

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trần Thị Thu Huyền

**NGHIÊN CỨU SỰ BIẾN ĐỔI DI TRUYỀN CỦA MỘT SỐ
GENE KHÁNG THUỐC VÀ MỐI LIÊN QUAN ĐẾN KHÁNG
DIHYDROARTEMISININ-PIPERAQUINE Ở CHỦNG KÝ
SINH TRÙNG *Plasmodium falciparum* TẠI CÁC TỈNH CÓ
LƯU HÀNH BỆNH SỐT RÉT**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 942 02 01

Hà Nội – 2025

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Người hướng dẫn khoa học:

1. Người hướng dẫn 1: PGS.TS. Nguyễn Văn Long – Cục Khoa học Quân sự - Bộ Quốc Phòng.
2. Người hướng dẫn 2: PGS.TS. Nguyễn Đăng Tôn – Viện Nghiên cứu hệ gen – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phản biện 1: GS.TS. Trần Huy Thịnh

Phản biện 2: PGS.TS. Trần Văn Khoa

Phản biện 3: PGS.TS. Cao Bá Lợi

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi giờ, ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
2. Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Sốt rét là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, đặc biệt phổ biến ở các khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới. Trong đó, ký sinh trùng *Plasmodium falciparum* là tác nhân gây tử vong cao nhất. Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) khuyến nghị sử dụng phác đồ điều trị dựa trên artemisinin (ACT) gồm DHA (dihydroartemisinin) và PPQ (piperaquine) cho sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* tại các quốc gia Đông Nam Á như Campuchia, Thái Lan, Lào và Việt Nam. Tuy nhiên, sự xuất hiện của các chủng *P. falciparum* kháng thuốc đã làm giảm hiệu quả của phác đồ này ở một số khu vực.

Để đối phó, việc đánh giá hiệu quả điều trị và theo dõi kháng thuốc là cần thiết. Những nghiên cứu về hiệu quả điều trị DHA-PPQ cung cấp dữ liệu quan trọng giúp cập nhật các hướng dẫn điều trị và duy trì hiệu quả các phương pháp hiện có, góp phần giảm tỷ lệ mắc bệnh và tử vong do sốt rét.

Theo dõi các chỉ thị phân tử cũng đóng vai trò quan trọng, cung cấp thông tin về sự hiện diện và lan rộng của kháng thuốc, giúp điều chỉnh các phác đồ điều trị. Các gen như *pfK13* (*plasmodium falciparum Kelch 13*), *pfpm2* (*plasmodium falciparum plasmepsin2*), và *pfEXO* (*plasmodium falciparum exonuclease*) liên quan đến khả năng kháng thuốc của *P. falciparum* được sử dụng để giám sát sự kháng thuốc.

Gen *pfK13* mã hóa protein Kelch liên quan đến kháng artemisinin. WHO đã xác định một số đột biến như C580Y, R539T, Y493H, I543T, và N458Y là chỉ thị kháng artemisinin. Gen *pfpm2* và *pfEXO* liên quan đến kháng PPQ, với các đột biến và tăng số lượng bản sao của chúng làm giảm hiệu quả điều trị.

Nhằm nghiên cứu kỹ hơn về tình trạng kháng thuốc, tôi tiến hành thực hiện luận án "***Nghiên cứu sự biến đổi di truyền của một số gene kháng thuốc và mối liên quan đến kháng Dihydroartemisinin-Piperazine ở chủng ký sinh trùng Plasmodium falciparum tại các tỉnh có lưu hành bệnh sốt rét.***

2. Mục tiêu nghiên cứu luận án

Mục tiêu 1. Nghiên cứu sự biến đổi di truyền và tần số đột biến của một số gen kháng thuốc ở ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum*.

Mục tiêu 2. Đánh giá hiệu quả điều trị của DHA – PPQ trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*.

Mục tiêu 3. Phân tích một số yếu tố liên quan tới hiệu quả của DHA – PPQ trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*.

Chương I. TỔNG QUAN

1.1. Bệnh sốt rét

Sốt rét là một bệnh truyền nhiễm do ký sinh trùng *Plasmodium* gây ra, lây truyền qua vết đốt của muỗi *Anopheles* cái. Đây là bệnh phổ biến ở các khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới, đặc biệt là ở châu Phi, châu Á và châu Mỹ Latin. Trong số các loài *Plasmodium*, *P. falciparum* là loài nguy hiểm nhất, chịu trách nhiệm cho phần lớn các ca bệnh nặng và tử vong.

Điều trị sốt rét do *P. falciparum* hiện nay chủ yếu dựa vào liệu pháp phối hợp artemisinin (ACT). Trong đó, dihydroartemisinin-piperaquine (DHA-PPQ) là một trong những phác đồ được ưu tiên sử dụng do bệnh nhân sốt rét do *P. falciparum* không biến chứng. Phương pháp này kết hợp hai loại thuốc để tăng hiệu quả điều trị và giảm nguy cơ phát triển kháng thuốc của ký sinh trùng.

Tuy nhiên, tình trạng kháng thuốc đang trở thành một thách thức lớn đối với việc điều trị sốt rét do *P. falciparum*. Đặc biệt, kháng thuốc đối với DHA-PPQ đã được ghi nhận tại một số khu vực, khiến việc điều trị trở nên khó khăn hơn. Kháng thuốc có thể dẫn đến thất bại điều trị, kéo dài thời gian bệnh và tăng nguy cơ biến chứng nghiêm trọng. Do đó, theo dõi hiệu quả điều trị và giám sát phân tử kháng thuốc là các biện pháp quan trọng trong việc kiểm soát và ngăn chặn bệnh sốt rét, đặc biệt là đối với các trường hợp do *P. falciparum* gây ra.

1.2. DHA-PPQ trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*

DHA-PPQ là một trong những liệu pháp ACT được sử dụng rộng rãi trong điều trị sốt rét do *P. falciparum*. DHA, một dẫn xuất của artemisinin, hoạt động bằng cách tạo ra các gốc tự do gây tổn thương cho màng tế bào ký sinh trùng, dẫn đến việc tiêu diệt chúng.

Piperaquine, một loại thuốc chống sốt rét lâu dài, giúp duy trì nồng độ thuốc trong máu cao đủ lâu để tiêu diệt hoàn toàn ký sinh trùng và ngăn ngừa tái phát.

Sự kết hợp này mang lại hiệu quả cao, giảm nguy cơ phát triển kháng thuốc và cải thiện tỷ lệ điều trị thành công. Hiệu quả của DHA-PPQ trong điều trị sốt rét do *P. falciparum* đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu lâm sàng và thử nghiệm trên diện rộng. DHA-PPQ có tỷ lệ điều trị thành công cao khi được sử dụng đúng liều lượng và thời gian. Tuy nhiên, hiệu quả của DHA-PPQ có thể bị giảm nếu ký sinh trùng phát triển khả năng kháng thuốc.

Đánh giá hiệu quả điều trị có vai trò tiên quyết trong giám sát sốt rét nói chung và sốt rét kháng thuốc nói riêng. Phương pháp nghiên cứu hiệu lực điều trị (TES - Therapeutic Efficacy Studies) là phương pháp *in vivo* chủ yếu được sử dụng để đánh giá hiệu quả điều trị sốt rét trên lâm sàng. TES bao gồm việc theo dõi bệnh nhân mắc sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* sau khi họ được điều trị bằng DHA-PPQ. Bệnh nhân được kiểm tra và lấy mẫu máu định kỳ trong 28-42 ngày sau điều trị để phát hiện sự tồn tại hoặc tái xuất hiện của ký sinh trùng. Các tiêu chí đánh giá gồm thời gian ký sinh thanh thải ký sinh trùng sốt rét (tỉ lệ dương tính với ký sinh trùng sốt rét vào ngày thứ 3 sau điều trị) và tỷ lệ thất bại điều trị. TES giúp xác định hiệu quả lâm sàng và ký sinh trùng của thuốc, đồng thời phát hiện sớm tình trạng kháng thuốc, từ đó cung cấp dữ liệu quan trọng để điều chỉnh phác đồ điều trị kịp thời.

1.3. Kháng thuốc ở ký sinh trùng sốt rét và sự biến đổi di truyền trên gen kháng thuốc ở ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum*

Tình trạng kháng thuốc ở ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* đang trở thành một vấn đề nghiêm trọng, đặc biệt là ở các vùng Đông

Nam Á và châu Phi. Kháng thuốc không chỉ làm giảm hiệu quả của các liệu pháp điều trị mà còn tăng nguy cơ tử vong và lây lan của bệnh. Phác đồ DHA-PPQ đã trở thành tiêu chuẩn vàng trong điều trị sốt rét, nhưng sự xuất hiện và lan rộng của kháng artemisinin đã đe dọa hiệu quả của phương pháp này.

Đột biến trong gen *pfK13*, chẳng hạn như C580Y, là nguyên nhân chính dẫn đến kháng artemisinin, làm kéo dài thời gian thanh trùng ký sinh trùng trong máu và gây ra thất bại điều trị.

Ngoài ra, gen *pfpm2* cũng đóng vai trò quan trọng trong kháng PPQ, một thành phần quan trọng của DHA-PPQ. Sự gia tăng số lượng bản sao của gen *pfpm2* đã được chứng minh làm giảm hiệu quả của PPQ, khiến ký sinh trùng có khả năng sống sót cao hơn dưới tác động của thuốc. Đặc biệt, đột biến E415G trên gen *pfEXO* ảnh hưởng đến cơ chế sửa chữa DNA của ký sinh trùng, góp phần vào kháng PPQ. Sự tương tác giữa các đột biến này có thể dẫn đến hiện tượng đa kháng thuốc, làm cho việc điều trị trở nên phức tạp và kém hiệu quả hơn.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mục tiêu 1: Mẫu máu khô trên giấy thấm Whatman từ 421 bệnh nhân sốt rét không biến chứng do nhiễm đơn thuần với *P. falciparum* bằng xét nghiệm lam máu nhuộm Giemsa, được thu thập được trong giai đoạn từ tháng 8 năm 2018 đến tháng 5 năm 2019 tại 4 tỉnh Đắk Nông, Gia Lai, Đắk Lắk, Bình Phước, thỏa mãn các tiêu chuẩn dưới đây:

Tiêu chuẩn lựa chọn:

- Nhiễm đơn thuần *P. falciparum*;
- Không phân biệt tuổi tác, giới tính;
- Bệnh nhân, người giám hộ hợp pháp cha mẹ chấp thuận tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- Nhiễm phối hợp hoặc đơn loài không phải *P. falciparum*;
- Không đồng ý tham gia nghiên cứu.

Mục tiêu 2: Hồ sơ bệnh án lưu trữ của các bệnh nhân đã tham gia đánh giá hiệu quả điều trị phác đồ DHA-PPQ trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* trong giai đoạn từ tháng 8 năm 2018 đến tháng 5 năm 2019.

****Tiêu chuẩn lựa chọn hồ sơ bệnh án được lựa chọn bao gồm:***

- Hồ sơ bệnh án của các bệnh nhân được chẩn đoán xác định mắc sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*.
- Các bệnh nhân trong hồ sơ đã được điều trị bằng phác đồ DHA-PPQ theo quy trình chuẩn, với đầy đủ thông tin về:
 - o Liều dùng, cách dùng và thời gian điều trị.
 - o Các phản ứng bất lợi liên quan đến thuốc (nếu có).
- Hồ sơ bệnh án có đầy đủ dữ liệu cần thiết, bao gồm:

- Thông tin hành chính: Họ tên, tuổi, giới tính, mã bệnh án, địa chỉ.
- Thông tin lâm sàng: Triệu chứng ban đầu, chẩn đoán xác định, tình trạng diễn biến trong quá trình điều trị.
- Kết quả các thông số xét nghiệm lâm sàng liên quan (thân nhiệt, mật độ ký sinh trùng).
- Thông tin theo dõi: Dữ liệu tái khám sau điều trị vào các mốc thời gian: ngày thứ 3, ngày thứ 7, ngày thứ 14, ngày thứ 28 và ngày thứ 42, bao gồm kết quả xét nghiệm ký sinh trùng và tình trạng lâm sàng.

*** Tiêu chuẩn loại trừ hồ sơ bệnh án:**

- Hồ sơ bệnh án bị rách, mất trang, mờ hoặc sai lệch thông tin.
- Thiếu thông tin quan trọng như chẩn đoán, kết quả xét nghiệm hoặc dữ liệu theo dõi.
- Chẩn đoán không phù hợp:
 - Hồ sơ không ghi nhận sự hiện diện của *P. falciparum* hoặc có sự hiện diện đồng thời của các loài *Plasmodium* khác.
 - Bệnh nhân bị sốt rét biến chứng hoặc mắc bệnh lý đồng mắc nghiêm trọng như suy gan, suy thận, HIV/AIDS.
- Bệnh nhân không tuân thủ phác đồ điều trị DHA-PPQ hoặc bỏ dở điều trị.

Mục tiêu 3: Hồ sơ bệnh án của 63 bệnh nhân mắc sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* được điều trị bằng DHA-PPQ và dữ liệu đột biến gen *pfK13*, *pfpm2*, *pfEXO* ở ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum*

2.2. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu đã được thông qua hội đồng đạo đức trong nghiên cứu của Học viện Quân y theo Số 1690/GCN-HVQY ngày 04 tháng 6 năm 2018. Tất cả những người tham gia được thông báo lợi ích, mục đích của nghiên cứu và các quy trình được sử dụng trong việc thu thập dữ liệu.

2.3. Thời gian, địa điểm tiến hành nghiên cứu

- Địa điểm: tại Viện Nghiên cứu Y dược học, Học Viện Quân y; Viện Sốt rét và Ký sinh trùng Trung ương.
- Thời gian nghiên cứu từ tháng 6 năm 2019 đến tháng 3 năm 2020.

2.4. Hoá chất, trang thiết bị, dụng cụ

Các hóa chất, máy móc và thiết bị phục vụ cho nghiên cứu này thuộc Viện Nghiên cứu Y dược học, Học Viện Quân y.

2.5. Phương pháp nghiên cứu

2.5.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả có phân tích

2.5.2. Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu

- Cỡ mẫu được tính theo công thức sau: $n = Z_{1-\alpha/2}^2 \frac{1-p}{\epsilon^2 p}$

Mục tiêu 1:

+ + Tham khảo tỉ lệ xuất hiện đột biến C580Y của gen *pfK13* tại khu Việt Nam giai đoạn 2015-2016 là 79,1%. Kết quả thay vào công thức ta có cỡ mẫu tối thiểu là $n = 102$ mẫu bệnh nhân.

+ Tỉ lệ xuất hiện đột biến gen *pfEXO* tham khảo từ kết quả nghiên cứu của tác giả Huỳnh Hồng Quang và cộng sự là 55,6%. Kết quả thay vào công thức ta có cỡ mẫu tối thiểu là $n = 307$ mẫu bệnh nhân.

+ Tỷ lệ xuất hiện đột biến gen *pfpm2* tham khảo từ kết quả nghiên cứu của tác giả D. Leroya và cộng sự là 54,1%. Kết quả thay vào công thức ta có cỡ mẫu tối thiểu là $n = 326$ mẫu bệnh nhân.

Như vậy cỡ mẫu tối thiểu để nghiên cứu biến đổi di truyền và tần số đột biến trên 3 gen ứng viên là 326 mẫu, dự trữ 10% mất thông tin thì nghiên cứu này cần 356 mẫu. Kết quả nghiên cứu của tôi đã thu thập được 421 bệnh nhân sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* đủ tiêu chuẩn tham gia nghiên cứu phục vụ khảo sát tần số đột biến trên các gen kháng thuốc

Mục tiêu 2:

Cỡ mẫu lựa chọn hồ sơ bệnh án trong nghiên cứu hồi cứu dựa vào công thức tính cỡ mẫu tham chiếu dựa trên bảng xác định cỡ mẫu của nghiên cứu của WHO (2009). Dựa vào tỷ lệ thất bại lâm sàng từ nghiên cứu trước sử dụng thuốc DHA-PPQ là dưới 10%, tỷ lệ 10% được chọn để xác định cỡ mẫu cho nghiên cứu này. Với khoảng tin cậy 95% và độ chính xác tuyệt đối 10% (d), tỷ lệ bệnh nhân mất theo dõi hoặc rút khỏi nghiên cứu được ước tính khoảng 10%. Do đó cỡ mẫu chung cho nghiên cứu là $49 + 8 = 57$ bệnh nhân. Nghiên cứu của tôi chọn lựa 63 bệnh án bệnh nhân đủ điều kiện cỡ mẫu cho nghiên cứu

2.6. Kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- Kỹ thuật đếm mật độ ký sinh trùng sốt rét
- Tách ADN tổng số được tách từ mẫu máu bằng bộ kit GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification.
- Định lượng và đánh giá độ sạch của ADN bằng quang phổ kế
- Xác định các đột biến trên các gen ứng viên *pfK13* bằng PCR và giải trình tự gen, khuếch đại bản sao *pfpm2* bằng Real – time PCR; phát hiện đột biến *pfEXO* bằng ARMS-PCR.

- Đánh giá hiệu quả điều trị của DHA-PPQ bằng phương pháp phân tích hồ bệnh án lưu trữ của bệnh nhân tham gia thử nghiệm hiệu quả điều trị..

2.7. Phân tích và xử lý số liệu

Trong nghiên cứu này, phân tích thống kê được thực hiện bằng Excel 2016 và phần mềm R (phiên bản 4.1.0) trên hệ điều hành Windows, với mức ý nghĩa thiết lập ở $p \leq 0,05$.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Nghiên cứu sự biến đổi di truyền và tần số đột biến của một số gen kháng thuốc ở ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum*

3.1.1. Tần số đột biến trên gen *pfK13* ở ký sinh trùng sốt rét

Trong tổng số 421 mẫu nghiên cứu, chúng tôi đã giải trình tự thành công tổng cộng 390, trong số các mẫu giải trình tự thành công, kí sinh trùng có đột biến C580Y trên gen *pfK13* là 356 mẫu (91,3%), kí sinh trùng không mang đột biến C580Y là 34 mẫu (8,7%).

Bảng 3. 1: Tần suất kí sinh trùng mang đột biến C580Y theo địa điểm nghiên cứu

<i>pfK13; n(%)</i>				
Địa điểm	C580Y	Kiểu đại	Tổng số	P ¹
Bình Phước	37,0 (86,0)	6,0 (14,0)	43,0 (100)	0,042
Đắk Lắk	89,0 (95,7)	4,0 (4,3)	93,0 (100)	
Đắk Nông	46,0 (83,6)	9,0 (16,4)	55,0 (100)	
Gia Lai	184,0 (92,5)	15,0 (7,5)	199,0 (100)	
Tổng số	356,0 (91,3)	34,0 (8,7)	390,0 (100)	

¹Fisher's exact test

Kết quả ban đầu cho thấy, đột biến C580Y là đột biến phổ biến tại các địa điểm có sốt rét lưu hành. Kết quả cụ thể tại từng địa điểm nghiên cứu như sau: Tại Đắk Lắk, tỉ lệ kí sinh trùng mang đột biến C580Y cao nhất 95,7%, tiếp đó là tỉnh Gia Lai (92,5%), Bình Phước (86%), thấp nhất ở tỉnh Đắk Nông (83,6%). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.2.2. Tần số thay đổi số lượng bản sao gen *pfpm2* ở ký sinh trùng sốt rét

Bảng 3.2: Tần số ký sinh trùng có sự thay đổi số lượng bản sao gen *pfpm2* theo địa điểm nghiên cứu

Địa điểm	<i>pfpm2</i> ; n(%)		Tổng số	P ¹
	1 bản sao	>1 bản sao		
Bình Phước	21 (55,3)	17 (44,7)	38 (100)	0,2
Đắk Lắk	52 (57,1)	39 (42,9)	91 (100)	
Đắc Nông	9 (47,4)	10 (52,6)	19 (100)	
Gia Lai	92 (44,4)	115 (55,6)	207 (100)	
Tổng số	174(49,0)	181(51,0)	355(100)	

¹Pearson's Chi-squared test

Kết quả khảo sát sự thay đổi số lượng bản sao gen *pfpm2* trên nhóm đối tượng nghiên cứu như sau: 51 % (181/355) bệnh nhân có ký sinh trùng mang nhiều bản sao *pfpm2* nghiên cứu. Khi xem xét phân bố tại từng địa điểm nghiên cứu, tỷ lệ bệnh nhân có ký sinh trùng >1 bản sao *pfpm2* như Đắc Nông (52,6%); Bình Phước (44,7%); Gia Lai (55,6%); Đắk Lắk (42,9%).

3.2.3. Tần số đột biến E415G trên gen *pfEXO* ở ký sinh trùng sốt rét

Bảng 3. 3: Tần suất ký sinh trùng mang đột biến E415G theo địa điểm nghiên cứu

Địa điểm	<i>pfEXO</i> ; n(%)		Tổng số	P ¹
	E415G	Kiểu đại		
Bình Phước	27 (84,4)	5 (15,6)	32 (100)	0,014
Đắk Lắk	79 (85,9)	13 (14,1)	92 (100)	
Đắc Nông	44 (78,6)	12 (21,4)	56 (100)	
Gia Lai	149 (70,0)	64 (30,0)	213 (100)	
Tổng số	299 (76,1)	94 (23,9)	393 (100)	

¹Pearson's Chi-squared test

Kết quả khảo sát tần suất đột biến trên gen *pfEXO* như sau: 76,1% (299/393) bệnh nhân có ký sinh trùng mang đột biến E415G. Tần suất đột biến E415G thay đổi ở các địa điểm nghiên cứu, cao nhất ở tỉnh Đắk Lắk (85,9%), tiếp đó là tỉnh tỉnh Bình Phước (84,4%) thấp nhất ở tỉnh Gia Lai (70%). Sự khác biệt về tần số ký sinh trùng mang đột biến E415G khác biệt theo địa điểm tiến hành nghiên cứu ($p < 0,05$).

3.2.4. Tần số kiểu gen phức ở ký sinh trùng sốt rét

Bảng 3.4: Tần số KSTSR mang kiểu gen C580Y/*pfpm2* theo địa điểm

Kiểu gen	Địa điểm nghiên cứu				Tổng số	P ¹
	Bình Phước	Đắk Lắk	Đắk Nông	Gia Lai		
C580Y+ <i>pfpm2</i>	13/37 (35,1)	33/83 (39,8)	6/17 (35,3)	98/193 (50,8)	150/330 (45,5)	0,13
C580Y+ E415G	25/31 (80,6)	69/84 (82,1)	35/52 (67,3)	121/199 (60,8)	250/366 (68,3)	0,00 2
E415G/<i>pfpm2</i> m2	9/27 (33,3)	36/83 (43,4)	6/16 (37,5)	74/206 (35,9)	125/332 (37,7)	0,7
C580Y+ E415G+ <i>pfpm2</i>	9/26 (34,6)	30/75 (40,0)	5/15 (33,3)	59/193 (30,6)	103/309 (33,3)	0,5

¹Fisher's exact test

Tỉ lệ ký sinh trùng mang kiểu gen C580Y/*pfpm2* là 45,5%, trong khi đó kiểu phức C580Y/E415G tương đối cao 68,3%, tại bình phước và Đắk Lắk xuất hiện hai đột biến đồng thời cao nhất với tỷ lệ trên 80%, sự khác biệt đối với các tỉnh còn lại có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

3.3. Đánh giá hiệu quả điều trị của DHA – PPQ trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*

Phân loại kết quả điều trị được thực hiện sau 42 ngày theo dõi. Kết quả điều trị DHA-PPQ trên bệnh nhân sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* được trình bày dưới đây:

Bảng 3. 5. Kết quả điều trị DHA-PPQ sau 42 ngày theo dõi

Phân loại điều trị	Bình Phước	Đắk Nông	Tổng số	<i>p</i> -Value *
	n, %	n, %	n, %	
Bệnh nhân hoàn thành theo dõi 42 ngày	ETF	0 (0)	0 (0)	0,042
	LCF	14 (31,8)	1 (5,3)	
	LPF	3 (6,8)	3 (15,8)	
	ACPR	21 (47,7)	11 (57,9)	
LOSS/WTH*	LOSS	3 (6,8)	4 (21,1)	
	WTH	3 (6,8)	0 (0)	3 (4,8)

*LOSS: Mất theo dõi; WTH: rút khỏi nghiên cứu

Tỉ lệ bệnh nhân khỏi bệnh sau 42 ngày theo dõi (ACPR) là 47,7% ở Bình Phước và 57,9% ở Đắk Nông, với tổng số bệnh nhân khỏi bệnh là 50,8%. Trong số bệnh nhân hoàn thành theo dõi 42 ngày, không có bệnh nhân nào thuộc nhóm ETF ở cả hai tỉnh. Tỉ lệ bệnh nhân thất bại điều trị muộn (LCF) ở Bình Phước là 31,8%, cao hơn đáng kể so với Đắk Nông là 5,3%. Tỉ lệ thất bại điều trị lâm sàng muộn (LPF) cũng có sự khác biệt, với Bình Phước chiếm 6,8% và Đắk Nông là 15,8%. Với tỉ lệ thất bại điều trị tổng cộng (gồm cả LCF và LPF) ở Bình Phước là 38,6% và ở Đắk Nông là 21,1%, rõ ràng rằng cả hai tỉnh đều có tỉ lệ thất bại điều trị vượt mức 10%.

3.4. Khảo sát một số yếu tố liên quan tới hiệu quả của DHA – PPQ trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*

Bảng 3.6. Kết quả phân tích mối liên quan giữa đột biến gen phức với kết quả điều trị thất bại bằng mô hình đơn biến

Yếu tố		Kết quả điều trị		Mô hình hồi quy logistic đơn biến	
		Thất bại	Đáp ứng	OR (95% CI)	P
<i>pfK13/pfEXO</i>	Không	2	9	-	-
	Có	13	0	4,5 (0,93-33,45)	0,085
<i>pfK13/pfpm2</i>	Không	10	18	-	-
	Có	11	4	4,95 (1,32-21,88)	0,023
<i>pfpm2/pfEXO</i>	Không	7	14	-	-
	Có	8	3	5,33 (1,15-30,81)	0,041
<i>pfK13/pfpm2/pfEXO</i>	Không	7	13	-	-
	Có	8	3	4,95 (1,06-28,75)	0,05

P: Wald test

Kết quả nghiên cứu cho thấy sự xuất hiện kiểu gen phức *pfK13/pfpm2*, *pfpm2/pfEXO* và đột biến trên cả 3 gen ứng viên cho thấy có mối liên quan với tình trạng điều trị thất bại. Cụ thể nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng sốt rét chưa đột biến trên *pfK13/pfpm2* có nguy cơ điều trị thất bại cao gấp 4,95 lần so với nhóm không, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ và 95% CI từ 1,32-21,88. Sau hiệu chỉnh bằng các yếu tố tuổi, BMI, mật độ ký sinh trùng sốt rét cho thấy OR tăng lên tới 7,78 lần, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng chưa đột biến trên *pfpm2/pfEXO* có nguy cơ điều trị thất bại cao gấp 5,33 lần so với

nhóm không, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ và 95% CI từ 1,15-30,81. Sau hiệu chỉnh bằng các yếu tố tuổi, BMI, mật độ ký sinh trùng sốt rét cho thấy OR tăng lên tới 8,12 lần. Nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng sốt rét chứa đột biến trên *pfK13/ pfp2/pfEXO* có nguy cơ điều trị thất bại cao gấp 4,95 lần so với nhóm không, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ và 95% CI từ 1,06-28,75. Kết quả hiệu chỉnh bằng các yếu tố đặc điểm chung bao gồm tuổi, địa điểm nghiên cứu, mật độ ký sinh trùng sốt rét, BMI cho thấy nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng sốt rét chứa 3 đột biến trên gen *pfp2, pfEXO, pfK13* có mối liên quan với tình trạng điều trị thất bại, cụ thể, sau hiệu chỉnh cho thấy OR tăng lên tới 7,71 lần, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Kết quả lựa chọn mô hình bằng phương pháp BMA cho thấy xây dựng được 7 mô hình từ 3 đột biến trên các gen ứng viên nhằm xác định vai trò và mối liên quan tới kết quả điều trị thất bại ký sinh trùng bằng phác đồ kết hợp. Từ biểu đồ trên ta thấy đột biến C580Y xuất hiện 82,2% các mô hình, tiếp theo là đột biến số lượng bản sao gen *pfp2* xuất hiện trong 39,2% các mô hình, còn đột biến E415G xuất hiện trong ít mô hình nhất với chỉ khoảng 19,2%.

Bảng 3.7. Các mô hình tốt nhất xác định hiệu quả điều trị sốt rét với sự tham gia các gen ứng viên

Các yếu tố	Mô hình 1	Mô hình 2	Mô hình 3	Mô hình 4	Mô hình 5
Hệ số chặn	0,00	-0,16	0,48	-0,27	-0,20
<i>pfK13 (C580Y)</i>	0,58	0,61	-	0,55	0,57
<i>pfpm2 (>1 bản sao)</i>	-	0,27	-	-	0,27
<i>pfEXO(E415G)</i>	-	-	-	0,07	0,09
Số biến	1	2	0	2	2
R²	0,18	0,253	0	0,183	0,258
BIC	-2,7	-2,17	0,000	0,60	1,06
Xác suất hậu định	0,392	0,297	0,100	0,074	0,059

Như vậy, từ 7 mô hình được phân tích, mô hình 1 và mô hình 2 được chọn là hai mô hình tốt nhất để dự đoán hiệu quả điều trị và nguy cơ thất bại điều trị sốt rét. Mô hình 1 chỉ sử dụng gen *pfK13 C580Y* với hệ số hồi quy 0,58, có $R^2 = 0,18$, $BIC = -2,7$ (thấp nhất), và xác suất hậu định 39,2% (cao nhất), cho thấy đây là mô hình đơn giản, hiệu quả và dễ triển khai. Nhờ tập trung vào *pfK13 C580Y*, mô hình này phù hợp để giám sát kháng artemisinin trên diện rộng, đặc biệt tại các vùng có nguồn lực hạn chế.

Mô hình 2, bổ sung thêm gen *pfpm2 (>1 bản sao)* với hệ số hồi quy 0,27, có $R^2 = 0,253$ (cao hơn mô hình 1), $BIC = -2,17$, và xác suất hậu định 29,7%. Mặc dù phức tạp hơn, mô hình này cải thiện độ chính xác dự đoán, đặc biệt trong các bối cảnh kháng PPQ xuất hiện cùng kháng artemisinin. Hai mô hình này được lựa chọn vì khả năng

cân bằng giữa tính hiệu quả, độ chính xác, và khả năng áp dụng thực tiễn trong các bối cảnh khác nhau.

Xác suất điều trị thất bại trong mỗi mô hình có thể được tính dựa trên các yếu tố di truyền liên quan như pfK13 C580Y và pfpm2 (>1 bản sao) thông qua mô hình logistic. Dưới đây là công thức tính xác suất thất bại điều trị cho mỗi mô hình.

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Mô tả tần số đột biến trên các gen ứng viên nghiên cứu tại các địa điểm nghiên cứu

4.1.1. Tần số đột biến C580Y trên gen *pfK13* ở ký sinh trùng sốt rét

Trong nghiên cứu này, tần suất C580Y trên gen *pfK13* là 91,3%, đây cũng là đột biến duy nhất trên gen *pfK13* được phát hiện. Tại Việt Nam, xu thế chung là sự gia tăng tần suất của C580Y theo thời gian cùng với sự biến mất dần của dạng đột biến khác trên gen *pfK13* được thể hiện xuyên suốt tại tất cả các khu vực đang điểm nóng sốt rét tại Việt Nam. Các kết quả trên cho thấy sự biến đổi đáng kể về tỷ lệ đột biến C580Y ở các vùng khác nhau trong Tây Nguyên Việt Nam. Nó cũng nhấn mạnh sự thay đổi theo thời gian và tác động của áp lực lựa chọn khác nhau đối với phân phối của các biến đổi chống lại thuốc của ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum*.

4.1.2. Tần số thay đổi số lượng bản sao gen *pfpm2* ở ký sinh trùng sốt rét

Nghiên cứu cho thấy tỷ lệ bệnh nhân có ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* mang nhiều bản sao gen *pfpm2* ở Việt Nam là 51%, với sự gia tăng đáng kể tại các tỉnh biên giới như Gia Lai và Bình Phước. Tại Đắk Lắk, tỷ lệ này là 72%, cho thấy mức độ kháng thuốc cao. Tình trạng tương tự cũng được ghi nhận ở Campuchia, nơi tỷ lệ này tăng mạnh sau khi áp dụng điều trị bằng DHA-PPQ, đặc biệt ở Pailin và Rattanakiri. Sự xuất hiện của kiểu gen đa kháng thuốc làm tình trạng thêm nghiêm trọng, đòi hỏi giám sát và nghiên cứu liên tục để kiểm soát hiệu quả. Ở biên giới Trung Quốc-Myanmar và Tây Phi, tình trạng kháng thuốc cũng được ghi nhận, tuy nhiên mức độ không phổ biến như ở Đông Nam Á.

4.1.3. Tần số đột biến E415G trên gen *pfEXO* ở ký sinh trùng sốt rét

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tỷ lệ đột biến E415G trong gen exonuclease của *P. falciparum* ở Đắc Lắc là 85,7%, tương tự kết quả tại Đắc Nông (55,6%) và Gia Lai (61,5%). Tần suất đột biến này gia tăng từ 85,5% (2017-2018) lên 91,1% (2019-2020) tại Đắc Lắc, cho thấy kháng thuốc PPQ đang phổ biến. Tuy nhiên, nghiên cứu tại Ninh Thuận không phát hiện đột biến này. E415G cũng hiếm gặp ở biên giới Trung Quốc-Myanmar và không xuất hiện nhiều ở châu Phi và Nam Mỹ. Sự xuất hiện của đột biến E415G tại Campuchia và Việt Nam cho thấy áp lực chọn lọc từ việc sử dụng DHA-PPQ.

4.1.4. Tần số kiểu gen phức ở ký sinh trùng sốt rét

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ kí sinh trùng sốt rét mang kiểu gen C580Y/*pfpm2* là 45,5%, trong khi đó kiểu phức C580Y/E415G tương đối cao 68,3%, tại Bình Phước và Đắc Lắc xuất hiện hai đột biến đồng thời cao nhất với tỷ lệ trên 80%, sự khác biệt đối với các tỉnh còn lại có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Kí sinh trùng mang kiểu gen C580Y/E415G chiếm 37,7%. Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ lưu hành kiểu gen phức C580Y/E415G/*pfpm2* là 33,3%.

Việc sử dụng DHA-PPQ tạo áp lực chọn lọc mạnh, dẫn đến phát triển và duy trì đột biến kháng thuốc và đa kháng thuốc phản ánh tính cục bộ của đột biến kháng thuốc ở Campuchia và Việt Nam, đòi hỏi giám sát và kiểm soát hiệu quả để ngăn chặn sự lan truyền của kháng thuốc

4.2. Kết quả điều trị sốt rét DHA-PPQ đối với bệnh nhân sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*

Nghiên cứu của chúng tôi đánh giá hiệu lực điều trị của phác đồ DHA-PPQ ở bệnh nhân sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* thông qua thử nghiệm TES. Việc xác định thời gian làm sạch ký sinh trùng được đo bằng tỉ lệ ký sinh trùng vào ngày thứ 3

(lý tưởng là sau 72 giờ kể từ khi bắt đầu điều trị) hiện được coi là một chỉ số thay thế để xác định các điểm nóng nghi ngờ có sự kháng thuốc artemisinin của *P. falciparum*. Kết quả theo dõi mật độ ký sinh trùng sốt rét sau 3 ngày sử dụng phác đồ của chúng tôi cho thấy mật độ ký sinh trùng sốt rét có xu hướng giảm nhanh, tuy nhiên sau 3 ngày thì tỉ lệ dương tính còn khá cao, cụ thể tỉ lệ dương tính chung cho cả hai địa điểm là 21,7% (Bình Phước: 22,7% và Đắk Nông: 18,8%).

Kết quả nghiên cứu này cho thấy tỉ lệ tái phát tích lũy tương đối cao, lên tới 22,6 % (95% CI 12,7-36,5%) và sự khác biệt giữa các địa điểm nghiên cứu không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$, điều này báo hiệu cho nguy cơ kháng PPQ tại các địa điểm nghiên cứu. Kết quả điều trị của DHA-PPQ sẽ được phân loại sau 42 ngày theo dõi. Kết quả điều trị thành công với phác đồ là 60,4%, tỉ lệ điều trị thất bại tại Bình Phước là 44,7%, tại Đắk Nông là 26,7%. Những kết quả này cùng nhiều báo cáo trước đó củng cố về sự suy giảm hiệu quả điều trị của DHA-PPQ với sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* tại Việt Nam.

Như vậy nghiên cứu hiệu lực điều trị của chúng tôi tương đồng với các báo cáo trước đó cho thấy hiệu lực điều trị của DHA-PPQ giảm dần qua thời gian, cùng với đó là sự gia tăng tỉ lệ dương tính ký sinh trùng sốt rét vào ngày thứ 3 sau điều trị, một dấu hiệu quan trọng của kháng artemisinin. Điều này cho thấy sự cần thiết việc theo dõi kháng thuốc thông qua các biến đổi di truyền này và xác định sự thay đổi trong khả năng của thuốc artemisinin tiêu diệt ký sinh trùng. Những thông tin này giúp cung cấp hướng dẫn quan trọng cho việc quản lý và điều trị sốt rét, đặc biệt là trong hoàn cảnh khi kháng thuốc đang lan rộng. Nó giúp các nhà nghiên cứu và nhà quản lý y tế

đánh giá hiệu quả của các loại thuốc và xác định liệu có cần phải thay đổi phác đồ điều trị hay không.

4.3. Khảo sát một số yếu tố liên quan tới hiệu quả của DHA – PPQ trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy các yếu tố nhân trắc (tuổi, thể trạng, địa điểm nghiên cứu) không ảnh hưởng tới hiệu quả điều trị của DHA-PPQ. Sự suy giảm hiệu quả điều trị của DHA-PPQ liên quan tới sự biến đổi di truyền trên các gen kháng thuốc.

Có nhiều nghiên cứu xây dựng mô hình đánh giá vai trò gen với hiệu quả điều trị của DHA-PPQ. Nghiên cứu của Van der Pluijm và cộng sự đã xây dựng mô hình hồi quy đa biến với ba dấu hiệu di truyền chính ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị sốt rét bằng DHA-PPQ bao gồm trạng thái đột biến *pfK13*, các đột biến trên gen *crt*, và tình trạng gia tăng bản sao của *pfpm2/3*. Kết quả cho thấy, sự gia tăng bản sao của *pfpm2/3* được xác định là có liên quan độc lập đến thất bại điều trị với HR (hazard ratio) là 2,620 ($p < 0,001$). như vậy sự gia tăng bản sao *pfpm2* này làm giảm hiệu quả của DHA-PPQ trong việc tiêu diệt ký sinh trùng sốt rét.

Nghiên cứu này cũng cho thấy, mặc dù đột biến C580Y phổ biến trong khu vực nghiên cứu và được xác định là dấu hiệu của kháng artemisinin, nó không cho thấy mối liên hệ độc lập với thất bại điều trị trong mô hình hồi quy đa biến, HR cho đột biến C580Y là 3,863 ($p = 0,060$) trong phân tích trước hiệu chỉnh và 0,632 ($p = 0,580$) sau khi điều chỉnh, không đạt mức ý nghĩa thống kê. Điều này có thể do tỉ lệ cao các ký sinh trùng mang đột biến *pfK13* C580Y, làm giảm khả năng phân biệt ảnh hưởng riêng của đột biến này khi có sự hiện diện của các yếu tố di truyền khác như nhân đôi *pfpm2/3* và các đột biến trên gen *pfcr*. Mô hình hồi quy đa biến cho thấy rằng

tình trạng nhân đôi *pfpm2/3* 3 và các đột biến trên gen *pfert* có vai trò quan trọng và độc lập trong thất bại điều trị bằng DHA-PPQ, trong khi đột biến *pfK13* C580Y không duy trì mối liên hệ độc lập với thất bại điều trị.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Sau khi nghiên cứu 421 bệnh nhân sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* tại 4 tỉnh: Bình Phước, Đắk Nông, Gia Lai và Đắk Lắk từ tháng 8 năm 2018 tới tháng 3 năm 2023 chúng tôi đưa ra một số kết luận sau:

- Đã nghiên cứu đánh giá được sự biến đổi di truyền và tần suất đột biến của một số gen kháng thuốc ở ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum*.

- o Trong đó, đột biến C580Y trên gen *pfK13* chiếm 91,3% và phổ biến nhất ở cả 4 tỉnh nghiên cứu.

- o Trên gen *pfpm2*, có số lượng bản sao tăng cao (51,0%).

- o Đột biến E415G trên *pfEXO* chiếm 76,1% trên tổng số mẫu nghiên cứu.

- o Sự lưu hành đột biến đơn và phức hợp các đột biến kháng thuốc có khác nhau ở một số tỉnh có bệnh sốt rét lưu hành.

- Đã đánh giá được hiệu quả điều trị của DHA – PPQ trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*.

- o DHA-PPQ suy giảm khả năng loại trừ ký sinh trùng sốt rét và ngăn ngừa tái phát với tỷ lệ D3 dương tính 21,7%, tỷ lệ tái phát tích lũy 22,6%.

- o Tỷ lệ khỏi bệnh thấp, ở Bình Phước và Đắk Nông lần lượt là 47,7% và 57,9%. Không xuất hiện thất bại ký sinh trùng sớm, tỷ lệ thất bại ký sinh trùng muộn lần lượt là 31,8% tại Bình Phước và 5,3% tại Đắk Nông.

- Đã phân tích được một số yếu tố liên quan tới hiệu quả của DHA – PPQ trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*. Sự biến đổi di truyền trên gen kháng thuốc có liên quan

đến thất bại điều trị, đặc biệt là các đột biến C580Y, E415G và số lượng bản sao *pfpm2*, với nguy cơ thất bại điều trị tăng so với bệnh nhân có ký sinh trùng mang đột biến

KIẾN NGHỊ

1- Tăng cường giám sát các đột biến di truyền ở ký sinh trùng sốt rét, tập trung vào các đột biến trên các gen *pfpm2*, *pfEXO*, và *pfK13*. Cần triển khai các chương trình giám sát di truyền trên diện rộng để đánh giá sự phân bố và tần suất của các đột biến này.

2- Nâng cao chiến lược kiểm soát sốt rét quốc gia bằng cách tích hợp dữ liệu phân tử vào các quyết định chiến lược nhằm cải thiện hiệu quả điều trị và giải quyết vấn đề kháng thuốc đang nổi lên.

3- Thúc đẩy các nghiên cứu nhằm hiểu rõ hơn về cơ chế kháng thuốc và xác định các phác đồ điều trị thay thế để đối phó với tình trạng kháng thuốc tại các khu vực lưu hành sốt rét

**DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **Thu Huyen Thi Tran**, Bui Thi Thu Hien, Nguyen Thi Lan Dung, Nguyen Thi Huong, Tran Thanh Binh, Nguyen Van Long, Nguyen Dang Ton, 2024, Evaluation of DHA-PPQ Efficacy and Molecular Marker in Uncomplicated Falciparum Patients: A Study across Binh Phuoc and Dak Nong, Vietnam, *Tạp chí Medicina*, 60(6), 1013.
2. **Tran Thi Thu Huyen**, Le Van Khanh, Bui Thi Thu Hien, Nguyen Thi Lan Dung, Nguyen Van Long, Nguyen Dang Ton, 2023, Reporting the impact of artemisinin resistance: Molecular surveillance of pfK13 and pfEXO mutations in Plasmodium falciparum in Southern provinces of Vietnam, *Tạp chí Công nghệ sinh học Việt Nam* 21(3), 393–405.