro-2a, với bằng chứng trực tiếp để hoàn thành chu trình nhiễm virut, *tức là* sản sinh virut con cháu có thể sống được. Hơn nữa, việc gây đột biến VP1 *EV71:BS* để đưa các đột biến thay thế axit amin K98E, E145A, và L169F và trong VP2 S144T và K149I dẫn đến sự nhiễm giới hạn các tế bào của chuột. Chỉ CDV có sự thay thế vùng *P1 EV71:TLLm* (*CDV:BS[M-P1]*) và CDV có các đột biến thay thế axit amin kết hợp VP1-K98E/E145A/L169F ($CDV{:}BS_{VP1}[K98E/E145A/L169F]$) có thể được cấy chuyển thành công trong các tế bào Neuro-2a và NIH/3T3 để tạo ra virut con cháu có thể sống được trong dịch nổi môi trường nuôi cấy thu được. Phần còn lại của CDV chứa các đột biến thay thế axit amin khác, một cách riêng rẽ hoặc trong các kết hợp khác nhau, thể hiện sự xâm nhập giới hạn vào trong các tế bào của chuột dẫn đến một chu trình sao chép, như được minh họa bởi sự quan sát thấy CPE và sự phát hiện các kháng nguyên virut trong các tế bào được tiêm. Virut con cháu sống không có mặt trong dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào đã được lây nhiễm, do việc tiêm lại của nó lên trên các tế bào chuột nhắt khỏe mạnh không gây ra sự nhiễm bệnh. Lý do thúc đẩy sự thất bại của việc sản sinh virut con cháu có thể sống được trong dịch nổi môi trường nuôi cấy của các tế bào được lây nhiễm bởi CDV này là không rõ, nhưng một khả năng có thể do sự không ổn định cấu trúc của vỏ capsit thu được sau đột biến. Các tác giả sáng chế nghi ngờ rằng các axit amin được đưa vào có thể không tương hợp với các axit amin khác kể cả protein, do đó, ảnh hưởng đến việc gấp cuộn toàn bộ protein vỏ capsit và thay đổi cấu trúc vỏ capsit. Giả thiết này nêu bật sự phức tạp của việc lắp ráp protein vỏ capsit, trong đó bốn protein virut (VP1-4) cùng nhau tương tác để tạo ra vỏ capsit chức năng. Do đó, các đột biến thay thế axit amin mà có thể cho phép virut gắn kết với các thụ thể mới cũng có thể có kết quả thê thảm, đặc biệt là nếu nó vô tình làm mất ổn định phức hợp vỏ capsit do không tương hợp với các gốc axit amin khác trong protein.

Các kết quả được thể hiện trong các ví dụ 10-17 cho thấy rằng ba thay thế VP1: K98E, E145A, và L169F là cần và đủ để gắn kết với thụ thể của nó trên các tế bào chuột nhắt và cho phép sự xâm nhập của EV71. Mặc dù, trước đây gốc VP1-169 không được nêu trong các tài liệu chuyên ngành, các gốc VP1-98 và VP1-145 trước đây đã được ngụ ý làm các chất đánh dấu để gắn kết các protein thụ thể PSGL-1 của người trên bạch cầu

[76]. Phân tích 1.702 trình tự VP1 của các thể phân lập lâm sàng EV71 được công bố trong Ngân hàng gen xác nhận khả năng sống, mặc dù, hiếm có, của thể đột biến VP1 kết hợp 98E/145A, mà xuất hiện chỉ trong 5 thể phân lập (0,3% cơ sở dữ liệu). Mặt khác, biến thể VP1-169F không quan sát được trong cơ sở dữ liệu được điều tra của các trình tự VP1 EV71, chứng tỏ sự hiếm có đặc biệt của nó. *CDV:BS$_{VP1}$[K98E/E145A/L169F]* có thể được cấy chuyển một cách ổn định lên trên các tế bào Neuro-2a và sản sinh xuất một cách nhất quán virut con cháu sống trong khi duy trì được các đột biến được đưa vào trong bộ gen virut trong ba lần cấy chuyển, gợi ý rằng virut này có thể sống được và ổn định ít nhất là trong các tế bào Neuro-2a. Do đó, có thể rằng việc đưa ba gốc này: VP1 98E, 145A, và 169F, vào trong các thể phân lập lâm sàng EV71 khác có thể cho phép nó lây nhiễm các tế bào của chuột, mặc dù điều này vẫn cần được chứng minh.

Tương tự như các kết quả trước đó mà EV71 sử dụng protein thụ thể "thanh thải" nhóm B thành viên-2 (SCARB2) làm thụ thể của nó để xâm nhập vào tế bào vật chủ và tháo bỏ lớp vỏ vào trong chất nguyên sinh [47, 72, 77], dữ liệu trong sáng chế này còn chứng tỏ rằng *EV71:TLLmv* được làm thích ứng với tế bào chuột nhắt sử dụng SCARB2 của chuột nhắt (mSCARB2) để lây nhiễm các tế bào của chuột. Virut gắn kết trực tiếp với mSCARB2 hòa tan tái tổ hợp *in vitro*, và việc ủ trước virut sống bằng protein trước khi tiêm lên trên các tế bào khỏe mạnh làm giảm mức độ nghiêm trọng của sự nhiễm tế bào. Hơn nữa, việc phong bế các bề mặt tự do của mSCARB2 trên các tế bào vật chủ bằng cách gắn kết với các kháng thể đa dòng kháng mSCARB2 làm giảm cả sự gắn kết virut trên các tế bào cố định và ức chế sự nhiễm của các tế bào sống. Các kết quả này còn thể hiện *EV71:TLLmv* gắn kết với protein SCARB2 của người (hSCARB2), mà virut sử dụng để lây nhiễm các tế bào của động vật linh trưởng. Việc gắn kết với và sự nhiễm các tế bào của động vật linh trưởng bởi *EV71:TLLmv* còn bị phong bế bởi các kháng thể kháng hSCARB2. Trong khi dữ liệu được nêu trong bản mô tả này chỉ thể hiện EV71:TLLmv, các kết quả còn được mở rộng đối với *EV71:TLLm*. *EV71:TLLmv* có nguồn gốc từ quá trình cấy chuyển tiếp của *EV71:TLLm* trong các tế bào NIH/3T3c, và chỉ vài đột biến thay thế axit amin được quan sát thấy giữa hai chủng EV71 được làm thích ứng với dòng tế bào chuột nhắt. Do đó, điều này chỉ ra rằng cả *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv* sử dụng mSCARB2 tế bào để lây nhiễm các tế bào động vật gặm nhấm.

Tương tự, cả *CDV:BS[M-P1]* và *CDV:BS$_{VP1}$[K98E/E145A/L169F]* sử dụng mSCARB2 để lây nhiễm các tế bào của chuột. Ủ trước các tế bào Neuro-2a bằng kháng

huyết thanh mSCARB2 phong bế sự nhiễm tế bào bởi virut, như được minh họa bởi mức độ gây ra CPE giảm và hàm lượng virut thấp hơn so với đối chứng. Dữ liệu gần đây cho thấy SCARB2 gắn kết với hẽm EV71 kích hoạt sự giải phóng "yếu tố túi", lipit trong hẽm vỏ capsit mà làm ổn định virion trưởng thành và được giả định là sphingosin trong EV71, [78], thúc đẩy một chuỗi các sự kiện trong việc tháo bỏ lớp vỏ virut: mở rộng vỏ capsit (để tạo ra 135-S hoặc hạt A), đẩy VP1 đầu tận cùng N và VP4 từ mối nối vỏ capsit trục gấp cuộn năm lần vào trong màng thể nội bào, và giải phóng ARN bộ gen virut vào trong tế bào chất của tế bào vật chủ [78-81]. Dữ liệu cấu trúc tinh thể SCARB2 của người gần đây còn phát hiện ra ống lipit đi qua toàn bộ protein [67], mà trong trường hợp chức năng SCARB2 là phân phối β-glucocerebrosidaza đến lysosom là không thích hợp, nhưng Dang và các đồng tác giả [72] đã đề cập đến rằng nó có chức năng như ống dẫn để loại bỏ và vận chuyển sphingosin từ hẽm vỏ capsit trong quá trình gắn kết SCARB2. Các gốc axit amin 140-151 của SCARB2, mà trình tự của chúng khác nhau cao giữa các protein của người và chuột, là vị trí gắn kết chủ yếu cho EV71 [49]. Vùng giống nhau này có vai trò như cổng kiểm soát việc mở và đóng ống lipit SCARB2, sự kiện được kích hoạt bởi độ pH axit trong quá trình tháo bỏ lớp vỏ virut. Gốc VP1-169 nằm trong hẽm vỏ capsit, và có thể có chức năng trực tiếp trong việc gắn kết SCARB2. Sự thay đổi mạnh mẽ từ leuxin sang phenylalanin ở vị trí này có thể biến đổi cấu trúc hẽm dẫn đến khớp tốt hơn với protein SCARB2 của chuột. Mặt khác, các gốc 98 và 145 của VP1, nằm trên rìa bao quanh hẽm vỏ capsit và có thể có chức năng khác ngoài việc gắn kết SCARB2. Đây là giả thuyết đơn giản, và nó cần thiết để phân tích cấu trúc của protein SCARB2 của chuột và vạch ra sự tương tác với vỏ capsit của virut để làm rõ cơ chế chính xác mà nhờ đó ba đột biến thay thế axit amin trên VP1 có thể đem lại "kiểu hình xâm nhập tế bào chuột nhắt."

Tin tưởng rằng đây là khảo sát khoa học đầu tiên về các đột biến đặc hiệu vị trí trên vỏ capsit EV71 mà gây ra sự nhiễm sinh sôi của các tế bào của chuột không cho phép nhiễm một cách tự nhiên. Các nghiên cứu trước đây đã nỗ lực khắc phục sự giới hạn vật chủ của virut thông qua sự thích ứng virut chọn lọc, như trong trường hợp cấy chuyển trong động vật sống để tạo ra các thể đột biến có kiểu nhiễm được cải thiện ở chuột nhắt [34, 37, 38, 82], hoặc sự biến đổi tế bào bằng cách biểu hiện lệch vị trí của protein SCARB2 của người [47, 69, 70, 83]. Sự không tương hợp của EV71 với SCARB2 của chuột nói chung giải thích cho tính kháng của chuột nhắt với sự nhiễm EV71, do đó, cản

trở sự phát triển của mẫu chuột nhắt nhiễm EV71. Điều này còn có thể giải thích tại sao hầu hết mẫu chuột nhắt nhiễm EV71 mà sử dụng chủng virut kiểu dại hoặc được làm thích ứng với chuột nhắt không tóm lược được phổ của các bệnh quan sát được trong sự nhiễm nặng ở người [34, 37, 38]. Mặt khác, chuột nhắt chuyển gen biểu hiện SCARB2 của người thể hiện các dấu hiệu nhiễm EV71 sâu rộng hơn mà không cần sự thích ứng của virut với chuột nhắt, nhưng phổ đầy đủ về các bệnh của người vẫn không thể được mô phỏng rõ ràng [69, 70]. Luận chứng trong bản mô tả này là các đột biến thay thế axit amin nhất định trong EV71 cho phép nó lây nhiễm các tế bào của chuột tạo ra bước đầu trong việc hiểu cơ chế phân tử mà cho phép *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv* được làm thích ứng với dòng tế bào chuột nhắt lây nhiễm một cách có hiệu quả các tế bào động vật gặm nhấm được nuôi cấy. Ngoài ra, có thể đưa ra một phương pháp khác để tạo ra mẫu chuột nhắt nhiễm EV71 để nghiên cứu sinh bệnh học chi tiết và sao chép phổ đầy đủ của các bệnh thần kinh được thấy trong việc nhiễm ở người.

Trong các ví dụ 22-25, lần đầu đã chứng minh được rằng chuột nhắt BALB/c con được tiêm virut entero 71 (EV71) được làm thích ứng với tế bào chuột nhắt thể hiện bệnh viêm não tủy cấp tính liên quan đến tình trạng phù phổi có nguồn gốc thần kinh (NPE) mà gần giống với bệnh học quan sát được ở người bệnh bị nhiễm. Các động vật được lây nhiễm bằng chủng virut thích ứng *EV71:TLLmv* thể hiện mức độ tổn thương mô do virut gây ra thay đổi trong cả vùng tế bào tháp và ngoại tháp của não, biểu hiện dưới dạng liệt, mất điều hòa và run, và phù hợp với bệnh học ở CNS được nhận diện trong các trường hợp nhiễm EV71 nguy hiểm đến tính mạng [91-95]. Hơn thế nữa, một số chuột nhắt biểu hiện suy kiệt hô hấp phù hợp với sự loạn chức năng thần kinh tự động. Dựa trên sự biểu hiện bệnh tại thời điểm làm chết không đau đớn, các chuột có thể được phân loại dễ dàng vào bốn nhóm: *Nhóm IA*, *nhóm IB, nhóm II* và *Sống sót.* Trong khi *Sống sót* không thể hiện các dấu hiệu của bệnh, chuột nhắt trong *nhóm II* thể hiện chứng liệt mềm dai dẳng và giảm cân nặng, còn chuột nhắt *nhóm IA* và *nhóm IB* còn bị bệnh thần kinh cấp tính mà gây chết toàn bộ trong vòng 3-7 DPI. Chuột nhắt *Nhóm IA* còn thể hiện sự suy kiệt hô hấp nặng rõ ràng mà không phải do suy tim sung huyết hoặc viêm phổi. Thay vào đó, các con vật trong *nhóm IA* thể hiện tổn thương mô sâu rộng trong thân não phía đuôi, đặc biệt là hành tủy, cùng với nồng độ catecholamin trong huyết thanh cao, gợi ý rõ ràng rằng các dấu hiệu hô hấp quan sát được trong các chuột nhắt được là kết quả của tình trạng phù phổi có nguồn gốc thần kinh (NPE). Sự so sánh toàn bộ bệnh lý của phổi từ chuột nhắt

nhóm IA với bệnh lý của phổi từ các nhóm khác phát hiện ra sự xẹp phổi chưa hoàn toàn khi giải phẫu, cũng như khối lượng ướt của phổi được tăng một cách đáng kể, có khả năng do sự xuất huyết và rò dịch vào trong khoang phế nang. Các dấu hiệu này gần giống với các dấu hiệu quan sát được trong các mẫu động vật thử nghiệm bị NPE không phải do virut gây ra và các trường hợp nguy hiểm đến tính mạng ở người bị NPE bạo phát [96, 97]. Thực vậy, phân tích mô bệnh học của các chuột *nhóm IA* còn phát hiện các vùng ổ của khoang phế nang có đầy protein và chất rỉ ra chứa hồng cầu, phù hợp với các quan sát trong các trường hợp nguy hiểm đến tính mạng ở người [21, 98-100].

Tình trạng phù phổi (PE) thường được xác định dưới dạng sự tăng ngoài mạch máu về hàm lượng nước của phổi,48 và có thể được phân tiểu loại dựa trên nguồn gốc tim hoặc thần kinh. Vì các mô tim của chuột nhắt *nhóm IA* thể hiện mô học bình thường và hiển nhiên không có các dấu hiệu của bệnh, các tác giả sáng chế có thể loại trừ PE có nguồn gốc tim, và việc không có sự sao chép virut hoặc chứng viêm trong nhu mô phổi loại trừ tổn thương mô do virut gây ra trực tiếp. Thay vào đó, các tác giả sáng chế đã phát hiện nồng độ catecholamin trong huyết thanh cao trong chuột nhắt *nhóm IA*, rõ ràng chứng tỏ rằng nhóm này thể hiện PE có nguồn gốc thần kinh (NPE), mà trước đây đã được chứng minh là kết quả là của cơn bão catecholamin gây ra bởi sự phóng giao cảm nặng [96, 101]. Trong tình huống này, sự loạn chức năng hệ thần kinh tự chủ kích hoạt cơn bão catecholamin, gây ra sự co mạch phổi và toàn thân. Điều này dẫn đến sự thay đổi thể tích máu từ hệ tuần hoàn toàn thân sang phổi, mà lên đến cực điểm là sự thoát huyết tương và sự xuất huyết vào trong khoang phế nang thông qua cơ chế thủy tĩnh hoặc do tổn thương nội mô phổi trực tiếp [101-104]. Trong khi một số mẫu động vật thử nghiệm bị NPE không phải do virut gây ra đã được nghiên cứu trong những năm gần đây (xem Sedy [103] and Davison [104] để xem xét), mẫu động vật trong sáng chế này là mẫu đầu tiên gây ra thành công các dấu hiệu kinh điển của tình trạng phù phổi chỉ bằng cách nhiễm EV71. Do đó, mẫu mới theo sáng chế tạo nên sự cải tiến đáng kể trong quá trình tìm kiếm các phép trị liệu và chế độ điều trị kháng virut mà có thể hạn chế sự nhiễm EV71 và phòng ngừa sự khởi phát của NPE bạo phát ở người bệnh. Mặc dù, có thể rằng tình trạng phù phổi cũng có thể được gây ra bởi cơn bão xytokin của vật chủ trong đáp ứng với sự nhiễm EV71 [105-107], dữ liệu này gợi ý rõ ràng rằng cơ chế chủ yếu của NPE do EV71 gây ra không liên quan đến đáp ứng viêm ồ ạt và thay vào đó có liên quan đến tổn thương mô trong các vùng cụ thể của não.

Các vùng não liên quan đến sự gây ra NPE đã được chỉ định là các vùng kích hoạt, bao gồm nhân cận não thất và nhân lưng dưới đồi [101, 103], và hành tủy bụng bên và mặt lưng, kể cả các vùng NTS và AP [96, 104, 108-110]. NPE do EV71 gây ra trước đây đã được cho là do tổn thương sâu rộng của mô thân não [21, 22, 93, 111], và trong mẫu chuột mới theo sáng chế, các tác giả đã phát hiện được cả các kháng nguyên virut và tổn thương sâu rộng trong thân não và tủy sống. Trong khi chuột nhắt *nhóm IA* và *nhóm IB* thể hiện sự phân bố các tổn thương và kháng nguyên virut tương tự trong thân não và tủy sống, cũng như sự điều chỉnh lên tương đương của catecholamin trong huyết thanh, sự không có NPE trong các chuột *nhóm IB* có thể được giải thích bởi sự giảm số lượng và mức độ nghiêm trọng của tổn thương não và/hoặc cường độ kháng nguyên virut thấp hơn trong NTS, nhân lưới tủy xương (medullary reticular nuclei - MdRN), và các vùng AP của hành tủy, nhân răng trong tiểu não, và nhân lưng của dưới đồi trước. Do đó, các tác giả sáng chế đề cập đến rằng sự hủy hoạt nặng, cấp tính của mô thân não, đặc biệt là sự hủy hoại liên quan đến các vùng vận mạch, gây ra cơn bão catecholamin ở vật chủ bị nhiễm EV71, và điều này có thể tiến triển thành NPE nếu các vùng kích hoạt đã biết bị tổn thương đủ.

Tóm tại, sáng chế là mẫu động vật đáng tin cậy bị bệnh thần kinh do nhiễm EV71 mà thể hiện độ giá trị trực diện [112], tức là các con vật này biểu hiện các dấu hiệu lâm sàng ở phạm vi toàn bộ có thể quan sát được qua phổ đầy đủ của bệnh thần kinh do sự nhiễm EV71 gây ra ở người bệnh, bao gồm NPE. Việc quan sát dấu hiệu xác nhận ở chuột nhắt bị nhiễm *EV71:TLLmv* thể hiện các dấu hiệu *nhóm IA* của bệnh được thực hiện bằng viđeo bao gồm hai đoạn viđeo của hai chuột *nhóm IA* khác nhau. Cả hai chuột đều không thể tự giữ thăng bằng và ở trong trạng thái hôn mê. Sự suy kiệt hô hấp nặng thể hiện dưới dạng nhịp thở nhanh với sự suy thoái dưới sườn rõ ràng ở chuột nhắt thứ nhất. Thở hổn hển, sự suy thoái dưới sườn và dịch có bọt chảy ra từ lỗ mũi được thấy ở chuột nhắt thứ hai. Việc quan sát dấu hiệu xác nhận ở chuột nhắt bị nhiễm *EV71:TLLmv* thể hiện các dấu hiệu *nhóm IB* của bệnh được thực hiện bằng viđeo của một chuột nhắt *nhóm 1B*. Chuột này không thể tự giữ thăng bằng và ở trong trạng thái sững sờ. Chứng liệt cùng bên của chân phải và run dai dẳng của chân trái sau cũng được quan sát thấy. Mẫu này còn thể hiện độ giá trị cấu trúc [112]đối với đặc điểm toàn bộ và mô bệnh học của bệnh, mà gần giống với các đặc điểm được báo cáo trong các ca nguy hiểm đến tính mạng ở người. Mẫu *in vivo* mới này thể hiện là công cụ có hiệu lực để nhận diện các sự

kiện then chốt trong sinh bệnh học thần kinh EV71, để phân tích kỹ cơ chế của NPE do EV71 gây ra, phát triển phương thức điều trị mới và phép trị liệu kháng virut tiềm năng, và để thực hiện đánh giá tiền lâm sàng các vacxin mới.

Việc thực hiện sáng chế sử dụng, trừ khi có chỉ dẫn khác, các kỹ thuật thông thường về hóa học, sinh học phân tử, vi sinh vật học, ADN tái tổ hợp, di truyền học, miễn dịch học, sinh học tế bào, sinh học nuôi cấy tế bào và chuyển gen, mà nằm trong phạm vi kỹ năng của lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Maniatis *et al.*, 1982, *Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning*, 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook and Russell, 2001, *Molecular Cloning*, 3rd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Green and Sambrook, 2012, *Molecular Cloning*, 4th Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Ausubel *et al.*, 1992), *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, including periodic updates); Glover, 1985, *DNA Cloning* (IRL Press, Oxford); Russell, 1984, *Molecular biology of plants: a laboratory course manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York, 1992); Guthrie and Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Academic Press, New York, 1991); Harlow and Lane, 1988, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Riott, *Essential Immunology*, 6th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988; Fire et al., *RNA Interference Technology: From Basic Science to Drug Development*, Cambridge University Press, Cambridge, 2005; Schepers, *RNA Interference in Practice*, Wiley-VCH, 2005; Engelke, *RNA Interference (RNAi): The Nuts & Bolts of siRNA Technology*, DNA Press, 2003; Gott, *RNA Interference, Editing,*

and Modification: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), Human Press, Totowa, NJ, 2004; Sohail, *Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application*, CRC, 2004.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả bằng cách đưa ra các ví dụ sau, các ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa, và không được dự định giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ. Các kỹ thuật chuẩn đã biết trong lĩnh vực này hoặc các kỹ thuật được mô tả cụ thể dưới đây được dùng

Ví dụ 1

Nguyên liệu và phương pháp trong các ví dụ 2-8

Các dòng tế bào và các chủng virut: Tất cả các dòng tế bào được sử dụng trong nghiên cứu này được mua từ Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ (American Tissue Type Culture Collection) (ATCC, USA). Các nghiên cứu được thực hiện bằng cách sử dụng các dòng tế bào động vật có vú khác nhau; các dòng tế bào caxinom tuyến của người HeLa (CCL-2) và HEp-2 (CCL-23), và sacom cơ vân RD (CCL-136); Vero thận khỉ xanh châu Phi (CCL-81), và COS-7 nguyên bào sợi thận khỉ Vervet (CRL-1651); Neuro2A u nguyên bào thần kinh chuột nhắt (CCL-131), NIH/3T3 nguyên bào sợi phôi (CRL-1658), và TCMK biểu mô thận (CCL-139); CHO-K1 giống biểu mô buồng trứng chuột đồng (CCL-61), và NRK biểu mô thận chuột cống bình thường (CRL-6509).

Chủng *EV71 BS* của người (*EV71:BS*) trước đây đã được phân lập từ thân não của bệnh nhân đã chết bị nhiễm EV71. Virut này được cấy chuyển trong các tế bào Vero trong bốn chu kỳ trước khi bảo quản ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng tiếp. Chủng *EV71:TLLm* được làm thích ứng với tế bào chuột nhắt (NIH/3T3) có nguồn gốc từ chủng EV71:BS thông qua sự cấy chuyển theo chuỗi liên tục (>60 chu kỳ) trong các tế bào NIH/3T3 của chuột nhắt. Chủng *EV71:TLLm* được cấy chuyển tiếp (40 chu kỳ) trong các tế bào NIH/3T3 để tạo ra chủng có tính độc được làm thích ứng với tế bào chuột nhắt (*EV71:TLLmv*).

Duy trì dòng tế bào và lây nhiễm bằng virut: Tất cả các dòng tế bào được phát triển trong môi trường Eagle cải biến của Dulbecco (DMEM, Gibco, USA) được bổ sung 10% (thể tích/thể tích) huyết thanh thai bò (FBS, i-DNA Singapore) và 0,22% (khối

lượng/thể tích) natri bicacbonat ($NaHCO_3$, Sigma Aldrich, USA) và được ủ ở nhiệt độ 37°C và 5% CO_2, trừ khi có chỉ dẫn khác. Tất cả các tế bào đã được lây nhiễm được ủ trong môi trường duy trì (DMEM được bổ sung 1% FBS và 0,22% $NaHCO_3$).

Các tế bào (2,5-5,0×10^5 tế bào mỗi giếng) được nuôi cấy trong đĩa sáu lỗ được xử lý bằng môi trường nuôi cấy mô (Nunc, Fisher Scientific) qua đêm, được lây nhiễm bằng 500 µl huyền phù virut (MOI 1), và được ủ ở nhiệt độ 30°C, 37°C, hoặc 39°C trong 2 giờ. Các tế bào được rửa hai lần trong dung dịch nước muối đệm phosphat vô trùng (PBS, độ pH=7,4) trước khi bổ sung môi trường duy trì mới (DMEM, 1% FBS). Các tế bào đã được lây nhiễm được quan sát hằng ngày về sự xuất hiện tác dụng gây bệnh tế bào (CPE) tan bào khác biệt.

Đối với các nghiên cứu động lực sự sinh trưởng của virut, các đĩa chứa các tế bào đã được lây nhiễm được làm đông ở nhiệt độ -80°C ở các thời điểm khác nhau: 0, 6, 12, 24, 36, 48, và 54 giờ sau khi nhiễm (hours post-infection - hpi). Các đĩa được đưa vào ba chu kỳ làm đông và làm tan, và dịch tan được thu lại và được làm trong bằng cách lắc mạnh tiếp theo ly tâm ở tốc độ 1,500×g (15,000 m/s^2) trong 10 phút. Dịch nổi đã trong được bảo quản trong ống cryovial (ống bảo quản nguyên liệu ở nhiệt độ rất thấp) (Nunc, Fisher Scientific) ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng tiếp.

Đối với các thử nghiệm đánh giá sự phù hợp về nhiệt độ, các tế bào Vero và NIH/3T3 đã được tiêm được ủ ở nhiệt độ 30°C, 37°C, và 39°C và được quan sát hằng ngày về sự xuất hiện của CPE. Dịch nổi môi trường nuôi cấy tương ứng được thu ở 48 hpi và được bảo quản trong các ống cryovial ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng tiếp.

Các dòng tế bào động vật có vú khác nhau, tức là các tế bào RD, HeLa, và HEp-2 (của người), Vero và COS-7 (của khỉ), NIH/3T3, Neuro-2A, và TCMK (của chuột nhắt), CHO-K1 (của chuột đồng), và NRK (của chuột cống), được lây nhiễm bằng chủng *EV71:BS* gốc hoặc chủng EV71 được làm thích ứng với NIH/3T3 thu được ở MOI (multiplicity of infection - hệ số nhiễm) bằng 1 và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 10 ngày. Các môi trường nuôi cấy được quan sát hằng ngày về sự xuất hiện của CPE.

Xác định hàm lượng virut và mức độ sao chép tương đối (relative replication rate - RRR): Dịch nổi virut được đem chuẩn độ điểm cuối và được thử nghiệm trong cả hai tế bào NIH/3T3 và Vero. Hàm lượng virut được tính bằng cách sử dụng phương pháp Reed and Muench [61] và máy tính Reed and Muench [62]. Nói ngắn gọn, các tế bào NIH/3T3

(1×10^4 tế bào mỗi giếng) và Vero (4×10^3 tế bào mỗi giếng) được nuôi cấy qua đêm trong đĩa 96 giếng. Virut đông đã được làm tan đến nhiệt độ trong phòng được pha loãng (10^{-1}) trong nước natri deoxycholat 1% vô trùng (Sigma Aldrich, USA), và được trộn mạnh trong 15 phút để làm phân rã virut. Virut đã phân rã được pha loãng theo bậc mười lần trong môi trường duy trì, và 100 µl virut đã pha loãng từ độ pha loãng 10^{-3} trở đi được bổ sung lên trên mỗi giếng chứa các tế bào. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C và được quan sát hằng ngày bằng cách soi bằng kính hiển vi quang học đảo ngược về sự xuất hiện của CPE khác biệt. Hàm lượng virut được báo cáo dưới dạng liều lây nhiễm 50% tế bào trên thể tích (50% cell culture-infectious doses per volume - $CCID_{50}$/ml).

Để đánh giá mức độ thích ứng của *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv* trong các tế bào NIH/3T3, dịch nổi virut thu được thu từ các dòng tế bào động vật linh trưởng và động vật gặm nhấm đã được lây nhiễm từ trước được đưa vào thư rnghiệm xác định hàm lượng virut bằng cách sử dụng cả hai tế bào NIH/3T3 và Vero. Tỷ lệ hàm lượng được sử dụng để đo mức độ sao chép tương đối (RRR) trong các tế bào NIH/3T3 và Vero được tính bằng cách sử dụng công thức sau:

$$RRR = \log (A/B)$$

trong đó *A* là hàm lượng virut được thử nghiệm trong các tế bào NIH/3T3, và *B* là hàm lượng virut được thử nghiệm trong các tế bào Vero.

Phát hiện kháng nguyên virut bằng thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch: Đối với các tế bào đã được lây nhiễm mà không thể hiện CPE đáng kể, việc nhuộm huỳnh quang miễn dịch (immunofluorescence - IF) được thực hiện để kiểm tra sự nhiễm. Các tế bào được trypsin hóa ở 72 hpi, được rửa hai lần trong PBS vô trùng, và được phủ lên trên các phiến kính Teflon (Erie, USA). Các phiến kính được làm khô bằng không khí bên trong tủ an toàn sinh học và được xử lý bằng UV trong 15 phút để làm bất hoạt virut sống trước khi cố định trong axeton lạnh ở nhiệt độ 4°C trong 10 phút. Các phiến kính được dò bằng kháng thể pan-virut entero (Merck Millipore, USA) và tiếp theo bằng IgG của chuột nhắt được tiếp hợp với FITC (DAKO Cytomation, Đan Mạch) đã được trộn với 0,01% (khối lượng/thể tích) chất phản nhuộm màu xanh da trời của Evan.

Chuyển nạp các tế bào bằng ARN virut EV71: Các tế bào Vero và NIH/3T3 (3×10^4 tế bào mỗi giếng) được nuôi cấy qua đêm trong đĩa 24 giếng được chuyển nạp bằng ARN virut được chiết từ 4×10^6 $CCID_{50}$ virut bằng cách sử dụng Lipofectamine

2000 (Life technologies, USA) theo quy trình của nhà sản xuất. ARN từ *EV71:BS*, *EV71:TLLm*, và *EV71:TLLmv* được chiết bằng cách sử dụng kit ARN virut (Qiagen, Đức) và được ủ bằng Lipofectamine 2000 trên các tế bào trong 6 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các tế bào đã được chuyển nạp được quan sát hằng ngày về sự xuất hiện của CPE. Ở 7 dpi, dịch nổi được thu từ các tế bào đã được lây nhiễm và được cấy chuyển lên trên các tế bào Vero và NIH/3T3 mới được nuôi cấy. Các tế bào được quan sát hằng ngày về sự xuất hiện của CPE, và ở 7 dpi, các tế bào được trypsin hóa và được xử lý để phát hiện kháng nguyên virut bằng huỳnh quang miễn dịch.

Giải trình tự bộ gen đầy đủ và lập bản đồ di truyền của các chủng EV71: ARN virut của các chủng *EV71:BS*, *EV71:TLLm*, và *EV71:TLLmv* được chiết bằng cách sử dụng kit ARN virut (Qiagen, Đức) và được phiên mã ngược bằng cách sử dụng Superscript II (SII-RT, Life Technologies, USA). cADN thu được được khuếch đại bằng GoTaq Green (Promega, USA) và các đoạn mồi EV71 thoái hóa (các trình tự của đoạn mồi là có sẵn khi yêu cầu). Amplicon được tinh chế bằng cách sử dụng kit PCR làm sạch (PCT clean up kit) (Geneaid Biotech, Đài Loan) và được tách dòng vào vectơ pZero2 (Lifetech, USA). Các dòng vô tính được chọn từ các đĩa Kanamycin, được tiêm vào canh LB (50 µg/ml Kanamycin) và được để phát triển qua đêm ở nhiệt độ 37°C để chiết plasmit bằng kit QiaSpin Miniprep (Qiagen, Đức). Tiếp theo, các plasmit được giải trình tự bằng phương pháp trình tự kết thúc BigDye (Applied Biosystems, USA) bằng cách sử dụng các đoạn mồi giống nhau. Các trình tự mảnh dài 500 bp thu được được bắt cặp bằng cách sử dụng BioEdit v7.0.9.0 [63] đối với trình tự toàn bộ bộ gen của thể phân lập Singapore EV71 3799-SIN-98 (Mã ngân hàng gen. DQ341354.1) để cấu trúc lại các trình tự bộ gen đầy đủ của *EV71:BS*, *EV71:TLLm*, và *EV71:TLLmv*. Việc tạo mô hình phân tử của các protome của *EV71:TLLm*, và *EV71:TLLmv* được thực hiện bằng cách sử dụng Deepview/Swiss pdbviewer ver. 3.7 (http colon slash slash expasy dot org slash spdbv slash) và máy chủ SWISS-MODEL [64, 65].

Ví dụ 2

Các dòng tế bào động vật linh trưởng chứ không phải các dòng tế bào của động vật gặm nhấm có thể cho phép nhiễm *EV71:BS*

Tất cả các dòng tế bào động vật linh trưởng được sử dụng trong nghiên cứu này là có thể cho phép nhiễm virut *EV71:BS*. Các tế bào RD của người, cũng như các tế bào

Vero và COS-7 của khỉ, thể hiện tác dụng gây bệnh tế bào (CPE) tan bào đầy đủ trong 48 giờ sau nhiễm (hpi) (Fig.1A, 1J, và 1M), và các kháng nguyên virut được phát hiện trong các tế bào đã được lây nhiễm đã được cố định (Fig.2A-Fig.2L; số liệu không được thể hiện đối với các tế bào RD, COS-7 và Vero). Đường cong động học sự sinh trưởng của virut thu được từ dịch nổi của các dòng tế bào đã được lây nhiễm khác nhau xác nhận sự nhiễm sinh sôi trong các tế bào RD, Vero, và COS-7 (Fig.3A). Virut thu được từ các tế bào RD và Vero đã đạt hàm lượng điểm cuối là 3×10^9 $CCID_{50}$/ml, trong khi hàm lượng virut từ COS-7 bằng 10^6 $CCID_{50}$/ml (Fig.3A). *EV71:BS* không gây ra CPE đầy đủ trong các tế bào HeLa và Hep-2 (Fig.1D và 1G), và hàm lượng virut thu được không đo được trong giới hạn ngưỡng thử nghiệm. Tuy nhiên, kháng nguyên virut được phát hiện bằng cách nhuộm huỳnh quang miễn dịch gián tiếp trong cả hai tế bào HeLa (Fig.2a) và Hep-2 (Fig.2D) cho thấy sự xâm nhập thành công của virut vào trong các tế bào nhưng sự sao chép không hiệu quả hoặc khiếm khuyết có thể dẫn đến hàm lượng virut không đo được.

Tất cả các dòng tế bào của động vật gặm nhấm được thử nghiệm được xác định là không cho phép nhiễm *EV71:BS*. CPE tan bào của các tế bào là không thấy sau khi nhiễm (Fig.4A, 4D, 4G, 4J và 4M), hàm lượng virut từ dịch nổi là không đo được, và các kháng nguyên virut không thể được phát hiện trong các tế bào được tiêm (Fig.2G, 2J và 2M; Fig.10A, 10C và 10E).

Ví dụ 3

Cả hai dòng tế bào động vật linh trưởng và động vật gặm nhấm bị nhiễm một cách có sinh sôi virut *EV71:TLLm* được làm thích ứng với tế bào chuột nhắt (NIH/3T3)

EV71:TLLm thu được sau khi cấy chuyển theo chuỗi *EV71:BS* trong dòng tế bào chuột nhắt NIH/3T3 trong tối thiểu 60 chu kỳ. Tất cả các dòng tế bào động vật linh trưởng và động vật gặm nhấm được thử nghiệm, ngoại trừ các tế bào NRK, là có thể bị nhiễm có sinh sôi bởi *EV71:TLLm*. CPE đầy đủ được quan sát trong các tế bào RD, Vero, và COS-7 (Fig.1B, 1K, và 1N), cũng như NIH/3T3 và Neuro-2A (Fig.4B, E) ở 48 hpi. Hàm lượng virut cao có thể đo được trong dịch nổi thu được từ tất cả các dòng tế bào đã được lây nhiễm ngoại trừ NRK (Fig.3C và 3D), và các tế bào đã được lây nhiễm được thử nghiệm là dương tính với kháng nguyên virut bằng thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch gián tiếp (Fig.2B, 2E, 2H, 2K và 2N). CPE đầy đủ và hàm lượng virut có thể đo được không quan sát được trong các tế bào NRK (Fig.4N; Fig.3D), nhưng các kháng

nguyên virut có thể được phát hiện (Fig.2K), cho thấy sự xâm nhập thành công của virut vào trong các tế bào NRK bởi *EV71:TLLm* nhưng sự sao chép virut không hiệu quả có thể dẫn đến hàm lượng virut không đo được.

Ví dụ 4

Các dòng tế bào của động vật gặm nhấm nhưng không phải tất cả các dòng tế bào động vật linh trưởng bị nhiễm một cách có sinh sôi bởi virut *EV71:TLLmv* được làm thích ứng với tế bào chuột nhắt (NIH/3T3)

Chủng virut *EV71:TLLmv* thu được từ việc cấy chuyển tiếp EV71:TLLm trong các tế bào NIH/3T3 trong 40 chu kỳ nữa. EV71:TLLmv gây ra CPE tan bào trong một số lượng dòng tế bào ít hơn - các tế bào RD, Vero, NIH/3T3, Neuro-2A, và TCMK (Fig.3B), và CPE đầy đủ chỉ quan sát được trong các tế bào RD, NIH/3T3, và Neuro-2A (Fig.1C; 4C, F). Các tế bào TCMK, CHO-K1 và NRK còn được lưu ý là có thể cho phép nhiễm mà không tiến triển thành CPE đầy đủ (Fig.4I, L, O), như được thể hiện bởi sự phát hiện kháng nguyên virut dương tính trong các tế bào đã được lây nhiễm (Fig.2L, 2O, và 2R).

Mặt khác, các dòng tế bào động vật linh trưởng HeLa, Hep-2, và COS-7 được quan sát thấy là không cho phép nhiễm *EV71:TLLmv*, như được thể hiện bởi sự không có CPE (Fig.1F, 1I, và 1O), hàm lượng virut không đo được (Fig.3B), và sự phát hiện kháng nguyên virut âm tính (Fig.2C, 2F, và dữ liệu không được thể hiện).

Ví dụ 5

Virut *EV71:TLLmv* thể hiện mức độ thích ứng cao hơn với các tế bào NIH/3T3, trong khi *EV71:TLLm* phù hợp hơn để sao chép trong các tế bào Vero

Lượng virut có thể sống được trong dịch nổi thu được từ các tế bào đã được lây nhiễm ở các thời điểm khác nhau được xác định bằng cách tính hàm lượng virut trong cả hai tế bào Vero và NIH/3T3. Tỷ lệ sinh sản tương đối (*RRR*), được tính bằng cách lấy tỷ lệ của trị số hàm lượng virut được thử nghiệm trong NIH/3T3 và trị số hàm lượng được thử nghiệm trong Vero, được sử dụng làm biện pháp đo thay thế mức độ thích ứng của virut với các tế bào NIH/3T3. Virut *EV71:BS* gốc thể hiện trị số *RRR* âm cao đối với RD, Vero, và COS-7 (Fig.5A), cho thấy rằng hàm lượng virut được thử nghiệm trong các tế bào Vero vượt xa hàm lượng được thử nghiệm trong các tế bào NIH/3T3. Các trị số tỷ lệ

sinh sản tương đối đối với các dòng tế bào khác không thể xác định được vì hàm lượng virut không thể đo được. Mặt khác, virut *EV71:TLLmv* thể hiện các trị số *RRR* dương tính, ngoại trừ virut được nhân giống trong các tế bào Vero (Fig.5B). Các trị số *RRR* dương tính là chỉ báo sự sao chép có hiệu quả hơn, và do đó, các trị số hàm lượng cao hơn, trong các tế bào NIH/3T3 so với các tế bào Vero. Trị số *RRR* âm được xác định đối với *EV71:TLLmv* thu được từ các tế bào Vero là nhất quán với động học sự sinh trưởng chậm (Fig.3B) và hàm lượng virut thấp hơn quan sát được. *EV71:TLLm* thể hiện các trị số *RRR* âm tính (Fig.5C và 5D), mặc dù mức độ nhỏ hơn so với các trị số *RRR* đối với *EV71:BS*. Điều này gợi ý rằng mặc dù *EV71:TLLm* có thể lây nhiễm một cách có sinh sôi vài dòng tế bào của động vật gặm nhấm, nó vẫn phù hợp để sao chép trong các tế bào Vero hơn so với các tế bào NIH/3T3.

Ví dụ 6

EV71:TLLm thể hiện khả năng thích ứng với sự thay đổi nhiệt độ tốt hơn so với *EV71:TLLmv*

Các tế bào Vero và NIH/3T3 được lây nhiễm EV71:BS gốc và các chủng *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv* được làm thích ứng với NIH/3T3 thu được được ủ ở các nhiệt độ khác nhau -30°C, 37°C, và 39°C, để xác định khả năng thích ứng của virut với sự biến thiên hoặc sự thay đổi nhiệt độ. EV71:BS thể hiện khả năng thích ứng bị hạn chế nhất, với CPE đầy đủ chỉ được quan sát trong các tế bào Vero được ủ ở nhiệt độ 37°C (Fig.8B; Bảng 1). *EV71:TLLmv* thể hiện khả năng thích ứng trung bình, dựa trên việc gây ra CPE đầy đủ quan sát được trong các tế bào Vero ở nhiệt độ 37°C (Fig.S2B) và trong các tế bào NIH/3T3 ở cả hai nhiệt độ 37°C và 39°C (Fig.8A, Fig.9A; Bảng 1). Mặt khác, *EV71:TLLm* thể hiện khả năng thích ứng lớn nhất, trong đó nó gây ra CPE đầy đủ trong các tế bào Vero đối với tất cả các nhiệt độ ủ (Fig.7B, Fig.8B, Fig.9B) mặc dù chỉ ở nhiệt độ 37°C trong các tế bào NIH/3T3 (Fig.8A; Bảng 1).

Bảng 1

Đánh giá khả năng thích ứng của virut *EV71:BS*, *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv* được phát triển trong các tế bào NIH/3T3 và Vero với các nhiệt độ ủ khác nhau

	Gây ra tác dụng gây bệnh tế bào (CPE) đầy đủ trong vòng 48 giờ sau khi nhiễm[1]					
Nhiệt độ ủ (°C)	*EV71:BS*		*EV71:TLLm*		*EV71:TLLmv*	
	Vero	NIH/3T3	Vero	NIH/3&3	Vero	NIH/3T3
30	-[2]	-	+	(30%)[3]	-	-

37	+[3]	-	+	+	+	+
39	(20%)[4]	-	+	(<10%)[3]	-	+

[1] Các tế bào đã được lây nhiễm được quan sát hằng ngày về các dấu hiệu chết tế bào tan bào và thời điểm xuất hiện CPE đầy đủ.

[2] Biểu thị sự không có CPE đầy đủ trong các tế bào đã được lây nhiễm.

[3] Biểu thị sự quan sát thấy CPE đầy đủ.

[4] Biểu thị sự không có CPE đầy đủ, đồng thời số trong ngoặc đơn biểu thị mức độ CPE lớn nhất quan sát được trong các tế bào.

Ví dụ 7

Các bộ gen virut của *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv* tích lũy nhiều đột biến sai nghĩa như là kết quả của sự phù hợp với các tế bào NIH/3T3

ARN virut của *EV71:BS*, *EV71:TLLm*, *EV71:TLLmv* được giải trình tự Sanger để xác định trình tự bộ gen liên ứng và nhận diện các đột biến phù hợp có thể nảy sinh từ quá trình làm thích ứng trong các tế bào NIH/3T3. Các trình tự liên ứng của các bộ gen thể hiện quần thể chiếm ưu thế của giả loài đã được lưu giữ trong Ngân hàng gen, NCBI (National Center for Biotechnology Information - Trung tâm thông tin công nghệ sinh học quốc gia). Sự bắt cặp các trình tự bộ gen đầy đủ của *EV71:TLLm* (Mã ngân hàng gen KF514879; SEQ ID NO.1) với *EV71:BS* (Mã ngân hàng gen KF514878; SEQ ID NO.3) phát hiện 60 đột biến nucleotit, 21 trong số đó dẫn đến sự đột biến thay thế axit amin (Bảng 2). Mặt khác, 83 đột biến với 36 đột biến thay thế axit amin, được lưu ý giữa các bộ gen của *EV71:TLLmv* (Mã ngân hàng gen KF514880; SEQ ID NO.2) và *EV71:BS*. Phần lớn các đột biến sai nghĩa nằm trong vùng P1 (các gen protein vỏ capsit) (Bảng 2), đặc biệt là trong gen protein VP1 (Bảng 3).

Các thay đổi axit amin cũng được quan sát thấy trong các vùng P2 và P3, đáng lưu ý nhất là trong ARN polymeraza phụ thuộc ARN (vùng 3D). *EV71:TLLm* tiếp nhận bốn thay đổi axit amin, hầu hết trong các miền gan bàn tay và ngón tay cái của enzym (Bảng 4). Mặt khác, *EV71:TLLmv* tích lũy tám các thay đổi axit amin, cũng chủ yếu trong các miền gan bàn tay và ngón tay cái của polymeraza. Các đột biến nucleotit cũng được quan sát thấy trong vùng không được dịch mã (untranslated region - UTR) 5′ của bộ gen. Ngoài các thay đổi bazơ ra, sự cài xen 1 bazơ được thấy trong *EV71:TLLm*, trong khi sự cài xen 4 bp và sự mất đoạn 20 bp được quan sát thấy trong 5′UTR *EV71:TLLmv* (các

bảng 2 và 3). Mặt khác, không có đột biến thay thế axit amin nào được quan sát thấy trong các vùng VP3 và 3A của *EV71:TLLm*, cũng như trong 3'UTR của cả hai *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv*.

Bảng 2

Các thay đổi nucleotit và axit amin trong bộ gen

của *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv* so với *EV71:BS*

	EV71:BS so với *EV71:TLLm*		*EV71:BS* so với *EV71:TLLmv*	
Vùng bộ gen	Số lượng thay đổi nucleotit	Số lượng thay đổi axit amin	Số lượng thay đổi nucleotit	Số lượng thay đổi axit amin
5' UTR	11	NA	11	NA
	Cài xen 1 bp		Cài xen 4 bp	
			Mất đoạn 20 bp	
P1	22	12	39	22
P2	11	2	11	2
P3	16	7	22	12
3' UTR	0	NA	0	NA
Tổng số	60	21	83	36

Bảng 3

Các đột biến phù hợp quan sát được trong các vùng 5'UTR và P1 của các bộ gen virut *EV71:TTLm* và *EV71:TLLmv*

	EV71:BS so với *EV71:TLLm*			*EV71:BS* so với *EV71:TLLmv*		
		Các thay đổi axit amin			Các thay đổi axit amin	
Vùng bộ gen	Các thay đổi nucleotit	Polyprotein[1]	Protein trưởng thành[2]	Các thay đổi nucleotit	Polyprotein	Protein trưởng thành
Cloverleaf				C140G		
IRES[3]	A141G			A141C		
	G195C			T209C		
	T209C			G258A		
	G258A			C370T		
	C370T			G448A		
	G448A			A502C		
	T502C			G675T		
	C709T			T677C		
	A671T			C687T		
	G675T			C709T		
	Cài xen T678			Cài xen 678-681		
				Mất đoạn 726-745		
VP4	A809G	E21G	E21G	A809C	E21G	E21G
VP2	G1359A	V204I	V135I	G1359A	V204I	V135I
	G1385C	S213T	S144T	G1385C	S213T	S144T

	A1400T	K218I	K149I	A1400T	K218I	K149I
				T1428C	E228P	E159P
				G1429C	E228P	E159P
VP3				G1900C	A385P	A62P
				A2287G	7514A	T191A
				A2421G	I558M	I235M
VP1	T2462C	V572A	V7A	T2462C	V572A	V7A
	C2725T	L660F	L95F	C2530A	Q595K	Q30K
	A2734G	K663E	K98E	A2719G	I658V	I93V
	A2752G	N669D	N104D	T2724A	D659E	D64E
	A2876G	E710A	E145A	C2725T	L660F	L95F
	A2943T	E732D	E167D	A2734G	K663E	K98E
	C2947T	L734F	L169F	A2752G		
	C3165	S806L	S241L	A2753G	N669G	N104G
				A2876C	E710A	E145A
				A2943T	E732D	E167D
				C2947T	L734F	L169F
				C3165T	S806L	S241L
				T3175C	Y810H	Y245H
				G3148A	V813I	V248I
				G3319T	A858S	A293S

[1] Đánh số axit amin trong polyprotein chưa được phân cắt trước khi trưởng thành.

[2] Đánh số axit amin trong protein trưởng thành.

[3] Vị trí xâm nhập ribosom bên trong.

Các đột biến dựa trên cơ sở sự bắt cặp với bộ gen *EV71:BS* tham chiếu.

Bảng 4

Các đột biến phù hợp quan sát được trong các vùng P2 và P3 của các bộ gen virut *EV71:TTLm* và *EV71:TLLmv*

	EV71:BS so với *EV71:TLLm*			*EV71:BS so với EV71:TLLmv*		
		Các thay đổi axit amin			Các thay đổi axit amin	
Vùng bộ gen	Các thay đổi nucleotit	Polyprotein[1]	Protein trưởng thành[2]	Các thay đổi nucleotit	Polyprotein	Protein trưởng thành
2A	G3772A	G992E	G130E	G3772A	G992E	G130E
2C	A4366G	T1207A	T96A	A4366G	T1207A	T96A
3A				C5117T	A1457V	A17V
3B	T5357C	L1537P	L119	T5357C	L1537P	L119
3C	A557G	I1604V	I56V	A557G	I1604V	I56V
	A5569G	I1608V	I60V	A5569G	I1608V	I60V
3D	A6211G	N1822D	N91D	A6070T	T1775S	T44S[3]
	T6835A	S2030T	S299T[3]	T6137C	V1797A	V66A
	A7128G	R2127S	R396S	A6211G	N1822D	N91D
	T7247C	V2167A	V436A	C6404G	S1886C	S155C
				T6592G	W1949G	W218G[5]
				T6835A	S2030T	S299T
				A7128G	R2127S	R396S[6]

				T7247C	V2167A	V436A

[1] Đánh số axit amin trong polyprotein chưa được phân cắt trước khi trưởng thành.

[2] Đánh số axit amin trong protein trưởng thành.

[3] Đột biến nằm trong miền ngón tay Ring của ARN polymeraza phụ thuộc ARN.

[4] Đột biến nằm trong miền gan bàn tay của ARN polymeraza phụ thuộc ARN.

[5] Đột biến nằm trong miền ngón tay cái của ARN polymeraza phụ thuộc ARN.

Các đột biến dựa trên cơ sở sự bắt cặp với bộ gen *EV71:BS* tham chiếu.

Ví dụ 8

Quá trình chuyển nạp của ARN virut *EV71:BS* vào trong các tế bào của chuột dẫn đến sự nhiễm sinh sôi nhưng virut con cháu không thể nhiễm lại vào cùng các tế bào chuột nhắt này

Các tế bào Vero và NIH/3T3 được chuyển nạp bằng ARN virut thể hiện CPE đầy đủ ở 7 ngày sau khi chuyển nạp (day post-transfection - dpt) (dữ liệu không được thể hiện). Các kháng nguyên virut được phát hiện trong các tế bào NIH/3T3 đã được chuyển nạp bằng ARN virut của *EV71:BS* (Fig.10B), nhưng không được phát hiện trong các tế bào NIH/3T3 được lây nhiễm bởi virut này (Fig.10A). Dịch nổi virut được tiêm lại lên trên các tế bào Vero và NIH/3T3 mới dẫn đến sự nhiễm sinh sôi (100% CPE) chỉ trong các tế bào Vero nhưng không phải trong các tế bào NIH/3T3 (Fig.6A), và sự phát hiện kháng nguyên virut xác nhận sự nhiễm trong các tế bào Vero, nhưng không phải trong các tế bào NIH/3T3 (Fig.6B).

Ví dụ 9

Nguyên liệu và phương pháp trong các ví dụ 10-17

Plasmit, virut, vi khuẩn, và dòng tế bào: Plasmit mã hóa cADN SCARB2 của chuột (pMD18-mSCARB2) (Mã ngân hàng gen NP_031670.1) được mua từ Sino Biological, Inc. (Beijing, Trung Quốc). Vectơ pQE30 (Qiagen, Đức) để biểu hiện tái tổ hợp protein mSCARB2 hòa tan trong các tế bào *E. coli* là quà tặng hào phóng từ Dr. Kian Hong Ng (Temasek Lifesciences Laboratory, Singapore). Các plasmit mã hóa cADN có chiều dài đầy đủ của EV71 được tạo ra bằng cách sử dụng plasmit có số lượng bản sao thấp pACYC177 (New England Biolabs, Singapore). Cấu trúc plasmit biểu hiện T7

polymeraza (pCMV-T7pol) là quà tặng hào phóng từ Dr. Peter McMinn của University of Sydney, New South Wales. Plasmit pZero-2 được dùng để giải trình tự mảnh của các virut có nguồn gốc dòng vô tính được mua từ Invitrogen (Life Technologies, USA).

Thể phân lập lâm sàng *EV71:BS* (Mã ngân hàng gen KF514878), *EV71:TLLm* (Mã ngân hàng gen KF514879.1), và *EV71:TLLmv* (Mã ngân hàng gen KF514880.1) được dùng trong nghiên cứu này được mô tả trên đây hoặc trước đây [71].

Tất cả các dòng tế bào được dùng trong nghiên cứu này - các tế bào Vero thận khỉ xanh châu Phi (CCL-81); Neuro-2a u nguyên bào thần kinh chuột nhắt (CCL-131), và NIH/3T3 nguyên bào sợi (CRL-1658) được mua từ Ngân hàng giống và vi sinh vật Hoa Kỳ (ATCC®, USA). Các tế bào được phát triển và được duy trì như đã được mô tả trên đây hoặc trước đây [71].

Các tế bào *E. coli* chủng *BL21* (New England Biolabs, Singapore) được sử dụng để biểu hiện protein với mức độ cao, chủng *TOP10* (Life Technologies, USA) để giải trình tự mảnh của các dòng vô tính riêng, và siêu chủng XL-10 Gold (Stratagene, USA) để tạo ra các dòng vô tính cADN bộ gen có chiều dài đầy đủ.

Cấu trúc của các dòng vô tính cADN bộ gen có chiều dài đầy đủ EV71:BS, các dòng vô tính khảm-vỏ capsit, và các dòng vô tính đột biến VP1/VP2: Các dòng vô tính cADN *EV71:BS* được tạo ra bằng cách tạo dòng gồm hai bước. Việc chiết ARN virut (Qiagen Viral RNA kit, Đức) và chuyển hóa thành cADN (Life Technologies Superscript-II RT, USA) đã được mô tả trên đây hoặc trước đây [71]. Mảnh ở gần bộ gen mã hóa các vùng *5'UTR* và *P1* được khuếch đại bằng cách sử dụng cặp đoạn mồi: *EV71_BamHI-PfF* và *EV71_Pf-AatIIR* (Bảng 5), mà chứa các vị trí cắt giới hạn *BamHI* và *AatII* để tạo dòng vào trong plasmit pACYC177. Mảnh ở xa mã hóa *P2*, *P3*, và *3'UTR* được khuếch đại bằng cặp đoạn mồi *EV71_HindIII-DF* và *EV71_D-BamHIR*, mà còn chứa các vị trí cắt giới hạn *HindIII* và *BamHI* để tạo dòng. Mảnh ở gần chứa vùng trình tự khởi động T7 polymeraza phía trước của *5'UTR* để tạo thuận lợi cho sự phiên mã. Mảnh ở gần này được nối với mảnh ở xa sau khi phân cắt bằng *EagI* và *AatII,* và dòng vô tính EV71:BS có chiều dài đầy đủ được tạo ra.

Bảng 5

Các đoạn mồi

Tên đoạn mồi	Trình tự (SEQ ID NO.)	Lưu ý
EV71_BamHI-PfF	CTAGGGATCCTAATACGACTCACTATAGGTTCAAACAGCCTGTGGGTTGCACCCACTCACAGG (4)	Để tạo dòng mảnh ở gần của EV71:BS (các vùng *5'UTR-P1*) vào trong plasmit pACYC177
EV71_Pf-AatIIR	CTAGGACGTCCGGCCGAACTTTCCAAGGGTAGTAATGGCAGTACGACTAGTGCC (5)	
EV71_HindIII-DF	TAATAAGCTTCGGCCGGCAGTCTGGGGCCATCTACGTG (6)	Để tạo dòng mảnh ở xa của EV71:BS (*P2-3'UTR*) vào trong plasmit pACYC177
EV71_D-BamHIR	GCGCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCTATTCTGGTTATAACAAATTTACCCCCAC (7)	
SDM_MluIF	GGTGTCCACTCAACGCGTCGGCTCCCACGAGAACTCCAATTCAGCTACAGAAGGCTCC (8)	Để đưa vị trí cắt giới hạn *MluI* vào trong dòng vô tính mảnh ở gần
SDM_MluIR	CAAGCATGGGCTCACAGGTGTCCACTCAACGCGTCGGCTCCCACG (9)	
MluI-TLLm-P1F	ACTCAACGCGTCGGCTCCCACGAGAACTCCAATTCAGCTACAGAAGGC (10)	Để khuếch đại các trình tự gen *P1* của EV71:TLLm có các vị trí cắt giới hạn *MluI* và *EagI* nằm bên sườn
EagI-TLLm-P1R	ACTGCCGGCCGAACTTTCCAAGGGTAGTAATGGCAGTACGACTAGTGCC (11)	
VP2_G1385C-F	CAGAGGACA*C*CCACCCTCCTTACAAACAAACACAACCTGGCGCC (12)	Để đưa đột biến G1385C vào (thay thế VP2 S144T)
VP2_G1385C-R	GGAGGGT*G*GGTGTCCTCTGTTCCTGTACCGCCTG (13)	
VP2_A1400T-F	CTCCTTACA*T*ACAAACACAACCTGGCGCCGACG (14)	Để đưa đột biến A1400T vào (thay thế VP2 K149I)
VP2_A1400T-R	TGTGTTTGT*A*TGTAAGGAGGGTGGCTGTCCTCTGTTCC (15)	
VP1_A2734G-F	CTCCCTCTT*G*AGGGTACCACCAATCCAAATGGTTATGCCAACTGGG (16)	Để đưa đột biến A2734G vào (thay thế VP1 K98E)
VP1_A2734G-F	TGGTACCCT*C*AAGAGGGAGATCTATCTCTCCTACCAAACCTGCCC (17)	
VP1_A2876C-F	CTACTGGTG*C*GGTTGTTCCACAATTACTCCAGTATATGTTTGTTCCCCCTGG (18)	Để đưa đột biến A2876C vào (thay thế VP1 E145A)
VP1_A2876C-R	GGAACAACC*G*CACCAGTAGGAGTGCACGCAACAAAAGTGAATT (19)	
VP1_C2947T-F	AGAGAATCA*T*TTGCTTGGCAGACAGCCACAAACCCC (20)	Để đưa đột biến C2947T vào (thay thế VP1 L169F)
VP1_C2947T-R	GCCAAGCAA*A*TGATTCTCTAGACTCTGGTTTGGGAGCACC (21)	
pQE-mSCARB2F	ATTAGGATCCGTCTTTCAGAAGGCGGTAGACCAG (22)	Để tạo dòng gen SCARB2 của chuột nhắt vào trong plasmit biểu hiện protein pQE30
pQE-mSCARB2R	TATAAAGCTTCGACACGCCAGCCACGTGAAAACCAAGCCAAAG (23)	

Để thay thế vùng *P1* của *EV71:BS* bằng *P1* của EV71:TLLm, vị trí cắt giới hạn *MluI* được xử lý kỹ thuật trong ranh giới giữa *5'UTR* và *P1* (cặp đoạn mồi *SDM_MluIF* và *SDM_MluI-R*). Trình tự cADN *P1* của EV71:TLLm được khuếch đại (cặp đoạn mồi *MluI-TLLm-P1F* và *EagI-TLLm-P1R*), được phân cắt bằng *MluI* và *EagI*, và được tách

dòng vào trong cấu trúc mang mảnh ở gần. Tiếp theo, mảnh ở gần được cải biến này được nối với mảnh ở xa như đã được mô tả.

Để tạo ra các dòng vô tính có các đột biến thay thế axit amin trong các protein VP2 và VP1, việc gây đột biến định hướng vị trí được thực hiện trong mảnh ở gần trước khi nối với mảnh ở xa. Sự đột biến thay thế axit amin VP2 S144T (nt G1385C) được đưa vào mảnh ở gần bằng cặp đoạn mồi đặc hiệu *VP2_G1385C-F* và *VP2_G1385C-R*. VP2 S144T (nt G1385C), VP1 K98E (nt A2734G), E145A (nt A2876C), và E167D (nt C2947T) cũng được tạo ra theo cách tương tự bằng cách sử dụng các cặp đoạn mồi khác nhau (Bảng 5).

Đánh giá "kiểu hình sự xâm nhập vào tế bào chuột nhắt": Để tạo ra virut sống, các dòng vô tính cADN được đồng chuyển nạp với một cấu trúc khác biểu hiện T7 ARN polymeraza (pCMV-T7pol) vào trong các tế bào Vero bằng cách sử dụng Lipofectamine 2000 (Life Technologies, USA) theo quy trình được khuyến cáo của nhà sản xuất. Dịch nổi chuyển nạp được thu lại 7-10 ngày sau khi chuyển nạp và được tiêm qua đêm lên trên các dòng tế bào được nuôi cấy ở 1 MOI như đã được mô tả trên đây hoặc trước đây [71]. Các tế bào được ủ bằng dịch nổi virut ở nhiệt độ 37° C trong 1 giờ và được rửa hai lần bằng PBS trước khi thay thế môi trường bằng DMEM, 1% FBS mới.

Để đánh giá kiểu hình nhiễm, sự tiến triển của việc gây ra tác dụng gây bệnh tế bào (CPE) tan bào được ghi lại, và các ảnh được chụp ở các thời điểm khác nhau. Các tế bào đã được lây nhiễm cũng được thu hoạch và được xử lý để phát hiện huỳnh quang miễn dịch các protein virut như đã được mô tả trên đây hoặc trước đây [71]. Nói ngắn gọn, các tế bào bám dính được trypsin hóa và được kết hợp với các tế bào được tạo hạt từ dịch nổi môi trường nuôi cấy, được rửa hai lần trong dung dịch muối đệm phosphat (phosphate buffered saline - PBS) vô trùng, và được cố định lên trên các phiến kính Teflon. Các tế bào đã cố định được ủ bằng các kháng thể đơn dòng pan-virut entero (Merck Millipore, USA) và được phát hiện bằng kháng thể kháng IgG của chuột nhắt được tiếp hợp với FITC tiêu chuẩn. Dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào đã được lây nhiễm cũng được thu lại, được làm trong, và được pha loãng theo bậc để xác định hàm lượng virut bằng cách sử dụng phương pháp Reed and Muench [61]. Ngay khi hàm lượng được biết, dịch nổi được cấy chuyển lên trên các tế bào NIH/3T3 và Neuro-2a mới được

nuôi cấy ở 1 MOI, và kiểu hình nhiễm được đánh giá lại bằng cách sử dụng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Sự biểu hiện protein tái tổ hợp của các protein SCARB2 hòa tan và sản sinh kháng huyết thanh thỏ SCARB2: Plasmit pMD18-mSCARB2 mã hóa miền ngoại bào của SCARB2 chuột nhắt (aa Arg27 - Thr 432) được khuếch đại bằng cặp đoạn mồi ***pQE-mSCARB2F*** và *pQE-mSCARB2R* để đưa các vị trí cắt giới hạn *BamHI* và *HindIII* vào để tạo thuận lợi cho việc tạo dòng vào trong vectơ biểu hiện protein pQE30. Các dòng vô tính được biến nạp vào các tế bào *E. coli* BL21, và sự biểu hiện protein được gây ra bằng 1mM IPTG qua đêm. Các tế bào thu được được phân cắt bằng lysozym (1 mg/ml), và phần chiết thô được tinh chế bằng cách sử dụng cột Ni-NTA (Qiagen®, Đức). Dịch tan trong được ủ qua đêm trong 1 ml huyền phù đặc Ni-NTA 50% ở nhiệt độ 4°C kết hợp lắc nhẹ. Protein được rửa 5 lần trong dung dịch đệm rửa (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 20mM imidazol, độ pH=8,0) và được rửa giải bằng dung dịch đệm rửa giải (50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, 250mM imidazol, độ pH=8,0.

Hai thỏ đực khỏe mạnh được gây miễn dịch bằng 1,4 µg protein SCARB2 chuột nhắt tinh chế được trộn với tá chất Freund đầy đủ (Sigma-Aldrich®) ở ngày 0. Liều tăng cường chứa 0,8 µg kháng nguyên được trộn với tá chất Freund không đầy đủ (Sigma-Aldrich®) được tiêm ở các ngày 21, 42, 63, 84, và 105. Việc lấy máu cuối cùng bằng cách chích tim được thực hiện ở ngày 117, và máu gom được được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C trước khi ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong 30 phút. Huyết thanh đã được làm trong được gom lại và được bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến khi sử dụng tiếp. Sự sản sinh kháng huyết thanh thỏ SCARB2 được phê chuẩn bởi Temasek Lifesciences Laboratory Institution Animal Care and Use Committee (TLL-IACUC) [số phê chuẩn 047/12].

Thử nghiệm cạnh tranh của virut với protein SCARB2 của chuột: Các thử nghiệm gắn kết *in vitro* được thực hiện để xác nhận sự tương tác của *EV71:TLLmv* với các protein SCARB2 của chuột nhắt và người. Các tế bào NIH/3T3 (6000 mỗi giếng) được nuôi cấy qua đêm lên trên các phiến kính được phủ Teflon vô trùng (Erie, USA). Trước khi tiêm virut, 100 MOI EV71:TLLmv được ủ bằng các protein SCARB2 của chuột nhắt (mSCARB2) hoặc SCARB2 của người (hSCARB2) tái tổ hợp với các nồng độ khác nhau (4,0 µg, 2,0 µg, 1,0 µg, 0,5 µg, 0,25 µg, 0,125 µg, và 0 µg) trong 2 giờ ở nhiệt độ 37°C

trên bệ lắc. Các tế bào đã được lây nhiễm được quan sát hằng ngày về các dấu hiệu CPE và được cố định ở 48 giờ sau nhiễm trong axeton tuyệt đối (4°C, 10 phút). Các tế bào đã cố định được thử nghiệm huỳnh quang miễn dịch bằng kháng thể pan-virut entero (Merck Millipore®, USA). Các phiến kính được chụp ảnh bằng kính hiển vi huỳnh quang thẳng đứng (Nikon, Nhật Bản).

Các thử nghiệm gắn kết virut-SCARB2: Các thử nghiệm phong bế SCARB2 gián tiếp qua kháng thể được thực hiện trên các tế bào cố định để đánh giá xem việc che giấu các protein SCARB2 bề mặt tế bào có ảnh hưởng đến việc gắn kết với virut hay không. Các tế bào NIH/3T3 và Vero được nuôi cấy trên các phiến kính Teflon được cố định (4% PFA, 25 phút, nhiệt độ phòng), và được phong bế bằng 5% BSA trong PBS trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các phiến kính được ủ trong huyết thanh thỏ đa dòng được tạo ra kháng mSCARB2 (1:100) trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Đối với các đối chứng âm tính, các tế bào được ủ bằng huyết thanh thỏ đa dòng được tạo ra kháng protein Saffold Virus L. Các phiến kính được rửa trong PBS trước khi ủ bằng *EV71:TLLmv* sống (1000 MOI) trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C và được dò bằng kháng thể pan-virut entero và được phát hiện bằng Ab được tiếp hợp với FITC. Các phiến kính được chụp ảnh bằng kính hiển vi laze đồng tiêu đảo ngược Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss, Đức), và các cường độ huỳnh quang được đo bằng cách sử dụng phần mềm tạo ảnh Imaris (BitPlane Scientific Software, Đức). Phân tích thống kê về sự khác biệt cường độ huỳnh quang được thực hiện bằng cách sử dụng Prism GraphPad phiên bản 6.01 (GraphPad Software, Inc., USA).

Thử nghiệm bảo vệ tế bào khỏi sự nhiễm virut bằng cách sử dụng huyết thanh đa dòng thỏ kháng SCARB2: Các thử nghiệm phong bế SCARB2 gián tiếp qua kháng thể cũng được thực hiện trên các tế bào sống để đánh giá tác dụng của nó lên sự nhiễm vào tế bào. Các tế bào NIH/3T3 được nuôi cấy qua đêm ($1x10^4$ tế bào mỗi giếng trong đĩa 96 giếng) được ủ bằng dịch pha loãng theo bậc hai lần (1:20 đến 1:640) của huyết thanh đa dòng thỏ được tạo ra kháng các protein SCARB2 của chuột nhắt hoặc người trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Tiếp theo, các tế bào được tiêm 100 MOI EV71:TLLmv hoặc thể đột biến virut có nguồn gốc dòng vô tính *CDV:BS[M-P1]* và $CDV{:}BS_{VP1}[K98E/E145A/L169F]$ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các tế bào được rửa hai lần trong PBS trước khi thay thế bằng DMEM mới (1% FBS). Các tế bào được quan sát hằng ngày về các dấu hiệu CPE, và dịch nổi môi trường nuôi cấy tế bào đã được lây nhiễm được thu lại ở 3 ngày sau

nhiễm (day post-infection - dpi). Dịch nổi được chuẩn độ virut bằng quy trình làm phân rã virut trước bằng cách lắc mạnh trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng trong 1% natri deoxycholat, như đã được mô tả trước đây [6, 71]. Hàm lượng virut được tính bằng phương pháp Reed and Muench [61] và được báo cáo dưới dạng $CCID_{50}$/ ml bằng dụng cụ tính khả năng lây nhiễm [62].

Ví dụ 10

Quá trình chuyển nạp của ARN bộ gen *EV71:BS* vào trong nơron thần kinh chuột nhắt

Các tế bào Neuro-2a và NIH/3T3 nguyên bào sợi tạo ra virut con cháu có thể sống được

Các tế bào NIH/3T3 nguyên bào sợi và Neuro-2a u nguyên bào thần kinh của chuột đã được minh họa trước đây dưới dạng không cho phép nhiễm *EV71:BS*, trong khi các tế bào Vero có cho phép nhiễm *EV71:BS* (trên đây hoặc [71]). Hai chủng, *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv*, cả hai có nguồn gốc từ *EV71:BS* đã xâm nhập và sao chép thành công trong các tế bào của chuột này. Để xác định xem bộ gen *EV71:BS* có thể sao chép trong các tế bào không được phép này không, ARN bộ gen từ *EV71:BS* được chiết và được chuyển nạp vào trong các tế bào Vero, NIH/3T3, và Neuro-2a. Tương tự, ARN bộ gen từ *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv* được chuyển nạp vào trong ba dòng tế bào này để so sánh. Để đánh giá khả năng sống của virut con cháu được tạo ra, dịch nổi quá trình chuyển nạp tiếp theo được tiêm lại lên trên các tế bào mới (Fig.15A).

Quá trình chuyển nạp ARN bộ gen của tất cả ba chủng virut vào trong các tế bào Vero dẫn đến tác dụng gây bệnh tế bào (CPE) tan bào trong lớp đơn tế bào được chuyển nạp (Fig.15B). Sự biểu hiện kháng nguyên virut cũng được quan sát trong các tế bào bị chết (Fig.15C), cho thấy sự sao chép virut thành công. Tương tự, các kết quả được quan sát từ quá trình chuyển nạp ARN virut của *EV71:TLLm* hoặc *EV71:TLLmv* vào trong lớp đơn tế bào NIH/3T3 và Neuro-2a (Fig.15B và 15C). Mặt khác, quá trình chuyển nạp của ARN EV71:BS vào trong các tế bào NIH/3T3 và Neuro-2a dẫn đến sự chết một số tế bào thể hiện sự biểu hiện kháng nguyên virut, nhưng không gây ra CPE đầy đủ của lớp đơn tế bào. Việc cấy chuyển tiếp dịch nổi quá trình chuyển nạp của *EV71:BS* từ cả hai tế bào NIH/3T3 và Neuro-2a lên trên các tế bào Vero mới dẫn đến gây ra sự tan lớp đơn tế bào đầy đủ (Fig.15D) và sự phát hiện của các kháng nguyên virut trong các tế bào bị chết

(Fig.15E). Tuy nhiên, việc cấy chuyển dịch nổi quá trình chuyển nạp lên trên các tế bào NIH/3T3 mới không thu được CPE (Fig.15D) hay sự biểu hiện kháng nguyên virut (Fig.15E).

Ví dụ 11

Vùng P1 mã hóa vỏ capsit của *EV71:TLLm* được làm thích ứng với dòng tế bào chuột nhắt chịu trách nhiệm về sự xâm nhập virut thành công vào trong các tế bào NIH/3T3 và Neuro-2a của chuột

Phân tích trước đây gợi ý rằng protein vỏ capsit của *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv* có thể chịu trách nhiệm về sự xâm nhập thành công vào trong các tế bào NIH/3T3 và Neuro-2a trên đây hoặc [71]). Để xác nhận điều này, các dòng vô tính cADN có chiều dài đầy đủ của bộ gen *EV71:BS* được tạo ra bằng cách di truyền ngược chuẩn. Vùng *P1* (vỏ capsit) của dòng vô tính cADN có chiều dài đầy đủ của *EV71:BS* tiếp theo được thay thế bằng trình tự di truyền của EV71:TLLm *P1* để tạo ra dòng vô tính plasmit khảm (Fig.16A). Dòng vô tính cADN *EV71:BS* được chuyển nạp vào trong các tế bào Vero để tạo ra virut có nguồn gốc dòng vô tính (CDV:BS). Tương tự, dòng vô tính khảm được chuyển nạp để tạo ra *CDV:BS[M-P1]* mà thể hiện protein vỏ capsit của EV71:TLLm và biểu hiện các protein không cấu trúc của *EV71:BS*. CDV này được tiêm lại lên trên các dòng tế bào khác nhau để đánh giá kiểu hình nhiễm (Fig.16B).

Virut có nguồn gốc dòng vô tính *EV71:BS* (*CDV:BS*) gây ra CPE trong các tế bào Vero nhưng không trong các tế bào NIH/3T3 và Neuro-2a, còn *CDV:BS[M-P1]* gây ra CPE trong tất cả ba dòng tế bào ở 48 giờ sau tiêm (hpi) (Fig.16C). Các tế bào của chuột bị nhiễm *CDV:BS[M-P1*], nhưng không bị nhiễm CDV:BS, thu được sự phát hiện các kháng nguyên virut trong các tế bào bị chết (Fig.16D). Để đánh giá sự sản xuất và giải phóng virut con cháu có thể sống được trong lần cấy chuyển thứ nhất (*P1*), dịch nổi môi trường nuôi cấy đã làm trong từ các tế bào đã được lây nhiễm được tiêm lại lên trên lớp đơn mới của cùng dòng tế bào này, và hiệu suất virut được đo ở 72 hpi. Việc cấy chuyển của cả hai *CDV:BS* và *CDV:BS[M-P1]* lên trên các tế bào Vero thể hiện hàm lượng virut cao, và mức tăng hàm lượng đáng kể được quan sát sau khi cấy chuyển tiếp (*P2*) (Fig.16E). Trong khi đó, việc cấy chuyển (*P1*) của *CDV:BS[M-P1]*, nhưng không phải *CDV:BS*, tạo ra hiệu suất virut cao trong cả hai tế bào NIH/3T3 và Neuro-2a (Fig.16F).

Ví dụ 12

Sự đột biến thay thế axit amin VP1-L169F trong vỏ capsit *EV71:BS* cho phép virut xâm nhập và gây ra sự nhiễm hạn chế trong các tế bào của chuột

Protein vỏ capsit của *EV71:TLLm* được làm thích ứng với tế bào chuột nhắt cho phép sự xâm nhập của *EV71:BS* vào trong các tế bào của chuột, và các tác giả sáng chế quan tâm đến độ đồng nhất của các gốc đặc hiệu mà mang lại kiểu hình mới này. Dữ liệu trước đây về sự so sánh sự bắt cặp trình tự polyprotein của *EV71:BS* và chủng EV71 được làm thích ứng với tế bào chuột nhắt cho thấy nhiều đột biến thay thế axit amin trong các protein VP1 và VP2 mà có thể liên quan đến sự gắn với thụ thể virut trên các tế bào vật chủ (trên đây hoặc [71]). Các gốc này bao gồm VP1 K98E, E145A, và L169F, cũng như VP2 S144T và K149I. Để xác định thay thế nào trong số các đột biến thay thế axit amin này là cần thiết đối với sự xâm nhập vào tế bào chuột nhắt, các đột biến riêng rẽ gây ra các đột biến thay thế axit amin này được đưa vào dòng vô tính cADN có chiều dài đầy đủ *EV71:BS* thông qua việc gây đột biến định hướng vị trí chuẩn (Fig.17A). Các dòng vô tính cADN được cải biến này được chuyển nạp một cách độc lập vào trong các tế bào Vero để tạo ra virut có nguồn gốc dòng vô tính (CDV), và dịch nổi thu được được tiêm lên trên các tế bào Vero, NIH/3T3, và Neuro-2a mới được nuôi cấy để đánh giá kiểu hình sự nhiễm.

Các tế bào Vero được lây nhiễm tất cả thể đột biến virut có nguồn gốc dòng vô tính (CDV) thể hiện 100% CPE, nhưng chỉ CDV mang các đột biến thay thế axit amin VP1 - $CDV{:}BS_{VP1}[K98E]$, $CDV{:}BS_{VP1}[E145A]$, và $CDV{:}BS_{VP1}[L169F]$ - thu được 100% CPE trong các tế bào Neuro-2a (Fig.17B và 17 C). Sự biểu hiện kháng nguyên virut được phát hiện trong các tế bào Vero và Neuro-2a được lây nhiễm bởi CDV chứa các đột biến thay thế axit amin trong VP1 ($CDV{:}BS_{VP1}$) và VP2 ($CDV{:}BS_{VP2}$), nhưng chỉ các tế bào NIH/3T3 được lây nhiễm bởi $CDV{:}BS_{VP2}$ thể hiện sự biểu hiện kháng nguyên virut (Fig.17D và 17E). Hơn thế nữa, các tế bào Vero được lây nhiễm bởi tất cả CDV đột biến thu được hàm lượng virut có thể đo được (Fig.17F), gợi ý khả năng sống của virut, nhưng chỉ $CDV{:}BS_{VP1}[L169F]$ tạo ra hàm lượng virut có thể đo được trong dịch nổi môi trường nuôi cấy của các tế bào NIH/3T3 và Neuro-2a được lây nhiễm (Fig.17G) như được thử nghiệm trong các tế bào Vero. Tuy nhiên, việc cấy chuyển tiếp lên trên các tế bào của

chuột khỏe mạnh, của dịch nổi môi trường nuôi cấy từ các tế bào NIH/3T3 và Neuro-2a được lây nhiễm bởi *CDV:BS$_{VP1}$[L169F]*, không gây ra sự nhiễm bệnh.

Ví dụ 13

Tình trạng lây nhiễm tăng sinh hữu hiệu trong các tế bào của chuột cần các đột biến thay thế axit amin kết hợp ở VP1

Để đánh giá xem việc kết hợp các đột biến thay thế axit amin trong VP1 và VP2 cũng có thể cho phép *EV71:BS* xâm nhập vào các tế bào chuột nhắt hay không, các dòng vô tính cADN bộ gen có chiều dài đầy đủ của *EV71:BS* có các tổ hợp đột biến thay thế axit amin khác nhau (*BS$_{VP2}$[S144T/K149I]*, *BS$_{VP1}$[K98E/E145A]*, *BS$_{VP1}$[K98E/E145A/L169F]*, và *BS[VP1/VP2]*) được tạo ra (Fig.18A). Các dòng vô tính plasmit được chuyển nạp một cách độc lập lên trên các tế bào Vero, và dịch nổi thu được được sử dụng để lây nhiễm các tế bào Vero, NIH/3T3, và Neuro-2a để đánh giá kiểu hình sự nhiễm.

Tất cả CDV được thử nghiệm, ngoại trừ *CDV:BS$_{VP2}$[S144T/K149I]*, gây ra CPE trong các tế bào Vero và Neuro-2a (Fig.18B). Các kháng nguyên virut cũng được phát hiện trong tất cả tế bào đã được lây nhiễm CDV khác nhau, mặc dù việc nhuộm miễn dịch là đáng chú ý hơn trong tế bào Neuro-2a so với tế bào NIH/3T3 khi so sánh các dòng tế bào của chuột (Fig.18C). Hàm lượng virut cao có thể đo được trong dịch nổi môi trường nuôi cấy của các tế bào Vero được lây nhiễm bởi tất cả CDV (Fig.18D), nhưng chỉ *CDV:BS$_{VP1}$[K98E/E145A]* và *CDV:BS$_{VP1}$[K98E/E145A/L169F]* thu được hàm lượng virut có thể đo được trong dịch nổi môi trường nuôi cấy của các tế bào NIH/3T3 và Neuro-2a được lây nhiễm (Fig.18E), như được thử nghiệm trong các tế bào Vero.

Ví dụ 14

Virut *EV71:BS* có các đột biến thay thế axit amin kết hợp ở VP1 K98E, E145A, và L169F có thể được cấy chuyển thành công trong các tế bào Neuro-2a của chuột nhắt

Cho đến nay, bốn thể phân lập virut có nguồn gốc dòng vô tính cho phép *EV71:BS* xâm nhập vào và lây nhiễm các dòng tế bào chuột nhắt được nuôi cấy: *CDV:BS[M-P1]*, *CDV:BS$_{VP1}$[L169F]*, *CDV:BS$_{VP1}$[K98E/E145A]*, và *CDV:BS$_{VP1}$[K98E/E145A/L169F]*. Để nhận diện virut nào trong số các CDV này có thể lây nhiễm một cách ổn định các tế bào chuột nhắt trong nhiều chu kỳ, dịch nổi virut được cấy chuyển hai lần trong cùng

dòng tế bào, tức là từ tế bào Neuro-2a sang tế bào Neuro-2a mới. Sự nhiễm được giám sát bằng cách đánh giá sự gây ra CPE và sự biểu hiện kháng nguyên virut, và sự sản xuất virut con cháu có thể sống được.

Chỉ *CDV:BS$_{VP1}$[K98E/E145A/L169F]* và *CDV:BS[M-P1]* có thể được cấy chuyển thành công liên tiếp trong các tế bào Neuro-2a như được minh họa bởi sự phát hiện của các kháng nguyên virut (Fig.19A) và hàm lượng virut có thể đo được (Fig.19B). Việc nhuộm dương tính được quan sát trong cả hai lần cấy chuyển số 2 và 3, và mức độ tăng hàm lượng virut được ghi lại ở lần cấy chuyển số 2 so với lần cấy chuyển thứ nhất. Mặt khác, chỉ *CDV:BS[M-P1]* có thể gây ra sự biểu hiện của các kháng nguyên virut trong các tế bào NIH/3T3, (Fig.19A), nhưng không phát hiện được virut con cháu có thể sống được. Việc giải trình tự bộ gen của *CDV:BS$_{VP1}$[K98E/E145A/L169F]* thu được từ lần cấy chuyển thứ ba trong các tế bào Neuro-2a thể hiện sự không thay đổi trong các đột biến axit amin được đưa vào (Fig.19C).

Ví dụ 15

Chủng được làm thích ứng với dòng tế bào chuột nhắt *EV71:TLLmv* gắn kết với protein SCARB2 cả *in vivo* và *in vitro*

Gần đây, EV71 đã được chứng minh là sử dụng protein thụ thể "thanh thải" nhóm B thành viên 2 (SCARB2) làm thụ thể của nó để xâm nhập vào tế bào vật chủ [47]. Để xác nhận xem chủng EV71 được làm thích ứng với dòng tế bào chuột nhắt có cũng sử dụng SCARB2 trong sự nhiễm của các tế bào chuột nhắt hay không, các thử nghiệm gắn kết virut cạnh tranh được thực hiện. Trước hết, các tế bào NIH/3T3 và Vero đã được phát triển qua đêm trên các phiến kính được phủ Teflon và đã được cố định nhẹ bằng 4% paraformaldehyt được ủ bằng huyết thanh thỏ kháng protein SCARB2 của chuột nhắt (mSCARB2) trước khi gắn kết *in vitro* với *EV71:TLLmv* sống. Các tế bào đã gắn kết được phát hiện huỳnh quang bằng cách sử dụng kháng thể đơn dòng pan-virut entero, và cường độ huỳnh quang được định lượng. Việc ủ trước các tế bào NIH/3T3 bằng huyết thanh kháng mSCARB2 dẫn đến sự giảm đáng kể sự gắn kết với *EV71:TLLmv* (Fig.20A), mà không quan sát thấy khi các tế bào được ủ trước bằng huyết thanh không đặc hiệu (NSP). Các kết quả tương tự được quan sát thấy bằng cách sử dụng các tế bào Vero (Fig.20B).

Trong thử nghiệm thứ hai, *EV71:TLLmv* sống được ủ bằng các protein SCARB2 hòa tan tái tổ hợp trước khi tiêm lên trên các tế bào NIH/3T3 đã được nuôi cấy, và mức độ nhiễm được đánh giá bằng cách gắn nhãn huỳnh quang của các kháng thể đơn dòng pan-virut entero gắn kết. Việc ủ trước virut bằng mSCARB2 hòa tan làm giảm mức độ nghiêm trọng của sự nhiễm tế bào theo cách phụ thuộc liều (Fig.20C). Các kết quả tương tự thu được khi sử dụng protein SCARB2 của người (hSCARB2) trong quá trình ủ trước (Fig.20D).

Ví dụ 16

Sự nhiễm tế bào bởi *EV71:TLLmv* được phong bế bằng cách ủ trước các tế bào chuột nhắt bằng huyết thanh được tạo ra kháng protein SCARB2

Để đánh giá xem sự nhiễm tế bào có được làm giảm bằng cách phong bế sự tương tác của *EV71:TLLmv* với SCARB2 hay không, các tế bào NIH/3T3 đã được nuôi cấy được ủ bằng các dịch pha loãng khác nhau của kháng huyết thanh protein SCARB2 trước khi tiêm bằng *EV71:TLLmv* sống, và mức độ nhiễm được đánh giá bằng cách đo hàm lượng virut con cháu sống. Việc ủ trước các tế bào bằng các dịch pha loãng tỷ lệ thấp của kháng huyết thanh hSCARB2 (1:20 đến 1:80) dẫn đến mức giảm đáng kể phụ thuộc liều của hàm lượng virut so với đối chứng (Fig.20E). Các kết quả tương tự thu được khi các tế bào được ủ trước bằng kháng huyết thanh mSCARB2 (Fig.20F).

Ví dụ 17

CDV:BS[M-P1] và *CDV:BS$_{VP1}$[K98E/E145A/L169F]* sử dụng protein SCARB2 của chuột làm thụ thể chức năng của chúng để xâm nhập vào trong các tế bào của chuột

Cả *CDV:BS[M-P1]* và *CDV:BS$_{VP1}$[K98E/E145A/L169F]* lây nhiễm một cách ổn định các tế bào Neuro-2a của chuột nhắt. Để xác định xem CDV này, như chủng EV71:TLLmv được làm thích ứng với tế bào chuột nhắt, có cũng sử dụng mSCARB2 để xâm nhập và tháo bỏ lớp vỏ virut hay không, các tế bào Neuro-2a được ủ bằng kháng huyết thanh mSCARB2 trước khi nhiễm bằng thể đột biến CDV. Mức độ giảm phụ thuộc liều của CPE tan bào được quan sát thấy trong các tế bào đã được lây nhiễm *CDV:BS$_{VP1}$[K98E/E145A/L169F]* (Fig.21A) hoặc *CDV:BS[M-P1]* (Fig.21B). Việc chuẩn độ dịch nổi môi trường nuôi cấy ở 7 ngày sau nhiễm (dpi) phát hiện ra rằng không có sự khác biệt đáng kể về hàm lượng virut *CDV:BS$_{VP1}$[K98E/E145A/L169F]* trong các tế bào

được ủ trước bằng kháng huyết thanh SCARB2 so với đối chứng (Fig.21C). Mặt khác, mức độ giảm hàm lượng virut đáng kể được phát hiện trong các tế bào đã được lây nhiễm *CDV:BS[M-P1]* được ủ trước bằng huyết thanh so với đối chứng (Fig.21D).

Ví dụ 18

Nguyên liệu và phương pháp trong ví dụ 19

Mẫu động vật: Để xác định kiểu hình lây nhiễm động vật của các chủng được làm thích ứng với tế bào chuột nhắt (*EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv*), chuột nhắt Balb/c 5-6 ngày tuổi được lây nhiễm bằng 10^6 $CCID_{50}$ của virut và được quan sát các triệu chứng của bệnh và các biến chứng thần kinh. Các chuột được theo dõi trong tối đa 28 ngày, sau đó, các chuột được làm chết và huyết thanh được gom lại để phát hiện các kháng thể đặc hiệu EV71.

Ví dụ 19

Nghiên cứu độc lực thần kinh của EV71 được làm thích ứng với dòng tế bào chuột nhắt (*EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv*) ở chuột nhắt Balb/c

Trong số các chuột có khả năng miễn dịch được lây nhiễm bởi *EV71:TLLm* (n = 7), hai chuột bị chết (29%) do liệt nặng và dai dẳng (> 24 giờ) ở 8 ngày sau nhiễm (Fig.13A). Trong số các chuột nhắt còn sống khác, 5 con (5/7, 71,4%) biểu hiện run và mất điều hòa, 5 con biểu hiện liệt nhẹ ở một hoặc cả hai chân sau, và 4 con (4/7, 57,1%) biểu hiện chứng liệt tạm thời ở một hoặc cả hai chân sau. Mặt khác, các con được lây nhiễm bởi *EV71:TLLmv* có biểu hiện lâm sàng của bệnh nặng hơn. Chín trong số mười (90%) các chuột được lây nhiễm không chống nổi bệnh trong vòng 8 ngày nhiễm bệnh (Fig.13A), với 6 trong số 9 chuột (66,7%) bị chết trong vòng ngày thứ tư sau nhiễm bệnh. Các triệu chứng khác được biểu hiện bao gồm run (5/10, 50%), liệt nhẹ ở một hoặc cả hai chân sau (6/10, 60%), và liệt ở một hoặc cả hai chân sau (5/10, 50). Trong khi dường như không có sự khác biệt về thể trọng của chuột nhắt được lây nhiễm bởi *EV71:TLLm* so với chuột được lây nhiễm giả, chuột nhắt được lây nhiễm bởi *EV71:TLLmv* biểu hiện mức độ giảm mạnh về thể trọng trong vòng 10 ngày đầu nhiễm bệnh (Fig.13B). Thú vị hơn nữa, các tác giả sáng chế đã quan sát thấy triệu chứng mới ở chuột nhắt được lây nhiễm bởi EV71, theo đó các chuột bị liệt (Fig.14A, mũi tên) biểu hiện nhịp thở nhanh với mức độ suy thoái dưới sườn đáng chú ý. Hơn nữa, 6 trong số 9 (66,7%) cái chết biểu hiện triệu

chứng này trước khi làm chết không đau đớn. Khi giải phẫu, các tác giả sáng chế còn quan sát thấy phổi không xẹp khi mở khoang ngực (Fig.14B, các mũi tên), quá trình bình thường trong việc giải phẫu khi thu các mô phổi và tim, gợi ý sự tồn tại tình trạng phù phổi. Việc kiểm tra mô học các mô phát hiện ra các dấu hiệu của tình trạng phù phổi và sự xuất huyết trong khoang phế nang của phổi (Fig.14C), và các ảnh có độ phóng đại cao hơn thể hiện sự có mặt của nguyên liệu protein đồng nhất (Fig.14D, các mũi tên).

Ví dụ này cũng được thực hiện bằng cách sử dụng chuột nhắt bị suy giảm miễn dịch, như chuột nhắt NSG. Các kết quả tương tự thu được ngoại trừ rằng mức độ nghiêm trọng của bệnh lớn hơn và tỷ lệ chết cao hơn.

Ví dụ 20

Sàng lọc các hợp chất kháng EV71 chọn lọc

Việc sàng lọc *in vitro* hiệu suất cao các hợp chất kháng EV71 chọn lọc được thực hiện bằng cách sử dụng dòng tế bào NIH/3T3 của chuột nhắt mà đã được chứng minh là dễ bị nhiễm gây tan bào bởi các chủng virut *EV71:TLLm* hoặc *EV71:TLLmv*. Các hợp chất đầy triển vọng được chọn từ việc sàng lọc *in vitro* sau đó được thử nghiệm *in vivo* trong mẫu động vật. Để thực hiện sàng lọc *in vivo*, số lượng chuột nhắt Balb/c được chuẩn hóa (trên cơ sở tính toán thống kê) được lây nhiễm bằng các chủng virut với hàm lượng được chuẩn hóa được lấy từ dung dịch gốc được chuẩn hóa của các chủng EV71 được làm thích ứng với dòng tế bào chuột nhắt (*EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv*) mà đã được chuẩn bị, được chuẩn độ và được giữ trong tủ lạnh sâu (-80°C). Hợp chất kháng EV71 chọn lọc được dùng cho chuột nhắt được lây nhiễm ở các liều đã được chuẩn hóa khác nhau trước khi xuất hiện bệnh để thử nghiệm tác dụng phòng ngừa tiềm năng của hợp chất chọn lọc hoặc sau khi khởi phát bệnh để thử nghiệm tác dụng điều trị bệnh tiềm năng của hợp chất chọn lọc.

Ví dụ 21

Nguyên liệu và phương pháp trong các ví dụ 22-25

Chuột nhắt và các chủng virut: Chuột nhắt BALB/c trưởng thành được mua từ InVivos (Singapore), và được giao phối để thu được chuột nhắt con. Các chủng EV71 được dùng để tiêm bao gồm *EV71:BS*, *EV71:TLLm*, và *EV71:TLLmv*, mà chi tiết và các đặc điểm của chúng đã được mô tả trong bản mô tả này.

Tuyên bố đạo đức: Các quy trình trên động vật được phê chuẩn bởi Institutional Care and Use of Animal Committee (IACUC) của Temasek Lifesciences Laboratory (số phê chuẩn TLL-14-023). Các động vật được lây nhiễm mà gần chết được làm chết bằng cách tiêm 90 mg/kg pentobarbitone thông qua đường I.P.. Việc kiểm tra thần kinh được thực hiện theo hướng dẫn và các quy trình chuẩn được quy định bởi The Institutional Care and Use of Animals Committee (IACUC) của University of California San Francisco. Các tiêu chuẩn để làm chết không đau đớn bao gồm các hướng dẫn đã được nêu trước đây [34]: (1) giảm > 20% thể trọng được ghi lại lớn nhất, (2) liệt kéo dài >48 giờ, (3) không ăn hoặc không có khả năng ăn, (4) không có khả năng tự giữ thăng bằng, và (5) trạng thái ý thức thay đổi thể hiện dưới dạng sững sờ hoặc hôn mê. Chuột nhắt con được quan sát trong tổng số 28 ngày , và các chuột mà sống sót trong toàn bộ giai đoạn này được làm chết bằng cách tiêm pentobarbitone qua đường I.P. .

Xử lý động vật và lây nhiễm: Các nhóm gồm tám chuột nhắt có độ tuổi thay đổi (6, 14, 21, hoặc 28 ngày tuổi) được tiêm *EV71:TLLmv* (liều 10^6 $CCID_{50}$) bằng cách tiêm I.P. hoặc I.M.. Để xác định liều tối ưu của *EV71:TLLmv*, các nhóm chuột nhắt con 6 ngày tuổi (n=8 mỗi nhóm) được lây nhiễm bằng các liều thay đổi của virut (10^6, 10^5, 10^4, 10^3, hoặc 10^2 $CCID_{50}$) thông qua đường I.P.. Các chuột được lây nhiễm được quan sát mỗi ngày hai lần về biểu hiện bệnh trong suốt tuần đầu sau nhiễm bệnh. Cả các chuột gần chết và các chuột mà sống sót qua giai đoạn quan sát được làm chết như đã được mô tả trên đây. Việc lấy máu cuối cùng được thực hiện thông qua việc chích tim bằng cách sử dụng kim 26G.

Giải phẫu, quan sát toàn bộ bệnh lý, và thu mô: Các chuột đã được làm chết được giải phẫu bằng cách sử dụng quy trình chuẩn để thu các cơ quan. Việc kiểm tra toàn bộ bệnh học cũng được thực hiện và ảnh được chụp với phê chuẩn IACUC. Phổi được rửa ở bề mặt hai lần bằng PBS vô trùng, và sau đó, được thấm khô trên giấy lọc trước khi đo khối lượng ướt. Các cơ quan thu được cho các nghiên cứu mô học được bảo quản trong formalin được đệm trung tính (neutral buffered formalin - NBF) 10% trong 1 tuần ở nhiệt độ 4° C.

Xác định: tải lượng virut của mô. Các mô đã được làm đông được dầm bằng cách sử dụng chày Teflon và được hoàn nguyên trong 1ml DMEM (1% FBS). Sau đó, các mẫu được trộn trong 1 giờ và được ly tâm hai lần (20 *g*, 30 phút, 4°C) để loại bỏ mảnh mô vụn

và thu virut đã được làm sạch. Mẫu virut được phân rã trong natri deoxycholat 1% [88] trước khi pha loãng theo bậc mười lần và chuyển lên trên các tế bào NIH/3T3. Các tế bào đã được lây nhiễm được quan sát hằng ngày về tác dụng gây bệnh tế bào (CPE), và các tế bào được nhuộm bằng kháng thể đơn dòng pan-virut entero (Merck Millipore, USA) [88]. Hàm lượng virut được tính và được báo cáo dưới dạng $CCID_{50}$ trên mỗi g mô.

Xử lý mô để phân tích mô học: Các mô đã cố định được loại nước trong một chuỗi dung dịch etanol có nồng độ tăng dần 70%, 95% và 100%. Các mô được ủ trong hai lần thay đổi rượu và ba lần thay đổi Histoclear II (Electron Microscopy Sciences, USA), và cuối cùng được hòa trộn bằng bốn lần thay đổi sáp parafin tan chảy. Tất cả các lần ủ được thực hiện trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng kết hợp lắc nhẹ ở 100 vòng/phút. Các lần hòa trộn parafin được thực hiện trong lò được thiết đặt ở nhiệt độ 65°C. Các khối mô được gắn vào parafin được cắt lát (5 µm) bằng cách sử dụng máy vi phẫu, được nạp lên trên các phiến kính thủy tinh được phủ poly-lysin, được làm khô qua đêm ở nhiệt độ 42°C, và sau đó, được bảo quản ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi sử dụng tiếp.

Nhuộm lát cắt mô: Các lát cắt mô được loại sáp bằng cách ủ trong hai lần thay đổi Histoclear II và sau đó, được hydrat hóa lại từ từ trong rượu có các nồng độ giảm dần 100%, 95%, 70%, và 50%. Các phiến kính được ủ trong PBS trong 10 phút trước khi nhuộm. Việc nhuộm hematoxylin và eosin (H &E) được thực hiện bằng cách trước hết làm ngập các phiến kính bằng hematoxylin của Harris (Sigma Aldrich, USA) và ủ ở nhiệt độ trong phòng (RT) trong 15 phút. Sau đó, các phiến kính được rửa trong nước, được khử nhuộm trong rượu axit 1% (95% etanol, 1% HCl), được nhúng trong NH4OH 0,2%, và được rửa trong nước trong 10 phút trước khi phản nhuộm trong dung dịch eosin. Tiếp theo, các phiến kính được khử nhuộm trong etanol 95%, được loại nước bằng ba lần thay đổi rượu tuyệt đối và hai lần thay đổi Histoclear II. Cuối cùng, các mô được đặt trong chất lỏng gắn DPX (Sigma Aldrich, USA).

Hóa mô miễn dịch: Sau khi loại sáp và hydrat hóa lại, các phiến kính được thu hồi kháng nguyên do nhiệt gây ra bằng cách ủ trong lò vi sóng ở cấp độ mô học và dung dịch đệm xitrat (độ pH=6,0) trong 30 phút ở nhiệt độ 96°C. Các phiến kính được để nguội xuống RT trong 3 giờ và tiếp theo được phong bế bằng huyết thanh lợn bình thường 5% trong 1 giờ ở RT. Không cần phải rửa tiếp, các phiến kính sau đó được ủ ở nhiệt độ 4°C qua đêm trong huyết thanh thỏ chứa các kháng thể đa dòng kháng EV71 (quà tặng hào

phóng từ Dr. Hiroyuki Shimizu của NIID, Nhật Bản). Sau đó, các phiến kính được rửa 5 lần trong nước muối được đệm Tris (độ pH=7,4), 0,05% Tween-20 (TBS-T), và được rửa hai lần trong TBS trước làm làm ngừng peroxidaza nội sinh bằng cách bổ sung H_2O_2 3% trong 1 giờ ở rt. Tiếp theo, các phiến kính được rửa hai lần trong TBS trước khi ủ bằng kháng Ig-HRP thỏ của lợn (Dako Cytomation, Đan Mạch) trong 1 giờ ở RT. Sau khi rửa, các phiến kính được ủ trong cơ chất diaminobenzidin (DAB), và được phản nhuộm bằng hematoxylin.

Lập bản đồ các kháng nguyên virut và tổn thương do virut gây ra trong lát cắt mô: Các ảnh mẫu của các lát cắt vòng đầu đại diện của não chuột nhắt được tải xuống từ www dot brainstars dot org [89]. Các ảnh này được sử dụng miễn phí và được biến đổi dưới sự cho phép của Creative Commons of Japan. Các tổn thương quan sát được và các kháng nguyên virut được đánh dấu lên trên các ảnh mẫu. Các vùng não bị ảnh hưởng được nhận diện bằng cách sử dụng tập bản đồ các lát cắt vòng đầu của não chuột nhắt (www dot mouse dot brain-map dot org slash static slash atlas) [90]. Tương tự, lát cắt vòng đại diện của tủy sống phần ngực được sử dụng làm mẫu cho bản đồ tủy sống. Sau đó, các vùng thể hiện sự có mặt của các kháng nguyên virut và tổn thương do virut gây ra được đánh dấu lên trên các ảnh mẫu.

Đo nồng độ catecholamin huyết thanh: Các mẫu máu được gom lại bằng cách chích tim của các chuột gần chết trong khi giải phẫu. Huyết thanh được thu bằng cách ly tâm các mẫu máu đã đông tụ ở tốc độ 3000 g (30000 m/s^2), 4° C, trong 30 phút, sau đó, được bảo quản ở nhiệt độ -20°C cho đến khi xác định nồng độ catecholamin bằng cách sử dụng kit 2-CAT (A-N) ELISA (Labor Diagnostika Nord, Đức) theo quy trình của nhà sản xuất.

Phân tích thống kê: Tất cả các đồ thị được tạo ra và các phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng GraphPad Prism (phiên bản 6.01) cho Windows (GraphPad Software, USA, www dot graphpad dot com).

So sánh kiểu hình nhiễm gây ra bởi các chủng virut EV71:TLLm và EV71:TLLmv: Các nhóm chuột nhắt con BALB/c 6 ngày tuổi được tiêm liều 106 CCID50 của *EV71:BS*, *EV71:TLLm*, hoặc *EV71:TLLmv* thông qua đường trong màng bụng (I.P.) hoặc trong cơ (I.M.) (n=10 chuột mỗi nhóm). Các chuột được quan sát mỗi

ngày hai lần về các dấu hiệu của bệnh trong suốt tuần đầu sau tiêm và được làm chết khi các dấu hiệu có tính quyết định được phát hiện như đã được mô tả.

Đo hàm lượng kháng thể trung hòa trong huyết thanh từ chuột nhắt được lây nhiễm: Các mẫu máu được gom lại bằng cách chích tim ở lúc giải phẫu trước khi bị đông tụ ở nhiệt độ trong phòng và huyết thanh được thu bằng cách ly tâm trong 20 phút ở tốc độ 3000g (30000 m/s^2), 4° C. Các mẫu được bảo quản ở nhiệt độ -20° C cho đến khi phân tích tiếp. Các mẫu ngẫu nhiên của dung dịch gốc đông lạnh được thử nghiệm để đo hiệu giá kháng thể trung hòa. Các dịch pha loãng theo bậc hai lần của huyết thanh (1:20 đến 1:1280) được chuẩn bị trong đĩa 96 giếng và được trộn với 100 $CCID_{50}$ virut. Hỗn hợp này được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ 37° C trước khi bổ sung các tế bào NIH/3T3 (6000 tế bào/giếng). Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37° C trong vài ngày và được quan sát về CPE giữa các ngày 4-10. Hiệu giá kháng thể trung hòa được xác định bằng cách sử dụng phương pháp Reed and Muench (được báo cáo dưới dạng đơn vị trên mỗi ml huyết thanh).

Ví dụ 22

Động lực học sự nhiễm của chủng EV71 cải biến trong vật chủ chuột

Các mẫu động vật hiện nay của bệnh và bệnh học thần kinh do virut entero 71 (EV71) gây ra chỉ sao chép một phần bệnh ở người. Do đó, các tác giả sáng chế nhằm mục đích phát triển mẫu bệnh học đáng tin cậy trên lâm sàng bằng cách sử dụng các chủng virut được làm thích ứng với tế bào chuột nhắt (NIH/3T3) *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv*, mà có thể lây nhiễm một cách có sinh sôi cả hai dòng tế bào của động vật gặm nhấm và động vật linh trưởng [88]. Thứ nhất, độc lực tương đối của *EV71:TLLm* và *EV71:TLLmv* được so sánh với chủng gốc *EV71:BS* được đánh giá bằng cách đánh giá bệnh học ở chuột nhắt BALB/c 1 tuần tuổi được lây nhiễm virut thông qua đường trong màng bụng (I.P.). Đồng thời sự chuyển đổi huyết thanh được quan sát trong tất cả các chuột được tiêm, chỉ chuột nhắt được lây nhiễm bởi *EV71:TLLm* hoặc *EV71:TLLmv* tiến triển bệnh đến chết (Fig.22a và 22b). Tương tự, khi các chủng được làm thích ứng được dùng thông qua đường trong cơ (I.M.) thay thế, các chủng này lại liên quan đến sự giảm khả năng sống của vật chủ so với chủng gốc *EV71:BS* (khả năng sống 57%; Fig.22c). Khi các đường lây nhiễm I.P. và I.M. được xem xét cùng nhau, thời gian sống trung bình sau khi tiêm là 4 ngày sau nhiễm (DPI) đối với sự nhiễm *EV71:TLLmv* và 7 DPI đối với sự

nhiễm *EV71:TLLm* (x^2 = 6,840; p = 0,0089). Đồng thời, dữ liệu này cho thấy rằng chủng virut được làm thích ứng với tế bào chuột nhắt *EV71:TLLmv* có liên quan đến khả năng gây chết lớn nhất , và do đó, được sử dụng trong tất cả các thử nghiệm tiếp theo.

Liều virut tối ưu, đường tiêm, và tuổi của chuột nhắt để sử dụng trong quá trình phát triển mẫu tiếp được tiếp tục đánh giá. Thứ nhất, đã xác nhận rằng mức độ nghiêm trọng của bệnh ở chuột nhắt được lây nhiễm bởi *EV71:TLLmv* là phụ thuộc vào liều virut; tỷ lệ sống tối thiểu được quan sát thấy ở các chuột được tiêm liều lây nhiễm 50% tế bào ($CCID_{50}$) bằng 10^6 (Fig.23a) và điểm cuối nhân đạo trung bình (HD50) là tương đương với 3,98 x 10^3 $CCID_{50}$ (Fig.23b). Sau đó, ảnh hưởng của tuổi chuột và đường lây nhiễm lên sự sống của vật chủ được đánh giá; đường cong thời gian sống của chuột nhắt 1 tuần tuổi được tiêm *EV71:TLLmv* là không bị ảnh hưởng đáng kể bởi đường tiêm(Fig.23c), nhưng các chuột nhỏ biểu hiện khả năng sống kém hơn một cách nhất quán so với các chuột lớn hơn , không phụ thuộc vào vị trí tiêm virut (Fig.23d). Chỉ ở các chuột lớn hơn là có thể thấy rõ tác dụng bất kỳ của đường lây nhiễm lên mức độ nghiêm trọng của bệnh; còn chuột nhắt 3 tuần tuổi hoàn toàn kháng với việc lây nhiễm qua đường I.P., một số chuột không sống sót sau lây nhiễm virut qua đường I.M. (Fig.24a và 24b). Sự chuyển đổi huyết thanh được phát hiện trong tất cả các chuột mà sống sót sau lây nhiễm, bao gồm các chuột không biểu hiện dấu hiệu bất kỳ của bệnh (Fig.24c, 24d và 24e). Dữ liệu này chứng minh rằng *EV71:TLLmv* gây ra sự nhiễm cấp tính và nặng đến chết ở chuột nhắt có độ tuổi 1-3 tuần tuổi. Trong số các điều kiện được thử nghiệm trong bản mô tả này, mức độ nghiêm trọng của bệnh là lớn nhất ở chuột nhắt 1 tuần tuổi được tiêm liều virut bằng 10^6 $CCID_{50}$ vào trong khoang màng bụng hoặc mô cơ.

Ví dụ 23

Tiến triển của bệnh ở chuột nhắt được lây nhiễm bởi *EV71:TLLmv*

Phần lớn chuột nhắt 1 tuần tuổi được tiêm *EV71:TLLmv* chết do bệnh và biểu hiện vô số dấu hiệu lâm sàng của chứng bệnh thần kinh. Các chuột được lây nhiễm biểu hiện sự mất điều hòa, run cục bộ hoặc toàn bộ cơ thể, dáng đi không vững, và liệt và liệt nhẹ chân tạm thời hoặc dai dẳng cho đến thời điểm làm chết không đau đớn. Trên cơ sở biểu hiện lâm sàng, các chuột ốm có thể được phân loại dễ dàng thành bốn nhóm (Bảng 6). *Sống sót* bao gồm chuột nhắt mà không xuất hiện dấu hiệu gần chết ở thời điểm bất kỳ trong suốt giai đoạn quan sát trong 28 ngày. Các chuột *nhóm I* biểu hiện chỉ sau 3-7 DPI

với các dấu hiệu nặng bao gồm không có khả năng tự giữ thăng bằng và sững sờ hoặc hôn mê. Tất cả chuột nhắt trong nhóm này thể hiện liệt nhẹ và/hoặc liệt chân co cứng (chân trước, chân sau, hoặc cả hai), nhưng còn một số chuột không có các triệu chứng hô hấp (*nhóm IB)*, các con khác còn được đặc trưng bởi các dấu hiệu suy kiệt hô hấp, bao gồm nhịp thở nhanh, nấc, thở hổn hển, và sự suy thoái dưới sườn (*nhóm IA*). Việc quan sát dấu hiệu xác nhận ở chuột nhắt được lây nhiễm bởi *EV71:TLLmv* thể hiện các dấu hiệu *nhóm IA* của bệnh được thực hiện bằng viđeo bao gồm hai đoạn viđeo của hai chuột *nhóm IA* khác nhau. Cả hai chuột đều không thể tự giữ thăng bằng và ở trong trạng thái hôn mê. Sự suy kiệt hô hấp nặng thể hiện dưới dạng nhịp thở nhanh với sự suy thoái dưới sườn rõ ràng ở chuột nhắt thứ nhất. Thở hổn hển, sự suy thoái dưới sườn và dịch có bọt chảy ra từ lỗ mũi được thấy ở chuột nhắt thứ hai. Việc quan sát dấu hiệu xác nhận ở chuột nhắt được lây nhiễm bởi *EV71:TLLmv* thể hiện các dấu hiệu *nhóm IB* của bệnh được thực hiện bằng viđeo của một chuột nhắt *nhóm 1B*. Chuột này không thể tự giữ thăng bằng và ở trong trạng thái sững sờ. Chứng liệt cùng bên của chân phải và run dai dẳng của chân trái sau cũng được quan sát thấy. Cuối cùng, chuột nhắt *nhóm II* biểu hiện sau 7 DPI với các dấu hiệu nhiễm bao gồm liệt mềm dai dẳng của chân (kéo dài >48 giời) (Fig.23e) cùng với giảm cân nặng (>20% thể trọng tối đa). Trong tất cả các nhóm bệnh, một vài trong số các chuột được lây nhiễm biểu hiện tổn thương trụi lông hoặc các chấm trụi lông trên lưng của chúng mà kéo dài trong vài ngày (Fig.23f). Phần lớn chuột nhắt con được tiêm I.P. bằng *EV71:TLLmv* được phân loại vào *nhóm I* (Fig.23g); các chuột *nhóm IA* chiếm 19,3% (n=11; các dấu hiệu hô hấp rõ ràng), còn các chuột *nhóm IB* chiếm 43,9% (n=25; không có dấu hiệu hô hấp rõ). Các chuột *nhóm II*4 chỉ chiếm 12,3% (n=7) trong số chuột nhắt được lây nhiễm, và nhóm *Sống sót* cấu thành 24,5% (n=14) trong số tất cả chuột nhắt được lây nhiễm. Kiểu phân bố tương tự giữa các loại bệnh được quan sát ở chuột nhắt con được tiêm thông qua đường I.M. (Fig.23h). Đồng thời, dữ liệu này cho thấy rằng chuột nhắt được lây nhiễm bởi *EV71:TLLmv* thể hiện tỷ lệ mắc và mức độ nghiêm trọng thay đổi của cả triệu chứng thần kinh và hô hấp mà phản ánh phổ đầy đủ của bệnh được quan sát ở người bệnh.

Bảng 6

Các dấu hiệu lâm sàng của chuột nhắt BALB/c được lây nhiễm bởi *EV71:TLLmv* tại thời điểm làm chết không đau đớn

	Nhóm IA	*Nhóm IB*	*Nhóm II*	*Sống sót*[a]
Thời gian đến lúc khởi phát dấu hiệu [ngày sau nhiễm (DPI)]	Trong vòng 3-5	Trong vòng 3-7	> 7	N/A
Mức ý thức	Sững sờ[b] / hôn mê[c]	Sững sờ[b]	Tích cực	Tích cực
Giảm cân	< 20% thể trọng	< 20% thể trọng	> 20% thể trọng	Không hoặc < 20% thể trọng
Chức năng chân (>48 h)	Liệt nhẹ / liệt chân co cứng	Liệt nhẹ / liệt chân co cứng	Liệt chân mềm	Bình thường
Chức năng hô hấp	Nhịp thở nhanh / thở hổn hển / nấc	Thường xuyên	Thường xuyên	Thường xuyên
Chức năng tim	Nhịp tim nhanh	Nhịp tim nhanh[d] / Thường xuyên	Thường xuyên	Thường xuyên
Run chân	Có thể biểu hiện	Có thể biểu hiện	Không biểu hiện	Không biểu hiện

[a] Các chuột được đánh giá ở cuối giai đoạn quan sát (28 DPI)

[b] Chuột không thể tự giữ thăng bằng, nhưng đáp ứng với kích thích vật lý của ngón chân.

[c] Chuột không thể tự giữ thăng bằng và không đáp ứng với kích thích vật lý của ngón chân.

[d] Nhịp tim nhanh được quan sát thấy ở 35% chuột nhắt *nhóm IB*

Ví dụ 24

Tình trạng phù phổi có nguồn gốc thần kinh ở chuột nhắt biểu hiện các dấu hiệu *nhóm IA*

Dù sự suy kiệt hô hấp quan sát được ở chuột nhắt *nhóm IA* là dấu hiệu của tình trạng phù phổi (pulmonary edema - PE) do virut gây ra được khảo sát tiếp. So sánh bệnh học toàn bộ phổi giữa chuột nhắt *nhóm IA, nhóm IB,* và *nhóm II* phát hiện rằng phổi *nhóm IA* bị sưng, bị xẹp không hoàn toàn khi giải phẫu (Fig.25a-25d), và thể hiện khối lượng ướt tăng so với phổi từ các nhóm khác (Fig.22E). So sánh các lát cắt mô của phổi từ chuột được tiêm giả (Fig.25f) và phổi *nhóm IA* phát hiện các vùng ổ xuất huyết và sự tích tụ dịch protein và dịch đầy hồng cầu trong khoang phế nang chỉ ở các chuột được lây nhiễm (Fig.25g). Các dấu hiệu bệnh lý này không có ở phổi của chuột nhắt *nhóm IB* và *nhóm II* (Fig.25h và 25i). Hơn thế nữa, các tác giả sáng chế đã không tìm ra bằng chứng của sự thâm nhiễm viêm hoặc các kháng nguyên virut trong phổi được lấy từ nhóm chuột nhắt bất kỳ(Fig.26a). Tương tự, phân tích hóa mô của cơ tim trong mỗi nhóm chuột nhắt

được lây nhiễm cũng không thể phát hiện ra bằng chứng bất kỳ của sự thâm nhiễm viêm, sự hoại tử cơ tim, hoặc các kháng nguyên virut (Fig.26b). Đồng thời, dữ liệu này thể hiện rằng sự suy kiệt hô hấp rõ ràng ở chuột nhắt *nhóm IA* không thể được cho là do bệnh viêm phổi hoặc bệnh suy tim sung huyết. Do đó, các tác giả sáng chế đã cố gắng xác định xem PE quan sát được trong nhóm này có nguồn gốc thần kinh hay không, vì vậy, tiếp theo các tác giả đo nồng độ catecholamin trong huyết thanh để xác định xem nồng độ chất dẫn truyền thần kinh có được điều biến trong chuột nhắt được lây nhiễm *EV71:TLLmv* có các dấu hiệu hô hấp hay không (*nhóm IA*). Bằng cách sử dụng phương pháp này, các tác giả sáng chế đã quan sát thấy rằng các nồng độ trong máu của cả adrenalin (epinephrin) và noradrenalin (norepinephrin) cao hơn một cách đáng kể ở chuột nhắt *nhóm IA* so với các nồng độ được phát hiện ở chuột nhắt *nhóm II* hoặc chuột được lây nhiễm giả (Fig.25j và 25k). Dữ liệu này cho thấy rõ rằng chuột nhắt *nhóm IA* biểu hiện tình trạng phù phổi có nguồn gốc thần kinh (NPE) do EV71 gây ra trước khi chết.

Ví dụ 25

Sự ảnh hưởng lên hệ thần kinh của virut *EV71:TLLmv* ở chuột nhắt *nhóm IA, nhóm IB*, và *nhóm II*

Sự phân bố của *EV71:TLLmv* và các tổn thương do virut gây ra trong não và tủy sống của các con vật từ mỗi nhóm bệnh tiếp theo được đánh giá để nhận diện các yếu tố mà có thể góp phần vào sự phát triển chọn lọc của NPE chỉ ở chuột nhắt *nhóm IA*. Phần lớn các chuột trong *nhóm IA* và *nhóm IB* thể hiện việc nhuộm các kháng nguyên virut ở khắp nơi (>10 tế bào thần kinh dương tính được phát hiện) và tổn thương bệnh lý nhẹ (>5 tổn thương quan sát được) ở tất cả các vùng CNS được đánh giá (Bảng 7). Ngược lại, chỉ 1 trong số 5 chuột nhắt có bệnh *nhóm II* biểu hiện các kháng nguyên virut và/hoặc tổn thương trong vỏ não cảm giác, hồi hải mã, não trung gian, não giữa, hành tủy não tủy, hoặc tủy sống thắt lưng. Các tác giả sáng chế không thể phát hiện các kháng nguyên virut trong mô bất kỳ được thử nghiệm bên ngoài của CNS (ngoại trừ đối với cơ xương sau khi tiêm thông qua đường I.M.; dữ liệu không được thể hiện).

Bảng 7

Sự phân bố CNS của kháng nguyên EV71 và tổn thương do virut gây ra ở chuột nhắt BALB/c được lây nhiễm rồi chết

		Nhóm IA				*Nhóm IB*				*Nhóm II*			
		Kháng nguyên EV71		Bệnh học		Kháng nguyên EV71		Bệnh học		Kháng nguyên EV71		Bệnh học	
Vỏ não	Vỏ não vận động	+++[a]	100%[b] (5/5)	+++[c]	80%[d] (4/5)	+++	80% (4/5)	+++	80% (4/5)		0% (0/5)		0% (0/5)
Vỏ não	Vỏ não cảm giác	++	60% (3/5)	++	80% (4/5)	++	80% (4/5)	++	80% (4/5)	+	20% (1/5)	+	20% (1/5)
Hồi hải mã		++	60% (3/5)	+	60% (3/5)	+	40% (2/5)	+	20% (1/5)	+	20% (1/5)	+	20% (1/5)
Não trung gian	Đồi não	+++	100% (5/5)	+++	60% (3/5)	++	60% (3/5)	++	20% (1/5)	+	20% (1/5)	+	20% (1/5)
Não trung gian	Dưới đồi	+++	80% (4/5)	+++	80% (4/5)	++	60% (3/5)	++	60% (3/5)	+	20% (1/5)	+	20% (1/5)
Não giữa		+++	100% (5/5)	+++	100 % (5/5)	+	60% (3/5)	++	60% (3/5)	+	20% (1/5)	+	20% (1/5)
Phần trước não sau	Tiểu não	++	80% (4/5)	++	80% (4/5)	+	40% (2/5)	+	60% (3/5)		0% (0/5)		0% (0/5)
Phần trước não sau	Cầu não	++	80% (4/5)	++	80% (4/5)	++	20% (1/5)	++	60% (3/5)		0% (0/5)		0% (0/5)
Não tủy	Hành tủy	+++	100% (5/5)	+++	100 % (5/5)	++	40% (2/5)	++	60% (3/5)	+	20% (1/5)	+	20% (1/5)
Tủy sống	Cổ	++	100% (5/5)	++	100 % (5/5)	++	80% (4/5)	++	60% (3/5)		0% (0/5)		0% (0/5)
Tủy sống	Ngực	++	100% (5/5)	++	100 % (5/5)	++	80% (4/5)	++	80% (4/5)		0% (0/5)		0% (0/5)
Tủy sống	Thắt lưng	++	100% (5/5)	++	100 % (5/5)	++	80% (4/5)	++	60% (3/5)	+	20% (1/5)	+	20% (1/5)

[a] Mật độ của các kháng nguyên virut được phát hiện trên mỗi phiến kính: +, < 10 nơron dương tính; ++, 10-20 nơron dương tính; +++, > 20 nơron dương tính

[b] Tỷ lệ phần trăm động vật biểu hiện các kháng nguyên virut trong vùng não được quy định (n = 5)

[c] Sự phân bố của các tổn thương bệnh học trong các mô thần kinh: +, < 5 tổn thương; ++, 5-10 tổn thương; +++, >10 tổn thương

[d] Tỷ lệ phần trăm động vật biểu hiện tổn thương trong vùng não được quy định (n = 5)

Khi bệnh học CNS giữa chuột nhắt *nhóm IA* và *nhóm IB* được so sánh, đã quan sát thấy rằng cả tổn thương mô và các kháng nguyên virut nằm ở cùng vùng trong hồi hải mã, não trung gian, não giữa, tiểu não, và hành tủy, nhưng bệnh học nặng hơn ở các chuột bị bệnh *nhóm IA* (Bảng 7 và Fig.27a-27d). Thực vậy, khi so sánh với chuột nhắt *nhóm IB*, các chuột trong *nhóm IA* biểu hiện sự thoái hóa thần kinh, sự thực bào, và sự hoại tử sâu rộng hơn trong các tế bào thần kinh CA3 của hồi hải mã (Fig.28a và 28b). Chuột nhắt *nhóm IA* còn biểu hiện mức độ nhuộm kháng nguyên virut mạnh ở dưới đồi, kèm theo viêm mô và hoại tử nơron thần kinh rõ rệt, trong khi các dấu hiệu bệnh lý này bị giới hạn ở chuột *nhóm IB* (Fig.28c và 28d và Fig.27b). Tương tự, chuột nhắt *nhóm IA* cũng thể hiện các dấu hiệu bệnh học do virut gây ra và cường độ kháng nguyên virut nặng hơn trong phức hợp ở dưới phần sau của đồi não (Fig.28e và 28f và Fig.27b), các mô liên quan đến não giữa bao gồm chất xám quanh đường thông não thất (peri-aqueductal gray - PAG), vùng lưới não giữa, và củ não trước liên quan đến vận động (Fig.28g và Fig.28h và Fig.27c), cũng như trong các tế bào Purkinje và nhân răng của tiểu não (Fig.28i và Fig.28j, Fig.27d và Fig.29a). Trong cả hai nhóm bệnh (*nhóm IA* và *nhóm IB*), sự phân bố sâu rộng nhất của các kháng nguyên virut và tổn thương bệnh lý liên quan đến tổn thương nơron và viêm mô được phát hiện trong hành tủy não tủy (Fig.28k và 28l), đặc biệt là trong vùng liên quan đến vận động của nhân lưới trung gian (intermediate reticular nuclei - IRN), nhân lưới bên (parvicellular reticular nuclei - PARN), và nhân tủy sống của dây thần kinh sinh ba (spinal nucleus of the trigeminal nerve - sptV) (Fig.27d và Fig.29b). Tuy nhiên, chỉ chuột nhắt *nhóm 1A* thể hiện các kháng nguyên virut và tổn thương mô trong vùng mặt bụng và mặt lưng của nhân lưới tủy xương (medullary reticular nucleus - MdRN), nhân của bó đơn độc (nucleus of the solitary tract - NTS) và vùng sau (area prostrema - AP) (Fig.29b và 29c). Để so sánh, các ảnh đại diện của hồi hải mã, dưới đồi, đồi não, não giữa, tiểu não, và hành tủy từ chuột nhắt được lây nhiễm giả cũng được thể hiện (Fig.30a-30f). Ngược lại, chuột nhắt *nhóm IA* và *nhóm IB* không khác về sự phân bố, vị trí hoặc mức độ tổn thương mô hoặc nhuộm kháng nguyên virut trong vỏ não vận động, vỏ não cảm giác, cầu não hoặc sừng bụng của chất xám tủy sống (Fig.28m và 28n, Fig.27a-27c và Fig.31a-31e), phù hợp với khái niệm

rằng NPE được gây ra do tổn thương được kích hoạt bởi virut vào các vùng não cụ thể chứ không phải sự tăng đều bệnh học do EV71 gây ra qua tất cả các mô.

Thuật ngữ "a" và "an" và "the" được sử dụng trong bản mô tả bao gồm cả dạng số ít và dạng số nhiều, trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ "bao gồm", "có", "gồm có", và "chứa" được hiểu là thuật ngữ mở (tức là nghĩa "bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở"), trừ khi có quy định khác. Việc trích dẫn các khoảng trị số trong bản mô tả này chỉ được dự định dùng như phương pháp tốc ký đề cập một cách riêng rẽ đến mỗi trị số riêng nằm trong khoảng này, trừ khi có quy định khác, và mỗi trị số riêng được kết hợp vào trong bản mô tả như thể nó được trích dẫn riêng rẽ trong bản mô tả này. Tất cả các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể được thực hiện theo thứ tự thích hợp bất kỳ, trừ khi có quy định khác. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc cách diễn đạt làm ví dụ (ví dụ, "như") được đưa ra trong bản mô tả này, chỉ được dự định để làm sáng tỏ hơn sáng chế và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế trừ khi được bảo hộ khác. Không có cách diễn đạt nào trong bản mô tả được hiểu là chỉ ra yếu tố không được bảo hộ như yếu tố thiết yếu đối với việc thực hiện sáng chế. Các phương án của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này, kể cả phương án tối ưu đã biết đối với các tác giả sáng chế để thực hiện sáng chế. Các cải biến của các phương án đó là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Các tác giả sáng chế mong đợi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này sử dụng các cải biến này khi thích hợp, và các tác giả sáng chế dự định sáng chế được thực hiện khác so với khi được mô tả trong bản mô tả này. Do đó, sáng chế bao gồm tất cả các cải biến và các phương án tương đương của đối tượng được trích dẫn trong yêu cầu bảo hộ kèm theo đây như được phép bởi luật ứng dụng. Hơn nữa, kết hợp bất kỳ của các yếu tố được mô tả trên đây trong tất cả các cải biến có thể của nó được bao gồm trong sáng chế, trừ khi có quy định khác.

Tài liệu tham khảo

1.Alexander JP, Baden L, Pallansch MA, Anderson LJ (1994) Enterovirus 71 infections and neurologic disease-United States, 1977-1991. J Infect Dis 169: 905-908.

2.Melnick JL (1996) Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: Fields B N KDM, Howley P M, et al.., editor. Fields Virology. Philadelphia.: Lippincott-Raven. 655-712.

3.Bible JM, Iturriza-Gomara M, Megson B, Brown D, Pantelidis P, et al. (2008) Molecular epidemiology of human enterovirus 71 in the United Kingdom from 1998 to 2006. J Clin Microbiol 46: 3192-3200.

4.Ooi MH, Wong SC, Lewthwaite P, Cardosa MJ, Solomon T (2010) Clinical features, diagnosis, and management of enterovirus 71. Lancet Neurol 9: 1097-1105.

5.Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, Cardosa MJ, McMinn P, et al. (2010) Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. Lancet Infect Dbằng 10: 778-790.

6.Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH (1974) An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. J Infect Dis 129: 304-309.

7.Blomberg J, Lycke E, Ahlfors K, Johnsson T, Wolontis S, et al. (1974) Letter: New enterovirus type associated with epidemic of aseptic meningitis and-or hand, foot, and mouth disease. Lancet 2: 112.

8.Kennett ML, Birch CJ, Lewis FA, Yung AP, Locarnini SA, et al. (1974) Enterovirus type 71 infection in Melbourne. Bull World Health Organ 51: 609-615.

9.Deibel R, Gross LL, Collins DN (1975) Isolation of a new enterovirus (38506). Proc Soc Exp Biol Med 148: 203-207.

10.Hagiwara A, Tagaya I, Yoneyama T (1978) Epidemic of hand, foot and mouth disease associated with enterovirus 71 infection. Intervirology 9: 60-63.

11.Chumakov M, Voroshilova M, Shindarov L, Lavrova I, Gracheva L, et al. (1979) Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. Arch Virol 60: 329-340.

12.Shindarov LM, Chumakov MP, Voroshilova MK, Bojinov S, Vasilenko SM, et al. (1979) Epidemiological, clinical, and pathomorphological characteristics of epidemic poliomyelitis-like disease caused by enterovirus 71. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 23: 284-295.

13.Nagy G, Takátsy S, Kukán E, Mihály I, Dömök I (1982) Virological diagnosis of enterovirus type 71 infections: experiences gained during an epidemic of acute CNS diseases in Hungary in 1978. Arch Virol 71: 217-227.

14.Chonmaitree T, Menegus MA, Schervish-Swierkosz EM, Schwalenstocker E (1981) Enterovirus 71 infection: report of an outbreak with two cases of paralysis and a review of the literature. Pediatrics 67: 489-493.

15.Samuda GM, Chang WK, Yeung CY, Tang PS (1987) Monoplegia caused by Enterovirus 71: an outbreak in Hong Kong. Pediatr Infect Dis J 6: 206-208.

16.Gilbert GL, Dickson KE, Waters MJ, Kennett ML, Land SA, et al. (1988) Outbreak of enterovirus 71 infection in Victoria, Australia, with a high incidence of neurologic involvement. Pediatr Infect Dis J 7: 484-488.

17.Hayward JC, Gillespie SM, Kaplan KM, Packer R, Pallansch M, et al. (1989) Outbreak of poliomyelitis-like paralysis associated with enterovirus 71. Pediatr Infect Dis J 8: 611-616.

18.Tagaya I, Takayama R, Hagiwara A (1981) A large-scale epidemic of hand, foot and mouth disease associated with enterovirus 71 infection in Japan in 1978. Jpn J Med Sci Biol 34: 191-196.

19.Ishimaru Y, Nakano S, Yamaoka K, Takami S (1980) Outbreaks of hand, foot, and mouth disease by enterovirus 71. High incidence of complication disorders of central nervous system. Arch Dis Child 55: 583-588.

20.Hagiwara A, Yoneyama T, Hashimoto I (1983) Isolation of a temperature-sensitive strain of enterovirus 71 with reduced neurovirulence for monkeys. J Gen Virol 64 (Pt 2): 499-502.

21.Lum LC, Wong KT, Lam SK, Chua KB, Goh AY, et al. (1998) Fatal enterovirus 71 encephalomyelitis. J Pediatr 133: 795-798.

22.Lum LC, Wong KT, Lam SK, Chua KB, Goh AY (1998) Neurogenic pulmonary oedema and enterovirus 71 encephalomyelitis. Lancet 352: 1391.

23.Chang LY, Huang YC, Lin TY (1998) Fulminant neurogenic pulmonary oedema with hand, foot, and mouth disease. Lancet 352: 367-368.

24.Yan JJ, Wang JR, Liu CC, Yang HB, Su IJ (2000) An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan 1998: a comprehensive pathological, virological, and molecular study on a case of fulminant encephalitis. J Clin Virol 17: 13-22.

25.Liu CC, Tseng HW, Wang SM, Wang JR, Su IJ (2000) An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan, 1998: epidemiologic and clinical manifestations. J Clin Virol 17: 23-30.

26.Wang JR, Tsai HP, Chen PF, Lai YJ, Yan JJ, et al. (2000) An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan, 1998. II. Laboratory diagnosis and genetic analysis. J Clin Virol 17: 91-99.

27.China C (2008) Report on the hand, foot and mouth disease outbreak in Fuyang City, Anhui Province and the prevention and control in China. Beijing, China: Office of the World Health Organization, China.

28.Yang F, Zhang T, Hu Y, Wang X, Du J, et al. (2011) Survey of enterovirus infections from hand, foot and mouth disease outbreak in China, 2009. Virol J 8: 508.

29.Zeng M, El Khatib NF, Tu S, Ren P, Xu S, et al. (2012) Seroepidemiology of Enterovirus 71 infection prior to the 2011 season in children in Shanghai. J Clin Virol 53: 285-289.

30.Zhang Y, Cui W, Liu L, Wang J, Zhao H, et al. (2011) Pathogenesis study of enterovirus 71 infection in rhesus monkeys. Lab Invest 91: 1337-1350.

31.Arita M, Shimizu H, Nagata N, Ami Y, Suzaki Y, et al. (2005) Temperature-sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys. J Gen Virol 86: 1391-1401.

32.Chen P, Song Z, Qi Y, Feng X, Xu N, et al. (2012) Molecular determinants of enterovirus 71 viral entry: cleft around GLN-172 on VP1 protein interacts with variable region on scavenge receptor B 2. J Biol Chem 287: 6406-6420.

33.Chen YC, Yu CK, Wang YF, Liu CC, Su IJ, et al. (2004) A murine oral enterovirus 71 infection model with central nervous system involvement. J Gen Virol 85: 69-77.

34.Chua BH, Phuektes P, Sanders SA, Nicholls PK, McMinn PC (2008) The molecular basis of mouse adaptation by human enterovirus 71. J Gen Virol 89: 1622-1632.

35.Khong WX, Yan B, Yeo H, Tan EL, Lee JJ, et al. (2012) A non-mouse-adapted enterovirus 71 (EV71) strain exhibits neurotropism, causing neurological manifestations in a novel mouse model of EV71 infection. J Virol 86: 2121-2131.

36.Ong KC, Badmanathan M, Devi S, Leong KL, Cardosa MJ, et al. (2008) Pathologic characterization of a murine model of human enterovirus 71 encephalomyelitis. J Neuropathol Exp Neurol 67: 532-542.

37.Wang W, Duo J, Liu J, Ma C, Zhang L, et al. (2011) A mouse muscle-adapted enterovirus 71 strain with increased virulence in mice. Microbes Infect 13: 862-870.

38.Wang YF, Chou CT, Lei HY, Liu CC, Wang SM, et al. (2004) A mouse-adapted enterovirus 71 strain causes neurological disease in mice after oral infection. J Virol 78: 7916-7924.

39.Yao PP, Qian L, Xia Y, Xu F, Yang ZN, et al. (2012) Enterovirus 71-induced neurological disorders in young gerbils, Meriones unguiculatus: development and application of a neurological disease model. PLoS One 7: e51996.

40.Borrego B, Novella IS, Giralt E, Andreu D, Domingo E (1993) Distinct repertoire of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the presence or absence of immune selection. J Virol 67: 6071-6079.

41.Burch CL, Chao L (1999) Evolution by small steps and rugged landscapes in the RNA virus phi6. Genetics 151: 921-927.

42.Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ (1992) Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. Gene 122: 281-288.

43.Biebricher C, Eigen M (2006) What is a Quasispecies. In: Domingo E, editor. Quasispecies: Concept and Implications for Virology. Heidelberg: Springer-Verlag. 1-31.

44.Eigen M, Schuster P (1977) The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle. Naturwissenschaften 64: 541-565.

45.Eigen M, Biebricher C (1988) Sequence Space and Quasispecies Distribution. In: Domingo E, Holland J, Ahlquist P, editors. RNA Genetics. Boca Raton: CRC Press. 211-245.

46.ATCC NIH/3T3 ATCC CRL-11658.

47.Yamayoshi S, Yamashita Y, Li J, Hanagata N, Minowa T, et al. (2009) Scavenger receptor B2 is a cellular receptor for enterovirus 71. Nat Med 15: 798-801.

48.Yamayoshi S, Ohka S, Fujii K, Koike S (2013) Functional comparison of SCARB2 and PSGL1 as receptors for enterovirus 71. J Virol 87: 3335-3347.

49.Yamayoshi S, Koike S (2011) Identification of a human SCARB2 region that is important for enterovirus 71 binding and infection. J Virol 85: 4937-4946.

50.Zaini Z, Phuektes P, McMinn P (2012) Mouse adaptation of a sub-genogroup B5 strain of human enterovirus 71 is associated with a novel lysine to glutamic acid substitution at position 244 in protein VP1. Virus Res 167: 86-96.

51.Arita M, Ami Y, Wakita T, Shimizu H (2008) Cooperative effect of the attenuation determinants derived from poliovirus sabin 1 strain is essential for attenuation of enterovirus 71 in the NOD/SCID mouse infection model. J Virol 82: 1787-1797.

52.Zaini Z, McMinn P (2012) A single mutation in capsid protein VP1 (Q145E) of a genogroup C4 strain of human enterovirus 71 generates a mouse-virulent phenotype. J Gen Virol 93: 1935-1940.

53.Liu CC, Chou AH, Lien SP, Lin HY, Liu SJ, et al. (2011) Identification and characterization of a cross-neutralization epitope of Enterovirus 71. Vaccine 29: 4362-4372.

54.Zaini Z, Phuektes P, McMinn P (2012) A reverse genetic study of the adaptation of human enterovirus 71 to growth in Chinese hamster ovary cell cultures. Virus Res 165: 151-156.

55.Miyamura K, Nishimura Y, Abo M, Wakita T, Shimizu H (2011) Adaptive mutations in the genomes of enterovirus 71 strains following infection of mouse cells expressing human P-selectin glycoprotein ligand-1. J Gen Virol 92: 287-291.

56.Lin JY, Chen TC, Weng KF, Chang SC, Chen LL, et al. (2009) Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. J Biomed Sci 16: 103.

57.Eigen M (1993) The origin of genetic information: viruses as models. Gene 135: 37-47.

58.Domingo E, Sheldon J, Perales C (2012) Viral quasispecies evolution. Microbiol Mol Biol Rev 76: 159-216.

59.Domingo E, Menéndez-Arias L, Holland JJ (1997) RNA virus fitness. Rev Med Virol 7: 87-96.

60.Domingo E (2002) Quasispecies theory in virology. Journal of Virology 76: 463-465.

61.Reed L, Muench H (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. The American Journal of Hygiene 27: 493-497.

62.Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, et al. (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. Science 309: 623-626.

63.Hall T (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.

64.Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. Bioinformatics 22: 195-201.

65.Guex N, Peitsch MC (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis 18: 2714-2723.

66.Bessaud M, Razafindratsimandresy R, Nougairede A, Joffret ML, Deshpande JM, Dubot-Peres A, Heraud JM, de Lamballerie X, Delpeyroux F, Bailly JL. (2014). Molecular comparison and evolutionary analyses of VP1 nucleotide sequences of new African human enterovirus 71 isolates reveal a wide genetic diversity. PloS one 9:e90624.

67.Neculai D, Schwake M, Ravichandran M, Zunke F, Collins RF, Peters J, Neculai M, Plumb J, Loppnau P, Pizarro JC, Seitova A, Trimble WS, Saftig P, Grinstein

S, Dhe-Paganon S. (2013). Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36. Nature 504:172-176.

68.Liu J, Dong W, Quan X, Ma C, Qin C, Zhang L. (2012). Transgenic expression of human P-selectin glycoprotein ligand-1 is not sufficient for enterovirus 71 infection in mice. Archives of virology 157:539-543.

69.Fujii K, Nagata N, Sato Y, Ong KC, Wong KT, Yamayoshi S, Shimanuki M, Shitara H, Taya C, Koike S. (2013). Transgenic mouse model for the study of enterovirus 71 neuropathogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110:14753-14758.

70.Lin YW, Yu SL, Shao HY, Lin HY, Liu CC, Hsiao KN, Chitra E, Tsou YL, Chang HW, Sia C, Chong P, Chow YH. (2013). Human SCARB2 transgenic mice as an infectious animal model for enterovirus 71. PloS one 8:e57591.

71.Victorio CB, Xu Y, Ng Q, Chow VT, Chua KB. (2014). Phenotypic and genotypic characteristics of novel mouse cell line (NIH/3T3)-adapted human enterovirus 71 strains (EV71:TLLm and EV71:TLLmv). PLoS One 9:e92719.

72.Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, Minagawa H, Mizuta K, Okamoto M, Nishimura H, Sanjoh K, Katsushima N, Itagaki T, Nagai Y, Fujii K, Koike S. (2012). Human SCARB2-dependent infection by coxsackievirus A7, A14, and A16 and enterovirus 71. J Virol 86:5686-5696.

73.Wilson T, Papahadjopoulos D, Taber T. (1979). The introduction of Poliovirus RNA into cells via lipid vesicles (Liposomes). Cell 17:77-84.

74.Collis PS, O'Donnell BJ, Barton DJ, Rogers JA, Flanegan JB. (1992). Replication of Poliovirus RNA and subgenomic RNA transcripts in transfected cells. Journal of Virology 66:6480-6488.

75.van Der Werf S, Bradley J, Wimmer E, Studier FW, Dunn JJ. (1986). Synthesis of infectious poliovirus RNA by purified T7 RNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 83:2330-2334.

76.Nishimura Y, Lee H, Hafenstein S, Kataoka C, Wakita T, Bergelson JM, Shimizu H. (2013). Enterovirus 71 binding to PSGL-1 on leukocytes: VP1-145 acts as a molecular switch to control receptor interaction. PLoS pathogens 9:e1003511.

77.Dang M, Wang X, Wang Q, Wang Y, Lin J, Sun Y, Li X, Zhang L, Lou Z, Wang J, Rao Z. (2014). Molecular mechanism of SCARB2-mediated attachment and uncoating of EV71. Protein & cell 5:692-703.

78.Wang X, Peng W, Ren J, Hu Z, Xu J, Lou Z, Li X, Yin W, Shen X, Porta C, Walter TS, Evans G, Axford D, Owen R, Rowlands DJ, Wang J, Stuart DI, Fry EE, Rao Z. (2012). A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71. Nature structural & molecular biology 19:424-429.

79.Lyu K, Ding J, Han JF, Zhang Y, Wu XY, He YL, Qin CF, Chen R. (2014). Human enterovirus 71 uncoating captured at atomic resolution. J Virol 88:3114-3126.

80.Ren J, Wang X, Hu Z, Gao Q, Sun Y, Li X, Porta C, Walter TS, Gilbert RJ, Zhao Y, Axford D, Williams M, McAuley K, Rowlands DJ, Yin W, Wang J, Stuart DI, Rao Z, Fry EE. (2013). Picornavirus uncoating intermediate captured in atomic detail. Nature communications 4:1929.

81.Shingler KL, Yoder JL, Carnegie MS, Ashley RE, Makhov AM, Conway JF, Hafenstein S. (2013). The enterovirus 71 A-particle forms a gateway to allow genome release: a cryoEM study of picornavirus uncoating. PLoS pathogens 9:e1003240.

82.Ong KC, Badmanathan M, Devi S, Leong KL, Cardosa MJ, Wong KT. (2008). Pathologic characterization of a murine model of human enterovirus 71 encephalomyelitis. Journal of neuropathology and experimental neurology 67:532-542.

83.Lin YW, Lin HY, Tsou YL, Chitra E, Hsiao KN, Shao HY, Liu CC, Sia C, Chong P, Chow YH. (2012). Human SCARB2-mediated entry and endocytosis of EV71. PloS one 7:e30507.

84.Bridgen, A (Ed.) (2012) *Reverse Genetics of RNA Viruses: Applications and Perspectives*, John Wiley & Sons, Ltd, Oxford.

85.Jackson, D, Cadman, A, Zurcher, T, Barclay, WS (2002) A reverse genetics approach for recovery of recombinant influenza B viruses entirely from cDNA. J Virol 76: 11744-11747.

86.Neumann, G, Watanabe, T, Ito, H, Watanabe, S et al. (1999) Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNA. Proc Natl Acad Sci USA 96: 9345-9350.

87.Stobart, CC and Moore, ML (2014) RNA virus reverse genetics and vaccine design. Viruses 6: 2531-2550.

88.Victorio, C.B., Xu, Y., Ng, Q., Chow, V.T. & Chua, K.B. Phenotypic and genotypic characteristics of novel mouse cell line (NIH/3T3)-adapted human enterovirus 71 strains (EV71:TLLm and EV71:TLLmv). *PloS one* 9, e92719 (2014).

89.Kasukawa, T., *et al.* Quantitative expression profile of distinct functional regions in the adult mouse brain. *PloS one* 6, e23228 (2011).

90.Lein, E.S., *et al.* Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168-176 (2007).

91.Wong, K.T., *et al.* The distribution of inflammation and virus in human enterovirus 71 encephalomyelitis suggests possible viral spread by neural pathways. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 67, 162-169 (2008).

92.Chan, L.G., *et al.* Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in sarawak, malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. For the Outbreak Study Group. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 31, 678-683 (2000).

93.Hsueh, C., *et al.* Bệnh viêm não tủy cấp tính during an outbreak of enterovirus type 71 infection in Taiwan: report of an autopsy case with pathologic, immunofluorescence, and molecular studies. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 13, 1200-1205 (2000).

94.Shieh, W.J., *et al.* Pathologic studies of fatal cases in outbreak of hand, foot, and mouth disease, Taiwan. *Emerging infectious diseases* 7, 146-148 (2001).

95.Wong, K.T., Chua, K.B. & Lam, S.K. Immunohistochemical detection of infected neurons as a rapid diagnosis of enterovirus 71 encephalomyelitis. *Annals of neurology* 45, 271-272 (1999).

96.Lu, W.H., *et al.* Hexamethonium reverses the lethal cardiopulmonary damages in a rat model of brainstem lesions mimicking fatal enterovirus 71 encephalitis. *Critical care medicine* 41, 1276-1285 (2013).

97.Rogers, F.B., *et al.* Neurogenic pulmonary edema in fatal and nonfatal head injuries. *The Journal of trauma* 39, 860-866; discussion 866-868 (1995).

98.Yu, P., *et al.* Histopathological features and distribution of EV71 antigens and SCARB2 in human fatal cases and a mouse model of enterovirus 71 infection. *Virus research* 189, 121-132 (2014).

99.Gao, L., *et al.* Pathological examinations of an enterovirus 71 infection: an autopsy case. *International journal of clinical and experimental pathology* 7, 5236-5241 (2014).

100.Jiang, M., *et al.* Autopsy findings in children with hand, foot, and mouth disease. *The New England journal of medicine* 367, 91-92 (2012).

101.Theodore, J. & Robin, E.D. Speculations on neurogenic pulmonary edema (NPE). *The American review of respiratory disease* 113, 405-411 (1976).

102.Busl, K.M. & Bleck, T.P. Neurogenic Pulmonary Edema. *Critical care medicine* 43, 1710-1715 (2015).

103.Sedy, J., Zicha, J., Kunes, J., Jendelova, P. & Sykova, E. Mechanisms of neurogenic pulmonary edema development. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 57, 499-506 (2008).

104.Davison, D.L., Terek, M. & Chawla, L.S. Neurogenic pulmonary edema. *Critical care* 16, 212 (2012).

105.Wang, S.M., Lei, H.Y. & Liu, C.C. Cytokine immunopathogenesis of enterovirus 71 brain stem encephalitis. *Clinical & developmental immunology* 2012, 876241 (2012).

106.Wang, S.M., *et al.* Pathogenesis of enterovirus 71 brainstem encephalitis in pediatric patients: roles of cytokines and cellular immune activation in patients with pulmonary edema. *The Journal of infectious diseases* 188, 564-570 (2003).

107.Huang, S.W., *et al.* Exogenous interleukin-6, interleukin-13, and interferon-gamma provoke pulmonary abnormality with mild edema in enterovirus 71-infected mice. *Respiratory research* 12, 147 (2011).

108.Inobe, J.J., Mori, T., Ueyama, H., Kumamoto, T. & Tsuda, T. Neurogenic pulmonary edema induced by primary medullary hemorrhage: a case report. *Journal of the neurological sciences* 172, 73-76 (2000).

109.Blessing, W.W., West, M.J. & Chalmers, J. Hypertension, bradycardia, and pulmonary edema in the conscious rabbit after brainstem lesions coinciding with the A1 group of catecholamine neurons. *Circulation research* 49, 949-958 (1981).

110.Nathan, M.A. & Reis, D.J. Fulminating arterial hypertension with pulmonary edema from release of adrenomedullary catecholamines after lesions of the anterior hypothalamus in the rat. *Circulation research* 37, 226-235 (1975).

111.Wong, K.T., *et al.* The distribution of inflammation and virus in human enterovirus 71 encephalomyelitis suggests possible viral spread by neural pathways. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 67, 162-169 (2008).

112.Wang, Y.F. & Yu, C.K. Animal models of enterovirus 71 infection: applications and limitations. *Journal of biomedical science* 21, 31 (2014).

113.Lein, E.S., *et al.* Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 445, 168-176 (2007).

114.Hashimoto, I. & Hagiwara, A. Pathogenicity of a poliomyelitis-like disease in monkeys infected orally with enterovirus 71: a model for human infection. *Neuropathology and applied neurobiology* 8, 149-156 (1982).

115.Nagata, N., *et al.* Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71. *Journal of medical virology* 67, 207-216 (2002).

116.Nagata, N., *et al.* Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. *The Journal of general virology* 85, 2981-2989 (2004).

117.Arita, M., *et al.* Temperature-sensitive mutants of enterovirus 71 show attenuation in cynomolgus monkeys. *The Journal of general virology* 86, 1391-1401 (2005).

118.Arita, M., *et al.* An attenuated strain of enterovirus 71 belonging to genotype a showed a broad spectrum of antigenicity with attenuated neurovirulence in cynomolgus monkeys. *J Virol* 81, 9386-9395 (2007).

119.Zhang, Y., *et al.* Pathogenesis study of enterovirus 71 infection in rhesus monkeys. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 91, 1337-1350 (2011).

120.Chen, H., *et al.* The effect of enterovirus 71 immunization on neuropathogenesis and protein expression profiles in the thalamus of infected rhesus neonates. *Virology* 432, 417-426 (2012).

121.Chen, Y.C. A murine oral enterovirus 71 infection model with central nervous system involvement. *Journal of General Virology* 85, 69-77 (2004).

122.Wang, Y.F., *et al.* A mouse-adapted enterovirus 71 strain causes neurological disease in mice after oral infection. *J Virol* 78, 7916-7924 (2004).

123.Chua, B.H., Phuektes, P., Sanders, S.A., Nicholls, P.K. & McMinn, P.C. The molecular basis of mouse adaptation by human enterovirus 71. *The Journal of general virology* 89, 1622-1632 (2008).

124.Chen, C.S., *et al.* Retrograde axonal transport: a major transmission route of enterovirus 71 in mice. *J Virol* 81, 8996-9003 (2007).

125.Ong, K.C., *et al.* Pathologic characterization of a murine model of human enterovirus 71 encephalomyelitis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 67, 532-542 (2008).

126.Wang, W., *et al.* A mouse muscle-adapted enterovirus 71 strain with increased virulence in mice. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 13, 862-870 (2011).

127.Khong, W.X., *et al.* A non-mouse-adapted enterovirus 71 (EV71) strain exhibits neurotropism, causing neurological manifestations in a novel mouse model of EV71 infection. *J Virol* 86, 2121-2131 (2012).

128.Caine, E.A., Partidos, C.D., Santangelo, J.D. & Osorio, J.E. Adaptation of enterovirus 71 to adult interferon deficient mice. *PloS one* 8, e59501 (2013).

129.Arita, M., Ami, Y., Wakita, T. & Shimizu, H. Cooperative effect of the attenuation determinants derived from poliovirus sabin 1 strain is essential for attenuation of enterovirus 71 in the NOD/SCID mouse infection model. *J Virol* 82, 1787-1797 (2008).

130.Xu, F., *et al.* Enterovirus 71 infection causes severe pulmonary lesions in gerbils, meriones unguiculatus, which can be prevented by passive immunization with specific antisera. *PloS one* 10, e0119173 (2015).

131.Koroleva, G.A., Karmysheva, V.Y. & Lukashev, A.N. 390 Enterovirus 71 pathogenicity in monkeys and cotton rats. *Archives of virology* 159, 1133-1138 (2014).

132.Yao, P.P., *et al.* Enterovirus 71-induced neurological disorders in young gerbils, Meriones unguiculatus: development and application of a neurological disease model. *PloS one* 7, e51996 (2012).

133.Yang, X., *et al.* A neonatal gnotobiotic pig model of human enterovirus 71 infection and associated immune responses. *Emerg Microbes Infect* 3, e35 (2014).

134.Wang, S.M., *et al.* Clinical spectrum of enterovirus 71 infection in children in southern Taiwan, with an emphasis on neurological complications. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 29, 184-190 (1999).

135.Huang, C.C., *et al.* Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection. *The New England journal of medicine* 341, 936-942 (1999).

136.Ho, M., *et al.* An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *The New England journal of medicine* 341, 929-935 (1999).

137.Chang, L.-Y., *et al.* Clinical features and risk factors of pulmonary oedema after enterovirus-71-related hand, foot, and mouth disease. *The Lancet* 354, 1682-1686 (1999).

138.Nishimura, Y., *et al.* Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nature medicine* 15, 794-797 (2009).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Mẫu động vật được lây nhiễm thần kinh virut entero 71 bao gồm chuột nhắt lên đến bốn tuần tuổi đã được lây nhiễm ở thời điểm giữa một tuần và hai tuần tuổi bằng virut entero 71 được cải biến để lây nhiễm chuột nhắt này,

trong đó chuột nhắt này được lây nhiễm bằng cách tiêm liều lây nhiễm chủng tế bào trung bình (mean cell culture infectious dose-$CCID_{50}$) nằm trong khoảng từ 10^5 đến 10^6 virut entero 71 được cải biến vào khoang màng bụng hoặc mô cơ,

trong đó virut entero 71 được cải biến này là *EV71:TLLmv*, mà

(a) được lưu giữ ở Ngân hàng giống và vi sinh vật Trung Quốc với mã lưu giữ là CCTCC V201438 hoặc

(b) được thu nhận bằng phương pháp di truyền ngược cải tiến bao gồm bước tổng hợp ARN virut bằng cách sử dụng trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 và

trong đó mẫu động vật này bị bệnh viêm não tủy cấp tính, tình trạng xuất huyết khu trú và có dịch protein trong phế nang phổi, nồng độ catecholamin trong huyết thanh cao và tổn thương mô rộng trong thân não, là dấu hiệu và triệu chứng của tình trạng phù phổi có nguồn gốc thần kinh.

2. Mẫu động vật theo điểm 1, trong đó $CCID_{50}$ bằng 10^6.

3. Mẫu động vật theo điểm 1, trong đó chuột nhắt này là chuột nhắt có khả năng miễn dịch.

4. Mẫu động vật theo điểm 3, trong đó chuột nhắt này là chuột nhắt BALB/c.

5. Mẫu động vật theo điểm 1, trong đó chuột nhắt này là chuột nhắt bị suy giảm miễn dịch.

6. Mẫu động vật theo điểm 5, trong đó chuột nhắt này là chuột nhắt NSG.

7. Phương pháp sản xuất mẫu động vật được lây nhiễm thần kinh virut entero 71, bao gồm các bước sau:

(i) lây nhiễm chuột nhắt ở thời điểm giữa một tuần và hai tuần tuổi bằng virut entero 71 được cải biến để lây nhiễm chuột nhắt này; và

(ii) nuôi chuột nhắt được lây nhiễm lên đến bốn tuần tuổi,

nhờ đó mẫu động vật được lây nhiễm thần kinh virut entero 71 được sản xuất,

trong đó chuột nhắt này được lây nhiễm bằng cách tiêm liều lây nhiễm chủng tế bào trung bình nằm trong khoảng từ 10^5 đến 10^6 virut entero 71 được cải biến vào khoang màng bụng hoặc mô cơ,

trong đó virut entero 71 được cải biến này là *EV71:TLLmv*, mà

(a) được lưu giữ ở Ngân hàng giống và vi sinh vật Trung Quốc với mã lưu giữ là CCTCC V201438 hoặc

(b) được thu nhận bằng phương pháp di truyền ngược cải tiến bao gồm bước tổng hợp ARN virut bằng cách sử dụng trình tự như nêu trong SEQ ID NO.2 và

trong đó mẫu động vật này bị bệnh viêm não tủy cấp tính, tình trạng xuất huyết khu trú và có dịch protein trong phế nang phổi, nồng độ catecholamin trong huyết thanh cao và tổn thương mô rộng trong thân não, là dấu hiệu và triệu chứng của tình trạng phù phổi có nguồn gốc thần kinh.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó $CCID_{50}$ bằng 10^6.

9. Phương pháp theo điểm 7 hoặc 8, trong đó chuột nhắt này là chuột nhắt có khả năng miễn dịch.

10. Phương pháp theo điểm 9, trong đó chuột nhắt này là chuột nhắt BALB/c.

11. Phương pháp theo điểm 7 hoặc 8, trong đó chuột nhắt này là chuột nhắt bị suy giảm miễn dịch.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó chuột nhắt này là chuột nhắt NSG.

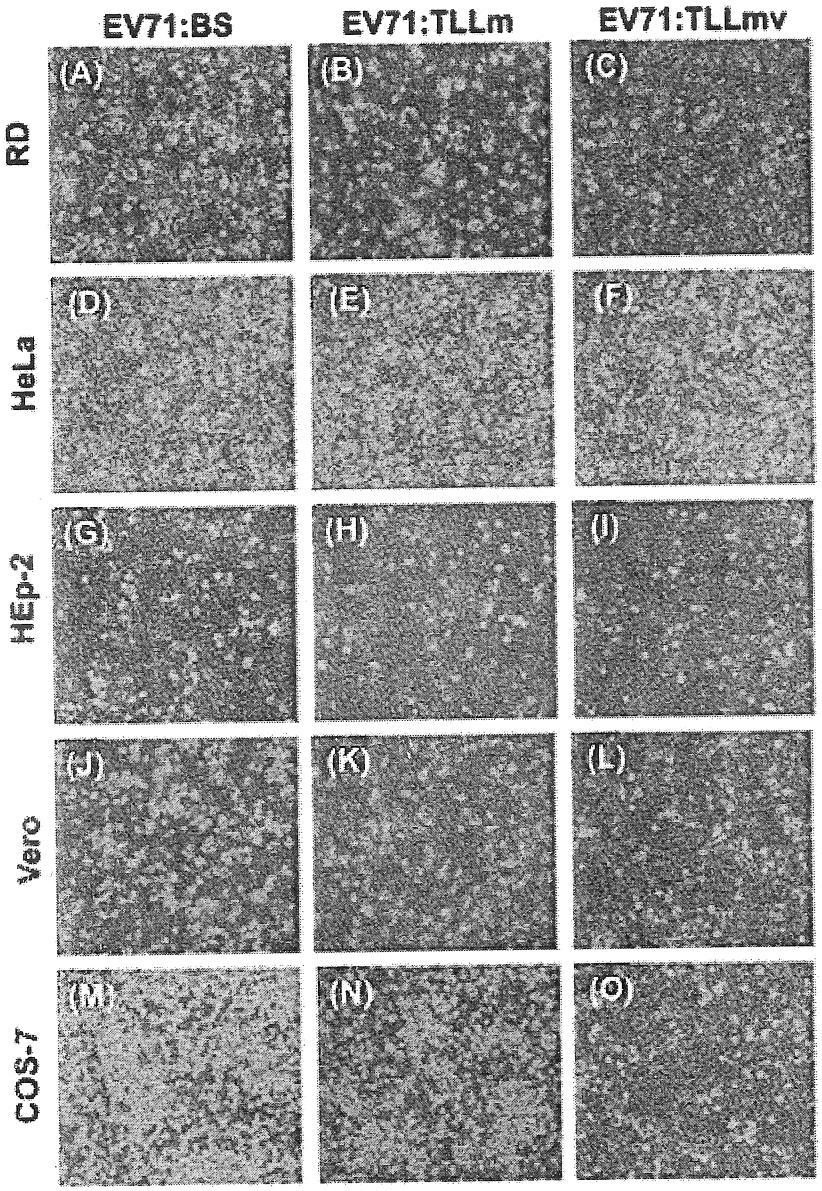

EV71:BS
EV71:TLLm
EV71:TLLmv
RD
HeLa
HEp-2
Vero
COS-7
(A)
(B)
(C)
(D)
(E)
(F)
(G)
(H)
(I)
(J)
(K)
(L)
(M)
(N)
(O)

Fig.1

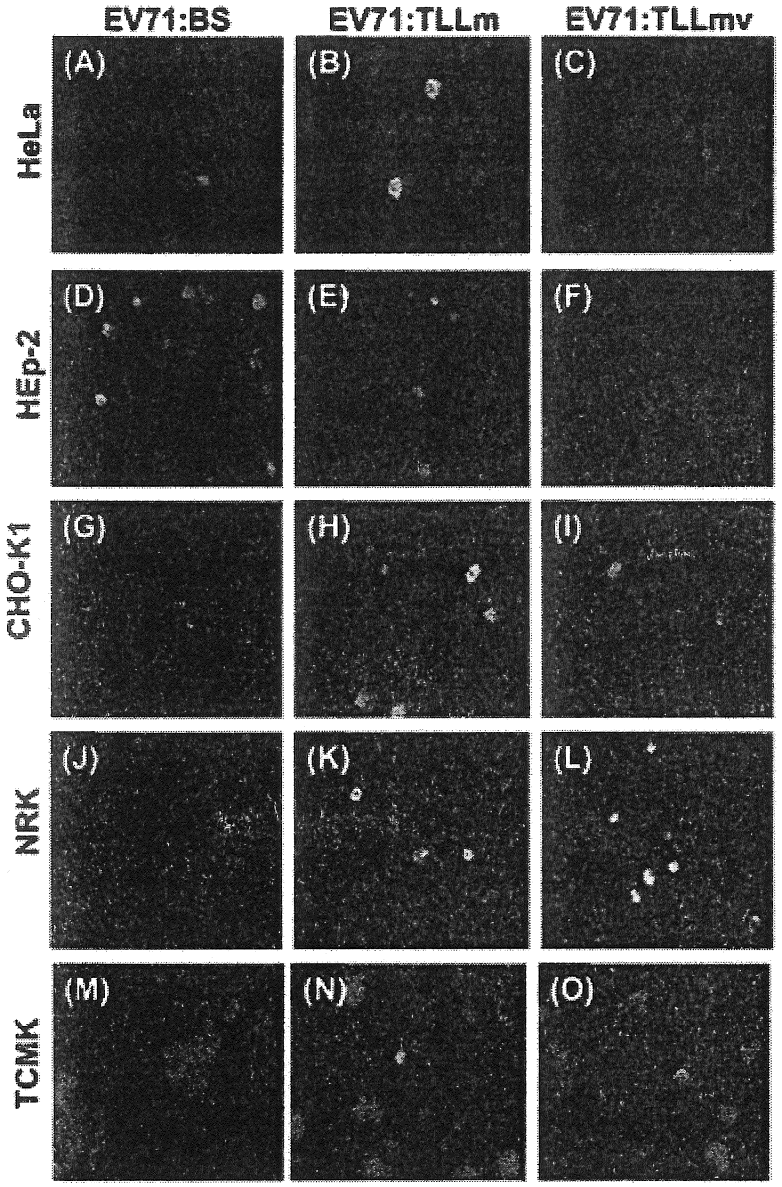

EV71:BS
EV71:TLLm
EV71:TLLmv
HeLa
HEp-2
CHO-K1
NRK
TCMK
(A)
(B)
(C)
(D)
(E)
(F)
(G)
(H)
(I)
(J)
(K)
(L)
(M)
(N)
(O)

Fig.2

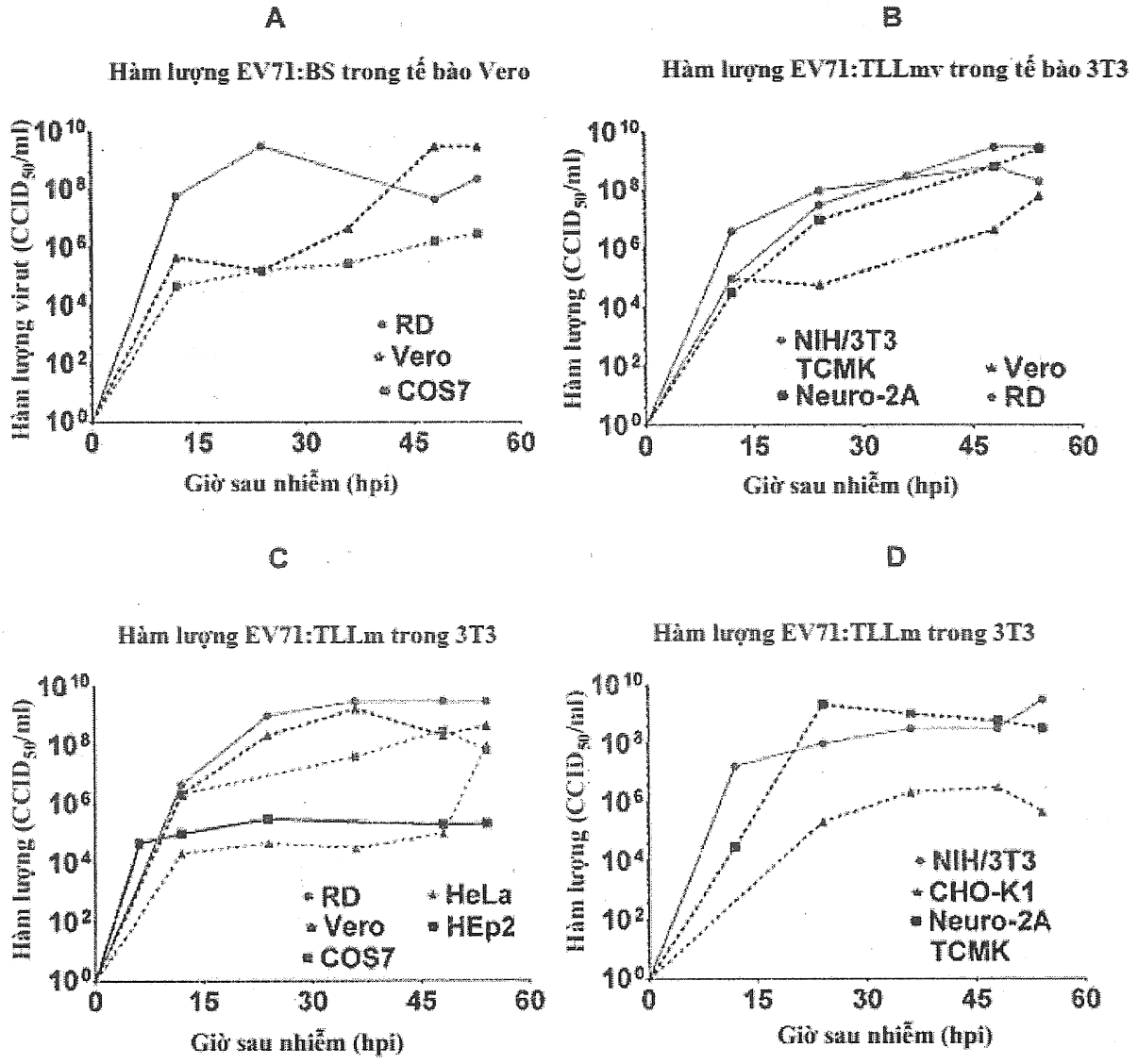

A
Hàm lượng EV71:BS trong tế bào Vero
Hàm lượng virut (CCID50/ml)
RD
Vero
COS7
Giờ sau nhiễm (hpi)
B
Hàm lượng EV71:TLLmv trong tế bào 3T3
Hàm lượng (CCID50/ml)
NIH/3T3
TCMK
Neuro-2A
Vero
RD
Giờ sau nhiễm (hpi)
C
Hàm lượng EV71:TLLm trong 3T3
Hàm lượng (CCID50/ml)
RD
Vero
COS7
HeLa
HEp2
Giờ sau nhiễm (hpi)
D
Hàm lượng EV71:TLLm trong 3T3
Hàm lượng (CCID50/ml)
NIH/3T3
CHO-K1
Neuro-2A
TCMK
Giờ sau nhiễm (hpi)

Fig.3

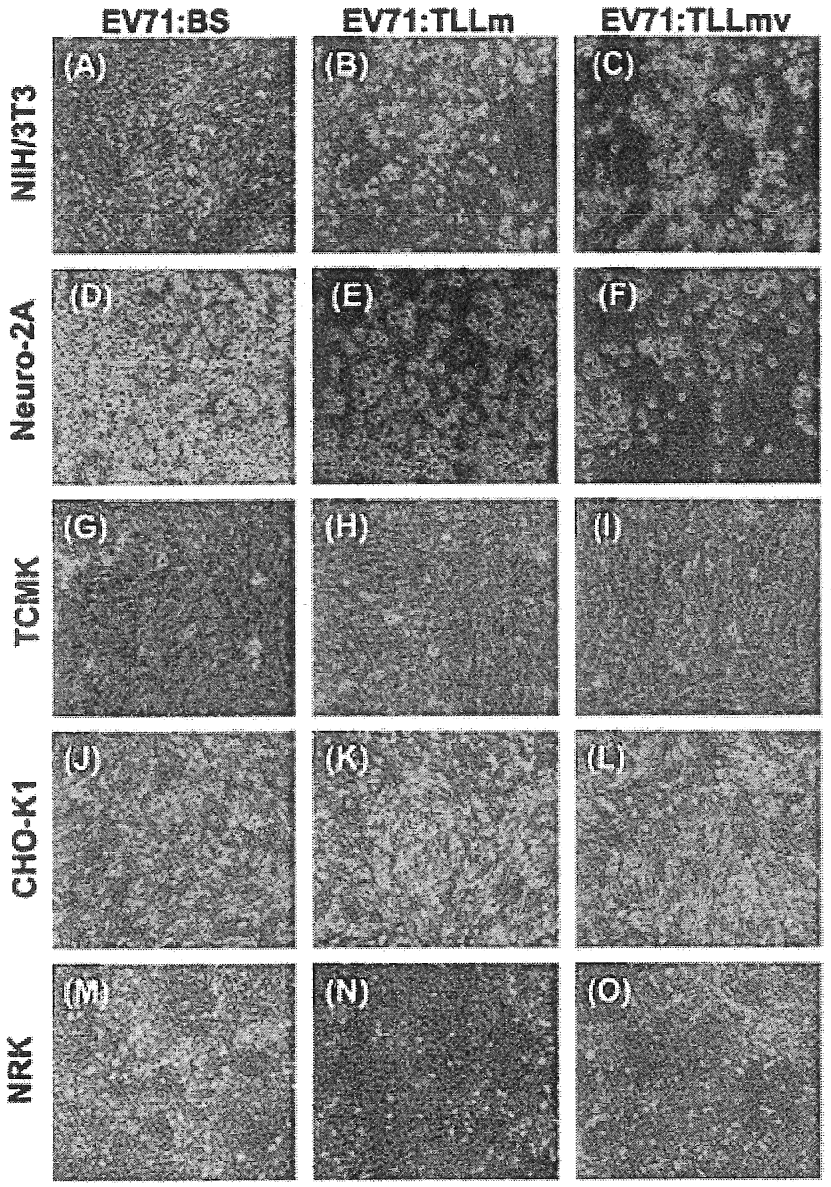

EV71:BS
EV71:TLLm
EV71:TLLmv
NIH/3T3
Neuro-2A
TCMK
CHO-K1
NRK
(A)
(B)
(C)
(D)
(E)
(F)
(G)
(H)
(I)
(J)
(K)
(L)
(M)
(N)
(O)

Fig.4

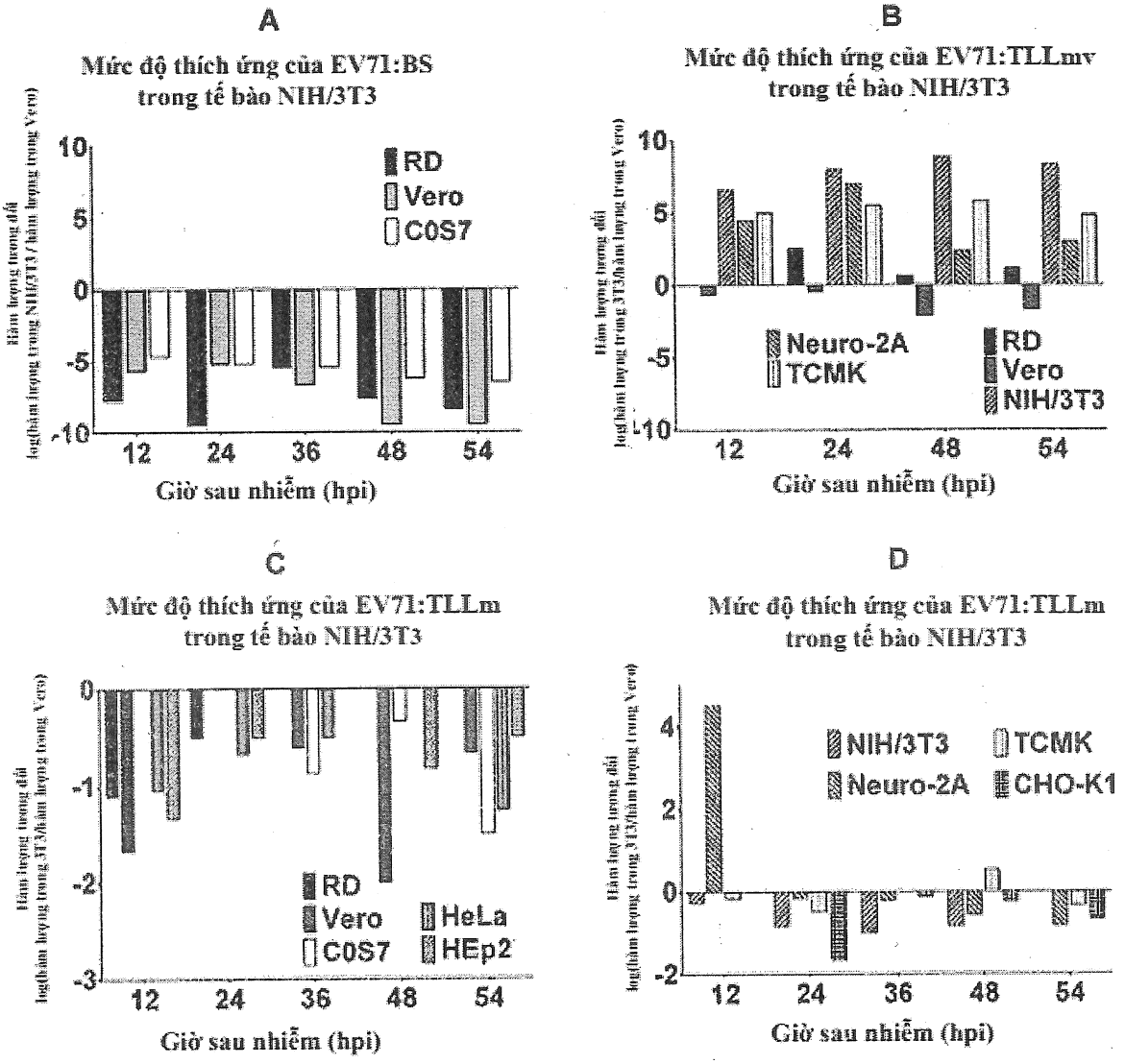

A
Mức độ thích ứng của EV71:BS
trong tế bào NIH/3T3
RD
Vero
C0S7
Giờ sau nhiễm (hpi)
B
Mức độ thích ứng của EV71:TLLmv
trong tế bào NIH/3T3
Neuro-2A
TCMK
RD
Vero
NIH/3T3
Giờ sau nhiễm (hpi)
C
Mức độ thích ứng của EV71:TLLm
trong tế bào NIH/3T3
RD
Vero
C0S7
HeLa
HEp2
Giờ sau nhiễm (hpi)
D
Mức độ thích ứng của EV71:TLLm
trong tế bào NIH/3T3
NIH/3T3
TCMK
Neuro-2A
CHO-K1
Giờ sau nhiễm (hpi)

Fig.5

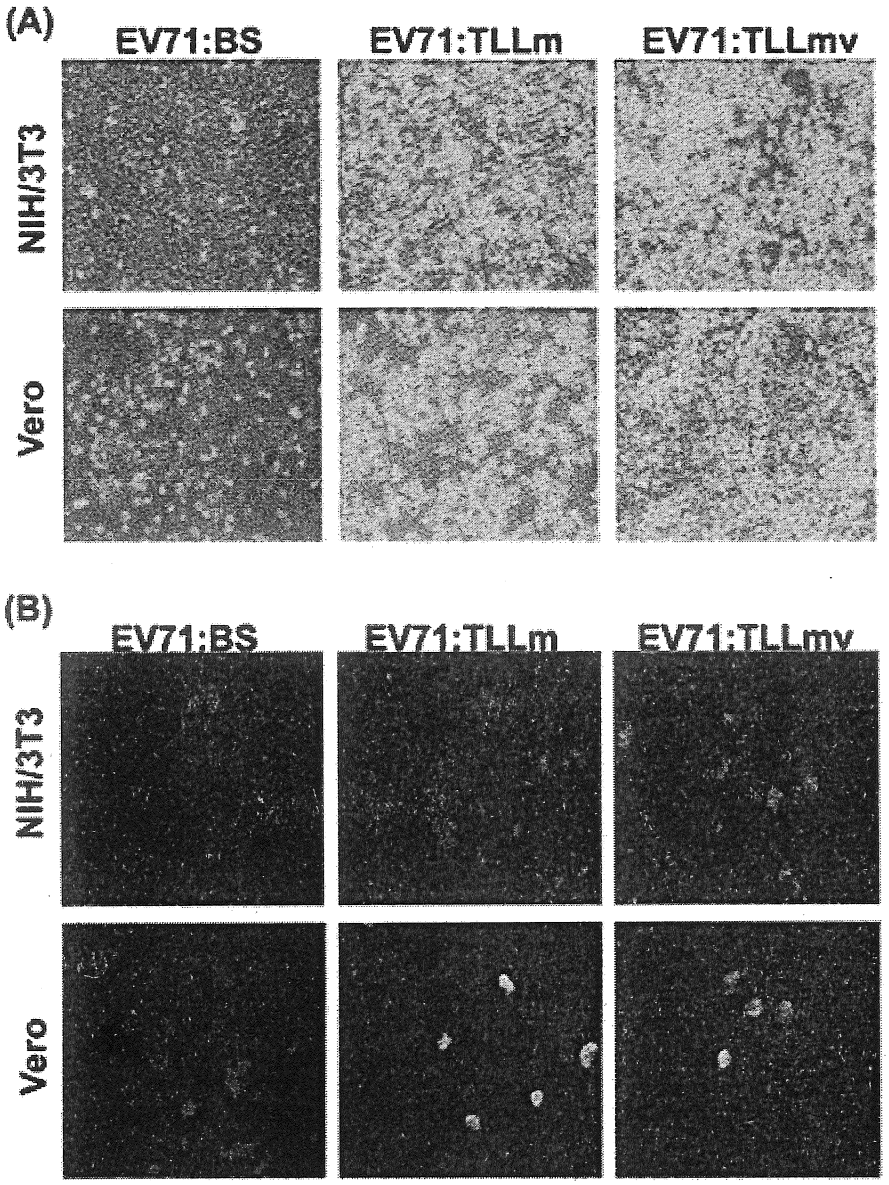

(A)
EV71:BS
EV71:TLLm
EV71:TLLmv
NIH/3T3
Vero
(B)
EV71:BS
EV71:TLLm
EV71:TLLmv
NIH/3T3
Vero

Fig.6

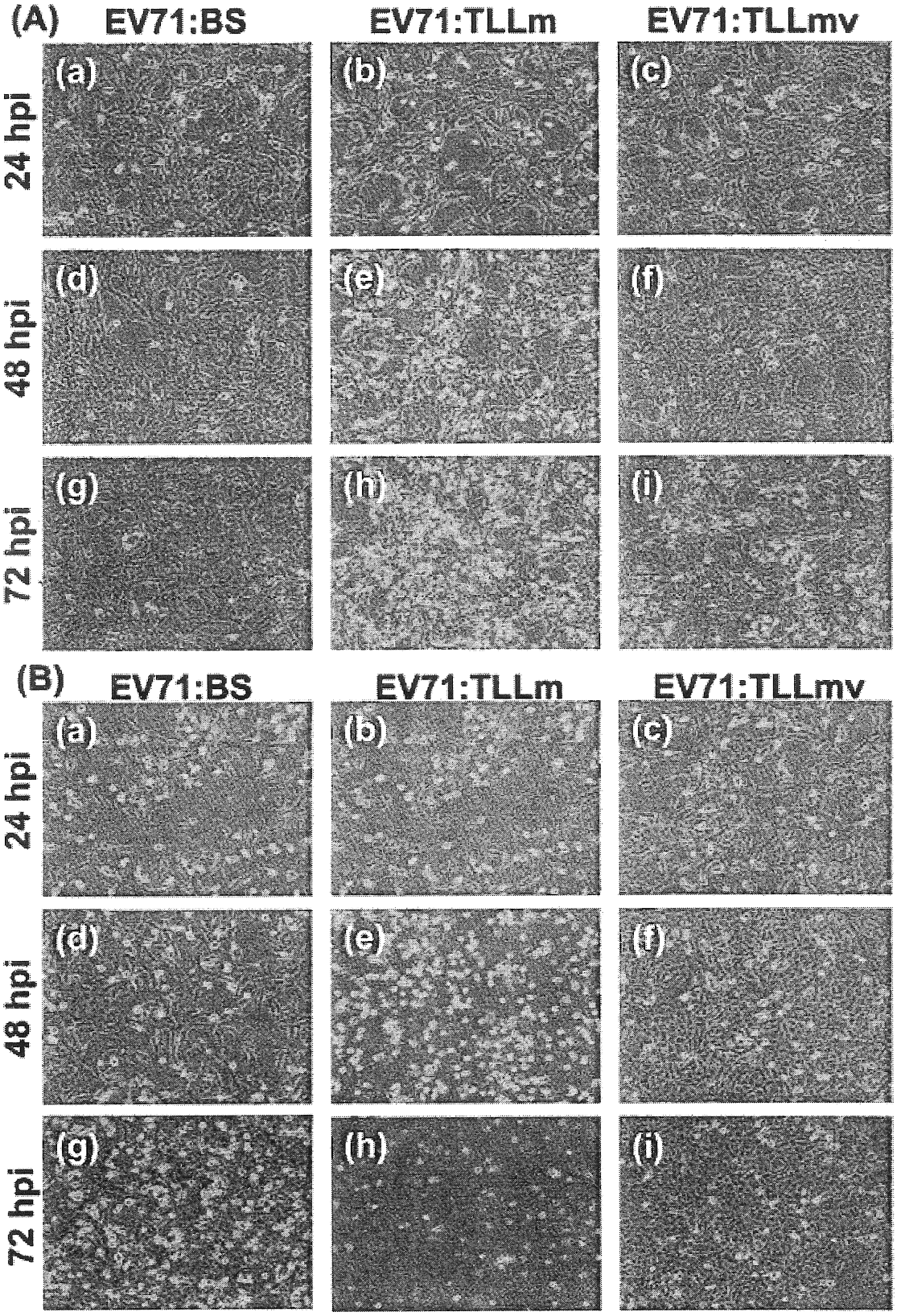

(A)
EV71:BS
EV71:TLLm
EV71:TLLmv
24 hpi
48 hpi
72 hpi
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)
(B)
EV71:BS
EV71:TLLm
EV71:TLLmv
24 hpi
48 hpi
72 hpi
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)

Fig.7

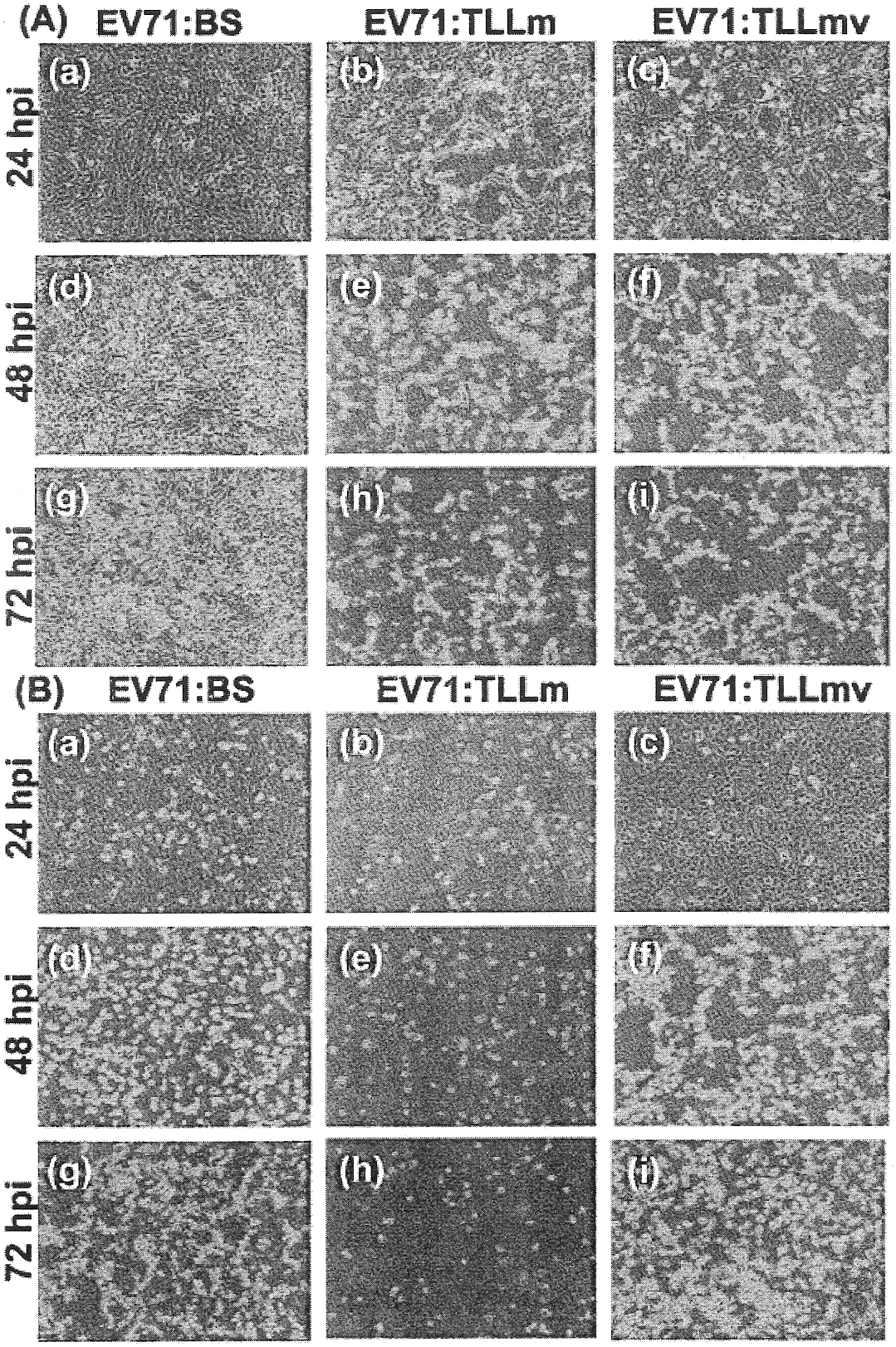

(A)
EV71:BS
EV71:TLLm
EV71:TLLmv
24 hpi
48 hpi
72 hpi
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)
(B)
EV71:BS
EV71:TLLm
EV71:TLLmv
24 hpi
48 hpi
72 hpi
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)

Fig.8

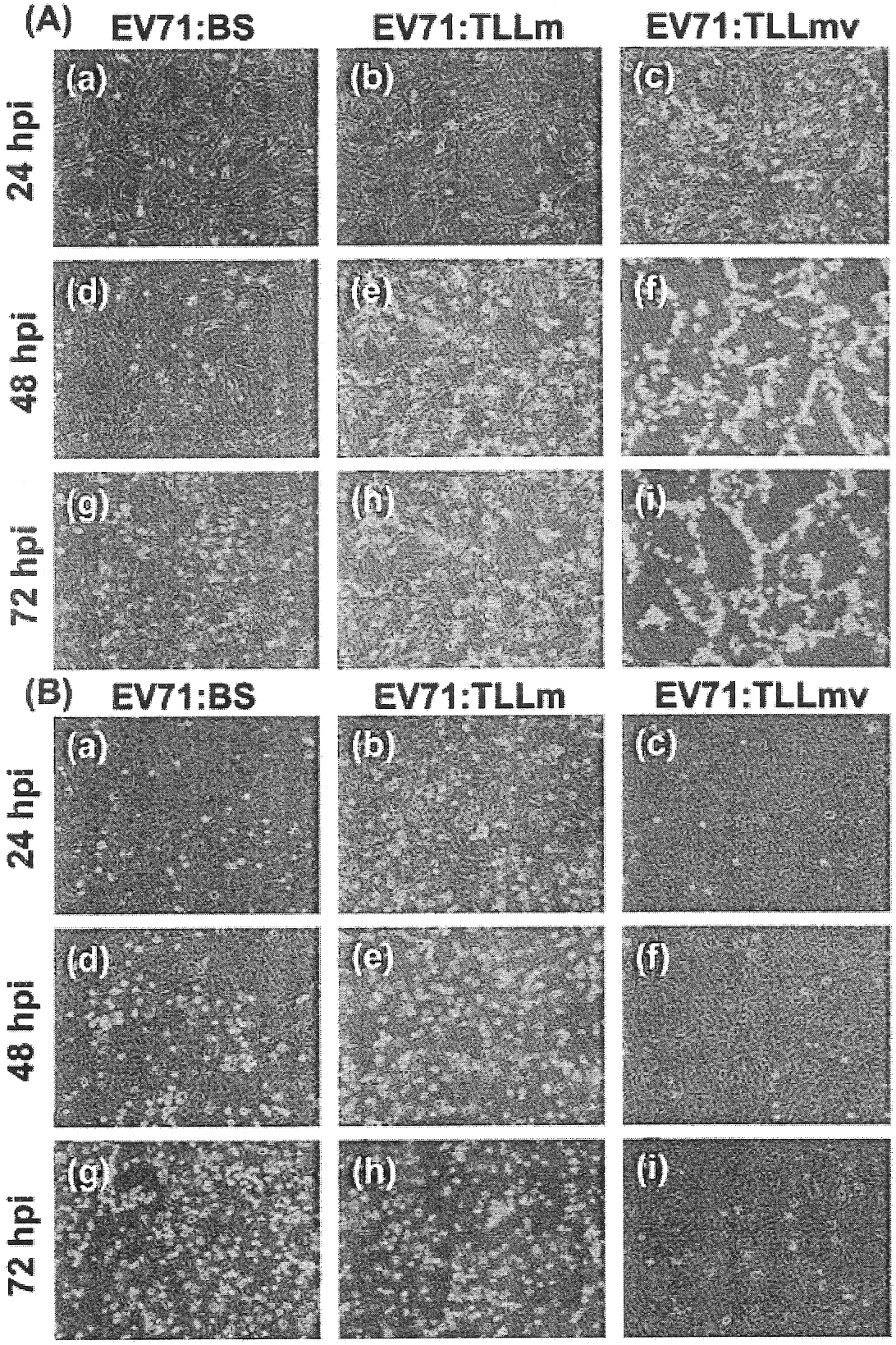

(A)
EV71:BS
EV71:TLLm
EV71:TLLmv
24 hpi
48 hpi
72 hpi
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)
(B)
EV71:BS
EV71:TLLm
EV71:TLLmv
24 hpi
48 hpi
72 hpi
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)

Fig.9

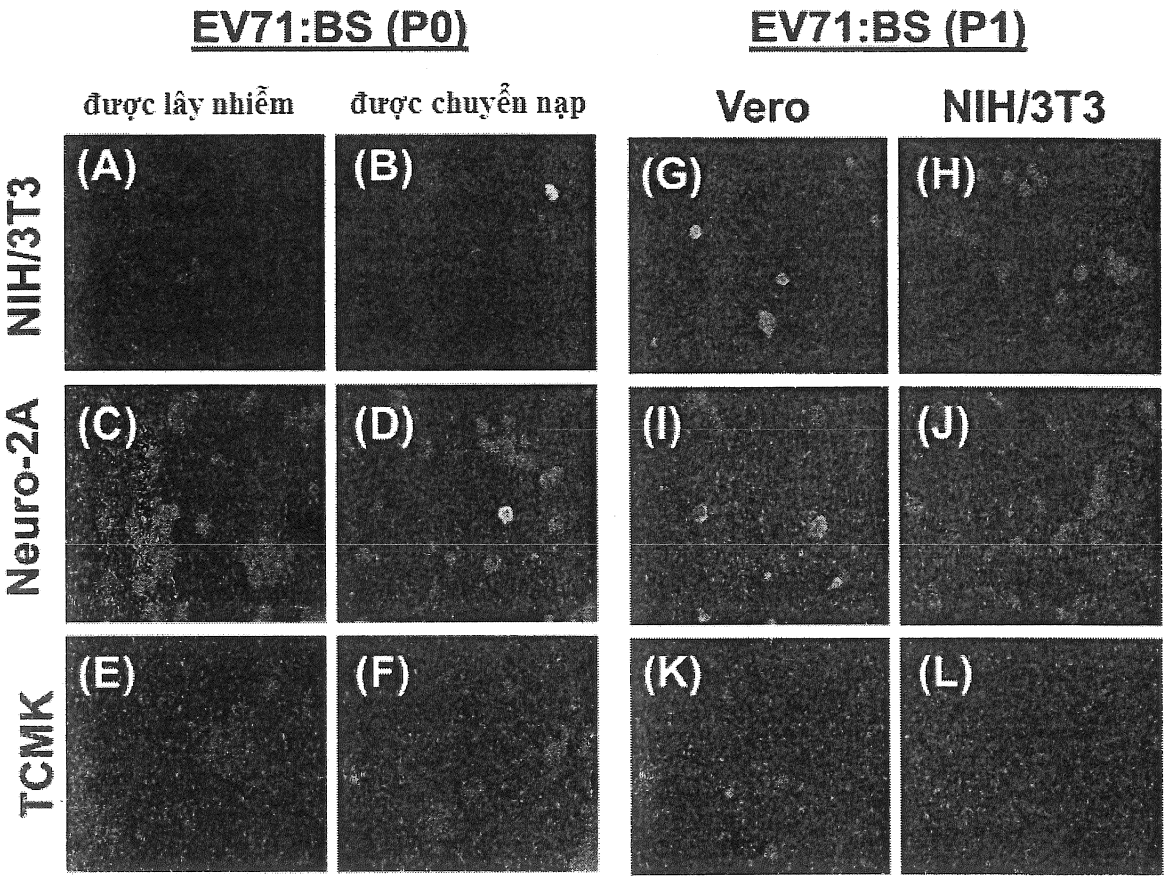

EV71:BS (P0)
EV71:BS (P1)
được lây nhiễm
được chuyển nạp
Vero
NIH/3T3
NIH/3T3
Neuro-2A
TCMK
(A)
(B)
(G)
(H)
(C)
(D)
(I)
(J)
(E)
(F)
(K)
(L)

Fig.10

Các đột biến phù hợp

Fig.11

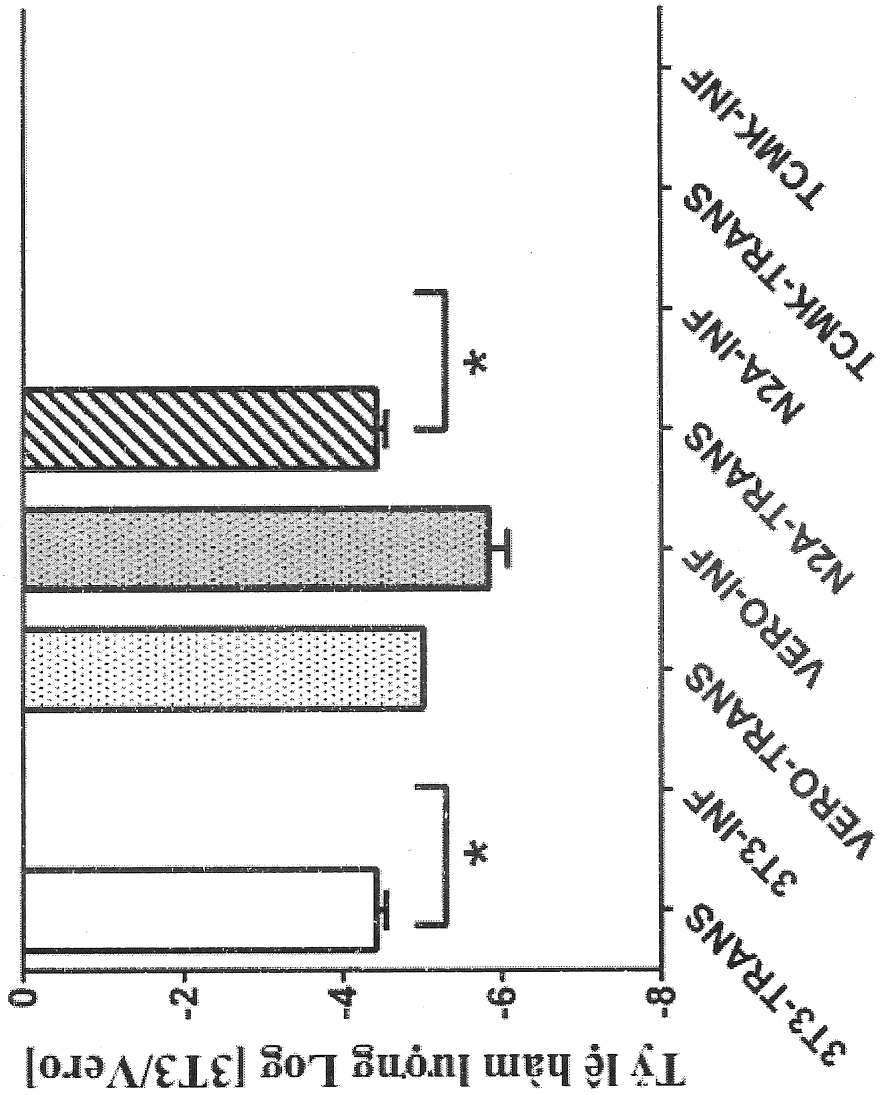

Tỷ lệ hàm lượng Log [3T3/Vero]
0
-2
-4
-6
-8
*
*
3T3-TRANS
3T3-INF
VERO-TRANS
VERO-INF
N2A-TRANS
N2A-INF
TCMK-TRANS
TCMK-INF

Fig.12

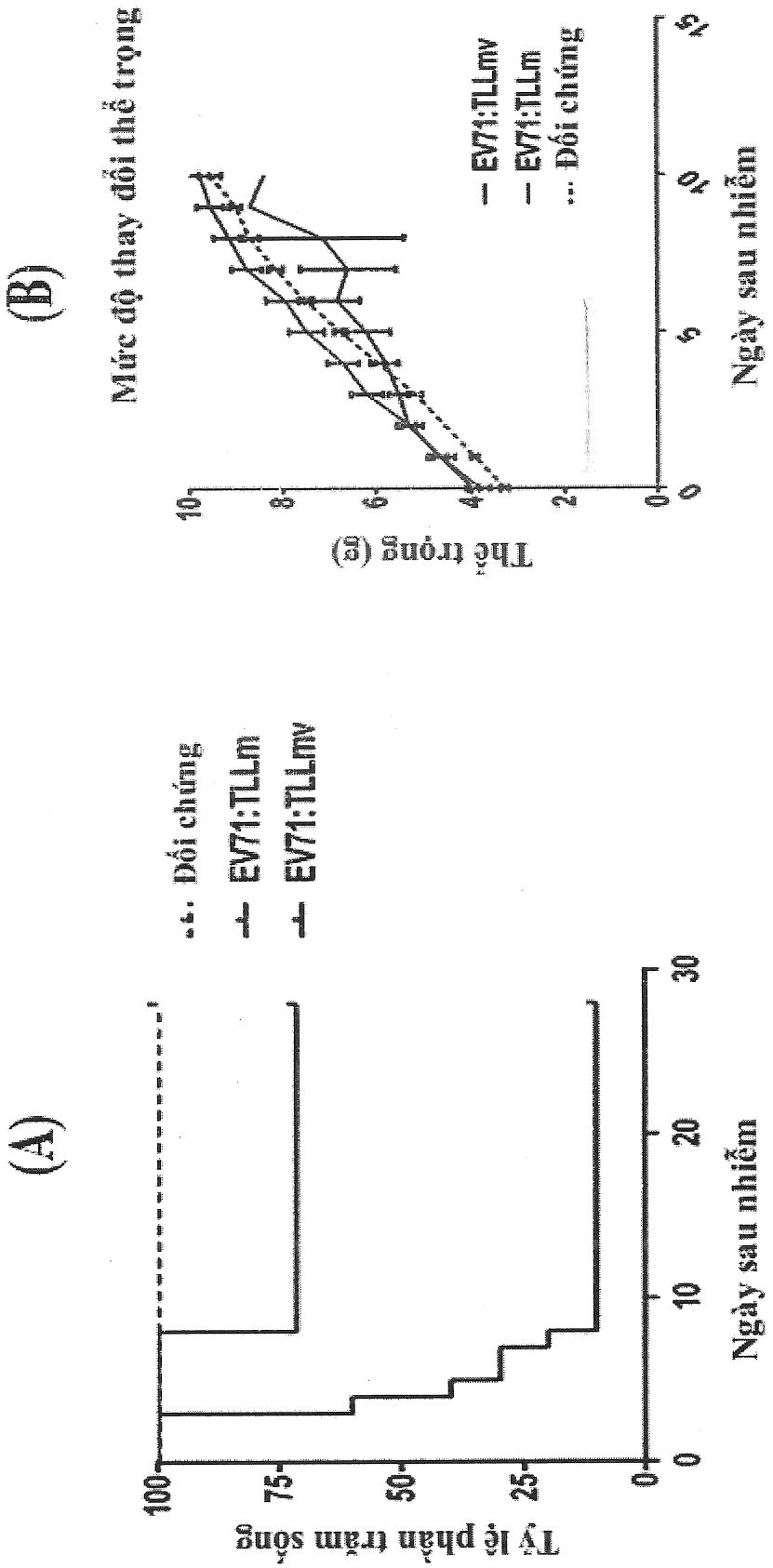
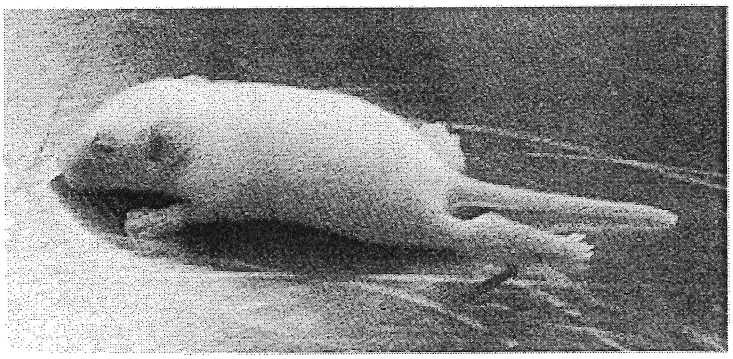
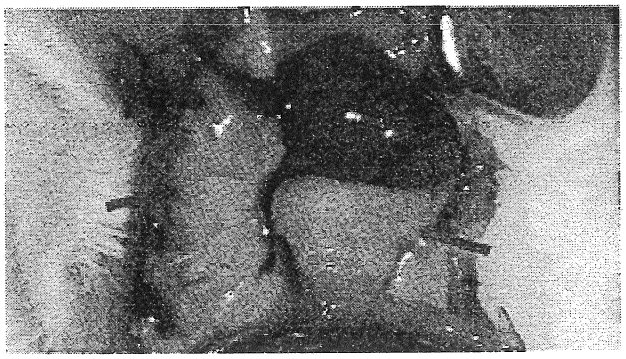

(A)
Tỷ lệ phần trăm sống
100
75
50
25
0
0
10
20
30
Ngày sau nhiễm
Đối chứng
EV71:TLLm
EV71:TLLmv
(B)
Mức độ thay đổi thể trọng
Thể trọng (g)
10
8
6
4
2
0
0
5
10
15
Ngày sau nhiễm
EV71:TLLmv
EV71:TLLm
Đối chứng

Fig.13

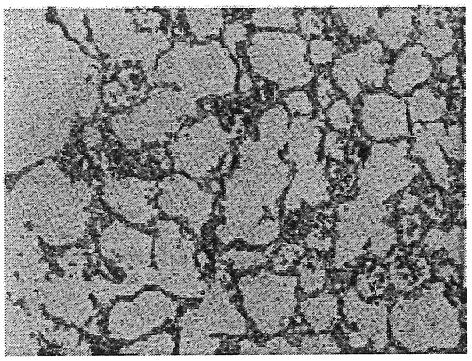
(A)



(B)



(C)



(D)

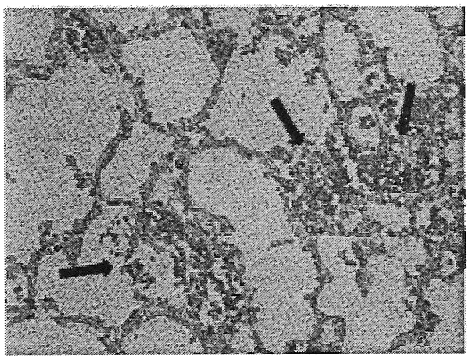


Fig.14

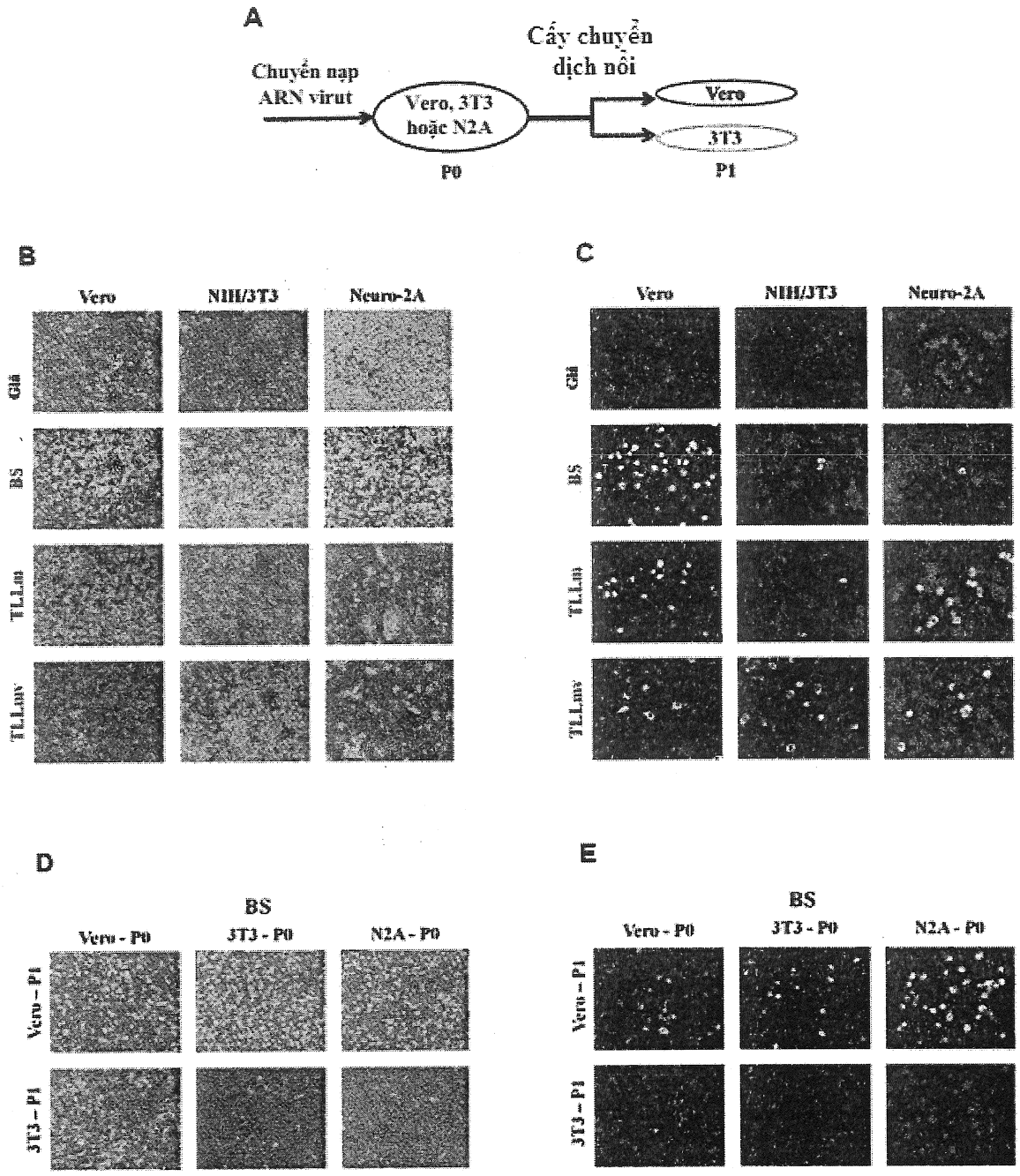

A
Chuyển nạp
ARN virut
Vero, 3T3
hoặc N2A
P0
Cấy chuyển
dịch nối
Vero
3T3
P1
B
Vero
NIH/3T3
Neuro-2A
Giả
BS
TLLuo
TLLmy
C
Vero
NIH/3T3
Neuro-2A
Giả
BS
TLLuo
TLLmy
D
BS
Vero - P0
3T3 - P0
N2A - P0
Vero – P1
3T3 – P1
E
BS
Vero - P0
3T3 - P0
N2A - P0
Vero – P1
3T3 – P1

Fig.15

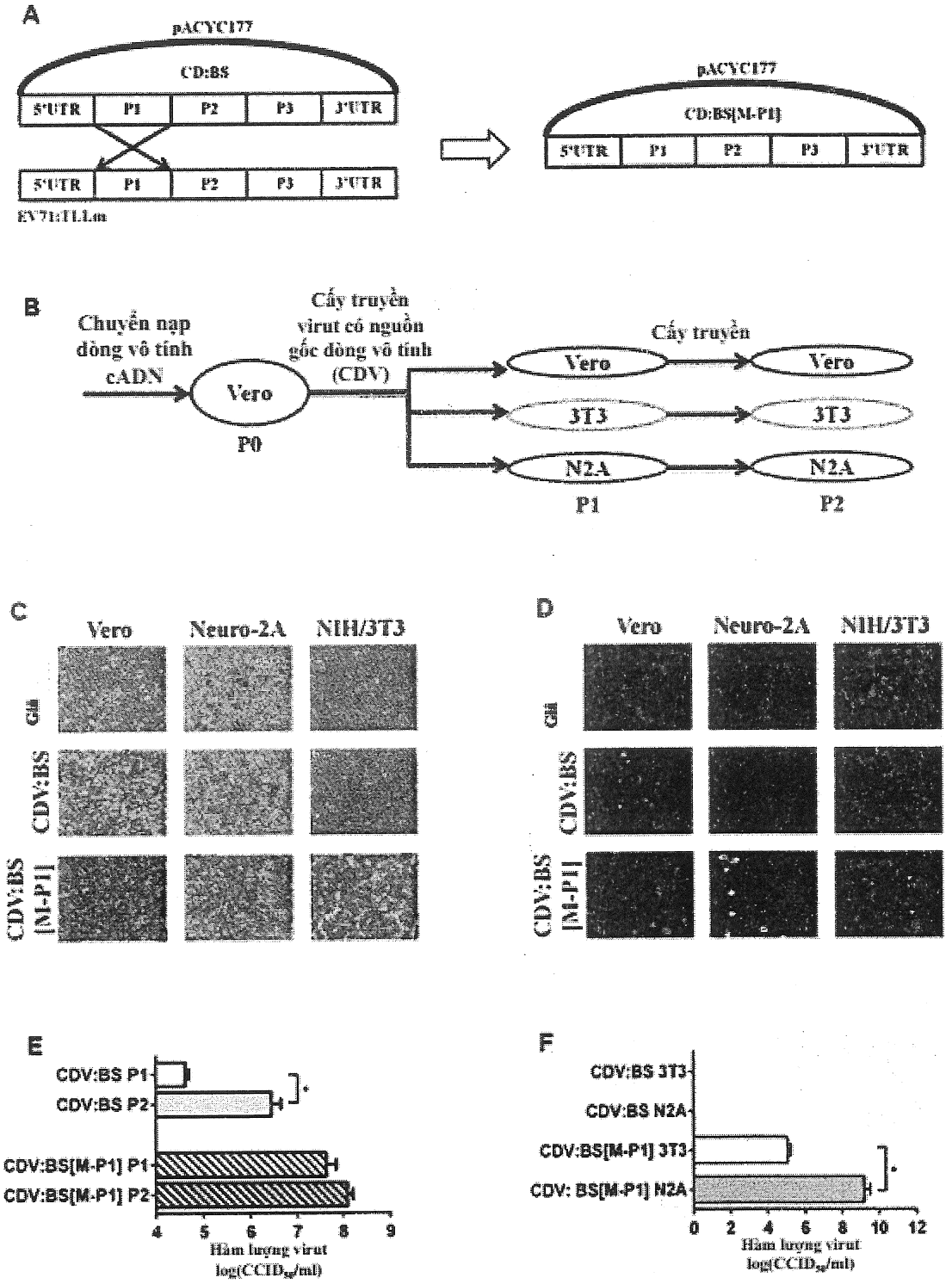

A
pACYC177
CD:BS
5'UTR
P1
P2
P3
3'UTR
5'UTR
P1
P2
P3
3'UTR
EV71:TLLm
pACYC177
CD:BS[M-P1]
5'UTR
P1
P2
P3
3'UTR
B
Chuyển nạp dòng vô tính cADN
Vero
P0
Cấy truyền virut có nguồn gốc dòng vô tính (CDV)
Cấy truyền
Vero
Vero
3T3
3T3
N2A
N2A
P1
P2
C
Vero
Neuro-2A
NIH/3T3
Cái
CDV:BS
CDV:BS [M-P1]
D
Vero
Neuro-2A
NIH/3T3
Cái
CDV:BS
CDV:BS [M-P1]
E
CDV:BS P1
CDV:BS P2
CDV:BS[M-P1] P1
CDV:BS[M-P1] P2
4
5
6
7
8
9
Hàm lượng virut
log(CCID50/ml)
F
CDV:BS 3T3
CDV:BS N2A
CDV:BS[M-P1] 3T3
CDV: BS[M-P1] N2A
0
2
4
6
8
10
12
Hàm lượng virut
log(CCID50/ml)

Fig.16

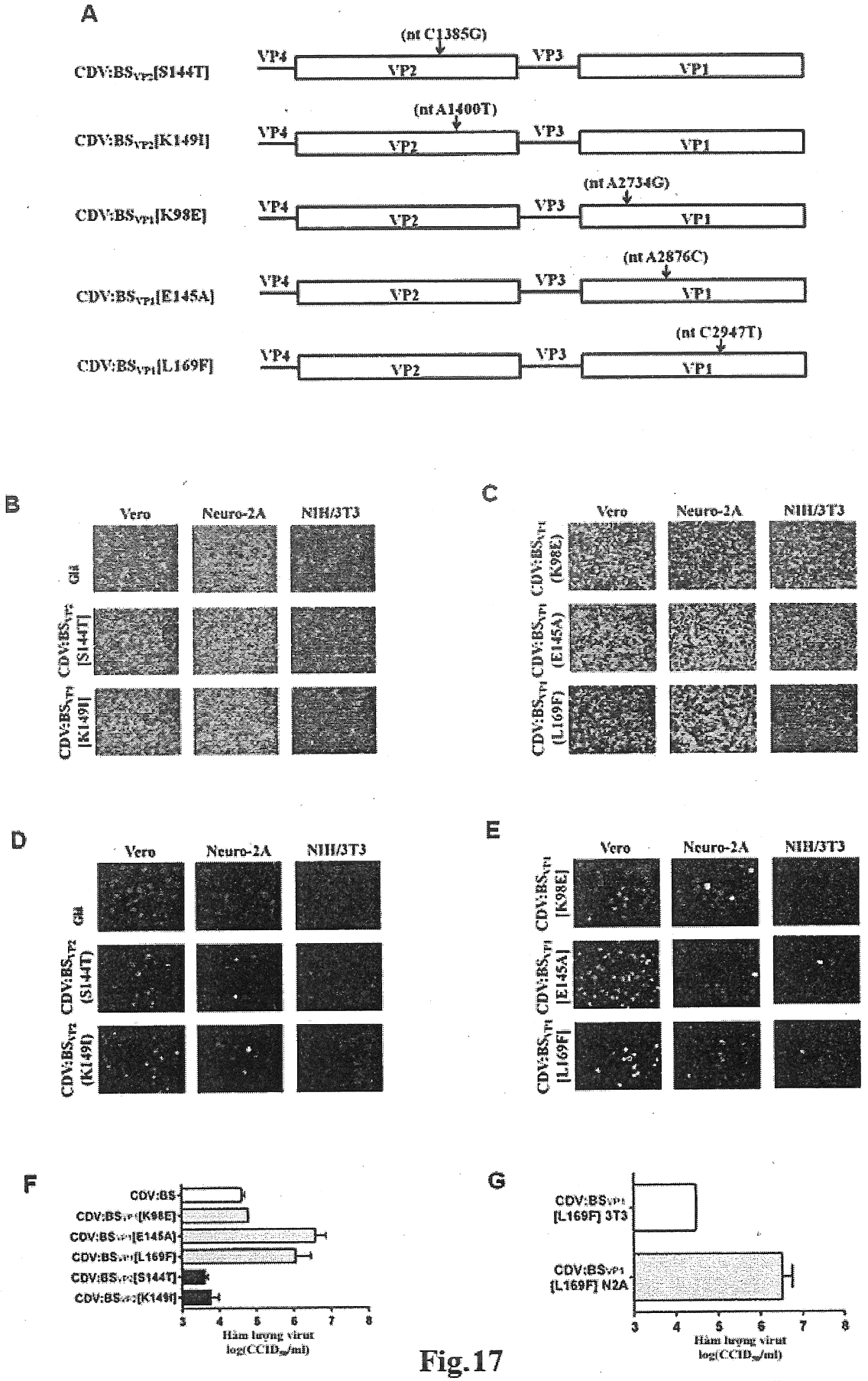

A
CDV:BS$_{VP2}$[S144T]
CDV:BS$_{VP2}$[K149I]
CDV:BS$_{VP1}$[K98E]
CDV:BS$_{VP1}$[E145A]
CDV:BS$_{VP1}$[L169F]
VP4
VP2
VP3
VP1
(nt C1385G)
(nt A1400T)
(nt A2734G)
(nt A2876C)
(nt C2947T)
B
C
D
E
Vero
Neuro-2A
NIH/3T3
Gốc
CDV:BS$_{VP2}$ [S144T]
CDV:BS$_{VP2}$ [K149I]
CDV:BS$_{VP1}$ (K98E)
CDV:BS$_{VP1}$ (E145A)
CDV:BS$_{VP1}$ (L169F)
F
CDV:BS
CDV:BS$_{VP1}$[K98E]
CDV:BS$_{VP1}$[E145A]
CDV:BS$_{VP1}$[L169F]
CDV:BS$_{VP2}$[S144T]
CDV:BS$_{VP2}$[K149I]
3 4 5 6 7 8
Hàm lượng virut
log(CCID$_{50}$/ml)
G
CDV:BS$_{VP1}$ [L169F] 3T3
CDV:BS$_{VP1}$ [L169F] N2A
3 4 5 6 7 8
Hàm lượng virut
log(CCID$_{50}$/ml)

Fig.17

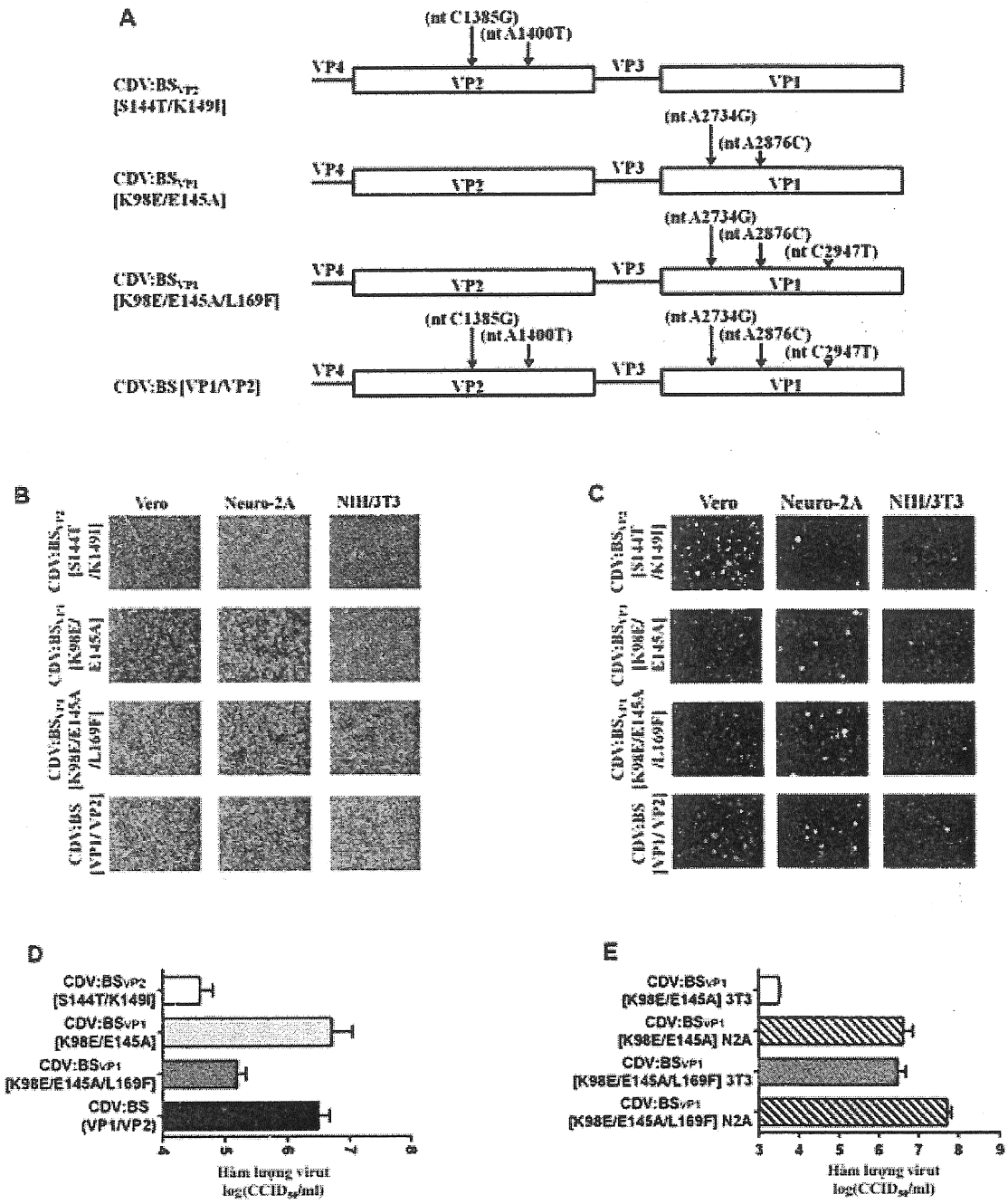

A
(nt C1385G)
(nt A1400T)
VP4
VP2
VP3
VP1
CDV:BS$_{VP2}$ [S144T/K149I]
(nt A2734G)
(nt A2876C)
CDV:BS$_{VP1}$ [K98E/E145A]
(nt C2947T)
CDV:BS$_{VP1}$ [K98E/E145A/L169F]
CDV:BS [VP1/VP2]
B
Vero
Neuro-2A
NIH/3T3
C
D
CDV:BS$_{VP2}$ [S144T/K149I]
CDV:BS$_{VP1}$ [K98E/E145A]
CDV:BS$_{VP1}$ [K98E/E145A/L169F]
CDV:BS (VP1/VP2)
Hàm lượng virut log(CCID$_{50}$/ml)
E
CDV:BS$_{VP1}$ [K98E/E145A] 3T3
CDV:BS$_{VP1}$ [K98E/E145A] N2A
CDV:BS$_{VP1}$ [K98E/E145A/L169F] 3T3
CDV:BS$_{VP1}$ [K98E/E145A/L169F] N2A
3
4
5
6
7
8
9

Fig. 18

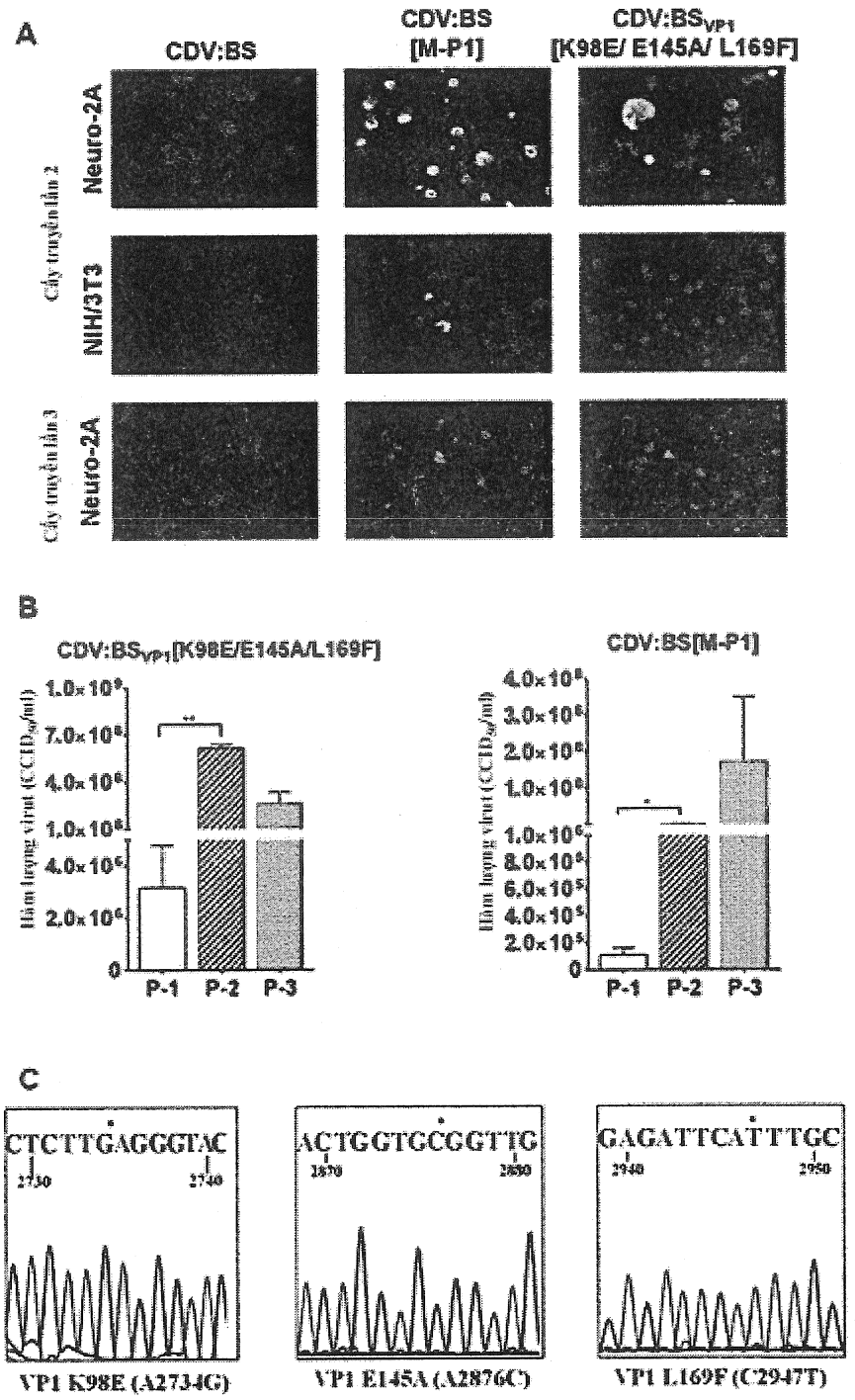

A
CDV:BS
CDV:BS [M-P1]
CDV:BS$_{VP1}$ [K98E/ E145A/ L169F]
Cấy truyền lần 2
Neuro-2A
NIH/3T3
Cấy truyền lần 3
Neuro-2A
B
CDV:BS$_{VP1}$[K98E/E145A/L169F]
CDV:BS[M-P1]
Hàm lượng virut (CCID$_{50}$/ml)
P-1
P-2
P-3
C
CTCTTGAGGGTAC
2730
2740
VP1 K98E (A2734G)
ACTGGTGCCGGTTG
2870
2880
VP1 E145A (A2876C)
GAGATTCATTTGC
2940
2950
VP1 L169F (C2947T)

Fig.19

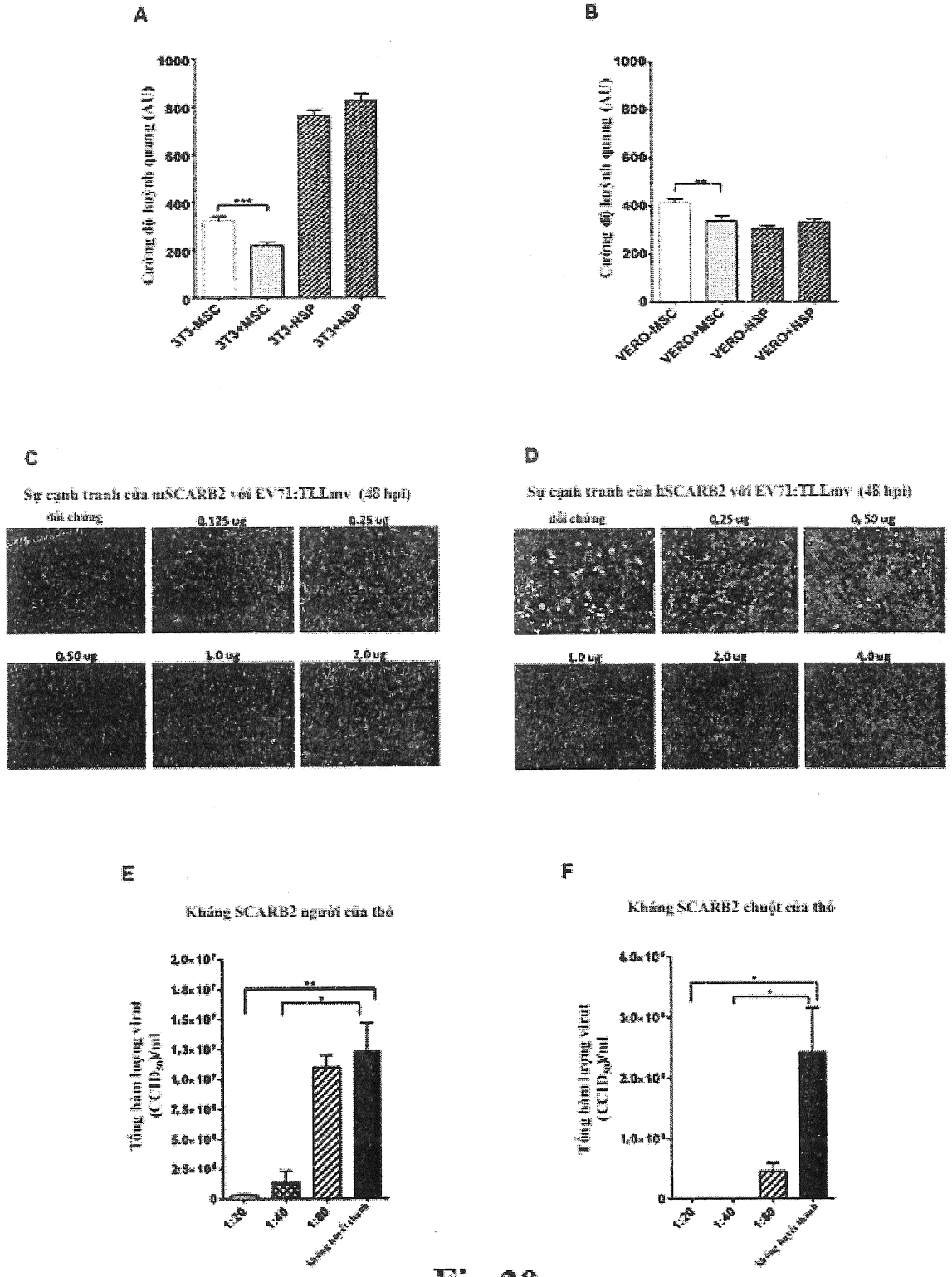

A
Cường độ huỳnh quang (AU)
1000
800
600
400
200
0
***
3T3-MSC
3T3+MSC
3T3-NSP
3T3+NSP
B
Cường độ huỳnh quang (AU)
1000
800
600
400
200
0
**
VERO-MSC
VERO+MSC
VERO-NSP
VERO+NSP
C
Sự cạnh tranh của mSCARB2 với EV71:TLLmv (48 hpi)
đối chứng
0,125 ug
0,25 ug
0,50 ug
1,0 ug
2,0 ug
D
Sự cạnh tranh của hSCARB2 với EV71:TLLmv (48 hpi)
đối chứng
0,25 ug
0,50 ug
1,0 ug
2,0 ug
4,0 ug
E
Kháng SCARB2 người của thỏ
Tổng hàm lượng virut (CCID50/ml)
2,0×10⁷
1,8×10⁷
1,5×10⁷
1,3×10⁷
1,0×10⁷
7,5×10⁶
5,0×10⁶
2,5×10⁶
0
**
*
1:20
1:40
1:80
F
Kháng SCARB2 chuột của thỏ
Tổng hàm lượng virut (CCID50/ml)
4,0×10⁶
3,0×10⁶
2,0×10⁶
1,0×10⁶
0
*
*
1:20
1:40
1:80

Fig.20

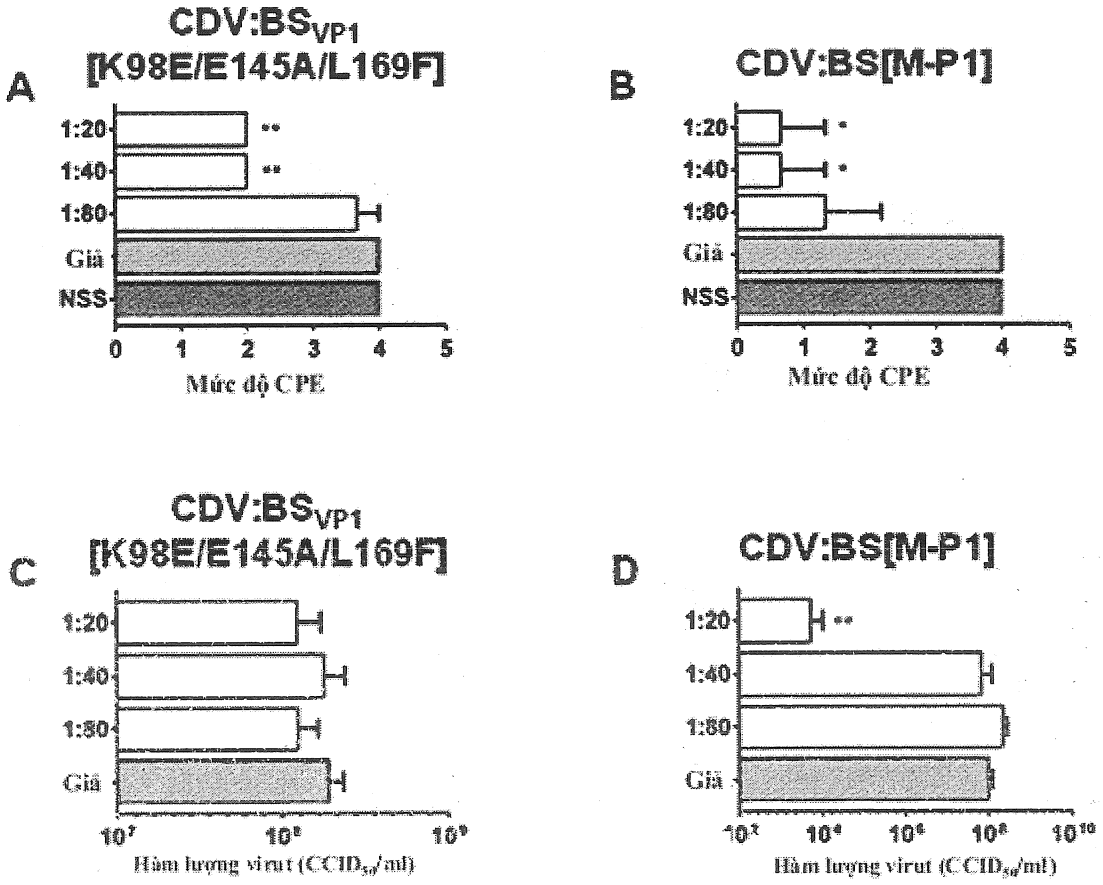

A
CDV:BS$_{VP1}$
[K98E/E145A/L169F]
1:20
1:40
1:80
Giả
NSS
**
**
0
1
2
3
4
5
Mức độ CPE
B
CDV:BS[M-P1]
1:20
1:40
1:80
Giả
NSS
*
*
0
1
2
3
4
5
Mức độ CPE
C
CDV:BS$_{VP1}$
[K98E/E145A/L169F]
1:20
1:40
1:80
Giả
10^7
10^8
10^9
Hàm lượng virut (CCID$_{50}$/ml)
D
CDV:BS[M-P1]
1:20
1:40
1:80
Giả
**
10^2
10^4
10^6
10^8
10^{10}
Hàm lượng virut (CCID$_{50}$/ml)

Fig.21

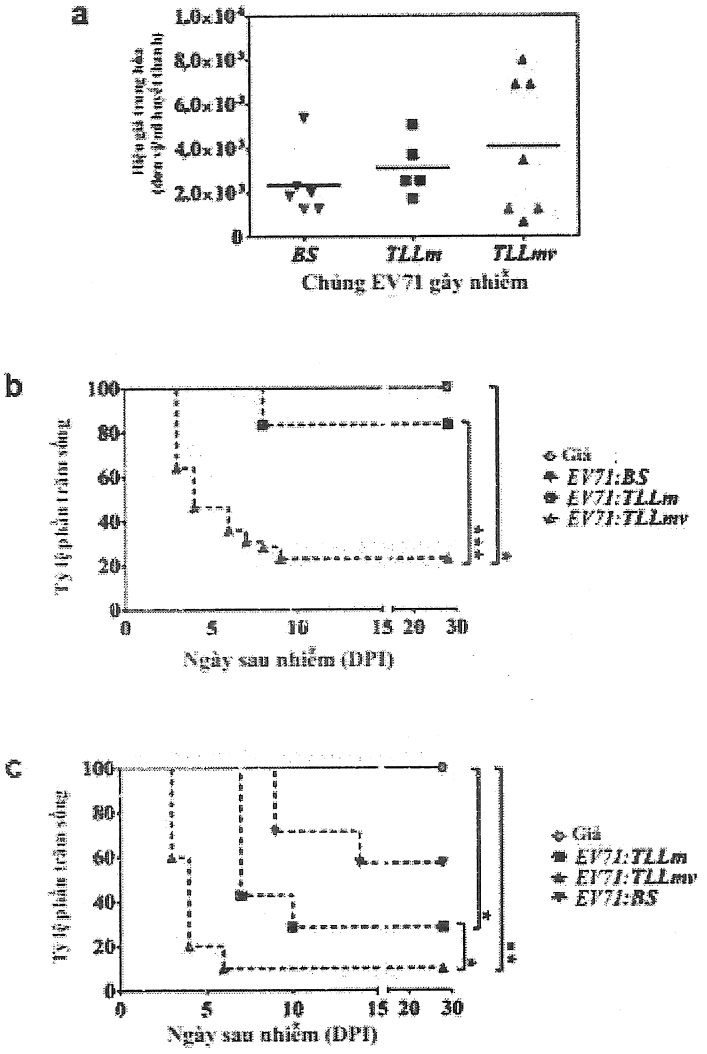

a
1.0x10⁴
8.0x10³
6.0x10³
4.0x10³
2.0x10³
0
BS
TLLm
TLLmv
Chủng EV71 gây nhiễm
b
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
30
Ngày sau nhiễm (DPI)
Giả
EV71:BS
EV71:TLLm
EV71:TLLmv
c
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
30
Ngày sau nhiễm (DPI)
Giả
EV71:TLLm
EV71:TLLmv
EV71:BS

Fig. 22

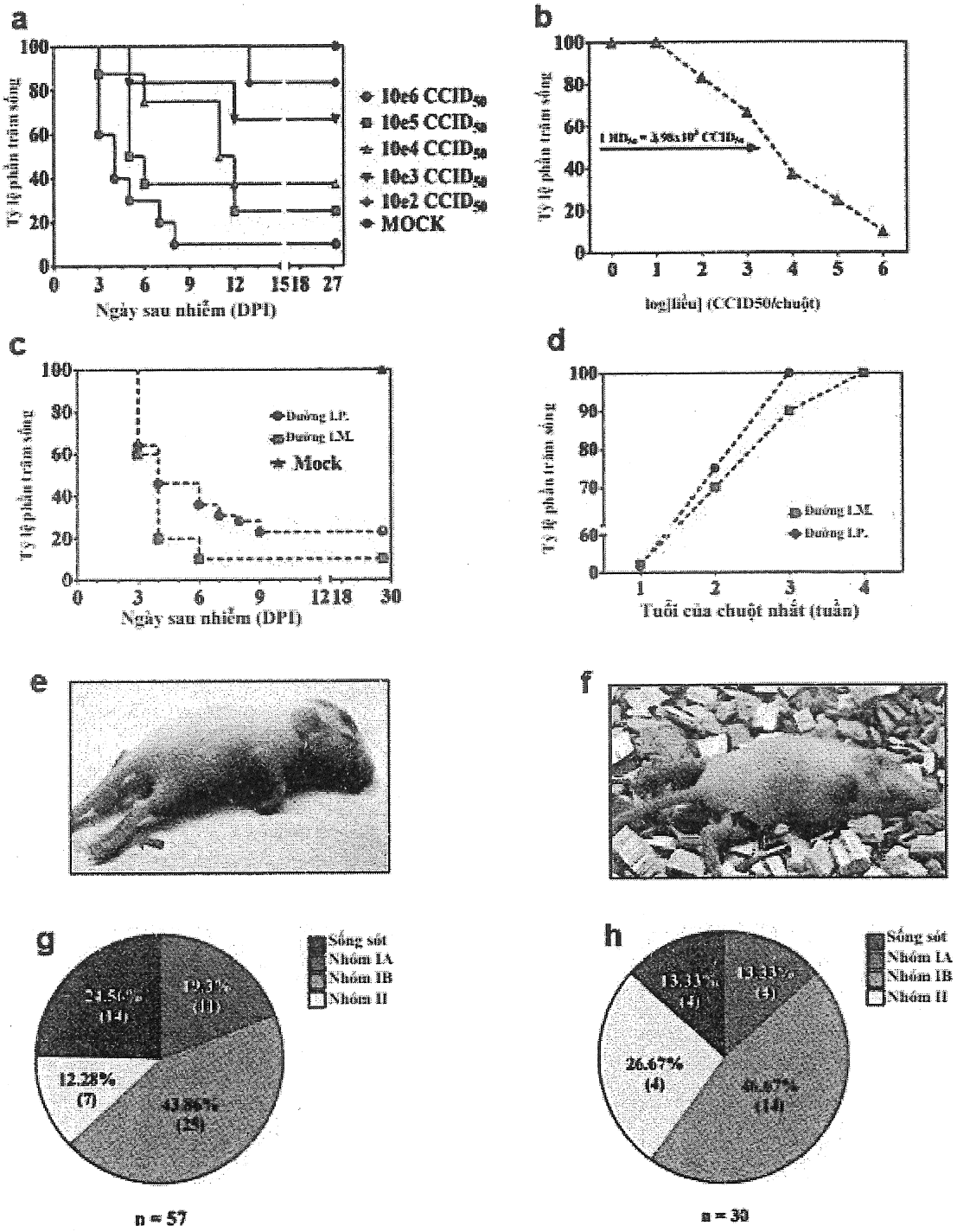

a
Tỷ lệ phần trăm sống
Ngày sau nhiễm (DPI)
10e6 CCID50
10e5 CCID50
10e4 CCID50
10e3 CCID50
10e2 CCID50
MOCK
b
Tỷ lệ phần trăm sống
log[liều] (CCID50/chuột)
c
Tỷ lệ phần trăm sống
Ngày sau nhiễm (DPI)
Đường LP.
Đường LM.
Mock
d
Tỷ lệ phần trăm sống
Tuổi của chuột nhắt (tuần)
Đường LM.
Đường LP.
e
f
g
Sống sót
Nhóm IA
Nhóm IB
Nhóm II
24.56%
(14)
19.3%
(11)
12.28%
(7)
43.86%
(25)
n = 57
h
Sống sót
Nhóm IA
Nhóm IB
Nhóm II
13.33%
(4)
13.33%
(4)
26.67%
(4)
46.67%
(14)
n = 30

Fig. 23

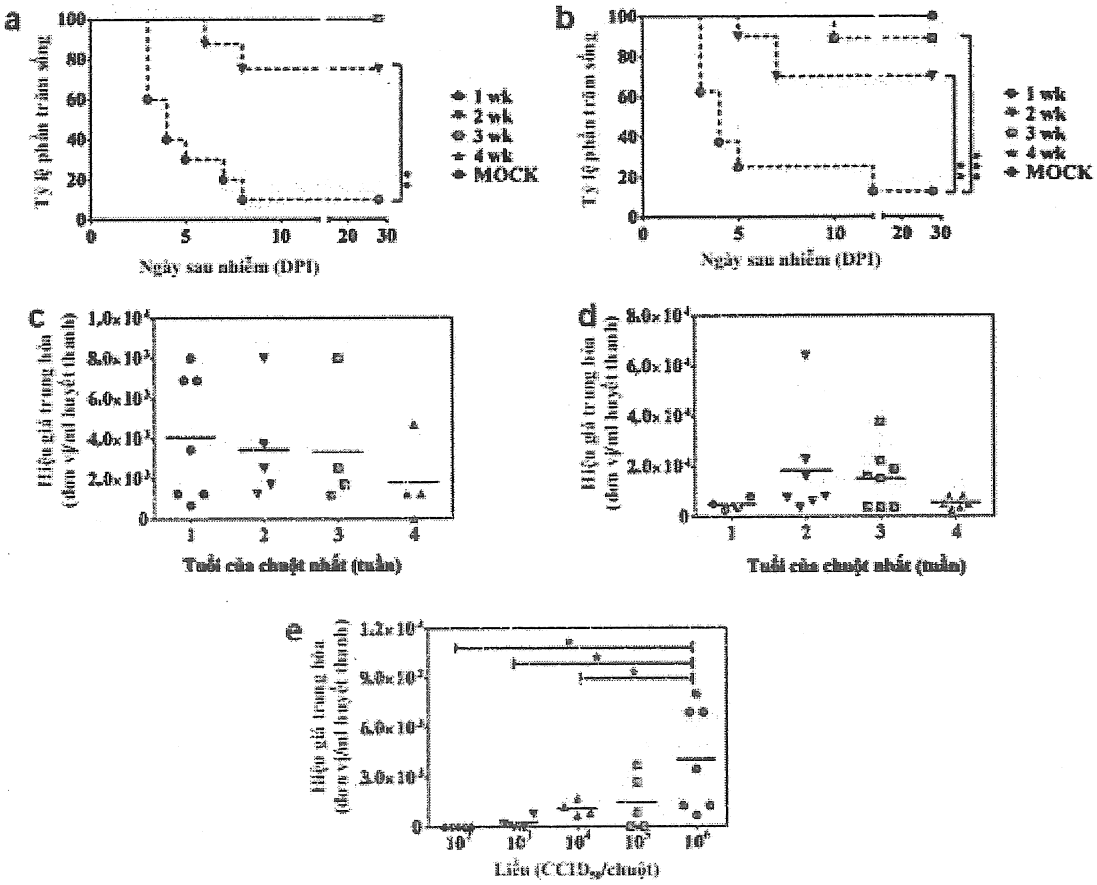

a
Tỷ lệ phần trăm sống
Ngày sau nhiễm (DPI)
1 wk
2 wk
3 wk
4 wk
MOCK
b
Tỷ lệ phần trăm sống
Ngày sau nhiễm (DPI)
1 wk
2 wk
3 wk
4 wk
MOCK
c
Hiệu giá trung hòa (đơn vị/ml huyết thanh)
Tuổi của chuột nhắt (tuần)
d
Hiệu giá trung hòa (đơn vị/ml huyết thanh)
Tuổi của chuột nhắt (tuần)
e
Hiệu giá trung hòa (đơn vị/ml huyết thanh)
Liều (CCID50/chuột)

Fig. 24

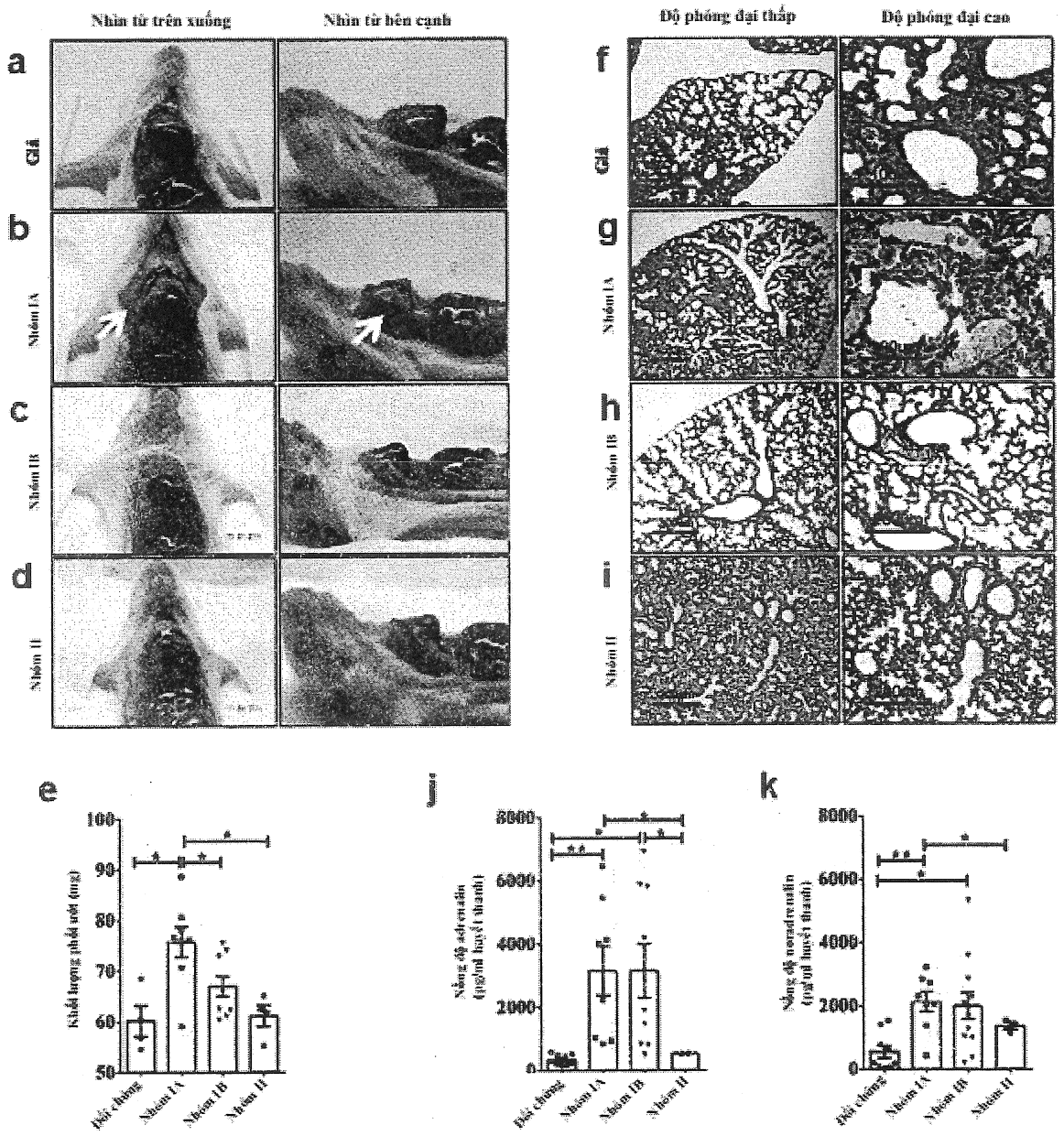

Nhìn từ trên xuống
Nhìn từ bên cạnh
Độ phóng đại thấp
Độ phóng đại cao
a
Giả
b
Nhóm IA
c
Nhóm IB
d
Nhóm II
f
Giả
g
Nhóm IA
h
Nhóm IB
i
Nhóm II
e
Khối lượng phổi sau đông
100
90
80
70
60
50
Đối chứng
Nhóm IA
Nhóm IB
Nhóm II
j
Nồng độ adrenalin (pg/ml huyết thanh)
8000
6000
4000
2000
0
Đối chứng
Nhóm IA
Nhóm IB
Nhóm II
k
Nồng độ noradrenalin (pg/ml huyết thanh)
8000
6000
4000
2000
0
Đối chứng
Nhóm IA
Nhóm IB
Nhóm II

Fig.25

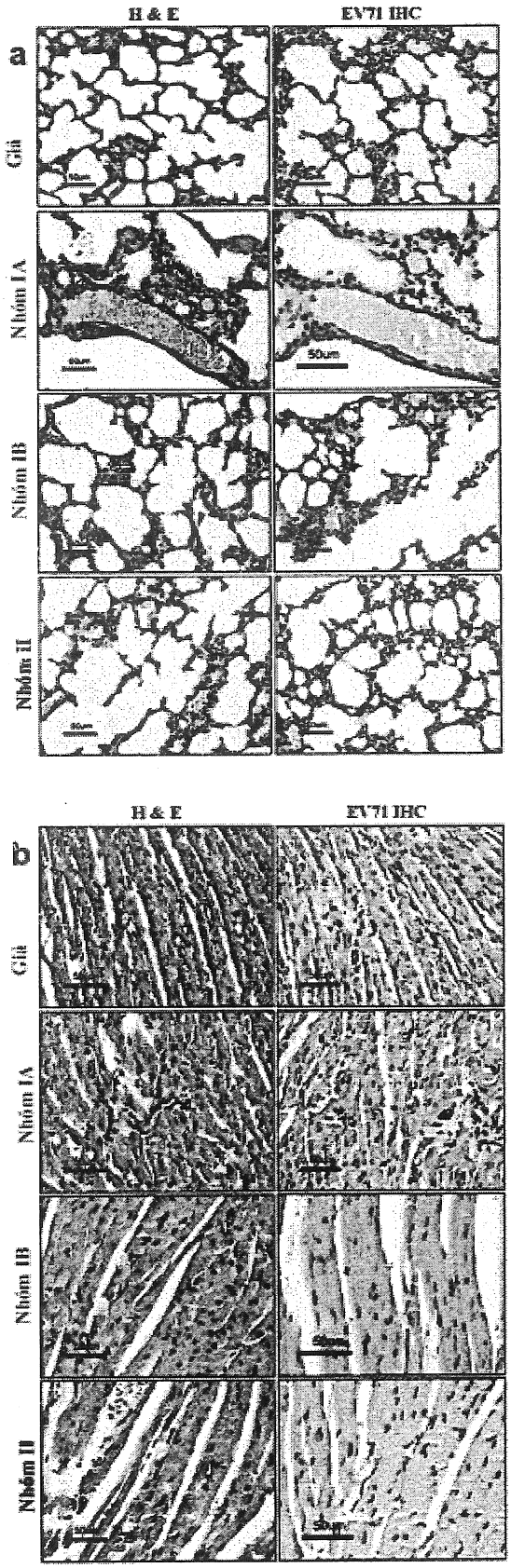

H & E
EV71 IHC
a
Giả
Nhóm IA
Nhóm IB
Nhóm II
50um
H & E
EV71 IHC
b
Giả
Nhóm IA
Nhóm IB
Nhóm II

Fig. 26

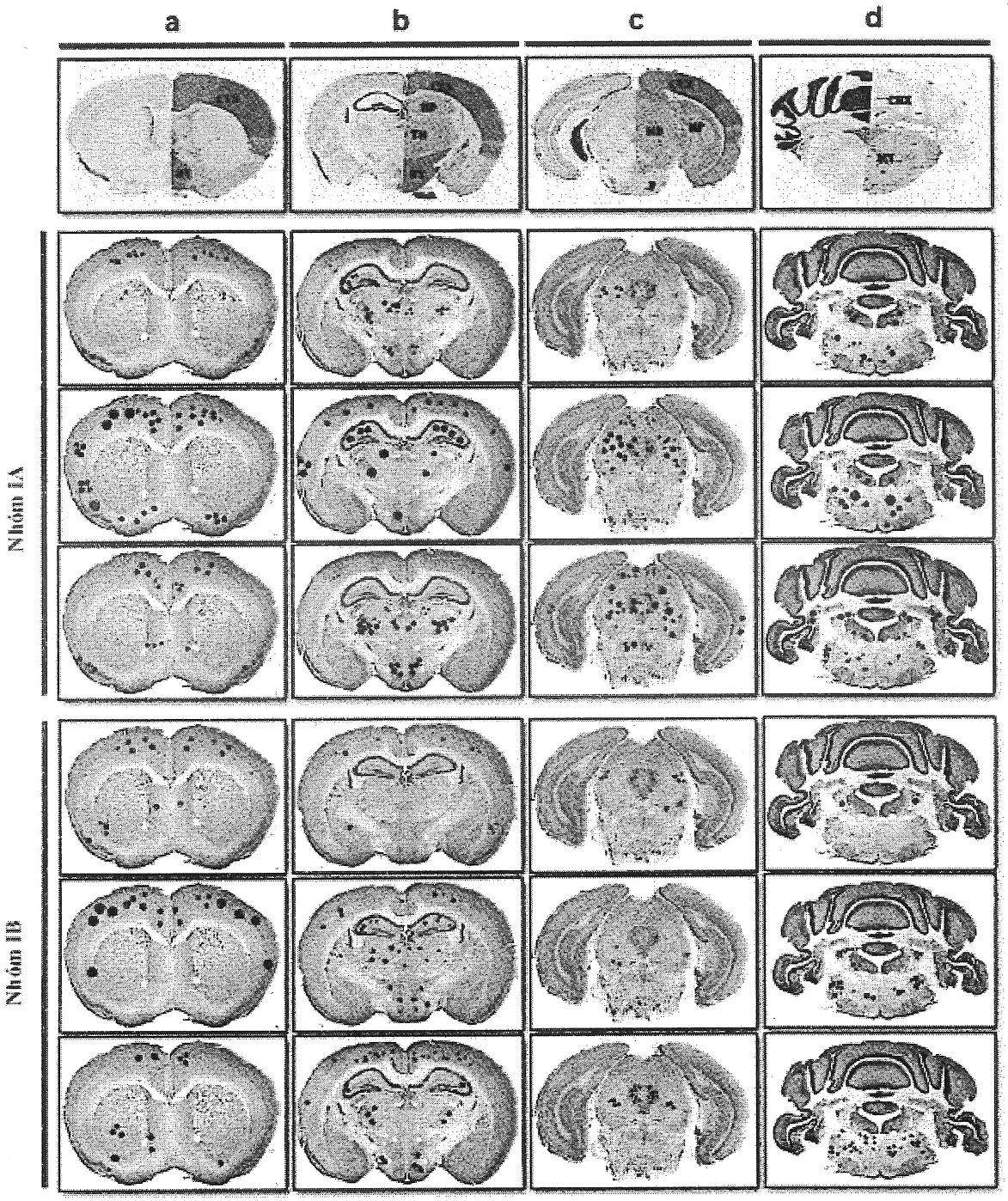


Fig. 27

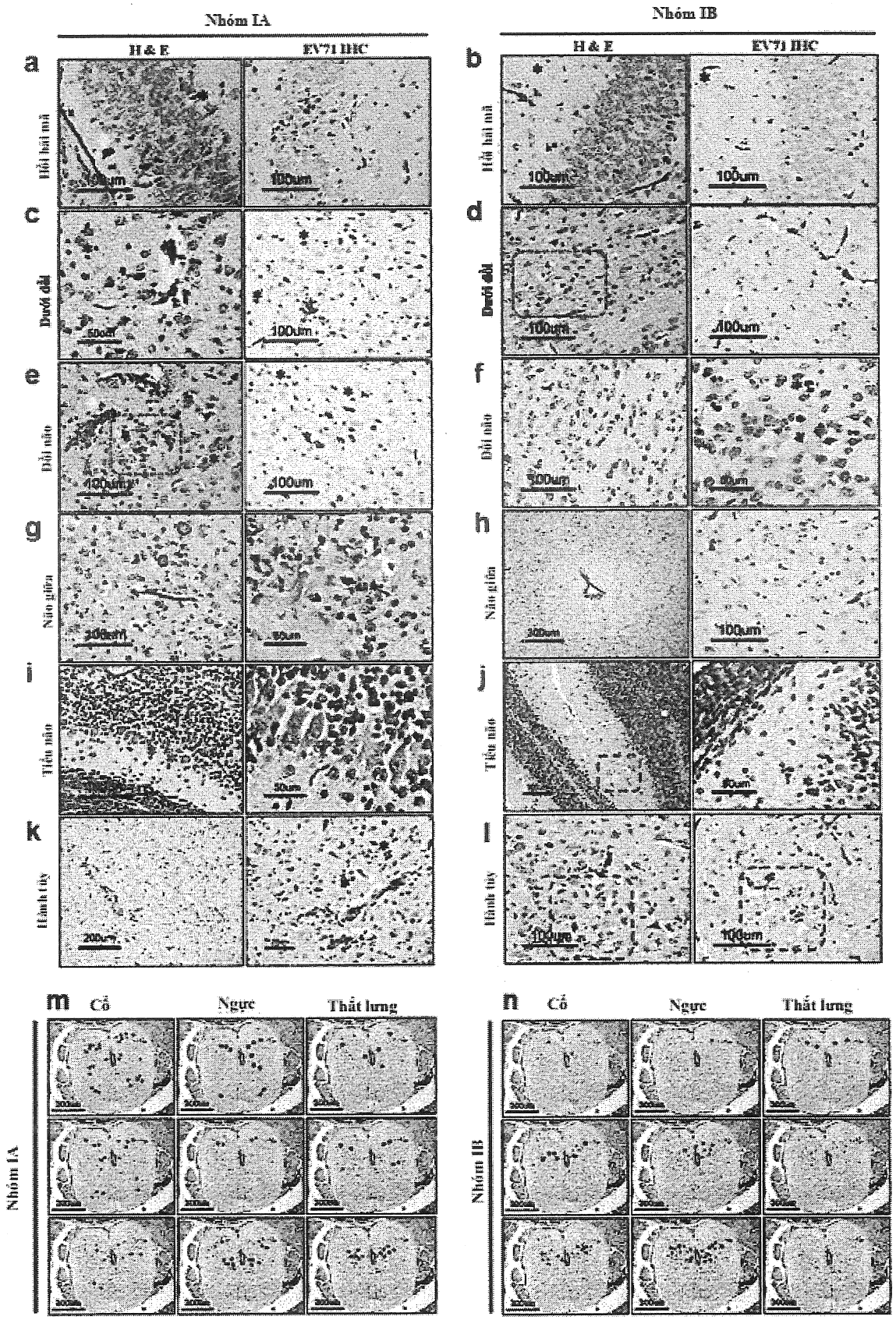

Nhóm IA
Nhóm IB
H & E
EV71 IHC
a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
Hồi hải mã
Dưới đồi
Đồi não
Não giữa
Tiểu não
Hành tủy
m
n
Cổ
Ngực
Thắt lưng
Nhóm IA
Nhóm IB

Fig.28

29/31

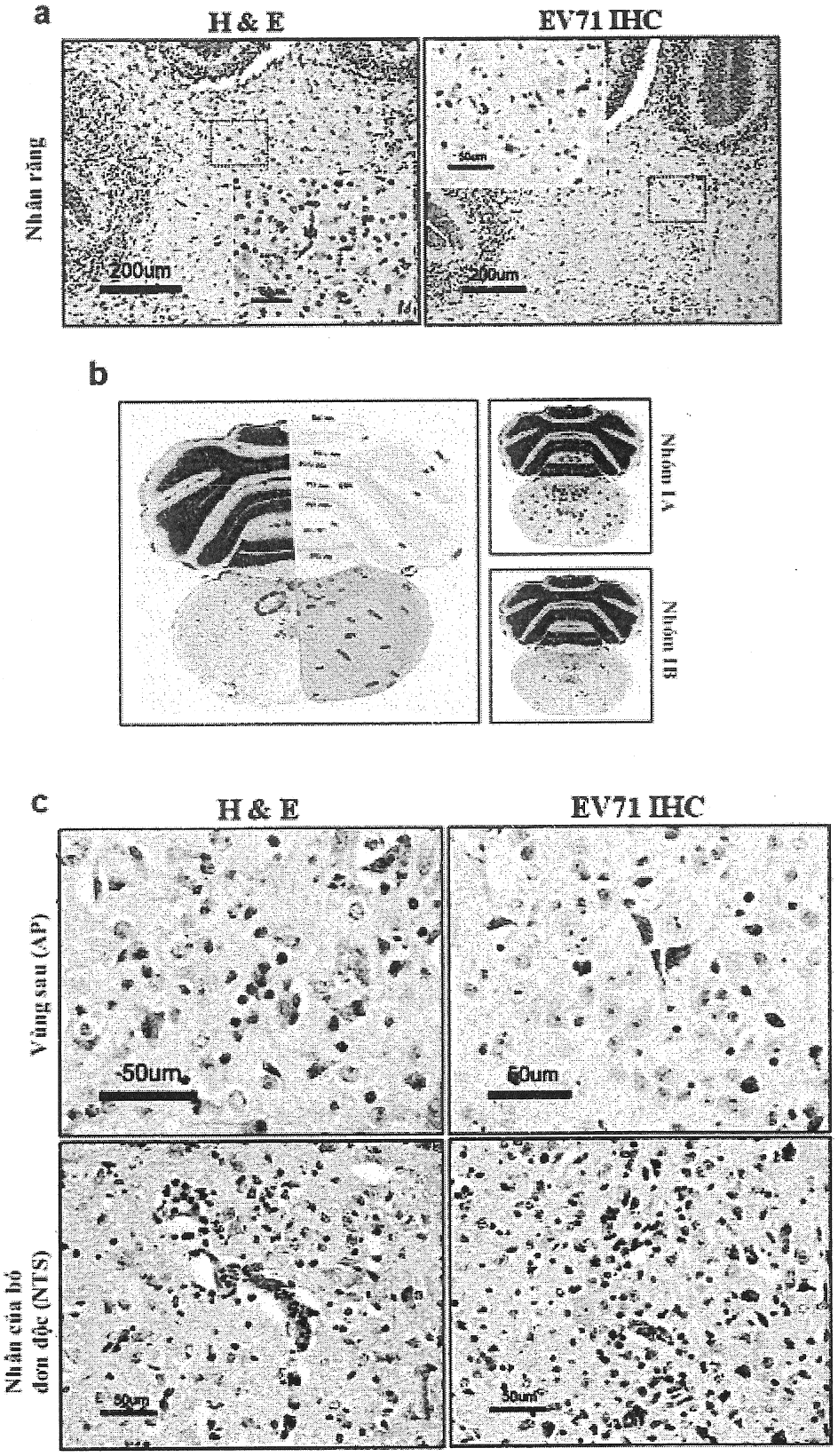

a
H & E
EV71 IHC
Nhân răng
200um
50um
200um
b
Nhóm 1A
Nhóm 1B
c
H & E
EV71 IHC
Vùng sau (AP)
50um
50um
Nhân của bó
dọn độc (NTS)
50um
50um

Fig. 29

30/31

Giả

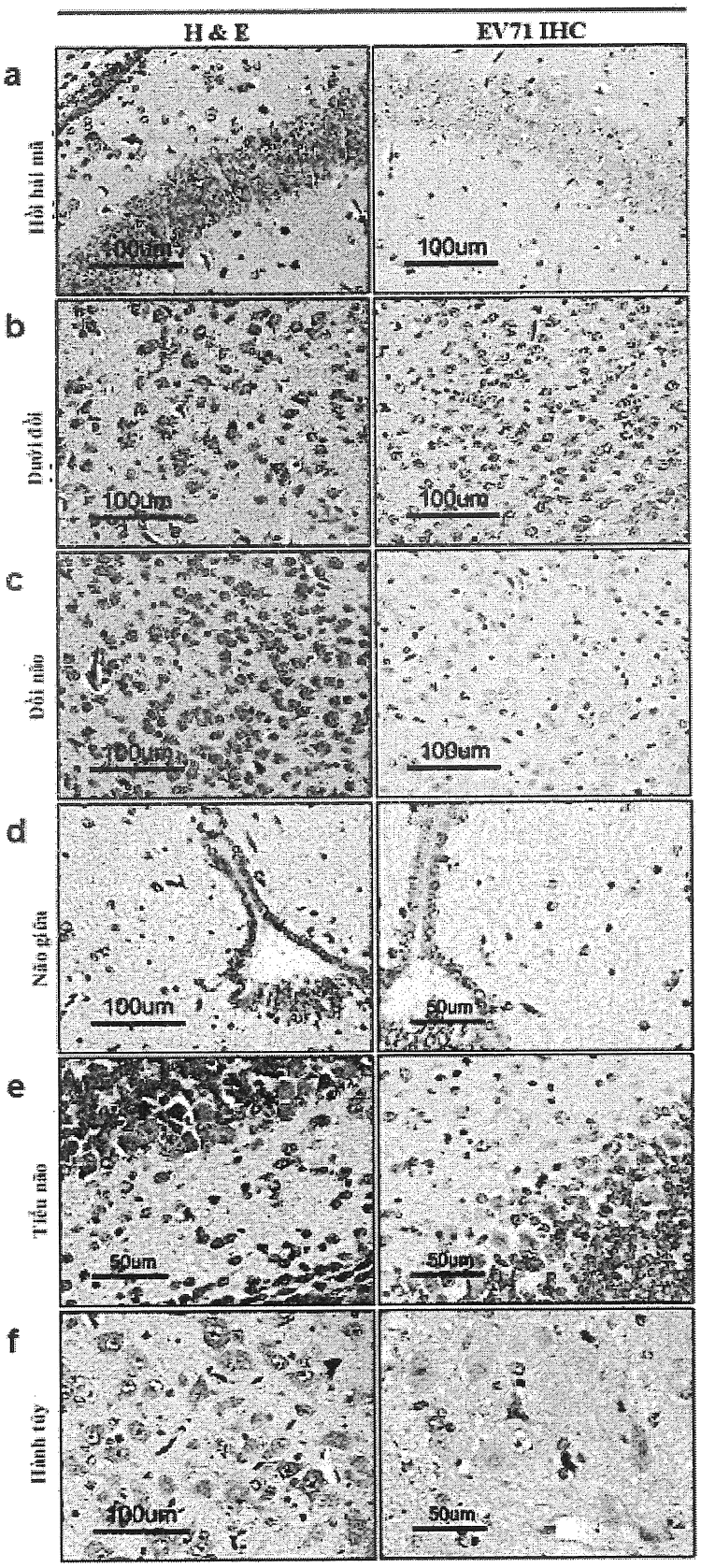


Fig.30

31/31

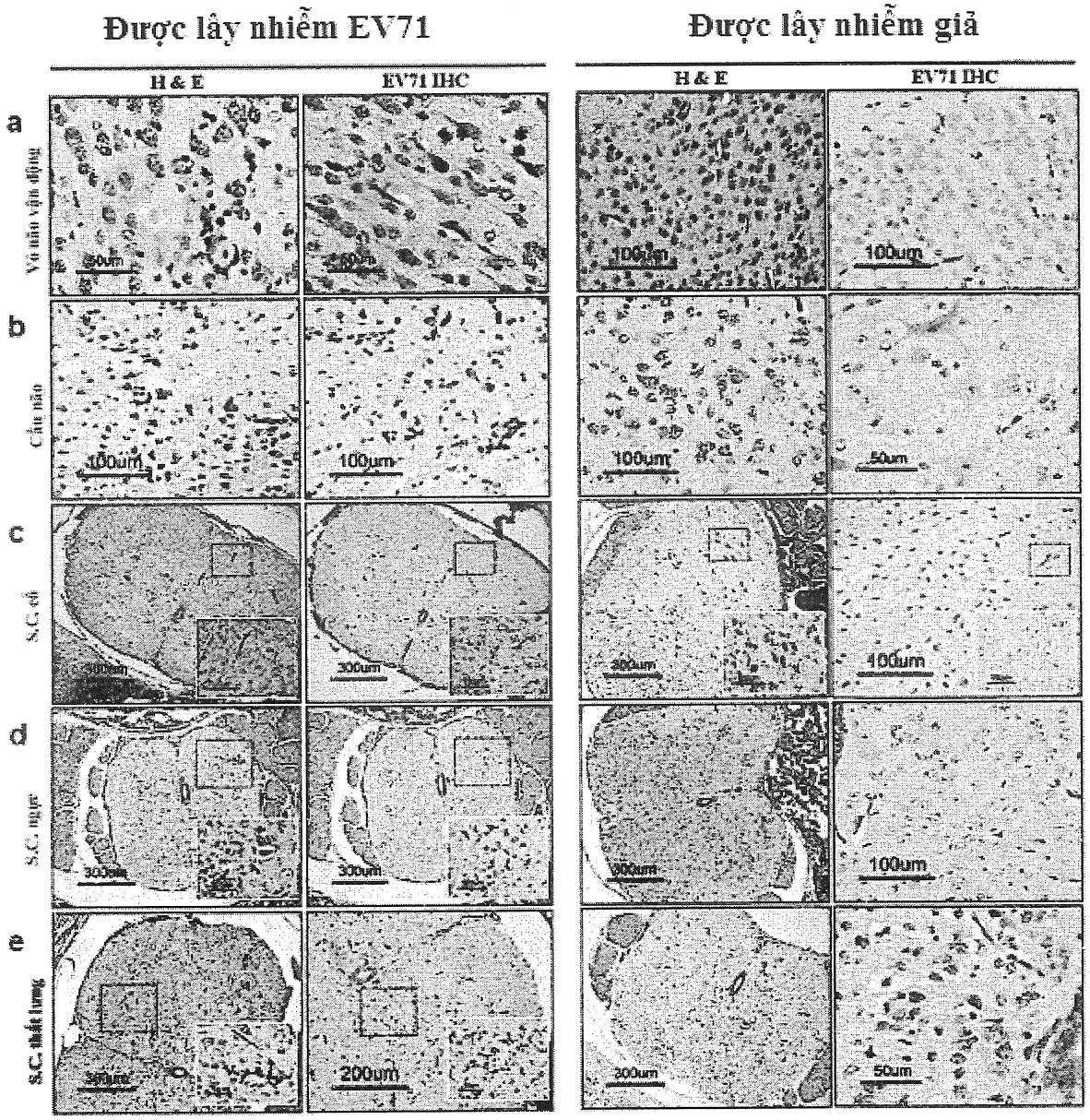

Được lây nhiễm EV71
Được lây nhiễm giả
H & E
EV71 IHC
H & E
EV71 IHC
a
Vỏ não vận động
b
Cầu não
c
S.C cổ
d
S.C ngực
e
S.C thắt lưng
100um
50um
300um
200um

Fig. 31

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> TEMASEK LIFE SCIENCES LABORATORY LIMITED
<120> MẪU ĐỘNG VẬT ĐƯỢC LÂY NHIỄM THẦN KINH VIRUT ENTERO 71 VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT MẪU ĐỘNG VẬT NÀY
<130> 2577-243PCT
<150> US 62/114,880
<151> 2015-02-11
<150> US 62/108,828
<151> 2015-01-28
<160> 23
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 7438
<212> ADN
<213> Virut entero 71:TLLm
<400> 1
ttcaaacagc ctgtgggttg cacccactca cagggcccac gtggcgctag cactctggtt 60
ctacggaacc tttgtgcgcc tgttttacgc cccttcccca atttgcaact tagaagcaat 120
acacaacact gatcaacagc gggcatggcg caccagctat gtcttgatca agcacttctg 180
tttccccgga ccgactatca atagactgct cacgcggttg aaggagaaag cgtccgttat 240
ccggctaact acttcgaaaa acctagtaac accattgaag ctgcagagtg tttcgctcgg 300
cacttccccc gtgtagatca ggtcgatgag tcactgcaat ccccacgggt gaccgtggca 360
gtggctgcgt tggcggcctg cctatggggc aacccatagg acgctctaat gcggacatgg 420
tgcgaagagt ctattgagct agttagtagt cctccggccc ctgaatgcgg ctaatcctaa 480
ctgcggagca catgccttca acccagaggg tagtgtgtcg taatgggcaa ctctgcagcg 540
gaaccgacta ctttgggtgt ccgtgtttcc ttttattctt atattggctg cttatggtga 600
caattacaga attgttacca tatagctatt ggattggcca tccggtgtgc aatagagcta 660
ttatatacct tttttttgg ctttgtacca ctaaccttaa aatctataat caccctcgac 720
tttatattaa ccctcaacac agtcaagcat gggctcacag gtgtccactc agcgatccgg 780
ctcccacgag aactccaatt cagctacagg aggctccacc attaattaca ctaccatcaa 840
ctattacaaa gactcctatg ctgcgacagc gggcaaacag agcctcaaac aagaccctga 900
taagtttgct aaccctgtca aggacatttt cactgaaatg gctgcgccac tgaagtctcc 960
atccgctgaa gcttgtggtt acagtgatcg cgtggcacaa ctcaccattg gaaactccac 1020
cattactaca caggaggcgg caaacatcat agttggttac ggtgagtggc cctcatactg 1080
ctctgatgac gacgctacag cggtggacaa accaacgcgc ccagatgttt cagtgaatag 1140
gttttataca ctggacacta aactgtggga aaagtcatcc aaggggtggt attggaagtt 1200
tcctgatgtg ttgactgaga ccggagtctt tggccagaac gcacagtttc actatttgta 1260
taggtcaggg ttttgcattc atgtgcaatg taacgctagc aagttccatc aaggagcgct 1320
gttagtcgcc atacttccag agtatgttat agggacaata gcaggcggta caggaacaga 1380
ggacacccac cctccttaca tacaaacaca acctggcgcc gacggtttcg agctgcagca 1440
cccgtacgtg ctcgatgctg ggattcctat atcacaattg acagtgtgtc cccatcaatg 1500
gattaacctg cggaccaata actgtgccac aataatagtg ccatatatga acacactgcc 1560
tttcgactct gccctgaacc attgcaattt tgggctgttg gtagtaccca ttagcccatt 1620
agattttgac caaggggcaa ctccggttat ccctattaca atcactctag ctccaatgtg 1680
ctctgagttt gcaggtctca gacaggcagt cactcaaggc tttcccactg agccaaaacc 1740
aggaacgaat caattcttga ccaccgatga cggcgtctca gcacccattc taccaaattt 1800
ccatcccact ccatgtattc acatacccgg tgaagtcaga aacctgcttg agttgtgtca 1860
agtggagact attcttgagg ttaacaacgt acccaccaat gctaccagtc tgatggaaag 1920
gctacgattc ccggtgtccg cgcaagcggg gaaaggtgaa ttgtgtgccg tgtttagggc 1980
cgaccctgga agagacggtc catggcaatc aacaatgctg ggccagttgt gtggatatta 2040
cacccagtgg tcagggtcac tggaggtcac ttttatgttt accgggtctt tcatggccac 2100
aggtaaaatg ctcatagctt atacacctcc tggcggcccc ttacccaaag atcgggccac 2160
agcaatgctg ggcacacatg ttatctggga ttttgggcta caatcatctg tcacccttgt 2220
aataccatgg attagtaata cccactacag ggcgcatgcc cgggatggag tgtttgacta 2280
ctataccaca ggactggtca gtatctggta tcaaacaaac tacgtagttc caattggggc 2340
acccaacaca gcttatataa tagcactagc ggcagcccag aagaatttca ccatgaaact 2400
gtgcaaagac accagtcaca tattacagac agcctccatt cagggagata gggtggcaga 2460
tgcgatcgag agctctatag gagatagtgt gagtagggca cttacccagg ccctgccagc 2520
acccacaggt caaaacacac aggtgagcag tcatcgacta gacactggcg aagttccagc 2580
gctccaagct gctgaaattg gggcatcgtc aaatactagt gatgagagta tgattgagac 2640
acgatgcgtt cttaactcac atagtacagc agagaccacc ttggacagtt tcttcagtag 2700
ggcaggtttg gtaggagaga tagatttccc tcttgagggt accaccaatc cagatggtta 2760

tgccaactgg gacatagaca taactggtta cgcacaaatg cgcaggaaag tggagctgtt 2820
cacctacatg cgctttgatg cggaattcac ttttgttgcg tgcactccta ctggtgcggt 2880
tgttccacaa ttactccagt atatgtttgt tccccctggt gctcccaaac cagagtctag 2940
agattcattt gcttggcaga cagccacaaa cccctcagtc tttgtcaagt tgactgatcc 3000
cccggcacag gtctcagttc cgttcatgtc acccgcgagc gcttaccagt ggttttacga 3060
cgggtacccc acgtttggag aacacaaaca ggagaaagac ctcgagtatg gagcgtgtcc 3120
taataatatg atgggcactt tctcggtgcg aaccgtgggg tcattaaagt ccaagtaccc 3180
cttggttgtc agaatatata tgagaatgaa gcatgtcagg gcgtggatac ctcgcccgat 3240
gcgcaaccaa aactatttgt tcaaagccaa cccaaactat gccggtaact ccattaagcc 3300
gaccggcact agtcgtactg ccattactac ccttggaaag ttcggccagc agtctggggc 3360
catctacgtg ggcaacttca gagtggttaa tcgtcacctc gctactcata atgactgggc 3420
gaacctcgtc tgggaagaca gctcccgcga cctattagtg tcgtctacca ccgctcaggg 3480
ctgtgataca attgcacgtt gtgactgtca aacaggagtg tactattgta attccaagag 3540
aaagcactat ccagtcagct tttctaaacc cagcctcata tatgtggaag ctagcgagta 3600
ttaccctgct agataccaat cgcacctgat gcttgcagtg ggccactctg agcccggcga 3660
ctgcggaggc atcttgaggt gtcaacatgg tgtagttggt atagtgtcca cgggtggcaa 3720
cgagctcgtt ggatttgctg atgtgaggga tctcttgtgg ttagatgaag aggccatgga 3780
gcaaggtgtg tccgactaca ttaaggggct cggtgatgcg tttggaacag gcttcactga 3840
cgctgtatcc agggaagttg aagcccttag gaaccacctt ataggatctg atggagcagt 3900
tgagaaaatc ctaaagaacc ttattaagct gatttcagcg ttagtaattg tgatcaggag 3960
cgattatgat atggtcaccc tcacagcaac tttagccctg attggttgtc atggaagtcc 4020
ttgggcttgg attaaagcca agacagcatc cattttaggt atccccatcg cccagaagca 4080
gagtgcttct tggctaaaga aatttaatga tatggcgagt gctgccaagg gtttagaatg 4140
gatatctaat aaaattagca agttcattga ctggctcagg gagaaaattg ttccagcagc 4200
taaggagaaa gcagaatttt taaccaattt gaagcaattg ccactattag agaaccagat 4260
cacaaattta gagcagtccg ctgcctcaca agaggacctt gaagctatgt ttgggaatgt 4320
gtcatacctc gcccatttct gtcgcaagtt ccaaccatta tacgccgcgg aagctaagcg 4380
agtctatgtt ctagagaaga gaatgaataa ctacatgcag ttcaagagca aacaccgtat 4440
tgaacctgta tgtctcatca ttagaggctc accaggcact ggaaagtccc ttgcgaccgg 4500
tatcattgct cgggccatag cagacaagta tcactctagt gtgtactcac ttccaccaga 4560
ccctgaccat tttgacgggt acaaacagca agtggttaca gttatggatg atctgtgtca 4620
raatcctgac ggcaaagaca tgtcattatt ttgccagatg gtgtctaccg tggattttat 4680
cccaccaatg gcttctctcg aagaaaaggg agtttctttc acatctaaat ttgttatcgc 4740
atccaccaac gctagcaaca ttatagtgcc tacagtgtca gactctgacg ccattcgtcg 4800
caggttttac atggattgcg acattgaggt gacagactca tacaaaacag atttgggtag 4860
actagacgct ggacgggctg ctaagctatg ctctgagaac aacaccgcaa acttcaaacg 4920
atgcagccca ctagtgtgtg ggaaagctat tcaacttaga gacaggaagt ctaaggtcag 4980
gtacagcgtg gacacagtgg tctctgaact tattagagaa tataatagca gatccgctat 5040
tggtaataca attgaagcac tattccaagg tccacccaag ttcaggccaa ttagaatcag 5100
tcttgaggag aagccagccc cagacgctat tggcgatctc ctcgctagtg tagatagcga 5160
ggaagtgcgc caatactgta gggagcaagg ctggatcatc cctgaaactc ccaccaatgt 5220
tgaacgacac cttaatagag cagtgctagt catgcaatcc atcgctactg tggtggcagt 5280
cgtctcactg gtgtacgtta tttacaagct ctttgcgggg tttcaaggtg cgtactctgg 5340
agctcccaag caaatgccca agaaacctgt cctccgtacg gcaacagtgc agggtccgag 5400
tcttgacttt gctctatcct tactgagaag gaacatcagg caagtccaaa cagatcaagg 5460
gcattttacc atgttaggtg tcagagatcg cttagccgtt cttccacggc actcacagcc 5520
cgggaagact atttgggtgg agcacaaact tgtgaacgtc cttgacgcag ttgagctggt 5580
ggatgagcag ggcgttaatt tggaactcac attggtgaca ctagatacta atgaaaaatt 5640
tagagatatc accaagttca ttccagagac cattagcggc gctagtgatg caactttagt 5700
gatcaacaca gaacatatgc catcaatgtt tgtcccagtg ggggacgtcg tgcagtacgg 5760
gttcttgaac cttagtggaa agccaactca taggaccatg atgtacaatt tccctacaaa 5820
agcaggacag tgtggaggtg tggtcacatc agtcggtaag attgttggca ttcacattgg 5880
cggcaacggg cgccaagggt tctgtgctgg tttgaagagg agttacttcg caagtgtgca 5940
gggtgagatc caatgggtga agcctaacaa ggaaactggt agactgaaca tcaatggtcc 6000
aactcgcact aagctggagc ctagtgtgtt tcatgatgtg tttgaaggta ataaggaacc 6060
agcagtttta acaagtaaag accctagatt ggaggtcgac tttgaacaag ccctgttttc 6120
caagtatgtg ggcaatgttt tacacgagcc cgatgaatac gtgattcaag ctgccctcca 6180
ctacgcgaat caacttaaac aattggacat agacactagc aagatgagca tggaggaagc 6240
gtgctatggc actgaaaacc tggaagcaat agacctctgc actagtgccg ggtacccata 6300
cagcgccctt ggtatcaaga aaagagacat tcttgacccc acaaccaggg atgtgtccaa 6360
gatgaaattc tatatggata aatacgggct agacctgcca tactctacct atgtgaagga 6420
tgagcttagg tccctggata aaatcaagaa aggaaaatca cgcttgatag aggctagtag 6480
cttgaatgac tctgtctacc ttagaatgac ttttgggcac ctttacgagg tgtttcatgc 6540

caaccctggc actgtgactg gctcagcagt gggttgcaac ccggacgtgt tttggagcaa 6600
actaccgatt ctgctgcctg ggtcactctt tgcctttgac tactcaggat acgatgctag 6660
tctcagcccg gtatggttca gggctctaga agttgtgtta cgggagattg ggtattcaga 6720
ggaggccgtg tccctaatag aagggatcaa ccacacccac catgtgtacc ggaacaaaac 6780
atactgtgta cttggtggaa tgccctcggg atgttctggt acttccatct ttaatacaat 6840
gatcaacaac atcatcatta gaaccctttt gatcaaaacc tttaagggaa tagacctgga 6900
tgagttgaac atggtggcct atggggacga tgtgctggct agttacccct ttcccattga 6960
ttgccttgag ttggctaaga ctggcaaaga gtatggtttg accatgacac ctgcagacaa 7020
atcaccctgt ttcaatgaag taacatggga aaatgctacc ttcctgaaga gaggattctt 7080
gccagaccac caatttccat tcttaattca ccctacgatg cccatgagtg agatccgtga 7140
gtccattcga tggactaaag acgcgcgcaa cacccaagat cacgtgcgct ccctgtgtct 7200
gttggcatgg cacaatggta aggatgaata tgagaagttt gtgagtgcaa ttagatcagt 7260
tccagttgga aaagcgttgg ccattcctaa tttcgagaac ctgagaagaa attggctcga 7320
attgttttaa tattacagct taaagctgaa ccccactaga aatctggtcg cgttaatgac 7380
tagtgggggt aaatttgtta taaccagaat agcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 7438

<210> 2
<211> 7421
<212> ADN
<213> Virut entero 71:TLLmv
<400> 2

ttcaaacagc ctgtgggttg cacccactca cagggcccac gtggcgctag cactctggtt 60
ctacggaacc tttgtgcgcc tgttttacgc cccttcccca atttgcaact tagaagcaat 120
acacaacact gatcaacagg cggcatggcg caccagctat gtcttgatca agcacttctg 180
tttccccgga ccgagtatca atagactgct cacgcggttg aaggagaaag cgtccgttat 240
ccggctaact acttcgaaaa acctagtaac accattgaag ctgcagagtg tttcgctcgg 300
cacttccccc gtgtagatca ggtcgatgag tcactgcaat ccccacgggt gaccgtggca 360
gtggctgcgt tggcggcctg cctatggggc aacccatagg acgctctaat gcggacatgg 420
tgcgaagagt ctattgagct agttagtagt cctccggccc ctgaatgcgg ctaatcctaa 480
ctgcggagca catgccttca acccagaggg tagtgtgtcg taatgggcaa ctctgcagcg 540
gaaccgacta ctttgggtgt ccgtgtttcc ttttattctt atattggctg cttatggtga 600
caattacaga attgttacca tatagctatt ggattggcca tccggtgtgc aatagagcta 660
ttatatacct atttttcttt tggctttgta tcactaacct taaaatctat aatcaccctc 720
gactttatag catgggctca caggtgtcca ctcagcgatc cggctcccac gagaactcca 780
attcagctac aggaggctcc accattaatt acactaccat caactattac aaagactcct 840
atgctgcgac agcgggcaaa cagagtctca aacaagaccc tgataagttt gctaaccctg 900
tcaaggacat tttcactgaa atggctgcgc cactgaagtc tccatccgct gaagcttgtg 960
gttacagtga tcgcgtggca caactcacca ttggaaactc caccattact acacaggagg 1020
cggcaaacat catagttggt tacggtgagt ggccctcata ctgctctgat gacgacgcta 1080
cagcggtgga caaaccaacg cgcccagatg tttcagtgaa taggttttat acactggaca 1140
ctaaactgtg ggaaaagtca tccaaggggt ggtattggaa gtttcctgat gtgttgactg 1200
agaccggagt ctttggccag aatgcacagt ttcactattt gtataggtca gggttttgca 1260
ttcatgtgca atgtaacgct agcaagttcc atcaaggagc gctgttagtc gccatacttc 1320
cagagtatgt tatagggaca atagcaggcg gtacaggaac agaggacacc caccctcctt 1380
acatacaaac acaacctggc gccgacggtt tcccgctgca gcacccgtac gtgctcgatg 1440
ctgggattcc tatatcacaa ttgacagtgt gtccccatca atggattaac ctgcggacca 1500
ataactgtgc cacaataata gtgccatata tgaacacact gcctttcgac tctgccctga 1560
accattgcaa ttttgggctg ttggtagtac ccattagccc attagatttt gaccaagggg 1620
caactccggt tatccctatt acaatcactc tagctccaat gtgctctgag tttgcaggtc 1680
tcagacaggc agtcactcaa ggctttccca ctgagccaaa accaggaacg aatcaattct 1740
tgaccaccga tgacggcgtc tcagcaccca ttctaccaaa tttccatccc actccatgta 1800
ttcacatacc cggtgaagtc agaaacctgc ttgagttgtg tcaagtggag actattcttg 1860
aggttaacaa tgtacccacc aatcctacca gtctgatgga aaggctacga ttcccggtgt 1920
ccgcgcaagc ggggaaaggt gaattgtgtg ccgtgtttag ggccgaccct ggaagagacg 1980
gtccatggca atcaacaatg ctgggccagt tgtgtggata ttacacccag tggtcagggt 2040
cactggaggt cacttttatg tttaccgggt ctttcatggc cacaggtaaa atgctcatag 2100
cttatacacc tcctggcggc cccttaccca aagatcgggc cacagcaatg ctgggcacac 2160
atgttatctg ggattttggg ctacaatcat ctgtcaccct tgtaatacca tggattagta 2220
atacccacta cagggcgcat gcccgggatg gagtgtttga ctactatacc gcaggactgg 2280
tcagtatctg gtatcaaaca aactacgtag ttccaattgg ggcacccaac acagcttata 2340
taatagcact agcggcagcc cagaagaatt tcaccatgaa actgtgcaaa gacaccagtc 2400
acatgttaca gacagcctcc attcagggag atagggtggc agatgcgatc gagagctcta 2460
taggagatag tgtgagtagg gcacttaccc aggccctgcc agcacccaca ggtaaaaaca 2520
cacaggtgag cagtcatcga ctagacactg gcgaagttcc agcgctccaa gctgctgaaa 2580

ttggggcatc gtcaaatact agtgatgaga gtatgattga gacacgatgc gttcttaact 2640
cacatagtac agcagagacc accttggaca gtttcttcag tagggcaggt ttggtaggag 2700
aggtagaatt ccctcttgag ggtaccacca atccaggtgg ttatgccaac tgggacatag 2760
acataactgg ttacgcacaa atgcgcagga aagtggagct gttcacctac atgcgctttg 2820
atgcggaatt cacttttgtt gcgtgcactc ctactggtgc ggttgttcca caattactcc 2880
agtatatgtt tgttcccccc ggtgctccca aaccagagtc tagagattca tttgcttggc 2940
agacagccac aaacccctca gtctttgtca agttgactga tcccccggca caggtctcag 3000
ttccgttcat gtcacccgcg agcgcttacc agtggtttta cgacgggtac cccacgtttg 3060
gagaacacaa acaggagaaa gacctcgagt atggagcgtg tcctaataat atgatgggca 3120
ctttctcggt gcgaaccgtg gggtcattaa agtccaagca ccccttgatt gtcagaatat 3180
atatgagaat gaagcatgtc agggcgtgga tacctcgccc gatgcgcaac caaaactatt 3240
tgttcaaagc caacccaaac tatgccggta actccattaa gccgaccggc actagtcgta 3300
cttccattac cacccttgga aagttcggcc agcagtctgg ggccatctac gtgggcaact 3360
tcagagtggt taatcgtcac ctcgctactc ataacgactg ggcgaacctc gtctgggaag 3420
acagctcccg cgacctatta gtgtcgtcta ccaccgctca gggctgtgat acaattgcac 3480
gttgtgactg tcaaacagga gtgtactatt gtaattccaa gagaaagcac tatccagtca 3540
gcttttctaa acccagcctc atatatgtgg aagctagcga gtattaccct gctagatacc 3600
aatcgcacct gatgcttgca gtgggccact ctgagcccgg cgactgcgga ggcatcttga 3660
ggtgtcaaca tggtgtagtt ggtatagtgt ccacgggtgg caacgagctc gttggatttg 3720
ctgatgtgag ggatctcttg tggttagatg aagaggccat ggagcaaggt gtgtccgact 3780
acattaaggg gctcggtgat gcgtttggaa caggcttcac tgacgctgta tccagggaag 3840
ttgaagccct taggaaccac cttataggat ctgatggagc agttgagaaa atcctaaaga 3900
accttattaa gctgatttca gcgttagtaa ttgtgatcag gagcgattat gatatggtca 3960
ccctcacagc aactttagcc ctgattggtt gtcatggaag tccttgggct tggattaaag 4020
ccaagacagc atccatttta ggtatcccca tcgcccagaa gcagagtgct tcttggctaa 4080
agaaatttaa tgatatggcg agtgctgcca agggtttaga atggatatct aataaaatta 4140
gcaagttcat tgactggctc agggagaaaa ttgttccagc agctaaggag aaagcagaat 4200
ttttaaccaa tttgaagcaa ttgccactat tagagaacca gatcacaaat ttagagcagt 4260
ccgctgcctc acaagaggac cttgaagcta tgtttgggaa tgtgtcatac ctcgcccatt 4320
tctgtcgcaa gttccaacca ttatacgccg cggaagctaa gcgagtctat gttctagaga 4380
agagaatgaa taactacatg cagttcaaga gcaaacaccg tattgaacct gtatgtctca 4440
tcattagagg ctcaccaggc actggaaagt cccttgcgac cggtatcatt gctcgggcca 4500
tagcagacaa gtatcactct agtgtgtact cacttccacc agaccctgac cattttgacg 4560
ggtacaaaca gcaagtggtt acagttatgg atgatctgtg tcagaatcct gacggcaaag 4620
acatgtcatt attttgccag atggtgtcta ccgtggattt tatcccacca atggcttctc 4680
tcgaagaaaa gggagtttct ttcacatcta aatttgttat cgcatccacc aacgctagca 4740
acattatagt gcctacagtg tcagactctg acgccattcg tcgcaggttt tacatggatt 4800
gcgacattga ggtgacagac tcatacaaaa cagatttggg tagactagac gctggacggg 4860
ctgctaagct atgctctgag aacaacaccg caaacttcaa acgatgcagc ccactagtgt 4920
gtgggaaagc tattcaactt agagacagga agtctaaggt caggtacagc gtggacacag 4980
tggtctctga acttattaga gaatataata gcagatccgc tattggtaat acaattgaag 5040
cactattcca aggtccaccc aagttcaggc caattagaat cagtcttgag gagaagccag 5100
tcccagacgc tattggcgat ctcctcgcta gtgtagatag cgaggaagtg cgccaatact 5160
gtagggagca aggctggatc atccctgaaa ctcccaccaa tgttgaacga caccttaata 5220
gagcagtgct agtcatgcaa tccatcgcta ctgtggtggc agtcgtctca ctggtgtacg 5280
ttatttacaa gctctttgcg gggtttcaag gtgcgtactc tggagctccc aagcaaatgc 5340
ccaagaaacc tgtcctccgt acggcaacag tgcagggtcc gagtcttgac tttgctctat 5400
ccttactgag aaggaacatc aggcaagtcc aaacagatca agggcatttt accatgttag 5460
gtgtcagaga tcgcttagcc gttcttccac ggcactcaca gcccgggaag actatttggg 5520
tggagcacaa acttgtgaac gtccttgacg cagttgagct ggtggatgag cagggcgtta 5580
atttggaact cacattggtg acactagata ctaatgaaaa atttagagat atcaccaagt 5640
tcattccaga gaccattagc ggcgctagtg atgcaacttt agtgatcaac acagaacata 5700
tgccatcaat gtttgtccca gtgggggacg tcgtgcagta cgggttcttg aaccttagtg 5760
gaaagccaac tcataggacc atgatgtaca atttccctac aaaagcagga cagtgtggag 5820
gtgtggtcac atcagtcggt aagattgttg gcattcacat tggcggcaac gggcgccaag 5880
ggttctgtgc tggtttgaag aggagttact tcgcaagtgt gcagggtgag atccaatggg 5940
tgaagcctaa caaggaaact ggtagactga acatcaatgg tccaactcgc actaagctgg 6000
agcctagtgt gtttcatgat gtgtttgaag gtaataagga accagcagtt ttatcaagca 6060
aagaccctag attggaggtc gactttgaac aagccctgtt ttccaagtat gtgggcaatg 6120
ctttacacga gcccgatgaa tacgtgattc aagctgccct ccactacgcg aatcaactta 6180
aacaattgga catagacact agcaagatga gcatggagga agcgtgctat ggcactgaaa 6240
acctggaagc aatagacctc tgcactagtg ccgggtaccc atacagcgcc cttggtatca 6300
agaaaagaga cattcttgac cccacaacca gggatgtgtc caagatgaaa ttctatatgg 6360

ataaatacgg gctagacctg ccatactgta cctatgtgaa ggatgagctt aggtccctgg 6420
ataaaatcaa gaaaggaaaa tcacgcttga tagaggctag tagcttgaat gactctgtct 6480
accttagaat gacttttggg cacctttacg aggtgtttca tgccaaccct ggcactgtga 6540
ctggctcagc agtgggttgc aacccggacg tgtttgggag caaactaccg attctgctgc 6600
ctgggtcact ctttgccttt gactactcag gatacgatgc tagtctcagc ccggtatggt 6660
tcagggctct agaagttgtg ttacgggaga ttgggtattc agaggaggcc gtgtccctaa 6720
tagaagggat caaccacacc caccatgtgt accggaacaa aacatactgt gtacttggtg 6780
gaatgccctc gggatgttct ggtacttcca tctttaatac aatgatcaac aacatcatca 6840
ttagaaccct tttgatcaaa acctttaagg gaatagacct ggatgagttg aacatggtgg 6900
cctatgggga cgatgtgctg gctagttacc cctttcccat tgattgcctt gagttggcta 6960
agactggcaa agagtatggt ttgaccatga cacctgcaga caaatcaccc tgtttcaatg 7020
aagtaacatg ggaaaatgct accttcctga agagaggatt cttgccagac caccaatttc 7080
cattcttaat tcaccctacg atgcccatga gtgagatccg tgagtccatt cgatggacta 7140
aagacgcgcg caacacccaa gatcacgtgc gctccctgtg tctgttggca tggcacaatg 7200
gtaaggatga atatgagaag tttgtgagtg caattagatc agttccagtt ggaaaagcgt 7260
tggccattcc taatttcgag aacctgagaa gaaattggct cgaattgttt taatattaca 7320
gcttaaagct gaaccccact agaaatctgg tcgcgttaat gactagtggg ggtaaatttg 7380
ttataaccag aatagcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 7421

<210> 3
<211> 7437
<212> ADN
<213> Virut entero 71:BS
<400> 3

ttcaaacagc ctgtgggttg cacccactca cagggcccac gtggcgctag cactctggtt 60
ctacggaacc tttgtgcgcc tgttttacgc cccttcccca atttgcaact tagaagcaat 120
acacaacact gatcaacagc aggcatggcg caccagctat gtcttgatca agcacttctg 180
tttccccgga ccgagtatca atagactgtt cacgcggttg aaggagaaag cgtccgttat 240
ccggctaact acttcgagaa acctagtaac accattgaag ctgcagagtg tttcgctcgg 300
cacttccccc gtgtagatca ggtcgatgag tcactgcaat ccccacgggt gaccgtggca 360
gtggctgcgc tggcggcctg cctatggggc aacccatagg acgctctaat gcggacatgg 420
tgcgaagagt ctattgagct agttagtggt cctccggccc ctgaatgcgg ctaatcctaa 480
ctgcggagca catgccttca atccagaggg tagtgtgtcg taatgggcaa ctctgcagcg 540
gaaccgacta ctttgggtgt ccgtgtttcc ttttattctt atattggctg cttatggtga 600
caattacaga attgttacca tatagctatt ggattggcca tccggtgtgc aatagagcta 660
ttatatacct atttgttggc tttgtaccac taaccttaaa atctataacc accctcgact 720
ttatattaac cctcaacaca gtcaagcatg ggctcacagg tgtccactca gcgatccggc 780
tcccacgaga actccaattc agctacagaa ggctccacca ttaattacac taccatcaac 840
tattacaaag actcctatgc tgcgacagcg ggcaaacaga gcctcaaaca agaccctgat 900
aagtttgcta accctgtcaa ggacattttc actgaaatgg ctgcgccact gaagtctcca 960
tccgctgaag cttgtggtta cagtgatcgc gtggcacaac tcaccattgg aaactccacc 1020
attactacac aggaggcggc aaacatcata gttggttacg gtgagtggcc ctcatactgc 1080
tctgatgacg acgctacagc ggtggacaaa ccaacgcgcc cagatgtttc agtgaatagg 1140
ttttatacac tggacactaa actgtgggaa aagtcatcca aggggtggta ttggaagttt 1200
cctgatgtgt tgactgagac cggagtcttt ggccagaacg cacagtttca ctatttgtat 1260
agatcagggt tttgcattca tgtgcaatgt aacgctagca agttccatca aggagcgctg 1320
ttagtcgcca tacttccaga gtatgttata gggacagtgg caggcggtac aggaacagag 1380
gacagccacc ctccttacaa acaaacacaa cctggcgccg acggttttga gctgcagcac 1440
ccgtacgtgc tcgatgctgg gattcctata tcacaattga cagtgtgccc ccatcaatgg 1500
attaacctgc ggaccaataa ctgtgccaca ataatagtgc catatatgaa cacactgcct 1560
ttcgactctg ccctgaacca ttgcaatttt gggctgttgg tagtgcccat tagcccatta 1620
gattttgacc aaggggcaac tccggttatc cctattacaa tcactctagc tccaatgtgc 1680
tctgagtttg caggtctcag acaggcagtc actcaaggct ttcccactga gccaaaacca 1740
ggaacgaatc aattcttgac caccgatgac ggcgtctcag cacccattct accaaatttc 1800
caccccactc catgtattca catacccggt gaagtcagaa acctgcttga gttgtgtcaa 1860
gtggagacta ttcttgaggt taacaacgta cccaccaatg ctaccagtct gatggaaagg 1920
ctacgattcc cggtgtccgc gcaagcgggg aaaggtgaat tgtgtgccgt gtttagggcc 1980
gaccctggaa gagacggtcc atggcaatca acaatgctgg gccagttgtg tggatattac 2040
acccagtggt cagggtcact ggaggtcact tttatgttta ccgggtcttt catggccaca 2100
ggtaaaatgc tcatagctta tacacctcct ggcggcccct tacccaaaga tcgggccaca 2160
gcaatgctgg gcacacatgt tatctgggat tttgggctac aatcatctgt cacccttgta 2220
ataccatgga ttagtaatac ccactacagg gcgcatgccc gggatggagt gttcgactac 2280
tataccacag gactggtcag tatctggtat caaacaaact acgtagttcc aattggggca 2340
cccaacacag cttacataat agcactagcg gcagcccaga agaattttac catgaaactg 2400

tgcaaagaca ccagtcacat attacagaca gcctccattc agggagatag ggtggcagat 2460
gtgatcgaga gctctatagg agatagtgtg agtagggcac ttacccaggc cctgccagca 2520
cccacaggtc aaaacacaca ggtgagcagt catcgactag acactggcga agttccagcg 2580
ctccaagctg ctgaaattgg ggcatcgtca aatactagtg atgagagtat gattgagaca 2640
cgatgcgttc ttaactcaca tagtacagca gagaccacct tggacagttt cttcagtagg 2700
gcaggtttgg taggagagat agatctccct cttaagggta ccaccaatcc aaatggttat 2760
gccaactggg acatagacat aactggttac gcacaaatgc gcaggaaagt ggagctgttc 2820
acctacatgc gctttgatgc ggaattcact tttgttgcgt gcactcctac tggtgaggtt 2880
gttccacaat tactccagta tatgtttgtt ccccctggtg ctcccaaacc agagtctaga 2940
gaatcacttg cttggcagac agccacaaac ccctcagtct ttgtcaagtt gactgatccc 3000
ccggcacagg tctcagttcc gttcatgtca cccgcgagcg cttaccagtg gttttacgac 3060
gggtacccca cgtttggaga acacaaacag gagaaagacc tcgagtatgg agcgtgtcct 3120
aataatatga tgggcacttt ctcggtgcga accgtggggt catcaaagtc caagtacccc 3180
ttggttgtca gaatatatat gagaatgaag catgtcaggg cgtggatacc tcgcccgatg 3240
cgcaaccaaa actatttgtt caaagccaac ccaaactatg ccggtaactc cattaaaccg 3300
accggcacta gtcgtactgc cattactacc cttggaaagt tcggccagca gtctggggcc 3360
atctacgtgg gcaacttcag agtggttaat cgtcacctcg ctactcataa tgactgggcg 3420
aacctcgtct gggaagacag ctcccgcgac ctattagtgt cgtctaccac cgctcagggc 3480
tgtgatacaa ttgcacgttg tgactgtcaa acaggagtgt actattgtaa ttccaagaga 3540
aagcactatc cagtcagctt ttctaaaccc agcctcatat atgtggaagc tagcgagtat 3600
taccctgcta gataccaatc gcacctaatg cttgcagtgg gccactctga gcccggcgac 3660
tgcggaggca tcttaaggtg tcaacatggt gtagttggta tagtgtccac gggtggcaac 3720
gggctcgttg gatttgctga tgtgagggat ctcttgtggt tagatgaaga ggccatggag 3780
caaggtgtgt ccgactacat taaggggctc ggtgatgcgt ttggaacagg cttcactgac 3840
gctgtatcca gggaagttga agcccttagg aaccacctca taggatctga tggagcagtt 3900
gagaaaatcc taaagaacct tattaagctg atttcagcgt tagtaattgt gatcaggagc 3960
gattatgata tggtcaccct cacagcaact ttagccctga ttggttgtca tggaagtcct 4020
tgggcttgga ttaaagccaa gacagcatcc attttaggta tccccatcgc ccagaagcag 4080
agtgcttctt ggctaaagaa atttaatgat atggcgagtg ctgccaaggg tttagaatgg 4140
atatccaata aaattagcaa gttcattgac tggctcaggg agaagattgt tccagcagct 4200
aaggagaaag cagaattttt aaccaatttg aagcaattgc cactattaga gaaccagatc 4260
acaaatttag agcagtccgc tgcctcacaa gaggaccttg aagctatgtt tgggaatgtg 4320
tcatacctcg cccatttctg tcgcaagttc caaccattat acgccacgga agctaagcga 4380
gtctatgttc tagagaagag aatgaacaac tacatgcagt tcaagagcaa acaccgtatt 4440
gaacctgtat gtctcatcat tagaggctca ccaggcactg gaaagtccct tgcgaccggt 4500
atcattgctc gggccatagc agacaagtat cactctagtg tgtactcact tccaccagac 4560
cctgaccatt ttgacgggta caaacagcaa gtggttacag ttatggatga tctgtgtcag 4620
aatcctgacg gcaaagacat gtcattattt tgccagatgg tgtccaccgt ggattttatc 4680
ccaccaatgg cttctctcga agaaaaggga gtttctttca catctaaatt tgttatcgca 4740
tccaccaacg ctagcaacat tatagtgcct acagtgtcag actctgacgc cattcgtcgc 4800
aggttttaca tggattgcga cattgaggtg acagactcat acaaaacaga tttgggtaga 4860
ctagacgctg gacgggctgc taagctatgc tctgagaaca acaccgcaaa cttcaaacga 4920
tgcagcccac tagtgtgtgg gaaagctatt caacttagag acaggaagtc taaggtcagg 4980
tacagcgtgg acacagtggt ctctgaactt attagagaat ataatagcag atccgctatt 5040
ggtaacacaa ttgaagcact attccaaggc ccacccaagt tcaggccaat tagaatcagt 5100
cttgaggaga agccagcccc agacgctatt ggcgatctcc tcgctagtgt agatagcgag 5160
gaagtgcgcc aatactgtag ggagcaaggc tggatcatcc ctgaaactcc caccaatgtt 5220
gaacgacacc ttaatagagc agtgctagtc atgcaatcca tcgctactgt ggtggcagtc 5280
gtctcactgg tgtacgttat ttacaagctc tttgcggggt ttcaaggtgc gtactctgga 5340
gctcccaagc aaatgctcaa gaaacctgtc ctccgtacgg caacagtgca gggtccgagt 5400
cttgactttg ctctatcctt actgagaagg aacatcaggc aagtccaaac agatcaaggg 5460
cattttacca tgttaggtgt cagagatcgc ttagccgttc tcccacggca ctcacagccc 5520
gggaagacta tttgggtgga gcacaaactt gtgaacatcc ttgacgcaat tgagctggtg 5580
gatgagcagg gcgttaattt ggaactcaca ttggtgacac tagatactaa tgaaaaattt 5640
agagatatca ccaagttcat tccagagacc attagcggcg ctagtgatgc aactttagtg 5700
atcaacacag aacatatgcc atcaatgttt gtcccagtgg gggacgtcgt gcagtacggg 5760
ttcttgaacc ttagtggaaa gccaactcat aggaccatga tgtacaattt ccctacaaaa 5820
gcaggacagt gtggaggtgt ggtcacatca gtcggtaaga ttgttggcat tcacattggc 5880
ggcaacgggc gccaagggtt ctgtgctggt ttgaagagga gttacttcgc aagtgtgcag 5940
ggtgagatcc aatgggtgaa gcctaacaag gaaactggta gactgaacat caatggtcca 6000
actcgcacta agctggagcc tagtgtattt catgatgtgt ttgaaggtaa taaggaacca 6060
gcagttttaa caagtaaaga ccctagattg gaggtcgact ttgaacaagc cctgttttcc 6120
aagtatgtgg gcaatgtttt acacgagccc gatgaatacg tgattcaagc tgccctccac 6180

tacgcgaatc aacttaaaca attggacata aacactagca agatgagcat ggaggaagcg 6240
tgctatggca ctgaaaacct ggaagcaata gacctctgca ctagtgccgg gtacccatac 6300
agcgcccttg gcatcaagaa aagagacatt cttgacccca caaccaggga tgtgtctaag 6360
atgaaattct atatggataa atacgggcta gacctgccat actctaccta tgtgaaggat 6420
gagcttaggt ccctggataa aatcaagaaa ggaaaatcac gcttgataga ggctagtagc 6480
ttgaatgact ctgtctacct cagaatgact tttgggcacc tttacgaggt gtttcatgcc 6540
aaccctggca ctgtgactgg ctcagcagtg ggttgcaacc cggacgtgtt ttggagcaaa 6600
ctaccgattc tgctgcctgg gtcactcttt gcctttgact actcaggata tgatgctagt 6660
ctcagcccgg tatggttcag ggctctagaa gttgtgttac gggagattgg gtattcagag 6720
gaggccgtgt ccctaataga agggatcaac cacacccacc atgtgtaccg gaacaaaaca 6780
tactgtgtac ttggtggaat gccctcggga tgttctggta cttccatctt taattcaatg 6840
atcaacaaca tcatcattag aaccctttg atcaaaacct ttaagggaat agacctggat 6900
gagttgaaca tggtggccta tggggacgat gtgctggcta gttacccctt tcccattgat 6960
tgccttgagt tggctaaaac tggcaaagag tatggtttga ccatgacacc tgcagacaaa 7020
tcaccctgtt tcaatgaagt aacatgggaa aatgctacct tcctgaagag aggattcttg 7080
ccagaccacc aatttccatt cttaattcac cctacgatgc ccatgagaga gatccgtgag 7140
tccattcgat ggactaaaga cgcgcgcaac acccaagatc acgtgcgctc cctgtgtctg 7200
ttggcatggc acaatggtaa ggatgaatat gagaagtttg tgagtgtaat tagatcagtt 7260
ccagttggaa aagcgttggc cattcctaat ttcgagaatc tgagaagaaa ttggctcgaa 7320
ttgttttaat attacagctt aaagctgaac cccactagaa atctggtcgc gttaatgact 7380
agtgggggta aatttgttat aaccagaata gcaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 7437
<210> 4
<211> 63
<212> ADN
<213> Virut entero 71
<400> 4
ctagggatcc taatacgact cactataggt tcaaacagcc tgtgggttgc acccactcac 60
agg 63
<210> 5
<211> 54
<212> ADN
<213> Virut entero 71
<400> 5
ctaggacgtc cggccgaact ttccaagggt agtaatggca gtacgactag tgcc 54
<210> 6
<211> 38
<212> ADN
<213> Virut entero 71
<400> 6
taataagctt cggccggcag tctggggcca tctacgtg 38
<210> 7
<211> 61
<212> ADN
<213> Virut entero 71
<400> 7
gcgcggatcc tttttttttt tttttttttt gctattctgg ttataacaaa tttacccccca 60
c 61
<210> 8
<211> 58
<212> ADN
<213> Virut entero 71
<400> 8
ggtgtccact caacgcgtcg gctcccacga gaactccaat tcagctacag aaggctcc 58
<210> 9
<211> 45
<212> ADN
<213> Virut entero 71
<400> 9
caagcatggg ctcacaggtg tccactcaac gcgtcggctc ccacg 45
<210> 10
<211> 48
<212> ADN
<213> Virut entero 71

<400> 10
actcaacgcg tcggctccca cgagaactcc aattcagcta cagaaggc 48
<210> 11
<211> 49
<212> ADN
<213> Virut entero 71
<400> 11
actgccggcc gaactttcca agggtagtaa tggcagtacg actagtgcc 49
<210> 12
<211> 44
<212> ADN
<213> Virut entero 71
<400> 12
cagaggacac ccaccctcct tacaaacaaa cacaacctgg cgcc 44
<210> 13
<211> 34
<212> ADN
<213> Virut entero 71
<400> 13
ggagggtggg tgtcctctgt tcctgtaccg cctg 34
<210> 14
<211> 33
<212> ADN
<213> Virut entero 71
<400> 14
ctccttacat acaaacacaa cctggcgccg acg 33
<210> 15
<211> 38
<212> ADN
<213> Virut entero 71
<400> 15
tgtgtttgta tgtaaggagg gtggctgtcc tctgttcc 38
<210> 16
<211> 46
<212> ADN
<213> Virut entero 71
<400> 16
ctccctcttg agggtaccac caatccaaat ggttatgcca actggg 46
<210> 17
<211> 45
<212> ADN
<213> Virut entero 71
<400> 17
tggtaccctc aagagggaga tctatctctc ctaccaaacc tgccc 45
<210> 18
<211> 52
<212> ADN
<213> Virut entero 71
<400> 18
ctactggtgc ggttgttcca caattactcc agtatatgtt tgttcccccct gg 52
<210> 19
<211> 43
<212> ADN
<213> Virut entero 71
<400> 19
ggaacaaccg caccagtagg agtgcacgca acaaaagtga att 43
<210> 20
<211> 36
<212> ADN
<213> Virut entero 71
<400> 20
agagaatcat ttgcttggca gacagccaca aacccc 36
<210> 21

<211> 40
<212> ADN
<213> Virut entero 71
<400> 21
gccaagcaaa tgattctcta gactctggtt tgggagcacc 40
<210> 22
<211> 34
<212> ADN
<213> Mus musculus
<400> 22
attaggatcc gtctttcaga aggcggtaga ccag 34
<210> 23
<211> 43
<212> ADN
<213> Mus musculus
<400> 23
tataaagctt cgacacgcca gccacgtgaa aaccaagcca aag 43