

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

NGUYỄN THỊ TRÀ

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN KHÁNG ARTEMISININ
TRÊN GEN K13 CỦA *Plasmodium falciparum* TẠI VÙNG SỐT RÉT
LƯU HÀNH NẶNG TỈNH BÌNH PHƯỚC, NĂM 2014 – 2015

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI – 2015

Số hóa bởi Trung tâm Học liệu – ĐHTN <http://www.lrc.tnu.edu.vn>

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

NGUYỄN THỊ TRÀ

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN KHÁNG ARTEMISININ
TRÊN GEN K13 CỦA *Plasmodium falciparum* TẠI VÙNG SỐT RÉT
LƯU HÀNH NẶNG TỈNH BÌNH PHƯỚC, NĂM 2014 – 2015

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Chuyên ngành: **Độc vật học**

Mã số: **60 42 01 03**

Người hướng dẫn khoa học: **TS. Trương Văn Hạnh**

HÀ NỘI – 2015

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của bản thân tôi. Các số liệu, kết quả trong luận văn này là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình hoặc tài liệu nào.

Tác giả

Nguyễn Thị Trà

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Trương Văn Hạnh, Thầy đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Lãnh đạo Viện Sốt rét-KST-CTTU đã tạo điều kiện thuận lợi, ủng hộ tôi về thời gian, vật chất và tinh thần trong quá trình thực hiện Luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn các Thầy, Cô, cán bộ Phòng Đào tạo Sau đại học, Ban lãnh đạo Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật, Trường Đại học Thái Nguyên đã tận tình giúp đỡ tôi trong quá trình học tập tại Trường.

Tôi xin chân thành cảm ơn tập thể cán bộ nghiên cứu Khoa Sinh học phân tử và cán bộ các Khoa/Phòng của Viện Sốt rét-KST-CTTU, đã giúp đỡ, ủng hộ và động viên tôi trong quá trình học tập và thực hiện đề tài.

Với lòng biết ơn sâu nặng, cảm ơn gia đình và bạn bè đã luôn bên tôi.

Nguyễn Thị Trà

MỤC LỤC

	Trang
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Tình hình sốt rét trên thế giới và Việt Nam	3
1.2. Tình hình ký sinh trùng sốt rét <i>P. falciparum</i> kháng thuốc trên thế giới và Việt Nam	5
1.2.1. Tình hình kháng các thuốc sốt rét của <i>P. falciparum</i> trên thế giới	5
1.2.2. Tình hình kháng các thuốc sốt rét của <i>P. falciparum</i> tại Việt Nam	9
1.3. Đặc điểm gen K13 của <i>P. falciparum</i> liên quan đến kháng artemisinin	10
1.3.1. Cơ sở khoa học chọn gen K13 là chỉ thị phân tử kháng artemisinin	10
1.3.2. Cấu trúc gen K13 của <i>P. falciparum</i>	12
1.4. Các nghiên cứu về đa hình đột biến gen K13 trên thế giới và Việt Nam	14
1.5. Các phương pháp nghiên cứu ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc	20
1.5.1. Phương pháp <i>in vivo</i>	20
1.5.2. Phương pháp <i>in vitro</i>	22
1.5.3. Phương pháp phân tử	22
1.6. Kỹ thuật giải trình tự gen theo phương pháp Sanger	23
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	25
2.1. Đối tượng, địa điểm, thời gian nghiên cứu	25
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	25
2.1.2. Địa điểm nghiên cứu	25
2.1.3. Thời gian nghiên cứu	25
2.2. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất	25

2.2.1. Thiết bị	25
2.2.2. Dụng cụ	25
2.2.3. Hóa chất	26
2.3. Phương pháp nghiên cứu	27
2.3.1. Thiết kế nghiên cứu	27
2.3.2. Phương pháp chọn mẫu và cỡ mẫu	27
2.4. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu	27
2.4.1. Thu thập mẫu	27
2.4.2. Tách chiết ADN bằng bộ sinh phẩm DNA micro test của hãng Qiagen	27
2.4.3. Kỹ thuật PCR xác định 4 loài ký sinh trùng sốt rét trên người	28
2.4.4. Kỹ thuật PCR xác định kiểu gen của <i>P. falciparum</i>	30
2.4.5. Kỹ thuật giải trình tự ADN phát hiện đột biến gen K13	31
2.5. Xử lý số liệu nghiên cứu	34
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	35
3.1. Kết quả xác định các đột biến gen K13 của <i>P. falciparum</i> phân lập từ bệnh nhân sốt rét tại Bình Phước	35
3.1.1. Kết quả xác định loài ký sinh trùng sốt rét bằng kỹ thuật PCR lồng	35
3.1.2. Kết quả xác định kiểu gen của <i>P. falciparum</i> bằng kỹ thuật PCR lồng	35
3.1.3. Kết quả phân tích đột biến gen K13 bằng kỹ thuật giải trình tự ADN	37
3.2. Đánh giá mối tương quan giữa đột biến gen K13 với kết quả theo dõi ký sinh trùng sốt rét trên bệnh nhân ngày D3	47
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN	50
KẾT LUẬN	54
KIẾN NGHỊ	54
TÀI LIỆU THAM KHẢO	55

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ACTs	Artemisinin-base Combination Therapy	Thuốc sốt rét phối hợp với Artemisinin
ADN	Acid deoxyribonucleic	
Bp	Base pair	Cặp bazơ ni tơ
DHA-PPQ	Dihydroartemisinin-piperaquine	
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphate	
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	
KST		Ký sinh trùng
KSTSR		Ký sinh trùng sốt rét
L	Ladder	Thang đo kích thước phân tử
Msp2	Mezoroite Surface Protein 2	Protein bề mặt 2
NCBI	National Center for Biotechnology Information	
SR		Sốt rét
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới

DANH MỤC BẢNG

Trang

Bảng 1.1. Mười tỉnh có tỷ lệ ký sinh trùng sốt rét lưu hành cao năm 2014	4
Bảng 1.2. Thời gian KSTSR <i>P. falciparum</i> kháng với các loại thuốc sốt rét.....	7
Bảng 1.3. Danh sách các vị trí đột biến gen K13 xác định kháng hoặc liên quan kháng artemisinin theo WHO 2015.....	20
Bảng 3.1. Kết quả xác định tỷ lệ nhiễm đơn và nhiễm phối hợp kiểu gen ở các mẫu nhiễm <i>P. falciparum</i> ngày D0 và D3 theo locus gen <i>msp2</i>	36
Bảng 3.2. So sánh tỷ lệ đột biến gen K13 giữa 2 nhóm mẫu bệnh nhân ngày D0 và ngày D3.....	44
Bảng 3.3. Tần suất của các vị trí đột biến gen K13 ở nhóm mẫu có đột biến	46
Bảng 3.4. Kết quả xác định đột biến gen K13 ở nhóm ký sinh trùng sốt rét ngày D3 và D0.....	48

DANH MỤC HÌNH

	Trang
Hình 1.1. Bản đồ các quốc gia và vùng lãnh thổ có lan truyền sốt rét	3
Hình 1.2. Cấu trúc protein K13 của <i>P. falciparum</i>	12
Hình 1.3. Mô hình cấu trúc 3D protein K13 của <i>P. falciparum</i>	13
Hình 1.4. Đọc trình tự nucleotit theo phương pháp Sanger	24
Hình 3.1. Ảnh điện di sản phẩm PCR của các mẫu nhiễm đơn <i>P. falciparum</i> ...	35
Hình 3.2. Ảnh điện di sản phẩm PCR của một số mẫu nhiễm kiểu gen FC	36
Hình 3.3. Ảnh điện di sản phẩm PCR của một số mẫu nhiễm kiểu gen IC	37
Hình 3.4. Ảnh điện di sản phẩm PCR nhân bội gen K13	38
Hình 3.5. Giản đồ giải trình tự nucleotit đoạn gen K13 của <i>P. falciparum</i> nhiễm trên mẫu bệnh nhân ngày D3	39
Hình 3.6. Kết quả so sánh trình tự nucleotit gen K13 của mẫu 3D7 phòng thí nghiệm với trình tự của đơn dòng 3D7 công bố trên ngân hàng gen.....	40
Hình 3.7. So sánh trình tự nucleotit đoạn gen K13 của các mẫu <i>P. falciparum</i> ngày D0 phát hiện điểm đột biến	42
Hình 3.8. So sánh trình tự nucleotit đoạn gen K13 của các mẫu <i>P. falciparum</i> ngày D3 phát hiện đột biến điểm	43
Hình 3.9. Kết quả so sánh trình tự axit amin để xác định đột biến gen K13 của <i>P. falciparum</i> ở các mẫu ngày D0.....	45
Hình 3.10. Kết quả so sánh trình tự axit amin để xác định đột biến gen K13 của <i>P. falciparum</i> ở các mẫu ngày D3	46