

## ĐA HÌNH CÁC VÙNG BIẾN ĐỔI (VARIABLE REGION) VRs THUỘC GEN *porA* CỦA VI KHUẨN *Neisseria meningitidis* LƯU HÀNH TẠI KHU VỰC MIỀN BẮC VIỆT NAM

Trần Xuân Thạch<sup>1</sup>, Lê Thu Trang<sup>1</sup>, Triệu Phi Long<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Hoa<sup>1</sup>, Đồng Văn Quyền<sup>1,3,✉</sup>, Nguyễn Minh Hoàng<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Y học dự phòng Quân đội, Bộ Quốc phòng

<sup>3</sup>Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: dvquyen@ibt.ac.vn; huongminh.nguyen@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 09.9.2019

Ngày nhận đăng: 20.11.2019

### TÓM TẮT

Vi khuẩn não mô cầu *Neisseria meningitidis* là nguyên nhân chính gây bệnh viêm màng não mủ, trong đó não mô cầu nhóm B và C là những nhóm gây bệnh chủ yếu tại Việt Nam hiện nay. Vi khuẩn não mô cầu biểu hiện hai protein xuyên màng lớn là PorA và PorB, trong đó PorA thể hiện mức độ đa hình cao giữa các chủng và được nghiên cứu như một thành phần của vaccine thể hệ mới kháng não mô cầu nhóm B. Các biến dị trong trình tự gen *porA* tập trung thành ba vùng biến đổi chính là VR1, VR2 và VR3. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành giải trình tự toàn bộ gen *porA* của 19 chủng *N. meningitidis* thu thập được từ các trại huấn luyện chiến sĩ khu vực miền Bắc Việt Nam giai đoạn 2008 – 2017 nhằm: (1) đánh giá độ đa hình của các vùng biến đổi VRs của gen *porA* và dự đoán khả năng đáp ứng miễn dịch của các trình tự amino acid suy diễn; (2) so sánh đa hình gen *porA* của các chủng Việt Nam với các chủng thế giới. Kết quả phân tích cho thấy độ đa hình cao giữa các chủng Việt Nam, mức đa dạng cao nhất tìm thấy ở VR1, tiếp theo là VR2 và VR3. Đặc biệt, 5/19 chủng thu thập được trong nghiên cứu này mang biến dị mới ở vùng VR2 chưa dự đoán được khả năng đáp ứng miễn dịch. Kết quả thu được thể hiện tính đặc trưng cao và nhiều đặc điểm miễn dịch mới của các chủng não mô cầu ở Việt Nam.

**Từ khóa:** *Neisseria meningitidis*, *porA*, vùng biến đổi VR, Việt Nam, vaccine

### MỞ ĐẦU

Vi khuẩn não mô cầu *Neisseria meningitidis* là cầu khuẩn Gram âm thông thường khu trú trong đường hầu họng trên của người khỏe mạnh, không gây ra triệu chứng và không gây bệnh. Tuy nhiên, khi sức đề kháng của người lành mang não mô cầu suy giảm do tổn thương hoặc viêm nhiễm đường hô hấp trên, vi khuẩn não mô cầu có thể xâm nhập vào máu gây nhiễm khuẩn huyết hoặc vào xoang não tủy gây viêm màng não mủ. Hai thể bệnh này đều hết sức nguy hiểm, có tỷ lệ tử vong cao và dễ phát triển thành dịch (Nguyễn Trần Chính 1992).

Bệnh viêm màng não mủ được phát hiện lần đầu tiên vào những năm đầu thế kỷ 19. Đến nay, viêm màng não mủ vẫn được xếp vào nhóm các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, do bệnh thường tiến triển nhanh sau giai đoạn ủ bệnh ban đầu không có triệu chứng rõ ràng, đôi lúc phát triển thành sốc nhiễm khuẩn toàn thân gây tỷ lệ tử vong cao (Rosenstein *et al.*, 2001). Tỷ lệ mang vi khuẩn não mô cầu *N. meningitidis* trong quần thể người trưởng thành trung bình là 10%, tuy nhiên, trong một số điều kiện sống tập trung đặc thù như ký túc xá học sinh, sinh viên, doanh trại hoặc trại tập huấn chiến sĩ, tỷ lệ người lành mang vi khuẩn não mô

cầu có thể cao gấp 2- 3 lần (Tryfinopoulou *et al.*, 2016, Breakwell *et al.*, 2018).

Theo đặc điểm miễn dịch học, vi khuẩn não mô cầu *N. meningitidis* phân chia thành 12 nhóm huyết thanh, trong đó nhóm gây bệnh chủ yếu là các nhóm huyết thanh A, B, C, Y và W135 (Nguyễn Trần Chính 1992). Trong năm nhóm huyết thanh gây bệnh, lớp vỏ polysaccharide của bốn nhóm A, C, Y và W135, trừ nhóm huyết thanh B, đều có tính đặc hiệu kháng nguyên cao và đã được sử dụng thành công làm vaccine phòng bệnh (Frasch 1995). Việc tìm kiếm các protein bề mặt có tính đặc hiệu kháng nguyên nhằm phát triển vaccine cho vi khuẩn não mô cầu nhóm B vì thế trở nên cần thiết.

Gần như toàn bộ các chủng vi khuẩn não mô cầu (>80%) đều biểu hiện protein bề mặt thuộc nhóm OMP1, mã hóa bởi gen *porA*, và một trong hai protein bề mặt nhóm 2 hoặc 3, lần lượt được mã hóa bởi gen *porB2* hoặc *porB3*. Tính đến nay, PorA là protein được sử dụng làm kháng nguyên đích phổ biến nhất cho các thử nghiệm vaccine kháng vi khuẩn não mô cầu nhóm B trên nhiều quốc gia trên thế giới (Bjune *et al.*, 1991, Sierra *et al.*, 1991, Moraes *et al.*, 1992, Boslego *et al.*, 1995, Cartwright *et al.*, 1999, Martin *et al.*, 2000, Oster *et al.*, 2005, Findlow *et al.*, 2006).

Vùng bọc lộ bề mặt của protein PorA chứa hai vùng biến đổi (variable region) VR1 và VR2 có mức độ đa hình rất cao, lần lượt phân chia thành 11 và 18 họ trình tự với tổng cộng hàng trăm biến dị allele được thống kê trên cơ sở dữ liệu PubMLST (<https://pubmlst.org/neisseria/>). Vùng biến đổi thứ ba, VR3, có mức độ đa hình thấp hơn VR1 và VR2. Nhờ mức độ đa hình cao, hai vùng VR1 và VR2 của protein PorA thường được sử dụng để nghiên cứu phát triển vaccine đặc hiệu phổ hẹp kháng não mô cầu nhóm B (Urwin *et al.*, 2004, Filippis *et al.*, 2007).

Trong nghiên cứu này chúng tôi trình bày kết quả giải trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của ba vùng biến đổi VR1, VR2 và VR3 của gen *porA*, qua đó phân tích

đặc điểm di truyền tiến hóa của gen *porA* của một số chủng *N. meningitidis* phân lập được trong giai đoạn 2009-2017 tại một số trại huấn luyện chiến sĩ trong địa bàn một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. Việc nghiên cứu giải mã vùng biến đổi của gen *porA* sẽ cung cấp nhiều thông tin quan trọng cho nghiên cứu dịch tễ học, giúp định hướng chiến lược phát triển vaccine kháng vi khuẩn não mô cầu nhóm B tại Việt Nam.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Đối tượng nghiên cứu

Mười chín chủng vi khuẩn não mô cầu *N. meningitidis* sử dụng trong nghiên cứu này được phân lập từ dịch nhầy họng của các chiến sĩ thu thập qua các đợt khám bệnh định kỳ (người lành mang khuẩn) hoặc dịch não tủy của các ca nhập viện quân đội được khẳng định lâm sàng là ca bệnh viêm màng não mủ thuộc các trại huấn luyện chiến sĩ trên một số tỉnh miền Bắc Việt Nam, cụ thể là Bắc Giang, Thái Nguyên, Vĩnh Phúc, Hà Nội và Hải Phòng, từ năm 2009 đến 2017 (Bảng 1) do Viện Y học dự phòng quân đội cung cấp. Phương pháp lấy, bảo quản, xử lý mẫu bệnh phẩm và thu thập số liệu lâm sàng được thực hiện theo các chuẩn thường quy. Vi khuẩn *N. meningitidis* được phân lập trên môi trường thạch máu 5%, ủ qua đêm ở 37°C có bổ sung 5% CO<sub>2</sub> và > 50% độ ẩm. Chủng thuần sau phân lập được định danh và xác định nhóm huyết thanh trên máy Vitek 2 Compact (bioMerieux, Pháp) bằng phương pháp hóa sinh tiêu chuẩn.

### Tách chiết DNA tổng số vi khuẩn *N. meningitidis*

DNA tổng số từ các mẫu vi khuẩn được tách chiết theo phương pháp thường quy sử dụng đệm chiết 4% SDS, 10 mM EDTA, 10 µl proteinase K (100 µg/mL). Hỗn hợp mẫu và đệm chiết được ủ ở 60°C trong 1 - 2 giờ, chiết lặp lại hai lần với phenol:chloroform:isoamyl alcohol tỷ lệ 25:24:1 và một lần với chloroform:isoamyl alcohol tỷ lệ 24:1. DNA tổng số sau đó được tủa trong thể tích isopropanol tương đương trong 1 giờ. Kết tủa

thu được được rửa hai lần với ethanol lạnh 70% trước khi hòa lại vào đệm TE và bảo quản ở -20°C cho tới khi sử dụng.

### Khuếch đại và giải trình tự gen *porA*

Trình tự các cặp mồi đặc hiệu và quy trình PCR dùng để khuếch đại toàn bộ vùng mã hóa protein của gen *porA* (~1179 bp) được tham khảo theo tài liệu hướng dẫn của Trung tâm Kiểm soát và Phòng chống bệnh (CDC, Mỹ) (Organization *et al.*, 2011). Phản ứng PCR được tiến hành ở thể tích 25  $\mu$ L sử dụng DreamTaq Master mix (Thermo Scientific); 50 ng DNA khuôn; 20 pmol mỗi xuôi CDC3UNI và 30 pmol mỗi ngược CDC5UNI. Phản ứng PCR được thực hiện theo phương pháp giảm nhiệt (touchdown), cụ thể: 95°C trong 5 phút; 30 chu kỳ gồm 94°C trong 1 phút, 65°C trong 1 phút (sau mỗi chu kỳ giảm 0,5°C), 72°C trong 1 phút; 15 chu kỳ gồm 94°C trong 1 phút, 50°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút; cuối cùng 72°C trong 2 phút và giữ máy ở 4°C sau khi kết thúc chu trình. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên agarose gel 1% trước khi tinh sạch và gửi giải trình tự hai chiều sử dụng cặp mồi CDC3UNI/CDC5UNI tổng hợp tại công ty Macrogen, Hàn Quốc.

### Xử lý số liệu

Trình tự các chuỗi nucleotide được phân tích bằng phần mềm Chromas (Technelysium, Úc). So sánh đối chiếu giữa các trình tự nucleotide trong nghiên cứu này với các trình tự nucleotide từ Ngân hàng gen được thực hiện bằng phần mềm BioEdit v7.2.6.1. Quan hệ nguồn gốc phát sinh chủng loại của các mẫu được phân tích bằng phần mềm MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016), theo phương pháp tối đa tương đồng (maximum likelihood) với mức tin cậy bootstrap 500.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Kết quả định nhóm huyết thanh của các chủng *N. meningitidis* phân lập được ở miền Bắc Việt Nam

Kết quả định nhóm huyết thanh của 19 mẫu

*N. meningitidis* trong nghiên cứu này cho thấy trong những năm gần đây, ở đối tượng thanh niên 19-25 tuổi, nhóm huyết thanh lưu hành phổ biến lưu hành ở miền Bắc Việt Nam là vi khuẩn viêm màng não nhóm B (NmB), chiếm 73,7% (14/19) tổng số mẫu thu được trong nghiên cứu này (Bảng 1). Nhóm huyết thanh còn lại là nhóm C (NmC), chiếm 26,3% (5/19) tổng số mẫu thu được. Trong số 19 mẫu, không thấy xuất hiện serogroup A, W, X và Y. Kết quả thu được phù hợp với các công bố gần đây tại Mỹ (Fletcher *et al.*, 2004), Châu Âu (Prevention, Control, 2013) và Úc (Lahra, Enriquez, 2014), theo đó NmB là type huyết thanh gây bệnh chủ yếu trong nhóm các chủng *N. meningitidis* gây bệnh ở thanh thiếu niên đang lưu hành tại các khu vực này.

### Đánh giá mức độ đa hình allele và khả năng đáp ứng miễn dịch của các vùng biến đổi của gen *porA*

Gen *porA* mã hóa cho một trong số các protein bề mặt quyết định tính kháng nguyên vô của chủng *N. meningitidis* serogroup hiện đang được nghiên cứu như một ứng cử viên cho vaccine phổ hẹp kháng vi khuẩn não mô cầu. Chúng tôi đã tiến hành giải trình tự gen *porA* của toàn bộ 19 chủng vi khuẩn viêm màng não thu được, xác định trình tự allele của 3 vùng biến đổi VR1, VR2, VR3 và dự đoán khả năng phản ứng với kháng thể đơn dòng (mAb1) của trình tự amino acid suy diễn theo kết quả công bố của cơ sở dữ liệu PubMLST (Bảng 1). Cụ thể, trình tự ba vùng biến đổi VR1, VR2 và VR3 của gen *porA* được submit lên cơ sở dữ liệu PubMLST để gọi các trình tự allele tương ứng. Mỗi allele của các vùng biến đổi đều được định danh bắt đầu bởi tiền tố P1, số tiếp sau là họ trình tự tương ứng (family), và thứ tự xuất hiện chủng (VD: VR1: P1.7-2). Trong trình tự gen *porA* của 19 chủng viêm màng não thu thập được trong nghiên cứu này, vùng biến đổi VR1 thể hiện mức độ đa hình cao nhất, gồm 6 allele P1.20, P1.18, P1.22, P1.22-25, P1.7-2 và P1.121-24; tiếp đó là vùng biến đổi VR2 với 4 allele đã biết (2, 9, 14, 13-2) và một nhóm allele mới chưa xác định (X). Vùng biến đổi VR3 phân thành 4 biến dị allele, 26-2, 38-1, 36 và

35-1. Đáng chú ý, một biến dị allele thuộc VR1, P1.7-2, là biến dị khiến cấu trúc protein dựa trên trình tự amino acid suy diễn bị ẩn, giảm khả năng nhận biết của kháng thể đơn dòng (mAb) đối với epitope này. Bên cạnh đó, trình tự amino acid suy diễn của allele mới chưa xác

định thuộc vùng VR2 phát hiện trên 5/19 chủng thuộc nghiên cứu này không thể hiện tính đặc hiệu rõ rệt với các trình tự mAb đã biết, đồng nghĩa với việc có khả năng các chủng viêm màng não mang biến dị allele này không đáp ứng với vaccine kháng NmB hiện có.

**Bảng 1.** Danh sách các chủng *N. meningitidis* cung cấp trình tự gen *PorA* cho phân tích tương quan về di truyền

| Ký hiệu mẫu | Địa điểm thu mẫu | Năm phân lập | Nhóm huyết thanh | Nhóm dưới huyết thanh |                  |                  |   |
|-------------|------------------|--------------|------------------|-----------------------|------------------|------------------|---|
|             |                  |              |                  | VR1 <sup>a</sup>      | VR2 <sup>b</sup> | VR3 <sup>c</sup> | Khả năng phản ứng với mAb1 <sup>d</sup> |
| 1237C       | Hải Phòng        | 2012         | C                | P1.20                 | 2                | 26-2             | +                                       |
| 37C         | Hải Phòng        | 2012         | B                | P1.20                 | 2                | 26-2             | +                                       |
| 40C         | Hải Phòng        | 2012         | C                | P1.20                 | 2                | 26-2             | +                                       |
| 14155       | Hà Nội           | 2014         | C                | P1.20                 | 2                | 26-2             | +                                       |
| 14156       | Hà Nội           | 2014         | B/C              | P1.20                 | 2                | 26-2             | +                                       |
| 14157       | Hà Nội           | 2014         | C                | P1.20                 | 2                | 26-2             | +                                       |
| 14072       | Bắc Giang        | 2014         | B                | P1.18                 | X                | 38-1             | X                                       |
| 14075       | Bắc Giang        | 2014         | B                | P1.18                 | X                | 38-1             | X                                       |
| 14089       | Bắc Giang        | 2014         | B                | P1.18                 | X                | 38-1             | X                                       |
| 1513        | Hà Nội           | 2015         | B                | P1.18                 | X                | 38-1             | X                                       |
| 17084       | Hà Nội           | 2017         | B                | P1.22                 | 9                | 35-1             | +                                       |
| 17088       | Hà Nội           | 2017         | B                | P1.22-25              | X                | 36               | X                                       |
| 17090       | Hà Nội           | 2017         | B                | P1.22-25              | 14               | 36               | X                                       |
| 14196       | Thái Nguyên      | 2014         | B                | P1.7-2                | 13-2             | 35-1             | +H                                      |
| 16408       | Hà Nội           | 2016         | B                | P1.7-2                | 14               | 36               | +H                                      |
| 16416       | Hà Nội           | 2016         | B                | P1.7-2                | 14               | 36               | +H                                      |
| Ngọc        | Vĩnh Phúc        | 2009         | B                | P1.7-2                | 14               | 36               | +H                                      |
| 16406       | Hà Nội           | 2016         | B                | P1.7-2                | 14               | 36               | +H                                      |
| 1532        | Hà Nội           | 2015         | B                | P1.12-24              | 13-12            | 35-1             | +                                       |

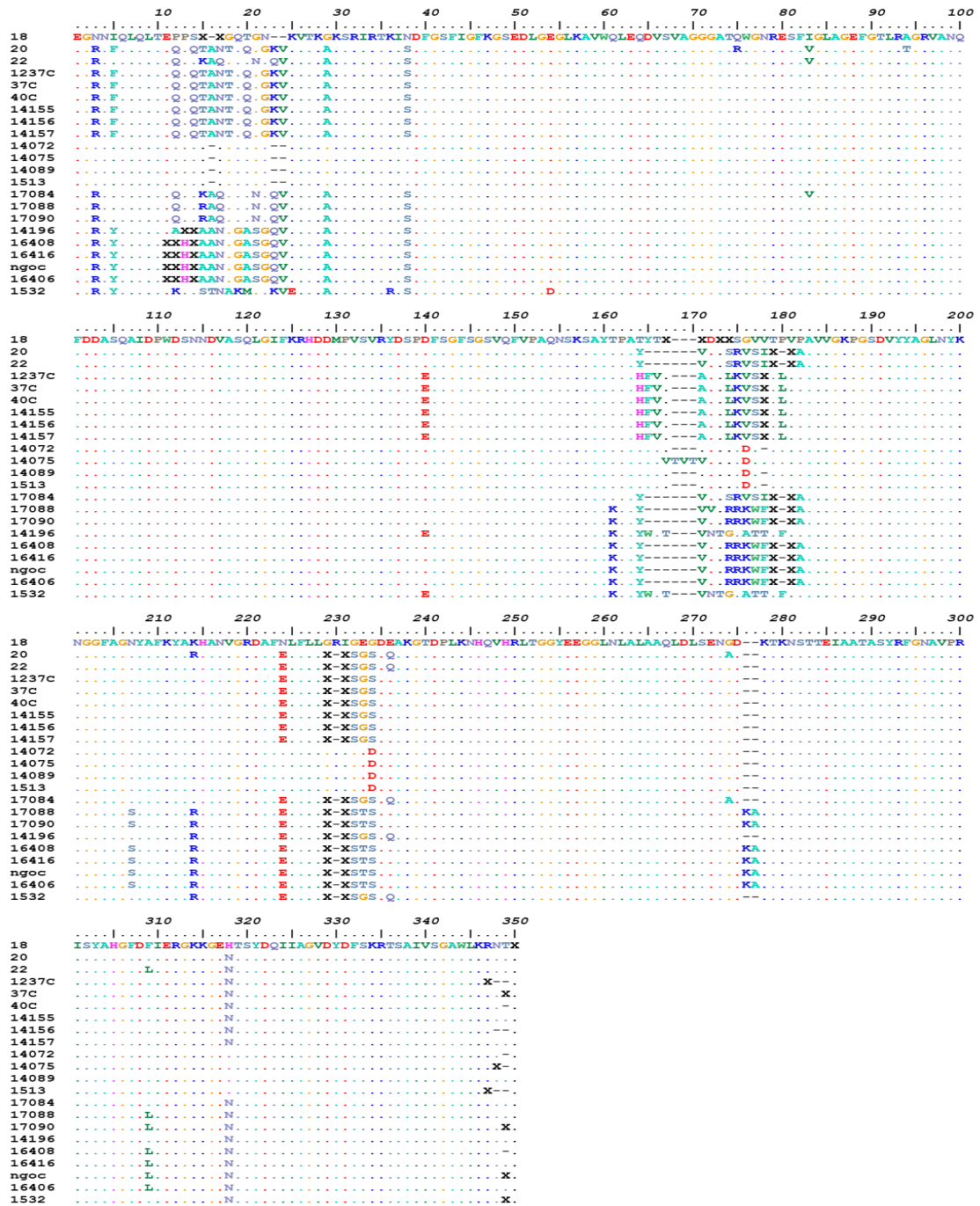
"a,b,c": Kết quả định danh khi so sánh trình tự DNA xác định vùng biến đổi (VR), "d": khả năng phản ứng với kháng thể đơn dòng mAb xác định theo ngân hàng dữ liệu pubMLST (Oxford, Vương quốc Anh), +: có phản ứng, X: chưa xác định, H (hidden): Epitope bị ẩn và chỉ phản ứng khi gen *porA* biến đổi.

Kết quả so sánh trình tự chuỗi amino acid suy diễn từ các chủng Việt Nam với các đoạn peptide từ ngân hàng dữ liệu pubMLST được trình bày ở Hình 1. Ba trình tự amino acid được lựa chọn để so sánh với các trình tự protein *PorA* của các chủng Việt Nam là X57183 (family

18 mAb-), X77425 (family 20 mAb+), X57181 (family 22 mAb1+). Đây là những trình tự được sử dụng phát triển vaccine NmB phổ biến hiện nay. Từ trình tự chuỗi amino acid cho thấy 4/5 chủng Việt Nam mang allele mới chưa xác định của vùng biến đổi VR2 (chủng 14072, 14075,

14089 và 1513) đều có chung một biến dị amino acid là G<sup>176</sup>→D. Riêng chủng 14075 mang thêm biến dị X<sup>167</sup>→V và chèn ba amino acid VTV tại

vị trí 168-170. Chúng còn lại, 17088, là chủng duy nhất mang biến dị thay thế 1 amino acid D<sup>172</sup>→V.

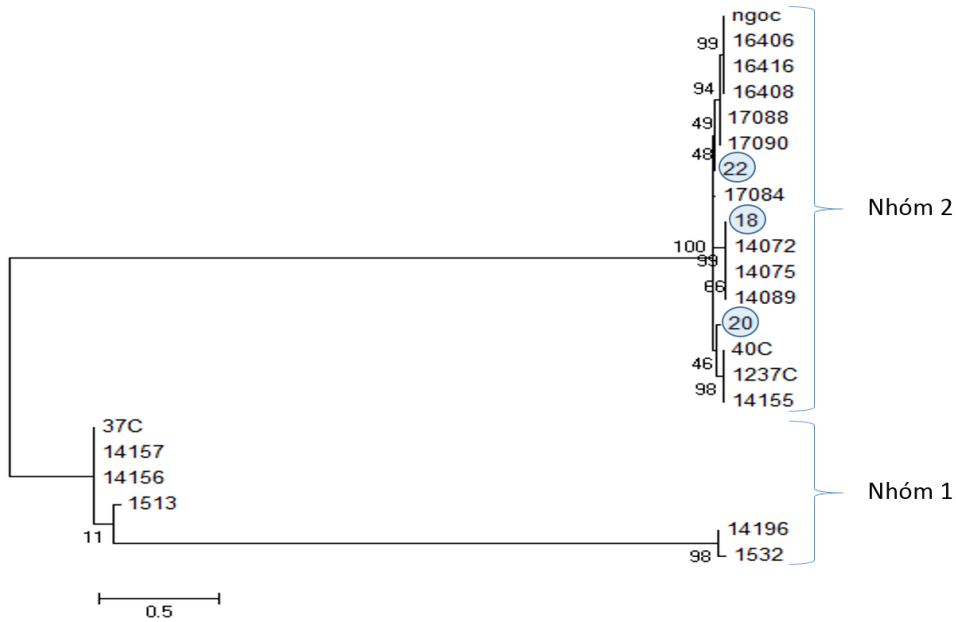


Hình 1. Trình tự amino acid suy diễn protein PorA của các chủng *N. meningitidis* lưu hành tại miền Bắc Việt Nam với các trình tự porA truy cập từ ngân hàng dữ liệu PubMLTS *Neisseria* spp. (18, 20, 22).

**Phân tích mối quan hệ di truyền phát sinh chủng loại của các chủng *N. meningitidis***

Sử dụng phần mềm MEGA7 bằng phương pháp “tối đa tương đồng” với độ tin cậy bootstrap 500, kết quả đa hình và mối quan hệ phát sinh chủng *N. meningitidis* tại miền Bắc Việt Nam dựa vào trình tự amino acid của protein PorA cho thấy 2 nhóm phát sinh rõ rệt. Nhóm 1 với 6 chủng tập hợp thành một cụm riêng biệt, trong đó 3 chủng 37C, 14157, 14156 có khoảng cách di truyền bằng nhau thể hiện sự tương đồng cao về nguồn gốc tiến hóa phân tử. Có quan hệ phát sinh gần gũi nhất với nhóm 1 là chủng 1513, bản thân 1513 lại hình thành một cụm tiến hóa với hai chủng 14196 và 1532.

Hướng tiến hóa còn lại lập thành nhóm 2 gồm đa số các chủng *N. meningitidis* thu thập được trong nghiên cứu này, với 13 chủng (68,4%) lập thành một cụm có khoảng cách di truyền phân tử rất gần gũi. Đặc biệt, 3 chủng thế giới (18, 20, 22) được sử dụng phổ biến trong thành phần các vaccine kháng NmB trên thế giới đều thuộc nhóm 2, hơn nữa 3 chủng nói trên chia 13 chủng của Việt Nam làm 3 nhóm tách biệt rõ rệt. Riêng chủng 17084 lập thành một nhánh độc lập so với các chủng còn lại trong nhóm 2 (Hình 2). Khái quát có thể thấy trình tự amino acid gen *porA* của các chủng *N. meningitidis* ở miền Bắc Việt Nam phân thành hai nhánh tiến hóa rất rõ rệt, trong đó các chủng thuộc mỗi nhánh có mức độ biến dị không quá lớn.



**Hình 2.** Mối quan hệ phát sinh chủng loại dựa trên trình tự amino acid suy diễn từ gen *porA* của các chủng *N. meningitidis* tại miền Bắc Việt Nam, phân tích bằng phần mềm MEGA7, theo phương pháp tối đa tương đồng (Maximum likelihood). Đơn vị chiều dài các nhánh là số sai khác nucleotide trên tổng số nucleotide so sánh. Ba allele 22, 18 và 20 (khoanh tròn) là những trình tự allele được sử dụng để sản xuất vaccine NmB đang lưu hành trên thế giới hiện nay.

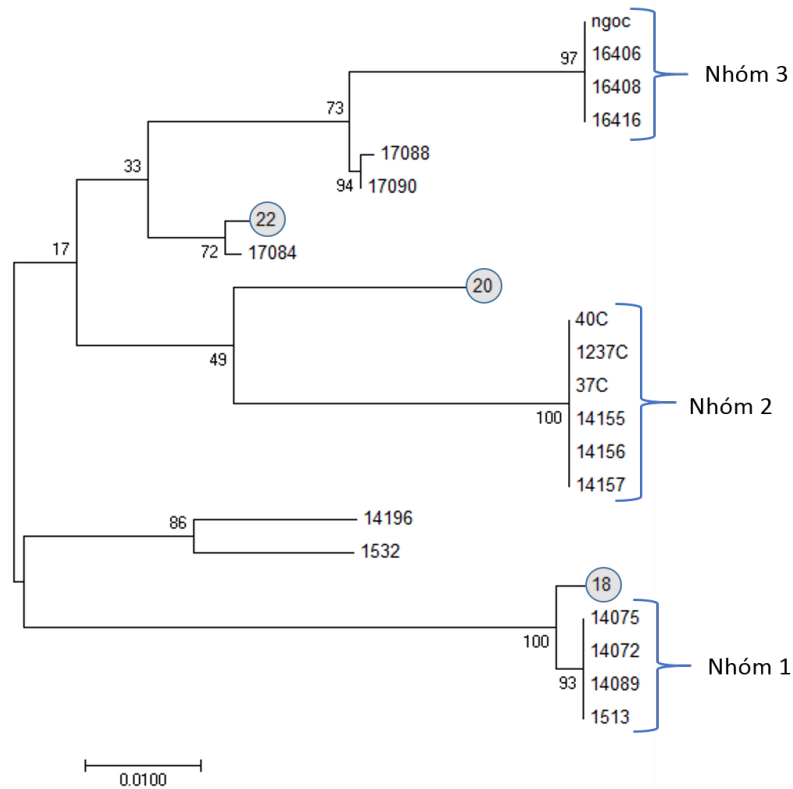
Khi so sánh trình tự nucleotide của gen *porA* của các chủng *N. meningitidis* trong nghiên cứu này, kết quả phân tích quan hệ phát sinh chủng loại sử dụng phương pháp tối đa tương đồng của phần mềm MEGA7 độ tin cậy bootstrap 500 được thể hiện ở Hình 3. Một cách

trực quan có thể nhận định cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự nucleotide của gen *porA* thể hiện mức đa dạng di truyền cao hơn so với khi phân tích bằng trình tự amino acid, phân ra làm 3 nhóm chính tương đối rõ rệt. Nhóm 1 gồm 4 chủng: 14075, 14072, 14089, 1513 thuộc

nhóm huyết thanh B có đặc điểm di truyền phân tử gần nhau nhất, trong nhánh này có sự phân ly về mặt di truyền gần với chủng *N. meningitidis* 18 ở nước Anh (Maiden *et al.*, 1991) mang vùng biến đổi VR1.18. Đáng chú ý, các chủng trong nhánh này đều mang biến dị allele chưa xác định thuộc vùng biến đổi VR2, có khả năng không đáp ứng với các kháng thể đơn dòng mAb đã biết (Bảng 1). Có quan hệ phát sinh gần gũi nhất với các chủng nhóm 1 là cụm phát sinh của hai chủng 14196 và 1532. Vùng biến đổi VR1 của hai chủng này có sai khác allele, lần lượt là P1.7-2 và P1.14-24, ngoài ra hai vùng biến đổi VR2 (13-2) và VR3 (35-1) giống nhau.

Nhóm 2 gồm 6 chủng *N. meningitidis*: 40C,

1237C, 37C, 14155, 14156, 14157 của Việt Nam tạo thành một cụm tương đồng di truyền, có đặc điểm phân tử giống nhau ở cả 3 phân vùng biến đổi VR1, VR2, VR3 và có chung nguồn gốc phát sinh với chủng *N. meningitidis* 20 (Anh Quốc). Nhánh còn lại lập thành nhóm 3 gồm 4 chủng: Ngọc, 16406, 16408, 16416 với 3 vùng biến đổi giống nhau và có vùng epitope bị ẩn. Cùng nguồn gốc phát sinh với cụm 4 chủng nói trên là 2 chủng 17088 và 17090. Chủng 17084 khác biệt nhất trong tổng số 19 chủng *N. meningitidis* nhóm B của Việt Nam ở 3 phân vùng biến đổi VR1.22,9,35-1, tách hẳn thành một nhánh riêng biệt có đặc điểm gen gần nhất với chủng *N. meningitidis* 22 (Anh Quốc).



**Hình 3.** Quan hệ di truyền phát sinh chủng loại giữa các chủng *N. meningitidis* theo thành phần nucleotide gen porA. Độ dài các nhánh cây phát sinh chủng loại dựng theo tỷ lệ, đơn vị mỗi sai khác nucleotide ở một vị trí. Ba allele 22, 18 và 20 (khoanh tròn) là những trình tự allele được sử dụng để sản xuất vaccine NmB đang lưu hành trên thế giới hiện nay

## KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thu thập

được tổng số 19 chủng vi khuẩn não mô cầu từ mẫu dịch nhầy họng hoặc dịch não tủy của các chiến sĩ tại các trại huấn luyện chiến sĩ trên địa

bản miền bắc Việt Nam trong giai đoạn 2008 – 2017. Kết quả nghiên cứu bước đầu đã nhận diện được các vị trí biến đổi đa hình trong trình tự nucleotide và amino acid suy diễn của ba phân vùng biến đổi chính thuộc gen *porA* là VR1, VR2 và VR3, dự đoán được khả năng phản ứng với các kháng thể đơn dòng mAb phổ biến hiện đang được sử dụng để phát triển vaccine kháng vi khuẩn não mô cầu nhóm B. Đặc biệt, chúng tôi đã phát hiện được 5/19 chủng nghiên cứu mang các biến dị thuộc phân vùng biến đổi VR2 của gen *porA* thuộc nhóm allele mới chưa được công bố, hiện chưa có kết quả thử nghiệm đáp ứng miễn dịch với các kháng thể đơn dòng đã biết. Đây là những kết quả bước đầu thể hiện tính đặc trưng cao và nhiều đặc điểm miễn dịch mới của các chủng não mô cầu đang lưu hành tại Việt Nam.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được thực hiện bằng kinh phí tài trợ của Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ quốc gia Nafosted cho đề tài mã số 106-NN.02-2015.66. Các tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của Viện Công nghệ sinh học và Viện Y học dự phòng Quân đội.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bjune G, Hoiby E, Gronnesby J, Arnesen O, Fredriksen JH, Lindbak A, Nokleby H, Rosenqvist E, Solberg L, Closs O (1991) Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. *Lancet* 338(8775): 1093-1096.
- Boslego J, Garcia J, Cruz C, Zollinger W, Brandt B, Ruiz S, Martinez M, Arthur J, Underwood P, Silva W (1995) Efficacy, safety, and immunogenicity of a meningococcal group B (15: P1. 3) outer membrane protein vaccine in Iquique, Chile. *Vaccine* 13(9): 821-829.
- Breakwell L, Whaley M, Khan UI, Bandy U, Alexander-Scott N, Dupont L, Vanner C, Chang H-Y, Vuong JT, Martin S (2018) Meningococcal carriage among a university student population—United States, 2015. *Vaccine* 36(1): 29-35.
- Cartwright K, Morris R, Rümke H, Fox A, Borrow R, Begg N, Richmond P, Poolman J (1999) Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (PorA) outer membrane proteins. *Vaccine* 17(20-21): 2612-2619.
- Filippis I, de Andrade CF, Silva L, Prevots DR, Vicente ACP (2007) PorA variable antigenic regions VR1, VR2, and VR3 of *Neisseria meningitidis* serogroups B and C isolated in Brazil from 1999 to 2004. *Infect Immun* 75(7): 3683-3685.
- Findlow J, Taylor S, Aase A, Horton R, Heyderman R, Southern J, Andrews N, Barchha R, Harrison E, Lowe A (2006) Comparison and correlation of *Neisseria meningitidis* serogroup B immunologic assay results and human antibody responses following three doses of the Norwegian meningococcal outer membrane vesicle vaccine MenBvac. *Infect Immun* 74(8): 4557-4565.
- Fletcher LD, Bernfield L, Barniak V, Farley JE, Howell A, Knauf M, Ooi P, Smith RP, Weise P, Wetherell M (2004) Vaccine potential of the *Neisseria meningitidis* 2086 lipoprotein. *Infect Immun* 72(4): 2088-2100.
- Frasch CE (1995) *Meningococcal vaccines: past, present and future*. In Cartwright K, ed. *Meningococcal Disease*. New York: Wiley 245-283.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33(7): 1870-1874.
- Lahra M, Enriquez R (2014) Australian Meningococcal Surveillance Programme annual report, 2013. *Commun Dis Intell Q Rep* 38(4): E301-308.
- Moraes JC, Camargo M, Hidalgo NR, Barbosa HA, Gattas V, Vasconcelos HdG, Sacchi CT, Gral IL, Perkins B, Wenger J (1992) Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. *Lancet* 340(8827): 1074-1078.
- Maiden M, Suker J, McKenna A, Bygraves J, Feavers I (1991) Comparison of the class 1 outer membrane proteins of eight serological reference strains of *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 5(3): 727-736.
- Martin S, Borrow R, Van Der Ley P, Dawson M, Fox A, Cartwright K (2000) Effect of sequence variation in meningococcal PorA outer membrane protein on the effectiveness of a hexavalent PorA outer membrane vesicle vaccine. *Vaccine* 18(23): 2476-2481.



Nguyễn Trần Chính (1992) Bộ môn Truyền nhiễm, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh. BỆNH TRUYỀN NHIỄM. Nhà xuất bản Hội Y Dược học Thành phố Hồ Chí Minh 255 -271.

Organization WH, Control CfD, Prevention (2011) *Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by neisseria meningitidis, streptococcus pneumoniae, and haemophilus influenzae*: WHO manual.

Oster P, Lennon D, O'Hallahan J, Mulholland K, Reid S, Martin D (2005) MeNZB™: a safe and highly immunogenic tailor-made vaccine against the New Zealand Neisseria meningitidis serogroup B disease epidemic strain. *Vaccine* 23(17-18): 2191-2196.

Prevention ECfD, Control (2013) *Surveillance of invasive bacterial diseases in Europe, 2012*, ECDC Stockholm, Sweden.

Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic

T, Hughes JM (2001) Meningococcal disease. *N Engl J Med* 344(18): 1378-1388.

Sierra G, Campa H, Varcacel N, Garcia I, Izquierdo P, Sotolongo P, Casanueva G, Rico C, Rodriguez C, Terry M (1991) Vaccine against group B Neisseria meningitidis: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann*14(2): 195-207; discussion 208-110.

Tryfinopoulou K, Kesanopoulos K, Xirogianni A, Marmaras N, Papandreou A, Papaevangelou V, Tsolia M, Jasir A, Tzanakaki G (2016) Meningococcal carriage in military recruits and university students during the Pre MenB vaccination era in Greece (2014-2015). *PLoS One* 11(12): e0167404.

Urwin R, Russell JE, Thompson EA, Holmes EC, Feavers IM, Maiden MC (2004) Distribution of surface protein variants among hyperinvasive meningococci: implications for vaccine design. *Infect Immun*72(10): 5955-5962.

## **POLYMORPHISM AT VARIABLE REGIONS (VRs) OF *porA* GENE FROM *Neisseria meningitidis* STRAINS ISOLATED IN NORTHERN VIETNAM**

**Tran Xuan Thach<sup>1</sup>, Le Thu Trang<sup>1</sup>, Trieu Phi Long<sup>2</sup>, Nguyen Thi Hoa<sup>1</sup>, Dong Van Quyen<sup>1,3</sup>, Nguyen Minh Huong<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Military Institute of Preventative Medicine*

<sup>3</sup>*University of Science and Technology of Hanoi, Vietnam Academy of Science and Technology*

### **SUMMARY**

Meningococcal bacterium *Neisseria meningitidis* is one of the major causes of meningitis worldwide. Currently in Vietnam, *N. meningitidis* B and C are the most prevalent invasive serogroups. *N. meningitidis* expresses two major transmembrane proteins, PorA and PorB, of which PorA showed high levels of polymorphism among strains and has been studied as one component of vaccines against *N. meningitidis* B. Polymorphisms in *porA* gene clustered into three variable regions VR1, VR2 and VR3. In this study, we sequenced the entire *porA* gene of 19 *N. meningitidis* strains isolated from military units in northern Vietnam during the period 2008 – 2017 in order to: (1) evaluate the polymorphism of *porA* gene at nucleotide level and predict its immunoreactivity from annotated amino acid sequences; and (2) compare *porA* variants of Vietnamese strains with known strains worldwide. Our results showed a high level of polymorphisms among Vietnamese strains, with the highest polymorphism found in VR1, followed by VR2 and VR3. Notably, 5/19 strains in this study showed novel variants at VR2 with unknown immunological reactivity. This result suggested potential novel immunological characteristics of meningococcal strains from Vietnam.

**Keywords:** *Neisseria meningitidis*, *porA*, variable region VR, Vietnam, vaccine