

MOLECULAR DYNAMICS OF ARTEMISININ RESISTANCE IN *PLASMODIUM FALCIPARUM* IN SEVERAL PROVINCES OF CENTRAL HIGHLANDS 2016-2021

Nguyen Thi Minh Trinh^{1*}, Le Thi Hanh Dieu¹,
Nguyen Thi Lien Hanh¹, Nguyen Xuan Xa², Nguyen Thu Huong³, Huynh Hong Quang¹

¹Institute of Malariology Parasitology and Entomology Quy Nhon - 611B Nguyen Thai Hoc, Quy Nhon City, Vietnam

²National Institute of Malariology Parasitology and Entomology - 34 Trung Van, Nam Tu Liem Dist, Hanoi City, Vietnam

³Hanoi University of Public Health - 1A Duc Thang, Dong Ngac Ward, Bac Tu Liem Dist, Hanoi City, Vietnam

Received: 20/09/2024

Revised: 03/11/2024; Accepted: 28/11/2024

ABSTRACT

Objectives: Determining the prevalence of K_{13} gene mutations, a marker of artemisinin resistance, from 2016 to 2021 in the Central Highlands is essential to better understand the status of malaria resistance in the region.

Methods: Total DNA was extracted and used in Nested-PCR techniques to identify four species of malaria parasites; Sanger sequencing was performed to identify K_{13} gene mutations.

Results: A total of 539 blood samples were collected from 2019 to 2021, along with 304 retrospective samples from 2016 to 2018 in Gia Lai, Đắk Lắk, and Đắk Nông. The prevalence of the C580Y mutation increased over the periods: in Gia Lai, it was 22.91% (2016-2017), 69.77% (2018-2019), and 98.18% (2020-2021); in Đắk Lắk, the rates were 44.78%, 87.95%, and 86.07%; and in Đắk Nông, they were 50%, 79.55%, and 100%. The K_{13} gene mutations identified as resistant according to WHO in Gia Lai were ¾ types (C580Y, P553L, I543T); in Đắk Lắk, 2/4 types (C580Y, R539T); and in Đắk Nông, 2/3 types (C580Y, R539T, and the new mutation F446I).

Conclusion: The majority of K_{13} mutations in Gia Lai, Đắk Lắk, and Đắk Nông are identified as artemisinin-resistant mutations according to WHO, with C580Y being the most significant. The increasing rates of these mutations over time may correlate with the clinical drug resistance status in the region.

Keyword: *Plasmodium falciparum*, artemisinin resistance, molecular marker.

*Corresponding author

Email: nguyenthminhtrinh1983@gmail.com **Phone:** (+84) 935228913 **Https://doi.org/10.52163/yhc.v65iCD12.1857**

DIỄN BIẾN TÌNH TRẠNG KHÁNG ARTEMISININ Ở MỨC ĐỘ PHÂN TỬ CỦA *PLASMODIUM FALCIPARUM* TẠI MỘT SỐ TỈNH TÂY NGUYÊN GIAI ĐOẠN 2016-2021

Nguyễn Thị Minh Trinh^{1*}, Lê Thị Hạnh Diệu¹,
Nguyễn Thị Liên Hạnh¹, Nguyễn Xuân Xã², Nguyễn Thu Hương³, Huỳnh Hồng Quang¹

¹Viện Sốt rét-Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn - 611B Nguyễn Thái Học, Tp. Quy Nhơn, Việt Nam

²Viện Sốt rét-Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương - 34 Trung Văn, Q. Nam Từ Liêm, Tp. Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Y tế Công cộng - 1A Đức Thắng, P. Đông Ngạc, Q. Bắc Từ Liêm, Tp. Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài: 20/09/2024

Chỉnh sửa ngày: 03/11/2024; Ngày duyệt đăng: 28/11/2024

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xác định tỷ lệ đột biến gen K_{13} , chỉ thị kháng artemisinin, từ 2016-2021 tại miền Trung-Tây Nguyên để góp phần hiểu rõ tình trạng KSTSR kháng thuốc tại khu vực.

Phương pháp nghiên cứu: DNA tổng số được tách chiết và sử dụng kỹ thuật Nested-PCR để xác định 4 loài ký sinh trùng sốt rét; PCR giải trình tự bằng phương pháp Sanger để xác định các đột biến gen K_{13} .

Kết quả: Tổng cộng 539 mẫu máu được thu thập từ 2019-2021 và 304 mẫu hồi cứu từ 2016-2018 tại Gia Lai, Đắk Lắk và Đắk Nông. Tỷ lệ đột biến C580Y tăng dần qua các giai đoạn: tại Gia Lai: 22,91% (2016-2017), 69,77% (2018-2019), và 98,18% (2020-2021); tỷ lệ lần lượt tại Đắk Lắk: 44,78%, 87,95%, và 86,07%; và tại Đắk Nông là 50%, 79,55%, và 100%. Các đột biến gen K_{13} kháng theo WHO tại Gia Lai là 3/4 loại (C580Y, P553L, I543T); Đắk Lắk: 2/4 loại (C580Y, R539T); Đắk Nông: 2/3 loại (C580Y, R539T và F446I).

Kết luận: Đa số đột biến K_{13} tại Gia Lai, Đắk Lắk và Đắk Nông đều là đột biến xác định kháng artemisinin theo WHO, trong đó C580Y là quan trọng nhất. Tỷ lệ đột biến này tăng qua các giai đoạn, có thể liên quan đến tình trạng kháng thuốc lâm sàng trong khu vực

Từ khóa: *Plasmodium falciparum*, kháng artemisinin, chỉ điểm phân tử.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Artemisinin là một thuốc có hiệu lực và hiệu quả cao đối với ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium* spp. Tình hình kháng thuốc artemisinin và giảm nhạy với thuốc phối hợp artemisinin (ACTs) do chủng *P. falciparum* đã được ghi nhận tại một số khu vực thuộc Tiểu vùng sông Mê Kông mở rộng, kể cả Việt Nam đã và đang đe dọa đến thành quả công tác phòng chống và loại trừ sốt rét. Bên cạnh đó, việc sử dụng chỉ thị phân tử để xác định các chỉ điểm và đột biến phân tử liên quan kháng thuốc trên quần thể ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* là hướng nghiên cứu mới, hiện đại bên cạnh các thử nghiệm lâm sàng in vitro và in vivo.

Đến nay, các đột biến trên gen K_{13} đã được xác định là chỉ thị phân tử cho kháng artemisinin. Với các dữ liệu nghiên cứu đã được Tổ chức Y tế thế giới công nhận cho thấy *P. falciparum* đã kháng artemisinin và ACTs tại một số tỉnh trên cả nước, trong đó có các tỉnh thuộc

khu vực miền Trung-Tây Nguyên là Đắk Nông, Gia Lai, Đắk Lắk, Quảng Nam, Khánh Hoà và Ninh Thuận với tỷ lệ *P. falciparum* thể vô tính tồn tại ngày D3 cao trên 10% và có các đột biến gen K_{13} propeller.

Do đó, nghiên cứu này tiến hành nhằm mục tiêu khảo sát tình trạng kháng artemisinin ở mức độ phân tử trong giai đoạn 5 năm từ 2016 đến 2021 để hiểu rõ hơn sự tiến hoá và cơ chế kháng thuốc artemisinin.

2. ĐỐI TƯỢNG & PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu cắt ngang mô tả, hồi cứu số liệu và các kỹ thuật phòng thí nghiệm.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

*Tác giả liên hệ

Email: nguyeminhtrinh1983@gmail.com Điện thoại: (+84) 935228913 <https://doi.org/10.52163/yhc.v65iCD12.1857>

Mẫu máu khô trên giấy thấm Whatman 3MM từ các bệnh nhân sốt rét nhiễm loài *P. falciparum* đơn thuần hoặc phối hợp có *P. falciparum* tại các vùng sốt rét lưu hành và các cơ sở khám chữa bệnh - nơi bệnh nhân đến khám và điều trị thuộc ba tỉnh Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông.

2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Các mẫu vật được thu thập tại 3 tỉnh thuộc Tây Nguyên bao gồm Gia Lai, Đắk Lắk và Đắk Nông

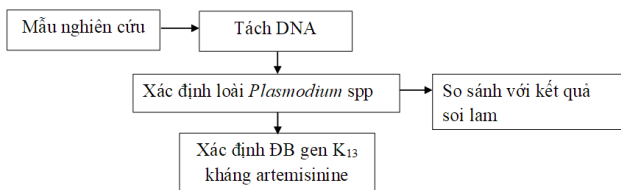
Nghiên cứu được tiến hành từ năm 2019 - 2021 và hồi cứu các số liệu từ năm 2016-2018.

2.4. Cỡ mẫu

Cỡ mẫu: thu thập mẫu thuận tiện, thu thập tất cả các mẫu máu dương tính với *P. falciparum* từ các địa điểm nghiên cứu trong giai đoạn từ năm 2019 đến 2022 và hồi cứu các số liệu từ năm 2016-2018.

2.5. Quy trình nghiên cứu và các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- Quy trình nghiên cứu



- Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:

Kỹ thuật tách chiết DNA tổng số (protocol của QIA-GEN), Nested-PCR xác định 4 loài KSTSR (Snounou và cộng sự, 1993); Kỹ thuật PCR để thu nhận gen K_{13} (Ariey và cộng sự, 2014); Kỹ thuật giải trình tự các đoạn gen K_{13} theo phương pháp Sanger thực hiện trên máy ABI3500.

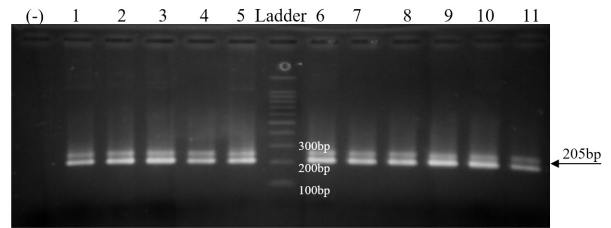
2.6. Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được phân tích trên phần mềm Geneious R8 và Microsoft Excel.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xác định loài ký sinh trùng Plasmodium spp của các mẫu nghiên cứu

Nghiên cứu phân tích tổng cộng 539 mẫu máu được thu thập tại các điểm nghiên cứu và hồi cứu số liệu của 304 mẫu trong giai đoạn từ năm 2016 đến 2018 của các tỉnh Gia Lai, Đắk Lắk và Đắk Nông. Các mẫu giấy thấm có chứa KSTSR dương tính sẽ được tiến hành tách chiết DNA và định loài lại bằng kỹ thuật nested-PCR. Kết quả được trình bày qua Hình 1 và được thể hiện sự phân bố mẫu theo thời gian và địa điểm ở Bảng 1.



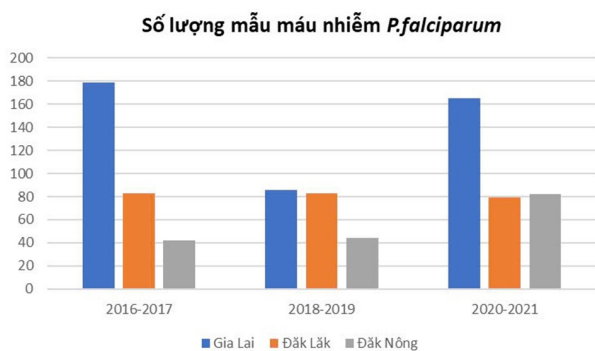
Hình 1. Kết quả điện di định loài các mẫu *P. falciparum*

Ghi chú: (-); chứng âm; 1: chứng dương *P. falciparum*, 205 bp; 2-11: mẫu *P. falciparum*; M: thang chuẩn 100bp.

Bảng 1. Số lượng các mẫu máu nhiễm *P. falciparum* sử dụng trong nghiên cứu

Thời gian	Địa điểm nghiên cứu			Tổng cộng
	Gia Lai	Đắk Lắk	Đắk Nông	
2016-2017	179	83	42	304
2018-2019	86	83	44	213
2020-2021	165	79	82	326
Tổng cộng	430	245	168	843

Tổng số mẫu phân tích trong nghiên cứu này là 843 mẫu. Trong đó, mẫu thu thập tại Gia Lai là cao nhất với 430 mẫu, và mẫu tại Đắk Nông là thấp nhất với 168 mẫu.



Hình 2. Biểu đồ phân bố thời gian và địa điểm thu thập mẫu KSTSR *P. falciparum*

3.2. Sự phân bố các đột biến gen K_{13} của *P. falciparum* liên quan kháng artemisinin

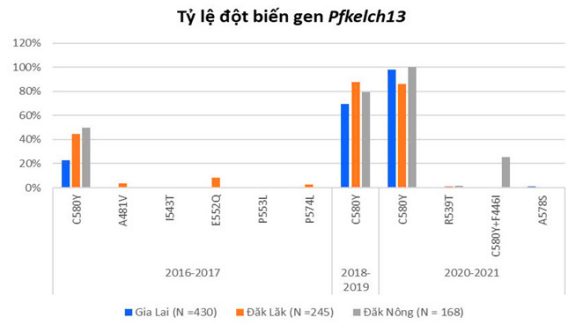
Các mẫu sau khi đã được xác định là *P. falciparum* sẽ được tiếp tục thực hiện phản ứng PCR để thu nhận gen mã hóa vùng K_{13} , với kích thước lý thuyết là khoảng 850bp. Sau khi phân tích so sánh các trình tự gen K_{13} thu nhận được từ quá trình giải trình tự bằng phần mềm phân tích Geneious R8 của 539 mẫu *P. falciparum* tại các điểm nghiên cứu, trong đó tại Gia Lai 251 mẫu, Đắk Lắk 162 mẫu và Đắk Nông là 126 mẫu. Đồng thời thu thập số liệu phân tích các đột biến trên vùng gen K_{13} của 304 mẫu hồi cứu. Đã phát hiện sự có mặt của 4 vị trí đột biến là R539T, C580Y, I446F và A578S trong

nhóm mẫu nghiên cứu và các vị trí đột biến C580Y, P553L, I543T, E552Q, P574L, A481V trong nhóm mẫu hồi cứu. Số lượng và tỷ lệ từng loại đột biến thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Số lượng và tỷ lệ các đột biến trên gen K₁₃ tại các địa điểm

Đột biến gen K ₁₃	Thời gian		
	Địa điểm thu thập mẫu nghiên cứu		
	Gia Lai (N=430)	Đắk Lắk (N=245)	Đắk Nông (N=168)
2016-2017			
Pfkelch13-C580Y	22,91% (41/179)	44,78% (38/83)	50% (21/42)
Pfkelch13- A481V	0%	3,61% (3/83)	0%
Pfkelch13- I543T	0,006% (1/179)	0%	0%
Pfkelch13- E552Q	0%	8,43% (7/83)	0%
Pfkelch13- P553L	0,12% (2/179)	0%	0%
Pfkelch13- P574L	0%	2,41% (2/83)	0%
2018-2019			
Pfkelch13-C580Y	69,77% (60/86)	87,95% (73/83)	79,55% (35/44)
2020-2021			
Pfkelch13-C580Y	98,18% (162/165)	86,07% (68/79)	100% (82/82)
Pfkelch13-R539T	0%	1,27% (1/79)	1,3% (1/82)
Pfkelch13 C580Y+F446I	0%	0%	25,6% (21/82)
Pfkelch13-A578S	1,006% (1/165)	0%	0%

Như vậy, tại 3 tỉnh Gia Lai, Đắk Lắk và Đắk Nông đều có sự xuất hiện của đột biến C580Y trong giai đoạn từ năm 2016 đến 2021. Tại Gia Lai, tỷ lệ xuất hiện đột biến C580Y là 22,91%(41/179), 69,77% (60/86), 98,18%(162/165) tương ứng với giai đoạn 2016-2017, 2018-2019, 2020-2021, tỷ lệ này có sự tăng dần qua các năm. Tại Đắk Lắk, tỷ lệ xuất hiện đột biến C580Y là 44,78% (38/83), 87,95% (73/83), 86,07% (68/79) tương ứng với giai đoạn 2016-2017, 2018-2019, 2020-2021. Tại Đắk Nông, tỷ lệ xuất hiện đột biến C580Y là 50% (21/42), 79,55% (35/44), 100% (82/82) tương ứng với giai đoạn 2016-2017, 2018-2019, 2020-2021, tương tự tỷ lệ này cũng gia tăng trong giai đoạn nghiên cứu. Bên cạnh đó, còn có sự các đột biến khác trong vùng gen K₁₃ với tỷ lệ nhỏ.



Hình 3. Biểu đồ phân bố các đột biến gen K₁₃ propeller tại các điểm nghiên cứu

3.3. So sánh các loại đột biến tại các điểm nghiên cứu theo phân loại của WHO (2018)

Bảng 3. So sánh loại đột biến với phân loại các đột biến K₁₃ theo WHO (2018)

Điểm nghiên cứu	Tỷ lệ từng loại đột biến gen K ₁₃	So sánh theo phân loại WHO (WHO, 2018)	
		Đột biến K ₁₃	Phân loại
Gia Lai (n = 430)	C580Y (n=263) P553L (n=2) A578S (n=1) I543T (n=1)	P441L	Liên quan(1)
		F446I	Xác định(2)
		G449A	Liên quan(1)
		C469F	Liên quan(1)
		N458Y	Xác định(2)
		M476I	Xác định(2)
		A481V	Liên quan(1)
Đắk Lắk (n = 245)	C580Y (n=179) P574L (n=2) A481V (n=3) E552Q (n=7) R539T (n=1)	Y493H	Xác định(2)
		P527H	Liên quan(1)
		N537I	Liên quan(1)
		G538V	Liên quan(1)
		R539T	Xác định(2)
		I543T	Xác định(2)
		Đắk Nông (n = 168)	C580Y (n=138) R539T (n=1) F446I (n=21)
R561H	Xác định(2)		
V568G	Liên quan(1)		
P574L	Liên quan(1)		
C580Y	Xác định(2)		
F673I	Liên quan(1)		
A675V	Liên quan(1)		

(1)Liên quan (associated) là phân loại đột biến có liên quan đến kháng thuốc *P. falciparum*

(2) Xác định (confirmed) là phân loại xác định kháng thuốc do *P. falciparum*

Tại điểm Gia Lai, xác định được 4 loại đột biến trên

vùng gen K₁₃ propeller, trong đó có 3 đột biến là đột biến xác định kháng artemisinin theo phân loại của Tổ chức Y tế thế giới (WHO, 2018) là C580Y, P553L, I543T. Tại Đắk Lắk, xác định được 4 loại đột biến trên vùng gen K₁₃ propeller, trong đó có 2 đột biến là đột biến xác định kháng theo phân loại của Tổ chức Y tế thế giới (WHO, 2018) là C580Y, R539T. Tại Đắk Nông, xác định được 3 loại đột biến trên vùng gen K₁₃ propeller, trong đó có 2 đột biến là đột biến xác định kháng theo phân loại của Tổ chức Y tế thế giới (WHO, 2018) là C580Y, R539T và một đột biến mới F446I.

4. BÀN LUẬN

Phân tích vùng gen K₁₃ propeller của tổng số 843 mẫu phân lập *P. falciparum* tại 3 tỉnh Gia Lai, Đắk Lắk và Đắk Nông của khu vực Tây Nguyên cho thấy sự xuất hiện các đột biến C580Y, F446I, R539T, A578S, P553L, I543T, E552Q, P574L và A481V.

Đột biến C580Y được tìm thấy trên các mẫu phân lập *P. falciparum* tại cả 3 tỉnh Tây Nguyên với tỷ lệ tương đối cao. Đột biến này được xác nhận là có liên quan đến quá trình chậm làm sạch KST thể vô tính của *P. falciparum* đã được xác nhận lại bằng những thử nghiệm bằng thử nghiệm in vivo và in vitro (WHO, 2018), đây là đột biến phổ biến nhất tại khu vực Tiểu vùng Sông Mê Kông mở rộng (Ariey và cs., 2014). Ngoài ra, trong khu vực cũng có sự xuất hiện các đột biến xác định kháng artemisinin đã được TCYTTG công nhận (WHO, 2018) như F446I, R539T, I543T và P553L. Trong đó có sự xuất hiện đột biến F446I, lưu hành ở khu vực Myanmar và Trung Quốc, đây là đột biến được cho là liên quan đến chậm “thanh thải hay làm sạch” thể vô tính của *P. falciparum* sau khi điều trị bằng artemisinin.

Tình trạng kháng artemisinin và các thuốc phối hợp ở cấp độ phân tử đã lan rộng các tỉnh trong khu vực Tây Nguyên; các chỉ thị phân tử kháng artemisinin có sự gia tăng theo thời gian, cụ thể theo nghiên cứu của Huỳnh Hồng Quang và cộng sự (2016) xác định tỷ lệ đột biến C580Y tại Gia Lai là 36,5% và tại Đắk Nông là 24,6%; nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Trinh và cộng sự (2016) cũng đã xác định tại Gia Lai là 11,59% (11/96); trong nghiên cứu này tỷ lệ giai đoạn 2016-2017 là 22,91% đến 50%, giai đoạn 2018-2019 là 69,77% đến 87,95% và trong giai đoạn 2020-2021 tăng lên đến 98,18% và 100% ở Gia Lai và Đắk Nông. Điều này cho thấy tình trạng kháng artemisinin ngày càng gia tăng và mở rộng vùng phân bố, có những khu vực trước kia không xuất hiện đột biến kháng hoặc tỷ lệ thấp thì giai đoạn 2020-2021 đã tăng cao với tỷ lệ trên 80% ở các điểm nghiên cứu.

Kết quả này cùng với tỷ lệ thất bại điều trị trên lâm sàng và tỷ lệ thể vô tính còn tồn tại ngày D3 cho thấy bức tranh kháng thuốc cấp độ phân tử ở khu vực Tây Nguyên và ở Việt Nam đang ở mức cảnh báo; điều này đã được chứng minh bằng việc thay đổi chính sách thuốc sốt rét chuyên từ DHA-PPQ sang dùng pyronaridine tetraphosphate-artesunate phổ biến từ cuối năm 2020 đến nay.

Hiện nay, tình trạng kháng thuốc lan rộng và giảm nhạy với một số thuốc có hiệu lực cao hiện dùng trong Chính sách thuốc sốt rét Quốc gia như hiện nay có xu hướng lan rộng, nếu không có thuốc ứng viên thay thế là một thách thức. Trong thực hành lâm sàng điều trị sốt rét do *P. falciparum* tại Việt Nam là chỉ định dùng thuốc phối hợp artesunate-pyronaridine (Pyramax®) còn hiệu lực cao, song tỷ lệ tồn tại thể vô tính ngày D3 dương tính còn cao trên 30%, đồng thời các chỉ điểm phân tử đột biến gen K₁₃, đặc biệt kiểu gen C580Y liên quan đến kháng artesunate trong thành phần thứ nhất của viên Pyramax trên quần thể *P. falciparum* là tình trạng kháng thuốc một phần đối với artesunate, điều đó chỉ ra chúng ta cần nghiên cứu giám sát hiệu lực thuốc in vivo trên lâm sàng và nên việc sử dụng và theo dõi giám sát hiệu lực thuốc thường xuyên là cần thiết.

5. KẾT LUẬN

- Tại Gia Lai, tỷ lệ xuất hiện đột biến C580Y là 22,91%(41/179), 69,77% (60/86), 98,18%(162/165) tương ứng với giai đoạn 2016-2017, 2018-2019, 2020-2021. Tại Đắk Lắk, tỷ lệ xuất hiện đột biến C580Y là 44,78% (38/83), 87,95% (73/83), 86,07% (68/79) tương ứng với giai đoạn 2016-2017, 2018-2019, 2020-2021. Tại Đắk Nông, tỷ lệ xuất hiện đột biến C580Y là 50% (21/42), 79,55% (35/44), 100% (82/82) tương ứng với giai đoạn 2016-2017, 2018-2019, 2020-2021.

- Tại Gia Lai, xác định được 4 loại đột biến trên vùng gen K₁₃ propeller, trong đó có 3 đột biến là đột biến xác định kháng artemisinin theo phân loại của Tổ chức Y tế thế giới (WHO, 2018) là C580Y, P553L, I543T. Tại Đắk Lắk, xác định được 4 loại đột biến trên vùng gen K₁₃ propeller, trong đó có 2 đột biến là đột biến xác định kháng theo phân loại của Tổ chức Y tế thế giới (WHO, 2018) là C580Y, R539T. Tại Đắk Nông, xác định được 3 loại đột biến trên vùng gen K₁₃ propeller, trong đó có 2 đột biến là đột biến xác định kháng theo phân loại của Tổ chức Y tế thế giới (WHO, 2018) là C580Y, R539T và một đột biến mới F446I.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J et al., (2014). A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. Nature.505:50-55.
- [2] WHO (2018). Status report on artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy.
- [3] Huỳnh Hồng Quang, Bùi Quang Phúc, Nguyễn Thanh Thủy Nhiên, Tạ Thị Tĩnh, Đỗ Mạnh Hà, Nguyễn Thị Minh Trinh, Đoàn Đức Hùng, Lê Phước Thiện (2019). Tình hình sốt rét kháng thuốc phân tử do *Plasmodium falciparum* tại miền Trung – Tây Nguyên (2017-2019). Tạp chí Phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng, số 5 (113), tr.49-58.