

Bước đầu xây dựng quy trình tetra-primer ARMS PCR phát hiện điểm đa hình đơn nucleotide *exo-E415G* của ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* ở khu vực Tây Nguyên, Việt Nam

Lê Văn Khánh, Trần Thu Huyền, Hoàng Văn Tổng*

Viện Nghiên cứu Y Dược học Quân sự, Học viện Quân y, 222 Phùng Hưng, phường Phúc La, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 17/5/2022; ngày chuyển phản biện 20/5/2022; ngày nhận phản biện 2/6/2022; ngày chấp nhận đăng 7/6/2022

Tóm tắt:

Nghiên cứu này nhằm thiết lập quy trình phát hiện đa hình đơn nucleotide (SNP) *exo-E415G* trên ký sinh trùng (KST) sốt rét *Plasmodium falciparum* kháng artemisinin bằng kỹ thuật tetra-primer ARMS PCR và bước đầu xác định tỷ lệ đột biến *exo-E415G* ở bệnh nhân thất bại điều trị với artemisinin ở khu vực Tây Nguyên. Quy trình xác định điểm SNP *exo-E415G* được tối ưu trên mẫu DNA của chủng chuẩn 3D7, sàng lọc đột biến trên 123 mẫu máu toàn phần từ bệnh nhân thất bại điều trị với artemisinin được thu thập tại 3 tỉnh (Gia Lai, Đắk Nông, Đắk Lắk) thuộc khu vực Tây Nguyên, Việt Nam. Một đoạn gen kích thước 749 bp chứa vị trí SNP *exo-E415G* được khuếch đại bằng cặp mồi E415G-Fc và E415G-Rc. Mỗi đặc hiệu cho alen bình thường (alen A) và alen đột biến (alen G) khuếch đại các đoạn có kích thước lần lượt là 316 và 474 bp. Khi so sánh với phương pháp giải trình tự Sanger thì cho kết quả tương đồng là 100%. Áp dụng quy trình vừa được thiết lập để khảo sát SNP *exo-E415G* ở KST *P. falciparum* kháng artemisinin cho tỷ lệ đột biến là 78% (96/123). Nghiên cứu đã thiết lập được quy trình đơn giản và chính xác để xác định SNP *exo-E415G*. Tần suất đột biến *exo-E415G* của KST *P. falciparum* ở các bệnh nhân thất bại điều trị với artemisinin tại khu vực Tây Nguyên là 78%.

Từ khóa: *exo-E415G*, kháng artemisinin, sốt rét, tetra-primer ARMS PCR.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

Sốt rét là một bệnh KST truyền nhiễm phổ biến và nguy hiểm gây ra tỷ lệ tử vong cao trên toàn thế giới. Trong năm 2019, ước tính có 229 triệu người mắc sốt rét ở 90 quốc gia và 409.000 ca tử vong vì sốt rét, nguyên nhân chủ yếu là do các loài KST *P. falciparum* [1]. Theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), liệu pháp kết hợp artemisinin (ACTs) là phác đồ ưu tiên điều trị sốt rét do nhiễm KST *P. falciparum*, góp phần làm giảm đáng kể tỷ lệ tử vong do sốt rét. Tuy nhiên, kháng thuốc sốt rét là một trở ngại đối với các chương trình phòng chống và loại trừ sốt rét trên toàn cầu. Ở khu vực Đông Nam Á, KST đã kháng với hầu hết mọi loại thuốc sốt rét hiện có, bao gồm cả liệu pháp ACTs [2, 3]. Những nghiên cứu gần đây cho thấy, kháng thuốc có liên quan chặt chẽ đến SNP *exo-E415G* trên nhiễm sắc thể số 13 (PF3D7_1362500) của KST *P. falciparum* [4-7]. *Exo-E415G* là đột biến làm thay đổi nucleotide adenin (A) thành guanin (G) trong gen mã hóa cho một exonuclease dẫn đến thay đổi axit glutamic (E) thành glycine (G) tại vị trí 415. *Exo-E415G* được coi là dấu hiệu làm giảm nhạy với artemisinin và dẫn đến tăng tỷ lệ thất bại điều trị đối với ACTs - liệu pháp điều trị ưu tiên của Việt Nam.

Việc theo dõi các chỉ thị phân tử nói chung và SNP *Exo-E415G* nói riêng có vai trò quan trọng trong giám sát,

điều trị sốt rét. Cho đến nay đã có nhiều phương pháp để xác định điểm SNP như giải trình tự gen, realtime-PCR, ARMS PCR, PCR-RFLP... Tuy nhiên, giải trình tự gen, realtime-PCR có hạn chế là cần trang thiết bị hiện đại, chi phí cao và nhân viên phải được đào tạo chuyên môn kỹ thuật tốt. Chính vì vậy để khắc phục những hạn chế đó, chúng tôi đã tiến hành thiết lập một phương pháp đơn giản, chi phí thấp và độ chính xác cao để xác định SNP *exo-E415G* bằng kỹ thuật tetra-primer ARMS PCR, sử dụng 4 mồi trong một phản ứng [8].

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Chủng chuẩn 3D7 được cung cấp bởi Viện Y học Nhiệt đới Tuebingen (Đức). Các mẫu DNA đã biết kiểu gen đồng hợp thường AA (D6.1) và đồng hợp đột biến GG (D6.2) được sử dụng để chuẩn hóa phản ứng tetra-primer ARMS PCR. 123 mẫu máu tổng số thu thập từ bệnh nhân thất bại điều trị với artemisinin ở 3 tỉnh Gia Lai, Đắk Nông và Đắk Lắk thuộc khu vực Tây Nguyên.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách DNA: DNA được tách chiết bằng bộ kit GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification (Thermo Fisher

*Tác giả liên hệ: Email: hoangvantong@vmmu.edu.vn

Establishment of tetra-primer ARMS-PCR technique for detecting *exo-E415G* SNP in *Plasmodium falciparum* isolates from Central Highlands of Vietnam

Van Khanh Le, Thu Huyen Tran, Van Tong Hoang*

Institute of Biomedicine and Pharmacy, Vietnam Military Medical University,
222 Phung Hung Street, Phuc La Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

Received 17 May 2022; revised 2 June 2022; accepted 7 June 2022

Abstract:

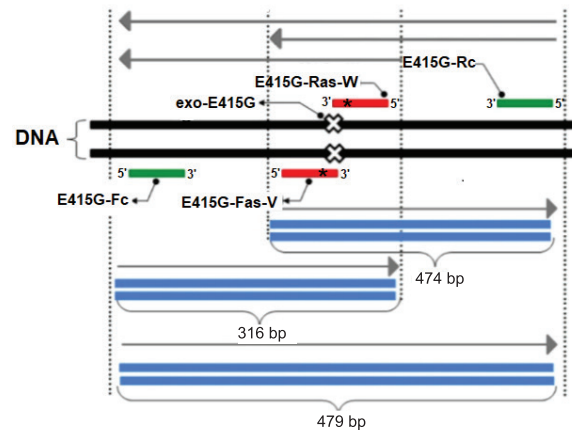
This study aims to establish a procedure based on tetra-primer ARMS PCR technique to detect the single nucleotide polymorphism (SNP) *exo-E415G* in malaria patients who experienced treatment failure with artemisinin. DNA sample from *P. falciparum* 3D7 isolate was used to optimise the procedure based on tetra-primer ARMS PCR technique to detect *exo-E415G* SNP. The method was then applied to screen for *exo-E415G* SNP on 123 blood samples from patients who experienced treatment failure with artemisinin in 3 provinces (Gia Lai, Dak Nong, Dak Lak) from Central Highlands of Vietnam. A DNA fragment (749 bp) containing the *exo-E415G* SNP was amplified using primer pairs E415G-Fc and E415G-Rc. Specific primers for the wildtype alen (A alen) and the mutant alen (G alen) amplified fragments with the length of 316 and 474 bp, respectively. The genotyping results were consistent with Sanger sequencing. The tetra-primer ARMS PCR technique was used for genotyping *exo-E415G* SNP on 123 patients who failed with artemisinin treatment, the frequency of *exo-E415G* alen was observed at 78% (96/123). In conclusion, the simple tetra-primer ARMS PCR technique was established to detect the SNP *Exo-E415G*. The prevalence of the mutant alen *Exo-E415G* was 78% in the Central Highlands of Vietnam.

Keywords: artemisinin resistance, *exo-E415G*, malaria, tetra-primer ARMS PCR.

Classification number: 3.1

Scientific, Mỹ). Quy trình tách chiết theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất, các mẫu DNA sau đó được định lượng và đánh giá độ sạch bằng quang phổ kế và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng cho phản ứng PCR.

Thiết kế mẫu: Xác định SNP *exo-E415G* thuộc exon 2 trên nhiễm sắc thể số 13 của bộ gen KST *P. falciparum* (PF3D7_1362500). Sau khi đã có trình tự gen tham chiếu, sử dụng phần mềm primer blast để thiết kế cặp mồi đặc hiệu cho gen nội chuẩn có kích thước là 749 bp chứa điểm đột biến. Tiếp theo tiến hành xây dựng mồi đặc hiệu cho alen đột biến và alen thường, các mồi này chỉ khác nhau nucleotide cuối cùng ở đầu 3' của mồi. Tuy nhiên, để tăng tính đặc hiệu cho mồi trong phản ứng tetra-primer ARMS PCR, chúng tôi cải tiến 2 mồi đặc hiệu alen bằng cách thêm một nucleotide không liên kết tạo ra thêm một mismatch ở nucleotide số 2 tại đầu 3'. Dựa vào độ khuếch đại của các mồi thường và mồi đột biến sẽ cho phép xác định mẫu bệnh phẩm có mang alen đột biến hay không. Sơ đồ vị trí các mồi trong phản ứng tetra-primer ARMS PCR để phát hiện điểm SNP *exo-E415G* như hình 1. Trình tự của 4 mồi là 5'-GGA ATG TGC TTT AAC GAA TGG-3' (E415G-Fc); 5'-GGT GTT CCT TCC TCT TTT CTT G-3' (E415G-Rc); 5'-CCC AAT GAT TGT TTA CTT CG-T-3' (E415G-Ras-W); 5'-TAT GGT TAT AAC GAT AAA AC-G-3' (E415G-Fas-V). Nucleotide đặc hiệu cho alen ở tận cùng đầu 3' của mồi được in đậm, gạch chân; nucleotide số 2 ở đầu 3' được thiết kế không bắt cặp được ký hiệu (*). Trình tự mồi được đặt tổng hợp tại Công ty Integrated DNA Technologies, Inc. (Singapore).



Hình 1. Sơ đồ vị trí các mồi trong phản ứng tetra-primer ARMS PCR. Hai mồi màu xanh (mồi ngoài) khuếch đại gen nội chuẩn, mồi màu đỏ E415G-Ras-W (mồi trong) khuếch đại alen thường, mồi màu đỏ E415G-Fas-V (mồi trong) khuếch đại alen đột biến. Dấu "X" minh họa vị trí xảy ra đột biến; dấu "*": minh họa mismatch ở nucleotide số 2 tính từ đầu 3' của mồi.

Kích thước các băng xuất hiện khi điện di sản phẩm phản ứng PCR sẽ cho biết kiểu gen của KST. Kiểu gen đồng hợp alen thường (AA) có các băng kích thước là 749 và 316 bp. Kiểu gen dị hợp (AG) cho ra 3 băng kích thước là 749, 474

và 316 bp. Kiểu gen đồng hợp alen đột biến (GG) xuất hiện các băng kích thước là 749 và 474 bp.

Thực hiện phản ứng tetra-primer ARMS PCR: Thành phần phản ứng gồm: GoTaq Green Mastermix (2X) (Thermo Fisher, Mỹ): 12,5 μ l; cặp mồi E415G-Fc và E415G-Ras-W (10 μ M): 0,3 μ l; cặp mồi E415G-Fas-V và E415G-Rc (10 nmol/ μ l): 1 μ l; nước deion: 7,9 μ l; mẫu (30 ng/ μ l): 2 μ l; tổng thể tích 25 μ l. Chu trình nhiệt phản ứng: 95°C trong 5 phút; tiếp theo 40 chu kỳ: 95°C trong 45 giây, 54°C trong 45 giây, 72°C trong 35 giây; cuối cùng 72°C trong 5 phút.

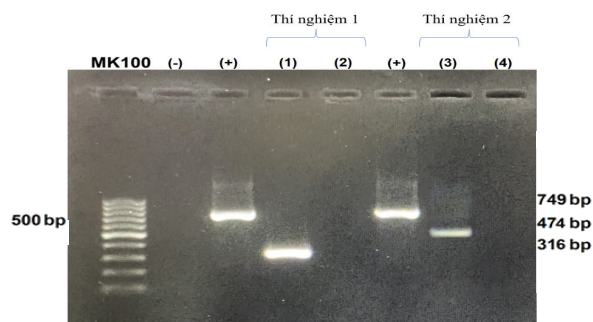
Điện di DNA trên gel agarose: Sau khi DNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR sẽ được tra vào giếng trên gel agarose 1,5% và đặt trong bể chứa dung dịch đệm TBE 0,5X. Bể chứa được đặt vào dòng điện một chiều với hiệu điện thế 120 V trong 30 phút. Sau khi kết thúc điện di, bản gel được lấy ra ngâm dưới Ethidium bromide và soi dưới ánh sáng tia tử ngoại của máy soi gel UVP.

Giải trình tự Sanger: Sản phẩm nhân gen được tinh sạch bằng kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher, Mỹ), giải trình tự tự động ABI 3100 Avant, được thực hiện bởi Công ty Thương mại Apical Scientific Laboratory (Malaysia).

3. Kết quả

3.1. Kết quả tối ưu điều kiện PCR đơn mồi

Trước khi chuẩn hóa quy trình cho phản ứng tetra-primer ARMS PCR cần chuẩn hóa điều kiện PCR: nồng độ mồi, nhiệt độ gắn mồi cho từng cặp mồi đồng thời kiểm tra mỗi cặp mồi thiết kế có khuếch đại đặc hiệu bằng lên đúng kích thước như tính toán hay không. Chúng tôi sử dụng các mẫu DNA chuẩn đã biết trước kiểu gen để tiến hành chạy gradient nhiệt độ gắn mồi cho từng cặp mồi với dải nhiệt độ 52,1-62,1°C. Kết quả cho nhiệt độ gắn mồi là 54°C làm nhiệt độ gắn mồi cho phản ứng tetra-primer ARMS PCR. Chúng tôi tiếp tục tiến hành kiểm tra tính đặc hiệu của mồi alen đột biến và mồi alen thường có đặc hiệu cho từng alen tại nhiệt độ gắn mồi 54°C (hình 2).

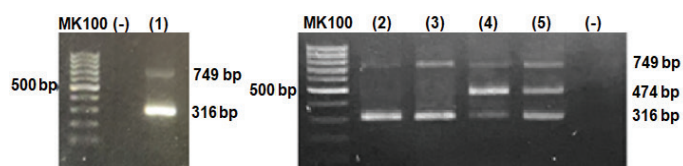


Hình 2. Kết quả kiểm tra tính đặc hiệu của mồi cho alen đột biến và alen thường. (-): đối chứng âm; (+): mẫu gen nội chuẩn làm chứng dương; MK100: thang chuẩn DNA 100 bp; (1, 4): DNA mẫu đồng hợp alen thường AA; (2, 3): DNA mẫu đồng hợp tử alen đột biến GG.

Quan sát kết quả hình 2, thí nghiệm 1 sử dụng mồi đặc hiệu cho alen thường thì chỉ có giếng số (1) của mẫu đồng hợp alen thường AA là lên băng 316 bp, giếng số (2) của mẫu đồng hợp tử alen đột biến GG không xuất hiện băng; thí nghiệm 2 sử dụng mồi cho alen đột biến thì giếng (3) của phản ứng sử dụng DNA mẫu GG lên băng 474 bp còn giếng số (4) của phản ứng sử dụng DNA có kiểu gen AA thì không có băng. Chứng (+) là các phản ứng khuếch đại đoạn gen nội chuẩn đều lên băng 749 bp, như vậy, DNA của các mẫu đều không có vẩn đục; chứng (-) không xuất hiện băng đảm bảo phản ứng PCR thực hiện đúng kỹ thuật. Có thể thấy, đối với phản ứng đơn mồi đặc hiệu cho alen đột biến và alen thường tại nhiệt độ gắn mồi 54°C là rất tốt, không xảy ra tình trạng mồi đột biến lại được khuếch đại ở mẫu đồng hợp alen thường AA và ngược lại.

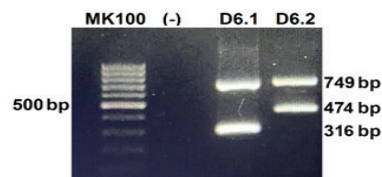
3.2. Kết quả tối ưu phản ứng tetra-primer ARMS PCR

Phản ứng tetra-primer ARMS PCR dùng cả 4 mồi trong 1 phản ứng do vậy sẽ có hiện tượng cạnh tranh giữa các mồi. Chính vì vậy, việc xác định tỷ lệ nồng độ các mồi trong phản ứng là điều vô cùng quan trọng. Tiếp theo, phản ứng tetra-primer ARMS PCR được tiến hành tối ưu nồng độ mồi tại nhiệt độ gắn mồi đã chọn là 54°C.



Hình 3. Kết quả tối ưu nồng độ mồi trên mẫu dị hợp tử (AG) bằng phản ứng tetra-primer ARMS PCR. (-): đối chứng âm; MK100: thang chuẩn DNA 100 bp. Nồng độ các mồi E415G-Fc, E415G-Ras-W, E415G-Fas-V, E415G-Rc lần lượt tại các giếng (1): 0,4 μ M, 0,4 μ M, 0,4 μ M, 0,4 μ M; (2): 0,16 μ M, 0,16 μ M, 0,4 μ M, 0,4 μ M; (3): 0,2 μ M, 0,2 μ M, 0,4 μ M, 0,4 μ M; (4): 0,08 μ M, 0,08 μ M, 0,4 μ M, 0,4 μ M; (5): 0,12 μ M, 0,12 μ M, 0,4 μ M, 0,4 μ M.

Kết quả điện di trên gel cho thấy, tại nồng độ mồi 0,4 μ M E415G-Fas-V, 0,4 μ M E415G-Rc, 0,12 μ M E415G-Fc, 0,12 μ M E415G-Ras-W xuất hiện cả 3 băng đích là 749, 474 và 316 bp đều sáng rõ, không xuất hiện băng phụ phù hợp với kiểu gen dị hợp tử của mẫu DNA khuôn đưa vào. Do đó, nồng độ các mồi này được sử dụng để chạy với các mẫu chuẩn đồng hợp thường AA (D6.1) và đồng hợp đột biến GG (D6.2) để kiểm tra độ đặc hiệu alen trong phản ứng tetra-primer ARMS PCR được kết quả như hình 4.



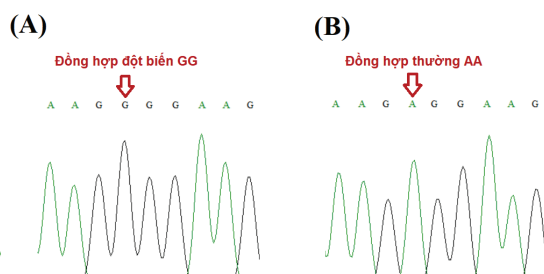
Hình 4. Kết quả phản ứng tetra-primer ARMS PCR với nồng độ mồi: 0,4 μ M E415G-Fas-V, 0,4 μ M E415G-Rc, 0,12 μ M E415G-Fc, 0,12 μ M E415G-Ras-W trên 2 mẫu chuẩn đồng hợp thường AA (D6.1) và đồng hợp đột biến GG (D6.2).

Kết quả điện di hình 4 cho thấy, tại mẫu đồng hợp alen thường (D6.1) xuất hiện 2 băng 749 bp cho gen nội chuẩn và 316 bp cho alen thường; mẫu đồng hợp đột biến (D6.2) cũng xuất hiện 2 băng 749 bp cho gen nội chuẩn và 474 bp cho alen đột biến. Như vậy, cả 2 mẫu đều lên các băng đúng kích thước như đã thiết kế ban đầu, các băng sáng rõ, đặc hiệu cho alen và không xuất hiện băng phụ. Sau khi chuẩn hóa các điều kiện, quy trình xác định SNP *exo-E415G* bằng kỹ thuật tetra-primer ARMS PCR đã được thiết lập thành công. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt của phản ứng tetra-primer ARMS PCR phát hiện SNP *exo-E415G*.

Thành phần	Thể tích (μl)	Nồng độ
Gotaq Green Mastermix (2X)	12,5	
E415G-Fc (10 μM)	0,3	0,12 μM
E415G-Ras-W (10 μM)	0,3	0,12 μM
E415G-Fas-V (10 μM)	1	0,4 μM
E415G-Rc (10 μM)	1	0,4 μM
H ₂ O	7,9	
DNA (30 ng/μl)	2	2,4 ng/μl
Tổng số	25	
Chu trình: 95°C-5 phút, (95°C-45 giây, 54°C-45 giây, 72°C-35 giây) x 40, 72°C-5 phút		

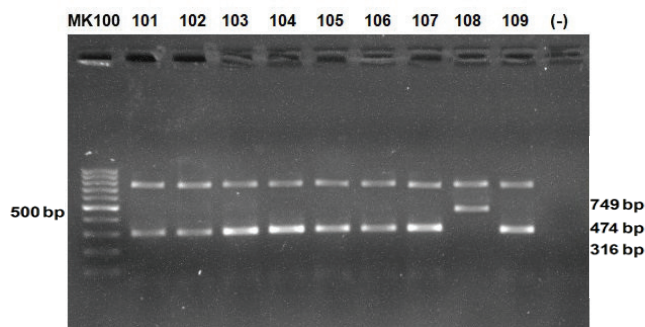
Trong số 123 mẫu bệnh phẩm, 16 mẫu được kiểm tra xác định kiểu gen *exo-E415G* bằng phương pháp Sanger. Kết quả cho thấy, 2 phương pháp có độ tương đồng 100%; trong 16 mẫu có 3/16 mẫu có kiểu gen AA; 13/16 mẫu có kiểu gen GG, không có mẫu mang kiểu gen dị hợp AG (hình 5).



Hình 5. Kết quả giải trình tự khẳng định tính chính xác của phản ứng tetra-primer ARMS PCR. (A) Mẫu đồng hợp alen đột biến; (B) Mẫu đồng hợp alen thường.

3.3. Kết quả khảo sát tỷ lệ đột biến *exo-E415G* tại khu vực Tây Nguyên

Sau khi đã tối ưu thành công quy trình phản ứng tetra-primer ARMS PCR xác định SNP *exo-E415G*, chúng tôi tiến hành kiểm tra trên toàn bộ 123 mẫu bệnh thất bại điều trị với artemisinin tại 3 tỉnh (Gia Lai, Đắk Nông, Đắk Lắk) thuộc khu vực Tây Nguyên. Kết quả cụ thể thu được như ở hình 6 và bảng 2.



Hình 6. Kết quả khảo sát đột biến *exo-E415G* bằng phản ứng tetra-primer ARMS PCR trên một số mẫu. (-): đối chứng âm; MK100: thang chuẩn ADN 100 bp; 101-109: các mẫu ADN được tách từ mẫu máu toàn phần.

Bảng 2. Kết quả khảo sát đột biến *exo-E415G* khu vực Tây Nguyên.

Kiểu gen	Tỷ lệ mẫu			Tổng số
	Gia Lai	Đắk Nông	Đắk Lắk	
AA	14/48 (29%)	8/40 (20%)	5/35 (14%)	27/123 (22%)
AG	0/48 (0%)	0/40 (0%)	0/35 (0%)	0/123 (0%)
GG	34/48 (71%)	32/40 (80%)	30/35 (86%)	96/123 (78%)

Tỷ lệ mẫu mang đột biến *exo-E415G* tại khu vực Tây Nguyên là 78% (96/123) trong đó, tỉnh Đắk Lắk có tỷ lệ đột biến cao nhất lên đến 86% (30/35), tỉnh Gia Lai có tỷ lệ đột biến thấp nhất là 71% (34/48).

4. Bàn luận

Ngày nay với sự phát triển của công nghệ giải trình tự gen cùng với nghiên cứu tương quan toàn bộ nhiễm sắc thể (GWAS), chúng ta có thể xác định các dấu hiệu phân tử tiềm ẩn khả năng kháng thuốc như các SNP trong quần thể KST. Những báo cáo đầu tiên về KST *P. falciparum* kháng thuốc ở bệnh nhân thất bại điều trị bằng ACTs có liên quan đến SNP *exo-E415G*. Hiện tại đã có nhiều phương pháp được phát triển để xác định SNP, tuy nhiên các phương pháp này có giá thành cao, đòi hỏi trang thiết bị hiện đại, nhân viên được đào tạo kỹ thuật tốt. Để khắc phục hạn chế đó ở các phòng thí nghiệm chưa có trang thiết bị đầy đủ, cần triển khai một phương pháp đơn giản, tiết kiệm chi phí nhưng vẫn đảm bảo độ chính xác để xác định SNP *exo-E415G*. Các phần mềm tin sinh học được sử dụng để thiết kế mồi và thiết lập, tối ưu quy trình phản ứng tetra-primer ARMS PCR cho xác định SNP *exo-E415G*. Kết quả nghiên cứu này cho thấy độ tương đồng 100% khi đối chiếu so sánh với phương pháp giải trình tự gen.

Đột biến *exo-E415G* nằm trên gen mã hóa cho exonuclease, là các enzym phân cắt nucleotide từ đầu 3' hoặc 5' của ADN. Hoạt động exonuclease không chỉ trong quá trình sao chép ADN mà còn được cho là cần thiết trong sửa chữa kết nối không tương đồng. Các giả thuyết cũng được đưa ra rằng, đột biến *exo-E415G* làm ảnh hưởng đến khả năng đọc sửa của

exonuclease dẫn đến tăng hoặc giảm các đột biến trong KST làm hình thành các kiểu hình kháng thuốc. Tuy đột biến *exo-E415G* không làm thay đổi tính nhạy cảm với piperazine [9], các nghiên cứu gần đây cũng cho thấy, *exo-E415G* thường được liên kết chặt chẽ với sự gia tăng số bản sao gene *plasmepsin 2/3*, một chỉ thị sinh học khác liên quan đến tính kháng artemisinin [4, 6]. Vì vậy, các nghiên cứu tiếp theo trong tương lai có thể sẽ làm rõ hơn vai trò của đột biến *exo-E415G* đối với tính kháng artemisinin của *P. falciparum*.

Nghiên cứu này chỉ ra tỷ lệ mẫu bệnh phẩm mang alen đột biến chiếm 96/123 mẫu tương đương với 78% cho thấy đột biến rất phổ biến tại khu vực Việt Nam cũng tương tự như đã thấy ở nước láng giềng Lào, Thái Lan và Campuchia. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của H.H. Quang và cs (2021) [7] với tỷ lệ xuất hiện SNP *Exo-E415G* là 80%. Tuy nhiên, tỉnh Đắk Nông lại có sự gia tăng đáng kể tỷ lệ KST sốt rét mang đột biến từ 66,7% (2021) lên thành 80% (2022) chỉ trong một khoảng thời gian ngắn. Điểm chung của cả 3 tỉnh trong nghiên cứu này là đều có đường biên giới chung với Campuchia, nơi có tỷ lệ gia tăng đột biến *exo-E415G* ở mức cao trong khu vực. Trong khi đó, theo nghiên cứu của N.C. Phong và cs (2019) [2] tại tỉnh Ninh Thuận, nơi không có đường biên giới với Campuchia thì không tìm thấy đột biến *exo-E415G* tại khu vực này. Có thể thấy sự gia tăng tình trạng giao lưu, đi lại của người dân qua biên giới đặc biệt là với Campuchia đã làm tăng nguy cơ lan truyền sốt rét cũng như KST sốt rét kháng thuốc, gây trở ngại lớn đến công cuộc phòng chống sốt rét.

Từ những năm 2011 đến 2013 đã có sự gia tăng đáng kể tình trạng kháng thuốc với DHA-PPQ tại 3 tỉnh là Ratanakiri, Preah Vihear và Pursat của Campuchia [6]. Phân tích SNP trên toàn bộ bộ gen của KST *P. falciparum* đã xác định được đột biến *exo-E415G* trên nhiễm sắc thể số 13 có liên kết với sự tái phát của KST sau khi điều trị bằng DHA-PPQ. R. Amato và cs (2017) [6] đã tiến hành khảo sát SNP *exo-E415G* bằng phương pháp giải trình tự tại Campuchia thu được tỷ lệ đột biến tại 3 tỉnh Ratanakiri, Preah Vihear và Pursat lần lượt là 15,38 (2/13), 40 (8/20) và 81,58% (31/38) vào năm 2013; trong khi đó, tỷ lệ đột biến tại 3 tỉnh này vào năm 2011 lần lượt chỉ là 0 (0/71), 0 (0/66) và 58,5% (48/82). Như vậy, tần suất xuất hiện của *exo-E415G* ở Campuchia đã có xu hướng tăng lên theo thời gian và có nguy cơ lan rộng sang các nước láng giềng, trong đó có Việt Nam. Tuy nhiên, các nghiên cứu về *exo-E415G* tại Thái Lan và Lào hiện nay vẫn còn hạn chế, chưa có số liệu được công bố.

Tại châu Phi, rất ít trường hợp kháng với DHA-PPQ đã được mô tả tại đây. Hai trường hợp điều trị DHA-PPQ thất bại sau 30 và 32 ngày đã được báo cáo là các du khách người Ý trở về từ Ethiopia. Tại Senegal, DHA-PPQ không còn được coi là liệu pháp điều trị ưu tiên mà thay vào đó sự kết hợp artemether-lumefantrine và artesunate-amodiaquine được sử dụng nhiều nhất ở đây. Tổng số 77 mẫu bệnh nhân đang điều trị sốt rét tại Senegal đã được đem đi giải trình tự để khảo sát đột biến

exo-E415G, kết quả thu được tất cả các mẫu đều có kiểu hình hoang dã, như vậy *exo-E415G* không được tìm thấy tại Senegal [10]. Đường như với sự thay đổi và phối hợp các liệu pháp điều trị sốt rét khác nhau mà hiện tượng KST sốt rét mang đột biến kháng thuốc có thể không xảy ra phổ biến tại khu vực này. Năm 2020 cũng đã có những nghiên cứu tại Cameroon và Nam Mỹ những nơi chưa sử dụng ACTs làm liệu pháp chính để điều trị sốt rét thì kết quả cũng không phát hiện được đột biến *exo-E415G*. Điều này cũng chứng tỏ *exo-E415G* là một trong những chỉ thị sinh học phân tử đáng tin cậy để phát hiện KST *P. falciparum* kháng artemisinin.

5. Kết luận

Nghiên cứu này đã thiết lập được quy trình đơn giản, chính xác, tiết kiệm thời gian để xác định SNP *exo-E415G* bằng phương pháp tetra-primer ARMS-PCR. Phương pháp này cho kết quả chính xác khi so sánh với phương pháp giải trình tự. Nghiên cứu đã bước đầu khảo sát tần suất đột biến *exo-E415G* ở khu vực Tây Nguyên và kiến nghị phương pháp này nên được sử dụng cho xác định SNP *exo-E415G* trên quy mô lớn tại các điểm nóng về sốt rét tại Việt Nam cũng như trên thế giới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] World Health Organization (2021), *World Malaria Report 2011*, <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/worldmalaria-report-2021>, accessed 2 May 2022.
- [2] N.C. Phong, M. Chavchich, H.H. Quang, et al. (2019), "Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artemisinins and *Plasmodium vivax* to chloroquine in Phuoc Chien commune, Ninh Thuan province, south-central Vietnam", *Malar. J.*, **18**(1), DOI: 10.1186/s12936-019-2640-2.
- [3] V. Duru, B. Witkowski, D. Ménard (2016), "*Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin derivatives and piperazine: A major challenge for malaria elimination in Cambodia", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **95**(6), pp.1228-1238, DOI: 10.4269/ajtmh.16-0234.
- [4] M.R. Ansbro, C.G. Jacob, R. Amato, et al. (2020), "Development of copy number assays for detection and surveillance of piperazine resistance associated *plasmepsin 2/3* copy number variation in *Plasmodium falciparum*", *Malar. J.*, **19**, DOI: 10.1186/s12936-020-03249-x.
- [5] C. Nsanabana (2019), "Resistance to artemisinin combination therapies (ACTs): Do not forget the partner drug!", *Trop. Med. Infect. Dis.*, **4**(1), DOI: 10.3390/tropicalmed4010026.
- [6] R. Amato, P. Lim, O. Miotto, et al. (2017), "Genetic markers associated with dihydroartemisinin-piperazine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: A genotype-phenotype association study", *Lancet Infect. Dis.*, **17**(2), pp.164-173, DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30409-1.
- [7] H.H. Quang, M. Chavchich, N.T.M. Trinh, et al. (2021), "Multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* parasites in the central highlands of Vietnam jeopardize malaria control and elimination strategies", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **65**(4), DOI: 10.1128/AAC.01639-20.
- [8] R.F.V. Medrano, C.A.D. Oliveira (2014), "Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development", *Mol. Biotechnol.*, **56**(7), pp.599-608, DOI: 10.1007/s12033-014-9734-4.
- [9] N. Boonyalai, K. Kirativanich, C. Thamnurak, et al. (2022), "A single point mutation in the *Plasmodium falciparum* 3'-5' exonuclease does not alter piperazine susceptibility", *Malar. J.*, **21**, DOI: 10.1186/s12936-022-04148-z.
- [10] M.G. Robert, F.F. Tsombeng, M. Gendrot, et al. (2019), "Baseline *ex vivo* and molecular responses of *Plasmodium falciparum* isolates to piperazine before implementation of Dihydroartemisinin-piperazine in Senegal", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **63**(5), DOI: 10.1128/AAC.02445-18.