

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO **BỘ Y TẾ**
VIỆN SÓT RÉT – KÝ SINH TRÙNG – CÔN TRÙNG TRUNG ƯƠNG

**NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM DỊCH TỄ
HỌC PHÂN TỬ GEN K13 VÀ ĐÁP ỨNG CỦA**
Plasmodium falciparum **VỚI**
**DIHYDROARTEMISININ-PIPERAQUIN
PHOSPHATE Ở MỘT SỐ VÙNG SÓT RÉT LƯU**
HÀNH TẠI VIỆT NAM

Chuyên ngành: Dịch tễ học

Mã số: 972.01.17

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

Hà Nội, 2022

CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI
VIỆN SÓT RẾT – KÝ SINH TRÙNG – CÔN TRÙNG TRUNG ƯƠNG

Cán bộ hướng dẫn khoa học:

1. Họ tên cán bộ hướng dẫn 1: PGS. TS. Bùi Quang Phúc
2. Họ tên cán bộ hướng dẫn 2: TS. Trương Văn Hạnh

Phản biện 1:

Tên đơn vị công tác.....

Phản biện 2:

Tên đơn vị công tác.....

Phản biện 3:

Tên đơn vị công tác.....

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Viện,
Hội đồng họp tại Viện Sốt rét – KST – CTTU vào hồi giờ
ngày năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia
- Thư viện Viện Sốt rét – Ký sinh trùng – Côn trùng Trung ương.

NHỮNG CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ

1. Đỗ Mạnh Hà, Trương Văn Hạnh, Bùi Quang Phúc và cs. Tần suất đột biến gen K13 liên quan đến kháng artemisinin của quần thể *P. falciparum* tại một số vùng sốt rét lưu hành nặng ở Việt Nam năm 2016-2018. *Tạp chí phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng*. Số 3 (129)/2022. Trang 36-43.
2. Đỗ Mạnh Hà, Trương Văn Hạnh, Bùi Quang Phúc và cs. . Hiệu lực điều trị của Dyhydroartemisinin – piperaquin phosphat trên bệnh nhân nhiễm *Plasmodium falciparum* chưa biến chứng giai đoạn 2016-2018. *Tạp chí phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng*. Số 3 (129)/2022. Trang 21-29.
3. Đỗ Mạnh Hà, Trương Văn Hạnh, Bùi Quang Phúc, Huỳnh Quốc Phòng và cs. Hiệu lực điều trị của Dyhydroartemisinin – piperaquin phosphat trên bệnh nhân nhiễm *Plasmodium falciparum* chưa biến chứng tại Bình Phước năm 2017. *Tạp chí phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng*. Số 3 (129)/2022. Trang 63-69.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Artemisinin và dẫn chất là thành phần quan trọng trong phối hợp thuốc ACTs để điều trị sốt rét *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) kháng thuốc [28]. Tổ chức Y tế thế giới (WHO) đã khuyến cáo sử dụng các loại thuốc phối hợp (ACTs) tại nhiều nước, kể cả Việt Nam. Ở Việt Nam phối hợp dihydroartemisinin- piperquin (DHA-PPQ) được lựa chọn đưa vào điều trị sốt rét do *P. falciparum*, giai đoạn từ 2005-2010 tỷ lệ đáp ứng lâm sàng đầy đủ (ACPR) từ 97,8% đến 100%, nhưng sau đó ký sinh trùng ngày D3 đã tăng lên nhanh chóng, năm 2012 là 30,6%, năm 2014 là 36% (Bình Phước) [16], Gia Lai 24,1% (2015) [12], Khánh Hòa 17,4% D3 (2014) [17].

Gần đây, một số đột biến trong gen K13 đã được xác định như các chỉ điểm phân tử liên quan chặt chẽ kháng thuốc artemisinin của *P. falciparum* [40].

Với ý tưởng kết để đánh giá tình hình nhạy-kháng thuốc trên *in vivo*, *in vitro* và các chỉ điểm phân tử K13 liên quan kháng trên quần thể *P. falciparum*, đề tài luận án “**Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ học phân tử gen K13 và đáp ứng của *Plasmodium falciparum* với dihydroartemisinin-piperquin phosphat ở một số vùng sốt rét lưu hành tại Việt Nam**” được thực hiện nhằm các mục tiêu sau:

Mục tiêu nghiên cứu:

1. Mô tả một số đặc điểm dịch tễ học phân tử đột biến gen K13 của *Plasmodium falciparum* tại 5 tỉnh Bình Phước, Gia Lai, Khánh Hòa, Ninh Thuận, Quảng Trị có sốt rét lưu hành nặng năm 2016 - 2018;

2. Đánh giá đáp ứng của ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* với thuốc dihydroartemisinin - piperquin phosphat tại các điểm nghiên cứu.

3. Đánh giá nhạy cảm của ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* với thuốc sốt rét bằng kỹ thuật *in vitro* tại Gia Lai.

TÍNH KHOA HỌC, TÍNH MỚI VÀ TÍNH THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

- Trong nghiên cứu này chúng tôi đã phát hiện được 8 điểm đột biến gen K13 trong đó có 2 điểm đột biến xác định kháng artemisinin (C580Y và P553L), một điểm liên quan (C496F) và 5 điểm đột biến chưa xác định được vai trò (H384Q, G638E, G639D, Y511H, K503N) với tỷ lệ thấp có những điểm lần đầu tiên phát hiện tại Việt Nam. Nghiên cứu này đã phát hiện được 3 tỉnh xác định kháng ART là Bình Phước, Gia Lai, Khánh Hòa (có D3 > 10% và K13 ở vị trí xác định kháng ART > 5%) và 1 tỉnh cần thay thuốc là Bình Phước (ACPR dưới 90%). Hiện tại cả 3 tỉnh này đã được thay thuốc DHA-PPQ bằng Pyramax.

- Việc xác định sự phân bố các kiểu gen đột biến K13 ở các tỉnh có sốt rét lưu hành nặng là một khía cạnh mới trong kế hoạch ngăn chặn sự lan rộng của quần thể *P. falciparum* kháng artemisinin và được xem như là một vấn đề y tế ưu tiên toàn cầu, bởi kháng artemisinin đang là mối đe dọa chính lên các thành quả đạt được từ kết quả PCSR trên toàn cầu cũng như ở Việt Nam;

- Đây là một trong số rất ít nghiên cứu về sự phân bố đột biến gen K13 tại nhiều vùng sốt rét lưu hành nặng kết hợp với theo dõi hiệu lực của thuốc trên *invivo* và nuôi cấy thử độ nhạy cảm của thuốc trên *invitro*. Nghiên cứu này đã phát hiện được 3 tỉnh xác định kháng ART là Bình Phước, Gia Lai, Khánh Hòa (có D3 > 10% và K13 ở vị trí xác định kháng ART > 5%) và 1 tỉnh cần thay thuốc là Bình Phước (ACPR dưới 90%).

CẤU TRÚC CỦA LUẬN ÁN

- Luận án dày 135 trang chia ra thành các phần sau: Đặt vấn đề 2 trang; Tổng quan: 32 trang; Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 28 trang; Kết quả nghiên cứu 36 trang; Bàn luận: 34 trang; Kết luận 2 trang; Kiến nghị 1 trang. Luận án có 23 hình, 42 bảng số liệu và 114 tài liệu tham khảo, trong đó có 56 tài liệu trong 5 năm gần đây.

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tình hình bệnh sốt rét trên thế giới và Việt Nam

Theo báo cáo của Tổ chức Y tế Thế giới, ước tính năm 2019 có khoảng 229 triệu trường hợp mắc bệnh sốt rét ở 87 quốc gia có sốt rét lưu hành, giảm 3,78% so với năm 2000 (229/238 triệu). Tỷ lệ mắc bệnh sốt rét trên 1.000 dân số nguy cơ giảm từ 80 (năm 2000) xuống 58 (năm 2015) và 57 (năm 2019). Từ năm 2000 đến năm 2015, tỷ lệ mắc bệnh sốt rét toàn cầu đã giảm 27,00% và từ năm 2015 đến năm 2019 số mắc giảm dưới 2,00%, cho thấy tốc độ giảm đã chậm hơn sau năm 2015 [107], [108].

Ở Việt Nam theo số liệu chương trình phòng chống sốt rét năm 2015 cả nước có 9331 bệnh nhân trong đó tập chung chủ yếu ở ven biển Miền Trung, Tây Nguyên, Đông Nam Bộ [28].

1.2. Các thuật ngữ và định nghĩa liên quan tới kháng thuốc

Đến nay TCYTTG đã chính thức công nhận kháng thuốc đối với 3 trong số 5 loại KSTSR gây bệnh cho người. Đó là *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, trong đó đáng kể nhất là *P. falciparum* kháng đa thuốc và là loài duy nhất đã giảm nhạy cảm và kháng với artemisinin và dẫn chất. Tuy nhiên, trên thực hành lâm sàng vẫn còn nhầm lẫn giữa thuật ngữ “Kháng thuốc” và “Thất bại điều trị” [106].

Năm 2018, định nghĩa kháng một phần artemisinin (artemisinin partial resistance) được đưa ra bởi TCYTTG khi có sự chậm làm sạch KSTSR, do kháng một phần của artemisinin trên thể nhân.

1.3. Đột biến gen K13

Gen K13 được xem là một chỉ điểm di truyền liên quan đến KSTSR *P. falciparum* kháng artemisinin và dẫn xuất. Về cấu trúc, gen K13 là một đoạn exon mã hóa protein Kelch 13 với chiều dài 726 axit amin

Cho đến nay Báo cáo của WHO (2018) [105] đã khẳng định: 9 vị trí đột biến gen K13 có giá trị xác định kháng artemisinin và 11 vị trí đột biến có giá trị xác định có liên quan đến kháng artemisinin (Bảng 1.1)

Bảng 1.1. Các vị trí đột biến gen K13 liên quan đến kháng artemisinin.

Các chỉ điểm K13 kháng xác định		Các chỉ điểm K13 ứng viên/ liên quan	
F446I	P553L	P441L	G538V
N458Y	R561H	G449A	V568G
M476I	C580Y	C469F	P574L
Y493H		A481V	F673I
R539T		P527H	A675V
I543T		N537I	

1.4. Tình hình ký sinh trùng *Plasmodium falciparum* kháng thuốc sốt rét

1.4.1. Trên thế giới

Tình hình KSTSR kháng thuốc diễn biến rất phức tạp đã có 73/95 quốc gia và vùng lãnh thổ thông báo có *P. falciparum* kháng thuốc. Tần số, mức độ *P. falciparum* kháng thuốc cao nhất ở vùng có dịch tễ phức tạp như Thái Lan, Campuchia, Việt Nam [59]. Một số nước Trung Mỹ, Haiti [93].

1.4.2. Tại Việt Nam

Đến năm 2009 đã xuất hiện ca thất bại sớm đầu tiên của *P. falciparum* với Arterakin tại xã Đăk Nhau, huyện Bù Đăng, tỉnh Bình Phước và sau đó tại huyện Phú Thiện, Gia Lai năm 2010 [Error! Reference source not found.]. Giám sát thường xuyên hiệu lực điều trị của DHA-PPQ đã phát hiện thêm nhiều điểm có tỷ lệ thể vô tính ngày $D_3 \geq 10\%$ là Gia Lai (2010), Đăk Nông và Quảng Nam (2012) [4], [15].

1.5. Hiệu lực điều trị, tính dung nạp và độ an toàn của phối hợp DHA-PPQ

Nhiều nghiên cứu của Tạ Thị Tĩnh và cộng sự (2011) [29], Bùi Quang Phúc và cộng sự (2013-2015) [15], [16] và Trần Tịnh Hiền và cộng sự (2014) tại Bù Đăng (Bình Phước) và Huỳnh Hồng Quang và cộng sự (2014-2017) [21], [22], [23] tại Tuy Đức (Đăk Nông), Phú Thiện (Gia Lai), Nam Trà My (Quảng Nam) với tỷ lệ ACPR từ 91,2-100%, song tỷ lệ tồn tại KST thể vô tính ngày D_3 dao động 14,7 - 44% .

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Mô tả một số đặc điểm dịch tễ học phân tử đột biến gen K13 của *Plasmodium falciparum* tại 5 tỉnh Bình Phước, Gia Lai, Khánh Hòa, Ninh Thuận, Quảng Trị có sốt rét lưu hành nặng năm 2016 - 2018

2.1.1. Đối tượng, thời gian, địa điểm nghiên cứu

2.1.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Mẫu máu giấy thấm được thu thập từ bệnh nhân sốt rét do *P. falciparum* đơn thuần chưa biến chứng

Tiêu chuẩn chọn bệnh

- + Nhiễm đơn thuần *P. falciparum*; Không phân biệt độ tuổi, giới tính, dân tộc, tự nguyện tham gia vào nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ

- + KSTSR *P. falciparum* nhiễm phối hợp với các loài khác

2.1.1.2. Thời gian

Thời gian nghiên cứu: Từ năm 2016 đến năm 2018

2.1.1.3. Địa điểm nghiên cứu:

Nghiên cứu tại thực địa: Được tiến hành tại 5 tỉnh gồm: Bình Phước, Gia Lai, Khánh Hòa, Ninh Thuận và Quảng Trị

Nghiên cứu phân tích mẫu tại phòng thí nghiệm: Tại phòng thí nghiệm sinh học phân tử, Khoa sinh học phân tử, Viện Sốt rét - KST – CTTU.

2.1.2. Phương pháp nghiên cứu

2.1.2.1. Thiết kế phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả có phân tích đột biến gen K13 của *P. falciparum* tại phòng thí nghiệm.

2.1.2.2. Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu

- Cỡ mẫu: Được tính toán theo công thức sau:

$$n = Z_{1-\alpha/2}^2 \frac{p(1-p)}{d^2}$$

Thay các giá trị vào công thức trên, tính được cỡ mẫu $n = 288$ mẫu tại 5 tỉnh.

- Phương pháp chọn mẫu: Mẫu được thu thập không ngẫu nhiên, từ các bệnh nhân sốt rét *P. falciparum* đơn thuần

2.1.2.3. Nội dung nghiên cứu

- Thu thập mẫu: Thu thập các mẫu máu của bệnh nhân nhiễm

KST *P. falciparum* trên giấy thấm Whatman 3MM.

- Thực hiện phân tích giải trình tự gen K13 bằng phương pháp Sanger.

- Phân tích kết quả xác định các vị trí điểm đột biến.

2.1.2.4. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:

- Thu thập mẫu máu bệnh nhân sốt rét nhiễm *P. falciparum* vào giấy thấm Whatman 3MM [5].

- Tách ADN bằng bộ kit.

- Phản ứng PCR nhân bản gen K13 với trình tự mồi được thiết kế bởi Ariey và cs 2014 và giải trình tự gen K13 theo phương pháp Sanger [40].

2.1.2.5. Các chỉ số đánh giá:

- Tỷ lệ, tần xuất, vị trí đột biến gen, theo nhóm tuổi, theo giới tại các điểm nghiên cứu.

- So sánh tỷ lệ đột biến, kiểu đột biến giữa các điểm nghiên cứu

2.1.2.6. Phương pháp phân tích và xử lý số liệu:

- Đọc và phân tích trình tự gen K13 bằng phần mềm tin sinh học Bioedit V.7.0.5.3.

2.2. Đánh giá đáp ứng của ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* với thuốc dihydroartemisinin - piperquin phosphate tại các điểm nghiên cứu

2.2.1. Đối tượng, thời gian địa điểm nghiên cứu

2.2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Các bệnh nhân được chẩn đoán là sốt rét do *P. falciparum* chưa biến chứng có đủ các tiêu chuẩn tuyển chọn được đưa vào đối tượng nghiên cứu thử nghiệm *in vivo* [101].

- Thuốc nghiên cứu: Thuốc dihydroartemisinin – piperquin.

2.2.1.2. Địa điểm nghiên cứu

Được tiến hành tại 5 tỉnh gồm: Bình Phước, Gia Lai, Khánh Hòa, Ninh Thuận và Quảng Trị

2.2.1.3. Thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu thực hiện từ năm 2016 đến năm 2018

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1 Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu thử nghiệm lâm sàng không ngẫu nhiên, không đối chứng.

2.2.2.2. Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu

- Cỡ mẫu cho nghiên cứu: Cỡ mẫu tính được dựa vào bảng xác định cỡ mẫu của WHO, 2009 [101].

Cơ mẫu chung là 157 bệnh nhân.

2.2.2.3. Nội dung nghiên cứu

- Sàng lọc đối tượng đủ điều kiện để đưa vào nghiên cứu
- Nghiên cứu triệu chứng lâm sàng
- Nghiên cứu cận lâm sàng

2.2.2.5. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- Kỹ thuật lấy lam máu, lam máu giọt dày và giọt mỏng.
- Kỹ thuật đếm mật độ KSTSR:
- Quy trình kỹ thuật và theo dõi bệnh nhân
- Kỹ thuật sinh học phân tử phân biệt tái phát, tái nhiễm 2.2.2.6.

Các chỉ số, biến số trong nghiên cứu

- Thời gian sạch KSTSR;
- Thời gian hết/ cắt sốt;
- Phân loại kết quả điều trị theo WHO (2009).

2.2.2.6. Nhập và phân tích xử lý số liệu

- Số liệu nghiên cứu thu thập được tổng hợp, phân tích và xử lý theo phần mềm *in vivo* phiên bản 7.1 Pascal Ringwald, WHO (2009) [101].

2.3. Đánh giá nhạy cảm của ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* với thuốc sốt rét bằng kỹ thuật *in vitro* tại Gia Lai

2.3.1. Đối tượng, thời gian địa điểm nghiên cứu

2.3.1.1. Đối tượng nghiên cứu

- Các bệnh nhân được chẩn đoán là sốt rét do *P. falciparum* chưa biến chứng có đủ các tiêu chuẩn tuyển chọn được đưa vào đối tượng nghiên cứu *in vitro* [102].
- Thuốc nghiên cứu: Bột Artesunat; dihydroartemisinin; piperquin phosphat; chloroquin phosphat.

2.3.1.2. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu tại huyện KrongPa, tỉnh Gia Lai.

2.3.1.3. Thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu thực hiện từ năm 2016 đến 2018

2.3.2. Phương pháp nghiên cứu

2.3.2.1 Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu phân tích *in vitro* đánh giá hiệu lực thuốc tại labo thực địa.

2.3.2.2. Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu

- Cỡ mẫu tối thiểu là 30 bệnh nhân.

2.3.2.3. Nội dung nghiên cứu

Nuôi cấy KSTSR *P. falciparum* theo quy trình thử thuốc 48h tại thực địa

2.3.2.4. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

Xác định độ nhạy cảm của KST SR với thuốc sốt rét (*in vitro*) [57],[92],[98]

2.3.2.5. Các biến số chỉ số trong nghiên cứu

- Xác định nồng độ thuốc ức chế 50%, sự phát triển của KSTSR.

2.3.2.6. Nhập và phân tích xử lý số liệu

- Xác định nồng độ ức chế 50%(IC₅₀), sự phát triển của KST sẽ được tính toán bằng cách sử dụng phần mềm phân tích và phương pháp báo cáo (IVART) được phát triển trực tuyến bởi WWARN.

2.4. Phương pháp khống chế nhiễu và hạn chế sai số

- Trước khi tiến hành nghiên cứu, nghiên cứu viên chính phải nhắc lại và tập huấn lại trình tự các khâu tiến hành nghiên cứu;
- Chọn đối tượng nghiên cứu chặt chẽ theo tiêu chí nghiên cứu;
- Trong quá trình phân tích số liệu và viết báo cáo: Giám sát chặt chẽ việc thu thập số liệu tại thực địa, làm sạch số liệu trên các bảng câu hỏi đã hoàn thành, mã hóa và loại bỏ các số liệu không tin cậy.

2.5. Đạo đức trong nghiên cứu

Đề tài được thông qua Hội đồng phê duyệt Đạo đức nghiên cứu và phê duyệt đề cương của Viện Sốt rét-KST-CT Trung ương;

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Mô tả một số đặc điểm dịch tễ học phân tử đột biến gen K13 của *Plasmodium falciparum* tại 5 tỉnh Bình Phước, Gia Lai, Khánh Hòa, Ninh Thuận, Quảng Trị có sốt rét lưu hành nặng năm 2016 - 2018

3.1.1. Đặc điểm chung của bệnh nhân nhiễm *P. falciparum* đưa vào phân tích đột biến gen K13

Tổng số 292 phân lập từ bệnh nhân sốt rét nhiễm đơn thuần *P. falciparum* được thu thập từ 5 tỉnh

Bảng 3.1. Đặc điểm chung của nhóm bệnh nhân tham gia nghiên cứu

Đặc điểm	Bình Phước n=39	Gia Lai n=108	Khánh Hòa n=52	Ninh Thuận N= 44	Quảng Trị N=49
Giới tính	SL	SL	SL	SL	SL
Nam	26	97	35	41	31
Nữ	13	11	17	3	18)
Nhóm tuổi	SL	SL	SL	SL(%)	SL
< 15 tuổi	5	12	21	11	11
≥ 15 tuổi	34	96	31	33	38
Tuổi trung bình	26,8 ± 12,4	26,9± 9,9	25,9 ± 18,2	26,8 ± 14,3	27,1 ± 16,8

Nhận xét:

Phân tích đặc điểm của nhóm bệnh nhân nghiên cứu ta thấy bệnh nhân nam chiếm đa số. Bệnh nhân tham gia nghiên cứu ở độ tuổi lớn hơn hoặc bằng 15 tuổi chiếm đa số, cao nhất là Gia Lai (88,89%) và thấp nhất là Khánh Hòa (59,6%).

3.1.2. Phân tích đặc điểm các vị trí đột biến trên gen K13 của *P. falciparum* trên các mẫu phân tích

Kết quả phân tích xác định được 8 kiểu đột biến gen K13 gồm: Đột biến C580Y phát hiện được ở cả 5 tỉnh, đột biến gen P553L được phát hiện có mặt ở 2 tỉnh Gia Lai và Khánh Hòa, đột biến C469F phát hiện được ở Gia Lai, đột biến gen khác bao gồm H384Q, K503N, Y511H, G638E, G639D, đây là các vị trí đột biến chưa xác định được vai trò

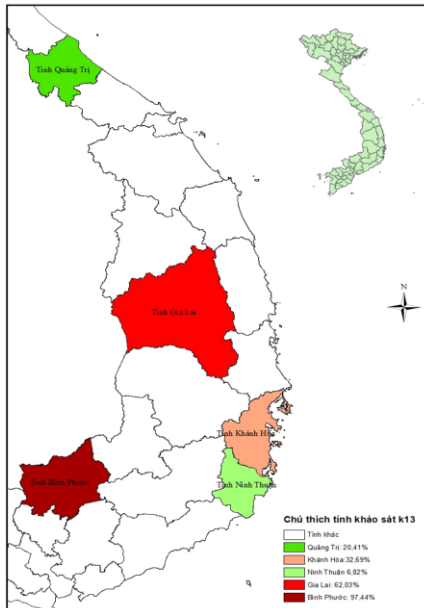
3.1.3. Tỷ lệ đột biến gen K13 của 5 tỉnh thực hiện nghiên cứu

Bảng 3.17. Kết quả tỷ lệ đột biến gen K13 tại điểm nghiên cứu

TT	Tỉnh	Mẫu phân tích	Mẫu có đột biến gen K13		P
			SL	%	
1	Bình Phước	39	38	97,44	0,00063
2	Gia Lai	108	67	62,04	
3	Khánh Hòa	52	17	32,69	
4	Ninh Thuận	44	3	6,82	
5	Quảng Trị	49	10	20,41	
	Tổng số	292	135	46,23	

Nhận xét:

Kết quả tổng hợp thu được tỷ lệ đột biến gen K13 chung là 135/292 (46,23%). Tỷ lệ có đột biến gen K13 của *P. falciparum* giữa các tỉnh nghiên cứu có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $p < 0,05$, (Bảng 3.16, Hình 3.7)



Hình 3.7. Bản đồ phân bố mức độ đột biến gen K13 của ký sinh trùng *P. falciparum* tại các điểm nghiên cứu

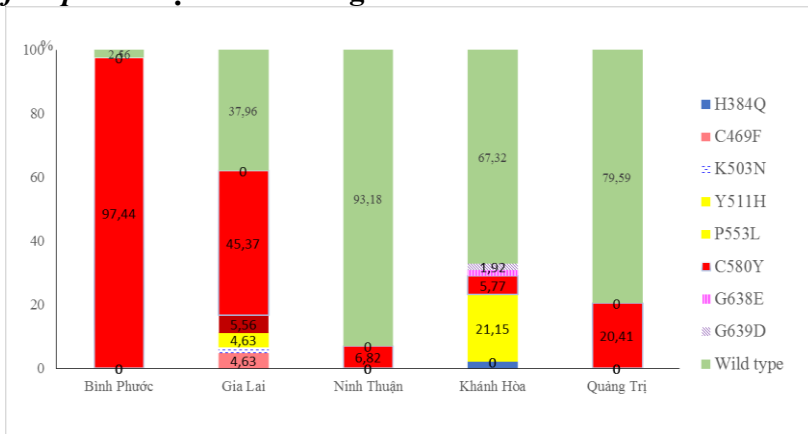
Bảng 3.18. Đặc điểm đột biến gen K13 của 5 tỉnh nghiên cứu

Kiểu gen	Số lượng	Tỷ lệ%	Phân loại
Đột biến P553L	18	6,16	Xác định kháng
Đột biến C580Y	103	35,27	Xác định kháng
Đột biến C469F	4	1,37	Liên quan/ứng viên
Đột biến H384Q	1	0,34	Chưa xác định vai trò
Đột biến Y511H	5	1,71	Chưa xác định vai trò
Đột biến K503N	2	0,68	Chưa xác định vai trò
Đột biến G638E	1	0,34	Chưa xác định vai trò
Đột biến G639D	1	0,34	Chưa xác định vai trò
Kiểu hoang dại	157	53,77	Nhạy với ART
Tổng	292	100%	

Nhận xét:

Kiểu đột biến C580Y chiếm tỷ lệ cao nhất 35,27% (103/292), tiếp đến là điểm P553L chiếm 6,16% (18/292) đây cũng là 2 điểm được xác định là kháng ART, điểm đột biến C469F chỉ phát hiện được với tỷ lệ nhỏ (1,37%). Ngoài ra còn phát 5 vị trí đột biến khác chưa xác định được vai trò.

3.1.5. So sánh tỷ lệ đột biến gen K13 của các quần thể *P. falciparum* tại các điểm nghiên cứu.



Hình 3.8. Biểu đồ so sánh tỷ lệ đột biến gen K13 phát hiện được tại các điểm nghiên cứu

Đột biến C580Y phát hiện được ở cả 5 tỉnh nghiên cứu, cao nhất tại Bình Phước với tần suất kiểu gen đột biến chiếm 97,44% (38/39 mẫu) và tỷ lệ thấp tại Khánh Hòa 5,77 % (3/52 mẫu). Đột biến kháng artemisinin P553L phát hiện được tại 2 tỉnh là Gia Lai 5,56% (6/108 mẫu) và ở Khánh Hòa 21,15% (11/52 mẫu). Đột biến C496F chỉ phát hiện được ở tỉnh Gia Lai với tỷ lệ 4,63% (5/108 mẫu). Một số đột biến chưa xác định tính kháng khác phát hiện được như K503N Y511H, H384Q, G638E, G639D 1,92% với tỷ lệ thấp.

3.2. Đánh giá đáp ứng của ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* với thuốc dihydroartemisinin - piperaquin phosphate tại các điểm nghiên cứu

Trong tổng số 292 bệnh nhân SR *P. falciparum*, có 201 bệnh nhân đủ tiêu chuẩn được lựa chọn đưa vào nghiên cứu *in vivo*

3.2.1. Đặc điểm chung về dân số của nhóm nghiên cứu

Bảng 3.21. Đặc điểm chung của nhóm bệnh nhân tham gia vào nghiên cứu

Đặc điểm	Bình Phước n= 39	Gia Lai n=48	Khánh Hòa n= 43	Ninh Thuận n=40	Quảng Trị n=31
Giới tính	SL	SL	SL	SL	SL
Nam	26	46	29	38	18)
Nữ	13	2	14	2	13)
Nhóm tuổi					
<5	0	0	1	1	2
≥ 5 - < 15	5	1	17	9	6
≥ 15	34	47	25	30	23
- Nhiệt độ (°C)	38,7 ± 0,6	38,7 ± 0,9	38,8 ± 0,9	38,9 ± 0,4	38,8 ± 0,8
- Cân nặng (kg)	51 ± 10,7	53,4 ± 8,2	37,6 ± 13,4	42,8 ± 13,8	40,4 ± 12,7
Mật độ KST	8.030/μL (1128- 97764)	10.770/μL (1019- 98765)	11.736/μL (1020- 99555)	26.530/μL (3111- 97666)	11.087/μL (1441 - 98234)

Nhận xét:

Nam chiếm cao hơn nữ trong cơ cấu tại tất cả điểm thực hiện TES, đa số bệnh nhân đều là người lớn trưởng thành (≥ 15 tuổi), tất cả bệnh nhân đều có sốt hoặc có tiền sử sốt trong vòng 24

giờ. Mật độ KSTSR thể vô tính *P. falciparum* trung bình tại các tỉnh dao động từ 8030 đến 26530/ μ L

3.2.3. Thời gian làm sạch ký sinh trùng và cắt sốt sau điều trị DHA-PPQ

Bảng 3.24. Hiệu lực làm sạch ký sinh trùng *P. falciparum* và cắt sốt

Nội dung phân tích	Bình Phước	Gia Lai	Khánh Hòa	Ninh Thuận	Quảng Trị
Mật độ KSTSR/ μ l ngày D ₀	8030	10770	11736	26530	11087
Thời gian sạch KST (giờ)	52,1 \pm 20,1	45,5 \pm 22,2	38,1 \pm 16,6	31,2 \pm 11,1	24,6 \pm 1,5
Nhiệt độ ngày D ₀ ($^{\circ}$ C)	38,7 \pm 0,6	38,7 \pm 0,9	38,8 \pm 0,9	38,9 \pm 0,4	38,8 \pm 0,8
Thời gian cắt sốt (giờ)	30,2 \pm 12,7	33,3 \pm 14,9	31,4 \pm 11,5	30 \pm 11,5	34,2 \pm 12,8

Nhận xét:

Sau điều trị thuốc DHA-PPQ cho thấy thời gian sạch KST trung bình lần lượt là 52,1 \pm 20,1 giờ; 45,5 \pm 22,2 giờ; 38,1 \pm 16,6 giờ; 31,2 \pm 11,1 giờ; 24,6 \pm 1,5 giờ. Song song đó, thời gian cắt sốt lần lượt 30,2 \pm 12,7 giờ, 33,3 \pm 14,9 giờ, 31,4 \pm 11,5 giờ 30 \pm 11,5 giờ và 34,2 \pm 12,8 giờ tại Bình Phước, Gia Lai, Khánh Hòa, Ninh Thuận và Quảng Trị.

Bảng 3.25. Tỷ lệ tồn tại ký sinh trùng thể vô tính sau 72 giờ (D₃)

Thời gian sạch KSTSR	Bình Phước	Gia Lai	Khánh Hòa	Ninh Thuận	Quảng Trị
Mật độ KSTSR / μ l ngày D ₀	8030	10770	11736	26530	11087
Số ca còn thể vô tính ngày D ₁	35/39 (89,7%)	38/48 (79,2%)	37/43 (86,1%)	17/40 (42,5%)	6/31 (19,4%)
Số ca còn thể vô tính ngày D ₂	27/39 (69,2%)	24/48 (50,0%)	25/43 (58,1%)	1/40 (2,5%)	0/31 (0,0%)
Số ca còn thể vô tính ngày D ₃	16/39 (41,0%)	7/48 (14,6%)	8/43 (18,6%)	0/40 (0%)	0/31 (0%)

Nhận xét:

Phân tích về tỷ lệ tồn tại KST thể vô tính sau điều trị DHA-PPQ ở ngày D₃ kể từ liều thuốc DHA-PPQ đầu tiên cho thấy tại các điểm theo dõi của tỉnh Bình Phước, Gia Lai, Khánh Hòa, tỷ lệ KST ngày D₃ >10% lần lượt là 41,0% (16/39), 14,6% (7/48), 18,6% (8/43). Ninh Thuận và Quảng Trị không có trường hợp nào còn KST ngày D₃.

Bảng 3.26. So sánh ký sinh trùng ngày D₃ với đột biến gen K13 tại các điểm nghiên cứu.

Tỉnh	Đột biến gen K13		Tổng cộng
	Có KST D ₃ (%)	Không Có KST D ₃ (%)	
Bình Phước n=39	16 41%	22 56,4%	38
Gia Lai n=48	7 14,6%	21 43,7%	28
Khánh Hòa n= 43	8 18,6%	8 18,6%	16
Ninh Thuận n=40	0 0%	2 5,0%	2
Quảng Trị n=31	0 0%	10 32,6%	10
Tổng cộng	31	63	94
	94		

Nhận xét:

Trong số 201 bệnh nhân theo dõi đến ngày D₃ của 5 tỉnh Bình Phước, Gia Lai, Khánh Hòa, Ninh Thuận, Quảng Trị có tất cả 31 bệnh nhân có KST ngày D₃ đều có điểm đột biến gen K13 xác định kháng ART (24.C580Y, 7.P553L) lần lượt tại các tỉnh là Bình Phước 41%, Khánh Hòa 18,6% và Gia Lai 14,6 % và 63/94 bệnh nhân có đột biến gen K13 nhưng không có KST ngày D₃. Như vậy các tỉnh Bình Phước, Gia Lai, Khánh Hòa có tỷ lệ KST ngày D₃ lớn hơn 10% kết hợp với đột biến K13 ở những vị trí xác định kháng ART > 5% được xác định là vùng kháng ART.

Bảng 3.27. Đặc điểm kiểu gen của những bệnh nhân có ký sinh trùng ngày D3

Kiểu gen	Bình Phước n=16	Gia Lai n =7	Khánh Hòa n =8	Tổng	Phân loại
Đột biến P553L	0 (0 %)	1 (14,28%)	7 (87,5%)	8	Xác định kháng
Đột biến C580Y	16 (100%)	6 (85,72 %)	1 12,5%	23	Xác định kháng
Đột biến C496F	0 (0 %)	0 (0%)	0 (0 %)	0	Liên quan/ ứng viên
Đột biến Khác	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0%)	0	Chưa xác định vai trò

Nhận xét:

Trong số 31 bệnh nhân có KST ngày D3 và có điểm đột biến gen K13 có 23 mẫu có đột biến C580Y, 8 mẫu có đột biến P553L. Tất cả các đột biến này đều được phân loại là xác định kháng artemisinin.

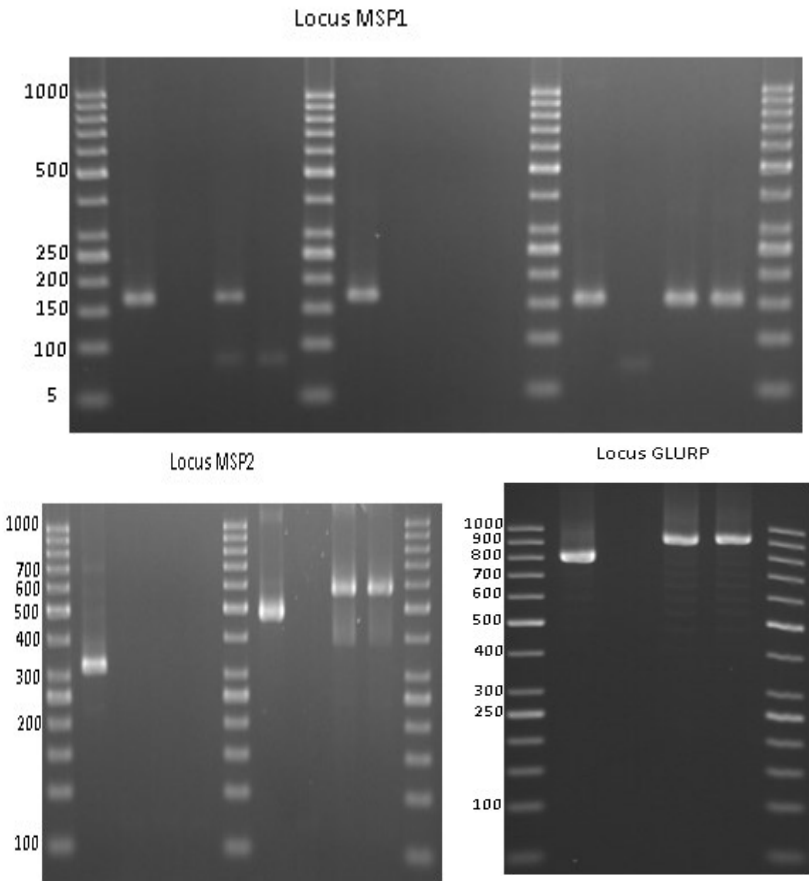
3.2.4. Hiệu lực phác đồ thuốc DHA-PPQ đối với sốt rét *P. falciparum*

Bảng 3.28. Hiệu lực phác đồ thuốc DHA-PPQ đối với sốt rét do *P. falciparum* tại các tỉnh nghiên cứu

Hiệu lực phác đồ DHA-PPQ	Bình Phước	Gia Lai	Khánh Hòa	Ninh Thuận	Quảng Trị
	SL(%)	SL(%)	SL(%)	SL(%)	SL(%)
Thất bại điều trị sớm (ETF)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Thất bại LS muộn (LCF)	2 (6,1%)	1 (2,2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Thất bại KST muộn (LPF)	4 (12,2%)	0 (0%)	1 (2,6%)	0 (0%)	0 (0%)
Đáp ứng LS và KST (ACPR)	27 (81,8%)	44 (97,8%)	38 (97,4%)	33 (100%)	26 (100%)
Tổng số phân tích	33	45	39	33	26

Nhận xét:

Trong số 176 bệnh nhân được theo dõi đánh giá đầy đủ. Kết quả chỉ ra đáp ứng lâm sàng và KSTSR đầy đủ (ACPR) tại hai tỉnh Ninh Thuận và Quảng Trị đều 100%, tại tỉnh Khánh Hòa và Gia Lai hiệu lực vẫn còn trên 95% lần lượt 96,4% và 97,4%, trong khi đó tại Bình Phước tỷ lệ ACPR này chỉ còn 81,8% (< 90%) và tỷ lệ thất bại trên 10%, kèm theo thất bại lâm sàng muộn (LCF) là 2 ca (6,1%), thất bại KST muộn (LPF) là 4 ca (12,2%). Đặc biệt, tại cả 5 tỉnh chưa có trường hợp nào thất bại điều trị sớm (ETF), riêng ở Khánh Hòa và Gia Lai có 1 trường hợp thất bại muộn.



Hình 3.11. Hình ảnh điện di phân tích tái phát, tái nhiễm

3.3. Đánh giá nhạy cảm của ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* với thuốc sốt rét bằng kỹ thuật *invitro* tại Gia Lai

Trong 292 ca đưa vào phân tích đột biến gen K13 thu thập được 54 phân lập *P. falciparum* tại Gia Lai để đánh giá nhạy cảm của KSTSR với với thuốc sốt rét. Trong đó 54 mẫu tiến hành nuôi cấy, tỷ lệ KST phát triển thành thể phân liệt ở giếng chứng trên 10% là 42/54 mẫu (77,7%).

3.3.1 Đặc điểm đột biến gen K13 của ký sinh trùng *P. falciparum* trên các mẫu đưa vào thử thuốc sốt rét

Bảng 3.31. Đặc điểm đột biến gen K13 trên các mẫu nuôi cấy thành công

Kiểu gen	Số lượng n=42	Tỷ lệ %	Tình trạng phân loại
Đột biến P553L	2	4,76	Xác định kháng
Đột biến C580Y	20	47,62	Xác định kháng
Đột biến C496F	3	7,14	Liên quan/ứng viên
Đột biến Y511H	4	9,52	Chưa xác định vai trò
Kiểu hoang dại	13	30,95	Nhạy với ART
Tổng	42	100	

Nhận xét:

- Qua phân tích có 29/42 mẫu phát hiện nhiều đột biến: Kiểu đột biến C580Y chiếm 47,62% (20/42), P553L là 4,76% (2/42) là hai đột biến xác định kháng artemisinin và đột biến ứng viên C496F 7,14% (3/42). Đột biến gen K13 vị trí Y511H là 9,52% (4/42) hiện chưa xác định vai trò

3.3.2. Đánh giá nhạy cảm của ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* với một số thuốc sốt rét

Kết quả nghiên cứu cho thấy IC₅₀ trung bình của AS là 3,06 ±

3,10 nmol/L. Trong đó, giá trị IC_{50} thấp nhất là 0,41 nmol/L và cao nhất 14,55 nmol/L; của DHA là $2,95 \pm 2,19$ nmol/L. Giá trị IC_{50} thấp nhất là 0,52 nmol/L và cao nhất là 9,94 nmol/L; của PPQ là $43,5 \pm 24,9$ nmol/L, giá trị IC_{50} thấp nhất là 4,66 nmol/L và cao nhất là 105,8 nmol/L.

3.3.3. Mối liên quan giữa đột biến gen K13 của ký sinh trùng *P. falciparum* với một số thuốc sốt rét trên *in vitro* tại Gia Lai

Bảng 3.32. So sánh đột biến gen K13 và IC_{50} của thuốc artesunat trên các mẫu nuôi cấy

Kiểu gen	Mẫu nuôi cấy (n=42)	IC_{50} (nmol/L)	P
Có đột biến K13 liên quan đến kháng ART	25/42	3,50	0,0034
Kiểu hoang dại hoặc đột biến K13 không liên quan đến kháng ART	17/42	2,18	

Nhận xét:

Qua phân tích ta thấy có 25/42 mẫu có đột biến K13 liên quan đến kháng ART, các mẫu này có chỉ số IC_{50} là 3,50 nmol/L và có 17/42 mẫu không có đột biến K13 các mẫu này có chỉ số IC_{50} trung bình là 2,18 nmol/L thấp hơn so với các mẫu có đột biến. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với ($p < 0,05$)

Bảng 3.33. So sánh đột biến gen K13 và IC_{50} của thuốc dihydro artemisinin trên các mẫu nuôi cấy

Kiểu gen	Mẫu nuôi cấy (n=42)	IC_{50} (nmol/L)	P
Có đột biến K13 liên quan đến kháng ART	25/42	3,53	0,0062
Kiểu hoang dại hoặc đột biến K13 không liên quan đến kháng ART	17/42	2,37	

Nhận xét:

Qua phân tích thấy có 25/42 mẫu có đột biến K13 liên quan đến kháng ART và dẫn chất, các mẫu này có chỉ số IC_{50} là 3,53 nmol/L và có 17/42 mẫu không có đột biến K13 các mẫu này có chỉ số IC_{50} trung bình là 2,37 nmol/L thấp hơn so với các

mẫu có đột biến. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với ($p < 0,05$).

Bảng 3.34. So sánh đột biến gen K13 và IC_{50} của thuốc piperacuin trên các mẫu nuôi cấy

Kiểu gen	Mẫu nuôi cấy (n=42)	IC_{50} (95% CI) nmol/L
Có đột biến K13 liên quan đến kháng ART	25/42	41,81
Kiểu hoang dại hoặc đột biến K13 không liên quan đến kháng ART	17/42	44,30

Nhận xét:

Qua phân tích ta thấy có mẫu có đột biến K13 liên quan đến kháng ART và dẫn chất, các mẫu này có chỉ số IC_{50} trung bình của thuốc piperacuin là 41,81 nmol/L và có 17/42 mẫu Không có đột biến K13 hoặc đột biến K13 không liên quan đến kháng ART các mẫu này có chỉ số IC_{50} trung bình là 44,30 nmol/L cao hơn so với các mẫu có đột biến.

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. Mô tả một số đặc điểm dịch tễ học phân tử đột biến gen K13 của *Plasmodium falciparum* tại 5 tỉnh Bình Phước, Gia Lai, Khánh Hòa, Ninh Thuận, Quảng Trị có sốt rét lưu hành nặng năm 2016 - 2018

Việc nghiên cứu đột biến gen K13 kháng artemisinin trên *P. falciparum* sẽ giúp cho các nhà làm chính sách thay đổi chính sách thuốc. Dữ liệu thu thập từ 72 nghiên cứu gồm chỉ điểm gen K13 gồm 16.613 mẫu máu từ 18 nước, các mẫu từ Myanmar 3842 (23,1%), Campuchia 3804 (22,9%) và Việt Nam 2663 (16%), có sự gia tăng từ tỷ lệ đột biến gen K13, thấp nhất là 4,3% năm 2005 (n=47) và cao nhất là 62,9% năm 2018 (n=264) [54].

So sánh số liệu của Nguyễn Thị Minh Trinh và cộng sự (2016) [32] và Nguyễn Thị Liên Hạnh và cộng sự (2017) [9] với 55 ca nhiễm đơn thuần *P. falciparum* về đột biến gen của K13 cho tỷ lệ 28/55 ca (50,9%) có đột biến K13, trong đó loại đột biến C580Y chiếm ưu thế 21/28 ca (75%) và P553L là 8 ca (14,5%). Trong khi đó các đột biến khác chưa xác định vai trò là

P574L 2 ca (3,6%). Giải trình tự trên 1.060 phân lập *P. falciparum* của 3 điểm nóng sốt rét tại Việt Nam. Số liệu cho thấy đột biến gen K13 gồm T474I, T493H, A539T, I543T, P553L, V568G, P574L và loại C580Y có và chưa liên quan đến kháng artemisinin cũng được tìm thấy. Tần suất đột biến K13 từ 29% (222/767), 6% (11/188) và 43% (45/105) lần lượt ở vùng SRLH thuộc các tỉnh Bình Phước, Ninh Thuận và Gia Lai [10],[32],[84]. Đột biến C580Y trở thành kiểu gen nổi trội trong những năm gần đây với tỷ lệ 79,1% (34/43) phân lập ở Bình Phước năm 2015[75] và 63% (17/27) phân lập ở Gia Lai [75]. Đồng thời, nghiên cứu đột biến gen K13 cũng có liên quan đến tính nhạy của thể tự dưỡng nhân của *P. falciparum* với thành phần dihydroartemisinin (DHA) trên thử nghiệm *in vitro* và thời gian làm sạch KSTSR kéo dài trên test *in vivo*.

Trong giai đoạn (2015-2016), đột biến C580Y là loại đột biến K13 duy nhất được phát hiện tại Gia Lai là 45/105 (43%). Mỗi liên quan giữa đột biến K13 với sự làm sạch 50% tải lượng KST trên lâm sàng được xác lập và hầu hết bệnh nhân nhiễm *P. falciparum* có đột biến với K13 alen có thời gian làm 50% lượng KST là 5 giờ, trong khi thời gian này ở nhóm không có đột biến K13 mà chỉ có đột biến hoang dại, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,001$) [75].

Phát hiện các gen liên quan đến kháng thuốc hay các kiến thức có tính thời sự về phân tử trong chu kỳ của KSTSR giúp ích ít nhiều trong LTSR, nhất là gen của *Plasmodium* spp. và lẽ đương nhiên không thể đảm bảo rằng các khía cạnh về gen học có thể dẫn đến chấm dứt lan truyền sốt rét mà nó đóng vai trò quan trọng trong bộ công cụ LTSR hiệu quả hơn.

4.2. Đánh giá đáp ứng của ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* với thuốc dihydroartemisinin - piperaquin phosphat tại các điểm nghiên cứu

So sánh với các dữ liệu cập nhật về hiệu lực thuốc sốt rét từ các thử nghiệm TES *in vivo* của TCYTTG cho thấy tại Campuchia, kháng một phần artemisinin (partial artemisinin resistance) lần đầu tiên báo cáo trên vào năm 2008, song các số liệu phân tích hồi cứu về chỉ điểm phân tử chỉ ra kháng một phần artemisinin đã từng xuất hiện trước năm 2001 và lan rộng kháng ACTs [62],[94],[103].

Nhìn chung, dù đáp ứng chậm với artemisinin tại một số vùng GMS, song thuốc ACTs vẫn còn hiệu lực trong điều trị sốt rét do *P. falciparum*. Phần lớn bệnh nhân có hiện tượng chậm làm sạch KST đều được chữa khỏi vì vai trò của thuốc đi kèm vẫn còn hiệu quả. Giám sát thường quy cần phải tiếp tục để đảm bảo rằng các thuốc ACTs đang được khuyến cáo còn hiệu quả và kịp thời thay đổi chính sách thuốc khi đến ngưỡng quy định. Đánh giá đột biến gen K_{13} hỗ trợ quan trọng trong truy vết kháng artemisinin một phần khi chúng đang dần nổi lên. Trong bối cảnh đa kháng thuốc tại GMS, việc loại trừ *P. falciparum* là vấn đề đặt ra ưu tiên. Vai trò kháng artemisinin trong phát triển hoặc chọn lọc kháng thuốc một phần cần đánh giá hơn nữa trong thời gian đến [107].

Tại Việt Nam, tiến trình chậm sạch KSTSR sau dùng thuốc DHA-PPQ lần đầu tiên phát hiện tại huyện Bù Đăng, tỉnh Bình Phước năm 2009. Giám sát thường quy hiệu lực thuốc DHA-PPQ cũng đã cho thấy các ổ bệnh khác cũng tương tự như tại huyện Phú Thiện, tỉnh Gia Lai (2010), huyện Tuy Đức và Cư Jut, tỉnh Đắk Nông (2011), huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam (2012), huyện Khánh Vĩnh, tỉnh Khánh Hòa (2014) và huyện Ninh Sơn, tỉnh Ninh Thuận (2015) [12],[25],[33].

Các TES thực hiện với thuốc DHA-PPQ từ năm 2010-2014 cũng đã tìm thấy hiệu lực điều trị trên 95% dù tỷ lệ thể vô tính ngày D_3 dương tính lên đến 36%. Tuy nhiên, một nghiên cứu năm 2015 tại Bình Phước báo cáo rằng tỷ lệ thất bại cao trên 10% sau điều trị DHA-PPQ và đã được TCYTTG khẳng định có sự xuất hiện kháng thuốc piperquin. Năm 2016, tỷ lệ thất bại cao với DHA-PPQ đã được báo cáo tại tỉnh Đắk Nông. Gần đây, các nghiên cứu chỉ ra tình trạng thất bại điều trị nghiêm trọng hơn và kèm theo các chỉ điểm phân tử kháng cả artemisinin và thuốc đi kèm piperquin tại các tỉnh lân cận từ “vết dầu loang” kháng này. Trong năm 2016-2017, tỷ lệ thất bại điều trị muộn tại Đắk Nông và Bình Phước lần lượt là 27% và 56% [86]. Các dữ liệu nghiên cứu từ huyện Krông Pa, Gia Lai và huyện Krông Năng, Ea Kar, tỉnh Đắk Lắk cũng cho thấy tỷ lệ cao các chỉ điểm phân tử đối với kháng artemisinin và piperquin và TES 2019 cho thấy thất bại điều trị muộn sau khi hiệu chỉnh PCR lần lượt là 34% và 68% tại Gia Lai và Đắk Lắk [19].

4.3. Đánh giá nhạy cảm của ký sinh trùng *P. falciparum* với thuốc sốt rét trên thử nghiệm *in vitro* tại Gia Lai

Nồng độ ức chế IC_{50} trung bình của AS là $3,06 \pm 3,10$ nmol/L, cao hơn so với kết quả nghiên cứu 2004 tại Bù Gia Mập Bình Phước IC_{50} trung bình của AS là $1,3 \pm 0,6$ nmol/L [27], cũng cao hơn nhiều so với nghiên cứu trung tâm cứu tại phía tây Campuchia giai đoạn 2001-2007 trên 495 mẫu thử với thuốc AS [83]. So với nghiên cứu tại Gabon Châu Phi cũng cao hơn IC_{50} trung bình 2,08 nmol/L (n=34) [55]. So với nghiên cứu tại Pháp [41], IC_{50} trung bình 1,1 nmol/L, kết quả này thấp hơn nhiều so với kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Nghiên cứu tại Thái Lan trên những bệnh nhân *P. falciparum* được thu thập từ 2016-2017 giá trị IC_{50} trung bình là $3,06 \pm 3,10$ nmol/L [67] kết quả này cũng tương tự như kết quả tại Gia Lai năm 2016-2017.

Nồng độ ức chế IC_{50} trung bình của DHA là $2,95 \pm 2,19$ nmol/L. Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu tại Cameroon năm 1999 IC_{50} trung bình là 1,11 nmol/L [92]. Nghiên cứu tại Pháp tổng cộng [41], IC_{50} trung bình của DHA là 1,3 nmol/L [41]. Nghiên cứu tại Kenyan năm 2008 nồng độ ức chế IC_{50} trung bình của DHA đối với 115 phân lập *P. falciparum* là $2,0 \pm 1,0$ nmol/L [80]. Nghiên cứu tại Thái Lan năm 2017 nồng độ ức chế IC_{50} trung bình của DHA đối với 113 phân lập *P. falciparum* là $2,1 \pm 1,2$ nmol/L [67].

Ngoài ra, thuốc piperquin phosphat (PPQ) đóng vai trò như một thuốc đi kèm (partner drug) trong viên phối hợp DHA-PPQ. Giá trị IC_{50} trung bình thu được $43,5 \pm 24,9$ nmol/L. Nghiên cứu tại Pháp tổng cộng 181 bệnh nhân *P. falciparum* [41], IC_{50} trung bình của PPQ là 66,8 nmol/L, kết quả này cao hơn so với kết quả nghiên cứu tại Gia Lai. Nghiên cứu tại biên giới giữa Thái Lan và Campuchia, Myanmar năm 2016 trên bệnh nhân nhiễm *P. falciparum* đơn thuần nồng độ ức chế IC_{50} trung bình của PPQ là $16,7 \pm 6,3$ nmol/L, Nghiên cứu tại Thái Lan năm 2017 trên bệnh nhân nhiễm *P. falciparum* đơn thuần nồng độ ức chế IC_{50} trung bình của PPQ là $18,4 \pm 8,4$ nmol/L [67]. Nghiên cứu tại Kenyan năm 2008 nồng độ ức chế IC_{50} trung bình của PPQ đối với 115 phân lập *P. falciparum* là 42 ± 10 nmol/L [80]

KẾT LUẬN

1. Mô tả một số đặc điểm dịch tễ học phân tử đột biến gen K13 của *Plasmodium falciparum* tại 5 tỉnh Bình Phước, Gia Lai, Khánh Hòa, Ninh Thuận, Quảng Trị có sốt rét lưu hành nặng năm 2016 – 2018

Tỷ lệ có đột biến gen K13 chung tại 5 tỉnh là 46,23% (135/292). Trong đó, đột biến K13 tại Bình Phước là 97,44% (38/39), Gia Lai 62,03% (67/108), Khánh Hòa 32,69% (17/52), Ninh Thuận 6,82% (3/44), Quảng Trị 20,41% (10/49); Tất cả đột biến gen K13 tại Bình Phước, Ninh Thuận và Quảng Trị đều là kiểu C580Y chiếm lần lượt Bình Phước 97,44%; Ninh Thuận 6,82% và Quảng Trị 20,41%; Tại Gia Lai kiểu đột biến K13 đa dạng hơn, trong đó kiểu C580Y chiếm 45,37% và P553L là 5,56% là hai kiểu đột biến xác định kháng artemisinin và loại đột biến liên quan C496F là 4,63% ngoài ra còn có 2 đột biến chưa xác định vai trò là K503N và Y511H chiếm 6,48%; Tại Khánh Hòa có 2 đột biến xác định kháng là C580Y là 5,77%, kiểu P553L là 21,15% và ba kiểu khác H384Q, G638E, G639D là 5,77%.

2. Đánh giá đáp ứng của ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* với thuốc dihydroartemisinin - piperaquin phosphate tại các điểm nghiên cứu

- Thời gian sạch KST trung bình là: Bình Phước $52,1 \pm 20,1$ giờ; Gia Lai $45,5 \pm 22,2$ giờ; Khánh Hòa $38,1 \pm 16,6$ giờ; Ninh Thuận $31,2 \pm 11,1$ giờ; Quảng Trị $24,6 \pm 1,5$ giờ. Thời gian cắt sốt trung bình lần lượt là: Bình Phước $30,2 \pm 12,7$ giờ, Gia Lai $33,3 \pm 14,9$ giờ, Khánh Hòa $31,4 \pm 11,5$ giờ; Ninh Thuận $30 \pm 11,5$ giờ và Quảng Trị $34,2 \pm 12,8$ giờ

- Đáp ứng lâm sàng và KST đầy đủ (ACPR) của *P. falciparum* với thuốc DHA-PPQ tại Ninh Thuận và Quảng Trị đều là 100%, tỉnh Khánh Hòa 97,4%, Gia Lai 97,8%. Trong khi ở Bình Phước là 81,8% (< 90%); với tỷ lệ thất bại tại Bình Phước cần phải tìm một phối hợp ACTs khác thay thế.

- Tỷ lệ tồn tại KST thể vô tính sau điều trị DHA-PPQ ở ngày D₃ tại các điểm theo dõi là: Bình Phước 41%, Gia Lai 14,6% , Khánh Hòa 18,6%, Ninh Thuận 0% và Quảng Trị 0%.

- Tất cả những 31 bệnh nhân có KST ngày D₃ đều có đột biến gen K13. Tất cả các đột biến này đều được phân loại là xác định kháng artemisinin.

3. Tính nhạy cảm trên thử nghiệm *in vitro* các phân lập *P. falciparum* với thuốc sốt rét tại tỉnh Gia Lai

- Tỷ lệ KST phát triển thành thể phân liệt ở giếng chứng trên 10% là 42/54 mẫu (77,7%).

- IC₅₀ trung bình của AS đối với *P. falciparum* là $3,06 \pm 3,10$ nmol/L. IC₅₀ trung bình của DHA đối với *P. falciparum* là IC₅₀ là $2,95 \pm 2,19$ nmol/L. Giá trị IC₅₀ trung bình của CQ là $67,7 \pm 53,1$ nmol/l Trong đó, 21,4% (9/42) số mẫu có IC₅₀ >100 nmol/L (ngưỡng xác định kháng CQ); Giá trị IC₅₀ trung bình PPQ là $43,5 \pm 24,9$ nmol/L.

- IC₅₀ trung bình của AS và DHA ở nhóm có đột biến gen K13 cao hơn ở nhóm không có đột biến, sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

KHUYẾN NGHỊ

1. Vai trò đột biến gen K13 góp phần như một chỉ dấu cảnh báo sớm và là yếu tố bổ sung cho định nghĩa kháng thuốc artemisinin có giá trị, truy vết sự lan rộng kháng sang các vùng, nên tiếp tục giám sát chỉ điểm phân tử trên quần thể *P. falciparum* để cảnh báo kháng;
2. Khi đã xác định được đột biến gen K13 có liên quan đến *P. falciparum* kháng artemisinin, nên tiến hành nghiên cứu sự phân bố của đột biến gen K13 trên tất cả các tỉnh có SRLH nặng và nghi ngờ kháng với artemisinin;
3. Cần phải theo dõi và quản lý chặt chẽ quá trình điều trị đặc biệt đối với bệnh nhân sốt rét do *P. falciparum*, phát hiện kịp thời các trường hợp thất bại sớm để điều trị thuốc sốt rét thay thế, đồng thời có kế hoạch khống chế tình trạng KST kháng với loại thuốc mang tính chiến lược này.
4. Nên nghiên cứu phân tích chỉ điểm phân tử *Pf*plasmepsine 2/3 và *Pf*ExoE415G liên quan đến kháng thành phần piperaquin phosphat (PPQ) trong viên phối hợp DHA-PPQ, để thể đánh giá một cách thấu đáo thực trạng kháng thuốc DHA-PPQ tại thời điểm đó.