

# Gen PfATP6 dan Resistensi *Plasmodium falciparum* Terhadap Golongan Artemisinin

Jhons Fatriyadi Suwandi

Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung

## Abstrak

Resistensi *P. falciparum* terhadap antimalaria sangat bergantung pada kondisi genetik parasit tersebut. Gen yang saat ini dilaporkan bertanggung jawab terhadap timbulnya resistensi terhadap artemisinin adalah PfATP6. Hal ini sesuai dengan mekanisme kerja artemisinin yang menghambat *sarcoendoplasmic reticulum calcium-dependent ATPase* (SERCA)  $Ca^{2+}$ -pump ATPase6. Posisi mutasi yang ditemukan pada berbagai *codon* menyebabkan sulitnya menentukan posisi *codon* yang berkaitan dengan timbulnya resistensi ini. Berdasarkan penelitian yang telah dipublikasikan ditemukan 4 posisi *codon* (263, 431, 623, dan 769) yang secara tunggal atau bersama-sama menurunkan suseptibilitas terhadap artemisinin. Tingginya variasi genetik gen PfATP6, menimbulkan keraguan mengenai kaitannya pada resistensi Plasmodium terhadap artemisinin. Hal ini menunjukkan kemungkinan adanya gen atau protein lain yang bertanggung jawab terhadap mekanisme resistensi ini. Berbagai penelitian untuk mengungkap *marker* molekuler ini terus dilakukan. Penelitian di Kamboja melaporkan adanya *Mutant K13-propeller alleles* pada isolat Plasmodium yang resisten terhadap artemisinin di Kamboja. Berdasarkan hasil penelitian ini, tampak bahwa mekanisme resistensi *P. falciparum* terhadap artemisinin tidak sepenuhnya berkaitan dengan gen PfATP6. [JuKe Unila 2015; 5(9):141-146]

**Kata kunci:** artemisinin, PfATP6, *Plasmodium falciparum*, resistensi

## PfATP6 Gene and *Plasmodium falciparum* Resistance Againsts Artemisinin Derivate

### Abstract

Resistance of *P. falciparum* to antimalarial highly dependent on the parasite genetic condition. PfATP6 is a gene that has been reported to be responsible for the emergence of resistance to artemisinin. This is consistent with the mechanism of action of artemisinin, which inhibits sarcoendoplasmic reticulum calcium-dependent ATPase (SERCA)  $Ca^{2+}$ -pump ATPase6. The position of the mutations found in various *codon*, causing difficulty of determining *codon* positions related to the emergence of resistance. Based on published studies found 4 *codon* position (263, 431, 623, and 769), singly or together, causing a decrease of artemisinin susceptibility. High genetic variation of gene PfATP6, causing doubts about the link of this gene in Plasmodium resistance to artemisinin. This suggests, the possibility of other genes or proteins that are responsible for this resistance mechanism. Various studies to unravel the molecular marker is being conducted. Research in Cambodia reported, the presence of *Mutant K13-propeller alleles* in Plasmodium isolates were resistant to artemisinin. Based on these results it appears that the mechanism of resistance of *P. falciparum* to artemisinin is not fully related to gene PfATP6. [JuKe Unila 2015; 5(9):141-146]

**Keywords:** artemisinin, PfATP6, *Plasmodium falciparum*, resistance

Korespondensi: Dr. dr. Jhons Fatriyadi Suwandi, M.Kes., alamat Jl. Soemantri Brojonegoro No.1, HP 081369038928, e-mail yadisuwandi04@gmail.com

### Pendahuluan

Resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap berbagai antimalarial telah dilaporkan. Di Indonesia resistensi terhadap antimalaria telah banyak dilaporkan. Adanya laporan resistensi Plasmodium terhadap klorokuin membuat pemerintah RI mengeluarkan kebijakan baru dalam standar pengobatan malaria dengan menggunakan kombinasi berbasis Artemisinin (*Artemisinin Base Combination Therapy*/ACT). Penggunaan ACT tersebut telah diberlakukan sejak tahun 2004 dan telah dilaksanakan di seluruh wilayah Indonesia.<sup>1</sup> Program pengendalian malaria

secara menyeluruh tertuang dalam Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 293/MENKES/SK/IV/2009 tanggal 28 April 2009 tentang eliminasi malaria di Indonesia.<sup>2</sup>

Timbulnya resistensi *P. falciparum* terhadap berbagai antimalaria berkaitan dengan kondisi genetik dari parasit tersebut. Terdapat beberapa gen yang telah dilaporkan bertindak sebagai *biomarker* resistensi *P. falciparum* terhadap antimalaria. Beberapa gen tersebut adalah gen PfCRT sebagai *biomarker* resistensi terhadap klorokuin dan amodiakuin. Gen PfMDR1 sebagai *biomarker* suseptibilitas *P. falciparum* terhadap golongan

arilaminoalkohol kuinolin dan 4-aminokuinolin.<sup>3-9</sup>

Gen yang dilaporkan menjadi dasar timbulnya resistensi terhadap artemisinin adalah PfATP6. Hal ini berkaitan dengan mekanisme kerja artemisinin yang menghambat *sarcoendoplasmic reticulum calcium-dependent ATPase* (SERCA)  $Ca^{2+}$ -pump ATPase.<sup>9-13</sup> Tulisan ini akan membahas mengenai gen PfATP6 dan kaitannya dengan resistensi *P. falciparum* terhadap artemisinin dan derivatnya.

## Isi

Antimalaria kelompok artemisinin merupakan senyawa yang berasal dari tumbuhan *Artemisia annua*. Artemisinin dan derivatnya telah lama digunakan sebagai antimalaria yang potensial terhadap stadium aseksual dan gametosit *P. falciparum* dan stadium aseksual *P. vivax*.<sup>9,11-14</sup>

Terdapat beberapa teori tentang mekanisme kerja obat golongan ini. Teori pertama menyebutkan bahwa artemisinin berikatan secara kovalen dengan protein globin pada vakuola makanan Plasmodium. Ikatan ini akan mengkatalis heme sehingga ikatan endoperoksidase terpotong dan melepaskan radikal bebas yang dapat membunuh Plasmodium.<sup>10-13,15</sup>

Teori yang kedua menyebutkan adanya penghambatan kerja sarkoplasmik endoplasmik retikulum calcium ATPase (PfATP6) yang berada di dalam sitoplasma Plasmodium yang berfungsi pada regulasi ion  $Ca^{2+}$ . Ion  $Ca^{2+}$  berperan pada fungsi vital Plasmodium yang meliputi metabolisme sel, diferensiasi sel, motilitas, dan kemampuan invasi ke sel hospes.<sup>16,17</sup> Protein PfATP6 tersebut dapat dihambat kerjanya oleh suatu inhibitor yaitu *thapsigargin* (*thapsigargin-bindingcleft*). Struktur molekul *thapsigargin* yang mirip dengan artemisinin menimbulkan dugaan bahwa artemisinin juga dapat menghambat kerja protein PfATP6.<sup>15,17</sup>

Penelitian terdahulu menyebutkan interaksi hidrofobik artemisinin dengan protein PfATP6 dan terputusnya ikatan endoperoksida oleh ion besi untuk membentuk *C-centered radical* akan menyebabkan kematian parasit. Bentuk ikatan tersebut merupakan interaksi hidrofobik antara artemisinin dengan residu hidrofobik asam amino PfATP6 pada posisi L263, I272, dan F273. Hasil analisis hubungan

struktur dan fungsi SERCA menyimpulkan bahwa residu asam amino L263 berperan pada sensitivitas terhadap artemisinin.<sup>9,10,16,18-20</sup>

Secara genetik *P. falciparum* memiliki 14 kromosom yang dengan ukuran 22,8 Mega basa (Mb).<sup>21</sup> Di dalam seluruh kromosom ditemukan sebanyak 5.300 gen yang mengkode berbagai protein.<sup>22,23</sup>

Penelitian dengan pendekatan molekuler telah dilakukan untuk mengetahui posisi mutasi pada berbagai gen yang berhubungan dengan resistensi. Sesuai dengan teori mekanisme kerja artemisinin yang berhubungan dengan penghambatan kerja sarkoplasmik endoplasmik retikulum calcium ATPase, maka gen yang terkait dengan resistensi terhadap artemisinin adalah gen PfATP6. Gen ini terletak pada kromosom 1.<sup>22-24</sup>

Penggunaan ACT dalam waktu lama dapat menyebabkan timbulnya strain-strain yang resisten terhadap ACT khususnya komponen artemisinin. Hal ini terjadi karena adanya proses adaptasi dari parasit yang berkembang sehingga timbul mutasi-mutasi pada satu atau lebih basa nukleotida pada gen-gen tertentu. Adanya adaptasi dan mutasi ini akan meningkatkan kemampuan parasit untuk mentoleransi kerja artemisinin dan dapat berkembang menjadi *strain* resisten yang stabil. Beberapa posisi lokasi mutasi pada gen PfATP6 yang telah dilaporkan dan berkaitan dengan resistensi terhadap artemisinin, yaitu *codon* 263, 431, 623, dan 769.<sup>24</sup> *Codon* 263 dan 769 juga telah dilaporkan oleh beberapa peneliti lain berkaitan dengan penurunan sensitivitas terhadap artemisinin dan artemeter.<sup>10,16,19</sup>

Selain penelitian yang telah dilakukan oleh peneliti-peneliti tersebut, banyak penelitian lain yang mengungkap posisi mutasi pada gen PfATP6 yang dicurigai berkaitan dengan resistensi Plasmodium terhadap artemisinin. Hasil penelitian-penelitian ini menunjukkan posisi mutasi yang berbeda-beda dan tingkat sensitivitas artemisinin yang berbeda-beda pula. Seperti penelitian yang dilakukan di Nigeria, Afrika, yang dipublikasikan pada tahun 2009 menunjukkan adanya posisi mutasi yang berbeda dengan posisi pada penelitian sebelumnya. Analisis hasil *sequencing* menunjukkan perubahan basa nukleotida pada *codon* 537 (D537D) 1,1%, *codon* 561 (K561N) 1,1%, *codon* 569 (N569K)

17,2%, *codon*630 (A630S) 1,1%, dan *codon* 639 (G639D) 1,1%.<sup>25</sup>

Penelitian yang dilakukan dengan menganalisis gen PfATP6 *P. falciparum* isolat Vietnam, menemukan adanya mutasi pada *codon* I89T, N463S, N465S, N683K, *codon* N460N, I898I, dan C1031C. Tiga *codon* terakhir menunjukkan adanya mutasi pada basa nukleotida yang tidak mengubah asam amino.<sup>26</sup>

Penelitian yang dilakukan di Ghana menyebutkan ada 20 posisi *codon* yang telah mengalami mutasi. Lima posisi *codon* yang paling banyak ditemukan yaitu *codon* D639G (50%), *codon* E431K (10,3%), *codon* D443E (7,4%), dan *codon* M813Q (7,4%).<sup>27</sup>

Pada penelitian lain disebutkan bahwa angka prevalensi mutasi pada gen PfATP6 berbeda-beda tergantung pada asal isolat Plasmodium. prevalensi di Asia dilaporkan sebesar 5%, di Afrika sebesar 11%, dan di Amerika sebesar 16%. Posisi mutasi pun berbeda-beda pada berbagai isolat Plasmodium, namun *codon* yang terbanyak dilaporkan adanya mutasi yaitu pada posisi 500 sampai 800.<sup>28</sup>

Hasil yang berbeda dilaporkan dari penelitian di China pada tahun 2008 yang menunjukkan belum adanya mutasi pada *codon* S769N. Seperti diketahui bahwa pemakaian artemisinin di China telah berlangsung lama dan diberikan secara tunggal. Keadaan ini tentunya dapat saja menyebabkan timbulnya adaptasi bahkan mutasi dari Plasmodium, namun hasil penelitian tersebut belum ditemukan adanya mutasi.<sup>29</sup>

Berasarkan hasil penelitian-penelitian tersebut tampak ditemukan banyak posisi mutasi. Hal ini tentunya akan menyulitkan penentuan prediksi posisi mutasi yang berkaitan dengan resistensi terhadap artemisinin. Penelitian yang telah dilakukan pada 4 *codon* 263, 431, 623 dan 769 yang diprediksi berkaitan dengan suseptibilitas terhadap artemisinin tidak menunjukkan hasil yang konsisten. Walaupun demikian Keempat *codon* tersebut secara umum masih diprediksi dapat menyebabkan penurunan sensitivitas artemisinin, baik secara bersama-sama atau tunggal.<sup>16,24-26,28-30</sup> *Codon* 263 diprediksi sebagai asam amino yang berperan penting pada ikatan gen PfATP6 dengan artemisinin. Mutasi pada *codon* ini dapat menyebabkan ikatan

antara artemisinin dengan PfATP6 terganggu yang menyebabkan penurunan efek artemisinin.<sup>19,20,26</sup> Posisi mutasi yang telah dilaporkan pada *codon-codon* lain, belum ada kajian yang melaporkan secara spesifik bertanggung jawab terhadap penurunan efektivitas derivat artemisinin.<sup>16,24-26,29-30</sup>

Tingginya variasi genetik dengan posisi mutasi dan makna biologis yang berbeda antar isolat akan menyebabkan timbulnya keraguan kaitan gen PfATP6 dengan timbulnya resistensi terhadap artemisinin. Tidak menutup kemungkinan adanya gen atau protein lain yang mendasari timbulnya resistensi terhadap artemisinin. Keraguan ini telah diungkapkan pada hasil penelitian yang dilakukan di *Greater Mekong Subregion*.<sup>31</sup> Penelitian ini juga melaporkan telah ditemukan mutasi diberbagai *codon*, namun mutasi pada *codon* L263E, E431K/A623E, dan S769N tidak ditemukan. Hanya ditemukan adanya mutasi tunggal pada *codon* E431K pada 1 dari 116 sampel Myanmar dan 2 dari 13 sampel Vietnam.<sup>31</sup>

Berdasarkan penelitian yang memberikan hasil yang berbeda-beda dan adanya keraguan akan keterkaitan gen PfATP6 maka usaha penelitian untuk mengungkap fenomena ini terus dilakukan. Penelitian terbaru di Kamboja yang dilaporkan pada tahun 2014 menunjukkan adanya *Mutant K13-propeller alleles* pada isolat Plasmodium yang resisten terhadap artemisinin.<sup>32</sup> Kondisi mutasi ini dicurigai berkaitan dengan kelangsungan hidup Plasmodium secara *in vitro* dan penurunan parasitemia secara *in vivo*. Berdasarkan hal ini dapat dikatakan bahwa adanya indikasi *Mutant K13-propeller alleles* berkaitan dengan resistensi Plasmodium terhadap artemisinin dan derivatnya.<sup>32-34</sup> Penelitian lain untuk mengungkap fenomena *Mutant K13-propeller alleles* juga telah dilakukan di Uganda, walaupun hasilnya belum ditemukan adanya mutasi pada gen ini.<sup>35</sup>

Penelitian tentang gen PfATP6 pada isolat *P.falciparum* di Indonesia sampai saat ini belum ditemukan adanya publikasi ilmiah. Masih menjadi suatu pertanyaan bagaimana variasi genetik PfATP6 pada isolat Plasmodium di Indonesia. Melihat bahwa ada gen atau protein lain yang juga ditemukan pada isolat yang resisten terhadap artemisinin, menunjukkan mekanisme resistensi ini tidak hanya dipengaruhi oleh 1 gen saja. Kombinasi atau kerjasama berbagai protein atau gen

mungkin saja berpengaruh terhadap timbulnya resistensi ini. Kondisi ini seperti tampak pada mekanisme resistensi Plasmodium terhadap klorokuin yang di pengaruhi oleh mutasi pada gen PfCRT dan PfMDR1.<sup>8</sup>

### Ringkasan

Timbulnya resistensi *P.falciparum* terhadap klorokuin telah mengubah standar pengobatan malaria dengan menggunakan Artemisinin (*Artemisinin Base Combination Therapy/ACT*) sejak tahun 2004.<sup>1</sup>Timbulnya resistensi ini berkaitan dengan kondisi genetik dari parasit tersebut.Gen PfATP6 dilaporkan bertanggungjawab pada timbulnya resistensi terhadap artemisinin.<sup>9-13</sup>

Lamanya waktu dan tingginya intensitas penggunaan ACT dapat menyebabkan timbulnya strain yang resisten. Hal ini disebabkan proses adaptasi dari parasit.Proses adaptasi akan meningkatkan toleransi parasit terhadap kerja artemisinin sehingga dapat menjadi *strain* resisten yang stabil.<sup>24</sup>*Codon* 263, 431, 623, dan 769telah dilaporkan berkaitan dengan resistensi terhadap artemisinin.<sup>24</sup>Penurunan sensitivitas terhadap artemisinin dan artemeter berkaitan dengan*Codon* 263 dan 769.<sup>10,16,19</sup>Hasil penelitian yang dilakukan di China pada tahun 2008 menunjukkan mutasi pada *codon* S769Nbelum ditemukan.<sup>29</sup>

Berbagai hasil penelitian menyebutkan adanyaposisi mutasi lain, namun kajian secara spesifik kaitan terhadap penurunan efektivitas derivat artemisinin belum pernah dilaporkan.<sup>16,24-26,29-30</sup>Penelitian yang telah dilakukan pada 4 *codon* 263, 431, 623 dan 769 tidak menunjukkan hasil yang konsisten, walaupun secara umum masih diprediksi menyebabkan penurunan sensitivitas artemisinin.<sup>16,24-26,28-30</sup>

Tingginya variasi genetik antar berbagai isolat menyebabkan keraguan peran gen PfATP6 ini. Keraguan ini telah diungkapkan pada hasil penelitian yang dilakukan di *Greater Mekong Subregion*.<sup>31</sup>Penelitian di Kamboja menunjukkan adanya *Mutant K13-propeller alleles* pada isolat Plasmodium yang resisten terhadap artemisinin.<sup>32</sup>Kombinasi atau kerjasama berbagai protein atau gen mungkin saja berpengaruh terhadap timbulnya resistensi ini.

### Simpulan

Mekanisme resistensi *P. falciparum* terhadap artemisinin tidak sepenuhnya berkaitan dengan gen PfATP6. Terdapat mekanisme yang melibatkan gen lain yang menyebabkan timbulnya resistensi ini. Kajian untuk mengungkap *biomarker* molekuler yang berkaitan dengan penurunan suseptibilitas artemisinin sedang dikembangkan.

### Daftar Pustaka

1. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Pedoman penatalaksanaan kasus malaria di Indonesia. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2008.
2. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Pedoman penatalaksanaan kasus malaria di Indonesia. Jakarta: Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan lingkungan; 2011.
3. Reed MB, Saliba KJ, Caruana SR, Kirk K, Cowman AF. Pgh1 modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 2000; 403(6772):906-9.
4. Warhurst DC. A molecular marker for chloroquine resistant *falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2001;344(4):299-302.
5. Syafruddin D, Asih PBS, Casey GJ, Maguire J, Baird JK, Nagesha HS, et al. Molecular epidemiology of *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs in Indonesia. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 72(2):174-81.
6. Dokomajilar C, Lankoande ZM, Dorsey G, Zongo I, Ouedraogo J-B, Rosenthal PJ. Roles of specific *Plasmodium falciparum* mutations in resistance to amodiaquine and sulfadoxine-pyrimethamine in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 75(1):162-5.
7. Dokomajilar C, Nsohya SL, Greenhouse B, Rosenthal PJ, Dorsey G. Selection of *Plasmodium falciparum* *pfmdr1* alleles following therapy with artemether-lumefantrine in an area of Uganda where malaria is highly endemic. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(5):1893-5.
8. Humphreys GS, Merinopoulos I, Ahmed J, Whitty CJ, Mutabingwa TK, Sutherland CJ, et al. Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum* *mdr1* gene in

- Tanzanian children treated for uncomplicated malaria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(3):991-7.
9. Suwandi JF. Polimorfisme gen PfMDR1 dan PfATP6 pada isolat plasmodium dari penderita malaria falciparum di kabupaten Pesawaran [disertasi]. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada; 2014.
  10. Afonso A, Hunt P, Cheesman S, Alves AC, Cunha CV, do Rosario V, et al. Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6* (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(2):480-9.
  11. Katzung BG. Katzung's basic and clinical pharmacology. San Fransisco: McGraw Hill Medical; 2006.
  12. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Rang and dales pharmacology. Edisi ke-6. Philadelphia: Elsevier Inc; 2007.
  13. Waldman SA, Terzic A. Pharmacology and therapeutics principles to practice. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009.
  14. Brunton L, Parker K, Blumenthal D, Buxton I. Goodman and Gilman's manual of pharmacology and therapeutics. New York: McGraw Hill Medical; 2008.
  15. Golenser J, Waknine JH, Krugliak M, Hunt NH, Grau GE. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinin. *Int J Parasitol.* 2006; 36(14):1427-41.
  16. Menegon M, Sannella AR, Majori G, Severini C. Detection of novel point mutations in the *Plasmodium falciparum* ATPase6 candidate gene for resistance to artemisinins. *Parasitol Int.* 2008; 57(2):233-5.
  17. Kannan R, Kumar K, Sahal D, Kukreti S, Chauhan VS. Reaction of artemisinin with haemoglobin: implications for antimalarial activity. *Biochem J.* 2005; 418:409-18.
  18. Jung M, Kim H, Nam KY, No KT. Three-dimensional structure of *Plasmodium falciparum*  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PfATP6) and docking of artemisinin derivatives to PfATP6. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005; 15(12):2994-7.
  19. Dahlström S, Veiga MI, Ferreira P, Kaneko A, Andersson B, Björkman A, et al. Diversity of the sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase orthologue of *Plasmodium falciparum* (PfATP6). *Infect Genet Evol.* 2008; 8(3):340-5.
  20. Dahlström S. Role of PfATP6 and pf MRP1 in *Plasmodium falciparum* resistance to antimalarial drugs. Stockholm: Karolinska Institutet; 2009.
  21. Gardner MJ, Hall N, Fung E, White O, Berriman M, Hyman RW, et al. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 2002; 419(6906):498-511.
  22. Cheng Q, Cloonan N, Fischer K, Thompson J, Waite G, Lanzer M, et al. Stevor and rif are *Plasmodium falciparum* multicopy gene families which potentially encode variant antigens. *Mol Biochem Parasitol.* 1998; 97(1-2):161-76.
  23. Kyes SA, Rowe JA, Kriek N, Newbold CI. Rifins: a second family of clonally variant proteins expressed on the surface of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96(16):9333-8.
  24. Tahar R, Ringwald P, Basco L. Molecular epidemiology of malaria in Cameroon. XXVIII. In vitro activity of dihydroartemisinin against clinical isolates of *Plasmodium falciparum* and sequence analysis of the P. falciparum ATPase 6 gene. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 81(1):13-8.
  25. Ibrahim ML, Khim N, Adam HH, Arie F, Duchemin J-B. Polymorphism of PfATPase in Niger: detection of three new point mutations. *Malar J.* 2009; 8:28.
  26. Bertaux L, Quang LH, Sinou V, Thanh NX, Parzy D. New PfATP6 mutations found in *Plasmodium falciparum* isolates from Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(10):4570-1.
  27. Kwansa-Bentum B, Ayi I, Suzuki T, Otchere J, Kumagai T, Anyan WK, et al. *Plasmodium falciparum* isolates from southern Ghana exhibit polymorphisms in the SERCA-type PfATPase6 though sensitive to artesunate in vitro. *Malar J.* 2011; 10(1):187.
  28. Jambou R, Martinelli A, Pinto J, Gribaldo S, Legrand E, Niang M, et al. Geographic structuring of the *Plasmodium falciparum* sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PfSERCA) gene diversity. *PLoS One.* 2010; 5(2):e9424.

29. Zhang G, Guan Y, Zheng B, Wu S, Tang L. No PfATPase6 S769N mutation found in *Plasmodium falciparum* isolates from China. *Malar J.* 2008; 7:122.
30. Mugittu K, Genton B, Mshinda H, Beck HP. Molecular monitoring of *Plasmodium falciparum* resistance to artemisinin in Tanzania. *Malar J.* 2006; 5(126):3-5.
31. Miao M, Wang Z, Yang Z, Yuan L, Parker DM, Putaporntip C, et al. Genetic diversity and lack of artemisinin selection signature on the *Plasmodium falciparum* ATP6 in the Greater Mekong Subregion. *PLoS One.* 2013;8(3):e59192.
32. Ariey F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois AC, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.* 2014; 505(7481):50-5.
33. Kavishe RA, Paulo P, Kaaya RD, Kalinga A, van Zwetselaar M, Chionola J, et al. Surveillance of artemether-lumefantrine associated *Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein-1 gene polymorphisms in Tanzania. *Malar J.* 2014;13(1):264.
34. Zwing J, Dorsey G, Mårtensson A, d'alessandro U, Ndiaye J-L, Karema C, et al. *Plasmodium falciparum* clearance in clinical studies of artesunate-amodiaquine and comparator treatments in sub-Saharan Africa, 1999-2009. *Malar J.* 2014; 13:114.
35. Conrad MD, Bigira V, Kapisi J, Muhindo M, Kanya MR, Haviir DV, et al. Polymorphisms in K13 and falcipain-2 associated with artemisinin resistance are not prevalent in *Plasmodium falciparum* isolated from Ugandan children. *PLoS One.* 2014;9(8):e105690.