

IN VITRO EVALUATION OF *PLASMODIUM FALCIPARUM* K13 MUTATIONS ON IC₅₀ LEVELS TO SOME ANTIMALARIAL DRUGS IN GIA LAI

Nguyen Quang Thieu*, Hoang Dinh Canh

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

Received 14/02/2023

Revised 15/03/2023; Accepted 13/04/2023

ABSTRACT

Objectives: The study analyzes the influence of *Plasmodium falciparum* K13 mutations on IC₅₀ levels to some anti-malarial drugs in vitro in Gia Lai to determine the drug sensitivity and resistance to *Plasmodium falciparum*.

Subjects and methods: The study was conducted in the laboratory with a descriptive research design. Some body included A total of 42 blood samples and cultured parasite samples from the patients diagnosed with uncomplicated *P. falciparum malaria* in Gia Lai were included.

Results: The mean IC₅₀ of artesunate for *Plasmodium falciparum* was 3.06 ± 3.10 nmol/L. The mean IC₅₀ of dihydroartemisinin for *Plasmodium falciparum* was 2.95 ± 2.19 nmol/L. The mean IC₅₀ of chloroquine for *Plasmodium falciparum* was 67.7 ± 51.3 nmol/L. The risk of chloroquine resistance in samples with drug resistance-related K13 genes was 1.47 times higher than that in samples without ART resistance-related K13 genes, with OR = 1.47, 95%CI: 1.15-4.79. The mean IC₅₀ of piperazine for *Plasmodium falciparum* was 43.5 ± 24.9 nmol/L.

Conclusions: The mean IC₅₀ of samples with K13 gene mutations was higher than that of those without K13 mutations for 4 ART drugs, including artesunate, dihydroartemisinin, chloroquine, and piperazine. The risk of chloroquine resistance in samples with drug resistance-related K13 genes was 1.47 times higher than that in samples without ART resistance-related K13 genes.

Keywords: Treatment efficacy; chloroquine, *P. Falciparum*.

*Corresponding author

Email address: thieunq@yahoo.com

Phone number: (+84) 912 216 817

<https://doi.org/10.52163/yhc.v64i3.657>



PHÂN TÍCH ẢNH HƯỞNG CỦA ĐỘ BIẾN GEN K13 CỦA *PLASMODIUM FALCIPARUM* ĐẾN NỒNG ĐỘ IC₅₀ VỚI MỘT SỐ THUỐC ĐIỀU TRỊ SỐT RÉT TRÊN *IN VITRO* TẠI GIA LAI

Nguyễn Quang Thiều*, Hoàng Đình Cảnh

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

Ngày nhận bài: 14 tháng 02 năm 2023

Chỉnh sửa ngày: 15 tháng 03 năm 2023; Ngày duyệt đăng: 13 tháng 04 năm 2023

TÓM TẮT

Mục tiêu: Phân tích ảnh hưởng của đột biến gen K13 của *Plasmodium falciparum* đến nồng độ IC₅₀ với một số thuốc điều trị sốt rét trên *In vitro* tại Gia Lai, nhằm xác định tỷ lệ nhạy, kháng của thuốc với *Plasmodium falciparum*

Đối tượng và phương pháp: Đề tài được thực hiện bằng phương pháp nghiên cứu mô tả thực nghiệm tại labo với 42 mẫu máu và mẫu ký sinh trùng nuôi cấy của bệnh nhân được chẩn đoán sốt rét do *P. falciparum* chưa biến chứng tại Gia Lai.

Kết quả: IC₅₀ trung bình của artesunat đối với *Plasmodium falciparum* là $3,06 \pm 3,10$ nmol/L; IC₅₀ trung bình của dihydroartemisinin đối với *Plasmodium falciparum* $2,95 \pm 2,19$ nmol/L; IC₅₀ trung bình của chloroquin đối với *Plasmodium falciparum* $67,7 \pm 51,3$ nmol/L; Nguy cơ kháng chloroquin ở các mẫu có gen K13 liên quan đến kháng thuốc cao gấp 1,47 lần mức mẫu không có gen K13 liên quan đến kháng thuốc ART, với OR = 1,47, 95%CI: 1,15-4,79; IC₅₀ trung bình của piperquin đối với *Plasmodium falciparum* $43,5 \pm 24,9$ nmol/L.

Kết luận: IC₅₀ trung bình của các mẫu có đột biến gen K13 cao hơn nhóm không có gen đột biến K13 đối với 4 loại thuốc ART gồm artesunat, dihydroartemisinin, chloroquin, piperquin. Nguy cơ kháng chloroquin ở các mẫu có gen K13 liên quan đến kháng thuốc cao gấp 1,47 lần các mẫu không có gen K13 liên quan đến kháng thuốc ART.

Từ khóa: Hiệu lực điều trị; chloroquin, *P. falciparum*.

*Tác giả liên hệ

Email: thieunq@yahoo.com

Điện thoại: (+84) 912 216 817

<https://doi.org/10.52163/yhc.v64i3.657>

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc đe dọa đến chương trình loại trừ sốt rét ở các nước trên thế giới, vì vậy nghiên cứu giám sát IC_{50} là cần thiết và bắt buộc đối với các nước có lưu hành sốt rét do *Plasmodium falciparum*. Gia Lai là tỉnh thuộc miền Trung - Tây Nguyên Việt Nam, là tỉnh có tỷ lệ mắc sốt rét cao nhất cả nước trong đó *Plasmodium falciparum* chiếm tỷ lệ cao nhất, tình hình kháng thuốc artemisinin (ART) diễn biến phức tạp đe dọa sự thành công của chương trình loại trừ sốt rét vào năm 2030 ở Việt Nam. Với tính cấp thiết của vấn đề chúng tôi thực hiện đề tài nghiên cứu: Phân tích ảnh hưởng của đột biến gen K13 của *Plasmodium falciparum* đến nồng độ IC_{50} với một số thuốc điều trị sốt rét trên In vitro tại Gia Lai, nhằm mục tiêu xác định tỷ lệ nhạy, kháng của thuốc với *Plasmodium falciparum*, thông qua xác định IC_{50} của các thuốc artesunat, dihydroartemisinin, chloroquin, piperaquin.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Một số từ viết tắt và thuật ngữ sử dụng trong nghiên cứu

IC_{50} : 50 Inhibitory Concentration - Nồng độ ức chế tối thiểu 50% phát triển của ký sinh trùng sốt rét ở 1 mẫu thử nghiệm; IC_{50} trung bình: Nồng độ ức chế 50% phát triển của ký sinh trùng sốt rét trung bình của các mẫu thử nghiệm.

K13: Kelch – gen K13; K13 propeller – Vùng cánh quạt trên nhiễm sắc thể số 13 của *Plasmodium falciparum*

PCR: Polymerase Chain Reaction: Phản ứng chuỗi Polymerase

WWARN Worl Wide Antimalarial Resistance Network – Mạng lưới kháng thuốc sốt rét toàn cầu.

2.2. Đối tượng, địa điểm, thời gian nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu:

+ Mẫu máu của 42 bệnh nhân được chẩn đoán sốt rét do *P. falciparum* chưa biến chứng tại Gia Lai [1].

+ Các mẫu ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* nuôi cấy.

- Địa điểm nghiên cứu: Đề tài thực hiện tại huyện KrongPa, tỉnh Gia Lai.

- Thời gian nghiên cứu: Năm 2019.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

- **Thiết kế nghiên cứu:** Đề tài thiếu kế bằng phương pháp nghiên cứu mô tả có phân tích trong labo về thử nghiệm lâm sàng *in vivo* tại thực địa.

- **Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu:**

42 mẫu nuôi cấy ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum*, trong đó có 25/42 mẫu có đột biến gen K13 đã được khẳng định liên quan đến kháng ART và dẫn chất.

- **Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:** Đề tài sử dụng các kỹ thuật [2], [3].

+ Kỹ thuật nuôi cấy ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* tại labo

+ Kỹ thuật phân tích đánh giá độ nhạy cảm của ký sinh trùng sốt rét

- **Tiêu chuẩn đánh giá nhạy, kháng:**

Hiện nay mới chỉ có chloroquin đã có tiêu chuẩn đánh giá kháng thuốc thông qua nồng độ IC_{50} của thuốc, với các thuốc khác chưa có tiêu chuẩn cụ thể mà chỉ dựa vào giám sát nồng độ IC_{50} , nếu tăng dần IC_{50} tức là tỷ lệ thuận kháng thuốc của ký sinh trùng sốt rét cũng tăng dần. Riêng với chloroquine là $IC_{50} > 100$ nmol/L [4], [5].

- **Trang thiết bị và vật liệu nghiên cứu:** Các thuốc bột artesunat, chloroquin phosphat, dihydroartemisinin, piperaquin phosphat được cung cấp của WHO; Giấy thấm Whatman 3MM, bình chứa nitơ lỏng; Các trang thiết bị phục vụ nuôi cấy ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* tại labo và đánh giá độ nhạy cảm của ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* với thuốc điều trị.

2.4. Các chỉ số trong nghiên cứu

Các chỉ số trong nghiên cứu gồm: Tỷ lệ (%) thể phân liệt bị ức chế ở mỗi nồng độ của từng loại thuốc; Nồng độ ức chế 50% phát triển của *P. falciparum* [4], [5].

2.5. Phân tích số liệu

Xác định nồng độ ức chế IC_{50} sự phát triển của ký sinh trùng được tính toán bằng phân mềm phân tích và báo cáo (IVART) được phát triển trực tuyến bởi WWARN.

3. KẾT QUẢ

3.1. Ảnh hưởng của đột biến gen K13 liên quan đến kháng thuốc với nồng độ trung bình IC_{50} của artesunat

Với 42 mẫu nuôi cấy *P. falciparum* với artesunat kết quả như sau:

Bảng 3.1. Nồng độ IC₅₀ trung bình ở các mẫu thử nghiệm với artesunat (n = 42)

Kiểu gen	Số lượng	IC ₅₀ trung bình (nmol/L)	Giá trị p
Có đột biến gen K13 liên quan kháng ART	25	3,50	< 0,01
Kiểu hoang dại hoặc đột biến K13 không liên quan đến kháng ART	17	2,18	
Tổng	42	2,93 ± 2,17 (0,41 – 14,55)	

42 mẫu nuôi cấy *P. falciparum*, đã được thực hiện kỹ thuật PCR, trong đó có 25 mẫu đã xác định có đột biến gen K13 liên quan đến kháng thuốc, 17 mẫu không có đột biến gen K13 liên quan đến kháng thuốc (kiểu hoang dại).

Khác biệt có ý nghĩa thống kê về nồng độ IC₅₀ trung bình ở nhóm có đột biến gen K13 liên quan đến kháng

thuốc và nhóm có gen K13 không liên quan đến kháng thuốc ở các mẫu thử nghiệm với artesunat (3,50nmol/L so với 2,18nmol/L, p < 0,01).

3.2. Ảnh hưởng của đột biến gen K13 liên quan đến kháng thuốc với nồng độ trung bình IC₅₀ của chloroquin

Bảng 3.2. Nồng độ IC₅₀ trung bình ở các mẫu thử nghiệm với chloroquin (n = 42)

Kiểu gen	Số lượng	IC ₅₀ trung bình (nmol/L)	Giá trị p
Có đột biến gen K13 liên quan kháng ART	25	75,23	< 0,01
Kiểu hoang dại hoặc đột biến K13 không liên quan đến kháng ART	17	52,99	
Tổng	42	67,7 ± 53,1	

Khác biệt có ý nghĩa thống kê về nồng độ IC₅₀ trung bình ở nhóm có đột biến gen K13 liên quan đến kháng thuốc ART và nhóm có gen K13 không liên quan

đến kháng thuốc ART khi thử nghiệm với chloroquin (3,50nmol/L so với 2,18nmol/L, p < 0,01).

Bảng 3.3. Phân tích đột biến gen K13 liên quan đến kháng chloroquin

Kiểu gen	Số tăng IC ₅₀ (nmol/L)	Số không tăng IC ₅₀ (nmol/L)	Tổng	OR, 95%CI:
Có đột biến gen K13 liên quan kháng ART	6	19	25	1,47:1,15-4,79
Kiểu hoang dại hoặc đột biến K13 không liên quan đến kháng ART	3	14	17	
Tổng	9	33	42	

Nguy cơ kháng chloroquin ở mức mẫu có gen K13 liên quan đến kháng thuốc cao gấp 1,47 lần mức mẫu không có gen K13 liên quan đến kháng thuốc ART.

3.3. Ảnh hưởng của đột biến gen K13 liên quan đến kháng thuốc với nồng độ trung bình IC₅₀ của artemisinin

Bảng 3.4. Nồng độ IC₅₀ trung bình ở các mẫu thử nghiệm với dihydro artemisinin (n = 42)

Kiểu gen	Số lượng	IC ₅₀ trung bình (nmol/L)	Giá trị p
Có đột biến gen K13 liên quan kháng ART	25	3,53	< 0,01
Kiểu hoang dại hoặc đột biến K13 không liên quan đến kháng ART	17	2,37	
Tổng	42	2,95 ± 2,19 (0,52 – 9,94)	

Khác biệt có ý nghĩa thống kê về nồng độ IC₅₀ trung bình ở nhóm có đột biến gen K13 liên quan đến kháng thuốc ART và nhóm có gen K13 không liên quan đến kháng thuốc ART (3,53 nmol/L so với 2,37 nmol/L, p < 0,01).

3.4. Ảnh hưởng của đột biến gen K13 liên quan đến kháng thuốc với nồng độ trung bình IC₅₀ của piperacuin

Bảng 3.5. Nồng độ IC₅₀ trung bình ở các mẫu thử nghiệm với piperacuin (n = 42)

Kiểu gen	Số lượng	IC ₅₀ trung bình (nmol/L)	Giá trị p
Có đột biến gen K13 liên quan kháng ART	25	41,81	> 0,05
Kiểu hoang dại hoặc đột biến K13 không liên quan đến kháng ART	17	44,30	
Tổng	42	43,5 ± 24,9	

Khác biệt không có ý nghĩa thống kê về nồng độ IC₅₀ trung bình ở nhóm có đột biến gen K13 liên quan đến kháng thuốc ART và nhóm có gen K13 không liên quan đến kháng thuốc ART khi thử nghiệm với piperacuin (41,81 nmol/L so với 44,30 nmol/L, với p > 0,05).

4. BÀN LUẬN

Hiện nay, các nghiên cứu tại Việt Nam và trên thế giới đều chưa đưa ra được kết quả bao nhiêu nmol/L là nồng độ ức chế tối thiểu. Tuy nhiên các nhà khoa học nhận thấy nồng độ ức chế tối thiểu tăng dần đồng nghĩa với tỷ lệ kháng thuốc cũng tăng dần. Năm 2004 nghiên cứu tại Bù Gia Mập IC₅₀ trung bình là (1,3 ± 0,6) nmol/L [5] so với kết quả của chúng tôi là (2,93 ± 2,17) nmol/L đã tăng > 2 lần sau 15 năm. Kết quả này cũng tương tự nghiên cứu tại Gabon châu Phi IC₅₀ trung bình là (2,08 ± 1,89) nmol/L [6] và đặc biệt tại Campuachia IC₅₀ trung bình tăng dần ở từng năm: Năm 2001 1,1 nmol/L (0,1 – 9,9) nmol/L; Năm 2002 là 1,0 nmol/L (0,2 – 100) nmol/L; Năm 2003 là 1,2 nmol/L (0,2 – 130) nmol/L; Năm 2004 là 1,8 nmol/L (0,3 – 7,1) nmol/L;

Năm 2005 là 1,6 nmol/L (0,7 – 7,2) nmol/L; Năm 2007 là 1,7 nmol/L (0,4 – 6,7) nmol/L. Các kết quả này củng cố thêm nhận định tình trạng tăng IC₅₀ trung bình cũng có nghĩa là tăng tỷ lệ kháng thuốc artesunat đơn thuần khi điều trị sốt rét do *Plasmodium falciparum* [6], [7].

Theo WHO, nồng độ IC₅₀ > 100 nmol/L là ký sinh trùng đã kháng với chloroquin. Từ kết quả 42 mẫu thử nghiệm có 6 mẫu ở nhóm có gen K13 đột biến liên quan đến kháng ART có nồng độ chloroquin > 100 nmol/L, 19 mẫu có nồng độ chloroquin < 100 nmol/L, trong khi ở nhóm Kiểu hoang dại hoặc đột biến K13 không liên quan đến kháng ART có 3 mẫu có nồng độ chloroquin > 100 nmol/L, 14 mẫu có nồng độ chloroquin < 100 nmol/L. Khi phân tích tỷ suất chênh OR thông qua lập bảng 2x2 kết quả của chúng tôi cho thấy IC₅₀ trung bình đã tăng cao, chứng tỏ *P. falciparum* đã kháng với chloroquin. Các tác giả trên thế giới chưa đi sâu phân tích tỷ suất chênh OR về nguy cơ kháng chloroquin của *P. falciparum* mà mới đi sâu giá trị chloroquin với *P. falciparum* đơn thuần chưa biến chứng, điển hình là các nghiên cứu có giá trị IC₅₀ trung bình cao hơn nghiên cứu của chúng: Nghiên cứu tại Kenyan (2008) nồng độ IC₅₀ trung bình

của chloroquin với *P. falciparum* là 158 ± 75 nmol/L. Nghiên cứu tại Thái Lan năm 2017 trên các bệnh nhân sốt rét do *P. falciparum* đơn thuần có nồng độ IC_{50} trung bình của chloroquin với *P. falciparum* là $90,7 \pm 43,3$ nmol/L ($18,2 - 230,3$) nmol/L [8]. Trên thế giới có nhiều tác giả nghiên cứu về IC_{50} trung bình ở nhóm có đột biến gen K13 liên quan đến kháng thuốc ART và nhóm có gen K13 không liên quan đến kháng thuốc ART có kết quả thấp hơn nghiên cứu của chúng tôi, cụ thể: Nghiên cứu của Cameroon năm 1999 có giá trị IC_{50} trung bình $1,11$ nmol/L ($0,25 - 4,56$) nmol/L [9]. Nghiên cứu tại Pháp ở các bệnh nhân sốt rét do *P. falciparum* nhập khẩu từ châu Phi cho kết quả IC_{50} trung bình $1,3$ nmol/L ($0,1 - 21,2$) nmol/L. Nghiên cứu tại Thái Lan năm 2017, giá trị IC_{50} trung bình $2,1 \pm 1,2$ nmol/L ($0,20 - 56$) nmol/L [8]. Kết quả nghiên cứu này thấp hơn nghiên cứu tại Pháp ở các bệnh nhân sốt rét do *P. falciparum* nhập khẩu từ châu Phi cho kết quả IC_{50} trung bình $66,8$ nmol/L ($11,8 - 217,3$) nmol/L [10]. Nghiên cứu tại vùng biên giới của Thái Lan với các nước láng giềng năm 2016, giá trị IC_{50} trung bình $16,7 \pm 6,3$ nmol/L ($6,4 - 33,7$) nmol/L [11]. Cũng tại Thái Lan năm 2017, ở bệnh nhân sốt rét đơn thuần do *P. falciparum* có giá trị IC_{50} trung bình $18,4 \pm 8,4$ nmol/L ($6,4 - 55,5$) nmol/L [8].

5. KẾT LUẬN

Với 42 mẫu được thực hiện thử nghiệm *in vivo* với các thuốc điều trị sốt rét, kết quả: IC_{50} trung bình của artesunat đối với *Plasmodium falciparum* là $3,06 \pm 3,10$ nmol/L; IC_{50} trung bình của dihydroartemisinin đối với *Plasmodium falciparum* $2,95 \pm 2,19$ nmol/L; IC_{50} trung bình của chloroquin đối với *Plasmodium falciparum* $67,7 \pm 51,3$ nmol/L; Nguy cơ kháng chloroquin ở mức mẫu có gen K13 liên quan đến kháng thuốc cao gấp 1,47 lần mức mẫu không có gen K13 liên quan đến kháng thuốc ART; IC_{50} trung bình của piperakin đối với *Plasmodium falciparum* $43,5 \pm 24,9$ nmol/L.

KIẾN NGHỊ

Cần có các nghiên cứu đánh giá thử nghiệm lâm sàng với các thuốc artesunat, dihydroartemisinin, chloroquin

và piperakin trong điều trị sốt rét do Plasmodium falciparum chưa biến chứng để đánh giá chính xác giá trị IC_{50} nhằm có khuyến cáo sử dụng thuốc hiệu quả nhất cho người bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương, Quy trình kỹ thuật thu mẫu máu ngoại vi trên giấy Whatman 3MM đóng gói, bảo quản và vận chuyển mẫu, Sách hướng dẫn kỹ thuật SOP, Tập 2, Nhà Xuất bản Y học, Tr.21-26, 2017.
- [2] Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương, Bệnh sốt rét: Dịch tễ, bệnh học, lâm sàng điều trị và phòng bệnh, Sách tham khảo, Nhà Xuất bản Y học, 2020.
- [3] Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương, Quy trình kỹ thuật thu làm lam máu giọt dày, giọt mỏng để phát hiện ký sinh trùng sốt rét, Sách hướng dẫn kỹ thuật SOP, Tập 3, Nhà Xuất bản Y học, 2019.
- [4] Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương, Quy trình kỹ thuật gắn thuốc sốt rét lên phiến nhựa 96 giếng sử dụng trong đánh giá độ nhạy cảm của ký sinh trùng sốt rét, Sách hướng dẫn kỹ thuật SOP tập 6, Nhà Xuất bản Y học, 2019.
- [5] Đoàn Hạnh Nhân và CS, Nghiên cứu thuốc artemisinin (dihydroartemisinin –piperazine) điều trị sốt rét ở Việt Nam, Công trình nghiên cứu khoa học chuyên ngành Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng, Nhà Xuất bản Y học, Tr.144-152, 2005.
- [6] Florian K, Peter P et al., In vitro activity of pyronaridine against Plasmodium falciparum and comparative evaluation of anti-malarial drug susceptibility assays, Publishsd Malaria Journal, 2009.
- [7] Pharath L, Chansuda W et al., Decreased In vitro susceptibility of Plasmodium falciparum insulates to artesunate, mefloquine, chloroquin and quinin in Cambodia from 2001 to 2007 and 2010, PMID, 2010.

- [8] Kittiya M, Peerapan T et al., In vitro sensitivity of pyronaridin in Thai Lan Isolates of Plasmodium falciparum, *Am. Journal Trop Med Hyg*, Vol.98(1), pp.51-56, 2018.
- [9] Aurelie P, Pilippe P et al., Ex In vitro activity of the ACT new components pyronaridine and piperaquine in compation with conventionnal ACT drug against isolates of Plasmodium falciparum , PMID: 22333675 *Malar Journal* Published, 2012.
- [10] Ringwald P, Basco LK, In vitro activity of dihydroartemisinin again clinical isolates of Plasmodium falciparum in Yaounde, Cameroon, *Am Journal Trop Med Hyg*, Vol.61(2), pp:187-192, 1999.
- [11] Mathirut M, Ekularn W et al., Influence of pfmdrl gene on In vitro sensitivities of piperaquine in Thai Lan isolates of Plasmodium falciparum , *Am Journal Trop Med Hyg*, Vol.96(3), pp.624-629, 2017.

