

Nghiên cứu phát hiện đột biến kháng artemisinin trên gen *K13* ở ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum*

Trần Thị Thu Huyền¹, Nguyễn Thị Lan Dung^{1,2}, Nguyễn Thùy Trang^{1,2},
Nguyễn Văn Ninh^{1,2}, Hồ Anh Sơn¹, Hoàng Văn Tổng^{1*}

¹Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân y

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày gửi bài 2/10/2020; ngày chuyển phản biện 8/10/2020; ngày nhận phản biện 24/11/2020; ngày chấp nhận đăng 2/12/2020

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu là xây dựng quy trình phát hiện đột biến trên gen *K13* và bước đầu xác định tần số đột biến trên gen này ở các mẫu lâm sàng. Phương pháp nghiên cứu: các mẫu ADN được tách chiết từ các mẫu máu của 50 bệnh nhân thất bại điều trị với artemisinin thu thập tại khu vực Tây Nguyên. Đoạn gene *K13* được nhân với các cặp mồi đặc hiệu, giải trình tự bằng phương pháp Sanger và phân tích đột biến sử dụng phần mềm Bioedit. Kết quả nghiên cứu: khuếch đại thành công đoạn gen *K13* có kích thước 799 bp ở chủng *P. falciparum*, sau khi giải trình tự phát hiện có sự thay thế nucleotide A>G tại vị trí 1740, dẫn tới sự thay đổi axit amin C>Y ở vị trí 580 tương ứng. Trong 50 mẫu bệnh phẩm, 41/50 (82%) mẫu xuất hiện đột biến C580Y và 9/50 (18%) mẫu không mang đột biến, ngoài ra không xuất hiện đột biến nào khác. Kết luận: đã thiết lập và tối ưu được quy trình phát hiện đột biến kháng artemisinin trên gen *K13* ở ký sinh trùng (KST) sốt rét *P. falciparum* và xác định tần số đột biến này trên gen *K13*.

Từ khóa: kháng artemisinin, *K13*, *P. falciparum*.

Chỉ số phân loại: 3.1

Đặt vấn đề

Sốt rét là một bệnh KST nguy hiểm gây tỷ lệ tử vong cao. Năm 2018, sốt rét được ước tính đã gây ra 405.000 ca tử vong trên toàn thế giới, hầu hết trong số đó do *P. falciparum* (Tổ chức Y tế thế giới - WHO, 2019). Theo WHO, liệu pháp điều trị kết hợp dựa trên artemisinin (ACT) là liệu pháp điều trị sốt rét do nhiễm KST *P. falciparum* hàng đầu hiện nay [1, 2], tuy nhiên trong năm 2008, những trường hợp đầu tiên có sự giảm hiệu quả điều trị của artemisinin đã được quan sát ở phía tây Campuchia [3]. Các nghiên cứu sau đó cho thấy sự lan truyền kháng thuốc khắp Đông Nam Á, đặc biệt hơn là ở phía tây Campuchia, Myanmar, Thái Lan, Lào và Việt Nam [4-8]. Sự xuất hiện kháng artemisinin ở Đông Nam Á cho thấy mối đe dọa nghiêm trọng trong công tác phòng chống sốt rét do *P. falciparum* trên phạm vi toàn cầu.

Gen *K13* là một đoạn exon mã hóa protein Kelch nằm trên nhiễm sắc thể số 13, hay còn gọi là protein Kelch 13. Tính kháng artemisinin liên quan chặt chẽ với các đột biến điểm đơn lẻ trong vùng propeller trên nhiễm sắc thể số 13 của *P. falciparum*, trong đó phổ biến nhất là đột biến C580Y, phân bố đặc trưng ở tiểu vùng phía đông sông Mê Kông. Việc xây dựng và hoàn thiện được quy trình xác định các chỉ điểm đột biến trên gen *K13* sẽ giúp mở ra một hướng tiếp cận mới để giám sát tình trạng kháng artemisinin, qua đó sẽ giúp ích cho công tác phòng chống sốt rét tại Việt Nam một cách hiệu quả hơn. Chính vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên

cứ phát hiện đột biến kháng artemisinin trên gen *K13* ở KST sốt rét *P. falciparum*.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Chúng tôi thực hiện nghiên cứu trên 50 mẫu bệnh phẩm đã thất bại trong việc điều trị với artemisinin được thu thập tại khu vực Tây Nguyên, Việt Nam để tối ưu quy trình phát hiện đột biến. Nghiên cứu được thực hiện tại Viện Nghiên cứu Y dược học Quân sự, Học viện Quân y. Chủng chuẩn KST *P. falciparum* (clone 3D7) được cung cấp bởi Viện Y học Nhiệt đới Tuebingen, CHLB Đức.

Phương pháp nghiên cứu

Tách DNA: mẫu chuẩn và 50 mẫu máu thu thập được tách bằng kit tách chiết DNA từ máu toàn phần GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ DNA được đo bằng máy NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), các mẫu DNA được bảo quản ở -30°C cho đến khi sử dụng cho phản ứng PCR.

Khuếch đại đoạn gen có chứa đột biến ở gen *K13* và giải trình tự: cặp mồi sử dụng cho phản ứng PCR và giải trình tự gen được đặt tổng hợp bởi Hãng IDT (Mỹ). Cặp mồi vòng 1 là: mồi xuôi 5'-GGG AAT CTG GTG GTA ACA GC-3' và mồi ngược 5'-CGG

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

Detection of mutations associated with artemisinin resistance in *K13* gene of *Plasmodium falciparum* parasites

Thi Thu Huyen Tran¹, Thi Lan Dung Nguyen^{1,2},
Thuy Trang Nguyen^{1,2}, Van Ninh Nguyen^{1,2},
Anh Son Ho¹, Van Tong Hoang^{1*}

¹Institute of Biomedicine and Pharmacy,
Vietnam Military Medical University

²University of Science, Vietnam National University, Hanoi

Received 2 October 2020; accepted 2 December 2020

Abstract:

Objective: this study aims to develop a methodology for detecting mutations in the *K13* gene and determine mutation frequencies in clinical samples. **Method:** total DNAs were extracted blood samples collected from 50 patients in failure with artemisinin treatment in the Central Highlands region. A fragment of the *K13* gene was amplified, purified, and sequenced by the Sanger method. The *K13* sequences were analysed by using Bioedit and aligned with the reference sequence to determine *K13* mutations. **Results:** successfully amplified the *K13* gene segment with size 799 bp in *P. falciparum*. After sequencing, there was a nucleotide substitution of A>G at position 1740, leading to changes in amino acids C>Y at the respective position 580. In the 50 patient samples, 41/50 (82%) samples showed the C580Y mutation, 9/50 (18%) of the samples had no mutation, and there was no other mutation. **Conclusion:** the authors have successfully developed and optimised a procedure for detecting the mutation C580Y in *K13* in *P. falciparum* and determined the mutation frequency in the *K13* gene.

Keywords: artemisinin resistance, *K13*, *P. falciparum*.

Classification number: 3.1

AGT GAC CAA ATC TGG GA-3', cặp mồi vòng 2 là: mồi xuôi 5'-GCC TTG TTG AAA GAA GCA GA-3' và mồi ngược 5'-GCC AAG CTG CCA TTC ATT TG-3' [3].

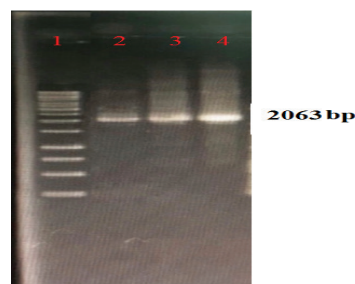
Thành phần phản ứng PCR nhân gen bao gồm phản ứng Nested-PCR vòng 1: master mix: 10 µl, primer K13-1F: 0,5 µl, primer K13-1R: 0,5 µl, nước: 7 µl, mẫu: 2 µl, tổng thể tích 20 µl. Phản ứng Nested-PCR vòng 2: master mix: 10 µl, primer K13-2F: 0,5 µl, primer K13-2R: 0,5 µl, nước: 7 µl, mẫu: 2 µl, tổng thể tích 20 µl. Chu trình nhiệt phản ứng PCR: phản ứng Nested-PCR vòng 1: 94°C trong 5 phút; tiếp theo 25 chu kỳ: 94°C trong 45 giây, 51°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút 25 giây. Cuối cùng 72°C

trong 5 phút. Phản ứng Nested-PCR vòng 2: 94°C trong 5 phút; tiếp theo 30 chu kỳ: 94°C trong 45 giây, 50°C trong 45 giây, 72°C trong 45 giây. Cuối cùng 72°C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%, phân tích kết quả [3]. Sản phẩm nhân gen được tinh sạch bằng kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), giải trình tự gen bằng phương pháp Sanger trên máy giải trình tự gen tự động, thực hiện bởi Công ty thương mại Macrogen (Seoul, Hàn Quốc) và phân tích kết quả trên phần mềm Bioedit.

Kết quả nghiên cứu

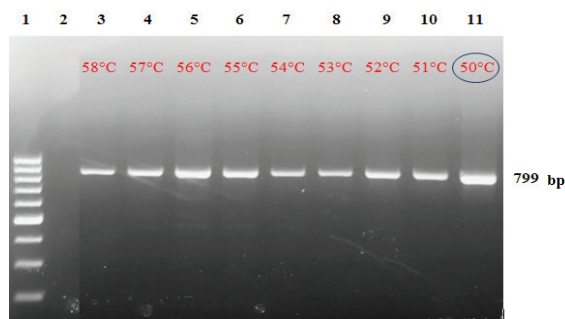
Kết quả tối ưu quy trình PCR

Thực hiện tối ưu các thành phần của quy trình Nested PCR nhân bản vùng gen *K13*: tối ưu nhiệt độ gắn mồi, nồng độ mồi cho cả 2 vòng của phản ứng. Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn mồi vòng 1 (hình 1): phản ứng PCR được thực hiện theo chương trình chạy gradient nhiệt độ gắn mồi với dải nhiệt độ từ 50-57°C để nhiệt độ gắn mồi không quá thấp và phù hợp với Tm của mồi. Sản phẩm phản ứng được điện di trên gel agarose 1,5% nhuộm trong dung dịch ethidium bromide trong 20 phút, quan sát và chụp ảnh trên hệ thống chụp ảnh gel để phân tích kết quả.



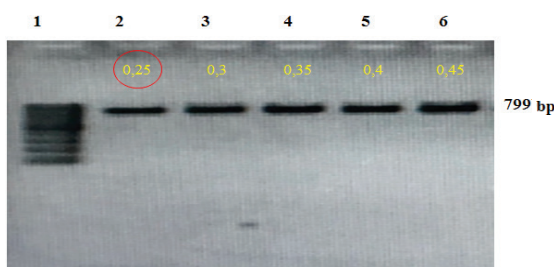
Hình 1. Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn mồi vòng 1. Giếng 1: marker 1 kb; giếng 2-4: nhiệt độ gắn mồi 51°C.

Kết quả điện di cho thấy, ở nhiệt độ gắn mồi khác nhau cho các kết quả khác nhau. Tại nhiệt độ 51°C cho tín hiệu băng sáng và rõ nét nhất, nhiệt độ này không quá thấp và không cao hơn nhiều so với Ta của mồi nên nhiệt độ gắn mồi tối ưu được lựa chọn là 51°C. Thực hiện thí nghiệm tương tự quy trình tối ưu nhiệt độ gắn mồi vòng 1, kết quả tối ưu nhiệt độ gắn mồi vòng 2 được thể hiện trong hình 2.



Hình 2. Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn mồi vòng 2. Giếng 1: thang DNA chuẩn 100 bp; giếng 2: ống đối chứng âm; giếng 3-11: sản phẩm PCR tại các nhiệt độ gắn mồi khác nhau lần lượt là 58°C, 57°C, 56°C, 55°C, 54°C, 53°C, 52°C, 51°C, 50°C.

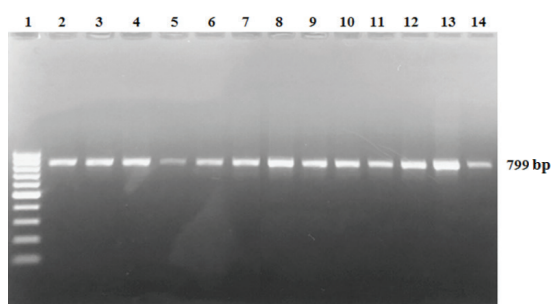
Tại nhiệt độ 50°C cho tín hiệu băng sáng, rõ nét, đậm nhất và là khoảng nhiệt độ thích hợp cho phản ứng PCR nên được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Tối ưu nồng độ môi: để chọn được nồng độ môi các cặp môi thích hợp cho phản ứng PCR cả 2 vòng, chúng tôi tiến hành thử nghiệm ở các dải nồng độ môi từ 0,25-0,45 μ M. Các nồng độ đều cho kết quả tốt, chúng tôi chọn nồng độ 0,25 μ M cho các lần chạy tiếp theo (hình 3).



Hình 3. Kết quả tối ưu nồng độ môi. Giếng 1: thang DNA chuẩn 100 bp; giếng 2-6: sản phẩm PCR tại các nồng độ môi lần lượt là 0,25; 0,3; 0,35; 0,4; 0,45 μ M.

Kết quả nhân gen K13

Sản phẩm Nested-PCR được điện di trên gel Agarose 1,5%, 120 V trong vòng 30 phút. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy các băng xuất hiện đều rõ nét, đúng kích thước 799 bp theo lý thuyết và không xuất hiện sản phẩm phụ (hình 4). Như vậy, điều kiện cho phản ứng nhân gen đã được tối ưu. Sản phẩm sẽ được tinh sạch sử dụng bộ kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher, Mỹ) và giải trình tự.

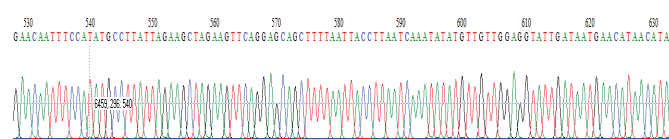


Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm Nested-PCR. Giếng 1: thang DNA chuẩn 100 bp; giếng 2-14: sản phẩm DNA điện di sau tinh sạch.

Kết quả giải trình tự Sanger

Chúng tôi đã tiến hành giải trình tự 50 sản phẩm tinh sạch PCR từ 50 mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân thất bại điều trị với artemisinin thu thập được ở khu vực Tây Nguyên, kết quả thu được thể hiện trong hình 5. Từ kết quả giải trình tự các mẫu thu được chúng tôi nhận thấy: các pick thu được có

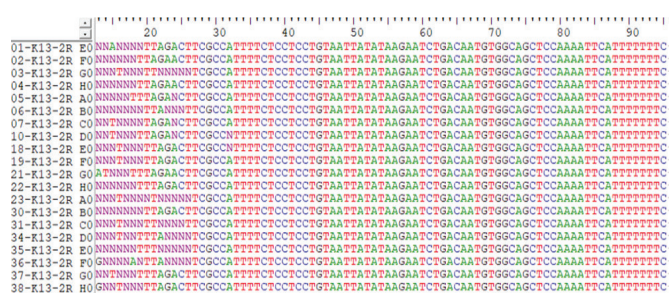
tín hiệu rõ ràng, không bị nhiễu, như vậy tất cả các mẫu của chúng tôi đã được giải trình tự thành công.



Hình 5. Kết quả giải trình tự đoạn gen K13 của mẫu bệnh.

Kết quả phân tích đột biến bằng phần mềm Bioedit

Sử dụng phần mềm Bioedit để so sánh trình tự đoạn gen K13 của mẫu bệnh phẩm thu được với trình tự tham chiếu gen K13 trên ngân hàng gen (mã số NC 004331.3), kết quả được thể hiện ở hình 6.

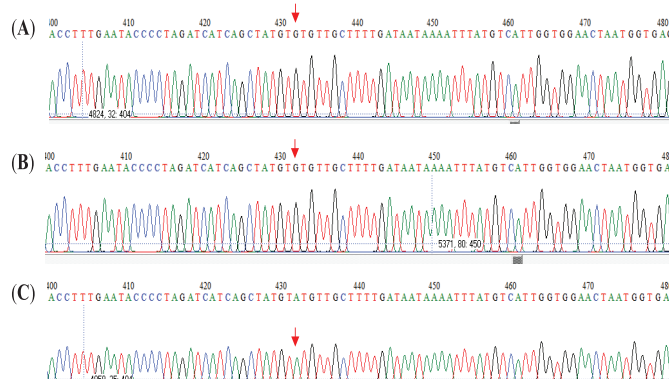


Hình 6. So sánh trình tự mẫu với trình tự tham chiếu trên GeneBank.

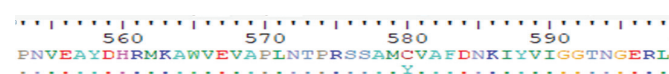
Phân tích 50 mẫu bệnh phẩm, chúng tôi thu được kết quả như hình 7, 8.



Hình 7. Vị trí xảy ra đột biến G>A.



Hình 8. Kết quả giải trình tự nhân gen K13. (A) chủng chuẩn, (B) mẫu không đột biến, (C) mẫu xảy ra đột biến thay thế nucleotide.



Hình 9. Đột biến C580Y.

Những mẫu có sự thay thế nucleotide A>G tại vị trí 1740 dẫn tới sự thay đổi axit amin C>Y ở vị trí 580 tương ứng, đột biến này được gọi là C580Y (hình 9). Trong tổng số 50 mẫu bệnh phẩm, chúng tôi thu được 41/50 (82%) mẫu xuất hiện đột biến C580Y này và chỉ có 9/50 (18%) mẫu không mang đột biến, không xuất hiện đột biến nào khác.

Bàn luận

Như vậy, trong nghiên cứu này của chúng tôi, đột biến C580Y chiếm ưu thế trong tổng số mẫu nghiên cứu, tỷ lệ này tương đương với nghiên cứu của B.Q. Phúc và cs (2017) [9] với tỷ lệ đột biến C580Y tại Việt Nam tăng từ 34,5 (năm 2015) đến 90,5% (năm 2017). Theo N.V. Thanh và cs (2017) [10], tỷ lệ đột biến C580Y tại Bình Phước năm 2015 xuất hiện trên 14/14 (100%) trường hợp thất bại điều trị với artemisinin. Nghiên cứu từ năm 2009 đến năm 2016 chỉ ra đột biến C580Y chiếm ưu thế cao, đặc biệt là 79,1% (34/43) phân lập ở tỉnh Bình Phước và 63% (17/27) phân lập ở tỉnh Gia Lai [10]. Theo nhiều nghiên cứu tổng hợp, tại Việt Nam có một số đột biến trên gen *K13* đó là: F446I, M476I, Y493H, R539T, I543T, P533L và C580Y, tuy nhiên không có bằng chứng cho thấy bất cứ KST nào mang nhiều hơn 1 đột biến và tần suất xuất hiện của các đột biến trên thay đổi theo từng giai đoạn. Tỷ lệ chủng KST có kiểu gen đột biến *K13* tăng từ 8,7 (20/231) năm 2009 lên 79,1% (34/43) năm 2016 ($p<0,001$). Tỷ lệ đột biến của C580Y tăng từ 1,7 (4/231) trong giai đoạn 2009-2010 lên 79,1% (34/43) trong giai đoạn 2015-2016 ($p<0,001$). Trái ngược với sự gia tăng về mức độ phổ biến của đột biến C580Y, đột biến I543T giảm tần số từ 10,2 (15/147) trong giai đoạn 2010-2011 xuống còn 2,1% (1/48) trong năm 2013-2014 và sau đó biến mất.

Đột biến *K13* được quan sát lần đầu tiên ở Pailin, miền tây Campuchia là C580Y và nó lan sang Thái Lan và Lào trong khoảng thời gian từ năm 2008 đến 2015. Hiện nay, đột biến này thường chiếm ưu thế ở Campuchia, Myanmar, Thái Lan, Lào và được coi là dấu hiệu phân tử mạnh đối với kháng artemisinin ở chủng *P. falciparum*. Nghiên cứu cũng cho thấy đột biến C580Y ở Campuchia, Thái Lan, Lào và Việt Nam có cùng nguồn gốc, trong khi đó đột biến C580Y ở Myanmar có nguồn gốc di truyền khác. C580Y cũng là đột biến duy nhất trên gen *K13* xuất hiện ở Nam Mỹ, tuy nhiên đột biến này được cho là có nguồn gốc độc lập so với đột biến C580Y ở Campuchia [11].

Nghiên cứu tại Việt Nam cho thấy sự gia tăng ưu thế của đột biến C580Y, tương tự như đã thấy ở các nước láng giềng Campuchia, Lào và Thái Lan. Một câu hỏi quan trọng là liệu các KST đột biến *K13*, và đột biến C580Y nói riêng được “nhập khẩu” từ các quốc gia khác trong khu vực hay chúng xuất hiện độc lập ở Việt Nam? Một nghiên cứu bao gồm một số KST từ tỉnh Bình Phước (có trong nghiên cứu hiện tại) cho thấy các mẫu của Việt Nam mang Y493H, I543T và đột biến C580Y có các dị dạng *K13* sườn dài giống hệt với các KST Campuchia [10]. Điều này cho thấy đột biến *K13* ở KST từ cả hai phía biên giới Việt Nam - Campuchia có chung một tổ tiên, mặc dù không thể xác định chắc chắn hướng nào của các chủng này đã lan rộng [12]. Mặt khác, đột biến C580Y trên gen *K13* ở Ninh Thuận và Gia Lai được quan sát thấy có các haplotypes lõi rất giống nhau và có sự khác biệt so với C580Y ở Bình Phước,

điều này cho thấy các đột biến ở hai địa điểm này có thể có nguồn gốc chung, đồng thời C580Y ở 2 tỉnh này có thể xuất hiện sớm hơn ở Bình Phước [13].

Theo S. Nair và cs (2018) [14], có đến 125 đột biến trên gen *K13* được phát hiện có liên quan đến tính kháng artemisinin, nhưng chỉ có đột biến C580Y được định hình và lan rộng tới các khu vực khác nhau, giả thuyết cho rằng đột biến C580Y giúp cho KST có sức đề kháng tốt hơn, khả năng chống chịu tác động tốt hơn, do đó giúp nó lan truyền mạnh mẽ hơn so với các đột biến khác.

Kết luận

Chúng tôi đã xây dựng và tối ưu thành công quy trình xác định đột biến trên gen *K13* ở KST sốt rét *P. falciparum* kháng artemisinin, và bước đầu xác định được tần suất đột biến C580Y trên gen *K13* là 82% trên các mẫu bệnh phẩm thu thập được.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S. Yeung, et al. (2004), “Antimalarial drug resistance, artemisinin-based combination therapy, and the contribution of modeling to elucidating policy choices”, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **71**(2 Suppl.), pp.179-186.
- [2] L. Tilley, et al. (2016), “Artemisinin action and resistance in *Plasmodium falciparum*”, *Trends in Parasitology*, **32**(9), pp.682-696.
- [3] F. Ariey, et al. (2014), “A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria”, *Nature*, **505**(7481), pp.50-55.
- [4] C. Wongsrichanalai, S.R. Meshnick (2008), “Declining artesunate-mefloquine efficacy against *falciparum* malaria on the Cambodia-Thailand border”, *Emerging Infectious Diseases*, **14**(5), pp.716-719.
- [5] H. Noedl, et al. (2008), “Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia”, *New England Journal of Medicine*, **359**(24), pp.2619-2620.
- [6] R. Leang, et al. (2013), “Efficacy of dihydroartemisinin-piperaquine for treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* in Cambodia, 2008 to 2010”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**(2), pp.818-826.
- [7] A.M. Dondorp, et al. (2009), “Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria”, *N. Engl. J. Med.*, **361**(5), pp.455-467.
- [8] N. Van Hong, et al. (2014), “Severe malaria not responsive to artemisinin derivatives in man returning from Angola to Vietnam”, *Emerging Infectious Diseases*, **20**(7), pp.1207-1210.
- [9] B.Q. Phuc, et al. (2017), “Treatment failure of dihydroartemisinin/piperaquine for *Plasmodium falciparum* malaria, Vietnam”, *Emerging Infectious Diseases*, **23**(4), pp.715-717.
- [10] N.V. Thanh, et al. (2017), “Rapid decline in the susceptibility of *Plasmodium falciparum* to dihydroartemisinin-piperaquine in the south of Vietnam”, *Malaria Journal*, **16**(1), pp.27-27.
- [11] L.C. Mathieu, et al. (2020), “Local emergence in Amazonia of *Plasmodium falciparum* *K13* C580Y mutants associated with in vitro artemisinin resistance”, *eLife*, DOI: 10.7554/eLife.51015.
- [12] M.T. Zaw, Z. Lin, N.A. Emran (2019), “Importance of *Kelch 13* C580Y mutation in the studies of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* in greater Mekong subregion”, *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, **53**(5), pp.676-681.
- [13] N. Thuy-Nhien, et al. (2017), “*K13* propeller mutations in *Plasmodium falciparum* populations in regions of malaria endemicity in Vietnam from 2009 to 2016”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **61**(4), DOI: 10.1128/AAC.01578-16.
- [14] S. Nair, et al. (2018), “Fitness costs and the rapid spread of *Kelch13*-C580Y substitutions conferring artemisinin resistance”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **62**(9), DOI: 10.1128/AAC.00605-18.