



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0049302
(51)^{2020.01} C12N 7/00; C12R 1/93; A61K 39/17; (13) B
A61P 31/14
-

- (21) 1-2021-05221 (22) 07/05/2020
(86) PCT/CN2020/088921 07/05/2020 (87) WO 2021/103421 A1 03/06/2021
(30) 201911182037.X 27/11/2019 CN
(45) 25/07/2025 448 (43) 25/11/2021 404A
(73) YEBIO BIOENGINEERING CO., LTD. OF QINGDAO (CN)
No. 21, Aodongnan Road, Hongdao Economic Development District, Qingdao,
Shandong, 266114, China
(72) SUN, Hualu (CN); CHU, Dianfeng (CN); YU, Xiaolu (CN); SUN, Peng (CN); HOU,
Yuchao (CN); LI, Zhen (CN); FAN, Gencheng (CN); DU, Yuanzhao (CN).
(74) Công ty TNHH Sở hữu trí tuệ Trần & Trần (TRAN & TRAN CO., LTD.)
-

- (54) CHŨNG VIRUT GÂY BỆNH NEWCASTLE CÓ KIỂU GEN VII ĐÃ GIẢM ĐỘC
LỰC VÀ VACXIN BAO GỒM CHŨNG NÀY

(21) 1-2021-05221

(57) Sáng chế đề cập đến chủng virus gây bệnh Newcastle có kiểu gen VII đã giảm độc lực và việc sử dụng nó; chủng này được phân lập tự nhiên và không được biến nạp bằng cách biến đổi gen bất kỳ, do đó giữ lại tính sinh miễn dịch tự nhiên của virus như chủng gây dịch bệnh. Số lưu giữ của chủng đã giảm độc lực này là CCTCC V201968. Chủng virus gây bệnh Newcastle có kiểu gen VII đã giảm độc lực có thể được sử dụng để bào chế vaccin.

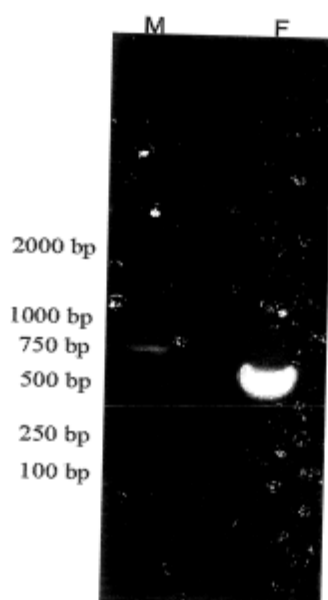


Fig.1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực sinh học phân tử và miễn dịch học của virus gây bệnh trên động vật, và cụ thể là chủng virus gây bệnh Newcastle có kiểu gen VII đã giảm độc lực và việc sử dụng chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh Newcastle (Newcastle Disease, ND) là một loại bệnh truyền nhiễm có mức độ lây lan cao, cấp tính và khởi phát đột ngột và dữ dội do virus gây bệnh Newcastle (Newcastle Disease Virus, NDV) gây ra, ảnh hưởng nghiêm trọng đến ngành công nghiệp chăn nuôi gia cầm trên toàn thế giới. Hệ gen của virus này là ARN sợi đơn, nghĩa âm, và có thể tồn tại trong nhiều vật chủ; gà là động vật dễ nhiễm virus này nhất; hơn thế nữa, tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ chết ở gà con cao hơn nhiều so với gà trưởng thành; và bệnh này thường xảy ra trong cả năm. NDV chỉ có duy nhất một kiểu huyết thanh, và có thể được chia thành nhóm lớp I và nhóm lớp II bằng phân tích tiến hóa di truyền gen F. Nhóm lớp I được chia thành 18 kiểu gen mà hầu hết đều chứa các chủng có độc lực và các chủng gây dịch bệnh.

Vacxin là biện pháp kinh tế và hiệu quả nhất để phòng ngừa và kiểm soát các bệnh truyền nhiễm. Từ khi ND xuất hiện, vacxin bất hoạt được sử dụng đầu tiên nhưng vacxin này bị hạn chế bởi chi phí sản xuất cao, hiệu quả miễn dịch niêm mạc và tế bào thấp, và yếu tố tương tự. Khi càng nhiều chủng đã giảm độc lực được phân lập, tỷ lệ sử dụng vacxin sống ngày càng tăng. Hiện nay, chủng La Sota và phần lớn các chủng khác chủ yếu được sử dụng để phòng ngừa và kiểm soát ND ở

Trung Quốc là các chủng có kiểu gen II, chủng có kiểu gen II này có khoảng cách di truyền lớn so với chủng có kiểu gen VII, và tính bảo vệ chéo kháng nguyên thấp hơn và theo đó, không thể cung cấp tác dụng bảo vệ đầy đủ đối với các chủng NDV gây dịch bệnh có kiểu gen VII. Vì các chủng NDV thịnh hành có kiểu gen VII được phân lập từ các giải pháp đã biết thường là các chủng có độc lực nên các chủng có độc lực này có thể sản xuất kháng thể nhanh chóng, nhưng gà được gây miễn dịch có khả năng gặp phải chứng biếng ăn, giảm đẻ trứng, mang virus và làm lây lan virus và các phản ứng bất lợi khác, mà có hại cho môi trường sinh thái. Do đó, việc thu được chủng đã giảm độc lực có kiểu gen VII là chìa khóa giúp bào chế vaccin. Biện pháp thu được chủng đã giảm độc lực trong giải pháp đã biết chủ yếu là biến nạp chủng có độc lực bằng kỹ thuật di truyền ngược; và thông qua việc cải biến gen, chủng virus tái tổ hợp thu được có nguy cơ đảo ngược độc lực, và rất khó để giảm độc lực hoàn toàn.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chủng virus gây bệnh Newcastle (Newcastle Disease Virus, NDV) có kiểu gen VII đã giảm độc lực và việc sử dụng nó. Chủng này được phân lập tự nhiên, và không được biến nạp bằng cách biến đổi gen bất kỳ và do đó, giữ lại tính sinh miễn dịch tự nhiên của virus như chủng gây dịch bệnh.

Theo phương án đầu tiên, sáng chế đề xuất chủng virus gây bệnh Newcastle (NDV) có kiểu gen VII đã giảm độc lực, sau đây được đề cập là: chủng NDVVII; và chủng này được lưu giữ vào ngày 15 tháng 10 năm 2019 tại Trung tâm sưu tập chủng giống Trung Quốc (China Center For Type Culture Collection, CCTCC) nằm tại Đại học Vũ Hán, và số lưu trữ: CCTCC V201968.

Theo phương án thứ hai, sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng đã giảm độc lực nêu trên, cụ thể là chủng virus gây bệnh Newcastle (NDV) có kiểu gen VII (chủng NDV VII) đã giảm độc lực phân lập được có thể được sử dụng trong bào chế vaccin.

Tùy ý, vaccin nêu trên là vaccin sống.

Theo phương án thứ ba, sáng chế đề xuất vaccin, trong đó kháng nguyên là chủng virus gây bệnh Newcastle (NDV) có kiểu gen VII đã giảm độc lực nêu trên, nghĩa là, chủng NDV VII.

Theo phương án thứ tư, sáng chế đề xuất gen F của chủng NDV VII; và trình tự nucleotit của nó là SEQ ID No.1; và protein được mã hóa bởi trình tự nucleotit này có trình tự axit amin là SEQ ID No.2.

Theo phương án thứ năm, sáng chế đề xuất hệ gen tổng thể của chủng NDV VII; và trình tự nucleotit của nó là SEQ ID No.3.

Chủng đã giảm độc lực này được cấy truyền liên tiếp ở phôi gà qua 20 lần cấy truyền; và thời gian chết trung bình (Mean Death Time, MDT) của nó lớn hơn 120 giờ; và không có sự đột biến trên trình tự axit amin ở vị trí phân cắt của gen F.

Chủng NDV VII theo sáng chế được phân lập tự nhiên; và thời gian chết trung bình (MDT) của chủng này trên phôi gà ở liều gây chết tối thiểu là 138 giờ; gà 1 ngày tuổi có chỉ số gây bệnh đường não (Intracerebral Pathogenicity Index, ICPI) là 0,16; và gà 6 tuần tuổi có chỉ số gây bệnh đường tĩnh mạch (Intravenous Pathogenicity Index, IVPI) là 0 trên cánh. Chủng này có tính di truyền ổn định; sau khi chủng này được cấy truyền liên tục ở phôi gà qua 20 lần cấy truyền, gen F không có đột biến làm tăng khả năng gây bệnh. Chủng dùng để bào chế vaccin

truyền thống, chủng La Sota, được kiểm tra so sánh hiệu lực bảo vệ miễn dịch để chứng minh rằng sau khi chủng này tạo ra vaccin sống để gây miễn dịch, mức sản sinh kháng thể cao hơn so với nhóm đối chứng; và sau khi gây miễn dịch, thử nghiệm thử thách đã chứng minh rằng chủng này có thể cung cấp sự bảo vệ đầy đủ cho gà.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện kết quả xác định bằng PCR đoạn F của chủng NDV VII;

Fig.2 thể hiện điện di đồ khuếch đại bằng PCR của 9 đoạn trong hệ gen tổng thể của chủng NDV VII;

Fig.3 thể hiện cây phát sinh chủng loại dựa trên cơ sở gen F.

Mô tả chi tiết sáng chế

Giải pháp kỹ thuật của sáng chế sẽ được thể hiện chi tiết dựa vào các phương án cụ thể. Tuy nhiên, cần hiểu rằng một phương án bất kỳ cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các cách hoặc biện pháp khác có thể được dự định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này, ví dụ trong trường hợp không có thông báo thêm; cách hoặc biện pháp không bị giới hạn ở việc thay đổi các thông số thử nghiệm, thay thế các chất thử được sử dụng trong thử nghiệm, và hoạt động tương tự. Vaccin theo sáng chế có thể được bào chế bằng phương pháp thông thường trong lĩnh vực bào chế vaccin, chứ không chỉ bị giới hạn ở phần mô tả cụ thể trong các phương án của sáng chế. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể thực hiện sáng chế bằng các phương pháp thông thường khác.

Các nguyên liệu sinh học được sử dụng trong sáng chế: vaccin sống LaSota và chủng NVD có độc lực với kiểu gen VII, JS 02/06, được cung cấp bởi Yebio

Bioengineering Co., Ltd. ở Thanh Đảo; huyết thanh tiêu chuẩn dương tính ND và AI kiểu phụ H5, H7, H9 được mua từ Viện quản lý thuốc thú y Trung Quốc (China Institute of Veterinary Drug Control).

Phương án 1: Sàng lọc chủng NDV đã giảm độc lực và xác định MDT, ICPI, và IVPI

Chủng NDV nghiên cứu được phân lập từ mẫu lâm sàng của gà từ một vùng nhất định của tỉnh Sơn Đông vào tháng 4 năm 2019, và được đặt tên là chủng NDV VII. Phôi gà được chủng virus để thu gom dịch niệu nang nhằm xác định hiệu giá HA. Sau khi chủng này được cấy truyền liên tục qua 20 lần cấy truyền, kết quả xác định hiệu giá HA đã cho thấy rằng hiệu giá HA của dịch niệu nang ở phôi gà ổn định ở $9 \log_2$ sau khi chủng này được cấy truyền trên phôi gà qua 4 lần cấy truyền. Dịch niệu nang sau khi thu hoạch được đem đi thực hiện thử nghiệm ức chế ngưng kết vi hồng cầu (Hemagglutination Inhibition, HI), và kết quả đã thể hiện rằng mẫu dịch niệu nang chỉ phản ứng với huyết thanh tiêu chuẩn dương tính ND; và các phản ứng với các huyết thanh dương tính H5, H7, và H9 cho thấy kết quả âm tính.

Cụ thể hơn là, các mẫu mô của gà khỏe mạnh được tách ra và được gửi đi từ một số trang trại nuôi gia cầm nhất định ở tỉnh Sơn Đông vào tháng 4 năm 2019; mô phế quản, gan, tim, đường ruột và các mô khác của gà được thu lấy và được bổ sung PBS chứa bốn kháng sinh có độ pH = 7,2 (Penixilin 10000 IU/ml, Streptomycin 10 mg/ml, Geamixin 250 μ g/ml, Kanamycin 250 μ g/ml), và được nghiền nhỏ. Các nguyên liệu đã trộn nện trên được ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 8000 vòng/phút; 0,2 ml dịch nổi được lấy ra và chủng vào phôi gà SPF 9-10 ngày tuổi; sau đó phôi gà chết trong vòng 24 giờ sẽ được bỏ đi, và dịch niệu nang của

phôi gà được thu gom sau khi 96 giờ để xác định hiệu giá HA. Dịch niệu nang có hiệu giá được pha loãng hai lần, và chủng vào nguyên bào sợi của phôi gà (Chicken Embryo Fibroblast, CEF) để tinh chế bằng dòng vô tính tạo vết tan trong 3 lần; phôi gà được chủng thêm một lần nữa; dịch niệu nang của phôi gà được thu gom 96 giờ sau đó để xác định hiệu giá HA; kết quả đã cho thấy rằng khi chủng virut này được cấy truyền trên phôi gà qua 4 lần cấy truyền sau khi được tinh chế, hiệu giá HA của dịch niệu nang có thể ổn định ở $9 \log_2$; sau đó chủng này được thu lấy và lưu giữ. Dịch niệu nang sau khi thu hoạch được đem đi thực hiện thử nghiệm ức chế ngưng kết vi hồng cầu (HI), và kết quả đã thể hiện rằng mẫu dịch niệu nang chỉ phản ứng với huyết thanh tiêu chuẩn dương tính ND; và các phản ứng với các huyết thanh dương tính H5, H7, và H9 cho thấy kết quả âm tính.

Trong sáng chế, cụm từ đầy đủ của MDT là thời gian chết trung bình, cụm từ đầy đủ của ICPI là chỉ số gây bệnh đường não, và cụm từ đầy đủ của IVPI là chỉ số gây bệnh đường tĩnh mạch.

MDT chỉ thời gian trung bình mà liều gây chết tối thiểu làm chết phôi gà, khi MDT thấp hơn 60 giờ, thì chủng là chủng NDV có độc lực; khi MDT trong vòng 60 giờ~90 giờ, thì chủng là chủng có độc lực trung bình; và khi MDT lớn hơn 90 giờ, thì chủng là chủng đã giảm độc lực. Dịch niệu nang mới thu hoạch mang virut được pha loãng bằng dung dịch nước muối vô trùng với bậc pha loãng là 10; 4 mức pha loãng 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} và 10^{-9} được thực hiện, và lần lượt được chủng vào phôi gà SPF 10 ngày tuổi, 5 phôi gà được chủng đối với mỗi mức pha loãng, và 0,1 ml được tiêm vào niệu nang của mỗi phôi. Các phôi gà được quan sát liên tục trong 7 ngày, và chiếu xạ một lần vào mỗi buổi sáng và buổi chiều, ghi lại thời gian chết

của mỗi phôi gà (các kết quả được thể hiện trong bảng 1). Công thức tính MDT là:

$$\text{MDT} = \frac{\text{Số lượng phôi chết trong vòng X giờ} \times \text{X giờ} + \text{Số lượng phôi chết trong vòng Y giờ} \times \text{Y giờ}}{\text{Tổng số lượng phôi chết}}$$

Phép kiểm tra xác định chỉ số gây bệnh đường não (ICPI) ở gà SPF 1 ngày tuổi: 10 con gà SPF 1 ngày tuổi được lấy, 5 con gà được tiêm 0,05 ml dịch niệu nang mang virus mới được pha loãng 10 lần bằng nước muối đệm phosphat (Phosphate Buffer Saline, PBS) bằng cách tiêm trong não; và 5 con gà còn lại được tiêm cùng liều lượng PBS vô trùng theo cùng phương pháp như các nhóm đối chứng. Sau khi chủng, các con gà được quan sát liên tục trong 8 ngày, quan sát và ghi lại tình trạng của gà ở các thời điểm chủng tương ứng theo ngày, chia thành tình trạng bình thường (hoạt bát, và không có hiện tượng mất điều hòa), bệnh tấn công (bao gồm liệt, nằm trên sàn, nhưng loại trừ gà chỉ có biểu hiện lơ đãng) và chết; các kết quả được thể hiện trong bảng 2.

$$\text{ICPI} = \frac{\text{Tỷ lệ mắc bệnh cộng dồn trong vòng 8 ngày} \times 1 + \text{Tỷ lệ chết cộng dồn trong vòng 8 ngày} \times 2}{\text{Tổng cộng gà được quan sát trong vòng 8 ngày}}$$

Phép kiểm tra xác định chỉ số gây bệnh đường tĩnh mạch (IVPI) ở gà SPF 6 tuần tuổi: PBS được sử dụng để pha loãng dịch niệu nang mới gây nhiễm trong 10 lần, 10 con gà SPF 6 tuần tuổi được lấy, trong đó 5 con gà được chủng trong tĩnh mạch trên cánh bằng 0,1 ml; và 5 con gà còn lại được tiêm cùng liều lượng PBS vô trùng theo cùng phương pháp như các nhóm đối chứng. Các con gà này được quan sát liên tục trong 10 ngày sau khi chủng để quan sát và ghi lại tình trạng của gà ở các thời điểm chủng tương ứng theo ngày, chia thành tình trạng bình thường

(hoạt bát, và không có hiện tượng mất điều hòa), bệnh tấn công (bao gồm liệt, nằm trên sàn, nhưng loại trừ gà chỉ biểu hiện lờ đờ) và chết; các kết quả được thể hiện trong bảng 3.

(Tỷ lệ mắc bệnh cộng dồn trong vòng 10 ngày $\times$ 1 + Số lượng cộng dồn của gà bị liệt trong vòng 10 ngày $\times$ 2 + Tỷ lệ chết cộng dồn trong vòng 10 ngày $\times$ 3)

$$IVPI = \frac{\text{Tổng cộng gà được quan sát trong vòng 10 ngày}}{\text{IVPI=}}$$

Bảng 1: Xác định MDT của chủng NDV VII

	Thời gian	24	48	72	96	120	144	168
	Mức pha loãng	giờ	giờ	giờ	giờ	giờ	giờ	giờ
Chủng NDVVII	10^{-7}	0	0	0	0	1	2	0
	10^{-8}	0	0	0	0	0	1	0
	10^{-9}	0	0	0	0	0	0	0

Bảng 2: Xác định ICPI của chủng NDV VII

	Tình trạng của gà được chủng	Ngày sau khi chủng vaccin								Tổng số	Trọng lượng	Tổng điểm
		1	2	3	4	5	6	7	8			
Chủng NDVVII	Bình thường	10	10	10	10	10	8	6	5	69	0	0
	Bệnh tấn công	0	0	0	0	0	2	2	2	6	1	6
	Chết	0	0	0	0	0	0	2	1	3	2	6
	Được quan sát	10	10	10	10	10	10	8	7	75		12

Bảng 3: Xác định IVPI của chủng NDV VII

Tình trạng của gà	Ngày sau khi chủng vaccin	Tổng	Trọng	Tổng
-------------------	---------------------------	------	-------	------

được chủng	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	số	lượng	điểm
Bình thường	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100	0	0
Bệnh tấn công	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Liệt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chết	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Được quan sát	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	100		0

Bảng 1-3 đã thể hiện rằng MDT của chủng NDV VII là 138 giờ; ICPI là 0,16, IVPI là 0, phù hợp với các đặc tính của NDV đã giảm độc lực, điều đó chứng minh rằng chủng NDV VII được phân lập ở thời điểm này là chủng đã giảm độc lực.

Chủng NDV có kiểu gen VII đã giảm độc lực, nghĩa là chủng NDV VII, được sàng lọc ở thời điểm này được lưu giữ vào ngày 15 tháng 10 năm 2019 tại CCTCC ở Trường đại học Vũ Hán, và số lưu giữ: CCTCC V201968.

Phương án 2: Xác định gen F và cây phát sinh chủng loại của chủng NDV VII

Các đoạn môi được thiết kế theo gen F của NDV được công bố bởi NCBI; môi ngược: NDV F-F: ATGGGCTCCAAACCTTCTACCAG; và môi xuôi: NDV F-R: AAAGTGCTGCATCTTCCCAACCG, sau đó tiến hành việc xác định khuếch đại đoạn F của chủng NDV VII, và đoạn đích này có khoảng 550 cặp bazơ (base pair, bp). 200 µl dịch niệu nang được thu hoạch bằng cách cấy truyền trên phôi gà được lấy để chiết ARN theo phương pháp thông thường; ARN được phiên mã ngược; và trình tự nucleotit của đoạn gen F là SEQ ID No.1; và trình tự axit amin của protein được mã hóa bởi trình tự nucleotit này là SEQ ID No.2. Phép điện di axit nucleic được tiến hành (kết quả được thể hiện trên Fig.1); các băng dương tính được cắt để thu hồi và liên kết với vector T để đọc trình tự. Trình tự nằm giữa nucleotit 47 đến nucleotit 420 của gen F được lấy để vẽ cây phát sinh chủng loại,

và kết quả được thể hiện trên Fig.3.

Các kết quả đã thể hiện rằng chủng NDV VII phân lập được thuộc về phân nhóm lớp II; và chủng NDV có kiểu gen VII thuộc về cùng nhánh tiến hóa với các chủng gây dịch bệnh từ nhiều nơi ở Trung Quốc trong các năm gần đây, và thuộc về phân nhóm VIIId.

Phương án 3: Xác định trình tự của hệ gen tổng thể của chủng NDV VII

Theo trình tự gen của NDV được công bố bởi NCBI, 9 cặp đoạn mồi được thiết kế; và các trình tự nucleotit một phần của các đoạn liền kề được khuếch đại bị chồng lấn lên nhau. Các đoạn mồi này được tổng hợp bởi Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd. và các trình tự được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4: Trình tự của đoạn mồi khuếch đại hệ gen tổng thể của chủng NDV VII

Tên đoạn mồi	Trình tự của đoạn mồi (5' đến 3')	Số lượng bazơ (bp)	Kích thước sản phẩm (bp)
NDV1-F	ACCAAACAGAGAATCCGTGAGTTAC	25	2227
NDV1-R	AGTTGCTTGCTCCAGTCTTG	20	
NDV2-F	CTAAGCACAGCATGGGAGAAG	21	1408
NDV2-R	AAGTCAAGACGCTGGATCCT	20	
NDV3-F	CACAGGAGATGGGAAGAAGC	20	1955
NDV3-R	ATGAGCTGAGTTGATTGTTCC	21	
NDV4-F	CAGTTGGGAAGATGCAGCAG	20	1798
NDV4-R	AGAGGGATAGAATGATGTGAC	21	
NDV5-F	CCTGTTCATGACCCAGACTAC	21	1734
NDV5-R	TCGAAGTCACATTCATCAGG	20	
NDV6-F	AGCACCAGATCATCCTACCAG	21	2263
NDV6-R	TCTGATCTTACCTCTCTCGTT	21	

NDV7-F	CAATCCAACCTTGCTGCAGC	19	1888
NDV7-R	TCGAAAGGAACCGCAACAG	19	
NDV8-F	TCTTTCCAATGACAACAACC	20	2230
NDV8-R	GACCGGATAACTGTGTCAAT	20	
NDV9-F	CGTCGTGTAACAAGATATCCT	20	793
NDV9-R	ACCAAACAAAGATTTGGTG	19	

ARN của virus được chiết bằng phương pháp chiết bằng cột thông thường; các đoạn ngẫu nhiên được phiên mã ngược, và các đoạn nêu trên được khuếch đại PCR; và các kết quả khuếch đại điện di của các đoạn được khuếch đại được thể hiện trên Fig.2. Đoạn đích này được cắt dán (glue cutting) để thu hồi, sau đó liên kết với vector PMD 19-T để biến nạp và đọc trình tự, và trình tự này được so sánh trên trang web NCBI và được ghép nối bằng phần mềm Lasergene, theo đó thu được trình tự của hệ gen tổng thể của chủng NDV VII (SEQ ID No.3).

Gen F có chiều dài đầy đủ là 1662 bp; trình tự axit amin ở vị trí phân cắt là $^{112}\text{G-R-Q-G-R-L}^{117}$, phù hợp với các đặc tính của chủng đã giảm độc lực tại vị trí phân cắt.

Theo trình tự SEQ ID No.3, có thể thấy rằng hệ gen của chủng NDV VII có chiều dài đầy đủ là 15186 bp, không phù hợp với chiều dài đầy đủ (15192 bp) của hệ gen của NDV có kiểu gen VII được phân lập thông thường. Chủng NDV VII này được cho là đã được tái tổ hợp trong quá trình gây dịch bệnh lâm sàng thời gian dài, và cuối cùng tạo ra tính di truyền ổn định. Các đặc tính về axit amin tại vị trí phân cắt của gen F của virus có mối quan hệ chặt chẽ với độc lực. Theo trình tự hệ gen tổng thể, có thể thấy rằng trình tự axit amin của gen F của chủng này tại vị trí phân cắt là $^{112}\text{G-R-Q-G-R-L}^{117}$, phù hợp với các đặc tính chung của vị trí phân

cắt của chủng đã giảm độc lực, điều này thể hiện rằng chủng NDV VII phân lập được có đặc tính độc lực giảm.

Phương án 4: Kiểm tra độ ổn định khi cấy truyền chủng NDV VII trên phôi gà

Chủng NDV VII được thí nghiệm cấy truyền liên tiếp trên phôi gà, và cứ qua 5 lần cấy truyền, MDT và ICPI của virus được xác định, và gen F được đọc trình tự để phân tích trình tự axit amin tại vị trí phân cắt, và chủng này được cấy truyền đến lần cấy truyền thứ 20. Các kết quả đã cho thấy rằng sau khi được cấy truyền liên tục qua 20 lần cấy truyền, MDT của chủng này luôn lớn hơn 120 giờ; không có đột biến về trình tự axit amin của gen F tại vị trí phân cắt, điều đó thể hiện rằng chủng này có thể là chủng virus tái tổ hợp tự nhiên, nhưng chủng này có tính chất di truyền ổn định; do đó, chủng này thích hợp làm chủng dự tuyển cho vaccine (Bảng 5).

Bảng 5: MDT và vị trí phân cắt của gen F của chủng NDV VII

Số lần cấy truyền	MDT	Trình tự axit amin của gen F tại vị trí phân cắt
Cấy truyền lần thứ 5	138 giờ	¹¹² G-R-Q-G-R-L ¹¹⁷
Cấy truyền lần thứ 10	140 giờ	¹¹² G-R-Q-G-R-L ¹¹⁷
Cấy truyền lần thứ 15	135 giờ	¹¹² G-R-Q-G-R-L ¹¹⁷
Cấy truyền lần thứ 20	133 giờ	¹¹² G-R-Q-G-R-L ¹¹⁷

Phương án 5: Kiểm tra độ ổn định trong thời gian bảo quản của chủng NDV VII

Dịch niệ nang chứa virus (EID₅₀ là 10^{9,17}/0,1 ml) thuộc chủng NDV VII mới thu hoạch được cấy truyền qua 20 lần cấy truyền được chia đều thành một vài phần, và được đặt ở -80°C để bảo quản, sau đó lần lượt lấy ra ở các thời điểm ngày thứ 1, ngày thứ 7, ngày thứ 14, ngày thứ 28 và tháng thứ 2, tháng thứ 4, và tháng thứ 6

của thời gian bảo quản, và rã đông ở 4°C để xác định hiệu giá HA; đồng thời, 0,1 ml dịch niệu nang được chủng vào mỗi con gà SPF 9~11 ngày tuổi, và nuôi cấy đến 120 giờ 37°C, sau đó dịch niệu nang được thu gom để xác định hiệu giá HA, do đó xác định độ ổn định của virus trong thời gian bảo quản.

Các kết quả cho thấy rằng khi dịch niệu nang chứa virus được giữ trong 6 tháng ở -80°C, HA giảm không đáng kể; dịch niệu nang được thu hoạch sau khi được cấy truyền qua 21 lần cấy truyền có HA giảm không đáng kể, điều đó chứng tỏ rằng virus được cấy truyền tương đối ổn định ở -80°C, và có thể được giữ trong ít nhất 6 tháng (Bảng 6).

Bảng 6: Kết quả xác định HA của chủng NDV VII trong thời gian bảo quản

Thời gian bảo quản	1 ngày	7 ngày	14 ngày	28 ngày	2 tháng	4 tháng	6 tháng
HA sau khi được cấy truyền qua 20 lần cấy truyền	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂	8log ₂	8log ₂
HA sau khi được cấy truyền qua 21 lần cấy truyền	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂

Phương án 6: Bào chế vaccin sống chứa chủng NDV VII, kiểm tra độ an toàn và kiểm tra độ vô trùng

Sữa gầy 5% sucroza được bổ sung vào dịch niệu nang đã pha loãng theo tỷ lệ 1:1, trong đó virus sau khi được pha loãng định lượng có hàm lượng 10^{7,0}EID₅₀/0,1 ml, và được trộn kỹ đồng đều và đông khô để thu được vaccin sống đông khô, theo đó bảo quản vaccin này; và vaccin sống đông khô được pha loãng bằng dung dịch PBS khi được sử dụng. Vaccin sống đã bào chế được kiểm tra độ vô trùng theo phụ

lục của Dược điển thú y Trung Quốc (*Chinese Veterinary Pharmacopoeia*) phiên bản 2010; và kết quả thu được phù hợp với tiêu chuẩn và không nhiễm vi khuẩn.

10 con gà SPF 1-3 ngày tuổi được chia 5 con vào nhóm thử nghiệm 5 con và 5 con vào nhóm đối chứng; mỗi con trong nhóm thử nghiệm được gây miễn dịch bằng dung dịch chứa virus nồng độ $10^{7.0} \text{EID}_{50}$; và nhóm đối chứng được gây miễn dịch bằng PBS vô trùng với cùng thể tích; và cách gây miễn dịch là chủng vaccin trong mắt-mũi. Các con gà này được nuôi trong cùng điều kiện, và quan sát liên tục trong 14 ngày để ghi lại việc ăn uống, uống nước và biểu hiện lâm sàng của gà nghiên cứu. Các kết quả đã cho thấy rằng gà được gây miễn dịch ở nhóm thử nghiệm giống như nhóm đối chứng, đều không bị sút kém, biếng ăn, lơ đãng, liệt, và các phản ứng có hại của toàn bộ cơ thể; gà khỏe mạnh, điều đó chứng minh rằng vaccin sống NDV VII đã bào chế là an toàn.

Phương án 7: Đánh giá hiệu quả miễn dịch của vaccin sống của chủng NDV VII

30 con gà SPF 21 ngày tuổi được chia thành 3 nhóm, 10 con mỗi nhóm, trong đó nhóm đầu tiên là nhóm dùng vaccin sống đông khô của chủng NDV VII, nhóm thứ hai là nhóm dùng vaccin sống của chủng LaSota, và nhóm thứ ba là nhóm đối chứng dùng PBS; mỗi con được gây miễn dịch bằng cách chủng trong mắt-mũi 0,1 ml; sau khi gây miễn dịch, gà trong mỗi nhóm được nuôi riêng, và mẫu máu được thu gom lần lượt ở các thời điểm ngày thứ 14, ngày thứ 21, và ngày thứ 28 sau khi gây miễn dịch, theo đó xác định các kháng thể. Sau khi thu gom các mẫu máu ở 28 ngày, gà được chủng bằng chủng vaccin của chủng JS 02/06 có độc lực và có kiểu gen VII bằng cách chủng vaccin trong mắt-mũi với liều $10^6 \text{EID}_{50}/\text{con}$; và nuôi trong lồng cách ly và quan sát trong 14 ngày, ghi lại tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ chết

của gà hằng ngày; vào ngày thứ ba và thứ năm sau khi chủng vaccin, que ngoáy họng và que ngoáy ổ nhóp gà ở mỗi nhóm được gây miễn dịch lần lượt được thu gom và chủng lên các phôi để xác định điều kiện lấy ra virus.

Các kết quả đã cho thấy rằng nhóm đầu tiên và nhóm thứ hai có thể sản xuất kháng thể ở mức cao hơn sau 14 ngày gây miễn dịch, và mức kháng thể ở ngày thứ 21 và ngày thứ 28 sau khi gây miễn dịch; và các kết quả được thể hiện trong bảng 7. Sau khi thử thách bằng cách chủng vaccin, không có con gà nào trong nhóm đầu tiên và nhóm thứ hai bị chết, và tất cả gà trong nhóm thứ ba bị chết. Thử nghiệm lấy ra virus đã cho thấy rằng không có virus được lấy ra ở nhóm đầu tiên; virus được lấy ra từ thanh khí quản và ổ nhóp vào ngày thứ 5 ở nhóm thứ hai, như được thể hiện trong bảng 8 và bảng 9.

Bảng 7: Danh sách xác định các hiệu giá kháng thể ở gà được gây miễn dịch

Nhóm	Số	Xác định hiệu giá kháng thể									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Chủng NDV VII	14 ngày	5log ₂	6log ₂	5log ₂	5log ₂	5log ₂	5log ₂	5log ₂	6log ₂	6log ₂	6log ₂
	21 ngày	7log ₂	7log ₂	6log ₂	7log ₂	7log ₂	6log ₂	7log ₂	7log ₂	7log ₂	7log ₂
	28 ngày	9log ₂	9log ₂	8log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂	8log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂
Vaccin sống LaSota	14 ngày	5log ₂	5log ₂	4log ₂	5log ₂	5log ₂	5log ₂	5log ₂	5log ₂	5log ₂	5log ₂
	21 ngày	6log ₂	7log ₂	6log ₂	7log ₂	7log ₂	6log ₂	7log ₂	7log ₂	6log ₂	6log ₂
	28 ngày	8log ₂	8log ₂	9log ₂	8log ₂	9log ₂	8log ₂	8log ₂	9log ₂	9log ₂	9log ₂
PBS	14 ngày	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	21 ngày	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	28 ngày	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Bảng 8: Danh sách kết quả thử nghiệm hiệu quả miễn dịch

Nhóm	Liều vaccin được chủng (EID ₅₀ /con)	Đường chủng vaccin	Tỷ lệ mắc bệnh/Tổng số	Tỷ lệ chết/Tổng số	Tỷ lệ bảo vệ (%)
Vaccin sống NDV VII	10 ⁶	Chủng vaccin trong mắt-mũi	0/10	0/10	100

Vacxin sống LaSota	10 ⁶	Chủng vacxin trong mắt-mũi	0/10	0/10	100
PBS	10 ⁶	Chủng vacxin trong mắt-mũi	10/10	10/10	-

Bảng 9: Kết quả phân lập virus 3 ngày và 5 ngày sau khi chủng vacxin

Nhóm	Số lượng dương tính với virus/Tổng số			
	Thanh khí quản		Ổ nhóp	
	Ngày thứ 3	Ngày thứ 5	Ngày thứ 3	Ngày thứ 5
Vacxin sống NDV VII	0/10	0/10	0/10	0/10
Vacxin sống La Sota	5/10	8/10	6/10	8/10

Tóm lại, chủng NDV VII được xây dựng cấu trúc theo sáng chế có tính sinh miễn dịch tốt; sau khi chủng này được bào chế thành vacxin sống để gây miễn dịch cho động vật, đã phát hiện thấy rằng vacxin này an toàn cho gà và có thể gây cảm ứng sản xuất các kháng thể trung hòa virus cao hơn, và có thể bảo vệ khỏi sự tấn công của chủng virus có độc lực gây dịch bệnh có kiểu gen VII hiện tại đem lại hiệu quả phòng ngừa tốt và do đó, có triển vọng sử dụng rộng.

Các phương án nêu trên được sử dụng chỉ để mô tả các phương án được ưu tiên của sáng chế, chứ không được dự định để giới hạn phạm vi của sáng chế. Các thay đổi và cải tiến khác nhau được tạo ra bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đối với giải pháp kỹ thuật của sáng chế sẽ nằm trong phạm vi bảo hộ được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Danh mục trình tự

<110> YEBIO BIOENGINEERING CO., LTD. OF QINGDAO

<120> CHŨNG VIRUT GÂY BỆNH NEWCASTLE CÓ KIỂU GEN VII ĐÃ GIẢM ĐỘC LỰC VÀ VACXIN BAO GỒM CHŨNG NÀY

<160> 3

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 1662

<212> ADN

<213> Virut gây bệnh Newcastle

<400> 1

atgggctcca aacettctac caggatccca gcacctctaa tgctgatcac tcggattatg	60
ctgatattga gctgtatccg tctgacaagc tctcttgacg gcaggcccct tgcagctgca	120
ggaattgtag taacaggaga taaggcagtc aatgtataca cctcgtctca gacagggta	180
atcatagtca agttgctccc gaatatgccc agagataagg aggcattgtc aaaagcccca	240
ttggaggcat ataacagaac actgactact ctgctcactc ctcttggcga ctccatccgc	300
aagatccaag ggtctgtgtc cacgtccgga ggaggagac aaggacgcct tataggtgct	360
gttattggca gtgtagctct tggggttgca acagcggcac agataacagc agctgcggcc	420
ctaatacaag ccaaacagaa tgccgccaac atcctccggc ttaaggagag cattgctgca	480
accaatgaag ctgtgcatga agtcaccgac ggattatcac aactatcagt ggcagttggg	540
aagatgcagc agtttgtcaa tgaccagtta aataatacgg cgcgagaatt ggactgtata	600
aaaatcacac aacaggctcg tgtagaactc aacctatacc taactgaatt gactacagta	660
ttcgggccac agatcacctc cctgcatta actcagctga ccatccaggc actttataat	720
ttagctggtg gcaatatgga ttacttatta actaagttag gtataggaaa caatcaactc	780
agctcattaa ttggtagcgg cctgatcact ggttacccta tactgtatga ctcacatact	840
caactcttgg gcatacaagt aaatctgccc tcagtcggga acttaataa tatgcgtgcc	900
acctatttgg agaccttacc tgtaagtaca accaaaggat atgcctcagc acttgctccg	960
aaagtagtga cacaagtcgg ttctgtgata gaagagcttg acacctcata ctgtatagag	1020
tccgatctgg atttatattg tactagaata gtgacattcc ccatgtcccc aggtatttat	1080
tcctgtttga gcggaacac atcagcttgc atgtattcaa agactgaagg cgcaactcact	1140
acgccgtata tgcccttag aggctcagtt attgccaatt gtaagataac aacatgcaga	1200
tgtacagacc ctcttggtat catatcgcaa aattacggag aagctgtatc cctgatagat	1260
agacattcat gcaatgtctt atcattagac ggaataactc tgaggctcag tggggaattt	1320

gatgcaactt atcaaaagaa catctcaata ttagattctc aagtcacgt gacaggcaat 1380
 cttagatat caactgaact tggaaacgtc aacaattcaa tcagcaatgc cttagatagg 1440
 ttggcagaaa gcaacagcaa gctagaaaaa gtcaatgtca gactaactag cacatctgct 1500
 ctcattacct atattgttct aactgtcatt tccctaattt tcggtgcact tagtctggtt 1560
 ttagcgtgtt acctgatgta caaacagaag gcacaacaga agaccttgct atggcttggg 1620
 aataataccc tcgatcagat gagagccacc acaagagcat ga 1662

<210> 2

<211> 553

<212> PRT

<213> Virut gây bệnh Newcastle

<400> 2

Met Gly Ser Lys Pro Ser Thr Arg Ile Pro Ala Pro Leu Met Leu Ile
 1 5 10 15
 Thr Arg Ile Met Leu Ile Leu Ser Cys Ile Arg Leu Thr Ser Ser Leu
 20 25 30
 Asp Gly Arg Pro Leu Ala Ala Ala Gly Ile Val Val Thr Gly Asp Lys
 35 40 45
 Ala Val Asn Val Tyr Thr Ser Ser Gln Thr Gly Ser Ile Ile Val Lys
 50 55 60
 Leu Leu Pro Asn Met Pro Arg Asp Lys Glu Ala Cys Ala Lys Ala Pro
 65 70 75 80
 Leu Glu Ala Tyr Asn Arg Thr Leu Thr Thr Leu Leu Thr Pro Leu Gly
 85 90 95
 Asp Ser Ile Arg Lys Ile Gln Gly Ser Val Ser Thr Ser Gly Gly Gly
 100 105 110
 Arg Gln Gly Arg Leu Ile Gly Ala Val Ile Gly Ser Val Ala Leu Gly
 115 120 125
 Val Ala Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Ala Ala Ala Leu Ile Gln Ala
 130 135 140
 Lys Gln Asn Ala Ala Asn Ile Leu Arg Leu Lys Glu Ser Ile Ala Ala
 145 150 155 160
 Thr Asn Glu Ala Val His Glu Val Thr Asp Gly Leu Ser Gln Leu Ser
 165 170 175
 Val Ala Val Gly Lys Met Gln Gln Phe Val Asn Asp Gln Leu Asn Asn
 180 185 190

Thr Ala Arg Glu Leu Asp Cys Ile Lys Ile Thr Gln Gln Val Gly Val
 195 200 205
 Glu Leu Asn Leu Tyr Leu Thr Glu Leu Thr Thr Val Phe Gly Pro Gln
 210 215 220
 Ile Thr Ser Pro Ala Leu Thr Gln Leu Thr Ile Gln Ala Leu Tyr Asn
 225 230 235 240
 Leu Ala Gly Gly Asn Met Asp Tyr Leu Leu Thr Lys Leu Gly Ile Gly
 245 250 255
 Asn Asn Gln Leu Ser Ser Leu Ile Gly Ser Gly Leu Ile Thr Gly Tyr
 260 265 270
 Pro Ile Leu Tyr Asp Ser His Thr Gln Leu Leu Gly Ile Gln Val Asn
 275 280 285
 Leu Pro Ser Val Gly Asn Leu Asn Asn Met Arg Ala Thr Tyr Leu Glu
 290 295 300
 Thr Leu Ser Val Ser Thr Thr Lys Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Val Pro
 305 310 315 320
 Lys Val Val Thr Gln Val Gly Ser Val Ile Glu Glu Leu Asp Thr Ser
 325 330 335
 Tyr Cys Ile Glu Ser Asp Leu Asp Leu Tyr Cys Thr Arg Ile Val Thr
 340 345 350
 Phe Pro Met Ser Pro Gly Ile Tyr Ser Cys Leu Ser Gly Asn Thr Ser
 355 360 365
 Ala Cys Met Tyr Ser Lys Thr Glu Gly Ala Leu Thr Thr Pro Tyr Met
 370 375 380
 Ala Leu Arg Gly Ser Val Ile Ala Asn Cys Lys Ile Thr Thr Cys Arg
 385 390 395 400
 Cys Thr Asp Pro Pro Gly Ile Ile Ser Gln Asn Tyr Gly Glu Ala Val
 405 410 415
 Ser Leu Ile Asp Arg His Ser Cys Asn Val Leu Ser Leu Asp Gly Ile
 420 425 430
 Thr Leu Arg Leu Ser Gly Glu Phe Asp Ala Thr Tyr Gln Lys Asn Ile
 435 440 445
 Ser Ile Leu Asp Ser Gln Val Ile Val Thr Gly Asn Leu Asp Ile Ser
 450 455 460
 Thr Glu Leu Gly Asn Val Asn Asn Ser Ile Ser Asn Ala Leu Asp Arg
 465 470 475 480
 Leu Ala Glu Ser Asn Ser Lys Leu Glu Lys Val Asn Val Arg Leu Thr

	485		490		495
Ser Thr Ser Ala Leu Ile Thr Tyr Ile Val Leu Thr Val Ile Ser Leu					
500		505		510	
Ile Phe Gly Ala Leu Ser Leu Val Leu Ala Cys Tyr Leu Met Tyr Lys					
515		520		525	
Gln Lys Ala Gln Gln Lys Thr Leu Leu Trp Leu Gly Asn Asn Thr Leu					
530		535		540	
Asp Gln Met Arg Ala Thr Thr Arg Ala					
545		550			

<210> 3

<211> 15186

<212> ADN

<213> Virut gây bệnh Newcastle

<400> 3

accaaacaga gaatccgtaa ggtacgatag aaggcgaagg agcaatcgaa gtcgtacggg	60
tagaaggtgt gaatctcgag tgcgagcccg aagctcaaac tcgagagagc cttctgccaa	120
aatgtcttct gtattcgatg agtacgagca gctcctcgcg gctcagactc gccccaatgg	180
agctcatggc ggaggagaga aggggagcac cttaaaggta gaagtcccg tattcactct	240
caacagtgat gaccagaag atagatggaa ctttgcagtg ttttgtcttc ggattgctgt	300
tagcgaggat gccaaacaaac cacttaggca aggtgctctc atatctctct tatgttccca	360
ctctcaagtg atgaggaacc atgttgccct tgcggggaaa cagaatgagg ccacactggc	420
tgttcttgag atcgatgggt ttaccaacgg cgtgccccag ttcaacaaca ggagtggagt	480
gtctgaagag agagcacaga gatttatgat gatagcaggg tctctccctc gggcatgcag	540
caacgggtacc cgttcgtca cagctgggg tgaagatgat gcaccagaag acattactga	600
taccctggag aggatcctct ctatccaggc tcaagtatgg gtcacggtgg caaaggccat	660
gactgcatat gagacagcag atgagtcaga aacaagaaga atcaataagt acatgcagca	720
aggcagggtc cagaagaagt acatcctcca ccccgatgc aggagcgcaa tccaactcac	780
aatcagacag tctctggcgg tccgcatctt tttgggttagc gagcttaaga gaggccgcaa	840
cacggcaggt gggacctcca cctattacaa cttgggtgggg gatgtagact catacatcag	900
gaacactggg ctaactgcat tcttcctgac acttaaatat ggaattaaca ccaagacatc	960
agcccttgca cttagcagcc tctcaggcga tatccagaaa atgaagcagc tcatgcgctt	1020
gtatcggatg aaaggagata atgcgccgta catgacattg ctcggtgaca gtgaccagat	1080
gagctttgca cctgccgagt atgcacaact ttactccttt gccatgggta tggcatcagt	1140
cctagataaa ggaactagca aataccaatt tgccagggac tttatgagca catcattctg	1200
gagacttgga gtagagtacg ctcaggctca aggaagtagc atcaatgagg atacggccgc	1260

cgagctaaag	ctaaccacag	cagcaaggag	aggcctggca	gctgctgccc	aaagagtgtc	1320
tgaggagacc	agcagcatgg	acatgcccac	ccaacaagcc	ggggtcctca	ctggactcag	1380
cgacggaggc	tcccaagccc	cccaaggtgc	actgaacaga	tcacaagggc	aaccggacac	1440
cggggatggg	gagacccaat	ttctggatct	gatgagagcg	gtggcaaata	gcatgagaga	1500
agcgccaaac	tctgcgcagg	gcacccctca	accggggcct	cccccaaccc	ctgggcccctc	1560
tcaagacaat	gacaccgact	gggggtactg	accgacagca	cccagtttgc	ttctatgagg	1620
tcattccaat	tcctctgccc	acaccccacc	cctcaatccg	caatcccgcg	tggccaaacc	1680
cacaaacgaa	ccccctgtc	tcctctctct	ccccagccc	cacaacccca	cctgcccagg	1740
gcaacatagg	tacaatgcga	cccactaata	atcaatacag	ggccaaagaa	attagaaaaa	1800
agtacgggta	gaaggagagc	attcagagat	cagggcgagt	caccggggtc	tctgctctcc	1860
cttctaccta	gtggattagg	atggagatgg	ccacctttac	agatgcggag	atcgacgagc	1920
tatttgagac	cagtggaaact	gtcattgaca	gcataattac	ggcccaggga	aaaccagtag	1980
agactgttgg	aaggagtgcg	atcccacaag	gcaaaactaa	ggctttgagc	gcagcatggg	2040
agaagcatgg	gagcatccag	tcaccagcca	gccaagacac	ccctgatcga	caggacagat	2100
cagataaaca	actgtccaca	cccagcaag	cgagtccaaa	cgacagcccc	ccagccacat	2160
ccactgacca	gcctcccact	caggctgcag	atgaggccgg	cgatacacag	ctcaagaccg	2220
gagcaagcaa	ctctctgctg	tcgatgcttg	ataaactcag	caataagtca	tctaattgcta	2280
aaaaggggccc	agggtcgagc	cctcaagaaa	ggcatcatca	acgtctgact	caacaacagg	2340
ggagtcaaca	aagccgcgga	aacagccaag	agagaccgca	gaaccaggcc	aaggccatcc	2400
ctggaaacca	ggtcacagac	gcgaacacag	catatcatgg	acaatgggag	gagtcacaac	2460
tatcagctgg	tgcaacccat	catgctctcc	gatcagagca	gagccaagac	aatactcctg	2520
cacctgtgga	tcattgtccag	ctacctgtcg	actttgtgca	ggcgatgatg	tctatgatgg	2580
aggcgatata	acagagggtg	agtaaagttg	actatcagct	ggaccttgct	ttgaaacaga	2640
catcttctat	ccccatgatg	cggctctgaaa	tccagcagct	gaaaacgtct	gttgcggtca	2700
tggaaGCCAA	tttgggcatg	atgaagatcc	tggaccctgg	ttgtgccaac	gtttcatctc	2760
taagtgatct	acgggcagtt	gcccgatccc	acccggtttt	aatttctggc	cccggagacc	2820
catctcctta	tgtgacccaa	gggggcgaaa	tggcactcaa	taaactttcg	caaccgggtgc	2880
aacacccctc	tgaattgatt	aaacccgcca	cggcaagcgg	gcctgatata	ggagtggaga	2940
aagacactgt	ccgtgcattg	atcatgtcac	gccctatgca	tccgagctct	tcagctaggc	3000
tcttgagcaa	actggacgca	gccggatcga	ttgaggaaat	cagaaaaaat	aagcgccttg	3060
cactgaatgg	ctaattacca	ccgcaacccg	cagcagatcc	ctgtccaccc	agcaccacac	3120
ggtatctgca	ccaagctcct	ctctgcaaac	ccaaggtcca	acaccccgag	cgacaaccct	3180
gtcctgcttc	ctctgcccc	ctaaatgata	gcgcagctgc	aatcaattca	gctatattaa	3240
ggattaagaa	aaaaatacggg	tagaatcgga	gtgccccgat	tgtgccaaaga	tggactcatc	3300
taggacaatc	gggctgtact	ttgattctac	ccttccttct	agcaacctgc	tagcattccc	3360
gatagtccta	caagacacag	gggacgggaa	gaagcaaata	gccccgcaat	acaggatcca	3420
gcgtcttgac	tcgtggacag	acagcaaaga	agactcggtg	ttcatcacca	cctatggatt	3480

catctttcag gttgggaatg aagaagccac tgtcggcatg atcaatgata atcccaagcg	3540
cgagttactt tccactgcc a tgctatgcct agggagtgt a ccaaatgtcg gagatcttgt	3600
tgagctggca agggcctgcc tcactatggg ggtaacatgc aagaagagt caactaacac	3660
cgagagaatg gtcttctcag tagtgcaggc accccagggt ctgcaaagct gtagggttgt	3720
ggcaaacaaa tactcgtcgg tgaatgcagt caagcacgtg aaagcaccag agaagattcc	3780
tgggagcgg a accctagagt acaaagtga ctttgtctct ctgaccgtgg tgccaagaaa	3840
ggacgtctac aagataccaa ctgcagcact taagggtctct ggctcaagtc tgtacaatct	3900
tgcgtcaat gtcactattg atgtggaggt agaccgaag agcccgttg tcaaattccct	3960
ttccaagtcc gacagtgggt actatgctaa tctcttctta catattgggc ttatgtccac	4020
tgtagataag aaggggaaga aagtgcatt tgacaagctg gaaaggaaga taaggagact	4080
tgatctatct gtagggctta gtgacgtgct cggaccttcc gtgcttgtaa aggcgagagg	4140
tgcacggact aagctgctgg cacctttctt ctctagcagt gggacagcct gctatcccat	4200
agcaaatgcc tctcctcagg tggccaagat actctggagc caaacgcgt acctgcggag	4260
tgtaaaagtc attatccaag cgggcaccca gcgtgctgtc gcagtgaccg ccgaccacga	4320
ggttacctct actaagctgg agaaggggca taccattgcc aaatacaatc cttcaagaa	4380
ataggctgca tctctgagat tgcactccgc ccatcttccc ggatcaccat gacactaaat	4440
aatgatctgt cttgattact tatagttagt tcgcctgtct atcaaattag aaaaaacacg	4500
ggtagaagag tctggatccc gaccggcaca ttcaggacac agcatgggct ccaaaccctc	4560
taccaggatc ccagcacctc taatgctgat cactcggatt atgctgatat tgagctgtat	4620
ccgtctgaca agctctcttg acggcaggcc ccttgacgt gcaggaattg tagtaacagg	4680
agataaggca gtcaatgtat acacctcgtc tcagacaggg tcaatcatag tcaagttgct	4740
cccgaatatg cccagagata aggaggcatg tgcaaaagcc ccattggagg catataacag	4800
aacactgact actctgtc a ctctcttgg cgactccatc cgcaagatcc aagggtctgt	4860
gtccacgtcc ggaggaggga gacaaggacg ccttataggt gctgttattg gcagtgtagc	4920
tcttgggggt gcaacagcgg cacagataac agcagctgcg gccctaatac aagccaaaca	4980
gaatgccgcc aacatcctcc ggcttaagga gagcattgct gcaaccaatg aagctgtgca	5040
tgaagtcacc gacggattat cacaactatc agtggcagtt gggaagatgc agcagtttgt	5100
caatgaccag ttaaataata cggcgcgaga attggactgt ataaaaatca cacaacaggt	5160
cgggtgtaga ctcaacctat acctaactga attgactaca gtattcgggc cacagatcac	5220
ctccccctgca ttaactcagc tgaccatcca ggcactttat aatttagctg gtggcaatat	5280
ggattactta ttaactaagt taggtatagg aaacaatcaa ctcagctcat taattggtag	5340
cggcctgatc actggttacc ctatactgta tgactcacat actcaactct tgggcataca	5400
agtaaactct ccctcagtcg ggaacttaaa taatatgcgt gccacctatt tggagacctt	5460
atctgtaagt acaaccaaag gatatgcctc agcacttgct ccgaaagtag tgacacaagt	5520
cggttctgtg atagaagagc tigacacctc atactgtata gagtccgatc tggatttata	5580
ttgtactaga atagtacat tccccatgtc cccagggtatt tattcctgtt tgagcggcaa	5640
cacatcagct tgcattgtatt caaagactga aggcgcactc actacgccgt atatggccct	5700

tagaggctca gttattgcc	attgtaagat aacaacatgc	agatgtacag accctcctgg	5760
tatcatatcg caaaattacg	gagaagctgt atccctgata	gatagacatt catgcaatgt	5820
cttatcatta gacggaataa	ctctgaggct cagtggggaa	tttgatgcaa cttatcaaaa	5880
gaacatctca atattagatt	ctcaagtcac cgtgacaggc	aatcttgata tatcaactga	5940
acttggaac gtcaacaatt	caatcagcaa tgccttggat	aggttggcag aaagcaacag	6000
caagctagaa aaagtcaatg	tcagactaac tagcacatct	gctctcatta cctatatattg	6060
tctaaactgtc atttccctaa	ttttcgggtgc acttagtctg	gttttagcgt gttacctgat	6120
gtacaaacag aaggcacaac	agaagacctt gctatggcct	gggaataata ccctcgatca	6180
gatgagagcc accacaagag	catgaatgca gataagaggt	ggacagatac ccaacagcag	6240
cctgtgtgtc aattccgata	acctgtcaag tagaagactt	aagaaaaaat tactgggaac	6300
aagcaaccaa agagcaatgc	acgggtagaa cggtcgggga	ggccgtccct caatcgggag	6360
ccgggcctca caacatccgt	tctaccgcat caccaatagc	agttttcagt catggaccgc	6420
gcagttagcc aagttgcgct	agagaatgat gaaagagagg	caaagaatac atggcgcttg	6480
gtattccgga tcgcaatcct	actctcaacg gtggtgacct	tagccatctc tgcagccgcc	6540
cttgcatata gcatggaggc	cagcacacct agcgatcttg	taggcatacc gactgcatc	6600
tctagagcag aggaaaagat	tacatctgca ctcggttcca	atcaagatgt agtagatagg	6660
atatataagc aggtggccct	cgaatctcca ctggcattgc	taaacaccga atctacaatt	6720
atgaacgcaa taacgtctct	ctcttatcga atcaatgggg	ccgcaaatac cagcggatgt	6780
ggagcaccca ttcattgatcc	agattatatt ggaggaatag	gtaaagaact tattgtagat	6840
gatgctagcg acgtcacatc	atactatccc tctgcgttcc	aagaacacct gaactttatc	6900
ccggcgccta ctacaggatc	aggttgcact cggataccct	catttgacat gagcgctacc	6960
cactactgtt ataactacaa	tgtgatatta tctggctgca	gagatcactc gcactcacat	7020
caatatattag cacttgggtg	gcttcggaca tctgcaacag	ggagggtatt cttttccact	7080
ctgcgttcca tcaatctgga	tgacacccaa aatcgggaag	cttgcaatgt gattgcaacc	7140
cccttgggtt gtgatatgct	gtgctctaaa gtcacagaga	ctgaagaaga ggattataac	7200
tcagctatcc ccacgtcgat	ggtacatgga aggttagggg	tcgacggcca ataccacgag	7260
aaggacctag atgtcacaac	actattcgag gactgggttg	caaactaccc aggagtaggg	7320
ggcgggtctt ttattgacaa	ccgcgtatgg ttcccagttt	acggagggct aaaacccaat	7380
tcgcccagtg acaccgcaca	agaagggaaa tatgtaatat	acaagcgata caatgacaca	7440
tgtccagatg agcaagatta	tcagattcaa atggctaagt	cttcatataa gcctgggcgg	7500
tttggaggga aacgcgtaca	gcaggccatc ttatctatca	aagtgtcaac atccttgggc	7560
gaggacccgg tactgactgt	accgcccac acagtaacac	tcatgggggc cgaaggcaga	7620
gttctcacag tagggacatc	tcatttcctt tatcagcgag	ggatcatcata cttctcccct	7680
gcctactat atcctatgat	agtcagcaac aaaacagcca	ctcttcatac tccttataca	7740
ttcaatgcct tcaactcgacc	aggtagtgtc ccttgccagg	cttcagcaag atgccctaac	7800
tcatgtgtta ccggagtcta	tactgatcca tatcccttgg	tcttctatag gaaccacacc	7860
ttgcgagggg tattcgggac	gatgcttgat gataaacaag	caagactcaa ccctgtatct	7920

gcagtatttg	acagcatatc	ccgcagtcgc	ataacccggg	tgagttcaag	cagcaccaag	7980
gcagcataca	caacatcaac	atgtttttaa	gttgtaaaga	ccaataaaac	ctattgtctc	8040
agcattgccg	aaatatccaa	taccctcttc	ggggaattca	gaatcgtccc	tttactagtt	8100
gagattctca	aggatgatgg	ggttagagaa	gccaggtcta	gccggttgag	tcaactgcga	8160
gagggttgga	aagatgacat	tgtatcacct	atcttttgcg	acgccaagaa	tcaaaactgaa	8220
taccggcgcg	agctcgagtc	ctacgctgcc	agttggccat	aatcagctag	tgctaattgtg	8280
attagattaa	gtcttgtcgg	tagtcacttg	attaagaaaa	aatgtgggtg	gtagcgggat	8340
ataaggcaaa	acaactcaag	gaggatagca	cgggtaggac	atggcgagct	ccggtcccga	8400
gagggcggag	catcagatta	tcctaccaga	gtcacacctg	tcttcaccat	tagtcaagca	8460
caaaactactc	tattactgga	aattaactgg	gctaccactc	cctgacgagt	gtgacttcga	8520
ccacctcatt	ctcagccgac	aatggaagaa	aataacttga	tcggcctccc	ctgacactga	8580
gagaatgata	aaacttggaa	gggcagtgca	ccagactctc	aaccacaatt	ccaagataac	8640
cggagtactc	catcccaggt	gtttagaaga	attggctagt	attgaggttc	ctgactcaac	8700
caacaagttt	cggaagatcg	agaagaaaat	ccaaattcac	aacacaaggt	atggagaact	8760
gttcacaaga	ctgtgcacgc	atgtagagaa	gaaattgttg	ggatcatctt	ggtctaataa	8820
tgtcccccg	tcagaagagt	tcaacagcat	ccgtacagat	ccggcattct	ggtttcactc	8880
aaaatggtcc	acaactaagt	ttgcatggct	ccatataaaa	cagattcaaa	ggcatctgat	8940
tgtggcagca	agaacaaggt	ccgcagccaa	caaattgggtg	acgtgaccc	ataaggtagg	9000
ccaagtcttt	gttactcctg	agcttgtcat	tgtgacacat	acagatgaga	acaagttcac	9060
gtgtcttacc	caggaacttg	tgttgatgta	tgcatatg	atggagggca	gagatatggt	9120
caacataata	tcattccacg	cggcacatct	caggagccta	tcagagaaaa	ttgatgacat	9180
tctgcggta	gtagatgccc	tggcaaaaga	tctgggtaat	caagtctacg	atgttgtagc	9240
actcatggag	ggatttgc	acggcgccgt	ccagctgctt	gagccgtcag	gtacattcgc	9300
aggggatttc	ttcgcattca	acctgcagga	gctcaaagac	actttgatcg	gcctccttcc	9360
taaggatata	gcagaatctg	tgactcacgc	aatagccact	gtattctctg	gcttagaaca	9420
aaatcaagcg	gctgagatgc	tgtgcctgtt	gcgtctatgg	ggccacccat	tacttgagtc	9480
ccgtattg	gcaaaaagcag	taaggagcca	aatgtgcgca	ccaaaaatgg	tagactttga	9540
tatgatcctc	caggtattgt	ctttctttaa	aggaacaatc	atcaacggat	acagaaagaa	9600
gaatgcaggt	gtttggccac	gtgtcaaagt	agatacgata	tacgggaagg	tcattgggca	9660
gctacacgct	gattcagcgg	agatttcaca	cgatatcatg	ttgagagagt	acaagagttt	9720
atctgcgctt	gaattcgagc	catgtataga	atacgaccct	atcaccaatc	tgagcatgtt	9780
tctaaaagac	aaggcgatcg	cacacccgaa	agacaactgg	ctcgccgctt	ttaggcgaaa	9840
ccttctctct	gaggaccaga	agaaacatgt	aaaggaggca	acctctacta	accgtctctt	9900
gatagagt	ttagagtcaa	atgattttga	tccatataag	gagatggaat	atctgacgac	9960
ccttgagtac	ctaagagatg	acaatgtggc	agtatcatac	tcgctcaagg	agaaggaagt	10020
gaaggttaat	gggcggat	ttgctaagct	aacaaagaaa	ttaaggaact	gtcaagtgat	10080
ggcggaaggg	atcttagctg	accagattgc	acctttcttt	caagggaatg	gggtcattca	10140

ggatagcata tctttaacca agagtatgct agcgatgagt caattgtctt tcaacagcaa	10200
taagaaacgt atcactgact gcaaagaaag agtagcctca aaccgcaatc acgatcaaaa	10260
gagcaagaat cgtcggagag ttgccacttt tataacgact gacctgcaaa agtactgtct	10320
taattggaga tatcagacaa tcaaactgtt cgctcatgcc atcaatcagc tgatgggctt	10380
acctcacttc ttcgaatgga ttcattctaag actaatggat actacgatgt ttgtaggaga	10440
ccctttcaat cccccaagtg acccaactga ctgtgatctc tcaagagtcc caaatgatga	10500
catatatatt gtcagtgcta gaggggggtat tgagggatta tgtcagaagc tatggacaat	10560
gatctcaatt gctgcaatcc aacttgctgc agcaagatca cattgtcgcg tcgcctgtat	10620
ggtacagggt gacaatcaag taatagctgt aacgagagag gtaaggtcag atgactcccc	10680
ggaaatggtg ttaacacaat tgcattcaagc cagtataat ttcttcaagg aattgattca	10740
tgtaatacat ttgattggcc ataatttgaa ggatcgtgaa acaatcagat cagacacatt	10800
cttcatatac agcaaacgaa tattcaaaga tggagcaata ctcatgcaag tcctcaaaaa	10860
ttcatctaaa ttagtgctaa tatcaggcga ccttagtgaa aacaccgtaa tgcctgtgc	10920
caacattgca tctactatag cacggctgtg cgagaacggg ctccaaagg atttctgtta	10980
ttacttaaac tacctgatga gttgcgtgca gacatacttt gattctgagt tttccatcac	11040
taacagctcg caccgatt ctaaccagtc gtggattgaa gacatctctt ttgtgcactc	11100
atatgtcctg acccctgccc agctaggggg actgagcaac ctccaatact caaggtctta	11160
cacgaggaac atcggtgacc cggaactac tgcttttgca gagatcaagc gattagaagc	11220
agtggggtta ctaagtccta gtattatgac taacatctta actaggccgc ctggaaatgg	11280
agattgggcc agtctgtgta acgaccctta ctctttcaat ttgagactg tcgcgagtcc	11340
aaatatgtc cttaagaaac atacacaaag agtcctattt gaaacttggt caaatccctt	11400
attatctggc gtgcatacag aggataatga ggcagaagag aaggcgttgg ctgaattttt	11460
actcaatcaa gaagtaattc atccacgtgt cgcacatgct atcatggaag caagctctat	11520
aggtaggagg aagcagattc aagggttgt tgacacaaca aacaccgtaa tcaagattgc	11580
attgactagg aggccacttg gcatcaagag gctgatgcgg atagttaact actcgagcat	11640
gcatgcaatg ctgttttagag acgatgtttt ctcatctaac aggtctaacc accccttagt	11700
ttcctctaata atgtgttctc tgacgctagc agactatgca cggaatagaa gctggtcacc	11760
attgacgggg ggtagaaaga tactgggtgt atctaatacct gatactatag aactttaga	11820
gggtgagatc cttagcgtca gcggaggatg cacaagatgt gacagcggag atgaacaatt	11880
cacttggttc catcttccga gcaatataga actgaccgat gacaccagca agaatacctcc	11940
gatgagagtg ccgtacctcg ggtcaaagac tcaagagagg agggccgcct cgcttgcgaa	12000
aatagctcat atgtcaccac atgtgaaagc tgctctaagg gcatcatccg tgttgatctg	12060
ggcttatgga gacaacgaag taaattggac tgctgctctt aaaattgcaa gatctcgggtg	12120
caatataaac tcagagtatc ttgactatt gtccccctta cccacagctg ggaatctcca	12180
acatagactg gatgacggca taactcagat gacattcacc cctgcatctc tctacagggt	12240
gtcaccttat attcacatat ccaatgattc tcaaagggtta ttacgggaag aaggagtcaa	12300
agagggaaat gtagtttatc agcaaatcat gctcttggtt ttatctctaa tcgaatact	12360

cttccccgatg acgacaacca ggacatacga tgagatcaca ttgcacctcc acagtaaatt	12420
tagctgctgt atcaggggaag caccggttgc agttcccttc gagttactcg ggatggcacc	12480
agaactaagg acagtgcact caaataagtt tatgtatgat cctagtcctg tatcggaggg	12540
tgacttttgcg agacttgact tagctatctt taagagttat gagcttaatc tagaatcata	12600
tcccacaata gagctaata acattctttc aatatccagc gggaagttaa tcggccagtc	12660
tgtggtttct tatgatgaag atacctccat aaagaatgac gccataatag tgtatgacaa	12720
cacccggaat tggatcagcg aagctcagaa ttcagatgtg gtccgcctat tcgagtatgc	12780
agcacttgaa gtgcttctcg actgtttctta tcagctctac tatctgagag taagaggcct	12840
agacaatata gtgttgata tgagtgcatt atataagaat atgccaggaa ttctactttc	12900
caacattgca gctacaatat ctcatcccat cattcattca agattgcatg cagtaggcct	12960
ggtcaatcac gacgggtcac accaacttgc agacacagat ttcacgaaa tgtctgcaaa	13020
actattagtc tcttgactc gacgcgtggt ctgaggttta tatgcaggga ataagtatga	13080
tctgctgttc ccgtctgtct tagatgataa cctgagttag aagatgcttc agctgatata	13140
tcggttatgc tgccgtgata cgggtgctct tgctacaaca agagagatcc cgaaaataag	13200
aggcttatct gcagaagaga agtggtcagt acttactgag tacctactgt cagatgctgt	13260
gaaaccatta cttagtctcg agcaagttag ctctatcatg tctcctaaca tagttacgtt	13320
cccagctaata ctatattaca tgtctcggaa gagccttaat ttgattaggg aaagagagga	13380
cagggacact atcttggcat tgttgttccc ccaagagcca ctacttgagt tccccttagt	13440
acaagatatt ggcgctcgag tgaaagatcc attcacccga caacctgcgg cgtttttaca	13500
agaattagat ttgagcgctc cagcaaggta tgacgcattt acacttagtc aggttcattc	13560
tgaacacaca tcaccaaate cggaggacga ctacttagta cgataacctgt tcagaggaat	13620
agggaccgcg tctcctctt ggtataaggc atctcacctt ctttctgtac ctgaggtcag	13680
atgtgcaagg caccggaatt ccttatactt ggcagaagga agcggagcca ttatgagtct	13740
tctcgaactg catgtgccgc atgagactat ctattacaat acgctcttct caaacgagat	13800
gaacccccca cagcggcatt tcggaccgac cccaacacag tttctgaatt cagttgttta	13860
taggaatcta caggcggagg taccatgtaa ggatggattt gtccaggagt tccgtccatt	13920
atggagagag aatacagaag aaagcgatct gacctcagat aaagcagtgg gttacatcac	13980
atctgcagtg ccctaccggt ctgtatcatt gctgcactgt gacattgaga ttctccagg	14040
atccaatcaa agcttactgg atcaactggc taccaatctg tctctgattg ccatgcattc	14100
tgtaaggagag ggcggggctg tgatcatcaa agtggtgtat gcaatgggat attacttcca	14160
tctactcatg aacttgttca ctccgtgttc tacgaaagga tatattctct ctaatggcta	14220
tgcatgtaga ggggatatgg agtggtacct ggtatttgtc atgggctatc gaggtgggcc	14280
tacatttgta catgaggtag tgaggatggc aaaaactcta gtgcagcggc acggtacact	14340
tttgtccaaa tcagatgaga tcacactgac taggttattt acctcacagc ggcagcgtgt	14400
aacagacatc ctatccagtc ctttaccgag actaataaag ttcttgagaa agaatatcga	14460
tactgcgcta attgaagccg ggggacaacc cgtccgtcca ttctgtgcag agagcttggt	14520
gaggacacta gcggacacaa ctgagatgac ccagatcatc gctagtcaca ttgacacagt	14580

cattcgatct gtgatctaca tggaggctga gggatgatctc gccgacacag tgttcttatt	14640
tacccccctac aatctctctta cagacggtaa aaagagaaca tcacttaaac agtgcacaag	14700
gcagatctta gaggtcacao tattgggtct tagagttgaa aatctcaata aagtaggtga	14760
tgtagtcagt ctagtactta aaggtatgat ttctctggag gacctgatcc ctctaagaac	14820
atacttgaag cgtagtacct gccctaagta ttggaagtct gttctaggta ttactaaact	14880
caaagaaatg ttacagaca cctctttatt atacttgact cgtgctcaac aaaaattcta	14940
catgaaaact ataggcaacg cagtcaaggg atactacagt aactgtgact cttaaagata	15000
atcacatatt aataggctcc ttttctagtt aactgagccc ttgttgattt aatgatacta	15060
tattagaaaa aagttgcact ccgacccttt aggactcgtg ttcgaattca aataattgtc	15120
ttagaaaaaa gttgcgcgta attgttcttg aatgtagtcc tgtcattcac caaatctttg	15180
tttggt	15186

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng virus gây bệnh Newcastle có kiểu gen VII đã giảm độc lực, trong đó số lưu giữ của chủng đã giảm độc lực này là CCTCC V201968.
2. Vacxin, trong đó kháng nguyên của vacxin này bao gồm chủng virus gây bệnh Newcastle có kiểu gen VII đã giảm độc lực theo điểm 1.

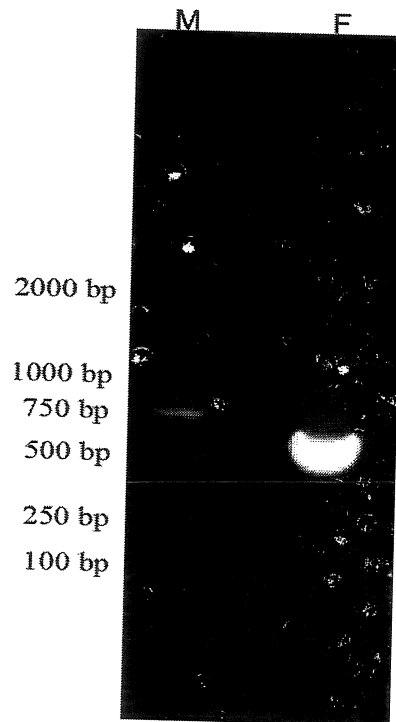


Fig.1

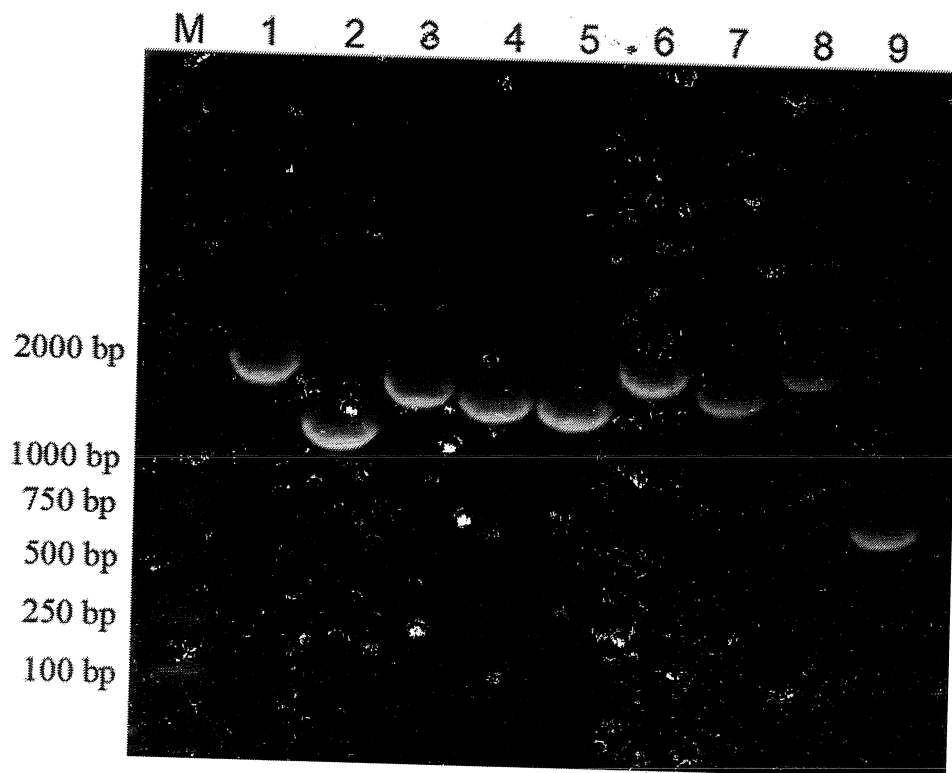


Fig.2

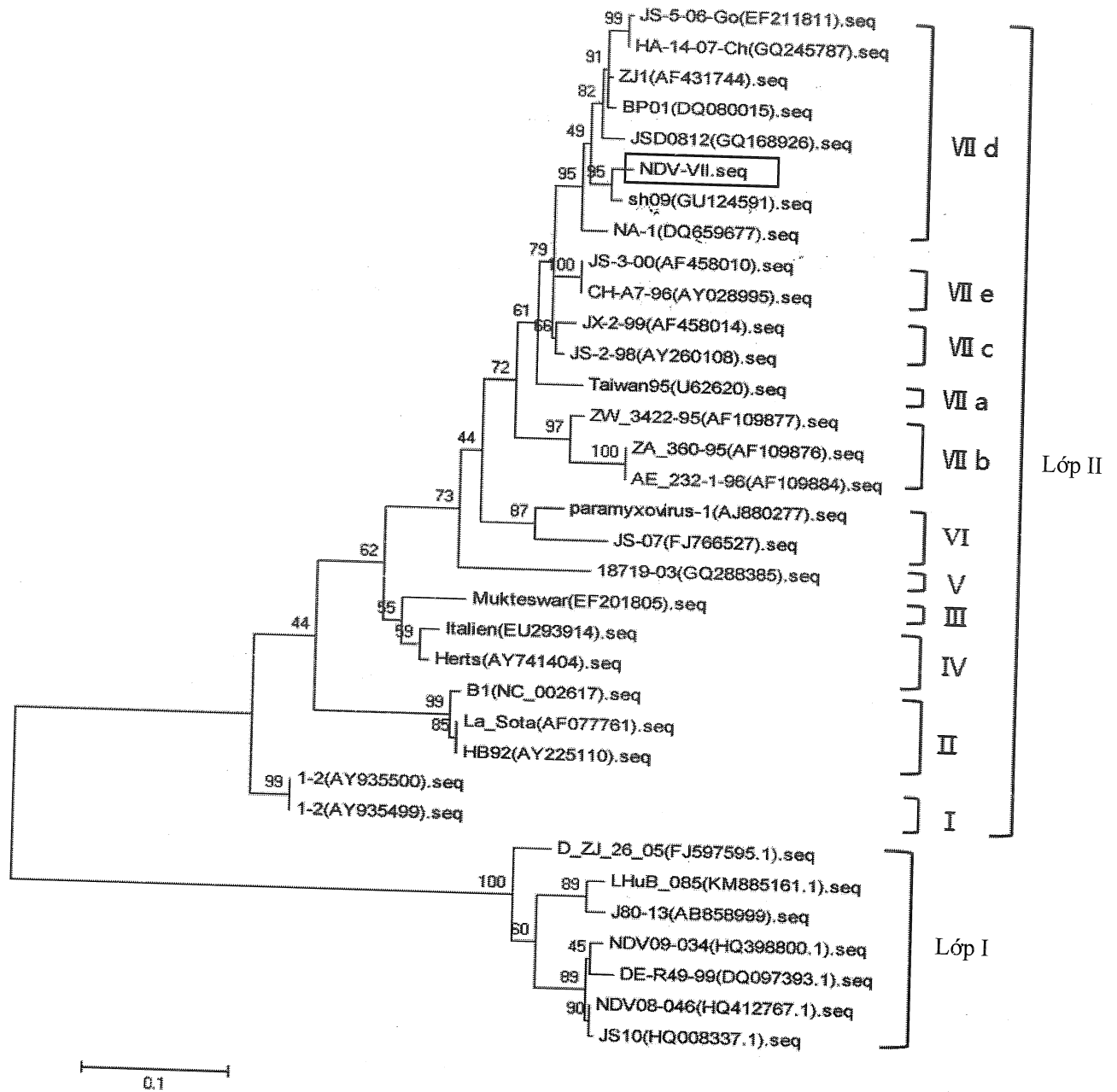


Fig.3