

ĐỘT BIẾN GEN K13 VÀ TÌNH TRẠNG CHẬM LÀM SẠCH KÝ SINH TRÙNG *Plasmodium falciparum* TẠI ĐẮK NÔNG VÀ GIA LAI

Huỳnh Hồng Quang¹, Hồ Đắc Hoàn¹, Đào Duy Khánh².

Giới thiệu: Ký sinh trùng *Plasmodium falciparum* kháng artemisinin là mối quan tâm tại khu vực Đông Nam Á. Xuất hiện kháng và lan rộng dường như độc lập với nhau. Do đó, mục tiêu cần thiết phải làm rõ vai trò chi điểm phân tử K₁₃ để giám sát kháng artemisinin cho phù hợp. **Phương pháp:** Một thiết kế nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng không đối chứng có cải tiến theo dõi ngắn ngày (Fast - TES), phân tích mẫu bằng kỹ thuật Nested PCR và giải trình tự, phân tích đột biến gen K₁₃ với mẫu thu thập dựa trên nghiên cứu *in vivo* nhằm xác định sự có mặt đa hình đột biến gen K₁₃; và mô tả sự liên quan giữa đột biến K₁₃ với tình trạng chậm làm sạch ký sinh trùng. **Kết quả:** Số liệu cho thấy tỷ lệ tồn tại ký sinh trùng sốt rét ngày D₃ là 35,6% và 21,1% lần lượt tại Gia Lai và Đăk Nông. Với các mẫu không còn tồn tại *P. falciparum* thể vô tính ngày D₃ tại Gia Lai và Đăk Nông, các đột biến thu được chủ yếu T474I và K503N (Gia Lai) và E605K và V520I (Đăk Nông) hay loại hoang dại (wild type) - đây là các đột biến chưa xác định liên quan đến kháng thuốc. Các mẫu có tồn tại KST thể vô tính ở ngày D₃, các đột biến thu nhận được là C580Y, R539T, Y493H, V568G lần lượt 36,5%; 16,5%; 1,2%; 5,2% (điểm Gia Lai); C580Y, I543T, E605K, K503K và V520I lần lượt 24,6%, 12%, 3%, 0,9%, 8% (điểm Đăk Nông). **Kết luận:** Các đột biến xác định kháng hoặc có liên quan kháng thuốc chiếm ưu thế trong nhóm bệnh nhân có tồn tại ký sinh trùng sốt rét ngày D₃(+). Sự làm chậm sạch *P. falciparum* thể vô tính trong máu có liên quan với các đột biến kháng thuốc.

Từ khóa: Kháng thuốc, K₁₃ propeller, hiệu lực, *Plasmodium falciparum*.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tại nhiều quốc gia trong khu vực Đông Nam Á, ký sinh trùng *Plasmodium falciparum* kháng với artemisinin và các dẫn xuất đang đe dọa các thành quả của chương trình phòng chống và loại trừ sốt rét⁽¹⁾. Đa hình đột biến gen K₁₃, có liên quan đến tỷ lệ sống sót của ký sinh trùng sốt rét (KSTSR) trong thử nghiệm giai đoạn thể nhân (ring stage assay thời điểm 0 và 3 giờ, viết tắt RSA_{0-3h}) của *P. falciparum*⁽¹⁾, đồng thời có liên quan đến hiện tượng chậm làm sạch ký sinh trùng⁽²⁾ hay giảm sự nhạy cảm của KSTSR với thuốc ở giai đoạn tự dưỡng và tỷ lệ KSTSR

tự dưỡng vào ngày thứ 3 (giờ thứ 72) ở bệnh nhân điều trị SR do *P. falciparum* với thuốc phối hợp có thành phần artemisinin (Artemisinin based combination therapies - ACTs), được ứng dụng là chỉ thị phân tử để xác định kháng artemisinin. Các đột biến này được xác định có mặt tại nhiều tỉnh của Campuchia và đặc biệt khu vực tiểu vùng sông Mê Kông, bao gồm Việt Nam. Tuy nhiên, nhiều đột biến K₁₃ tồn tại, song không phải luôn luôn tỷ lệ thuận với sự chậm làm sạch KSTSR sau điều trị artemisinin và các dẫn xuất^(3,4). Xuất hiện kháng artemisinin và lan rộng dường như độc lập với nhau. Do đó, cần làm rõ vai trò đột biến K13 là một chỉ thị phân tử có độ nhạy, độ đặc hiệu cao để kiểm soát kháng artemisinin⁽⁵⁾. Các tỉnh miền Trung, Tây Nguyên là nơi có tỷ lệ mắc và tử vong cao do sốt rét hàng năm và các nguy cơ giảm hiệu lực dihydroartemisinin - piperaquin [DHA - PPQ], thậm chí thất bại hoặc kháng thuốc cao. Đề tài này tiến hành tại 2 tỉnh Đăk Nông và Gia Lai nhằm mục tiêu: Xác định sự có mặt

¹Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn, ²Sở Y tế tỉnh Kon Tum.

Ngày nhận bài: 21/9/2016

Ngày phản biện xong: 25/12/2016.

Ngày duyệt đăng: 2/1/2017

Người chịu trách nhiệm nội dung khoa học: Huỳnh Hồng Quang, Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn.

Điện thoại: 0269 3306 E-mail: huynhhongquangimpr@yahoo.com

các đa hình đột biến gen K_{13} tại điểm nghiên cứu và mô tả sự liên quan giữa đột biến K_{13} với tình trạng chậm làm sạch ký sinh trùng sau điều trị.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

Phương pháp

+ Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng không đối chứng với đề cương của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), 2009 có cải tiến theo dõi ngăn ngừa (Fast - TES) đối với theo dõi bệnh nhân trong thời gian 7 ngày đầu.

+ Phân tích mẫu tại phòng thí nghiệm bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự phát hiện đột biến K_{13} với cỡ mẫu thu thập dựa trên nghiên cứu *in vivo*.

Đối tượng nghiên cứu

+ **Tiêu chuẩn chọn bệnh:** Các bệnh nhân từ 3 tuổi trở lên đến dưới 70 tuổi, nhiễm đơn thuần loại KSTSR *P. falciparum*, mật độ KSTSR thể vô tính *P. falciparum* trong máu $\geq 1.000 - < 100.000/\mu\text{L}$ máu, nhiệt độ nách hoặc tai $> 37,5^\circ\text{C}$ chưa dùng một loại thuốc sốt rét nào, bệnh nhân, hoặc người thân đồng ý hợp tác. Địa điểm nghiên cứu: Huyện Krông Pa (tỉnh Gia Lai) và huyện Cư Jút (tỉnh Đắk Nông). Trong thời gian từ tháng 4/2015 - 12/2015.

+ **Tiêu chuẩn loại trừ:** Các bệnh nhân nhỏ hơn 3 tuổi hoặc lớn hơn 70 tuổi, phụ nữ đang có thai, hoặc đang cho con bú, người đang có bệnh rối loạn tâm thần kinh, động kinh, nôn mửa, tiêu chảy trầm trọng hoặc thể trạng không hấp thu được thuốc, sốt rét có biến chứng hoặc mắc các bệnh nhiễm trùng phối hợp. Nhiễm sốt rét phối hợp *P. falciparum* với loài *Plasmodium sp.* khác, bệnh nhân đã dùng thuốc có hoạt tính thuốc sốt rét trong 48 giờ trước nghiên cứu, bệnh nhân trong độ tuổi sinh đẻ cần phải thử test thai âm tính.

Cỡ mẫu nghiên cứu: Trong nghiên cứu này, nếu xem tỷ lệ thất bại của thuốc DHA - PPO tại một vùng nghiên cứu biết trước đó khoảng 15%, nên tỷ lệ được chọn để ước tính tỷ lệ thất bại là $p = 15\%$, khoảng tin cậy 95%, độ chính xác $d = 10\%$. Khi đó, cỡ mẫu tối thiểu cần trong nghiên cứu $n = 50$.

Phương pháp tiến hành nghiên cứu: Bệnh nhân tham gia nghiên cứu được đánh giá các thông số lâm sàng, KSTSR và đánh giá thời gian làm sạch KSTSR, phân tích sinh học phân tử xác định gen PF3D7_1343700 mang đột biến liên quan kháng artemisinin, sau đó phân tích giải trình tự, xác định đa hình các đột biến K_{13} . Các xét nghiệm

được tiến hành tại phòng sinh học phân tử Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn.

Phân tích và xử lý số liệu

+ Số liệu thu thập được tổng hợp, phân tích và xử lý theo phần mềm *in vivo* phiên bản 7.1 (WHO, 2009) và dựa vào kết quả phân tích đột biến K_{13} .

+ Thời gian làm sạch KSTSR (được định nghĩa là khoảng thời gian tính bằng giờ để từ liều điều trị đầu tiên cho đến khi xét nghiệm có 2 lam máu liên tiếp âm tính với thể vô tính *P. falciparum*).

+ Tính tỷ lệ từng loại đột biến dựa trên số loại đột biến trên tổng số mẫu được phân tích của từng nhóm có tồn tại thể vô tính ngày D_3 và nhóm không tồn tại thể vô tính ngày D_3 .

KẾT QUẢ

Đặc điểm chung bệnh nhân sốt rét dương tính trong thời gian nghiên cứu

Bảng 1. Đặc điểm chung bệnh nhân sốt rét trong thời gian nghiên cứu bằng kính hiển vi

Thông số	Gia Lai		Đắk Nông	
	Số lượng	%	Số lượng	%
Số KSTSR (+)	74		21	
<i>P. falciparum</i>	59	79,7	19	90,5
<i>P. vivax</i>	14	18,9	2	9,5
<i>P. f + P. v</i>	01	1,4	0	0
Nhóm tuổi				
< 5	5	6,7	0	0
$\geq 5 - < 15$	9	12,2	3	14,3
≥ 15	60	81,1	18	85,7

Nhận xét: Với số ca đủ tiêu chuẩn đưa vào nghiên cứu *in vivo*, theo dõi liệu trình 7 ngày. Mật độ KSTSR thể vô tính trung bình trong máu tại điểm Gia Lai và điểm Đắk Nông lần lượt là 15.7567/ μL máu và 22.500/ μL máu, là không phải mật độ cao.

Bảng 2. Hiệu lực điều trị và tồn tại thể vô tính sau điều trị phác đồ DHA - PPO

Thông số phân tích	Gia Lai (n = 59)		Đắk Nông (n = 19)	
	Số lượng	%	Số lượng	%
Số ca sạch KST vô tính sau điều trị phác đồ DHA - PPO	38	64,4	15	78,9
Số ca còn tồn tại KST vô tính ngày D_3 (hay giờ 72)	21	35,6	4	21,1

Nhận xét: Về hiệu quả phác đồ DHA - PPO trong điều trị

trị sốt rét do *P. falciparum* chưa biến chứng cho thấy về hiệu lực chữa khỏi, sạch KSTR thể vô tính trong 7 ngày đầu với đáp ứng lâm sàng và ký sinh trùng đầy đủ (ACPR) là 100%, theo dõi sau 3 ngày điều trị cho tỷ lệ sạch KSTR thể vô tính là 64,4% và số còn tồn thể vô tính là 35,6% (điểm Gia Lai) và tỷ lệ sạch KSTR thể vô tính ở điểm Đắk Nông là 78,9% và tỷ lệ tồn tại KSTR ngày D₃ là 21,1%.

Xác định đa hình các đột biến gen K₁₃ propeller tại 2 điểm

Trong tổng số 59 ca và 19 ca *P. falciparum* lần lượt tại Gia Lai và Đắk Nông đủ tiêu chuẩn đưa vào nghiên cứu, lấy mẫu giấy thấm ngày D₃, kể cả những ca còn tồn tại KSTR thể vô tính ngày D₃ (21 ca ở Gia Lai và 4 ca ở Đắk Nông).

Số mẫu giấy thấm đạt tiêu chuẩn phân tích 53/59 (điểm Gia Lai) và 16/19 (Đắk Nông).

Bảng 3. Phân tích đột biến K₁₃ propeller trên nhóm không còn tồn tại KSTR thể vô tính ngày D₃

Điểm NC	Mẫu không còn tồn tại <i>P. falciparum</i> thể vô tính ngày D ₃	
	Số mẫu	Loại đột biến phát hiện
Gia Lai (n = 53)	32	T474I, K503N
Đắk Nông (n = 16)	12	E605K, V520I
Tổng số		44

Nhận xét: Số phân lập phân tích đột biến K₁₃ tại Gia Lai là 53 và tại Đắk Nông là 16 ca (bao gồm cả số ca D₃(+). Mẫu không còn tồn tại *P. falciparum* thể vô tính ngày D₃ tại Gia Lai và Đắk Nông thu nhận được các đột biến T474I và K503N (điểm Gia Lai) và loại E605K và V520I (điểm Đắk Nông), số còn lại là dạng hoang dại (wild - type).

Bảng 4. Phân tích đột biến K₁₃ propeller trên nhóm có tồn tại KSTR thể vô tính ngày D₃

Điểm NC	Mẫu còn tồn tại <i>P. falciparum</i> thể vô tính ngày D ₃	
	Số mẫu	Loại đột biến phát hiện (tỷ lệ % các đột biến)
Gia Lai (n = 53)	21	C580Y (36,5%), R539T (16,5%), Y493H (1,2%), V568G (5,2%)
Đắk Nông (n = 16)	4	C580Y (24,6%), I543T (12%), E605K (3%), K503K (0,9%), V520I (8%)
Tổng số		25

Nhận xét: Trên các phân lập trên bệnh nhân có tồn tại KSTR thể vô tính ngày D₃(+) xuất hiện các đột biến C580Y

(36,5%), R539T (16,5%), Y493H (1,2%) và V568G (5,2%) tại điểm Gia Lai hoặc C580Y (24,6%), I543T (12%), E605K (3%), K503N (0,9%), V520I (8%) tại Đắk Nông.

Bảng 5. So sánh loại đột biến với phân loại các đột biến K₁₃ theo WHO

Điểm nghiên cứu	Tỷ lệ từng loại đột biến trên ca KST (+) ngày D ₃	So sánh theo phân loại WHO, 2015	
		Đột biến K ₁₃	Phân loại
Gia Lai (n = 21)	C580Y (36,5%), R539T (16,5%), Y493H (1,2%), V568G (5,2%)	441L	Liên quan ⁽¹⁾
		446I	Liên quan ⁽²⁾
		449A	Liên quan ⁽¹⁾
		458Y	Liên quan ⁽²⁾
		493H	Xác định ⁽²⁾
		539T	Xác định ⁽²⁾
Đắk Nông (n = 4)	C580Y (24,6%), I543T (12%), E605K (3%), K503K (0,9%), V520I (8%)	543T	Xác định ⁽¹⁾
		553L	Liên quan ⁽¹⁾
		561H	Liên quan ⁽¹⁾
		568G	Liên quan ⁽¹⁾
		574L	Liên quan ⁽¹⁾
		580Y	Xác định ⁽²⁾
	675V	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*.

Nhận xét: Tại điểm Gia Lai, có 3 loại đột biến K₁₃ propeller phù hợp với phân loại đột biến của Tổ chức Y tế thế giới (WHO, 2015) xác định kháng (confirmed) là C580Y, R539T và Y493H và đột biến có liên quan (associated) kháng thuốc là V568G. Tại Đắk Nông xuất hiện 2 loại đột biến C580Y, I543T phù hợp xác định kháng theo phân loại của WHO và 3 loại đột biến khác hiện chưa xác định có liên quan đến kháng là E605K, K503K và V520I.

BÀN LUẬN

Đặc điểm chung nhóm bệnh nhân sốt rét dương tính

Trong 21 ca có KSTR dương tính ghi nhận tại Đắk Nông, số ca nhiễm đơn thuần *P. falciparum* chiếm ưu thế với 19 ca (90,5%), loài *P. vivax* là 2 (9,5%) và nhóm tuổi bệnh nhân tập trung nhiều nhất là từ 15 tuổi trở lên (85,7%). Số mẫu tại Đắk Nông thấp so với số mẫu tối thiểu trong đề cương vì một số lý do: Tình hình bệnh nhân thấp hơn so với các năm trước, huyện Cư Jút, tỉnh Đắk Nông thuộc dự án Sáng kiến ngăn chặn sốt rét kháng artemisinin (RAI_Regional Artemisinin Resistance Initiative) đã triển khai hoạt động theo dõi KSTR ngay D₃ sau điều trị tại tuyến dưới, một số trạm y tế xã đã giữ bệnh

nhân lại không chuyển lên tuyến trên (Bệnh viện đa khoa huyện Cư Jút), nên nhiều hoạt động can thiệp, phần nào làm giảm số ca đưa vào nghiên cứu.

Mật độ trung bình *P. falciparum* thể vô tính trong máu tại điểm Gia Lai và Đắk Nông lần lượt 15.7567/ μ L và 22.500/ μ L là không phải mật độ cao, nên tiêu chí này không đưa vào phân tích như một yếu tố làm tồn tại KSTSR thể vô tính *P. falciparum* sau điều trị như một số nghiên cứu trước (Tạ Thị Tĩnh và CS., 2010)^[5] và ở Campuchia hay Myanmar cho rằng sự tồn tại KSTSR ngày D_3 sau điều trị artemisinin hoặc thuốc ACTs có liên quan đến mật độ cao (> 100.000/ μ L) trong máu ngoại vi ngày D_0 trước khi điều trị.

Hiệu lực phác đồ điều trị DHA - PPQ đôi với sốt rét do *P. falciparum* chưa biến chứng

Hiệu quả chữa khỏi của DHA - PPQ trong điều trị sốt rét do *P. falciparum* chưa biến chứng cho thấy sạch thể vô tính trong 7 ngày đầu với đáp ứng lâm sàng và kỹ sinh trùng đầy đủ (ACPR) là 100%. Tuy nhiên, theo dõi sau 3 ngày điều trị cho tỷ lệ sạch KSTSR thể vô tính chỉ có 74,4% và 78,9% lần lượt tại điểm Gia Lai và Đắk Nông. Số ca còn tồn tại thể vô tính là 35,6% và 21,1% lần lượt tại điểm Gia Lai và Đắk Nông. Cả hai điểm đều có tỷ lệ $D_3(+)$ trên 10% như một chỉ điểm lâm sàng gián tiếp kháng thuốc artemisinin, nên cần phân tích thêm về các chỉ điểm phân tử hoặc chỉ số dược động học để xác định nồng độ thuốc tại thời điểm đó có còn đủ ức chế KSTSR hay không?

Số liệu trên đây tương tự như một số nghiên cứu ở trong nước được các tác giả ghi nhận tại các điểm nghiên cứu liên tục ở các vùng sốt rét lưu hành tại khu vực miền Trung, Tây Nguyên và Bình Phước. Tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và kỹ sinh trùng đầy đủ (ACPR) từ 94,7 - 100% và tỷ lệ tồn tại thể vô tính *P. falciparum* tại các tỉnh cũng còn cao, như tại Bình Phước tăng dần theo từng năm, từ 15% đến 22%, 30%, 36%, 36,8% giai đoạn 2010 - 2015 và tại khu vực miền Trung, Tây Nguyên cũng vậy, Quảng Nam với tỷ lệ tồn tại ngày D_3 là 29,2%, Kon Tum là 14,8%, Khánh Hòa là 17,4%, Gia Lai từ 11% lên 23%, 26,4% (từ 2010 - 2014). So sánh với các nghiên cứu các nước trong khu vực, thì tỷ lệ này có thấp hơn, đặc biệt tại các điểm Pailin, Rattanakiri, Battambang của Campuchia với tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và KST đầy đủ là 90 - 95%, cũng với sự tồn tại KSTSR ngày D_3 cao theo các năm tại

các điểm theo dõi liên tục, từ 2008 - 2012 là 26%, 33%, 45%, 54%, hoặc tỷ lệ này cao hơn ở điểm Jingyang, Trung Quốc (D_3 dương tính 14%), hoặc ở Champassack, Lào 22% (2012), hoặc tại Kawthaung, Mon của Myanmar từ 14%, lên 19%, 23% (từ 2011 - 2013), hoặc tại điểm Tak, Maehongson, Kanchanaburi của Thái Lan có tỷ lệ $D_3(+)$ từ 9%, lên 14%, 17%, 25%, 48% (2009 - 2014)^[6]. Điều này cho thấy nguy cơ kháng không những lan rộng trong nước mà còn lan rộng trong toàn khu vực tiểu vùng sông Mê Kông.

Xác định gen đột biến K_{13} propeller tại các điểm nghiên cứu

Trong tổng số 59 ca và 19 ca *P. falciparum* lần lượt ở Gia Lai và Đắk Nông đủ tiêu chuẩn đưa vào nghiên cứu đều được lấy máu giầy thấm ngày D_3 , kể cả những ca còn tồn tại KSTSR thể vô tính ngày D_3 (21 ca ở Gia Lai và 4 ca ở Đắk Nông). Số mẫu đạt tiêu chuẩn là 53/59 và 16/19, số còn lại không đạt do kỹ thuật lấy máu, hoặc bệnh nhân không cho lấy lượng máu lớn nên không phân tích được.

Đối với nhóm không có tình trạng chậm làm sạch KST thể vô tính trong máu tại Gia Lai và Đắk Nông cho thấy các dạng chủ yếu là dạng hoang dại (wild type), hoặc T474I và K503N (Gia Lai) và E605K và V520I (Đắk Nông), đây là các loại đột biến chưa xác định có liên quan đến kháng thuốc theo ghi nhận của WHO (so sánh với bảng các phân loại đột biến K_{13} của Mạng lưới kháng artemisinin toàn cầu và Tổ chức Y tế thế giới (2015))^[7]. Số liệu về các đột biến không có nghĩa này cũng phù hợp với phân tích đột biến K_{13} tại huyện Hướng Hóa, Quảng Trị và các điểm sentinel tại Lào, nơi có giáp ranh với Quảng Trị. Tuy nhiên, khác loại đột biến tại tỉnh Quảng Nam và Ninh Thuận.

Đối với nhóm các bệnh nhân có biểu hiện nghi ngờ kháng thuốc hay có tồn tại thể vô tính ở ngày $D_3(+)$, các đột biến được xác định là C580Y, R539T, Y493H, V568G (Gia Lai) hoặc C580Y, I543T, E605K, K503N, V520I (Đắk Nông). Đáng lưu ý, các loại đột biến ở huyện Krông Pa, Gia Lai này lại khác với loại đột biến kháng thuốc K_{13} tại một điểm nghiên cứu khác thuộc huyện Phú Thiện, tỉnh Gia Lai (chưa phát hiện có đột biến C580Y mà chỉ thấy chủ yếu Y493H), dù hai điểm này cách nhau chừng 95 - 100km và đều không có giao lưu biên giới, phần lớn các bệnh nhân đều đi làm rẫy, rừng ở trong bán kính từ 14km (điểm Phú Thiện) đến 26km (điểm Krông Pa). Có thể thấy,

tình hình kháng thuốc của KSTSR ở Việt Nam không những xảy ra tại vùng có giao lưu biên giới với Campuchia như Đắk Nông, Bình Phước, Gia Lai, mà còn xảy ra nội tại trong vùng không có giao lưu biên giới với Campuchia như Quảng Nam, Gia Lai, Khánh Hòa, Kon Tum, điều đó đã được xác định bằng các "khoảng trống, loang lổ" trên bản đồ Tier 1, không như hình ảnh "vết đầu loang" ở các điểm kháng thuốc quốc gia Thái Lan, Campuchia, Myanmar.

Mối liên quan giữa đột biến gen K_{13} propeller với sự chậm sạch KST

Tại điểm Gia Lai có 3 loại đột biến K_{13} propeller là đột biến xác định kháng thuốc (confirmed) theo phân loại Tổ chức Y tế thế giới (2015) là C580Y, R539T và Y493H và 1 loại đột biến được xem có liên quan kháng (associated) là V568G. Tại Đắk Nông, có 2 loại đột biến C580Y, I543T là dạng xác định kháng và 3 loại đột biến khác là E605K, K503K và V520I không xác định kháng hoặc liên quan đến kháng hoặc các đột biến này có thể không liên quan đến kháng ở vùng này nhưng lại xác định có liên đới đến kháng ở vùng khác, quốc gia khác.

Xét về tỷ lệ các loại đột biến trên các mẫu giấy thấm có chứa KSTSR *P. falciparum* cho thấy C580Y chiếm tỷ lệ 36,5%, R539T (16,5%), Y493H (1,2%) và loại V568G (5,2%) tại điểm Gia Lai. Trong khi đó, tại Đắk Nông, tỷ lệ các đột biến là C580Y (24,6%), I543T (12%), E605K

(3%), K503K (0,9%), V520I (8%), số còn lại là các đột biến không có ý nghĩa hoặc đột biến hoang dại. Với các dữ liệu và bảng chứng ở trên cho thấy, sự làm chậm sạch KST thể vô tính trong máu hay còn tồn tại KST D3(+) có liên quan với các đột biến kháng thuốc được xác nhận như C580Y, R539T và Y493H (Gia Lai) và C580Y, I543T (Đắk Nông).

KẾT LUẬN

- Hiệu lực phác đồ DHA - PPQ sau 3 ngày điều trị cho tỷ lệ sạch KSTSR thể vô tính chỉ có 74,4% và 78,9%, song tỷ lệ còn tồn tại KSTSR dương tính ngày D₃ là 35,6% và 21,1% lần lượt tại điểm Gia Lai và Đắk Nông.

- Ở các bệnh nhân có biểu hiện kháng thuốc có tồn tại thể vô tính ngày D3(+), tại điểm Gia Lai xuất hiện 3 đột biến xác định kháng (C580Y, R539T, Y493H) và liên quan kháng (V568G). Trong khi đó, tại điểm Đắk Nông, có 2 đột biến xác định kháng (C580Y, I543T) và 3 loại đột biến khác không liên quan kháng thuốc hoặc vai trò chưa xác định rõ (E605K, K503K và V520I).

- Các đột biến xác định kháng hoặc có liên quan chiếm ưu thế: C580Y (36,5%), R539T (16,5%), Y493H (1,2%) và V568G (5,2%) tại Gia Lai và C580Y (24,6%), I543T (12%) tại Đắk Nông. Điều này cho thấy, có mối liên quan giữa các đột biến xác định kháng hoặc liên quan kháng thuốc và tình trạng chậm làm sạch KSTSR.

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(7481): 50 - 55.
2. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C et al., (2014). Tracking resistance to artemisinin. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*, 371(5): 411 - 423.
3. Melissa D. Conrad, Victor Bigira, James Kapisi et al., (2014). Polymorphisms in K13 and Falcipain - 2 associated with artemisinin resistance are not prevalent in *Plasmodium falciparum* isolated from Ugandan children. *PLoS One*, 9(8): 1 - 6.
4. Rie Isozumi HU, Isao Kimata, Yoshio Ichinose JL et al., (2015). Novel mutations in K_{13} propeller gene of artemisin - resistant *P. falciparum*. *Emerging infectious diseases*, 21(3): 490 - 492.
5. Tạ Thị Tinh, Nguyễn Văn Hường, Bùi Quang Phúc, Ngô Việt Thành, Huỳnh Hồng Quang và CS., (2011). Hiệu lực điều trị một số thuốc sốt rét đối với *Plasmodium falciparum*, giai đoạn 2005 - 2010. Công trình nghiên cứu khoa học. Báo cáo Hội nghị KST toàn quốc lần thứ 38 (Bệnh sốt rét). NXB Y học, Hà Nội, trang 95 - 103.
6. WHO, (2014). Status report on artemisinin resistance (pp. 1 - 7).
7. WHO, (2015). Status report on artemisinin and ACT resistance. September 2015.
8. Winzeler EA, Manary MJ (2014). Review: Drug resistance genomics of the antimalarial drug artemisinin. *Genome Biology*, 15(11): 544.

K13 PROPELLER MUTATION AND DELAYED PARASITE CLEARANCE OF *Plasmodium falciparum* IN DAKNONG AND GIALAI

Summary

Backgrounds: Resistance to the artemisinin in *Plasmodium falciparum* is an urgent health concern in South - East Asia. The spread or independent emergence of artemisinin resistance in other parts of the world could require to identify effective markers to monitor its spread.

Methods: A study design of non - randomized controlled study design for the first 7 days (Fast - TES), and the K_{13} -propeller domain will be amplified by nested PCR, then sequencing to detect K_{13} propeller polymorphisms and describe the correlation between K_{13} mutations and delayed parasite clearance. **Results:** the data showed that proportion of positive parasitemia at D_3 in Gialai was 35.6% and Daknong was 21.1%. Mutations observed in the patients had no positive parasitemia at D_3 are T474I and K503N (Gialai), E605K and V520I (Daknong), and wild type -

these are not correlated to artemisinin resistance. Vice - versa, overall the others mutant alleles in the patients day 3 positive post - treatment. The frequency of these are C580Y, R539T, Y493H, V568G of 36.5%; 16.5%; 1.2% and 5.2%, respectively (in Gia Lai sentinel site) and C580Y, I543T, E605K, K503K, V520I of 24.6%; 12%; 3%; 0.9% and 8%, respectively (in Daknong sentinel site). With the day 3 positivity patients post - treatment, the confirmed and associated mutations, respectively C580Y, R539T, Y493H, I543T and V568G, are prominent in comparison with the others not associated with artemisinin resistance (E605K, K503K, V520I). **Conclusions:** The confirmed or associated K_{13} - propeller mutant seems to be correlated to delayed parasite clearance time as followed by WHO classification.

Key words: Efficacy, drug resistance, K13 propeller, *Plasmodium falciparum*.