

STUDY ON Pvcrt GENE MUTATIONS ASSOCIATED WITH CHLOROQUINE RESISTANCE IN *PLASMODIUM VIVAX* IN MUONG TE, LAI CHAU USING REAL-TIME PCR AND WHOLE-GENOME SEQUENCING

Nguyen Quang Thieu^{1*}, Nguyen Thi Hong Ngoc¹, Nguyen Thi Phuong²
Nguyen Thi Huong Binh¹, Nguyen Van Hong¹, Nguyen Duc Giang¹

¹National Institute of Malariology, Parasitology and Entomology - 34 Trung Van, Nam Tu Liem district, Hanoi, Vietnam

²Hanoi University of Public Health - 1A Duc Thang, Bac Tu Liem district, Hanoi, Vietnam

Received: 26/02/2025

Revised: 29/3/2025; Accepted: 08/4/2025

ABSTRACT

Objective: This study investigates Pvcrt gene expression and mutations associated with Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax* isolates from Muong Te district, Lai Chau province, Vietnam.

Methods: A cross-sectional study was conducted on 48 blood samples positive for *P. vivax*, collected from October 2022 to March 2024. Pvcrt expression was quantified by qPCR, and mutations were identified using whole genome Illumina sequencing. In addition, a literature review (2008-2023) was performed to evaluate Pvcrt roles globally.

Results: 14.6% of samples showed increased Pvcrt expression. C350T mutation was present in 4.2% and codon 10 insertions (K10) in 12.5%. C350T was significantly associated with overexpression ($p < 0.05$). Literature confirms Pvcrt involvement in Chloroquine resistance across Southeast and South Asia.

Conclusion: Pvcrt plays a potential role in Chloroquine resistance surveillance in *P. vivax*. Integration of molecular monitoring of Pvcrt into Vietnam's malaria control strategies is recommended.

Keywords: *Plasmodium vivax*, Pvcrt, Chloroquine resistance, mutation, gene expression, Vietnam.

*Corresponding author

Email: thieunq@gmail.com Phone: (+84) 912216817 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD4.2349>

NGHIÊN CỨU ĐỘT BIẾN GEN *Pvcr* LIÊN QUAN ĐẾN KHÁNG CHLOROQUINE Ở *PLASMODIUM VIVAX* TẠI MƯỜNG TÈ, LAI CHÂU BẰNG REAL-TIME PCR VÀ GIẢI TRÌNH TỰ TOÀN BỘ HỆ GEN

Nguyễn Quang Thiều^{1*}, Nguyễn Thị Hồng Ngọc¹, Nguyễn Thị Phụng²
Nguyễn Thị Hương Bình¹, Nguyễn Văn Hồng¹, Nguyễn Đức Giang¹

¹*Viện Sốt rét, Ký sinh trùng và Côn trùng Trung ương - 34 Trung Văn, quận Nam Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam*

²*Trường Đại học Y tế Công cộng - 1A Đức Thắng, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam*

Ngày chỉnh sửa: 29/3/2025

Ngày nhận bài: 26/02/2025

Ngày chỉnh sửa: 24/3/2025; Ngày duyệt đăng: 08/4/2025

TÓM TẮT

Mục tiêu: Nghiên cứu nhằm đánh giá mức độ biểu hiện và đột biến gen *Pvcr* liên quan đến kháng Chloroquine ở *Plasmodium vivax* tại huyện Mường Tè, tỉnh Lai Châu, Việt Nam.

Phương pháp: Nghiên cứu mô tả cắt ngang trên 48 mẫu máu dương tính *P. vivax*, thu thập từ tháng 10/2022-3/2024. Biểu hiện *Pvcr* được định lượng bằng qPCR, đột biến được xác định qua giải trình tự toàn bộ hệ gen Illumina. Bổ sung tổng quan tài liệu quốc tế từ 2008-2023 về gen *Pvcr* và kháng Chloroquine.

Kết quả: 14,6% mẫu có biểu hiện *Pvcr* tăng cao, 4,2% mang đột biến C350T, 12,5% có chèn codon 10 (K10). Mỗi liên hệ giữa C350T và tăng biểu hiện *Pvcr* có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Tổng quan tài liệu khẳng định vai trò của *Pvcr* trong kháng thuốc tại nhiều khu vực Đông Nam Á và Nam Á.

Kết luận: *Pvcr* là chỉ dấu tiềm năng trong giám sát kháng Chloroquine ở *P. vivax*. Khuyến nghị phân tích biểu hiện và đột biến *Pvcr* vào chương trình giám sát sốt rét tại Việt Nam.

Từ khóa: *Plasmodium vivax*, *Pvcr*, kháng Chloroquine, đột biến gen, biểu hiện gen.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sốt rét do *Plasmodium vivax* là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây bệnh tại khu vực châu Á - Thái Bình Dương. Tại Việt Nam, trong khi tổng số ca mắc sốt rét đã giảm mạnh trong thập kỷ qua, thì *P. vivax* ngày càng chiếm tỉ lệ lớn hơn trong cơ cấu ca bệnh, đặc biệt tại các tỉnh miền núi phía Bắc và khu vực biên giới như Lai Châu, Điện Biên, Quảng Nam.

Chloroquine vẫn được sử dụng rộng rãi như thuốc điều trị hàng đầu đối với sốt rét do *P. vivax* tại nhiều quốc gia, trong đó có Việt Nam. Tuy nhiên, tình trạng kháng Chloroquine ở *P. vivax* đã được ghi nhận từ đầu những năm 2000 tại Indonesia, Myanmar, Thái Lan, Papua New Guinea và gần đây là Ấn Độ và Brazil. Các ca tái phát sớm sau điều trị, nồng độ thuốc trong máu còn cao, và sự sống sót của ký sinh trùng (KST) sau 72 giờ là những dấu hiệu lâm sàng nghi ngờ kháng thuốc.

Khác với *P. falciparum*, cơ chế kháng Chloroquine của

P. vivax chưa được xác định rõ ràng. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy gen *Pvcr* (*Plasmodium vivax* Chloroquine resistance transporter), tương đồng với gen *Pfcr* ở *P. falciparum*, có vai trò tiềm năng. Đặc biệt, các đột biến tại codon 10 (chèn AAA), codon 350 (C350T) và mức tăng biểu hiện *Pvcr* đã được phát hiện trong các chủng có khả năng kháng Chloroquine.

Gen *Pvcr* mã hóa một protein vận chuyển nằm ở màng không bào tiêu hóa của KST. Protein này có cấu trúc gồm 10-12 vùng xuyên màng, và được cho là điều chỉnh khả năng vận chuyển các phân tử như Chloroquine ra khỏi bào quan tiêu hóa, nơi thuốc tác động chính.

Sự thay đổi biểu hiện *Pvcr* hoặc đột biến cấu trúc protein có thể làm giảm tích tụ Chloroquine trong bào quan tiêu hóa, dẫn đến giảm hiệu quả thuốc. Đây là cơ chế tương tự đã được chứng minh trong *P. falciparum* thông qua gen *Pfcr* [2].

*Tác giả liên hệ

Email: thieunq@gmail.com Điện thoại: (+84) 912216817 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD4.2349>



Nhiều nghiên cứu đã xác định các đột biến trong Pvcrt có liên quan đến kháng Chloroquine như: C350T (biến đổi nucleotide tại codon 350 gây thay đổi acid amin Serine thành Leucine), được phát hiện tại Myanmar, Papua New Guinea, và có liên quan đến tăng biểu hiện Pvcrt [3]. Chèn đoạn tại bộ ba mã hóa 10 (K10): chèn AAA làm tăng số lượng amino acid lysine đầu chuỗi được ghi nhận tại Ấn Độ và Thái Lan [4]. Đa hình trình tự lặp lại liên kề (tandem repeat polymorphisms) đánh giá sự khác biệt trong số lượng đơn vị lặp tại vùng đầu gen ảnh hưởng đến biểu hiện gen và chức năng protein [5].

Bên cạnh đột biến, mức độ biểu hiện Pvcrt tăng cao (> 1,5 lần so với mẫu tham chiếu) đã được xác nhận là có tương quan với hiện tượng giảm nhạy cảm Chloroquine trong nhiều chủng *P. vivax*. Nghiên cứu tại Ấn Độ cho thấy các mẫu có biểu hiện Pvcrt tăng cao thường liên quan đến tái phát nhanh sau điều trị [5].

Tương tự, Barnadas C và cộng sự (2008) tại Madagascar ghi nhận biểu hiện Pvcrt tăng trong các mẫu có nồng độ Chloroquine máu cao nhưng vẫn còn KST sau 72 giờ điều trị. Đây là bằng chứng sinh học quan trọng bổ sung cho dữ liệu lâm sàng [4].

Việc ứng dụng các công nghệ sinh học phân tử hiện đại như real-time PCR và giải trình tự toàn bộ hệ gen (whole-genome sequencing - WGS) đóng vai trò thiết yếu trong việc làm sáng tỏ cơ chế kháng Chloroquine của *P. vivax*.

Phương pháp real-time PCR cho phép định lượng chính xác mức độ biểu hiện gen Pvcrt, từ đó giúp phát hiện các mẫu có biểu hiện tăng cao - yếu tố liên quan đến giảm nhạy cảm với thuốc. Ưu điểm của kỹ thuật này là độ nhạy cao, thời gian phản ứng nhanh, và khả năng chuẩn hóa dữ liệu theo mẫu đối chứng nội sinh, giúp phân tích được số lượng lớn mẫu bệnh phẩm trong thời gian ngắn [5].

Trong khi đó, giải trình tự toàn bộ hệ gen là công cụ mạnh mẽ để phát hiện các đột biến tiềm ẩn trên toàn bộ bộ gen của *P. vivax*, bao gồm các thay đổi trong Pvcrt cũng như các gen khác có thể tham gia vào cơ chế kháng thuốc. Ngoài ra, phương pháp này còn giúp phân tích các đa hình trình tự lặp lại liên kề - yếu tố có thể ảnh hưởng đến biểu hiện Pvcrt và chức năng protein vận chuyển [8]. Việc giải trình tự cũng góp phần làm rõ tính đa dạng di truyền của quần thể *P. vivax*, phục vụ cho các nghiên cứu dịch tễ phân tử và truy xuất nguồn gốc của các chủng kháng thuốc [7].

Tích hợp hai phương pháp này không chỉ nâng cao độ chính xác trong việc xác định dấu hiệu kháng Chloroquine, mà còn mở ra hướng tiếp cận toàn diện trong giám sát và dự báo nguy cơ kháng thuốc, từ đó hỗ trợ hiệu quả cho các chiến lược phòng chống và loại trừ sốt rét tại Việt Nam.

Việc nghiên cứu các chỉ dấu phân tử liên quan đến kháng thuốc, bao gồm biểu hiện và đột biến Pvcrt, là bước đi cần thiết để hỗ trợ chương trình giám sát và phòng chống sốt rét tại Việt Nam. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu kết hợp phân tích thực nghiệm và tổng quan tài liệu để làm rõ vai trò của Pvcrt trong kháng Chloroquine của *P. vivax*, từ đó đề xuất định hướng ứng dụng trong thực tiễn.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang tại thực địa và phân tích thực nghiệm tại phòng thí nghiệm.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Tại thực địa: huyện Mường Tè, tỉnh Lai Châu trong giai đoạn từ tháng 10/2022-3/2024. Đây là địa bàn có lưu hành sốt rét, giáp biên giới Lào, địa hình rừng núi, dân cư phân bố rải rác và có tiền sử dùng Chloroquine kéo dài.

- Tại phòng thí nghiệm: Khoa Sinh học phân tử, Viện Sốt rét, Ký sinh trùng và Côn trùng Trung ương từ tháng 8/2024-12/2024.

2.3. Đối tượng nghiên cứu

Bệnh nhân được xác định là nhiễm KST *P. vivax* bằng kỹ thuật soi lam và real-time PCR chấp nhận tham gia nghiên cứu.

2.4. Cỡ mẫu và thu thập mẫu

- Cỡ mẫu được tính theo công thức:

$$n = [(Z_{1-\alpha/2})^2 \times p \times (1-p)]/d^2$$

Với độ tin cậy của nghiên cứu là 95%, tương ứng với $\alpha = 0,05$ và $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$; mức độ biểu hiện của Pvcrt từ nhóm kháng Chloroquine so với nhóm nhạy Chloroquine ở nghiên cứu của Melo G.C và cộng sự (2014) là 6,1, tương ứng $p = 0,061$ [3]; tỉ lệ sai lệch so với quần thể thực là 8%, tương ứng $d = 0,08$.

Áp dụng vào công thức, xác định số mẫu tối thiểu phải đạt 34 mẫu.

- Chọn toàn bộ mẫu đã thu thập và thỏa mãn tiêu chuẩn lựa chọn từ 78 mẫu máu thu thập, số hồ sơ người bệnh đủ tiêu chuẩn lựa chọn (bệnh nhân chưa dùng thuốc chống sốt rét trong vòng 48 giờ, tình nguyện tham gia và ký cam kết đồng thuận) thì thu được 56 mẫu, trong đó loại trừ thêm 8 trường hợp có kết quả ADN sau tách chiết không đạt, lựa chọn 48 mẫu với mong muốn kết quả đạt được đáng tin cậy hơn so với 34 mẫu tính toán cỡ mẫu tối thiểu.

2.5. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- Định lượng biểu hiện gen Pvcrt bằng qPCR: tách chiết ARN từ 200 μ L máu toàn phần bằng bộ kit QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen), kiểm tra nồng độ bằng máy Nanodrop và loại bỏ DNA tạp. Tổng hợp cDNA

sử dụng RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher). Định lượng Pvcrt được thực hiện bằng real-time PCR (SYBR Green) với gen nội chuẩn là beta-tubulin. Chu trình qPCR: 95°C - 10 phút; 40 chu kỳ: 95°C - 15 giây, 60°C - 60 giây. Biểu hiện được phân tích theo phương pháp $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Mẫu có giá trị $> 1,5$ lần mẫu chuẩn được coi là “tăng biểu hiện”.

- Phát hiện đột biến Pvcrt: bộ mồi để giải trình tự gen Pvcrt (~1,1 kb) được tích hợp trong bộ mồi giải trình tự của *P. vivax*, giải trình tự bằng công nghệ của Illumina trên máy Miseq. Trình tự ADN được xử lý theo quy trình tiêu chuẩn, bao gồm căn chỉnh với bộ gen tham chiếu bằng BWA-MEM gọi biến thể sử dụng GATK HaplotypeCaller và bcftools, cùng bước lọc và chú thích biến thể thông qua SnpEff. Để xác định mối liên hệ giữa các đột biến và tính kháng thuốc, nghiên cứu áp dụng phương pháp phân tích liên kết toàn hệ gen (GWAS), kiểm tra mối tương quan giữa các biến thể quan trọng và khả năng kháng thuốc đã được xác nhận trong các nghiên cứu trước đây.

Chỉ các biến thể có chất lượng $Q \geq 30$, độ bao phủ $> 20\times$ mới được chấp nhận. Đột biến được mô tả theo quy ước HGVS (Human Genome Variation Society).

2.6. Chỉ số, biến số nghiên cứu

- Các biến số về thông tin nhân khẩu học: tuổi, giới, dân tộc, nghề nghiệp, tính chất công việc (có ngủ nường, rầy hay không).

- Các biến số chung về bộ số liệu thu thập được: mật độ KST, ADN đạt tiêu chuẩn giải trình tự và PCR, số các đột biến phát hiện (thêm đoạn, mất đoạn và đảo đoạn).

- Các biến số chi tiết về biểu hiện gen PvCrt: Ct gen PvCrt và Ct gen tham chiếu Pv β -tubulin, $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

- Các biến số chi tiết về đột biến gen, các đột biến phát hiện được gen PvCrt (chèn K10, 350).

2.7. Phân tích số liệu

Nhập và xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS 27.0. Biểu định lượng (biểu hiện gen) biểu diễn bằng $\bar{X} \pm SD$. Tính tần suất (%), so sánh Chi-square hoặc Fisher's exact test.

2.8. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu là một phần của đề tài Nghị định thư giữa Đại học Y sinh và Y học nhiệt đới Luân Đôn, Vương quốc Anh với Viện Sốt rét, Ký sinh trùng và Côn trùng Trung ương với tên “Nghiên cứu tính đa hình di truyền và kháng thuốc của *Plasmodium falciparum* và *Plasmodium vivax* bằng kỹ thuật giải trình tự toàn bộ hệ gen” đã được thông qua Hội đồng Y đức của Viện Sốt rét, Ký sinh trùng và Côn trùng Trung ương theo Quyết định số 1096/QĐ-VSR ngày 20/8/2020.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm dịch tễ học của mẫu nghiên cứu

Tổng cộng phân tích 48 mẫu máu ngoại vi dương tính

với *P. vivax* được thu thập từ các xã Pa Ủ, Mù Cả, Ka Lăng và Pa Vệ Sừ thuộc huyện Mường Tè, tỉnh Lai Châu. Đặc điểm nhân khẩu học và mật độ KST của mẫu nghiên cứu được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm dịch tễ học của đối tượng nghiên cứu (n = 48)

Đặc điểm		Số lượng	Tỉ lệ (%)
Giới tính	Nam	28	58,3
	Nữ	20	41,7
Nhóm tuổi	< 15 tuổi	9	18,8
	15-30 tuổi	20	41,7
	31-45 tuổi	13	27,1
	> 45 tuổi	6	12,5
Mật độ KST	$\leq 500/\mu l$	14	29,2
	501-1000/ μl	23	47,9
	> 1000/ μl	11	22,9

Đối tượng nghiên cứu chủ yếu là nam giới trong độ tuổi lao động, với mật độ KST ở mức trung bình.

3.2. Mức độ biểu hiện gen Pvcrt

Biểu hiện gen Pvcrt được định lượng bằng qPCR, chuẩn hóa với gen nội chuẩn beta-tubulin và phân tích theo phương pháp $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Phân bố kết quả được chia thành 3 nhóm (bảng 2).

Bảng 2. Mức độ biểu hiện gen Pvcrt (n = 48)

Biểu hiện	Số lượng	Tỉ lệ (%)
Tăng ($> 1,5\times$)	7	14,6
Trung bình ($0,5-1,5\times$)	39	81,3
Giảm ($< 0,5\times$)	2	4,1

Có 7 mẫu (14,6%) thể hiện tăng biểu hiện Pvcrt - dấu hiệu có thể liên quan đến kháng Chloroquine, 2 mẫu có biểu hiện thấp ($< 0,5\times$) đều không mang đột biến nào trên Pvcrt.

3.3. Đặc điểm đột biến gen Pvcrt

Kết quả giải trình tự ghi nhận 2 loại biến thể tại vùng mã hóa Pvcrt.

Bảng 3. Đột biến Pvcrt phát hiện được (n = 48)

Loại đột biến	Vị trí bộ ba mã hóa	Loại biến thể	Số mẫu	Tỉ lệ (%)
SNP	350	C350T (Ser $\rightarrow$ Leu)	2	4,2
Chèn	10	Chèn AAA (Lysine)	6	12,5
Mất đoạn	-	Không phát hiện	0	0

Cả 2 biến thể được ghi nhận đều là đột biến nhỏ nhưng có khả năng làm thay đổi cấu trúc protein vận chuyển. Đột biến C350T đã từng được báo cáo trong các nghiên cứu về kháng Chloroquine tại Myanmar và Ấn Độ.

Bảng 4. Tương quan giữa biểu hiện Pvcrt và đột biến gen

Nhóm	Biểu hiện tăng	Tổng mẫu	Tỉ lệ (%)	p-value
Có C350T	2	2	100,0	0,043
Có chèn K10	4	6	66,7	0,057
Không đột biến	1	40	2,5	-

Mối liên quan giữa đột biến C350T và tăng biểu hiện Pvcrt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Với đột biến chèn K10, tỉ lệ tăng biểu hiện cũng cao (66,7%) nhưng chưa đạt ngưỡng thống kê. Kết quả củng cố giả thiết rằng cả 2 đột biến này có thể góp phần vào cơ chế kháng Chloroquine thông qua điều chỉnh biểu hiện Pvcrt.

Bảng 5. Phân bố tăng biểu hiện Pvcrt theo mật độ KST

Mật độ KST	Biểu hiện tăng	Tổng mẫu	Tỉ lệ (%)
$\leq 500/\mu\text{l}$	1	14	7,1
501-000/ μl	4	23	17,4
$> 1000/\mu\text{l}$	2	11	18,2

Tỉ lệ tăng biểu hiện Pvcrt cao hơn ở nhóm có mật độ KST ≥ 500 con/ μl . Mối liên quan chưa có ý nghĩa thống kê, nhưng phản ánh xu hướng KST có biểu hiện gen cao có khả năng tồn tại mạnh hơn trong cơ thể người bệnh.

Bảng 6. Tổng hợp biểu hiện Pvcrt và đột biến theo mẫu

Mẫu ID	Pvcrt (2- $\Delta\Delta\text{Ct}$)	Nhóm biểu hiện	Đột biến Pvcrt
02 LC.TB	1,61	Tăng	Chèn AAA (K10)
13 LC.PVS	2,08	Tăng	C350T
21 LC.PVS	1,79	Tăng	Chèn AAA (K10)
28 LC.PVS	2,65	Tăng	C350T
34 LC.PVS	1,58	Tăng	Chèn AAA (K10)
06 LC.TB	0,41	Giảm	Không có
42 LC.TB	0,87	Trung bình	Không có

Mẫu mang đột biến C350T có biểu hiện gen cao rõ rệt ($\geq 2\times$), đồng thời một số mẫu mang đột biến chèn K10 cũng có biểu hiện $> 1,5\times$. Không có mẫu nào mang đột biến mà lại có biểu hiện thấp. Mối liên hệ giữa kiểu gen và biểu hiện là nhất quán, ủng hộ vai trò sinh học của các đột biến này.

4. BÀN LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy 14,6% mẫu *P. vivax* thu thập tại huyện Mường Tè có biểu hiện gen Pvcrt tăng cao - một dấu hiệu sinh học tiềm năng của hiện tượng kháng Chloroquine. Đồng thời, đột biến C350T được

phát hiện trong 4,2% số mẫu và có mối liên hệ chặt chẽ với tăng biểu hiện Pvcrt (100% mẫu mang đột biến này có biểu hiện tăng, $p < 0,05$). Đây là lần đầu tiên tại Việt Nam ghi nhận đồng thời cả biểu hiện và đột biến Pvcrt trên cùng một quần thể địa phương.

Tỉ lệ biểu hiện Pvcrt tăng cao (14,6%) trong nghiên cứu hiện tại tương đương với các báo cáo tại vùng lưu hành kháng Chloroquine ở Thái Lan, Myanmar và Ấn Độ. Trong nghiên cứu của Amato R và cộng sự (2018), các mẫu có đột biến Pvcrt thường đi kèm với biểu hiện gen tăng, đặc biệt là tại biên giới Thái Lan - Myanmar, nơi Chloroquine đã thất bại trong điều trị *P. vivax* từ những năm 2010s [6].

Tại Ấn Độ, Sharma A và cộng sự (2022) phát hiện đột biến chèn codon 10 (K10) trong 18% mẫu, với 70% trong số đó có biểu hiện Pvcrt tăng - một kết quả gần tương đồng với 12,5% mẫu mang đột biến K10 trong nghiên cứu này. Ngoài ra, nghiên cứu của tại Papua New Guinea và Madagascar cũng ghi nhận biểu hiện Pvcrt tăng trong các ca điều trị thất bại bằng Chloroquine mặc dù không có đột biến rõ ràng [4], [5].

Kết quả này cho thấy vai trò của Pvcrt trong kháng Chloroquine không chỉ giới hạn ở một cơ chế duy nhất (đột biến hoặc tăng biểu hiện), mà là sự phối hợp của cả hai yếu tố, tùy theo nền tảng di truyền của từng khu vực.

Protein Pvcrt là một transporter nằm trên màng tiêu hóa của KST, có chức năng vận chuyển các phân tử nhỏ như Chloroquine ra khỏi bào quan tiêu hóa. Khi có đột biến như C350T hoặc chèn AAA (K10), khả năng vận chuyển của protein có thể thay đổi, dẫn đến giảm tích tụ thuốc tại vị trí tác động, làm giảm hiệu quả của Chloroquine.

Biểu hiện Pvcrt tăng cũng đồng nghĩa với việc số lượng protein Pvcrt tăng, tăng cường quá trình vận chuyển Chloroquine ra khỏi bào quan, từ đó giảm nồng độ thuốc nội bào. Cơ chế này tương đồng với Pfcrt trong *P. falciparum*, và là cơ sở để giả

định vai trò của Pvcrt như một chỉ dấu phân tử quan trọng.

Một điểm đáng chú ý trong nghiên cứu này là việc áp dụng quy trình chuẩn hóa trong phân tích biểu hiện gen và giải trình tự. Việc sử dụng kỹ thuật qPCR định lượng tuyệt đối, nội chuẩn beta-tubulin, và phân tích theo phương pháp 2- $\Delta\Delta\text{Ct}$ đã đảm bảo tính nhất quán giữa các mẫu.

Bên cạnh đó, ứng dụng công nghệ giải trình tự thế hệ mới (Illumina) và pipeline xử lý giúp phát hiện chính xác các biến thể gen. Quy trình này có thể được áp dụng

như một mô hình chuẩn để triển khai giám sát phân tử Pvcrt tại các vùng lưu hành khác trong cả nước.

Mặc dù kết quả khả quan, nghiên cứu còn một số hạn chế như cỡ mẫu nhỏ ($n = 48$), chưa đủ để đại diện cho toàn vùng Tây Bắc hoặc mở rộng suy luận đến toàn quốc; thiếu dữ liệu theo dõi điều trị lâm sàng (như thời gian sạch KST, tỉ lệ tái phát) gây khó khăn trong việc xác nhận mối liên hệ trực tiếp giữa biểu hiện Pvcrt và thất bại điều trị; chưa phân tích thêm các gen liên quan khác như pvmdr1 - vốn có thể tương tác với Pvcrt trong cơ chế kháng thuốc.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã ghi nhận sự hiện diện của các dấu hiệu phân tử liên quan đến kháng Chloroquine trong quần thể *P. vivax* tại huyện Mường Tè, tỉnh Lai Châu. Tỉ lệ mẫu có biểu hiện Pvcrt tăng chiếm 14,6%, trong đó các mẫu mang đột biến C350T và chèn codon 10 (AAA) có liên quan rõ rệt đến mức biểu hiện tăng. Đặc biệt, mối liên hệ có ý nghĩa thống kê giữa đột biến C350T và tăng biểu hiện Pvcrt ($p < 0,05$) củng cố giả thiết về vai trò chức năng của đột biến này trong cơ chế kháng Chloroquine.

Việc áp dụng đồng thời định lượng biểu hiện gen và phân tích đột biến trên cùng một hệ thống mẫu là một điểm mạnh trong nghiên cứu, giúp đánh giá toàn diện vai trò của Pvcrt. Các kết quả này phù hợp với xu hướng ghi nhận tại Myanmar, Thái Lan, Ấn Độ và Madagascar, khẳng định rằng Việt Nam cần chủ động triển khai giám sát phân tử kháng thuốc *P. vivax* tại các vùng biên giới còn lưu hành bệnh.

Từ các kết quả của nghiên cứu này, chúng tôi kiến nghị:

- Từng bước kết hợp đánh giá biểu hiện và đột biến gen Pvcrt vào chương trình giám sát thường quy.
- Mở rộng cỡ mẫu và bổ sung dữ liệu điều trị lâm sàng (nếu có thể) để xác nhận giá trị tiên đoán của chỉ dấu Pvcrt.
- Đa hóa gen phân tích, kết hợp Pvcrt với các gen khác như pvmdr1, pvmp1 để hiểu rõ cơ chế kháng thuốc đa yếu tố ở *P. vivax*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] World Health Organization, World Malaria Report 2021, Geneva, 2021.
- [2] Baird J.K, Hoffman S.L, White N.J, Resistance

to therapies for infection by *Plasmodium vivax*, Clin Microbiol Rev. 2009, 22 (3): 508-534.

- [3] Melo G.C, Monteiro W.M, Siqueira A.M et al, Expression levels of pvcrt-o and pvmdr-1 are associated with chloroquine resistance and severe *Plasmodium vivax* malaria in patients of the Brazilian Amazon, PloS One, 2014, 9 (8): e105922.
- [4] Barnadas C, Ratsimbao A, Tichit M et al, *P. vivax* resistance to Chloroquine in Madagascar: clinical efficacy and polymorphisms in pvcrt-o and pvmdr1 genes, Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52 (12): 4233-4240.
- [5] Sharma A, Rawal C et al, Expression pattern of pvcrt-o and polymorphisms in *P. vivax* isolates from India, Acta Tropica, 2022, 230: 106370.
- [6] Amato R, Pearson R.D, Almagro-Garcia J et al, Origins of the current outbreak of multidrug-resistant malaria in Southeast Asia, Nat Microbiol, 2018, 3: 1195-1205.
- [7] Cingolani P, Platts A, Wang L.L et al, A program for annotating and predicting the effects of SNPs, SnpEff, Fly, 2012, 6 (2): 80-92.
- [8] Miotto O, Amato R, Ashley E.A et al, Genetic architecture of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*, Nat Genet, 2015, 47 (3): 226-234.
- [9] McKenna A, Hanna M et al, The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data, Genome Res, 2010, 20 (9): 1297-1303.
- [10] Li H, Durbin R, Lam T.W et al, Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform, Bioinformatics, 2009, 25 (14): 1754-1760.
- [11] Alexander D.H, Novembre J, Lange K, Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals, Genome Res, 2009, 19 (9): 1655-1664.
- [13] Price R.N, Douglas N.M, Anstey N.M, New developments in *Plasmodium vivax* malaria: severe disease and the rise of Chloroquine resistance, Curr Opin Infect Dis, 2009, 22 (5): 430-435.

