

ĐẶC ĐIỂM DI TRUYỀN PHÂN TỬ CỦA *NEISSERIA MENINGITIDIS* (SEROGROUPS VÀ GENOSUBTYPES) PHÂN LẬP Ở MỘT SỐ ĐƠN VỊ QUÂN ĐỘI KHU VỰC PHÍA BẮC (2014-2017)

VÕ VIẾT CƯỜNG⁽¹⁾, BÙI THỊ LAN ANH⁽¹⁾, NGUYỄN VĂN MINH⁽¹⁾, TRIỆU PHI LONG⁽²⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh nhiễm khuẩn do não mô cầu *Neisseria meningitidis* là bệnh truyền nhiễm cấp tính, gây dịch. Bệnh lây truyền qua đường hô hấp do hít phải các giọt nhỏ dịch tiết mũi họng bị nhiễm não mô cầu. Tỷ lệ người mang mầm bệnh không triệu chứng chiếm khoảng 5÷10% trong cộng đồng và 20÷25% ở lứa tuổi trưởng thành [8, 9]. Ở nước ta, não mô cầu có khả năng gây các vụ dịch nhỏ và ca bệnh rải rác khắp tỉnh thành trên cả nước, nguy cơ dịch lây lan trong cộng đồng là rất lớn, nhất là nơi đông dân cư và sống tập trung như: quân đội, nhà tù... Theo số liệu thống kê không đầy đủ từ năm 2011 tới nay, cả nước có 610 ca nhiễm bệnh và năm có số người mắc bệnh cao nhất là năm 2011 với 272 ca nhiễm viêm não mô cầu [2].

Dựa vào cấu trúc kháng nguyên ngoài màng của *N.meningitidis*, đã xác định được 12 serogroup (nhóm huyết thanh) khác nhau, trong đó 90% các ca bệnh trên thế giới tập trung vào các serogroup A, B, C, Y và W135 [8]. Theo phân vùng dịch tễ, các nước thuộc khu vực châu Âu chủ yếu có sự lưu hành của serogroup A, C, Y, W135 và các nước thuộc khu vực châu Mỹ có sự lưu hành chủ yếu của serogroups B, C và W135 [4, 8, 11]. Trong giám sát dịch tễ học não mô cầu, ngoài xác định serogroup thì việc xác định serosubtype bằng phương pháp huyết thanh học dựa trên panel kháng thể đơn dòng vùng biến đổi VR1, VR2 của protein màng ngoài PorA là hết sức cần thiết nhằm tiên lượng dự báo nguy cơ bùng phát dịch, phân vùng dịch tễ học theo khu vực và đề xuất chiến lược dự phòng bằng vắc xin [6, 7]. Xác định genosubtype dựa trên trình tự nucleotit vùng biến đổi VR1, VR2 của gen *porA* được sử dụng ngày càng rộng rãi để giám sát não mô cầu [7, 11]. Nghiên cứu này trình bày đặc điểm di truyền phân tử (serogroup và genosubtype) của *N. meningitidis* phân lập ở một số đơn vị Quân đội phía Bắc, giai đoạn 2014÷2017.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các chủng *N. meningitidis* phân lập trong chương trình giám sát não mô cầu của Viện Y học dự phòng Quân đội/Cục Quân y giai đoạn 2014÷2017.

2.2. Hóa chất, thiết bị

Hóa chất Kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN - 51306), Bộ kit tinh sạch sản phẩm PCR MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification, PCR master mix 2X (Intron biotechnology, Hàn Quốc), các hóa chất khác đạt chuẩn sinh học phân tử.

2.3. Phương pháp nghiên cứu, kỹ thuật sử dụng

2.3.1. Phương pháp: Phân tích thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

2.3.2. Xác định serogroups bằng kỹ thuật multiplex-PCR

Trình tự các cặp mồi cho phản ứng multiplex-PCR: Thiết kế mồi phát hiện serogroup A trên vùng gen *orf-2*; phát hiện serogroup: B, C, W135, Y trên vùng gen *siaD*. Mồi do hãng Invitrogen sản xuất có trình tự trong bảng 1.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi xác định nhóm huyết thanh [10]

Trình tự mồi	Gen đích	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
5'-CGCAATAGGTGTATATATTCTTCC-3'	<i>orf-2</i> (A)	400
5'-CGTAATAGTTTCGTATGCCTTCTT-3'		
5'-GGATCATTTTCAGTGTTCACCA-3'	<i>siaD</i> (B)	450
5'-GCATGCTGGAGGAATAAGCATTA-3'		
5'-TCAAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT-3'	<i>siaD</i> (C)	250
5'-CAATCACGATTTGCCCAATTGAC-3'		
5'-CAGAAAGTGAGGGATTCCATA-3'	<i>siaD</i> (W135)	120
5'-CACAACCATTTTCATTATAGTTACTGT-3'		
5'-CTCAAAGCGAAGGCTTTGGTTA-3'	<i>siaD</i> (Y)	120
5'-CTGAAGCGTTTTCATTATAATTGCTAA-3'		

Phản ứng PCR được thực hiện trong thể tích 50 µl: 25 µl PCR master mix 2X; 1,25 µl mồi mỗi loại (10 pmol); 19,5 µl H₂O; 3 µl DNA khuôn. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm các bước: Biến tính ở 94°C trong 10 phút; tiếp theo 35 chu kỳ phản ứng của 94°C trong 30 giây, 60°C trong 45 giây, 72°C trong 30 giây. Phản ứng được kết thúc với chu kỳ kéo dài chuỗi ở 72°C trong 10 phút.

2.3.3. Xác định genosubtype dựa trên gen *porA* bằng kỹ thuật PCR

- *Trình tự mồi nhân đoạn gen porA*: PorA_F: 5'-AAA CTT ACC GCC CTC GTA-3' và PorA_Rv: 5'-TTA GAA TTT GTG GCG CAA ACC GAC-3 (Biosearch Technologies, Mỹ) được thiết kế dựa trên công bố của Jelfs [7]. Thành phần phản ứng PCR (50 µl): 25 µl PCR master mix 2X; 1,25 µl mồi mỗi loại; 19,5 µl H₂O; 3 µl DNA khuôn. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm các bước: Biến tính ở 94°C trong 2 phút; tiếp theo 35 chu kỳ phản ứng của 94°C trong 20 giây, 64°C trong 20 giây, 72°C trong 60 giây. Phản ứng được kết thúc với chu kỳ kéo dài chuỗi ở 72°C trong 4 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di gel agarose 2%.

- *Tinh sạch DNA*: Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA Purification và giải trình tự theo phương pháp Sanger (1stBASE, Malaysia) tại công ty 1st BASE.

- *Phân tích, xử lý số liệu*: Sử dụng phần mềm DNASTAR để đọc và ghép các trình tự DNA. Genosubtype của *N.meningitidis* được xác định từ cơ sở dữ liệu của *N. meningitidis* trên website: <https://pubmlst.org/neisseria/PorA>.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Cơ cấu serogroup

Đã thu thập được 48 chủng *N. meningitidis* từ chương trình giám sát não mô cầu của Viện Y học dự phòng Quân đội trong thời gian 2014 đến 2017, trong đó có 2 chủng phân lập từ ca bệnh, 46 chủng phân lập từ người lành mang mầm bệnh (bảng 2).

Bảng 2. Cơ cấu serogroups *N. meningitidis* (2014-2017)

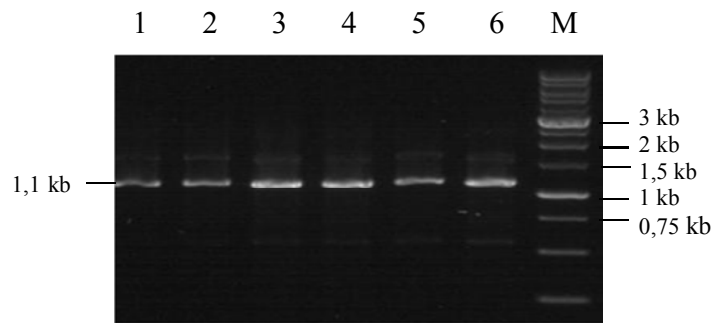
Phân loại	Năm giám sát				Tổng (%)
	2014	2015	2016	2017	
Serogroup B	18	3	13	4	38 (79,16%)
Serogroup C	3	0	0	0	3 (6,25%)
KXD	0	0	4	3	7 (14,58%)

KXD: không xác định

Kết quả xác định các serogroup cho thấy trong số 48 chủng thu thập được có 38 chủng thuộc serogroup B chiếm đa số với 79,16%, nhóm C chiếm 6,25% (3/48), còn lại là các serogroup khác không thuộc 5 nhóm gây bệnh chủ yếu A, B, C, W135 và Y. Trong quân đội, dịch nhiễm não mô cầu chủ yếu bùng phát tại các đơn vị huấn luyện tân binh. Giám sát nhiễm *N.meningitidis* trên tân binh khu vực miền Nam năm 2012 là 15,5% trong đó serogroup B là 21%, và serogroup C chiếm 5% và [1]. Kết quả giám sát 45 ca bệnh được chẩn đoán lâm sàng do nhiễm não mô cầu thu dung điều trị tại các bệnh viện Quân y từ năm 2008÷2014, phát hiện 29 ca do nhiễm khuẩn não mô cầu, 86% các trường hợp là do serogroup B. Kết quả điều tra 946 quân nhân ở một số đơn vị quân đội khu vực miền Bắc từ 2008÷2014 cho thấy tỷ lệ người mang mầm bệnh là chung là 29%, khi có dịch là 33%, ngoài vụ dịch là 26%. Cơ cấu serogroup trên người mang mầm bệnh gồm: nhóm B (83%), nhóm C (10%), nhóm W135 (1%) và 6% không xác định [3].

3.2. Xác định cơ cấu genosubtype *N. meningitidis*

Gen *porA* có kích thước 1179 bp mã hóa cho protein màng ngoài lớp I PorA, trọng lượng phân tử 44 kDa. Trong nghiên cứu này, đoạn gen *porA* chứa vùng VR1, VR2 được khuếch đại cặp mồi đặc hiệu có kích thước khoảng 1,1 kb. Kết quả kiểm tra sản phẩm khuếch đại đoạn gen *porA* bằng điện di cho thấy xuất hiện băng DNA có kích thước theo lý thuyết (hình 1). Sản phẩm PCR được giải trình tự theo phương pháp Sanger (1stBASE, Malaysia), ghép và đọc trình tự DNA bằng phần mềm DNASTAR. Trong số 48 chủng *N. meningitidis*, vì những lý do khác nhau nhóm tác giả chỉ nhận được trình tự đoạn gen *porA* của 38 chủng để phục vụ các nghiên cứu tiếp theo. Từ dữ liệu trình tự gen *porA* trên website: <https://pubmlst.org/neisseria/PorA> đã xác định được các genosubtype *N. meningitidis* (bảng 3).



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen *porA*
1-6: Sản phẩm PCR đoạn gen *porA*, M: Thang DNA (1 kb).

Kết quả bảng 3 cho thấy xác định được 8 serosubtype trong số 38 chủng *N. meningitidis*, gồm: P1.7-2, 13-1, P1.7-2, 13-2, P1.7-2, 13-9, P1.7-2, 14, P1.18, 25-11, P1.19, 15-23, P1.20, 2 và P1.22-25, 14. Có 7 chủng (18,4%) chỉ xác định được một phần (VR1) hoặc không xác định được genosubtype do trình tự gen *porA* của các chủng *N. meningitidis* này chưa có trong dữ liệu trên website: <https://pubmlst.org/neisseria/PorA>. Về cơ cấu genosubtype cho thấy P1.22-25,14 chiếm 34,2% (13/38), P1.7-2,13-1 chiếm 10,5% (4/38), các genosubtype khác chiếm tỷ lệ thấp hơn, từ 2,6% đến 7,9%.

Bảng 3. Cơ cấu serosubtype *N. meningitidis*

STT	Serosubtype (VR1, VR2)	Loại mẫu	Serogroups	Số lượng chủng (%)
1	P1.7-2, 13-1	NLMT	B	4 (10,5)
2	P1.7-2, 13-2	NLMT	B	2 (5,2)
3	P1.7-2, 13-9	NLMT	B	3 (7,9)
4	P1.7-2, 14	NLMT	B	3 (7,9)
5	P1.18, 25-11	NLMT	B	1 (2,6)
6	P1.19, 15-23	NLMT	B	2 (5,2)
7	P1.20, 2	NLMT	B (1), C (2)	3 (7,9)
8	P1.22-25, 14	NLMT	B	13 (34,2)
9	KXĐ	NLMT	B	7 (18,4)

(KXĐ: không xác định, BN bệnh nhân, NLMT: người lành mang mầm bệnh)

Một số nghiên cứu cho thấy sử dụng phương pháp huyết thanh học chỉ xác định được một số lượng nhỏ các serosubtype do sự hạn chế về panel kháng thể đơn dòng. Xác định genosubtype dựa vào trình tự nucleotit của gen *porA* (vùng VR1 và VR2) được sử dụng rộng rãi trong giám sát não mô cầu, cho phép xác định các chủng không xác định được serosubtype bằng phương pháp huyết thanh học [6, 7, 11]. Nghiên cứu serosubtype thuộc serogroup B của *N. meningitidis* thu thập tại khu vực bắc Tây Ban Nha giai đoạn 2000÷2003 cho thấy bằng phương pháp huyết thanh học trong số 96 chủng chỉ 9 chủng xác định được serosubtype, 78 chủng chỉ xác định được 1 phần (VR1 hoặc VR2) và 9 chủng không xác định. Trong khi đó sử dụng phương pháp sinh học phân tử, với 96 chủng đều xác định được genosubtype. Các genosubtype lưu hành chủ yếu là P1.5-1,10-8 (20 chủng), P1.19, 15 (14 chủng), P1.22, 9 (11 chủng) và P1.5, 2 (9 chủng) [11]. Nghiên cứu dựa trên các trình tự nucleotide vùng VRI, VRII, VRIII gen *porA* của *N. meningitidis* phân lập trên các bệnh nhân ở Scotland cho thấy các genosubtype phổ biến là P1.18-1, 3, 38 và P1.22, 14, 36 [6]. Kết quả xác định genosubtype 109 chủng huyết thanh nhóm B của *N. meningitidis* gây bệnh ở Australia giai đoạn 2000÷2011 cho thấy genosubtype lưu hành chủ yếu là: P1.22,14-16 (23 chủng) và P1.7-2,4 (19 chủng) [4].

Hiện nay 2 loại vắc xin phòng nhiễm não mô cầu được cấp phép sử dụng ở Việt Nam: (1) vắc xin phòng não mô cầu serogroup A và C Meningo AC (Pháp), tiêm cho trẻ từ 2 tuổi trở lên, tiêm 2 mũi cách nhau 3 năm; (2) vắc xin VA-MENGOC-BC (Cu-Ba) phòng não mô cầu serogroup B và C, tiêm 2 mũi nhau 6 đến 8 tuần cho trẻ từ 3 tháng tuổi trở lên. Vắc xin VA-MENGOC-BC là một phức hợp của protein PorA serogroup B và thành phần polysaccharide vỏ capsular tinh sạch nhóm huyết thanh C, theo công bố của nhà sản xuất, thành phần kháng nguyên của vắc xin chủng B:4:P1.19,15, với kết quả phân tích genosubtype của não mô cầu thuộc serogroup B từ các chủng của Việt Nam không thấy có sự tương thích cao với chủng *N. meningitidis* dự tuyển sản xuất vắc xin của Cu Ba [9]. Do vậy việc mở rộng điều tra giám sát các genosubtype của *N. meningitidis* serogroup B là cần thiết, làm cơ sở cho chiến lược sử dụng và nghiên cứu sản xuất vắc xin dự phòng não mô cầu cả trong và ngoài quân đội.

4. KẾT LUẬN

Serogroup B chiếm đa số với tỷ lệ 79,17% trong 48 chủng *N. meningitidis* phân lập được tại một số đơn vị quân đội khu vực miền Bắc, giai đoạn 2014÷2017, nhóm C chiếm 6,25%, không xác định là 14,58%.

Đã xác định được 8 genosubtype gồm P1.7-2, 13-1, P1.7-2, 13-2, P1.7-2, 13-9, P1.7-2, 14, P1.18, 25-11, P1.19, 15-23, P1.20, 2 và P1.22-25, 14 trong số 36 chủng *N. meningitidis* serogroup B và 2 chủng serogroup C. Genosubtype chiếm tỷ lệ cao là P1.22-25,14 (34,21%), P1.7-2,13-1 (10,52%); các genosubtype khác chiếm tỷ lệ từ 2,6% đến 7,9%. 7 chủng (18,42%) không xác định được genosubtype.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Thị Hoan, Võ Thị Trang Đài, Phan Văn Thành, Uông Nguyễn Đức Ninh, Nguyễn Thị Kim Hoàng, *Nhóm huyết thanh và tình hình kháng kháng sinh của Neisseria meningitidis trên tân binh tại một số doanh trại quân đội khu vực phía Nam, năm 2012 -2014*, Tạp chí Y học dự phòng, 2014, **11**:58-62.
2. Quỳnh Viên, *Viêm màng não do não mô cầu*, Tạp chí Thuốc và Sức khỏe, 2014, **4**:24-25.
3. Triệu Phi Long, Lê Thu Hà, Lê Hải Yến, Đoàn Trọng Tuyên, *Giám sát dịch tễ học não mô cầu tại một số đơn vị quân đội khu vực miền Bắc từ 2008- 2014*, Tạp chí Truyền nhiễm Việt Nam, 2015, **2**:16-21.
4. Barra G.N., Araya P.A., Fernandez J.O., Gabastou J.M., Hormazábal J.C., Seoane M., Pidal P.C., Valenzuela M.T., Ibarz-Pavón A.B., *Molecular characterization of invasive Neisseria meningitidis strains isolated in Chile during 2010-2011*, PLoS One, 2013, **8**(6):e66006. doi: 10.1371/journal.pone.0066006.
5. Boan P., Metasan N., Tempone S., Harnett G., Speers D.J., Keil A.D., *Neisseria meningitidis porA, fetA and fHbp gene distribution in Western Australia 2000 to 2011*, BMC Infect Dis. 2014, **14**: doi: 10.1186/s12879-014-0686-x.
6. Diggle M.A., Clarke S.C., *Detection and genotyping of meningococci using a nested PCR approach*, Journal of Medical Microbiology, 2003, **52**:51-57.
7. Jelfs J., Munro R., Wedge E., Caugant D.A., *Sequence variation in the porA gene of a clone of Neisseria meningitidis during epidemic spread*, Clin Diagn Lab Immunol., 2000, **7**(3):390-395.
8. Khatami A., Pollard A., *The epidemiology of meningococcal disease and the impact of vaccines*, Expert Rev. Vaccines, 2010, **9**(3):285-298.
9. Soeters H.M., Dinitz-Sklar J., Kulkarni P.A., MacNeil J.R., McNamara L.A., Zaremski E., Montana B., *Serogroup B Meningococcal Disease Vaccine Recommendations at a University, New Jersey, USA, 2016*, Emerging Infectious Diseases, 2017, **23**(5):867-869,
10. Taha M.K., *Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of Neisseria meningitidis*, J Clin Microbiol., 2000, **38**(2):855-857.
11. Vicente D., Esnal O., Michaus L., López de Goicoechea M.J., Cisterna R., Pérez-Trallero E., *Prevalence of genosubtypes (PorA types) of serogroup B invasive meningococcus in the north of Spain from 2000 to 2003*, J Med Microbiol., 2005, **54**(4):381-384.

SUMMARY

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *NESERRIA MENINGITIDIS* SEROGROUPS AND GENOSUBTYPES ISOLATED IN SOME NORTHERN MILITARY UNITS IN THE PERIOD 2012 - 2015

Based on polysaccharide capsule protein, *N. meningitidis* was subdivided into 13 serogroups. The distribution of serogroups depended on time and geographic areas. Most of these invasive disease cases are strains belonging to serogroups A, B, C, Y, and W-135. PorA is an outer membrane protein of most meningococcal isolates which contains two major variable regions (VR1 and VR2). Determination of VR1 and VR2 regions in *porA* gene plays very important role in epidemiology examination and vaccine production. Studying the structure of serogroups and genosubtypes of *N. meningitidis* isolated in several northern military units in period 2014 - 2017 showed that the serogroup B contributed to the highest rate which was estimated in 79.17%, followed serogroup C (6.25%), and the remaining rates belongs to the other serogroups except serogroups A, B, C, W135, and Y. The results for determination of genosubtype based on VR1 and VR2 regions of *porA* gene in 38 strains indicated that the highest genosubtypes were P1.22-25,14 (34,2%), followed P1.7-2,13-1 (10,5%). Other genosubtypes accounted from 2,6% to 7,9%. 7 strains (18,4%) were non-genosubtypeable.

Từ khóa: Não mô cầu, nhóm huyết thanh, *porA*, phân típ huyết thanh; *Neisseria meningitidis*, serogroup, *porA*, serosubtype.

Nhận bài ngày 24 tháng 8 năm 2017

Hoàn thiện ngày 20 tháng 10 năm 2017

⁽¹⁾ Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

⁽²⁾ Viện Y học Dự phòng Quân đội, Cục Quân y