

# KHÁNG THUỐC LÂM SÀNG VÀ PHÂN TỬ TRÊN QUẦN THỂ *Plasmodium falciparum* VỚI LIỆU PHÁP THUỐC SỐT RÉT ƯU TIÊN TẠI VÙNG SỐT RÉT LƯU HÀNH TỈNH ĐẮK LẮK (2019 - 2021)

Huỳnh Hồng Quang<sup>1</sup>, Hồ Văn Hoàng<sup>1</sup>, Bùi Quang Phúc<sup>2</sup>,  
Nguyễn Thanh Thùy Nhiên<sup>3</sup>, Lê Đình Vĩnh Phúc<sup>4</sup>.

**Giới thiệu:** Dihydroartemisinin - piperaquine phosphate là thuốc sốt rét đầu tay được Tổ chức Y tế thế giới (WHO), 2015 khuyến cáo điều trị sốt rét do *Plasmodium falciparum*, song hiện nay thất bại điều trị với thuốc này đang xảy ra tại một số tỉnh ở Việt Nam có biên giới với Campuchia và có xu hướng lan rộng. **Mục tiêu:** của nghiên cứu là nhằm đánh giá hiệu lực thuốc và một số chỉ điểm phân tử liên quan đến kháng dihydroartemisinin - piperaquine tại Đắk Lắk. **Phương pháp:** thiết kế nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng in vivo, không ngẫu nhiên, không đối chứng theo dõi 42 ngày, phân tích các chỉ điểm phân tử liên quan kháng thuốc. **Kết quả:** đáp ứng lâm sàng và ký sinh trùng (KST) đầy đủ là 12,1%, thất bại lâm sàng muộn 51,5%, thất bại ký sinh trùng muộn 36,4%, tỷ lệ tồn tại KST ngày D<sub>3</sub> là 37,0%, chỉ số slope bán thải 5,36 giờ, diễn tiến làm sạch KST PC50, PC75, PC 90, PC95, PC99 lần lượt là 13,24; 19,29; 25,69; 29,97 và 39,15 giờ. Chỉ điểm phân tử đột biến gen K<sub>13</sub> loại C580Y chiếm ưu thế 100% (50/50), tăng số bản sao Plasmepsine 2 là 72% (36/50) và xuất hiện đồng thời cả K<sub>13</sub> và Plasmepsine 2 trên quần thể *P. falciparum* là 72% (36/50). **Kết luận:** Hiệu lực thuốc DHA - PPQ giảm đi đáng kể, chỉ còn 12,1%, thất bại điều trị chung là 87,9%, cùng với đột biến C580Y chiếm ưu thế và Plasmepsine 2 trên các bệnh nhân chậm sạch *P. falciparum* trong máu. Các bằng chứng rõ ràng trên cho thấy cần phải thay đổi chính sách thuốc khẩn cấp tại vùng có kháng DHA - PPQ.

**Từ khóa:** *Plasmodium falciparum*, K<sub>13</sub> propeller, số bản sao Plasmepsine 2.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Ký sinh trùng *Plasmodium falciparum* kháng với artemisinin như một mối đe dọa đến các thành quả Lộ trình loại trừ sốt rét ở các nước Tiểu vùng Sông Mê Kông (GMS). Đột biến gen K<sub>13</sub> và tăng số bản sao Plasmepsine 2 hiệu được xem như các chỉ điểm liên quan lần lượt đến kháng artemisinin và piperaquine và kéo dài sống sót của thể vô tính<sup>[1]</sup>, nên có hiện tượng chậm làm sạch KSTSR<sup>[7]</sup> trên bệnh nhân sốt rét *P. falciparum* sau điều trị thuốc

ACTs. Các chỉ điểm này được phát hiện có mặt tại nhiều nước GMS. Sau Bình Phước, một số tỉnh miền Trung, Tây Nguyên là nơi có tình trạng giảm nhạy, thất bại điều trị và kháng thuốc dihydroartemisinin - piperaquin (DHA - PPQ) đáng chú ý, như ở Đắk Nông, Quảng Nam, Khánh Hòa, Gia Lai. Huyện Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk là một trong những vùng có số ca mắc cao nhất khu vực Tây Nguyên và là tỉnh giáp ranh với nhiều tỉnh Đắk Nông, Khánh Hòa, Gia Lai, Phú Yên, liệu có sự xuất hiện kháng DHA - PPQ trên In vivo và chỉ điểm kháng như các tỉnh khác không?

Với ý nghĩa đó, đề tài tiến hành nhằm mục tiêu xác định hiệu lực thuốc DHA - PPQ trong điều trị sốt rét do *P. falciparum* và điều tra sự có mặt các chỉ điểm đột biến gen K13 và Plasmepsine 2 trên quần thể *P. falciparum*.

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**Địa điểm và thời gian:** xã Ea Dah, Dlie Ya, Ea Puk của

<sup>(1)</sup>Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn, <sup>(2)</sup>Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương, <sup>(3)</sup>Đơn vị nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford, <sup>(4)</sup>Trung tâm MEDIC thành phố Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài: 12/5/2021.

Ngày phản biện xong: 28/5/2021.

Ngày duyệt đăng: 10/6/2021.

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

Điện thoại: 0905103496. E-mail: huyngquangimpe@yahoo.com

huyện Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk. Từ tháng 4/2019 - 3/2021.

### Thiết kế nghiên cứu

+ Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng không đối chứng với đề cương TES của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) 2019, theo dõi 42 ngày trên bệnh nhân.

+ Phân tích và giải trình tự phát hiện đột biến tại Đơn vị Sinh học phân tử của Viện Pasteur Campuchia (IP - Cambodia), Đơn vị Nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford (OUCRU) Vương quốc Anh và Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn (IMPE - QN) với tất cả mẫu trên thử nghiệm *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 loài *P. falciparum*, mật độ KSTSR thể vô tính *P. falciparum* trong máu  $\geq 1.000 - < 100.000/\mu\text{L}$  máu, thân nhiệt đo ở tại  $> 37,5^\circ\text{C}$ , chưa dùng thuốc sốt rét và bệnh nhân, hoặc người thân đồng ý hợp tác.

+ *Tiêu chuẩn loại trừ*: Các bệnh nhân nhỏ hơn 3 hoặc lớn hơn 70 tuổi, phụ nữ mang 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 ký sinh trùng sốt rét (KSTSR) phối hợp *P. falciparum* với *Plasmodium sp.* khác, bệnh nhân đã dùng thuốc sốt rét, hay trong độ tuổi sinh đẻ cần phải thử test thai âm tính.

**Cỡ mẫu nghiên cứu**: trong nghiên cứu, nếu xem tỷ lệ thất bại của DHA - PPQ trong một nghiên cứu trước đó<sup>[5]</sup> khoảng 15% tại Bình Phước, thì tỷ lệ được chọn để ước tính tỷ lệ thất bại  $p = 15\%$ , khoảng tin cậy 95%, độ chính xác  $d = 10\%$ . Khi đó, cỡ mẫu tối thiểu cần nghiên cứu  $n = 50$ .

### Các kỹ thuật và chỉ số áp dụng trong nghiên cứu:

bệnh nhân tham gia nghiên cứu sẽ được đánh giá các thông số lâm sàng, KSTSR và đánh giá thời gian làm sạch KSTSR, phân tích sinh học phân tử, giải trình tự xác định đột biến gen  $K_{13}$  (kháng artemisinin) bằng giải trình tự, tăng số Plasmequine 2 CNV (kháng piperaquine) bằng RT - PCR nhuộm Synb green.

### Phân tích và xử lý số liệu

+ Số liệu thu thập được nhập và phân tích theo phần

mềm *in vivo* (WHO 2015, V2017);

+ Tính tỷ lệ từng loại đột biến gen  $K_{13}$  và Plasmequine 2 dựa trên tổng số mẫu được phân tích.

## KẾT QUẢ

### 1. Đặc điểm về dân số học nhóm bệnh nhân tham gia nghiên cứu

**Bảng 1. Đặc điểm chung bệnh nhân sốt rét tham gia nghiên cứu**

Thông số dân số học	Krông Năng, Đắk Lắk	
	Số lượng	%
<b>Giới tính</b>	50	
Nam	47	94,0
Nữ	3	6,0
<b>Tuổi trung bình</b>	32,1 (7,9)	
<b>Min - Max</b>	19 - 51	
< 5	0	0
$\geq 5 - < 15$	0	0
$\geq 15$	50	100
<b>Cân nặng trung bình</b>	56,9 (5,6)	
<b>Min - Max</b>	43 - 72	1,0

*Nhận xét*: trong số 50 ca sốt rét do *P. falciparum* đơn thuần tham gia nghiên cứu ở điểm Krông Năng, Đắk Lắk, nam giới chiếm ưu thế với 47 ca (94%) và nữ giới là 3 ca (6%). Tuổi trung bình nhóm nghiên cứu là 32,1 và tất cả đều trên 15 tuổi (100%). Cân nặng trung bình là 56,9 kg.

**Bảng 2. Đặc điểm lâm sàng, khám lách và mật độ KSTSR *P. falciparum***

Đặc điểm nhóm nghiên cứu	Đắk Lắk (n = 50)
<b>Thân nhiệt</b> Thân nhiệt trung bình ( $^\circ\text{C}$ )	Mean $\pm$ SD (Min - Max) 38,5 $\pm$ 0,6 (36,2 - 39,6)
<b>Tình trạng lách</b> Bệnh nhân lách lớn $\geq$ độ 2 Bệnh nhân cắt lách	3 (6,0) 0 (0)
<b>Mật độ KSTSR trước khi điều trị</b> Mật độ trung bình Khoảng (Min-Max)	14.263 (828 - 98.102)
<b>Thông số huyết học</b> - Nồng độ haemoglobine (g/dL) - Tỷ lệ haematocrite (%)	11,4 (9,5 - 11,2) 37,2 (39,5 - 40,2)

*Nhận xét*: nhóm bệnh nhân tham gia nghiên cứu có thân nhiệt trung bình (38,5  $\pm$  0,6) $^\circ\text{C}$ , khám lách cho thấy chỉ có 3 ca (6%) có lách lớn từ độ 2 trở lên, không có trường hợp nào có tiền sử cắt lách. Mật độ trung bình KSTSR *P. falciparum* ở ngày  $D_0$  trước khi điều trị là 14.263/ $\mu\text{L}$  máu. Nồng độ haemoglobin (Hb) là 11,4g/dL (9,5 - 11,2) và haematocrit (Hct) 37,2% (39,5 - 40,2) đều nằm trong giới hạn bình thường.

**Hiệu lực phác đồ DHA - PPQ trong điều trị bệnh nhân sốt rét *P. falciparum***

**Bảng 3. Hiệu quả phác đồ đối với sốt rét do *P. falciparum* tại điểm nghiên cứu**

	Thông số đánh giá hiệu lực thuốc	Trước hiệu chỉnh PCR		Sau hiệu chỉnh PCR	
		SL	%	SL	%
Hiệu lực	Thất bại điều trị sớm (ETF)	0	0	0	0
	Thất bại lâm sàng muộn (LCF)	17	<b>41,5</b>	17	<b>51,5</b>
	Thất bại ký sinh trùng muộn (LPF)	20	<b>48,8</b>	12	<b>36,4</b>
	Đáp ứng lâm sàng & KST đầy đủ (ACPR)	4	<b>9,7</b>	4	<b>12,1</b>
	<b>Tổng số phân tích</b> (per protocol)	41		33	
	Rút khỏi nghiên cứu và mất theo dõi	9	18,0	17	34
<b>Tổng số nghiên cứu</b>		<b>50</b>		<b>50</b>	

*Nhận xét:* trong tổng số 50 ca theo dõi đến 42 ngày, tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và ký sinh trùng đầy đủ (ACPR) của thuốc DHA - PPQ sau khi hiệu chỉnh PCR chỉ có 4 ca (12,1%), số còn lại là thất bại lâm sàng muộn (LCF) 17 ca (51,5%), thất bại KST muộn 12 ca (36,4%), không thấy trường hợp thất bại điều trị sớm. Ngoài ra, số ca rút khỏi nghiên cứu và mất theo dõi là 17 ca (34%).

**Bảng 4. Hiệu lực điều trị và tồn tại thể vô tính sau điều trị phác đồ DHA - PPQ**

Thông số phân tích	Đắc Lắc (n = 50)		
	SL	%	CI95%
Số ca sạch KST vô tính sau điều trị phác đồ DHA - PPQ trước D <sub>3</sub>	33	63,0	
Số ca còn tồn tại KST vô tính ngày D <sub>3</sub> (hay giờ 72)	17	<b>37,0</b>	23,2% 52,5%

*Nhận xét:* tỷ lệ tồn tại KSTR thể vô tính *P. falciparum* sau điều trị ngày D<sub>3</sub> là 37%.

**Bảng 5. Chỉ số biểu thị làm sạch ký sinh trùng *P. falciparum* theo thời gian**

Số ca In vivo	Slope half - life	Diễn tiến làm sạch KSTR				
		PC50	PC75	PC90	PC95	PC99
50	5,36 giờ	13,24 giờ	19,29 giờ	25,69 giờ	29,97 giờ	39,15 giờ

*Nhận xét:* phân tích chi tiết cho thấy thời gian bán thải loại trừ chung (slope half - life) là 5,36 giờ. Thời gian làm sạch 50% dung khối KSTR hay PC50 là 13,24 giờ. Tiếp đó, các chỉ số làm sạch PC75, PC90, PC95 và PC99 lần lượt 19,29 giờ; 25,69 giờ; 29,97 giờ và 39,15 giờ.

**Xác định chỉ điểm đột biến gen K<sub>13</sub> và tăng bản sao Plasmeppsine 2 CNV**

**Bảng 6. Phân tích chỉ điểm K<sub>13</sub> propeller và Plasmeppsine 2 CNV**

Điểm nghiên cứu	Đột biến K <sub>13</sub> , tăng bản sao Plasmeppsine 2 (> 1,5 copy)			
	Số mẫu phân tích	Đột biến K <sub>13</sub>	Tăng Plasmeppsine 2 CNV (> 1,5 copy)	K <sub>13</sub> + Plasmeppsine 2
Đắc Lắc (n = 50)	50	C580Y 50 (100%)	36 (72%)	36 (72%)
Ý nghĩa liên quan →		Kháng artemisinin	Kháng piperazine	Kháng cả hai thành phần

*Nhận xét:* phân tích phân tử 50 phân lập *P. falciparum* ở bệnh nhân tại huyện Krông Năng cho thấy cả 50 phân lập (100%) có mang đột biến C580Y có ý nghĩa xác định kháng artemisinin. Tăng số bản sao Plasmeppsine 2 (> 1,5 CNV) trên quần thể *P. falciparum* là 36 mẫu (72%) như một chỉ điểm kháng piperazine phosphate và số mẫu có đồng thời hai loại chỉ điểm K<sub>13</sub> và Plasmeppsine 2 là 36 (72%), nghĩa là chỉ điểm kháng cả hai thành phần trong viên DHA - PPQ.

**Bảng 7. So sánh loại đột biến với phân loại các đột biến K<sub>13</sub> theo TCYTTG**

Phân loại một số đột biến của Tổ chức Y tế thế giới (WHO, 2018)			
Đột biến K <sub>13</sub>	Phân loại	Đột biến K <sub>13</sub>	Phân loại
P441L	Liên quan <sup>(1)</sup>	F637I	Liên quan <sup>(1)</sup>
G449A	Liên quan <sup>(1)</sup>	Y493H	Xác định <sup>(2)</sup>
C469F	Liên quan <sup>(1)</sup>	R539T	Xác định <sup>(2)</sup>
A481V	Liên quan <sup>(1)</sup>	I543T	Xác định <sup>(2)</sup>
V568G	Liên quan <sup>(1)</sup>	<b>C580Y</b>	Liên quan <sup>(1)</sup>
P527H	Liên quan <sup>(1)</sup>	N458Y	Xác định <sup>(2)</sup>
P574L	Liên quan <sup>(1)</sup>	F446I	Xác định <sup>(2)</sup>
A675V	Liên quan <sup>(1)</sup>	M476I	Xác định <sup>(2)</sup>
G538V	Liên quan <sup>(1)</sup>	P553L	Xác định <sup>(2)</sup>
N537I	Liên quan <sup>(1)</sup>	R561H	Xác định <sup>(2)</sup>

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

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

**BÀN LUẬN**

**Đặc điểm lâm sàng và ký sinh trùng trên bệnh nhân nghiên cứu**

Trong số 50 ca sốt rét do *P. falciparum* đơn thuần tham gia nghiên cứu ở điểm Krông Năng, tỉnh Đắc Lắc, nam giới chiếm ưu thế với 47 ca (94%) và nữ giới là 3 ca (6%). Tuổi trung bình nhóm nghiên cứu là 32,1 và tất cả

đều là bệnh nhân người lớn trên 15 tuổi (100%). Cân nặng trung bình là 56,9 kg. Thân nhiệt trung bình ( $38,5 \pm 0,6$ ) $^{\circ}$ C, khám lách cho thấy chỉ có 3 ca (6%) có lách lớn từ độ 2 trở lên, không có trường hợp nào có tiền sử cắt lách. Mật độ trung bình KSTSR *P. falciparum* ở ngày D<sub>0</sub> trước khi điều trị là 14.263/ $\mu$ l máu. Nồng độ haemoglobin (Hb) là 11,4g/dL (9,5 - 11,2) và haematocrit (Hct) là 37,12% (39,5 - 40,2) đều trong giới hạn bình thường, phù hợp tiêu chí chọn bệnh và đưa vào thử nghiệm.

Số liệu trên tương tự nghiên cứu đa trung tâm ở hai tỉnh biên giới cũng thấy phần lớn BNSR thuộc nhóm tuổi lao động ( $\geq 15$ ) với 56 ca (98,2%) và 45 ca (95,7%) lần lượt ở Đắk Nông và Quảng Trị. Trên các nhóm BNSR *P. falciparum* có thân nhiệt không cao, lần trung bình ( $38,2 \pm 0,5$ ) $^{\circ}$ C và ( $38,3 \pm 0,2$ ) $^{\circ}$ C lần lượt Đắk Nông và Quảng Trị; 91,7% và 92,3% bệnh nhân có sốt trong vòng 48 giờ trước khi nghiên cứu. Số ca có lách lớn trên lâm sàng chỉ 3 ca (6,2%) ở Đắk Nông, 2 ca (5,13%) ở Quảng Trị. Mật độ trung bình *P. falciparum* ở ngày D<sub>0</sub> lần lượt là 10.285/ $\mu$ l và 15.332/ $\mu$ l, Nồng độ haemoglobin (Hb) và tỷ lệ haematocrit (Hct) nằm trong giới hạn bình thường, không có thiếu máu nặng. Vì mật độ KSTSR trước khi đưa vào nghiên cứu không cao, nên tiêu chí này không đưa vào phân tích như một yếu tố ảnh hưởng đến sự tồn tại thể vô tính *P. falciparum* sau điều trị như một số nghiên cứu trước ở Campuchia hay Myanmar cho rằng sự tồn tại KSTSR ngày D<sub>3</sub> sau điều trị artemisinin hoặc thuốc ACTs có liên quan đến mật độ cao ( $> 100.000/\mu$ L) trong máu ngoại vi ngày D<sub>0</sub>.

### **Hiệu lực phác đồ DHA - PPQ trong điều trị bệnh nhân sốt rét *P. falciparum***

Trong tổng số 41 ca *P. falciparum* theo dõi đến 42 ngày, tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và KSTSR đầy đủ (ACPR) của thuốc DHA - PPQ sau khi hiệu chỉnh PCR chỉ có 4 ca (12,1%), số còn lại là thất bại lâm sàng muộn (LCF) 17 ca (51,5%), thất bại KST muộn 12 ca (36,4%), không thấy trường hợp thất bại điều trị sớm (ETF). Số ca rút khỏi nghiên cứu và mất theo dõi là 17 ca (34%). Trong thời gian 3 ngày điều trị bằng thuốc DHA - PPQ, có 33 ca (63%) sạch hoàn toàn KSTSR thể vô tính, song vẫn còn tỷ lệ tồn tại KSTSR thể vô tính *P. falciparum* sau điều trị DHA-PPQ ngày D<sub>3</sub> là 37,0% (CI95%: 23,2 - 52,5).

Số liệu trên cho thấy hiệu lực thuốc DHA - PPQ đã giảm rất nhiều, tỷ lệ chữa khỏi hoàn toàn chỉ có 12,1%,

tỷ lệ thất bại điều trị chung lên đến 87,9%. So với hiệu lực thuốc này ở nghiên cứu tại hai tỉnh biên giới cho hiệu lực thuốc hay đáp ứng lâm sàng và KST đầy đủ (ACPR) là 88,1% và 100% lần lượt ở Đắk Nông và Quảng Trị, đặc biệt cả hai điểm nghiên cứu không có thất bại điều trị sớm, nhưng ở điểm Đắk Nông có thất bại lâm sàng muộn là 4 ca (9,5%), thất bại KST muộn là 1 ca (2,4%). Ngoài ra, số ca rút khỏi nghiên cứu là 2 ca (8,33%) ở điểm Đắk Nông. 2 ca (5,13%) mất theo dõi ở điểm Quảng Trị và 4 ca (8,33%) ở Đắk Nông. Tỷ lệ sạch thể vô tính trong 3 ngày điều trị lên đến 58,3% và 94,9% lần lượt tại Đắk Nông và Quảng Trị và còn tồn tại thể vô tính ngày D<sub>3</sub> lần lượt 41,7% (Đắk Nông) và 5,1% (Quảng Trị). Sự tồn tại KSTSR ngày D<sub>3</sub>(+) trên 10% được WHO coi như một chỉ điểm kháng một phần artemisinins hoặc dẫn suất dihydroartemisinin với số liệu tại điểm Đắk Nông, trong khi đó tại điểm Quảng Trị tỷ lệ này chỉ có 5,1% ( $< 10\%$  theo ngưỡng của WHO quy định). Do vậy, việc phân tích thêm các chỉ điểm phân tử hoặc chỉ số dược động học để xác định nồng độ thuốc tại thời điểm đó liệu có còn đủ ức chế KST 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 SRLH tại khu vực miền Trung, Tây Nguyên và Bình Phước<sup>[1,7]</sup>. Tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và KST đầy đủ từ 94,7% - 100% và tỷ lệ tồn tại thể vô tính *P. falciparum* tại các tỉnh 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 miền Trung, Tây Nguyên cũng vậy: Quảng Nam với tỷ lệ tồn tại ngày D<sub>3</sub> là 29,2%, 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%, cùng với sự tồn tại KSTSR ngày D<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub>(+) từ 9% lên 14%; 17%; 25%; 48% (2009 - 2014). Điều này cho thấy nguy cơ kháng không những lan rộng trong nước mà còn lan rộng trong Tiểu vùng sông Mê Kông.

Phân tích còn thấy thời gian bán thải loại trừ (slope half - life) là 5,36 giờ. Thời gian làm sạch 50% dung khối KSTSR hay PC50 là 13,24 giờ. Tiếp đó, chỉ số làm sạch PC75, PC90, PC95 và PC99 lần lượt 19,29 giờ; 25,69 giờ; 29,97 giờ và 39,15 giờ, nghĩa là để sạch 99% lượng KST phải mất đến gần 40 giờ.

### **Chỉ điểm đột biến gen $K_{13}$ và tăng số bản sao Plasmeppsine 2 liên quan đến kháng**

Tất cả ca bệnh *P. falciparum* nghiên cứu đều lấy giấy thấm phân tích đột biến gen  $K_{13}$  propeller (chỉ điểm kháng thành phần dihydroartemisinin - DHA) và plasmepsine 2/3 (chỉ điểm kháng thành phần piperazine - PPQ). Phân tích phân tử toàn bộ 50 phân lập *P. falciparum* ở bệnh nhân tham gia nghiên cứu tại điểm Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk cho thấy tất cả 50 (100%) phân lập có mang đột biến C580Y có ý nghĩa xác định kháng artemisinin. Tăng số bản sao Plasmeppsine 2 (1,5 copy) trên quần thể *P. falciparum* là 36 mẫu (72%) như một chỉ điểm kháng piperazine phosphate và số mẫu có đồng thời hai loại chỉ điểm  $K_{13}$  và Plasmeppsine 2 là 36 (72%), nghĩa là chỉ điểm kháng cả hai thành phần trong viên DHA - PPQ.

Số liệu này so với nghiên cứu ở Đắk Nông và Quảng Trị thấy rằng trong số phân lập không có tồn tại thể vô tính ngày  $D_3$  (sau 72 giờ), phân tích đột biến gen  $K_{13}$  và tăng số bản sao Plasmeppsine 2 CNV thấy chỉ có thể hoang dại (wild type) và đột biến không có nghĩa V520I, theo phân loại đột biến của Tổ chức Y tế thế giới<sup>(9,10)</sup> thì các kiểu hình này không phải là đột biến và không có ý nghĩa trong xác định kháng thuốc, ngoài ra phân tích các ca tại hai điểm không cho thấy ca nào có số bản sao Plasmeppsine 2 trên quần thể *P. falciparum* tăng lên như một chỉ điểm kháng PPQ. Ngược lại, trên các phân lập *P. falciparum* ở các trên bệnh nhân có tồn tại KST thể vô tính ngày  $D_3(+)$  tại điểm Đắk Nông, cho thấy xuất hiện các đột biến C580Y (80%) và 20% số ca còn lại là đột biến hoang dại, loại đột biến C580Y phù hợp với phân loại (WHO, 2018) xác định kháng, đặc biệt số ca có tăng bản sao Plasmeppsine 2 (60%) như một chỉ điểm kháng PPQ và số phân lập có đồng thời chỉ điểm kháng cả DHA và PPQ lên đến 60%, nên nguy cơ thất bại là rất cao. Trong khi đó, tại Quảng Trị, trong 2 ca còn tồn tại KST ngày  $D_3$  thì có một ca (50%) có đột biến C580Y xác định kháng DHA và một ca (50%) là đột biến P574L (có liên quan) kháng thuốc, nhưng không có tăng số bản sao Plasmeppsine 2.

Huyện Tuy Đức, tỉnh Đắk Nông giáp với tỉnh Bình Phước và là khu vực có biên giới giáp Campuchia, nên các đột biến C580Y cao như thế cũng là phù hợp, tương tự như nhận định của các nhà khoa học đã từng phân tích chứng minh là kiểu hình đột biến C580Y xuất phát điểm từ Pailin (Campuchia) dịch chuyển sang Champasack của Lào và đến Bình Phước của Việt Nam, sau đó có thể sang tỉnh Đắk Nông là khó tránh khỏi<sup>(6)</sup>. Số liệu về các đột biến C580Y tại huyện Hướng Hóa (Quảng Trị) giáp với tỉnh Salavan và Savanakhét của Lào, trong khi đó Salavan có đột biến kháng C580Y và Savanakhét thì không có đột biến, nên các số liệu phân tích ở nghiên cứu này phù hợp với phân tích đột biến  $K_{13}$  các điểm sentinel tại Lào. So sánh với các nghiên cứu trước đây đã báo cáo trên y văn như 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 14 km (Phú Thiện) đến 26 km (Krông Pa). Có thể thấy tình hình kháng thuốc của Việt Nam không những xảy ra ở vùng có giao lưu biên giới với Campuchia như Đắk Nông, Bình Phước, Gia Lai, mà còn xảy ra nội tại trong vùng không giao lưu biên giới với Campuchia như Quảng Nam, Gia Lai, Khánh Hòa, Kon Tum<sup>(4)</sup> điều đó đã được xác định bằng các "khoảng trống" trên bản đồ kháng thuốc, không như hình ảnh "vết dầu loang" ở các điểm kháng thuốc ở Thái Lan, Campuchia, Myanmar<sup>(9)</sup>.

Với các số liệu phân tích về thời gian làm sạch ký sinh trùng ở thời điểm ngày  $D_3$  hay 72 giờ và đột biến gen  $K_{13}$  và plasmepsine 2/3 như trên cho thấy trên nhóm bệnh nhân *P. falciparum* còn nhạy cảm với thuốc DHA - PPQ đã sạch KSTSR thể vô tính sớm trước ngày  $D_3$  hay nhóm có  $D_3(-)$  thì đồng thời không có đột biến cả  $K_{13}$  và Plasmeppsine 2, ngược lại trên nhóm bệnh nhân có biểu hiện chậm làm sạch KST *P. falciparum* ở thời điểm  $D_3$  dương tính thì có đột biến  $K_{13}$  loại C580Y (80%) đơn thuần hoặc đồng thời cả C580Y và Plasmeppsine 2 (60%). Điều này cho thấy, có mối liên quan thuận giữa nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng

*P. falciparum* có đột biến gen K<sub>13</sub> và, hoặc cả Plasmepsine 2 có diễn tiến làm sạch KST thể vô tính chậm hơn so với nhóm không có đột biến. Kết quả này tương tự như các nghiên cứu trước đây thực hiện tại điểm Gia Lai có 3 loại đột biến K<sub>13</sub> xác định kháng thuốc gồm C580Y, R539T và Y493H và một loại đột biến được xem có liên quan kháng V568G<sup>[3,4,8]</sup>. Tại Đắk Nông, có 2 loại đột biến C580Y, I543T là loại xác định kháng và 3 loại đột biến khác là E605K, K503K và V520I không liên quan kháng hoặc 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.

## KẾT LUẬN

- Hiệu lực thuốc DHA - PPQ trong điều trị sốt rét do *P. falciparum* với tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và KST đầy đủ là

12,1%. Thất bại lâm sàng muộn 51,5% và thất bại KST muộn 36,4%.

- Tỷ lệ còn tồn tại KST ở ngày D<sub>3</sub> là 37% tại điểm Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk.

- Đột biến gen K<sub>13</sub> loại C580Y (xác định kháng DHA) chiếm 100% và tăng số bản sao Plasmepsin 2 (xác định kháng PPQ) là 72% và xuất hiện cả hai loại chỉ điểm trên quần thể *P. falciparum* nghiên cứu là 72% (36/50).

## KHUYẾN NGHỊ

Tổng hợp các dữ liệu trên chỉ ra rằng thuốc DHA - PPQ đã giảm hiệu lực rất nghiêm trọng và theo khuyến cáo của TCYTQG, cần phải thay thuốc ACTs khác có hiệu lực hơn.

---

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Quang Phúc, Huỳnh Hồng Quang, Trần Thanh Dương (2015). Hiệu lực điều trị của Dihydroartemisinin-piperaquin phosphate đối với sốt rét do *Plasmodium falciparum* chưa biến chứng, năm 2014. Viện Sốt rét-KST-CT TW. Công trình NCKH tại HNKH toàn quốc Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng năm 2015, ISBN: 978-604-66-0950-6, tr.49-57.
2. Tạ Thị Tĩnh, Bùi Quang Phúc, Huỳnh Hồng Quang, Phùng Đức Thuận và cs. (2013). Hiệu lực của một số thuốc sốt rét có thành phần artemisinin (ACTs) trong điều trị sốt rét *Plasmodium falciparum* chưa biến chứng tại vùng SRLH (2005-2012). Tạp chí Phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng, ISSN 0868-3735, số 6-2013, trang 90-96.
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. Thuy Nien Nguyen, Tuyen Kim Nguyen, Quang Hong Huynh, Maciej Boni, Olive Miotto, Christiane Dolecek, Nicholas White, Hien Tinh Tran (2016). Kelch protein gene (K13) mutation in *Plasmodium falciparum* population in three malaria hot spots of Vietnam. *American Society of Tropical medicine and Hygiene*, Vol. 95, No.5, pp:192-5.
5. Nguyen Thuy-Nhien, Nguyen Kim Tuyen, Nguyen Thanh Tong et al., (2017). K13 propeller mutations in *Plasmodium falciparum* populations in regions of malaria endemicity in Vietnam from 2009 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e01578-16.
6. Bui Quang Phuc, Huynh Hong Quang, Tran Thanh Duong et al., (2013). Efficacy and safety of oral artesunate and dihydroartemisinin-piperaquin for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Binh Thuan, Ninh Thuan, Daklak and Gia Lai provinces, Vietnam 2011-2012. *Journal for malaria and parasitic disease control*, vol. 5-2013, ISSN 0868-3735, pp.84-89.
7. Quang H. Huynh et al., (2016). Efficacy of dihydroartemisinin-piperaquin and chloroquin in the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria in Vietnam. *American Society of Tropical medicine and Hygiene*, Vol. 95, No.5, pp. 272.
8. Huynh Hong Quang, Nguyen Thi Lien Hanh, Nguyen Thi Minh Trinh (2017). Artemisinin resistance molecular marker Kelch 13 in *falciparum* malaria in two sentinel sites of Central Highlands of Vietnam. *Vietnam Journal of Preventive Medicine*, Vol.27, Issue 4: 68-78.
9. WHO (2009). Methods for surveillance of anti-malarial drug efficacy.
10. WHO (2018). Status report on artemisinin and ACTs efficacy, August 2018.

**CLINICAL AND MOLECULAR RESISTANCE  
TO *PLASMODIUM FALCIPARUM*'S FIRST-LINE DRUG TREATMENT  
IN MALARIA ENDEMIC ZONE OF DAK LAK PROVINCE, 2019 - 2021**

**Summary**

*Backgrounds:* Dihydroartemisinin - piperaquine is a current frontline drug recommended in global by WHO for the treatment of *Plasmodium falciparum* malaria (WHO, 2015), but is now failing in Vietnam provinces where border Cambodia, and has emerged and spread. The purpose of this study was to evaluate efficacy and molecular markers of dihydroartemisinin - piperaquine failures in Daklak province. *Methods:* A study design of non - randomized controlled study design for the 42 day - course follow - up in vivo test, and the molecular markers analysis. *Findings:* The data showed that adequate clinical and parasitological response was sharply declined of 12,1%, late clinical failure of 51.5%, late parasitological failure of 36.4%, pro-

portion of positive parasitemia at D<sub>3</sub> is 37%, slope half - life of 5.36 hrs, and progressive parasite clearance PC50, PC75, PC 90, PC95, and PC99 were 13.24; 19.29; 25.69; 29.97 and 39.15 hrs, respectively. Molecular markers of C580Y Kelch mutation observed 100% (50/50) in the patients, increased of Plasmepsine 2 CNV of 72% (36/50), and both K<sub>13</sub> and Plasmepsine 2 of 72% (36/50). *Conclusions:* The DHA - PPQ efficacy severely decreased of 12.1%, overall treatment failure of 87.9% with the prominent C580Y mutant plus increased Plasmepsine 2 copy number variation in delayed asexual *P. falciparum* parasite clearance. These obvious data need to urgently change antimalarial policy in DHA - PPQ resistance zones.

**Key words:** *Plasmodium falciparum*, K<sub>13</sub> propeller, Plasmepsine 2 copy number variation.