

ĐỘT BIẾN GEN KHÁNG THUỐC PLASMEPSINE2/3, KELCH13 VỚI DIỄN TIẾN LÀM SẠCH KÝ SINH TRÙNG *Plasmodium falciparum* TẠI MỘT SỐ VÙNG BIÊN GIỚI CAMPUCHIA - VIỆT NAM - LÀO

Huỳnh Hồng Quang¹, Nguyễn Ngọc Dũng²,
Đặng Đức Trí³, Nguyễn Thị Minh Trinh¹.

Mục tiêu: xác định sự có mặt các đột biến gen K_{13} và *Plasmepsine 2/3*. Mô tả sự liên quan giữa đột biến K13 với tình trạng chậm làm sạch ký sinh trùng sau điều trị. **Đối tượng và phương pháp:** bệnh nhân từ 3 tuổi trở đến < 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, chưa dùng thuốc sốt rét. Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng không đối chứng có cải tiến theo dõi ngăn ngày (Fast - TES), phân tích phòng thí nghiệm phát hiện đột biến gen *Kelch13* và *Plasmepsine 2/3*. **Kết quả:** dữ liệu cho thấy tỷ lệ tồn tại ký sinh trùng sốt rét (KSTSR) ngày D_3 là 41,7% và 5,1% lần lượt tại Đăk Nông và Quảng Trị. Với các mẫu không còn tồn tại *P. falciparum* thể vô tính ngày D_3 tại Đăk Nông và Quảng Trị, các đột biến thu được chủ yếu thể hoang dại, K503N (Đăk Nông) và V520I (Quảng Trị), đây là các đột biến chưa xác định liên quan đến kháng thuốc và không có *plasmepsine2/3*. Ngược lại, các mẫu có tồn tại thể vô tính ở ngày D_3 , đột biến ghi nhận C580Y là 80% với *plasmepsine 2/3* tăng là 60% ở Đăk Nông và 50% C580Y ở Quảng Trị, không kèm theo số bản sao *plasmepsine2/3* tăng. **Kết luận:** đột biến C580Y và *plasmepsine2/3* chiếm ưu thế trong nhóm bệnh nhân chậm sạch *P. falciparum* trong máu sau điều trị, phối hợp hai chỉ điểm K_{13} và *plasmepsine2/3* chỉ ra kháng thuốc phối hợp dihydroartemisinin - piperaquine cao tại Đăk Nông.

Từ khóa: Kháng thuốc sốt rét, K_{13} propeller, *Plasmepsine 2/3*, *Plasmodium falciparum*.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tại các nước trong Tiểu vùng sông Mê Kông, ký sinh trùng *Plasmodium falciparum* kháng với artemisinin và các dẫn suất đang đe dọa đến Lộ trình loại trừ sốt rét^[6]. Đa hình đột biến gen *Kelch* hay K_{13} và *Plasmepsine 2/3* có liên quan lần lượt đến kháng artemisinin và piperaquine và kéo dài sống sót của thể vô tính *P. falciparum*^[1], nên có hiện tượng chậm làm sạch ký sinh trùng^[2] hay giảm sự nhạy cảm của KSTSR với thuốc ở giai đoạn tư dưỡng vào ngày thứ 3 (giờ thứ 72) trên bệnh nhân sốt rét *P. falciparum* được điều trị thuốc phối hợp ACTs. Các đột biến

này được xác định có mặt tại nhiều nước Đông Nam Á. Tuy nhiên, nhiều đột biến K13 tồn tại, song không phải luôn luôn tỷ lệ thuận với chậm làm sạch KSTSR sau điều trị^[3,4]. Xuất hiện kháng artemisinin và lan rộng dường như độc lập với nhau, nên cần làm rõ vai trò đột biến K_{13} và *Plasmepsine 2/3* là hai chỉ điểm phân tử có độ nhạy, độ đặc hiệu cao để đánh giá kháng artemisinin^[8]. 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. Đề tài này tiến hành tại 2 tỉnh Đăk Nông và Quảng Trị nhằm mục tiêu xác định sự có mặt các đột biến gen K_{13} và *Plasmepsine2/3* và mô tả sự liên quan giữa đột biến K_{13} với tình trạng chậm làm sạch ký sinh trùng sau điều trị.

¹Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn, ²Trung tâm Y tế huyện Xuân Lộc, Đồng Nai, ³Trung tâm Y tế huyện Thống Nhất, Đồng Nai.

Ngày nhận bài: 01/7/2019.

Ngày phản biện xong: 10/12/2019.

Ngày duyệt đăng: 10/01/2020.

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

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

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 tai $> 37,5^\circ\text{C}$, 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 phổi hợp. Nhiễm sốt rét phổi hợp *P. falciparum* với loài *Plasmodium* sp. khác, bệnh nhân đã dùng thuốc sốt rét, bệnh nhân trong độ tuổi sinh đẻ cần phải thử test thai âm tính.

Địa điểm và thời gian

+ Huyện Tuy Đức, Cư Jut (tỉnh Đắk Nông) và huyện Hướng Hóa, Đa Krông (tỉnh Quảng Trị).

+ Từ tháng 7/2017 - 7/2019.

Thiết kế nghiên cứu

+ Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng không đối chứng với đề cương của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO, 2009) có cải tiến lịch trình theo dõi ngăn ngày (Fast - TES) trên bệnh nhân;

+ Phân tích mẫu tại phòng thí nghiệm bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự phát hiện đột biến K^{13} và *Plasmepsine* 2/3 với cỡ mẫu thu thập dựa trên nghiên cứu *in vivo*.

Cỡ mẫu nghiên cứu: trong nghiên cứu này, nếu xem tỷ lệ thất bại của DHA - PPQ trong nghiên cứu trước đó khoảng 15%, nên 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 trong nghiên cứu $n = 50$.

Phương pháp 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} và *Plasmepsine* 2/3 kháng artemisinin và piperaquine.

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, 2015) và dựa vào kết quả phân tích đột biến gen K^{13} và *Plasmepsine* 2/3;

+ Thời gian làm sạch KSTSR (được định nghĩa là khoảng thời gian tính bằng giờ kể 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

Thông số	Đắk Nông		Quảng Trị	
	Số lượng	%	Số lượng	%
Số ký sinh trùng dương tính				
<i>P. falciparum</i>	57		47	
	48	84,2	39	82,9
<i>P. vivax</i>	9	15,8	8	17,1
Nhóm tuổi				
< 5	0	0	0	0
$\geq 5 - < 15$	1	1,8	2	4,3
≥ 15	56	98,2	45	95,7

Nhận xét: trong số bệnh nhân sốt rét dương tính, số ca đủ tiêu chuẩn đưa vào nghiên cứu *in vivo* (Fast - TES), số ca nhiễm *P. falciparum* đơn thuần ở điểm Đắk Nông và Quảng Trị lần lượt là 48 ca (84,2%) và 39 ca (82,9%) và số còn lại là nhiễm *P. vivax*. Phần lớn bệnh nhân sốt rét thuộc nhóm tuổi lao động (≥ 15) với 56 ca (98,2%) và 45 ca (95,7%) lần lượt ở Đắk Nông và Quảng Trị.

Bảng 2. Một số đặc điểm lâm sàng và tiền sử sốt bệnh nhân nghiên cứu

Đặc điểm nhóm nghiên cứu	Thời điểm bắt đầu nghiên cứu D ₀	
	Đăk Nông (n = 48)	Quảng Trị (n = 39)
Thân nhiệt và cân nặng Thân nhiệt trung bình (°C) Cân nặng trung bình (kg) Số ngày sốt trước điều trị	Mean + SD (Min - Max) 38,2 ± 0,5 (36,2 - 39,6) 47,8 ± 7,8 (27 - 55) 2,4 ± 1,6 (1 - 4)	Mean + SD (Min - Max) 38,3 ± 0,2 (38,0 - 38,5) 40,8 ± 8,9 (27,8 - 59) 2,5 ± 0,9 (1 - 3)
Số ca có sốt và tiền sử có sốt Nhiệt độ ở tai lúc D ₀ ≥ 37,5°C Tiền sử có sốt (trong 48 giờ)	38,2 ± 0,3 (36,9 - 39,7) 44 (91,7)	37,8 ± 0,2 (36,2 - 37,9) 36 (92,3)
Tình trạng lách Bệnh nhân lách lớn ≥ độ 2 Bệnh nhân không có lách lớn	3 (6,2) 45 (93,8)	2 (5,13) 37 (94,87)

Nhận xét: ở các nhóm bệnh nhân sốt rét nhiễm *P. falciparum* đủ tiêu chuẩn nghiên cứu có thân nhiệt trung bình không cao, trung bình (38,2 ± 0,5)°C và (38,3 ± 0,2)°C; 91,7% và 92,3% ca có sốt trước khi đến khám. Số ca có lách lớn ≥ độ 2 chỉ có 3 ca (6,2%) ở Đăk Nông, 2 ca (5,13%) ở Quảng Trị.

Đặc điểm về ký sinh trùng và huyết học trên bệnh nhân nghiên cứu

Bảng 3. Đặc điểm về KST *P. falciparum* và huyết học

Đặc điểm nhóm nghiên cứu	Thời điểm bắt đầu nghiên cứu D ₀	
	Đăk Nông (n = 48)	Quảng Trị (n = 39)
Mật độ KSTSR trung bình - MĐKST thể vô tính/μl - Số bệnh nhân có giao bào	10.285 (328 - 112.200) 4 (8,33%)	15.332 (422 - 98.797) 2 (5,13%)
Thông số huyết học (TB) - Nồng độ haemoglobine (g/dL) - Tỷ lệ haematocrite (%)	10,7 (9,2 - 10,2) 37,02 (39,4 - 40,15)	9,9 (9,3 - 10,8) 35,0 (33,6 - 36,3)

Nhận xét: mật độ trung bình KSTSR *P. falciparum* ở ngày D₀ lần lượt là 10.285/μl và 15.332/μl là đủ tiêu chuẩn đưa vào nghiên cứu. Nồng độ haemoglobin (Hb) và tỷ lệ haematocrit (Hct) nằm trong giới hạn bình thường, không có thiếu máu nặng.

Hiệu quả phác đồ trong điều trị bệnh nhân sốt rét *P. falciparum*

Phân loại hiệu quả phác đồ thuốc phối hợp

Bảng 4. Hiệu quả phác đồ đối với sốt rét do *P. falciparum* tại hai tỉnh

Thông số đánh giá hiệu lực thuốc		Đăk Nông		Quảng Trị	
		SL	%	SL	%
Hiệu lực	Thất bại điều trị sớm (ETF)	0	0	0	0
	Thất bại lâm sàng muộn (LCF)	4	9,5	0	0
	Thất bại ký sinh trùng muộn (LPF)	1	2,4	0	0
	Đáp ứng lâm sàng & KST đầy đủ (ACPR)	37	88,1	37	100
	Tổng số phân tích (per protocol)	42		37	
Mất ca theo dõi	Rút khỏi nghiên cứu (WITH)	2	4,17	0	0
	Mất theo dõi sau D7 (LFU)	4	8,33	2	5,13
	Tổng số nghiên cứu	48		39	

Nhận xét: số liệu cho thấy qua phân tích 42 và 37 ca đầy đủ liệu trình về hiệu lực chữa khỏi hay đáp ứng lâm sàng và ký sinh trùng đầy đủ (ACPR) là 88,1% và 100% lần lượt ở Đăk nông và Quảng Trị. Đặc biệt, cả 2 điểm không có thất bại điều trị sớm không có, nhưng ở điểm Đăk Nông có thất bại lâm sàng muộn là 4 ca (9,5%), thất bại ký sinh trùng muộn là 1 ca (2,4%). Ngoài ra, số ca rút khỏi nghiên cứu là 2 ca (8,33%) ở điểm Đăk Nông và 2 ca (5,13%) mất theo dõi ở điểm Quảng Trị và 4 ca (8,33%) ở Đăk Nông.

Bảng 5. Hiệu lực làm sạch ký sinh trùng *P. falciparum* và cắt sốt

Kết quả phân tích	Đăk Nông (n = 48)	Quảng Trị (n = 39)
Mật độ KSTSR/μl ngày D ₀	10.285 (328 - 112.200)	15.332 (422 - 98.797)
Thời gian TB sạch KST (median [IQR] - PCT)	48 (36 - 72) giờ	24 (12 - 36) giờ
Thân nhiệt ngày D ₀ (°C)	38,2 ± 0,5 (36,2 - 39,6)	38,3 ± 0,2 (38,0 - 38,5)
Thời gian TB cắt sốt (median [IQR] - FCT)	24 (18 - 36) giờ	12 (18 - 24) giờ

Nhận xét: thời gian làm sạch KSTSR trung bình tại hai điểm Đăk Nông và Quảng Trị lần lượt 48 giờ và 24 giờ, thời gian cắt sốt trung bình 24 giờ và 12 giờ.

Bảng 6. Hiệu lực điều trị và tồn tại thể vô tính sau điều trị phác đồ DHA - PPQ

Thông số phân tích	Đăk Nông (n = 48)		Quảng Trị (n = 39)	
	SL	%	SL	%
Số ca sạch KST vô tính sau điều trị phác đồ DHA - PPQ trước D ₃	28	58,3	37	94,9
Số ca còn tồn tại KST vô tính ngày D ₃ (hay giờ 72)	20	41,7	2	5,1

Nhận xét: tại điểm Đăk Nông và Quảng Trị cho thấy, tỷ lệ số ca sạch thể vô tính trong 3 ngày điều trị lên đến 58,3% và 94,9%. Bên cạnh đó, tỷ lệ bệnh nhân còn tồn tại thể vô tính lần lượt là 41,7% và 5,1%. Tỷ lệ tồn tại KSTR ngày D₃(+) hay sau 72 giờ như một chỉ điểm lâm sàng gián tiếp kháng thuốc tại điểm Đăk Nông. Trong khi đó, tại điểm Quảng Trị tỷ lệ này chỉ có 5,1% (< 10% theo ngưỡng của Tổ chức Y tế thế giới quy định).

Xác định đa hình các đột biến gen K₁₃ và Plasmeppsine 2/3

Bảng 7. Phân tích đột biến K13 propeller và Plasmeppsine 2/3 trên nhóm D₃(-)

Điểm nghiên cứu	Đột biến K13 trong mẫu có D3 (-)		Plasmeppsine 2/3 trong mẫu có D3 (-)	
	Số mẫu	Đột biến	Số mẫu	Đột biến
Đăk Nông (n = 48)	28 (58,3%)	Wild type, K503N	28 (58,3%)	Không có
Quảng Trị (n = 39)	37 (94,9%)	Wild type, V520I	37 (94,9%)	Không có

Nhận xét: trong số các phân lập không có tồn tại thể vô tính ngày D₃, phân tích đột biến gen K₁₃ và Plasmeppsine 2/3 tại Đăk Nông và Quảng Trị cho thấy chỉ có thể hoang dại (wild type) và đột biến không có nghĩa V520I. Đặc biệt, không có ca nào có số bản sao Plasmeppsine 2/3 trên quần thể *P. falciparum*.

Bảng 8. Phân tích đột biến K13 propeller và Plasmeppsine 2/3 trên nhóm có tồn tại D3 (+)

Điểm nghiên cứu	Đột biến K13 trong mẫu có D3 (+)		Plasmeppsine 2/3 trong mẫu có D3 (+)	
	Số mẫu	Đột biến	Số mẫu	Đột biến
Đăk Nông (n = 48)	20 (41,7%)	C580Y (80%), wild type (20%)	20 (41,7%)	Plasmeppsine 2/3 tăng (60%)
Quảng Trị (n = 39)	2 (5,1%)	C580Y (50%), P574L (50%)	2 (5,1%)	Không có

Nhận xét: trên các phân lập *P. falciparum* ở bệnh nhân có tồn tại KST thể vô tính ngày D₃(+) tại điểm Đăk Nông, xuất hiện các đột biến C580Y (80%) và số còn lại là đột biến hoang dại (WT), đặc biệt phân tích còn cho

thấy số ca có tăng số bản sao Plasmeppsine 2/3 (60%) như một chỉ điểm kháng piperazine hiện nay. Trong khi đó, tại điểm Quảng Trị, có 50% là loại đột biến C580Y và 50% là đột biến P574L và không có tăng số bản sao của Plasmeppsine 2/3.

Bảng 9. So sánh loại đột biến với phân loại các đột biến K₁₃ theo TCYTTG

Điểm nghiên cứu	Tỷ lệ từng loại đột biến trên ca KST(+) ngày D ₃	So sánh theo phân loại TCYTTG (WHO, 2018)	
		Đột biến K ₁₃	Phân loại
Đăk Nông (n = 20)	C580Y (80%) wild type (20%)	P441L	Liên quan ⁽¹⁾
		G449A	Liên quan ⁽¹⁾
		C469F	Liên quan ⁽¹⁾
		A481V	Liên quan ⁽¹⁾
		V568G	Liên quan ⁽¹⁾
		P527H	Liên quan ⁽¹⁾
		P574L	Liên quan ⁽¹⁾
		A675V	Liên quan ⁽¹⁾
		G538V	Liên quan ⁽¹⁾
		N537I	Liên quan ⁽¹⁾
		F637I	Liên quan ⁽¹⁾
		Y493H	Xác định ⁽²⁾
		R539T	Xác định ⁽²⁾
Quảng Trị (n = 2)	C580Y (50%) P574L(50%)	I543T	Xác định ⁽²⁾
		P553L	Xác định ⁽²⁾
		R561H	Xác định ⁽²⁾
		C580Y	Xác định ⁽²⁾
		N458Y	Xác định ⁽²⁾
		F446I	Xác định ⁽²⁾
		M476I	Xác định ⁽²⁾

(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 Đăk Nông, có loại đột biến C580Y (80%) phù hợp với phân loại Tổ chức Y tế thế giới (WHO, 2018) xác định kháng và đột biến hoang dại không có ý nghĩa. Trong khi đó, tại điểm Quảng Trị, trong 2 ca còn tồn tại KST ngày D₃ thì có một ca (50%) có đột biến C580Y xác định kháng và một ca (50%) là đột biến P574L (có liên quan) kháng thuốc.

BÀN LUẬN

Đặc điểm chung nhóm bệnh nhân sốt rét dương tính

Trong số bệnh nhân sốt rét có KSTR dương tính hoặc *P. falciparum* hoặc *P. vivax*, số ca đủ tiêu chuẩn đưa vào nghiên cứu in vivo (Fast - TES), số ca nhiễm *P. falciparum* đơn thuần ở điểm Đăk Nông và Quảng Trị lần lượt là 48 ca (84,2%) và 39 ca (82,9%), số còn lại là nhiễm *P. vivax*. Phần lớn bệnh nhân sốt rét thuộc nhóm tuổi lao động (≥ 15) với 56 ca (98,2%) và 45 ca (95,7%) lần lượt ở Đăk Nông và Quảng Trị. Số mẫu tại hai điểm 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, các huyện trọng điểm thuộc dự án Sáng kiến Ngăn chặn sốt rét kháng artemisinin đã triển khai hoạt động theo dõi KSTSR ngày D₃ sau điều trị tại tuyến dưới, một số trạm y tế xã đã giữ bệnh nhân lại không chuyển lên tuyến trên, một số dự án triển khai nghiên cứu đồng thời trên một huyện, nên nhiều hoạt động can thiệp, phần nào làm giảm số ca đưa vào nghiên cứu.

Ở các nhóm bệnh nhân sốt rét nhiễm *P. falciparum* đủ tiêu chuẩn nghiên cứu có thân nhiệt trung bình không cao, lần trung bình (38,2 ± 0,5)0C và (38,3 ± 0,2)0C tại Đắk Nông và Quảng Trị; 91,7% và 92,3% ca có sốt trong vòng 48 giờ trước khi đến khám. 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 KSTSR *P. falciparum* ở ngày D0 lần lượt là 10.285/○I và 15.332/○I là đủ tiêu chuẩn đưa vào nghiên cứu. Nồng độ haemoglobin (Hb) và tỷ lệ haematocrit (Hct) nằm trong giới hạn bình thường, không có thiếu máu nặng. Mật độ thể vô tính trong máu tại điểm Gia Lai và Đắk Nông lần lượt 15.7567/μL và 22.500/ μL 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 và ở Campuchia hay Myanmar cho rằng sự tồn tại KSTSR ngày D3 sau điều trị artemisinin hoặc thuốc ACTs có liên quan đến mật độ cao (> 100.000/μL) trong máu ngoại vi ngày D0 trước khi điều trị.

Hiệu lực phác đồ và diễn tiến làm sạch KST thể vô tính sau điều trị DHA - PPQ

Số liệu cho thấy qua phân tích 42 và 37 ca *P. falciparum* đầy đủ liệu trình về hiệu lực chữa khỏi hay đáp ứng lâm sàng và ký sinh trùng đầy đủ (ACPR) là 88,1% và 100% lần lượt ở Đắk nông và Quảng Trị. Đặc biệt, ở 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 ký sinh trùng muộn là 1 ca (2,4%). Ngoài ra, số ca rút khỏi nghiên cứu là 2 ca (8,33%) ở điểm Đắk Nông và 2 ca (5,13%) mất theo dõi ở điểm Quảng Trị và 4 ca (8,33%) ở Đắk Nông. Thời gian làm sạch KSTSR trung bình tại hai điểm Đắk Nông và Quảng Trị lần lượt 48 giờ và 24 giờ, thời gian cắt sốt trung bình là 24 giờ và 12 giờ.

Tỷ lệ số ca sạch thể vô tính trong 3 ngày điều trị lên đến 58,3% và 94,9% lần lượt tại Đắk Nông và Quảng Trị.

Song bên cạnh đó, nhiều bệnh nhân còn tồn tại thể vô tính ngày D₃ hay sau 72 giờ lần lượt 41,7% (Đắk Nông) và 5,1% (Quảng Trị). Sự tồn tại KSTSR ngày D₃(+) trên 10% được TCYTTG coi như một chỉ điểm lâm sàng gián tiếp kháng thuốc 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 hay diệt sạch 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 ký 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 D₃ 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%, cùng với sự tồn tại KSTSR ngày D₃ 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 (D₃ 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 D₃(+) 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 ra toàn khu vực tiểu vùng sông Mê Kông.

Đột biến gen K13 propeller và *Plasmepsine2/3* tại các điểm

Tất cả ca bệnh *P. falciparum* đưa vào nghiên cứu đều lấy giấy thăm phân tích đột biến gen K₁₃ propeller (chỉ điểm kháng thành phần dihydroartemisinin - DHA) và *plasmepsine2/3* (chỉ điểm kháng thành phần piperaquine - PPQ), kể cả nhóm các ca còn tồn tại và không tồn tại thể

vô tính từ ngày D₃ trở đi. Trong số các phân lập không có tồn tại thể vô tính ngày D₃ (sau 72 giờ), phân tích đột biến gen K₁₃ propeller và *Plasmepsine 2/3* tại Đắk Nông và Quảng Trị cho thấy, chỉ có thể hoang dại (wild type) và đột biến không có nghĩa V520I, theo phân loại đột biến của WHO 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 *Plasmepsine 2/3* trên quần thể *P. falciparum* tăng lên như một chỉ điểm kháng thành phần thuốc thứ hai piperazine.

Ngược lại, trên các phân lập *P. falciparum* ở các bệnh nhân có tồn tại KST thể vô tính ngày D₃(+) tại điểm Đắk Nông, cho thấy xuất hiện các đột biến C580Y (80%) và 20% số ca còn lại là đột biến hoang dại (wild type - WT), loại đột biến C580Y phù hợp với phân loại WHO, 2018 xác định kháng và đột biến hoang dại không có ý nghĩa. Đặc biệt, phân tích còn cho thấy số ca có tăng số bản sao *Plasmepsine 2/3* (60%) như một chỉ điểm kháng piperazine hiện nay, tổng hợp lại số phân lập có chỉ điểm kháng cả hai thành phần DHA và PPQ lên đến 60%, nên nguy cơ thất bại kháng là rất cao. Trong khi đó, tại điểm Quảng Trị, trong 2 ca còn tồn tại KST ngày D₃ 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, đồng thời không có tăng số bản sao của *Plasmepsine 2/3* như chỉ điểm kháng PPQ.

Ở 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 thể 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. Số liệu về các đột biến C580Y tại huyện Hướng Hóa, tỉnh Quảng Trị giáp với các tỉnh Salavanh và Savanakheth của Lào, trong khi đó Salavanh có đột biến kháng C580Y và Savanakheth thì không có đột biến, nên các số liệu phân tích ở nghiên cứu này cũng phù hợp với phân tích đột biến K₁₃ các điểm sentinel tại Lào. Nhìn chung, các loại đột biến ở Đắk Nông và Quảng Trị có giống nhau, song có khác loại đột biến tại tỉnh Quảng Nam và Ninh Thuận, là hai tỉnh ven biển miền Trung đã từng báo cáo trước đây trên y văn.

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 D₃(+), 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 K₁₃ 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 (điểm Phú Thiện) đến 26 km (điểm 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 các 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 lỗ" trên bản đồ kháng thuốc, không như hình ảnh "vết đầu loang" ở các điểm kháng thuốc quốc gia Thái Lan, Campuchia, Myanmar.

Với các số liệu phân tích về thời gian làm sạch ký sinh trùng ở thời điểm ngày D₃ hay 72 giờ và đột biến gen K₁₃ 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 D₃ hay nhóm có D₃(-) thì đồng thời không có đột biến cả K₁₃ và *plasmepsine 2/3*, ngược lại trên nhóm bệnh nhân có biểu hiện chậm làm sạch ký sinh trùng *P. falciparum* ở thời điểm D₃ dương tính thì có đột biến gen đa hình K₁₃ loại C580Y (80%) đơn thuần hoặc đồng thời cả C580Y và *plasmepsine 2/3* (60%). Điều này cho thấy, có mối liên quan thuận giữa nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng *P. falciparum* có đột biến gen K₁₃ và, hoặc cả *plasmepsine 2/3* 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 K₁₃ xác định kháng thuốc gồm C580Y, R539T và Y493H và một loại đột biến được xem có liên quan kháng 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 phân lập có chứa *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 bằng chứng ở trên cho thấy, sự làm 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.

KẾT LUẬN

Hiệu lực phác đồ DHA - PPQ sau 3 ngày điều trị cho tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và ký sinh trùng đầy đủ là 88,1%

(ở Đắk Nông) và 100% (ở Quảng Trị), song tỷ lệ còn tồn tại KSTSR dương tính ngày D₃ là 41,7% và 5,1% lần lượt tại điểm Đắk Nông và Quảng Trị.

Ở các bệnh nhân có biểu hiện giảm nhạy hay chậm làm sạch ký sinh trùng với thuốc DHA - PPQ có tồn tại thể vô tính ngày D₃(+) đồng thời có đột biến xác định kháng C580Y (80%) và tăng *plasmepsine 2/3* (60%) ở Đắk Nông và C580Y là 50% ở Quảng Trị.

Đột biến gen kháng thuốc K₁₃ loại C580Y và *Plasmepsine 2/3* có liên quan đến diễn tiến làm sạch ký sinh trùng thể vô tính chậm hơn và khả năng kháng hai thành phần thuốc DHA-PPQ đồng thời cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Liên Hạnh, Huỳnh Hồng Quang (2017). Nghiên cứu đột biến gen K13 và tình trạng chậm làm sạch ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* sau điều trị tại một số điểm miền Trung-Tây Nguyên (2014-2016). *Tạp chí Phòng chống Bệnh sốt rét và Các bệnh ký sinh trùng, Số đặc biệt (96)/2017*, ISSN 0868-3735, trang 79-85.
2. 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 nghiên cứu khoa học, Báo cáo tại Hội nghị khoa học toàn quốc chuyên ngành Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng năm 2015*, NXB Y học, Mã số sách chuẩn quốc tế ISBN: 978-604-66-0950-6, trang 49-57.
3. Huỳnh Hồng Quang, Nguyễn Văn Chương (2014). Hiện tượng kháng có liên quan đến tiến trình chậm làm sạch ký sinh trùng *Plasmodium falciparum* sau điều trị thuốc dihydroartemisinin-piperaquine tại một số vùng sốt rét lưu hành có giao lưu biên giới Campuchia, 2013. *Y học thành phố Hồ Chí Minh*, tập 18, phụ bản số 6 năm 2014, trang 247-252.
4. Tạ Thị Tĩnh, Bùi Quang Phúc, Huỳnh Hồng Quang, Vũ Văn Thái, Nguyễn Văn Hường, Lê Thành Đồng, Phùng Đức Thuận, Nông Thị Tiến, Ngô Việt Thành, Nguyễn Mạnh Hùng (2013). Hiệu lực của một số thuốc sốt rét có thành phần là dẫn chất của artemisinin (ACTs) trong điều trị sốt rét do *Plasmodium falciparum* chưa biến chứng tại một số vùng sốt rét lưu hành giai đoạn 2005-2012. *Tạp chí Phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng*, ISSN 0868-3735, số 6-2013, trang 90-96.
5. Nguyễn Thị Minh Trinh, Huỳnh Hồng Quang, Trần Bình Trọng (2017). Xác định các đột biến điểm trên vùng gen mã hóa cho protein kelch (K13) của *Plasmodium falciparum* và sự liên quan đến tính kháng artemisinin tại Gia Lai và Ninh Thuận. *Tạp chí Phòng chống Bệnh sốt rét và Các bệnh ký sinh trùng, Số đặc biệt (96)/2017*, ISSN 0868-3735, trang 228-235.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Rie Isozumi HU, Isao Kimata, Yoshio Ichinose JL et al., (2015). Novel mutations in K₁₃ propeller gene of artemisinin-resistant *P. falciparum*. *Emerging infectious diseases*, 21(3):490-492.
10. WHO, (2017). Status report on artemisinin and ACT resistance, april 2017.

**ANTIMALARIA RESISTANCE KELCH 13 AND PLASMEPSINE 2/3
MUTATION WITH *Plasmodium falciparum* PARASITE
CLEARANCE PROGRESS IN SOME BORDER ZONES
OF CAMBODIA - VIETNAM - LAOS**

Summary

Objectives: Identify the presence of K₁₃ and Plasmepsine 2/3 gene mutations and describe the relationship between the K₁₃ mutation and the delayed parasite clearance after treatment. *Subjects and methods:* A study design of non-randomized controlled study design for the first 7 days (Fast - TES), and the Kelch₁₃ and plasmepsine2/3 mutant analysis by molecular laboratory techniques. *Results:* The data showed that proportion of positive parasitemia at D₃ is 41.7% and 5.1% in Daknong and Quangtri, respectively. Mutations observed in the patients had no positive parasitemia at D₃ are K503N, wild type (Daknong), V520I, wild type (Quangtri), these are

not correlated to artemisinin resistance, and without elevated copy number of plasmepsine2/3. Vice - versa, in the patients had day 3 positive post - treatment with recorded C580Y mutant of 60% with elevated plasmepsine 2/3 copy numbers (Daknong) and C580Y of 50% (Quangtri) without positive plasmepsine2/3. *Conclusions:* The C580Y mutant and increased plasmepsine2/3 copy numbers are prominent in delayed asexual *P. falciparum* parasite clearance group at post - treatment, and combined K₁₃ - propeller mutant and plasmepsine 2/3 indicated highly resistant to dihydroartemisinin - piperaquine combination.

Key words: Antimalarial drug resistance, K13 propeller, Plasmepsine2/3, *Plasmodium falciparum*.