

CHỈ ĐIỂM PHÂN TỬ KHÁNG THUỐC SỐT RÉT TRÊN CÁC PHÂN LẬP *PLASMIDIUM FALCIPARUM*: MỘT NGHIÊN CỨU QUAN SÁT TẠI ĐẮK LẮK TỪ 2017 - 2020

Huỳnh Hồng Quang¹, Nguyễn Thanh Thùy Nhiên²,
Châu Văn Khánh¹, Bùi Quang Phúc³, Nguyễn Thị Minh Trinh¹,
Nguyễn Thị Liên Hạnh¹, Trần Thanh Sơn⁴

Mục tiêu: Xác định đột biến và tần số các haplotype trên các gen khác nhau liên quan đến kháng tại một số huyện không có giao lưu biên giới Campuchia của tỉnh Đắk Lắk.

Đối tượng và phương pháp: Nghiên cứu đánh giá các chỉ điểm phân tử liên quan đến kháng thuốc dihydroartemisinin - piperazine, artesunate - mefloquine từ các phân lập của mẫu máu khô thu thập của bệnh nhân sốt rét do *P.falciparum* tại đa trung tâm trong thời gian 2017 - 2020. Tất cả phân lập được phân tích để tìm các chỉ điểm gen kháng thuốc *Pfk13*, *Pfplasmepsine2*, *Pfmdr1*, *Pfprt* bằng giải trình tự Sanger. Ngoài ra, số bản sao gen *Pfplasmepsine2* được đánh giá bằng real - time PCR. DNA được tinh khiết với bộ QIAamp DNA Mini kits (QIAGEN, Düsseldorf, Đức), tất cả kiểu gen phân tích giải trình tự chọn lọc bộ gen ký sinh trùng tại Viện Wellcome Sanger (Anh), Viện Pasteur (Campuchia), Viện First Base DNA sequencing Axil Scientific (Singapore), các kiểu gen được chuyển dịch thành các kiểu gen đơn bộ kháng thuốc.

Kết quả: Tổng số 55 và 79 mẫu phân lập được chẩn đoán xác định *P. falciparum* dưới kính hiển vi, thu thập tại các cơ sở y tế tỉnh Đắk Lắk trong giai đoạn (2017 - 2018) và (2019 - 2020). Kết quả chỉ ra có tỷ lệ cao các đột biến *Pfk13* - C580Y liên quan kháng artemisinin từ 83,6% (46/55) đến 100% (79/79) và *PfPlasmepsine 2* (> 1,5 copy) từ 20% (11/55) đến 77,2% (61/79) cũng như đột biến exonuclease E415G liên quan đến kháng piperazine từ 88,5% (44/55) đến 91,1% (72/79) trong thời gian (2017 - 2018) và (2019 - 2020). Mặt khác, tần suất các đột biến kháng với nhóm thuốc 4 - aminoquinoline loại *Pfprt* (72 - 76 CVIET) là 92,7% (51/55) và 91,1% (72/79), rất ít các đột biến *Pfprt* (72 - 76 CVIDT), *Pfprt* (72 - 76 CVVET), *Pfprt* (72 - 76 WGIET), *Pfprt* F145I (< 5%). Điểm quan tâm là có tỷ lệ chỉ điểm *Pfmdr1* (> 1,5 copy) cao liên quan đến kháng mefloquine, từ 23,6% (13/55) giai đoạn (2017 - 2018), nhưng chỉ có 1,3% (1/79) trong giai đoạn (2019 - 2020). Đáng lưu ý là nhóm phân lập có hai chỉ điểm đồng thời *Pfk13* - C580Y + *PfPlasmepsine2* (kháng với DHA - PPQ) là 16,4% (9/55) và 77,2% (61/79) và *Pfk13* - C580Y + *Pfmdr1* CNV (kháng với ASMQ) là 21,8% (12/55) và 1,3% (1/79) lần lượt trong khoảng thời gian 2017 - 2018 và 2019 - 2020. Chưa thấy phân lập nào có từ 3 hay 4 loại đột biến trong nghiên cứu này.

Kết luận: Kết quả nghiên cứu cho thấy có tỷ lệ một hay hai chỉ điểm di truyền *Pfk13* - C580Y và *PfPlasmepsine 2*/exonuclease E415G đồng thời rất cao, liên quan đến kháng artemisinin và piperazine. Tỷ lệ đột biến *Pfmdr1* liên quan đến kháng mefloquine cao cần phải theo dõi chặt chẽ. Vai trò giám sát các chỉ điểm phân tử liên quan kháng ACTs là rất quan trọng để bổ sung dữ liệu vào thay đổi chính sách thuốc quốc gia tại Việt Nam.

Từ khóa: *Plasmodium falciparum*, chỉ điểm phân tử *Pfk13*, *Pfmdr1*, *Pfprt*, *Pfplasmepsine2*.

⁽¹⁾ Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn. ⁽²⁾ Đơn vị NCLS Đại học Oxford. ⁽³⁾ Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương. ⁽⁴⁾ Đại học Quy Nhơn.

Ngày nhận bài: 07/6/2021.

Ngày phản biện xong: 05/8/2021.

Ngày duyệt đăng: 20/8/2021.

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: huynhquangimpe@yahoo.com.



GIỚI THIỆU

Chiến lược phòng chống và loại trừ sốt rét hiện nay đang dựa vào tổ hợp nhiều biện pháp can thiệp, trong đó vai trò của thuốc sốt rét ACTs là rất quan trọng và là một trong 4 thành tố chiến lược nhất. Trong khi chưa có thêm ứng viên thuốc mới nào thay thế, tình trạng *Plasmodium falciparum* kháng thuốc sốt rét, kể cả nhóm thuốc ACTs hiện dùng là một trong những thách thức về mặt kỹ thuật, đã và đang đe dọa các thành quả đạt được trong lộ trình phòng chống và loại trừ sốt rét tại khu vực Tiểu vùng sông Mê Kông.

Tại Việt Nam, hầu hết các tỉnh Nam bộ, Lâm Đồng và miền Bắc, loài *Plasmodium falciparum* vẫn còn nhạy với liệu pháp thuốc phối hợp có artemisinin (ACTs), ngoại trừ tỉnh Bình Phước, nhưng ở miền Trung - Tây Nguyên đã xuất hiện chủng *P. falciparum* kháng thuốc ACTs kể từ năm 2010^[1] và có nguy cơ lan rộng các vùng lân cận, nên cần phải giám sát theo dõi thường xuyên về mặt lâm sàng đánh giá hiệu lực thuốc, giám sát chỉ điểm phân tử rất hữu ích trong theo dõi diễn tiến kháng. Nghiên cứu này tiến hành nhằm mục tiêu:

xác định đột biến và tần số các haplotype trên các gen khác nhau liên quan đến kháng tại một số huyện không có giao lưu biên giới Campuchia của tỉnh Đắk Lắk, nơi có số bệnh nhân đứng thứ 3 so với cả nước trong 3 năm gần đây.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

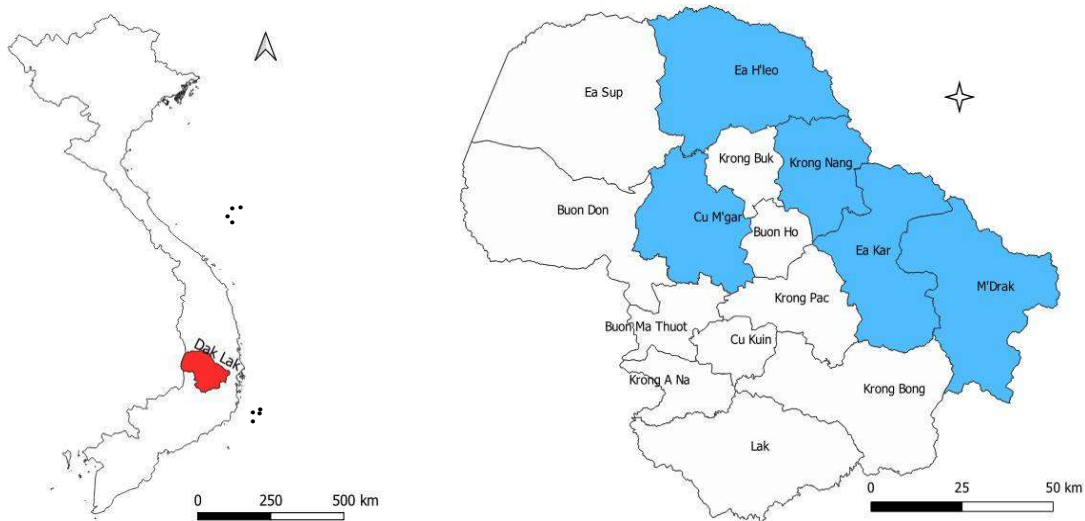
Đối tượng nghiên cứu

- Tất cả phân lập nhiễm *P. falciparum* đơn thuần hoặc nhiễm phối hợp trên bệnh nhân đang điều trị bằng thuốc artesunate - mefloquine (ASMQ) hoặc dihydroartemisinin - piperaquine phosphate (DHA - PPQ) tại các cơ sở y tế hoặc mẫu nghiên cứu đánh giá hiệu lực thuốc tại thực địa, lấy mẫu máu vào giấy thấm Whatman 3MM.

- Các mẫu máu trên bệnh nhân không phân biệt giới tính, nam nữ và độ tuổi, có triệu chứng hay không triệu chứng sốt rét.

Địa điểm và thời gian nghiên cứu

- Thời gian: Từ tháng 12/2017 đến tháng 12/2020.
- Địa điểm: Vùng sốt rét lưu hành huyện Ea Kar, Ma Đrăk, Krông Năng, Cư Mgar, tỉnh Đắk Lắk.



Hình 1. Địa điểm nghiên cứu Đắk Lắk và các huyện nơi thu thập mẫu phân lập *P. falciparum*

Thiết kế nghiên cứu và cỡ mẫu: Nghiên cứu ngang mô tả đặc tính di truyền chỉ điểm phân tử liên quan kháng thuốc sốt rét trên từng phân lập *P. falciparum* thu thập ở bệnh nhân. Cỡ mẫu: tất cả mẫu máu của bệnh nhân nhiễm đơn thuần hay phối hợp có *P. falciparum* tại các điểm nghiên cứu từ năm 2017 - 2020.

Nội dung nghiên cứu: Tất cả các phân lập *P. falciparum* thu thập trên các bệnh nhân nhiễm đơn thuần hay phối hợp có *P. falciparum* được xác định thông qua soi lam máu nhuộm giemsa dưới kính hiển vi vào giấy thấm dưới dạng mẫu máu khô (Dried Blood Spots - DBS).

Xác định nhiễm *P. falciparum* và nhiễm phối hợp bằng phân tích mã và định loại theo Sanger's 101 SNPs và định loài. Phân tích các chỉ điểm phân tử kháng thuốc artemisinin Kelch 13 (458, 493, 539, 543, 580), kháng piperaquine gồm Plasmepsins 2/3 CNV, Exonuclease E415G, Pfcrt (aa 72 - 72, 93, 97, 145, 218), kháng mefloquine (*Pfmdr1* CNV), hay kháng đa thuốc *Pfmdr1* (86, 184, 1034, 1042, 1226 và 1246)^[2,3,4]. Tất cả kiểu gen được đánh giá giải trình tự amplicon trên các vùng chọn lọc của bộ gen ký sinh trùng sốt rét (KSTSR) bằng chương trình Illumina MiSeq, sau đó chuyển dịch kiểu gen thành các haplotype kháng thuốc.

Kỹ thuật trong nghiên cứu: Một số kỹ thuật được áp dụng trong nghiên cứu gồm:

Kỹ thuật thu thập mẫu máu đầu ngón tay làm lam máu nhuộm giemsa, xác định loài KSTSR.

- Tách chiết DNA của *P. falciparum*: Ba giọt (50µl) máu lấy vào giấy thấm Whatmann 3MM (Maidstone, Anh), để khô tự nhiên và lưu giữ vào túi nhựa có khóa, bảo quản và tách chiết DNA ký sinh trùng *P. falciparum* từ các mẫu máu khô sử dụng kit QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN, Inc., Đức), sau đó mẫu DNA được tách chiết xong lưu giữ trong tủ lạnh -20°C đến khi phân tích.

- Phân tích và khuếch đại số bản sao *Pfpm2* copy number: *Pfpm2*CNV được thực hiện trên hệ thống Agilent real - time PCR (Stratagene MX3005P, Agilent Tech, La Jolla, Mỹ). Tất cả mẫu được kiểm tra ba lần. Hai chứng dương với 1 bản sao và 3 bản sao được sử dụng trong nghiên cứu này. Số copy *Pfpm2* được xác định thông qua phương pháp 2 - $\Delta\Delta CT$ ($\Delta CT = CT_{Pfpm2} - CT_{P. falciparum}$ β - tubulin gene; CT, chu kỳ ngưỡng)

sử dụng chủng 3D7 *P. falciparum* được biết có một bản copy đơn của gen *Pfmd2* gen, như một chuẩn (calibrator).

- Khuếch đại gen *Pfk13* propeller domain, *Pfmdr1* và *Pfprt*: Khuếch đại gen *Pfk13*, *Pfmdr1* và *Pfprt* được tiến hành trên format 96 giếng của hệ thống GeneAmp PCR9700 (Applied Biosystems, Mỹ). Đối với *Pfk13*, đoạn gen mà dùng để khuếch đại chứa 6 codon được xem là hợp lệ có liên quan đến kháng thuốc artemisinin. Các codon này gồm 458 (N458Y), 493 (Y493H), 539 (R539T), 543 (I543T), 561 (R561H) và 580 (C580Y). Phản ứng PCR và Nested-PCR cho khuếch đại vùng gen cánh quạt *Pfk13* dùng 50-250ng mẫu DNA trong một phản ứng 25µL PCR mix chứa 0,5µM cho mỗi môi, 0,2µM dNTPs, 1,0 UHF Phusion DNA Polymerase và 1 × Phusion HF buffer theo quy trình đề cương. Phản ứng PCR và nested PCR khuếch đại gen *Pfmdr1* (codon từ 86-184 và 1034-1246) được thực hiện, sử dụng 50-250ng mẫu DNA trong một 25µL PCR mix chứa 0,5µM mỗi môi và 1 × Promega Master-mix theo đề cương. Phản ứng PCR và nested PCR khuếch đại gen *Pfprt* (codon từ 72-76) được thực hiện sử dụng 50-250ng mẫu DNA trong một 25µL PCR mix chứa nồng độ cuối cùng 0,25µM mỗi môi và 1 × Promega Master Mix theo đề cương.

- Giải trình tự gen *Pfk13* propeller domain, *Pfmdr1* và *Pfprt* genes: Giải trình tự Sanger qua điện di cho các vùng gen *Pfk13* propeller, *Pfmdr1* và *Pfprt* được tiến hành trên hệ thống ABI 3130XL DNA sequencer (Applied Biosystems, Mỹ). Phần mềm Geneious R10 (Biomatters, San Francisco, Mỹ) được dùng để phân tích xác định các SNPs đặc biệt với các trình tự gen tham chiếu từ ngân hàng gen <http://plasmodb.org>. Các SNPs trên vùng gen *Pfk13* propeller, *Pfmdr1* và *Pfprt* được xác định bằng cách so sánh với các chủng tham chiếu 3D7 lần lượt PF3D7_1343700, PF3D7_0523000 và PF3D7_0709000.

Phân tích xử lý số liệu

Tần số và tỷ lệ phần trăm các allele đột biến và haplotype được xác định bằng phần mềm thống kê SPSS (Statistical Package for Social Sciences, Mỹ, phiên bản 20) để phân tích số liệu.

Khía cạnh đạo đức trong nghiên cứu

- Đề cương nghiên cứu được thông qua Hội đồng Đạo đức y sinh Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn.



- Các thủ thuật lấy máu trong mức nguy cơ thấp và các kết quả chỉ dùng để nghiên cứu, bổ sung dữ liệu vào tình trạng kháng thuốc ở Việt Nam và thay đổi chính sách thuốc sốt rét ở Việt Nam.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Chỉ điểm phân tử liên quan đến kháng thuốc artemisinin trên *P. falciparum*

Bảng 1. Một số chỉ điểm phân tử liên quan đến kháng artemisinin và dẫn suất

Chỉ điểm phân tử (N = 134)	2017 - 2018 (n = 55)		2019 - 2020 (n = 79)	
	Tần suất	Tỷ lệ	Tần suất	Tỷ lệ
Pfkelch13 - C580Y	46/55	83,6%	79/79	100%
Pfkelch13 - R539T	0/55	0%	0/79	0%
Wild - type	9/55	16,4%	0	0%

Nhận xét: Loại đột biến Pfkelch13 - C580Y chiếm ưu thế trong số chỉ điểm K13 với 83,6% (46/55) và 100% (79/79) vào thời gian lần lượt từ 2017 - 2018 và 2019 - 2020; loại đột biến gen Pfkelch13 - R539T chưa được phát hiện trên số phân lập trong thời gian này tại Đắk Lắk, số mẫu có kiểu alen hoang dại wild - type (WT) là 16,4% (9/55).

Chỉ điểm phân tử liên quan đến kháng thuốc piperazine phosphate trên *P. falciparum*

Bảng 2. Một số chỉ điểm phân tử liên quan đến kháng piperazine phosphate

Chỉ điểm phân tử (N = 134)	2017 - 2018 (n = 55)		2019 - 2020 (n = 79)	
	Tần suất	Tỷ lệ	Tần suất	Tỷ lệ
Plasmepsine 2(>1.5)	11/55	20%	61/79	77,2%
Exo-E415G	47/55	85,5%	72/79	91,1%
Pfcr1 (72-76 CVIET)	51/55	92,7%	72/79	91,1%
Pfcr1 (72-76 CVIDT)	2/55	3,64%	2/79	2,53%
Pfcr1 (72-76 CVVET)	1/55	1,82%	2/79	2,53%
Pfcr1 (72-76 WGIET)	1/55	1,82%	1/79	1,26%
Pfcr1 F145I	2/55	3,64%	0/79	0
Pfcr1 Thr93Ser	0/55	0	0/79	0
Pfcr1 His97Tyr	0/55	0	0/79	0
Pfcr1 Ile218Phe	0/55	0	0/79	0

Nhận xét: Chỉ điểm liên quan kháng piperazine và thuốc thuộc nhóm 4 - aminoquinoleine từ giai đoạn 2017 - 2018 sang

2019 - 2020, các chỉ điểm Plasmepsine 2 CNV (> 1,5) tăng từ 20% (11/55) lên 77,2% (61/79); đột biến Exo - E415G tăng từ 88,5% (44/55) lên 91,1% (72/79).

Các chỉ điểm phân tử liên quan đến kháng PPO và các thuốc 4 - aminoquinoline như Pfcr1 (72 - 76 CVIET) từ 92,7% (51/55) lên 91,1% (72/79); Pfcr1 (72 - 76 CVIDT) từ 3,64% (2/55) xuống 2,53% (2/79); Pfcr1 (72 - 76 CVVET) từ 1,82% (1/55) lên 2,53% (2/79); Pfcr1 (72 - 76 WGIET) từ 1,82% (1/55) xuống 1,26% (1/79); Pfcr1 F145I từ 3,64% (2/55) xuống 0%. Riêng các chỉ điểm khác Pfcr1 Thr93Ser, Pfcr1 His97Tyr, Pfcr1 Ile218Phe chưa phát hiện trong nghiên cứu này.

Chỉ điểm phân tử liên quan đến kháng thuốc mefloquetrên *P. falciparum*

Bảng 3. Chỉ điểm phân tử liên quan đến kháng thuốc mefloquine

Chỉ điểm phân tử (N = 134)	2017-2018(n = 55)		2019-2020(n = 79)	
	Tần suất	Tỷ lệ	Tần suất	Tỷ lệ
Pfmdr1 (>1,5 copy)	13/55	23,6%	1/79	1,3%
Pfmdr1 (≤ 1,5 copy)	42/55	76,4%	78/79	98,7%

Nhận xét: Về chỉ điểm Pfmdr1 liên quan đến kháng thuốc mefloquine (> 1,5 copy) thay đổi từ 23,6% (13/55) xuống còn 1,3% (1/79) từ giai đoạn (2017 - 2018) sang (2019 - 2020). Số còn lại thì các Pfmdr1 ở ngưỡng ≤ 1,5 copy thay đổi từ 76,4% (42/55) tăng lên 98,7% (78/79).

Bảng 4. Chỉ điểm xuất hiện đồng thời liên quan đến kháng artemisinin với thuốc đi kèm trong viên dihydroartemisinin - piperazine và viên artesunate - mefloquine

Chỉ điểm phân tử (N = 134)	2017 - 2018 (n = 55)		2019 - 2020 (n = 79)	
Pfkelch13 - C580Y + Pfmdr1*	12/55	21,8%	1/79	1,3%
Pfkelch13 - C580Y + Plasmepsine2**	9/55	16,4%	61/79	77,2%

* Liên quan *P. falciparum* kháng artesunate-mefloquine;
** Liên quan *P. falciparum* kháng dihydroartemisinin-piperazine.

Nhận xét: Một số phân lập *P. falciparum* thu thập tại điểm nghiên cứu có đồng thời hai chỉ điểm liên quan đến kháng cả hai thành phần thuốc trong viên phối hợp ACTs hiện đang dùng tại các vùng lưu hành *P. falciparum*. Trong giai đoạn

(2017 - 2018) và (2019 - 2020) bộ chỉ điểm C580Y + *Pfmdr1* (liên quan kháng thuốc artesunate - mefloquine) từ 21,8% (12/55) xuống còn 1,3% (1/79) và C580Y + Plasmequine 2 (liên quan kháng thuốc dihydroartemisinin - piperazine) từ 16,4% (9/55) tăng lên 77,2% (61/79).

BÀN LUẬN

Đặc điểm chung của quần thể các phân lập *P. falciparum* tại điểm nghiên cứu

Nghiên cứu cắt ngang có phân tích dựa trên các phân lập *P. falciparum* tại các xã có sốt rét lưu hành nặng của các huyện có tọa độ GPS trên bản đồ, huyện Krông Năng (13°024'67" N 108°363'21" E), Ea Kar (12°834'89" N 108°458'58" E), Cư Mgar (12°878'16" N 108°068'88" E) và Ma Đ'rák (12°754'92" N 108°735'42" E) trong giai đoạn 2017 - 2018 và 2019 - 2020, đặc biệt mẫu tập trung nhiều mùa lan truyền sốt rét tại các huyện, với đỉnh bệnh cao nhất từ tháng 8 đến tháng 1 năm sau hàng năm. Tổng số có 55 (năm 2017 - 2018) và 79 (năm 2019 - 2020) mẫu máu các phân lập *P. falciparum* lấy vào giấy thấm để khô (DBS) nhiệt độ phòng từ các bệnh nhân tham gia nghiên cứu TES và bệnh nhân đến khám điều trị tại các cơ sở trung tâm y tế và trạm y tế xã và lưu giữ trong túi nhựa có khóa.

Các đột biến gen mã hóa protein Kelch (*Pfkelch*) trên nhiễm sắc thể số 13 của *P. falciparum* có liên quan đến kháng artemisinin, dẫn đến thể nhân *P. falciparum* kém đáp ứng với artemisinin và chậm làm sạch KSTSR^[4,5,9]. Sự khuếch đại *Pfplasmepsin2* và đột biến kháng với chloroquine của *P. falciparum* (chloroquine resistance transporter - *Pfprt* liên quan locus kháng với nhóm thuốc 4 - aminoquinoline resistance locus (vị trí 72 - 76 với Lys76Thr) liên quan đến kháng cả piperazine. Khuếch đại bản sao *Pfmdr1* là một chỉ điểm liên quan đến kháng mefloquine và chỉ điểm này cũng góp phần vào làm giảm tính nhạy với thuốc lumefantrine tại Đông Nam Á.

Việc tính toán các mẫu có alen đột biến và hoang dại (wild type - WT) được dùng để khái quát hóa tỷ lệ mẫu có biểu hiện đa hình đơn nucleotide (SNPs). Các kiểu gen đơn bội (haplotype) *Pfmdr1* được cấu trúc dựa trên sự hoán vị của các SNPs tại codons 86, 184 và 1246. Các haplotype *Pfprt* được cấu trúc dựa trên sự

hoán vị các SNPs tại codons 72 - 76. Đối với nhiễm phối hợp, tất cả phối hợp haplotype *Pfmdr1* có thể (dựa trên quan sát SNPs) và WT *Pfprt* (ví dụ CVMNK) và hầu hết haplotype đột biến (CVIDT và CVMDT) được báo cáo dựa trên vị trí đột biến (codons 74 - 76 và codons 75 - 76).

Chỉ điểm phân tử liên quan đến kháng thuốc artemisinin và thuốc di kèm

Chỉ điểm phân tử liên quan kháng artemisinin và dẫn suất

Tất cả 134 mẫu phân lập *P. falciparum* được thu thập vào các giấy thấm chuyên dùng ở bệnh nhân đều đủ lượng DNA để phân tích gen phát hiện chỉ điểm phân tử. Kết quả về các chỉ điểm phân tử liên quan đến kháng thuốc artemisinin hoặc các dẫn suất trên *P. falciparum*, loại đột biến *Pfkelch13* - C580Y chiếm ưu thế trong số các chỉ điểm đột biến gen K13 với tỷ lệ 83,6% (46/55) và 100% (79/79) vào khoảng thời gian lần lượt từ (2017 - 2018) và (2019 - 2020), loại đột biến gen *Pfkelch13* - R539T chưa được phát hiện trên số phân lập thu thập được trong thời gian này tại Đắk Lắk và kiểu alen hoang dại wild - type (WT) là 16,4% (9/55). Tỷ lệ đột biến C580Y này cao hơn so với các nghiên cứu trước đây tại Việt Nam khi phân tích đa quốc gia tại GMS chỉ có 66% và không chỉ C580Y mà còn có các đột biến khác như C469F (1,9%), K503N (0,4%), P553L (4,6%) và các alen WT (Didier Menard và cộng sự, 2014).

Ngoài ra, gần đây tác giả Huỳnh Hồng Quang và Marina Chavchich (số liệu sắp công bố) điều tra cho thấy thêm đột biến loại *Pfkelch13* - R539T tại huyện Ia H'drai, tỉnh Kon Tum 8,7% (2/23) là một đột biến mới hiếm gặp ở miền Trung và miền Nam của Việt Nam, có thể tình này có giao lưu biên giới với Lào và Campuchia nên có thể xuất hiện đột biến mới? Trong số 127 phân lập *P. falciparum* qua điều tra phân tử cắt ngang tại Đắk Nông (n = 36), Đắk Lắk (n = 56), Gia Lai (n = 13) và Kon Tum (n = 23). Tính đa hình của *Pfkelch 13* cho thấy có 81% và 84% số phân lập có đột biến C580Y lần lượt tại Đắk Nông và Đắk Lắk, tiếp sau đó là Gia Lai (39%) và Kon Tum (30%).

Sở dĩ các điều tra của các tác giả trên đã phát hiện đa dạng về đột biến gen K13 hơn trong điều tra này tại tỉnh Đắk Lắk, vì họ phân tích từ các mẫu phân lập thu thập từ nghiên cứu về hiệu lực thuốc sốt rét (Therapeutic Efficacy Study - TES) hoặc thu thập mẫu phân lập từ các bệnh nhân điều

trị tại tất cả cơ sở y tế của nhiều tỉnh thành có sốt rét lưu hành để giám sát kháng thuốc phân tử (molecular resistance surveillance - MRS) đồng thời nên được số mẫu *P. falciparum* nhiều và vì thể tính đa dạng về đột biến gen K13 cũng sẽ cao hơn lấy mẫu tại một tỉnh. Ngoài ra, các nghiên cứu kháng thuốc TES và MRS thu thập mẫu phần lớn tại các vùng sốt rét lưu hành có và không có giao lưu với biên giới Campuchia (Bình Phước, Gia Lai, Kon Tum, Đắk Lắk) và Lào (Quảng Nam và Kon Tum) nên kiểu đột biến cũng có thể giao thoa giữa các vùng khác nhau.

So sánh chỉ điểm phân tử với các nước khác trong khu vực GMS chỉ ra hai kiểu gen (genotype) C580Y có mặt nhiều ở vùng Đông GMS và loại chiếm tỷ lệ thấp hơn là P446I ở Myanmar chiếm chủ yếu và các đột biến khác giảm đi. Ngoài ra, tại vùng Đông GMS, loại alen C580Y được phát hiện ở Ranong (Tây Nam của Thái Lan giáp biên với Myanmar khoảng 28% (21/74), Mae Hong Son 15% (2/13) và Mae Sot 11% (39/369). Tại phía Tây của Campuchia, tỷ lệ C580Y tăng lên từ 33% (3/9) vào năm 2007 lên đến 90% (18/20) vào năm 2017. Tại Myanmar, loại đột biến C580Y phân bố rộng ở tần suất thấp ở Kayin 5% (177/3140), Kachin 1% (1/100) và Sagaing 10% (6/58). Loại alen P446I tìm thấy chỉ có ở phía Tây của GMS. Tỷ lệ P446I trong số các phân lập *P. falciparum* cao nhất ở phía Bắc Myanmar^[10]. Loại P446I cũng phổ biến ở bang Kayin nhưng tỷ lệ thấp hơn vùng biên giới với Thái Lan. So sánh với trình tự chuỗi bên C580Y (n = 113) với các phân lập *Pfkelch* wild - type tạm thời (n = 95) ở vùng phía Tây của GMS giai đoạn 2007 - 2017 biểu hiện một sự giảm đáng kể các đột biến trên quần thể *P. falciparum* theo thời gian (He 0,220, standard error [SE] 0,002) cho thấy rằng có một đợt biến trung tính (selective sweep). Về tính đa dạng của các đột biến gen K13 còn liên quan đến kích thước vùng trên bộ gen được giải trình tự và đánh giá để tìm các đột biến.

Chỉ điểm phân tử liên quan đến kháng piperazine phosphate trên *P. falciparum*

Thuốc dihydroartemisinin - piperazine phosphate (DHA - PPQ) là thuốc ưu tiên điều trị sốt rét do *P. falciparum* chưa biến chứng tại Việt Nam. Tuy nhiên, kể từ năm 2008, lần đầu tiên phát hiện chủng *P. falciparum* kháng với artemisinin tại phía Tây biên giới Campuchia -

Thái Lan, sau đó đến cuối năm 2009^[4,7], một số dấu hiệu cảnh báo chậm làm sạch thể nhân *P. falciparum* tại Bình Phước, đến năm 2010 - 2014 thì các vùng lân cận như Đắk Nông, Gia Lai cũng có dấu hiệu tương tự (có thể lan rộng theo đường biên giới hay trên nhóm dân di biến động mang chủng kháng thuốc?) thể hiện bằng chỉ số KSTSR thể vô tính ngày D3 sau điều trị tăng dần theo các năm như một chỉ điểm lâm sàng gián tiếp kháng thuốc theo định nghĩa của Tổ chức Y tế thế giới (WHO, 2012). Song, điều đặc biệt tại các vùng SRLH của Đắk Lắk thì tính nhạy giữa quần thể *P. falciparum* với thuốc DHA - PPQ còn cao mãi đến năm 2016 mới có biểu hiện chậm sạch KSTSR *P. falciparum* sau điều trị DHA - PPQ tại TTYT huyện Buôn Đôn và đây chính là ý tưởng nghiên cứu làm thế nào đánh giá thật sự thực trạng kháng cả về mặt *in vivo* và khía cạnh phân tử.

Với số liệu của chỉ điểm phân tử liên quan đến kháng piperazine phosphate (PPQ) và các đồng phân trong nhóm 4 - aminoquinoline theo giai đoạn (2017 - 2018) và (2019 - 2020), các chỉ điểm phân tử như tăng số bản sao Plasmequine 2 CNV (> 1,5 copy) tăng từ 20% (11/55 ca) lên 77,2% (61/79) và đột biến điểm Exo - E415G tăng từ 88,5% (44/55) lên 91,1% (72/79). Tần suất và tỷ lệ về Plasmequine 2 và Exo - E415G tăng này cho thấy trên quần thể các phân lập *P. falciparum* không những có chỉ điểm kháng một phần với dẫn suất artemisinin (DHA) mà còn kháng cả thành phần thuốc đi kèm PPQ rất cao hay nói đúng hơn là hiệu lực thuốc đã giảm đi rõ rệt. Một nghiên cứu đa trung tâm tại vùng GMS cho thấy từ 2007 - 2018^[5,9], sự khuếch đại *Pfplasmepsin2* tăng tần suất hơn tại phía Đông vùng GMS với trung vị số bản sao là 1,83 (1,60 - 2,76; n = 4571) tại Myanmar và chỉ thấy có ở Kyain Seikgyi giai đoạn (2015 - 2017) với tỷ lệ 1% (51/4221).

Một nghiên cứu thực hiện tại 3 tỉnh Tây Nguyên phân tích *P. fPlasmepsins2* tại Gia Lai, Đắk Lắk và Đắk Nông cho thấy tỷ lệ đa bản sao của gen từ 20% - 39%, tỷ lệ phân lập có đột biến Exo - E415G liên đới đến kháng thuốc PPQ là 62% - 86%. Tỷ lệ số phân lập *P. falciparum* có xuất hiện 2 loại chỉ điểm đồng thời *Pfkelch13* C580Y và *Pfplasmepsins2* là từ 16% - 28%, riêng ở Kon Tum chỉ 4,3%. Sự khác biệt về tỷ lệ đột biến kháng giữa các điểm nghiên cứu có thể do độ lớn của cỡ mẫu từng tỉnh, khác nhau vùng địa lý, có hay không giao lưu biên giới và vùng kháng

thuốc trước đó (Huỳnh Hồng Quang và cộng sự, số liệu chưa công bố).

Để điều tra xem có thể do “du nhập” từ vùng Đông của GMS hay không, các tác giả đã phân tích chi tiết trình tự và so sánh. Sản phẩm DNA khuếch đại chứa gen *Pfplasmepsin2* nhiều bản sao tại Pailin, Campuchia đặc trưng trước đây dài khoảng 18kb và phân tích 3 gen *Pfplasmepsin1*, 2 và 3. Tổng số 9/36 phân lập từ Myanmar có tăng bản sao *pfplasmepsin2* có cùng điểm phân giới (breakpoint) như các phân lập tại Campuchia và sản phẩm DNA khuếch đại (amplicon) thay đổi về độ dài từ 81kb đến hơn 190kb. Các kết quả này chỉ ra nguồn gốc độc lập đối với các chỉ điểm *Pfplasmepsin2* tại Myanmar và không có cung cấp bằng chứng chọn lọc hay chứng minh nhập khẩu từ phía Đông của GMS. Trình tự gen *pfplasmepsin2* trên 51 phân lập nhiều bản sao (multiple - copy isolate) và 54 phân lập đơn bản sao (single - copy isolate) tại phía Đông của GMS. Tại Myanmar, không có bằng chứng về quét chọn lọc, trình tự bên quanh các phân lập đa bản sao *pfplasmepsin2* tại Kayin (n = 10) chỉ ra kiểu gen đơn bội khác nhau và các phân lập có nguồn gốc khác nhau (He 0,643, SE: 0,057).

Bên cạnh đó, phân tích các chỉ điểm phân tử trên *P. falciparum* liên quan đến kháng các thuốc 4 - aminoquinoline như Pfert (72 - 76 CVIET) từ 92,7% (51/55) lên 91,1% (72/79). Một số chỉ điểm khác thì dao động tăng hoặc giảm trong khoảng (\pm 3%) như chỉ điểm Pfert (72 - 76CVIDT) từ 3,64% (2/55) xuống 2,53% (2/79); Pfert (72 - 76 CVVET) từ 1,82% (1/55) lên 2,53% (2/79); Pfert (72 - 76 WGIET) từ 1,82% (1/55) xuống 1,26% (1/79); Pfert F145I từ 3,64% (2/55) xuống 0%. Riêng các chỉ điểm khác Pfert Thr93Ser, Pfert His97Tyr, Pfert Ile218Phe chưa phát hiện ở nghiên cứu này.

So sánh với nghiên cứu tại vùng GMS, tỷ lệ phân lập *P. falciparum* có chỉ điểm *Pfplasmepsin2* thấp hoặc 0% sau điều trị DHA - PPQ tại các vùng ở Myanmar và Campuchia. Không có bằng chứng về đột biến chọn lọc Pfert liên quan kháng PPQ. Không có phân lập nào tìm thấy tại Kayin, Myanmar và *pfert* Gly353Val tìm thấy trong 7 phân lập trước và sau điều trị tại Campuchia (với 1 kiểu gen đơn bội CVIET ở vị trí 72 - 76).

Chỉ điểm phân tử liên quan đến kháng thuốc mefloquine trên *P. falciparum*

Artesunate-mefloquine (ASMQ) hiện được xem là thuốc ACTs tiềm năng về hiệu lực điều trị cao nhất để điều trị sốt rét do *P. falciparum* kháng thuốc tại các nước GMS, kể cả Việt Nam thể hiện qua nhiều nghiên cứu. Tuy nhiên, về lịch sử kháng thuốc thì thuốc mefloquine (MQ) và artesunate (AS) đơn thuần cũng từng bị kháng bởi *P. falciparum* tại Việt Nam vào những năm 1990 và 2000^[11], nên việc phối hợp hai thành phần có thời gian bán hủy thuốc ngắn và dài sẽ vừa giúp vừa diệt nhanh dung khối ký sinh trùng (parasite biomass) vừa trì hoãn tiến triển kháng.

Điểm đặc biệt trong điều tra phân tích về chỉ điểm Pfmdr1 liên quan đến kháng MQ (> 1,5 copy) thay đổi từ 23,6% (13/55) ở giai đoạn lấy mẫu (2017 - 2018) xuống còn xuống còn 1,3% (1/79) ở giai đoạn (2019 - 2020). Điều này có thể giải thích rằng, 55 phân lập *P. falciparum* thu thập từ năm 2017 - 2018 chủ yếu trên bệnh nhân thuộc nhóm dân di biến động, thường đi vào các vùng rừng giáp biên giới và đi lại giữa các tỉnh với nhau nên có thể mắc các phân lập có đột biến Pfmdr1 nhiều hơn, đến năm 2019 - 2020 thì thực trạng bảo vệ rừng nghiêm ngặt hơn và nhất là tình trạng giãn cách xã hội và hạn chế đi lại của người đi rừng và nhóm nguy cơ cao khi đại dịch COVID-19 xảy ra mà Đắc Lắc cũng ghi nhận ca dương tính SARS-Cov2, nên phần lớn số bệnh nhân nhiều hơn nhưng đa số họ mắc tại rừng và bìa rừng địa phương chứ không giao lưu biên giới, nên tỷ lệ có chỉ điểm Pfmdr1 cũng thấp hơn. Một lý do thứ hai, phần lớn số ca *P. falciparum* năm 2019 - 2020 là tập trung tại hai huyện Krông Năng và Ea Kar, không có từ huyện khác; trong khi đó số ca từ 2017 - 2018 thì từ hầu hết các huyện Cư Mgar, Ma Drach, Krông Năng và Ea Kar nên có thể có nhiều quần thể *P. falciparum* khác nhau sẽ có đa dạng di truyền đột biến của Pfmdr1 hơn so với giai đoạn 2019 - 2020. Số phân lập còn lại thì các Pfmdr1 ở ngưỡng \leq 1,5 copy với tỷ lệ 76,4% (42/55) và 98,7% (78/79) chưa xếp loại vào nhóm chỉ điểm kháng.

So sánh dữ liệu nghiên cứu đa quốc gia trong vùng GMS từ 2007 - 2018 với tổng số 6.984 phân

lập *P. falciparum* được phân tích khuếch đại chỉ điểm Pfmdr1^[8,11]. Loại chỉ điểm Pfmdr1 này được phát hiện khắp vùng GMS. Tại Mandalay, Myanmar có 13% (8/59) giai đoạn 2013 - 2014 và tại Kayin là 3% (79/2139) vào năm 2017 và vùng biên giới Tây bắc với Thái Lan là Mae Sot 30% (19/62) năm 2015. Số liệu này ở Mae Sot có tỷ lệ hơi thấp hơn giai đoạn (1993 - 1994) và các phân lập này thu thập trên cùng một vùng 48% (30/62) khi mefloquine đơn trị liệu được sử dụng để điều trị như thuốc đầu tay. Chỉ điểm Pfmdr1 cũng được tìm thấy ở phía Nam của Lào với tỷ lệ 4% (7/173) năm 2018 và ở Stung Treng, phía Bắc Campuchia 8% (7/89) năm 2018 và ở Đông Bắc Thái Lan (Ubon Ratchathani và Srisaket) giáp Campuchia 7% (1/13) vào năm 2016.

Nhiều chỉ điểm đồng thời liên quan đến kháng artemisinin với thuốc đi kèm

Thuốc sốt rét ACTs loại DHA - PPQ và ASMQ là hai thuốc đầu tay trong điều trị sốt rét do *P. falciparum* kháng thuốc, nên việc phân tích các chỉ điểm liên quan đến kháng từng loại thuốc và xuất hiện đồng thời hai hay nhiều chỉ điểm là rất quan trọng. Phân tích đã cho thấy một vài phân lập *P. falciparum* có đồng thời hai chỉ điểm liên quan đến kháng cả hai thành phần thuốc trong viên phối hợp ACTs. Trong giai đoạn (2017 - 2018) và (2019 - 2020) cặp chỉ điểm [C580Y + Pfmdr1] (liên quan kháng thuốc artesunate - mefloquine) chiếm từ 21,8% (12/55) xuống còn 1,3% (1/79) và cặp chỉ điểm [C580Y + Plasmeppsine2] (hay KEL1/PLA1 co - lineage; liên quan kháng thuốc dihydroartemisinin - piperazine) từ 16,4% (9/55) tăng lên 77,2% (61/79). Số liệu này chỉ ra rằng tình trạng kháng thuốc mức độ phân tử đã có và nguy cơ xuất hiện kháng thuốc trên lâm sàng chỉ còn là vấn đề thời gian và phương thức sử dụng thuốc sao cho hợp lý.

Hai trong 5 thuốc ACTs được Tổ chức Y tế thế giới khuyến cáo điều trị sốt rét do *P. falciparum* chưa biến chứng là loại dihydroartemisinin - piperazine (DHA - PPQ) và artesunate - mefloquine (ASMQ). Tuy nhiên, song song với tình trạng thuốc DHA - PPQ biểu hiện thất bại tại vùng sốt rét rộng lớn từ Campuchia đến Đông Bắc Thái Lan, phía Nam Việt Nam rồi đến Lào, thì thuốc ASMQ cũng đã có dấu hiệu thất bại điều trị ở vùng SRLH ở phía Đông của Myanmar.

Sự xuất hiện và khó kiểm soát quần thể *Plasmodium falciparum* kháng artemisinin và dẫn suất đang lan rộng tại các nước Tiểu vùng sông Mê Kông (GMS) trên 12 năm qua đã cho thấy mối đe dọa tiềm tàng với các thành quả trong lộ trình loại trừ sốt rét và nguy hiểm hơn khi chúng “tiếp cận” đến Ấn Độ, Bangladesh và châu Phi. Kháng artemisinin đơn thuần nghĩa là làm tăng kháng và giảm hiệu lực của thuốc phối hợp có thành phần artemisinin (ACTs). Do đó, trong khi chờ đợi các ứng viên thuốc mới thay thế chống kháng thì việc lựa chọn các thuốc đi kèm (partner drugs) trong viên phối hợp thích ứng là rất quan trọng.

Kháng artemisinin được nhận ra lần đầu năm 2007 tại phía Tây Campuchia có liên quan đến đột biến gen vùng cánh quạt Pfkclch (NST số 13) có thể kháng chọn lọc từ các chủng *P. falciparum*, tăng áp lực thuốc và tăng kháng artemisinin một phần rồi đến cả ACTs, cuối cùng thất bại điều trị do hiệu lực giảm. Về khía cạnh dịch tễ, vùng GMS có thể chia thành hai vùng lan truyền riêng biệt: vùng phía Đông gồm Campuchia và vùng giáp với phía Nam Việt Nam, phía Nam Lào, Đông Bắc Thái Lan và vùng phía Tây gồm Myanmar và vùng liên kề Tây Thái Lan, với biên giới tỉnh Vân Nam (Trung Quốc), Đông Bắc Ấn Độ và Bangladesh. Vùng giữa hai vùng này gồm Bắc Lào và phần còn lại của Thái Lan hầu như không có sốt rét.

Tại vùng Đông, ngoại trừ Lào, thuốc DHA - PPQ đã được dùng phổ biến trong nhiều năm, đột biến kiểu gen đơn bội PfkclchC580Y (PfPailin) giờ đã lan rộng vùng Đông khu vực GMS và cả đột biến luôn cả thành phần thuốc đi kèm PPQ (*Pfplasmepsin2* và *Pfprt*). DHA - PPQ là thuốc điều trị ưu tiên có hiệu quả cao tại Việt Nam, Campuchia và Thái Lan, nhưng dòng (lineage) PfPailin đa kháng thuốc trở thành nổi trội trong vùng Đông của GMS, dẫn đến tỷ lệ thất bại điều trị cao xảy ra. Tỷ lệ thất bại cao quy kết có vai trò của đột biến trong gen *Pfprt* và tăng bản sao *Pfplasmepsin2* nên làm giảm tính nhạy với PPQ. Các đột biến mới *Pfprt* này tương ứng với locus kháng nhóm thuốc 4 - aminoquinoline (vị trí 72 - 76) biểu hiện là kiểu gen đơn bội CVIET haplotype trên hầu hết các phân lập *P. falciparum* trong vùng này.

Phần lớn số ca *P. falciparum* ở Thái Lan tập trung ở vùng gần biên giới của Myanmar và số cao nhất ở tỉnh Tak và giáp với bang Kayin ở đông Myanmar và khi các vùng này triển khai can

thiệt điều trị hàng loạt thì kiểu đột biến C580Y giảm đi. Ngoài vùng biên giới thì các đột biến trên còn phát hiện tại các vùng không phải “giao thoa” biên giới hai nước. Sự phát triển và lan rộng kháng PPQ tại vùng Đông của GMS làm gia tăng kháng nhiều nơi hơn. Các bản sao *Pfplasmepsin* được xác định trên một số phân lập *P. falciparum* từ Myanmar nhưng cơ chế khuếch đại khác với vùng Đông GMS và giải trình tự gen không thấy có liên quan^[4,5]. Hoặc là các chủng này kháng PPQ trên *in vivo* chưa được biết, nhưng tính đa dạng của các kiểu gen đơn bội cho thấy không chọn lọc và PPQ chưa từng dùng tại các vùng như thế.

Pfmdr1 xuất hiện từ từ trong các vùng SRLH liên quan đến giảm tính nhạy với thuốc mefloquine tại khu vực biên giới phía Đông và Tây của Thái Lan vào đầu những năm 1990 trước khi ACTs được dùng. Dù thuốc mefloquine (MQ) giảm tính nhạy, song thuốc artesunate - mefloquine (ASMQ) vẫn chứng minh hiệu lực cao và bền vững trên vùng đó hơn 15 năm trước khi tăng thất bại điều trị trở lại vào năm 2011^[9]. Hiệu lực ASMQ giảm từ kháng cả artemisinin (đột biến *Pfkelch*) và tái xuất hiện kháng mefloquine (*Pfmdr1* amplification). Nên nghiên cứu này gợi ý có thể có quần thể *P. falciparum* có chỉ điểm kháng MQ đơn thuần hoặc phối hợp với kháng cả thành phần và hiện tại các vùng này đã biểu hiện kháng artemisinin gần như 100% và hiệu lực MQ sẽ giữ được bao lâu vẫn chưa biết. Do vậy, định hướng nghiên cứu và phát triển thuốc mới hay dạng triple ACTs để bảo vệ hiệu lực từng thành phần của thuốc là quan trọng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO (2015). Guidelines for the treatment of malaria, 3rd Edition.
2. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, et al., (2014). A molecular marker of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria. Nature; 505: 50-55.
3. Amato R, Lim P, Miotto O, et al., (2017). Genetic markers associated with dihydroartemisinin-piperaquine failure in Plasmodium falciparum malaria in Cambodia: A genotype-phenotype association study. Lancet Infect Dis 2017; 17: 164-73.
4. Hamilton WL, Amato R, Quang HH, Thuy-Nhien NT, Dondorp AM, Miotto O et al., (2019). Evolution and expansion of multidrug-resistant malaria in Southeast Asia: A genomic epidemiology study. The Lancet Infectious Diseases 19:943-951.
5. Imwong M, Suwannasin K, Kunasol C, et al. (2017). The spread of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum in the Greater Mekong subregion: A molecular epidemiology observational study. Lancet Infect Dis 2017; 17: 491-97.

ĐIỂM HẠN CHẾ CỦA NGHIÊN CỨU

Hạn chế chính của nghiên cứu này là mẫu phân lập thu từ cả nghiên cứu TES và tại hệ điều trị thường quy nên không phải tất cả ca bệnh gắn liền với kết quả *in vivo* nên việc phân tích lâm sàng chưa thể hoàn hảo và có thể sai số.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết quả nghiên cứu cho thấy có tỷ lệ một hay hai chỉ điểm di truyền *Pfk13* - C580Y và *PfPlasmepsin 2/exonuclease E415G* đồng thời rất cao, liên quan đến kháng artemisinin và piperaquine. Tỷ lệ đột biến *Pfmdr1* liên quan đến kháng mefloquine.

Tuy nhiên, các dữ liệu dịch tễ học phân tử kháng thuốc sẽ là dấu cảnh báo sớm về quần thể *P. falciparum* giảm nhạy và kháng thuốc trước khi biểu hiện thất bại trên lâm sàng và lan rộng.

Việc triển khai thường quy và có hệ thống thông qua nhân viên y tế lấy mẫu đúng sau khi họ chẩn đoán xác định sốt rét *P. falciparum* bằng kính hiển vi hoặc/và test chẩn đoán nhanh nhất là trong lộ trình loại trừ sốt rét và số ca đang giảm thấp đáng kể sẽ giúp giảm kinh phí thực hiện chứ không lớn như các TES trước đây và số liệu phân tích cũng bổ sung cung cấp tần suất và tỷ lệ chỉ điểm kháng sau khi can thiệp, nhằm bổ sung dữ liệu giúp thay đổi Chính sách thuốc và góp phần vào thành công loại trừ sốt rét.

6. Phyo AP, Ashley EA, Anderson TJC, et al. (2016). Declining efficacy of artemisinin combination therapy against *P. falciparum* malaria on the Thai-Myanmar border (2003-2013): the role of parasite genetic factors. *Clin Infect Dis* 2016; 63: 784-91.
7. van der Pluijm RW, Imwong M, Chau NH, et al. (2019). Determinants of dihydroartemisinin-piperaquine treatment failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: A prospective clinical, pharmacological, and genetic study. *Lancet Infect Dis* 2019; 19: 952-61.
8. Price RN, Uhlemann AC, Brockman A, et al. (2004). Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum* and increased *Pfmdr1* gene copy number. *Lancet* 2004; 364: 438-47.
9. Ross LS, Dhingra SK, Mok S, Yeo T, Wicht KJ, Kumpornsin K, Menard D, Fidock DA (2018). Emerging Southeast Asian *Pfprt* mutations confer *Plasmodium falciparum* resistance to the first-line antimalarial piperaquine. *Nat Commun* 9:3314.
10. Tun KM, Imwong M, Lwin KM, et al. (2015). Spread of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Myanmar: A cross-sectional survey of the K13 molecular marker. *Lancet Infect Dis* 2015; 15: 415-21.
11. Wongsrichanalai C, Meshnick SR. 2008. Declining artesunate-mefloquine efficacy against *falciparum* malaria on the Cambodia-Thailand border. *Emerg Infect Dis* 14:716-9.

ANTIMALARIAL DRUG RESISTANCE MOLECULAR MAKERS ON *PLASMODIUM FALCIPARUM* ISOLATES: AN OBSERVATIONAL STUDY DURING 2017 - 2020

Summary

Backgrounds: Emerging artemisinin - based combination (ACTs) resistance in Vietnam poses a significant risk to malaria elimination roadmap by 2030. Since 2009, *P. falciparum* strains have shown decreased susceptibility to artemisinin and delayed asexual parasite clearance after ACTs treatment in Highland zone, except Dak Lak province. Understanding the genetic phenotype of ACTs resistance is crucial for early warning sign surveillance.

Methods: This study assessed molecular markers associated with resistance to dihydroartemisinin - piperaquine, artesunate - mefloquine via dried - blood spots (DBS) isolate samples collected from *falciparum* malaria patients enrolled in a multicenter observational study during 2017 - 2020. All isolates were analysed for the drug resistance markers in the *Pfk13* propeller domain, *Pfplasmepsine2*, *Pfmdr1*, and *Pfprt* genes by Sanger sequencing. Additionally, the *Pfpm2* gene copy number was assessed by real - time polymerase chain reaction. DNA was purified with QIAamp DNA Mini kits (QIAGEN; Düsseldorf, Germany), all genotypes were generated by selective regions amplicon sequencing of the parasite genome at Wellcome Sanger Institute (UK), Pasteur Institute (Cambodia), First Base DNA sequencing Axil Scientific Pte., (Singapore), then genotypes were translated into drug resistance haplotypes.

Findings: A total of 55 and 79 isolate samples of microscopically diagnosed *P. falciparum* isolates were collected from Dak Lak province in 2017 - 2018 and 2019 - 2020, respectively. The results indicate presence of both high proportion of *Pfk13* - C580Y mutations associated with artemisinin resistance from 83.6% (46/55) to 100% (79/79) and the *PfPlasmepsine2* amplification (> 1.5 copy) from 20% (11/55) to 77.2% (61/79) and exonuclease E415G mutation which is linked with piperaquine resistance from 88.5% (44/55) to 91.1% (72/79) as well in period 2017 - 2018 and 2019 - 2020, respectively. On the other hand, frequency of other 4 - aminoquinoline resistance mutations in *Pfprt* (72 - 76 CVIET) of 92.7% (51/55) and 91.1% (72/79), very few mutations were found in *Pfprt* (72 - 76 CVIDT), *Pfprt* (72 - 76 CVVET), *Pfprt* (72 - 76 WGIET), *Pfprt* F145I markers (< 5%). There was a

noteworthy point of high proportion of mutations in *Pfmdr1* (> 1.5 copy) conferring mefloquine resistance from 23.6% (13/55) in years 2017 - 2018, but only 1.3% (1/79) in years 2019 - 2020. Noteworthy, high proportion of double *Pfk13*-C580Y mutations plus *PfPlasmepsine2* amplification (resistance to DHA - PPQ) were 16.4% (9/55) and 77.2% (61/79), and *Pfk13*-C580Y mutations plus *Pfmdr1*CNV (resistance to ASMQ) were 21.8% (12/55) and 1.3% (1/79) in 2017 - 2018 and 2019 - 2020, respectively. There is no isolate with triple or quadruple mutations in this study.

Conclusions: The results showed presence high proportion of alone and double *Pfk13*-C580Y mutations and *PfPlasmepsine2* amplification/exonuclease E415G mutation associated with artemisinin and piperazine resistance. High proportion of mutations in *Pfmdr1* which is linked with mefloquine resistance need to be more strictly surveillance. Role of monitoring for molecular markers of ACT resistance is needed to complement clinical data to inform National treatment policy in Vietnam.

Key words: *Plasmodium falciparum*, molecular *Pfk13*, *Pfmdr1*, *Pfcr1*, *Pfplasmepsine2* markers.