

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NCS. 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**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Hà Nội – 2025

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**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC ỨNG DỤNG

Ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 942 02 01

**Xác nhận của
Học viện Khoa học
và Công nghệ**

Người hướng dẫn 1

Người hướng dẫn 2



PGS.TS. Nguyễn Văn Long PGS.TS. Nguyễn Đăng Tôn

Hà Nội – 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: “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” là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của PGS.TS. Nguyễn Văn Long và PGS.TS. Nguyễn Đăng Tôn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc.

Luận án sử dụng một phần số liệu từ đề tài cấp nhà nước “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét và mô hình kết hợp quân dân y trong phòng chống bệnh sốt rét ở khu vực trọng điểm”, mã số KC.10.32/16- 20.

Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả.

Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày 23 tháng 01 năm 2025

Nghiên cứu sinh



Trần Thị Thu Huyền

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu sinh xin được bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Nguyễn Văn Long, Cục Khoa học Quân sự, Bộ Quốc Phòng và PGS.TS. Nguyễn Đăng Tôn Trưởng phòng Phân tích hệ gen, Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hướng dẫn, định hướng và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho nghiên cứu sinh trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu cũng như thực hiện luận án.

Nhân dịp này, nghiên cứu sinh cũng xin chân thành cảm ơn Ban Giám đốc, tập thể cán bộ giảng viên Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thuận lợi nhất cho nghiên cứu sinh trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Nghiên cứu sinh xin trân trọng cảm ơn Ban Lãnh đạo Viện Nghiên cứu hệ gen, Cán bộ phòng quản lý tổng hợp, đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi về mọi mặt, hỗ trợ nghiên cứu sinh thực hiện các thủ tục cần thiết để hoàn thành chương trình học tập và luận án.

Nghiên cứu sinh cũng xin chân thành cảm ơn đề tài “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét và mô hình kết hợp quân dân y trong phòng chống bệnh sốt rét ở khu vực trọng điểm”, mã số KC.10.32/16- 20, Viện sốt rét – ký sinh trùng-Côn trùng Trung ương đã tạo điều kiện và hỗ trợ nhiệt tình cho tôi trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thành luận văn này.

Nghiên cứu sinh xin trân trọng cảm ơn sự giúp đỡ, tạo điều kiện của lãnh đạo Viện nghiên cứu Y dược học Quân sự và tập thể cán bộ Trung tâm thử nghiệm lâm sàng và tương đương sinh học, Học viện Quân y đã ủng hộ, tạo điều kiện cho nghiên cứu sinh trong suốt thời gian học tập và hoàn thành luận án.

Cuối cùng, nghiên cứu sinh bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đối với gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã luôn tin tưởng và là nguồn động viên tinh thần lớn lao đối với nghiên cứu sinh trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu, hoàn thành luận án.

Hà Nội, ngày 23 tháng 01 năm 2025

Nghiên cứu sinh



Trần Thị Thu Huyền

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

| Viết tắt | Tiếng Anh | Tiếng Việt |
|------------------|--|---|
| ACPR | Adequate Clinical and Parasitological Response | Đáp ứng đầy đủ về lâm sàng và ký sinh trùng |
| ACT | Artemisinin-Based Combination Therapy | Liệu pháp phối hợp điều trị dựa trên artemisinin |
| AL | Artemether - Lumefantrine | |
| ARMS-PCR | Amplification Refractory Mutation System – Polymerase Chain Peaction | Phản ứng chuỗi trùng hợp khuếch đại đặc hiệu allen |
| AS-AQ | Artesunate-Amodiaquine | |
| BMA | Bayesian Model Average | |
| BMI | Body Mass Index | Chỉ số khối cơ thể |
| CNV | Copy Number Variation | Sự thay đổi số lượng bản sao |
| D | Day | Ngày |
| DHA | Dihydroartemisinin | |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid | |
| ETF | Early Treatment Failure | Thất bại điều trị sớm |
| GMS | Greater Mekong Subregion | Khu vực sông tiểu vùng Mê Kông |
| KST | | Ký sinh trùng |
| IC ₅₀ | Half-maximal Inhibitory Concentration | Nồng độ ức chế 50% ký sinh trùng sốt rét phát triển |
| LCF | Late Clinical Failure | Thất bại lâm sàng muộn |
| LPF | Late Parasitological Failure | Thất bại ký sinh trùng muộn |
| MSP | Merozoite Surface Protein | |
| OR | Odd Ratio | Tỉ suất chênh |
| PCR | Polymerase Chain Reaction | Phản ứng chuỗi Polymerase |
| <i>pfK13</i> | <i>Plasmodium falciparum Kelch 13</i> | |
| <i>pfEXO</i> | <i>Plasmodium falciparum exonuclease</i> | |
| <i>pfpm2</i> | <i>Plasmodium falciparum</i> | |

| Viết tắt | Tiếng Anh | Tiếng Việt |
|-----------------|---------------------------------|------------------------------|
| | <i>plasmepsin 2</i> | |
| PPQ | Piperaquine | |
| RDT | Rapid Diagnostic Test | Xét nghiệm chẩn đoán nhanh |
| SNPs | Single Nucleotide Polymorphisms | Tính đa hình đơn nucleotide |
| SP | Sulfadoxine pyrimethamine | |
| TES | Therapeutic Efficacy Study | Nghiên cứu hiệu lực điều trị |
| WHO | World Health Organization | Tổ chức Y tế Thế giới |

MỤC LỤC

| | |
|--|-----------|
| MỞ ĐẦU | 1 |
| 1.1. Giới thiệu về bệnh sốt rét..... | 5 |
| 1.1.1. Tình hình bệnh sốt rét trên thế giới..... | 6 |
| 1.1.2. Tình hình sốt rét tại Việt Nam | 7 |
| 1.1.3. Đặc điểm sinh học của ký sinh trùng sốt rét <i>P. falciparum</i> và vai trò gây bệnh trong y học..... | 8 |
| 1.1.4. Phương pháp phát hiện ký sinh trùng sốt rét | 11 |
| 1.2. Điều trị sốt rét do <i>P. falciparum</i> | 13 |
| 1.2.1. Lịch sử điều trị sốt rét do <i>P. falciparum</i> | 13 |
| 1.2.2. Phác đồ điều trị sốt rét hiện hành..... | 15 |
| 1.2.3. Vai trò của Dihydroartemisinin – Piperaquine trong điều trị sốt rét..... | 17 |
| 1.3. Các phương pháp theo dõi, đánh giá hiệu lực của thuốc điều trị sốt rét và kháng thuốc | 23 |
| 1.3.1. Thử nghiệm hiệu lực điều trị (Therapeutic Efficacy Study - TES).. | 23 |
| 1.3.2. Phương pháp in vitro..... | 25 |
| 1.3.3. Phương pháp sinh học phân tử..... | 26 |
| 1.4. Ký sinh trùng <i>P. falciparum</i> kháng thuốc..... | 28 |
| 1.4.1. Một số định nghĩa trong kháng thuốc sốt rét | 28 |
| 1.4.2. Chỉ thị phân tử trong theo dõi kháng Dihydroartemisinin-Piperaquine | 29 |
| 1.4.3. Tình hình ký sinh trùng <i>P. falciparum</i> kháng thuốc sốt rét..... | 36 |
| Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU | 39 |
| 2.1. Nghiên cứu sự biến đổi di truyền và tần số đột biến của một số gen kháng thuốc ở ký sinh trùng sốt rét <i>P. falciparum</i> | 39 |
| 2.1.1. Đối tượng nghiên cứu, thời gian, địa điểm | 39 |
| 2.1.2. Hoá chất, trang thiết bị, dụng cụ | 39 |
| 2.1.3. Phương pháp nghiên cứu | 40 |

| | |
|--|-----------|
| 2.1.4. Nội dung nghiên cứu và biến số nghiên cứu | 41 |
| 2.1.5. Kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu..... | 43 |
| 2.2. Đánh giá hiệu quả điều trị của DHA – PPQ trong điều trị sốt rét không biến chứng do <i>P. falciparum</i> | 49 |
| 2.2.1. Đối tượng, thời gian, địa điểm nghiên cứu | 49 |
| 2.2.3. Nội dung và biến số nghiên cứu đánh giá hiệu quả phác đồ DHA-PPQ..... | 51 |
| 2.2.4. Kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu..... | 53 |
| 2.3. Phân tích một số yếu tố liên quan tới hiệu quả của Dihydroartemisinin - Piperaquine trong điều trị sốt rét không biến chứng do <i>P. falciparum</i> | 54 |
| 2.3.1. Đối tượng nghiên cứu | 54 |
| 2.3.3. Nội dung nghiên cứu..... | 54 |
| 2.3.4. Biến số, chỉ số nghiên cứu mối liên quan với hiệu quả phác đồ DHA-PPQ..... | 55 |
| 2.4. Phân tích và xử lý số liệu | 56 |
| 2.5. Đạo đức trong nghiên cứu..... | 57 |
| 2.6. Sơ đồ nghiên cứu..... | 58 |
| Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU | 59 |
| 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 <i>P. falciparum</i> | 59 |
| 3.1.1. Đặc điểm chung bệnh nhân tham gia nghiên cứu..... | 59 |
| 3.1.2. Sự biến đổi di truyền và tần số đột biến trên gen pfK13 ở ký sinh trùng sốt rét | 60 |
| 3.1.3. Sự thay đổi số lượng bản sao gen pfpm2 ở ký sinh trùng sốt rét . | 66 |
| 3.1.4. Tần số đột biến E415G trên gen pfEXO ở ký sinh trùng sốt rét .. | 68 |
| 3.1.5. Tần số kiểu gen phức ở ký sinh trùng sốt rét..... | 71 |
| 3.2. Đánh giá hiệu quả điều trị của Dihydroartemisinin-Piperaquine trong điều trị sốt rét không biến chứng do <i>P. falciparum</i> | 74 |
| 3.2.1. Đặc điểm bệnh nhân tham gia đánh giá hiệu quả điều trị sốt rét.. | 74 |

| | |
|---|------------|
| 3.2.2. Kết quả đánh giá điều trị Dihydroartemisinin-Piperaquine trên bệnh nhân sốt rét không biến chứng do <i>P. falciparum</i> | 76 |
| 3.3. Phân tích một số yếu tố liên quan tới hiệu quả của DHA – PPQ trong điều trị sốt rét không biến chứng do <i>P. falciparum</i> | 80 |
| 3.3.1. Đặc điểm hiệu quả điều trị DHA-PPQ theo yếu tố gen..... | 80 |
| 3.3.2. Mối liên quan giữa các yếu tố với hiệu quả điều trị | 83 |
| Chương 4. BÀN LUẬN..... | 93 |
| 4.1. Nghiên cứu sự biến đổi di truyền và tần số đột biến của một số gen kháng thuốc ở ký sinh trùng sốt rét <i>P. falciparum</i> | 93 |
| 4.1.1. Tần số đột biến C580Y trên gen pfK13 ở ký sinh trùng sốt rét.... | 93 |
| 4.1.2. Sự thay đổi số lượng bản sao gen pfpm2 ở ký sinh trùng sốt rét . | 98 |
| 4.1.3. Tần số đột biến E415G trên gen pfEXO ở ký sinh trùng sốt rét | 101 |
| 4.1.4. Tần số kiểu gen phức ở ký sinh trùng sốt rét..... | 102 |
| 4.2. Kết quả điều trị sốt rét Dihydroartemisinin-Piperaquine đối với bệnh nhân sốt rét không biến chứng do <i>P. falciparum</i> | 105 |
| 4.3. Phân tích một số yếu tố liên quan tới hiệu quả của DHA – PPQ trong điều trị sốt rét không biến chứng do <i>P. falciparum</i> | 112 |
| KẾT LUẬN | 120 |
| KIẾN NGHỊ..... | 121 |
| DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN .. | 122 |
| PHỤ LỤC | |

DANH MỤC BẢNG

| Bảng | Tên Bảng | Trang |
|-------|--|-------|
| 2.1. | Chỉ tiêu, biến số nghiên cứu mục tiêu 1 | 41 |
| 2.2. | Trình tự cặp môi nhân bản gen <i>pfK13</i> | 44 |
| 2.3. | Thành phần phản ứng cho phản ứng PCR nhân gen <i>pfK13</i> | 44 |
| 2.4. | Trình tự môi và đầu dò phản ứng nhân gen <i>pfpm2</i> và β - <i>tubulin</i> | 45 |
| 2.5. | Thành phần phản ứng và chu kỳ nhiệt cho phản ứng nhân gen <i>pfpm2</i> và β - <i>tubulin</i> | 46 |
| 2.6. | Trình tự 4 môi được sử dụng để phát hiện điểm đa hình E415G..... | 47 |
| 2.7. | Thành phần phản ứng phát hiện E415G trên gen <i>pfEXO</i> ở ký sinh trùng... | 48 |
| 2.8. | Thành phần phản ứng nhân gen <i>pfEXO</i> | 49 |
| 2.10. | Chỉ tiêu, biến số nghiên cứu mục tiêu 2 | 51 |
| 2.11. | Các biến số, chỉ số nghiên cứu mục tiêu 3 | 55 |
| 3.1. | Phân loại tình trạng sốt ở bệnh nhân tham gia nghiên cứu | 60 |
| 3.2. | Tỉ lệ đột biến gen <i>pfK13</i> tại các địa điểm nghiên cứu | 64 |
| 3.3. | Đặc điểm lâm sàng và dịch tễ của bệnh nhân theo đột biến gen C580Y .. | 65 |
| 3.4. | Tỉ lệ bản sao gen <i>pfpm2</i> tại các địa điểm nghiên cứu..... | 67 |
| 3.5. | Đặc điểm lâm sàng và dịch tễ của bệnh nhân theo số bản sao gen <i>pfpm2</i> .. | 68 |
| 3.6. | Tỉ lệ đột biến gen <i>pfEXO</i> tại các địa điểm nghiên cứu..... | 70 |
| 3.7. | Đặc điểm lâm sàng và dịch tễ của bệnh nhân theo gen <i>pfEXO</i> | 70 |
| 3.8. | Phân bố kiểu gen C580Y/ <i>pfpm2</i> tại các địa điểm nghiên cứu | 72 |
| 3.9. | Phân bố kiểu gen C580Y/E415G tại các địa điểm nghiên cứu | 72 |
| 3.10. | Tỉ lệ kiểu gen E415G/ <i>pfpm2</i> tại các địa điểm nghiên cứu | 73 |
| 3.11. | Đặc điểm phân bố xuất hiện đồng thời các đột biến trên 3 gen ứng viên theo địa điểm nghiên cứu | 73 |
| 3.12. | Đặc điểm tuổi và giới tính đối tượng tham gia điều trị | 74 |
| 3.13. | Đặc điểm thể trạng đối tượng tham gia điều trị | 74 |
| 3.14. | Đặc điểm sốt và mật độ ký sinh trùng sốt rét trước điều trị..... | 75 |
| 3.15. | Đặc điểm biến đổi các gen kháng thuốc của ký sinh trùng sốt rét | 75 |
| 3.16. | Tình trạng sốt của bệnh nhân trong ba ngày đầu tiên sau điều trị..... | 76 |
| 3.17. | Tỉ lệ dương tính KST sốt rét vào ngày D3 sau điều trị | 76 |
| 3.18. | Kết quả phân biệt tái phát, tái nhiễm ở bệnh nhân | 77 |

| Bảng | Tên Bảng | Trang |
|-------------|---|--------------|
| 3.19. | Kết quả điều trị DHA-PPQ sau 42 ngày theo dõi..... | 79 |
| 3.20. | Tỉ lệ xuất hiện đột biến <i>pfK13</i> ở nhóm bệnh nhân dương tính KST vào ngày D3 sau điều trị..... | 80 |
| 3.21. | Kết quả điều trị theo đột biến C580Y trên gen <i>pfK13</i> | 80 |
| 3.22. | Kết quả điều trị theo số lượng bản sao gen <i>pfpm2</i> | 81 |
| 3.23. | Kết quả điều trị theo đột biến E415G trên gen <i>pfEXO</i> | 81 |
| 3.24. | Kết quả điều trị theo đột biến phức C580Y của gen <i>pfK13</i> và E415G trên gen <i>pfEXO</i> | 81 |
| 3.25. | Kết quả điều trị theo đột biến phức C580Y của gen <i>pfK13</i> và số lượng bản sao gen <i>pfpm2</i> | 82 |
| 3.26. | Kết quả điều trị theo đột biến phức tăng số lượng bản sao của gen <i>pfpm2</i> và E415G trên gen <i>pfEXO</i> | 82 |
| 3.27. | Kết quả điều trị theo đột biến phức C580Y của gen <i>pfK13</i> và E415G trên gen <i>pfEXO</i> và tăng số lượng bản sao gen <i>pfpm2</i> | 82 |
| 3.28. | Kết quả phân tích mối liên quan giữa các yếu tố với kết quả điều trị thất bại | 83 |
| 3.29. | Kết quả phân tích mối liên quan giữa các đột biến với kết quả điều trị thất bại | 85 |
| 3.30. | Kết quả phân tích mối liên quan giữa đột biến gen phức với kết quả điều trị thất bại | 85 |
| 3.31. | Các mô hình tốt nhất xác định hiệu quả điều trị sốt rét với sự tham gia các gen ứng viên | 90 |

DANH MỤC HÌNH

| Hình | Tên Hình | Trang |
|-------|--|-------|
| 1.1: | Sơ đồ vòng đời của ký sinh trùng sốt rét..... | 9 |
| 1.2: | Hồng cầu người bị nhiễm ký sinh trùng sốt rét..... | 10 |
| 1.3: | Cấu trúc hóa học của Artemisinin và dẫn xuất..... | 14 |
| 1.4: | Gen <i>pfK13</i> và các vùng chức năng..... | 31 |
| 2.1: | Sơ đồ vị trí các môi trong phản ứng tetra-primer ARMS-PCR..... | 47 |
| 2.2: | Sơ đồ nghiên cứu..... | 58 |
| 3.1: | Đặc điểm về độ tuổi của các bệnh nhân tham gia nghiên cứu..... | 59 |
| 3.2: | Đặc điểm giới tính của bệnh nhân tham gia nghiên cứu..... | 59 |
| 3.3: | Mật độ ký sinh trùng sốt rét ở bệnh nhân tham gia nghiên cứu..... | 60 |
| 3.4: | Kết quả điện di sản phẩm sau tinh sạch..... | 61 |
| 3.5: | Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen <i>pfK13</i> và trình tự gen <i>pfK13</i> chủng tham chiếu trên ngân hàng gen..... | 61 |
| 3.6: | Minh hoạ đột biến trên gen <i>pfK13</i> ở ký sinh trùng sốt rét..... | 63 |
| 3.7: | Hình ảnh kết quả so sánh multiple sequence alignment của vùng gen <i>pfK13</i> từ nhiều mẫu bệnh phẩm ký sinh trùng sốt rét với trình tự tham chiếu chuẩn..... | 64 |
| 3.8: | Phản ứng nhân gen <i>pfpm2</i> và β - <i>tubulin</i> bằng kỹ thuật real-time PCR.. | 66 |
| 3.9: | Kết quả phát hiện đột biến E415G ở ký sinh trùng sốt rét..... | 69 |
| 3.10: | Kết quả giải trình tự khẳng định tính chính xác phản ứng ARMS-PCR..... | 69 |
| 3.11: | Tỉ lệ tái phát tích lũy sau điều trị..... | 78 |
| 3.12: | Kaplan – Meier biểu diễn tình trạng tái phát tại địa điểm nghiên cứu..... | 78 |
| 3.13: | Mối liên quan giữa đột biến gen phức C580Y trên <i>pfK13</i> và E415 trên <i>pfEXO</i> với kết quả điều trị thất bại hiệu chỉnh bằng đặc điểm chung..... | 86 |
| 3.14: | Mối liên quan giữa đột biến C580Y trên <i>pfK13</i> và tăng số lượng bản sao <i>pfpm2</i> với kết quả điều trị thất bại hiệu chỉnh bằng đặc điểm chung..... | 87 |
| 3.15: | Mối liên quan giữa đột biến E415G trên <i>pfEXO</i> và tăng số lượng bản sao <i>pfpm2</i> với kết quả điều trị thất bại hiệu chỉnh bằng đặc điểm chung..... | 88 |

| Hình | Tên Hình | Trang |
|-------------|--|--------------|
| 3.16. | Mối liên quan giữa biến đổi di truyền trên cả 3 gen với kết quả điều trị thất bại hiệu chỉnh bằng đặc điểm chung | 89 |
| 3.17. | Vai trò của đột biến trên các gen ứng viên trong mối liên quan với điều trị thất bại | 90 |

MỞ ĐẦU

Sốt rét là một trong những bệnh truyền nhiễm gây tử vong hàng đầu trên thế giới, đặc biệt ở các khu vực nhiệt đới và cận nhiệt đới [1, 2]. Trong số các tác nhân gây bệnh, *Plasmodium falciparum* là loại ký sinh trùng gây sốt rét nặng nhất và có khả năng gây tử vong cao nhất [2]. Phác đồ phối hợp DHA (dihydroartemisinin) - PPQ (piperaquine) là một trong những phác đồ điều trị dựa trên artemisinin (ACT-Artemisinin based combination therapy) được các nước sử dụng phổ biến để điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* tại Đông Nam Á như Campuchia, Thái Lan, Lào và Việt Nam [2, 3].

Mặc dù DHA-PPQ đã chứng tỏ hiệu quả cao trong điều trị sốt rét, nhưng sự xuất hiện của các chủng *P. falciparum* kháng thuốc là một thách thức lớn. Theo báo cáo của WHO, đã có những trường hợp về thất bại điều trị cao với DHA-PPQ ở Campuchia, Lào và Việt Nam [4-7], dẫn đến việc phải thay đổi phác đồ điều trị ở một số khu vực.

Thử nghiệm TES (Therapeutic efficacy study) là tiêu chuẩn vàng trong kiểm tra theo dõi hiệu lực điều trị sốt rét hiện nay. Đánh giá hiệu lực điều trị của DHA-PPQ giúp phát hiện sớm và phản ứng kịp thời trước sự kháng thuốc, từ đó bảo vệ sức khỏe cộng đồng và đảm bảo rằng bệnh nhân được điều trị bằng các phác đồ hiệu quả nhất [8, 9].

Trong theo dõi kháng DHA-PPQ, các chỉ thị phân tử chủ yếu được sử dụng là đột biến gen *pfK13* (*Plasmodium falciparum* Kelch 13), trong theo dõi kháng artemisinin và dẫn xuất là DHA, sự tăng số lượng bản sao của gen *pfpm2* (*Plasmepsin2*) và điểm đột biến E415G trên gen *pfEXO* (*Plasmodium falciparum* Exonuclease) (chỉ thị phân tử trong theo dõi kháng piperaquine).

Trong đó, gen *pfK13* (*Plasmodium falciparum* Kelch 13) mã hóa cho protein Kelch, nằm trên nhiễm sắc thể số 13 của ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* [10, 11]. WHO đã thiết lập danh sách một số đột biến trên *pfK13* như C580Y, R539T, Y493H, I543T, và N458Y là chỉ thị phân tử của kháng artemisinin tại khu vực tiểu vùng sông Mê Kông (Greater Mekong Subregion - GMS) [12].

Gen *plasmepsin 2* (*pfpm2*) nằm trên nhiễm sắc thể 14 của ký sinh trùng *P. falciparum* và mã hóa cho một enzyme protease thuộc họ aspartic protease [13]. Enzyme này đóng vai trò quan trọng trong quá trình tiêu hóa hemoglobin của ký sinh trùng trong hồng cầu người, phân giải hemoglobin

thành các peptide nhỏ để cung cấp dinh dưỡng cho ký sinh trùng. Sự gia tăng số lượng bản sao gen *pfpm2* là chỉ thị phân tử của kháng PPQ, một thành phần của phác đồ điều trị sốt rét DHA-PPQ [14-16].

Gen *exonuclease* (*pfEXO* hoặc PF3D7_1362500) nằm trên nhiễm sắc thể số 13 của ký sinh trùng sốt rét mã hoá enzym exonuclease [17]. Đột biến E415G trên gen *pfEXO* làm thay đổi nucleotide A thành G dẫn đến làm thay đổi axit glutamic (E) thành glycine (G) ở vị trí 415 trên gen mã hóa. Đột biến E415G là chỉ thị phân tử theo dõi kháng PPQ [14, 18].

Tại Việt Nam, một số tỉnh như Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông, và Bình Phước có tỷ lệ lưu hành bệnh cao [19]. Đây cũng là các tỉnh gần biên giới Campuchia, nơi tình hình sốt rét và sốt rét kháng thuốc diễn biến phức tạp, làm gia tăng nguy cơ lây lan qua lại, bao gồm các chủng ký sinh trùng kháng thuốc.

Mặc dù kháng thuốc có ảnh hưởng đến kết quả điều trị sốt rét, nhưng trong môi trường cơ thể sống phức tạp, kết quả điều trị còn chịu tác động của nhiều yếu tố khác như tình trạng bệnh lý, khả năng miễn dịch của bệnh nhân và mức độ nhiễm ký sinh trùng. Do đó, việc phân tích các yếu tố này là cần thiết để tối ưu hóa hiệu quả điều trị bệnh.

Chính vì vậy chúng 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 - Piperaquine ở chủng ký sinh trùng *Plasmodium falciparum* tại các tỉnh có lưu hành bệnh sốt rét”.

Mục tiêu luận án:

1. Nghiên cứu sự biến đổi di truyền và tần số đột biến của một số gene liên quan tới kháng thuốc ở ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum*.
2. Đánh giá hiệu quả điều trị của DHA – PPQ trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*.
3. Phân tích một số yếu tố liên quan tới hiệu lực của DHA – PPQ trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*.

Nội dung nghiên cứu:

Nghiên cứu này tập trung vào sự biến đổi di truyền và tần số đột biến của các gen kháng thuốc trong ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum*, đặc biệt là các đột biến ở gen *pfK13*, *pfpm2* và *E415G* liên quan đến kháng artemisinin và piperaquine (PPQ). Đồng thời, nghiên cứu đánh giá hiệu quả điều trị DHA-

PPQ ở bệnh nhân sốt rét không biến chứng thông qua các chỉ số quan trọng như tỉ lệ bệnh nhân dương tính ký sinh trùng ngày 3, tỉ lệ tái phát và tỉ lệ thất bại điều trị. Ngoài ra, nghiên cứu cũng khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị như tuổi, giới tính, thể trạng bệnh nhân, mức độ nhiễm ký sinh trùng và các đột biến gen, và xây dựng mô hình dự đoán dựa trên các yếu tố này.

Ý nghĩa khoa học của luận án:

- Xác định được các yếu tố di truyền cụ thể liên quan đến thất bại điều trị: Kết quả cho thấy các đột biến trên gen kháng thuốc, đặc biệt là số lượng bản sao gen *pfpm2*, đột biến C580Y trên gen *pfK13*, và đột biến E415G trên gen *pfEXO*, có mối liên hệ chặt chẽ với tình trạng thất bại điều trị sốt rét.

- Việc xác định vai trò của từng đột biến thông qua các hệ số của mô hình phân tích không chỉ giúp hiểu rõ cơ chế di truyền gây ra kháng thuốc mà còn cho phép đánh giá mức độ ảnh hưởng của chúng đối với kết quả điều trị. Sự kết hợp giữa dữ liệu di truyền và các phương pháp thống kê hiện đại tạo ra một nền tảng khoa học vững chắc, góp phần giải thích một cách có hệ thống các hiện tượng phức tạp kháng thuốc trong lâm sàng.

Tính mới của luận án:

+ Đã xác định được biến đổi di truyền và tần số kiểu gen kháng thuốc ở ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* bao gồm: đột biến C580Y trên gen *pfK13* và *pfpm2*; đột biến E415G trên gen *pfEXO*. 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.

+ Đánh giá được mức độ ảnh hưởng của các đột biến kháng thuốc với hiệu quả điều trị của DHA – PPQ trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*.

Ý nghĩa thực tiễn của đề tài:

Ý nghĩa thực tiễn của đề tài nghiên cứu này rất quan trọng trong việc kiểm soát và điều trị bệnh sốt rét tại Việt Nam và các khu vực khác có tình trạng kháng thuốc sốt rét do *P. falciparum*. Cụ thể:

- Hỗ trợ cho công tác giám sát kháng thuốc: Kết quả về tần suất xuất hiện các đột biến trên gen *pfpm2*, *pfEXO* và *pfK13* đóng vai trò như một chỉ số sinh học quan trọng giúp các cơ quan y tế theo dõi sát tình

trạng kháng thuốc. Từ đó, các chiến lược giám sát và kiểm soát bệnh có thể được xây dựng và thực hiện một cách chủ động hơn.

- Định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo: Nghiên cứu cung cấp cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo về kháng thuốc, đặc biệt trong việc phát triển các loại thuốc mới hoặc phác đồ thay thế để đối phó với các trường hợp kháng thuốc gia tăng. Phát hiện về các đột biến gen và cơ chế kháng thuốc góp phần mở rộng hiểu biết về sinh học ký sinh trùng sốt rét.
- Bảo vệ sức khỏe cộng đồng: Bằng cách xác định và hiểu rõ hơn về cơ chế kháng thuốc, đề tài góp phần giúp giảm thiểu nguy cơ tái phát và thất bại điều trị, từ đó bảo vệ sức khỏe của cộng đồng, đặc biệt là ở những vùng có tỷ lệ nhiễm sốt rét cao. Việc này cũng đóng góp vào mục tiêu dài hạn của Tổ chức Y tế Thế giới trong việc giảm thiểu số ca mắc và tử vong do sốt rét trên toàn cầu.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Giới thiệu về bệnh sốt rét

Bệnh sốt rét là một trong những bệnh truyền nhiễm phổ biến và là vấn đề nghiêm trọng đối với sức khỏe cộng đồng. Bệnh do ký sinh trùng *Plasmodium* gây ra chủ yếu thông qua vết cắn của muỗi cái *Anopheles* truyền sang người. Trong năm chủng *Plasmodium* gây sốt rét ở người: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, chủng *P. falciparum* gây tỉ lệ tử vong cao nhất, tuy vậy chủng *P. vivax* cũng có tỉ lệ biến chứng nặng đáng kể [1, 20].

Bệnh sốt rét thường có biểu hiện lâm sàng đặt trưng bằng những cơn sốt điển hình gồm có 3 giai đoạn: rét run, sốt, vã mồ hôi có tính chu kỳ tùy theo từng loài ký sinh trùng gây bệnh. Sốt rét chưa biến chứng là trường hợp người bệnh mắc sốt rét nhưng không có dấu hiệu đe dọa đến tính mạng hoặc các triệu chứng làm sáng tỏ bệnh. Sốt rét có biến chứng (hoặc sốt rét ác tính) là tình trạng nghiêm trọng hơn, thường xảy ra ở những người nhiễm *P. falciparum* hoặc nhiễm phối hợp *P. falciparum*. Các biến chứng có thể bao gồm rối loạn ý thức, co giật, rối loạn tiểu tiện, nôn, tiêu chảy, tiểu nhiều lần trong ngày hoặc bí tiểu cấp, và đau đầu dữ dội. Thiếu máu là một triệu chứng phổ biến do sự phá hủy hồng cầu bởi ký sinh trùng, biểu hiện qua mặt môi, da và niêm mạc nhợt nhạt, hoa mắt, chóng mặt. Lách và gan có thể bị to, do cơ thể phải làm việc nhiều để loại bỏ hồng cầu bị nhiễm, gây cảm giác đau hoặc khó chịu ở vùng bụng trên, bên trái [20].

Điều trị sốt rét dựa vào việc sử dụng các loại thuốc điều trị sốt rét phù hợp với từng loại ký sinh trùng gây bệnh. Đối với sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*, liệu pháp ACT là lựa chọn hàng đầu dựa trên sự kết hợp artemisinin (hoặc dẫn xuất) với các thuốc điều trị sốt rét khác để kéo dài thời gian tác dụng, đảm bảo tiêu diệt hoàn toàn ký sinh trùng [3, 20]. Các loài khác như *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* và *P. knowlesi* cũng có thể được điều trị bằng chloroquine. Ngoài ra, *P. vivax* và *P. ovale* cần được điều trị thêm với primaquine để loại bỏ các thể ngủ trong gan gây tái phát bệnh. Khi điều trị đúng cách, người bị sốt rét thường có thể hồi phục hoàn toàn [21].

Sốt rét kháng thuốc là vấn đề y tế công cộng nghiêm trọng, đặc biệt tại các khu vực nhiệt đới. Tình trạng này xảy ra khi ký sinh trùng *Plasmodium* kháng lại các thuốc điều trị, làm giảm hiệu quả điều trị và tăng nguy cơ tử

vong. Mối lo ngại lớn nhất hiện nay là kháng artemisinin – thuốc chủ chốt trong điều trị sốt rét ác tính. Tại Đông Nam Á, *P. falciparum* đã kháng artemisinin, làm giảm hiệu quả điều trị và kéo dài thời gian mắc bệnh. Do đó, cần tăng cường giám sát, nghiên cứu phát triển thuốc mới và đẩy mạnh chiến lược phòng chống để ngăn chặn sự lây lan của các chủng ký sinh trùng kháng thuốc.

1.1.1. Tình hình bệnh sốt rét trên thế giới

Theo báo cáo của WHO năm 2023, tình hình sốt rét trên thế giới vẫn đáng lo ngại với 249 triệu ca mắc bệnh được ước tính trong năm 2022, tăng 5 triệu ca so với năm 2021. Phần lớn các ca sốt rét tập trung ở châu Phi, đặc biệt là Nigeria và Cộng hòa Dân chủ Congo, cùng với một số quốc gia ở Đông Nam Á, Ấn Độ, và các khu vực khác như Papua New Guinea và Sudan [22]. Từ năm 2000 đến 2022, ước tính có khoảng 2,1 tỉ ca sốt rét và 11,7 triệu ca tử vong do sốt rét đã được ngăn chặn trên toàn cầu. Đa số các ca mắc bệnh và tử vong được ngăn chặn là ở khu vực Châu Phi, chiếm 82% số ca bệnh và 94% số ca tử vong, tiếp theo là khu vực Đông Nam Á. Sự gia tăng các ca bệnh trong năm 2020 và 2021 một phần do ảnh hưởng của đại dịch COVID-19, làm gián đoạn các dịch vụ y tế thiết yếu. Tổng số ca tử vong do sốt rét trên toàn cầu trong năm 2022 là 608.000 ca, cao hơn so với năm 2019. Tỷ lệ tử vong do sốt rét trên toàn cầu đã giảm một nửa từ năm 2000 đến 2019, từ 28,8 xuống 14,1 trên 100.000 dân số có nguy cơ, nhưng đã tăng lên 15,2 vào năm 2020 trước khi giảm nhẹ xuống 14,3 vào năm 2022 [22]. Tình hình sốt rét được phân bố không đồng đều giữa các khu vực địa lý khác nhau. Châu Phi vẫn là khu vực chịu ảnh hưởng nặng nề nhất bởi sốt rét, chiếm 82% số ca mắc và 94% số ca tử vong trên toàn cầu. Trong năm 2022, tỉ lệ mắc sốt rét ở khu vực này là 222,6 ca trên 1.000 dân số có nguy cơ, trong khi tỉ lệ tử vong là 55,5 trên 100.000 dân số có nguy cơ. Khu vực Đông Nam Á chiếm 10,5% số ca mắc và 3% số ca tử vong toàn cầu [22].

Tình hình sốt rét tại khu vực GMS diễn biến phức tạp. Từ năm 2000-2022, số ca sốt rét bản địa giảm 55,5% và số ca sốt rét do *P. falciparum* giảm 89,1%. Tuy nhiên, từ 2021-2022, số ca sốt rét bản địa tăng gần gấp đôi từ 90.082 lên 170.527 ca, trong đó ca do *P. falciparum* tăng từ 16.490 lên 30.789 ca. Dù đã đạt nhiều tiến bộ nhờ các chương trình phát hiện và điều trị chủ động, GMS vẫn đối mặt với thách thức lớn về kháng thuốc, đặc biệt là kháng

artemisinin, cùng với nguy cơ lây truyền do di cư qua biên giới, nhất là từ Myanmar sang Thái Lan. Khu vực này cần tăng cường giám sát, phòng chống và điều trị để đạt mục tiêu loại trừ sốt rét [22].

Nhìn chung, mặc dù có những tiến bộ đáng kể trong việc giảm tỉ lệ mắc và tử vong do sốt rét, các khu vực vẫn phải đối mặt với nhiều thách thức, bao gồm ảnh hưởng của đại dịch COVID-19, điều này gây khó khăn cho việc đạt được các mục tiêu giảm tỉ lệ mắc và tử vong của WHO [22].

1.1.2. Tình hình sốt rét tại Việt Nam

Việt Nam nằm ở khu vực Đông Nam Á, giáp biên giới với Trung Quốc ở phía bắc, Lào và Campuchia ở phía tây, và biển Đông ở phía đông. Vị trí địa lý này đặt Việt Nam vào khu vực có nguy cơ cao về các bệnh nhiệt đới, bao gồm sốt rét, do khí hậu nhiệt đới và môi trường thuận lợi cho sự phát triển của muỗi *Anopheles*, vector truyền bệnh sốt rét [23].

Năm 2021, tình hình sốt rét tại Việt Nam cải thiện rõ rệt với 467 ca bệnh có ký sinh trùng sốt rét, giảm 67% so với 1.733 ca năm 2020. Tỷ lệ mắc sốt rét giảm còn 0,0048/1.000 dân, không ghi nhận ca sốt rét ác tính hay tử vong, trong khi năm 2020 có 4 ca ác tính và 1 ca tử vong. Tây Nguyên là khu vực có số ca mắc cao nhất (49,68%), tiếp theo là miền núi phía Bắc (22,48%) và miền Trung (19,91%), trong đó tỉnh Lai Châu chiếm hơn 90% số ca của khu vực miền núi phía Bắc. Tỷ lệ nam giới chiếm 74,3% ca mắc (347 ca). Chủng *P. vivax* là chủng ký sinh trùng phổ biến nhất, chiếm 55,25% tổng số ca bệnh [19].

Tại Việt Nam, ký sinh trùng *P. falciparum* kháng artemisinin đã được ghi nhận ở các tỉnh Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông, Bình Phước, Quảng Nam, Khánh Hòa, Phú Yên và có nguy cơ lan rộng. Tỷ lệ thất bại điều trị với DHA-PPQ và số ca còn ký sinh trùng sau 3 ngày điều trị gia tăng. Để ứng phó, chương trình quốc gia đã thay thế thuốc điều trị bằng Artesunate-Pyronaridine (Pyramax) tại Đắk Nông, Bình Phước (7/2019), Gia Lai, Đắk Lắk (1/2020) và tiếp tục mở rộng sang Phú Yên, Khánh Hòa, Ninh Thuận (2021). Mặc dù số ca bệnh sốt rét giảm mạnh năm 2021 nhờ các biện pháp phòng chống hiệu quả, nguy cơ bùng phát dịch vẫn cao do nhiều người sống trong vùng có sốt rét lưu hành, tình trạng kháng thuốc lan rộng, muỗi truyền bệnh kháng hóa chất và biến động dân cư giữa các vùng có và không có sốt rét [19, 23].

1.1.3. Đặc điểm sinh học của ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* và vai trò gây bệnh trong y học

Theo khoá phân loại khoa học, *P. falciparum* được xếp vào:

Ngành: *Apicomplexa*

Lớp: *Aconoidasida*

Bộ: *Haemosporida*

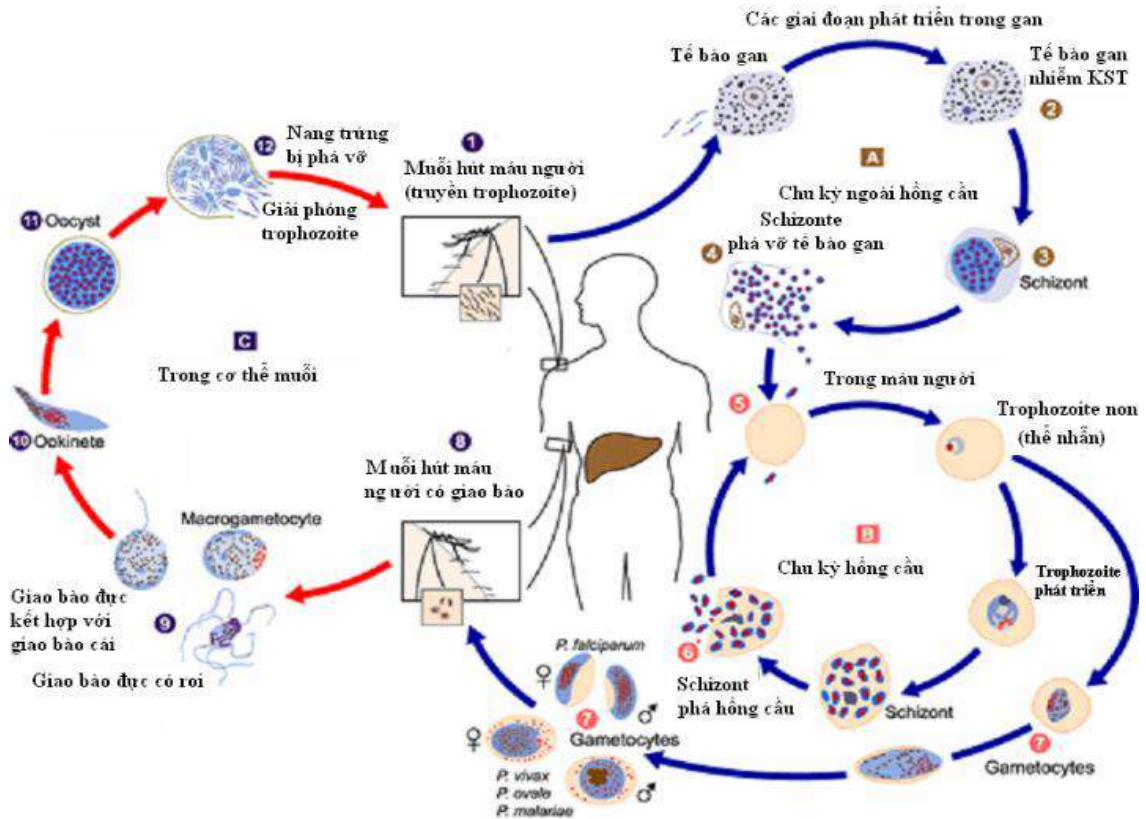
Họ: *Plasmodiidae*

Chi: *Plasmodium*

Loài *falciparum*

P. falciparum là một trong năm loại ký sinh trùng *Plasmodium* gây ra bệnh sốt rét ở người, và nó được coi là loại nguy hiểm nhất do khả năng gây bệnh nặng và tử vong cao nếu không được điều trị kịp thời [2]. Đặc điểm sinh học của *P. falciparum* bao gồm chu kỳ sống phức tạp, khả năng thích nghi và phát triển trong cơ thể người và muỗi, cũng như các cơ chế gây bệnh và biến chứng nặng [2, 21].

Chu kỳ sống của *P. falciparum* rất phức tạp và bao gồm hai giai đoạn chính: giai đoạn trong cơ thể muỗi *Anopheles* và giai đoạn trong cơ thể người (Hình 1.1). Sự phức tạp này giúp *P. falciparum* tồn tại và phát triển qua nhiều môi trường khác nhau, tạo điều kiện thuận lợi cho sự lan truyền và gây bệnh. Chu kỳ sống phức tạp của *P. falciparum* không chỉ đảm bảo sự lan truyền hiệu quả của ký sinh trùng mà còn tạo ra nhiều thách thức trong việc kiểm soát và điều trị bệnh sốt rét. Khả năng thích nghi và biến đổi di truyền của *P. falciparum* làm cho việc phát triển các phương pháp điều trị hiệu quả và bền vững trở nên khó khăn hơn [2].



Hình 1.1: Sơ đồ vòng đời của ký sinh trùng sốt rét [24]

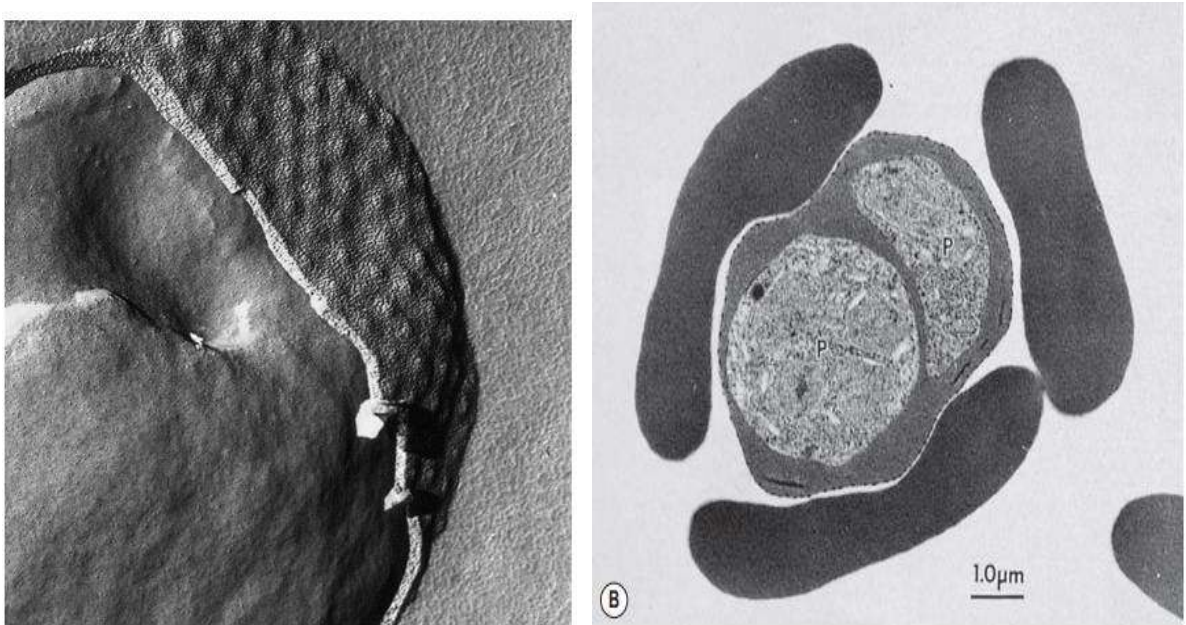
(A): Giai đoạn phân chia trong tế bào gan: Khi muỗi *Anopheles* đốt người, thoi trùng vào máu và sau khoảng 30 phút chúng di chuyển tới gan. Sau khi tấn công thành công tế bào gan, các thoi trùng phân chia tạo ra một loạt ký sinh trùng sốt rét non, lưu hành vào máu và tiếp tục xâm nhập vào hồng cầu;

(B): Các ký sinh trùng non vào máu và xâm nhập vào hồng cầu. Ở hồng cầu, chúng phát triển qua các giai đoạn thể dinh dưỡng non, dinh dưỡng phát triển, dinh dưỡng già, phân chia non, phân chia già tạo ra các ký sinh trùng non;

(C): Giai đoạn phát triển hữu tính trong cơ thể muỗi. Trong cơ thể muỗi, giao bào cái phát triển thành giao tử cái, giao bào đực phân chia thành 8 giao tử đực. Giao tử đực tìm đến giao tử cái, kết hợp với nhau tạo thành hợp tử. Tiếp theo, hợp tử phát triển thành thể tạo trứng, rồi thành nang trứng bên trong chứa nhiều thoi trùng. Nang trứng chín, vỡ ra, thoi trùng được giải phóng rồi di chuyển tập trung ở tuyến nước bọt muỗi. Khi muỗi đốt người, thoi trùng xâm nhập vào cơ thể người và tiếp tục quá trình phát triển trong cơ thể người.

P. falciparum thể hiện khả năng thích nghi vượt trội thông qua sự biến đổi di truyền nhanh chóng, cho phép nó phát triển khả năng kháng thuốc đối với nhiều loại thuốc điều trị sốt rét. Các đột biến trong gen *pfcr*, *pfmdr1* và *pfK13*, *pfpm2*.... là những ví dụ điển hình về cách mà *P. falciparum* có thể

thay đổi cấu trúc protein của mình để tránh tác động của thuốc điều trị sốt rét. Khả năng này không chỉ giúp ký sinh trùng tồn tại trong điều kiện có áp lực chọn lọc từ thuốc, mà còn làm phức tạp thêm việc kiểm soát và điều trị bệnh sốt rét. Ngoài ra, *P. falciparum* còn thể hiện sự thích nghi qua việc thay đổi biểu hiện các protein bề mặt của hồng cầu bị nhiễm. Các protein này, như *PfEMP1*, có vai trò quan trọng trong việc bám dính vào thành mạch máu và tránh được hệ thống miễn dịch của người [25, 26]. Sự thay đổi liên tục của các protein này giúp ký sinh trùng né tránh sự phát hiện và tiêu diệt bởi hệ miễn dịch, đồng thời góp phần vào việc gây ra các biến chứng nghiêm trọng như sốt rét ác tính, đồng thời sự bám dính này không chỉ giúp ký sinh trùng tồn tại mà còn gây tắc nghẽn vi mạch, đặc biệt là trong não, gây ra biến chứng sốt rét ác tính [25, 26].



Hình 1.2: Hồng cầu người bị nhiễm ký sinh trùng sốt rét [2]

(Nguồn: Nicolas White và cộng sự, 2024)

A. Các cấu trúc đặc trưng xuất hiện trên bề mặt hồng cầu, được gọi là "knobs" hay nút, được sắp xếp một cách đều đặn và chúng là đặc điểm sinh học nổi bật của các hồng cầu nhiễm *P. falciparum*;

B. Rosetting: là một hiện tượng xảy ra khi một hồng cầu bị nhiễm ký sinh trùng sốt rét, đặc biệt là *P. falciparum*, gắn kết với các hồng cầu khỏe mạnh xung quanh nó, tạo thành một cấu trúc giống như hoa hồng khi nhìn dưới kính hiển vi. Các hồng cầu không bị nhiễm bao quanh hồng cầu bị nhiễm, tạo ra một nhóm tế bào được gọi là rosette.

Tắc nghẽn vi mạch và sự phá hủy hồng cầu dẫn đến thiếu máu, giảm lưu lượng máu và tổn thương các cơ quan quan trọng như não, gan, thận và phổi. Hơn nữa, *P. falciparum* còn gây ra phản ứng viêm mạnh mẽ trong cơ thể [25]. Khi hồng cầu bị nhiễm vỡ ra, các sản phẩm của ký sinh trùng và mảnh vỡ hồng cầu kích hoạt hệ thống miễn dịch, dẫn đến sản xuất các cytokine viêm như TNF-alpha và interleukin-1 [26]. Sự gia tăng cytokine viêm này góp phần vào các triệu chứng sốt và có thể dẫn đến các biến chứng nặng như sốc nhiễm khuẩn và tổn thương các cơ quan [25, 26].

Tóm lại, *P. falciparum* gây ra bệnh sốt rét thông qua nhiều cơ chế phức tạp, bao gồm phá hủy hồng cầu, giải phóng chất độc, kích hoạt phản ứng viêm, sự tích tụ và bám dính tế bào, biến đổi kháng nguyên và kháng thuốc. Hiểu rõ các cơ chế này là cơ sở quan trọng để phát triển các phương pháp điều trị và phòng ngừa hiệu quả, nhằm giảm thiểu gánh nặng của bệnh sốt rét trên toàn cầu.

1.1.4. Phương pháp phát hiện ký sinh trùng sốt rét

1.1.4.1. Xét nghiệm máu nhuộm Giemsa

Đây là phương pháp tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán sốt rét [27]. Một giọt máu được lấy từ ngón tay hoặc vành tai, phết mỏng trên lam kính, nhuộm bằng Giemsa và quan sát dưới kính hiển vi [28-30].

Việc xác định loại và giai đoạn của ký sinh trùng sốt rét và xác định mật độ ký sinh trùng là rất quan trọng trong việc quản lý lâm sàng bệnh nhân sốt rét, thử nghiệm hiệu quả thuốc, khảo sát dịch tễ học và các chương trình kiểm soát sốt rét. Do đó, chẩn đoán sốt rét dựa trên việc kiểm tra tiêu bản máu cần phải chính xác và số lượng ký sinh trùng phải được xác định một cách chính xác. Kiểm tra tiêu bản máu cũng cho phép phát hiện một số mầm bệnh khác trong máu, chẩn đoán hình thái học của thiếu máu và nhận diện các rối loạn huyết học khác, những điều này cần được báo cáo bởi kỹ thuật viên kiểm tra [28, 31].

Tuy nhiên, xét nghiệm máu nhuộm Giemsa cũng có những hạn chế. Nó đòi hỏi kỹ năng và kinh nghiệm cao trong việc sử dụng kính hiển vi và nhận diện hình ảnh ký sinh trùng. Quy trình chuẩn bị mẫu và nhuộm cũng như quá trình xem xét mẫu dưới kính hiển vi mất thời gian, chất lượng kết quả có thể biến động tùy thuộc vào kỹ năng của người thực hiện và chất lượng của mẫu máu. Tuy nhiên đây vẫn là kỹ thuật phổ biến trong sàng lọc sốt rét [31].

1.1.4.2. Xét nghiệm chẩn đoán nhanh

Xét nghiệm chẩn đoán nhanh (Rapid Diagnostic Test - RDT) cho ký sinh trùng sốt rét là một phương pháp chẩn đoán nhanh chóng, đơn giản và hiệu quả, đặc biệt quan trọng trong các khu vực thiếu trang thiết bị y tế đầy đủ [27]. RDT hoạt động dựa trên nguyên tắc phát hiện các antigen đặc trưng của ký sinh trùng sốt rét trong mẫu máu, thường là HRP2 cho *P. falciparum* và pLDH hoặc aldolase cho các loài *Plasmodium* khác [32, 33]. Trong quá trình thực hiện, một mẫu máu nhỏ được lấy và đặt trên dải thử nghiệm, sau đó một dung dịch buffer được thêm vào để hỗ trợ di chuyển mẫu máu qua dải. Khi máu di chuyển, nó gặp các kháng thể đặc hiệu trên dải thử nghiệm. Kết quả của xét nghiệm thường được chỉ ra bằng sự xuất hiện của các vạch màu trên dải thử nghiệm, với ít nhất một vạch kiểm tra để chứng tỏ rằng xét nghiệm đã hoạt động đúng cách [29].

Xét nghiệm RDT có ưu điểm là nhanh chóng, dễ thực hiện và không cần trang thiết bị phức tạp, phù hợp cho chẩn đoán sốt rét ở các khu vực có điều kiện hạn chế. Tuy nhiên, RDT có một số hạn chế, bao gồm khả năng không phát hiện nhiễm trùng với mật độ ký sinh trùng thấp, không xác định được mật độ ký sinh trùng và không phát hiện được các giai đoạn phát triển của ký sinh trùng. Một số loại RDT không nhận diện được tất cả các loài ký sinh trùng hoặc không phân tách được từng loài, gây khó khăn trong chỉ định điều trị. Ngoài ra, kết quả dương tính có thể kéo dài ngay cả khi ký sinh trùng đã bị loại bỏ [33, 34].

1.1.4.3. Kỹ thuật sinh học phân tử

Bao gồm PCR (polymerase chain reaction) và các kỹ thuật khác, cho phép xác định chính xác loài ký sinh trùng và mật độ ký sinh trùng. Chẩn đoán phân biệt ký sinh trùng sốt rét thông qua PCR thường dựa vào cặp mồi nhắm vào gen 18S rRNA [27, 35]. Gen 18S rRNA là một lựa chọn phổ biến do sự hiện diện của nó trong tất cả các loài *Plasmodium* và các đặc điểm độc đáo giúp phân biệt giữa các loài. Các cặp mồi được thiết kế dựa trên gen này có thể phân biệt chính xác *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale*, *P.malariae*, và *P.knowlesi* [27].

Ngoài ra, tùy thuộc vào yêu cầu cụ thể của xét nghiệm, các cặp mồi khác cũng có thể được sử dụng, bao gồm mồi thiết kế cho gen mã hóa cho protein bề mặt của merozoite (Merozoite Surface Protein - MSP), giai đoạn ký sinh trùng xâm nhập hồng cầu, được sử dụng trong PCR để chẩn đoán

phân biệt ký sinh trùng sốt rét là một công cụ hiệu quả [36-38]. Mỗi loài *Plasmodium* có các biến thể độc đáo của *MSP*, điều này cho phép các nhà khoa học thiết kế các cặp mồi PCR đặc hiệu cho từng loài giúp xác định chính xác loài ký sinh trùng gây nhiễm [36]. Việc sử dụng mồi nhắm vào gen *MSP* cũng tăng độ nhạy của xét nghiệm, cho phép phát hiện ký sinh trùng ngay cả khi nồng độ trong máu rất thấp. Ngoài ra, mồi nhắm vào *MSP* không chỉ hữu ích trong chẩn đoán lâm sàng mà còn trong nghiên cứu khoa học: nghiên cứu về sinh học ký sinh trùng và phát triển vắc xin [39, 40]. Mồi này còn có thể theo dõi sự biến đổi gen và kháng thuốc của ký sinh trùng sốt rét [41].

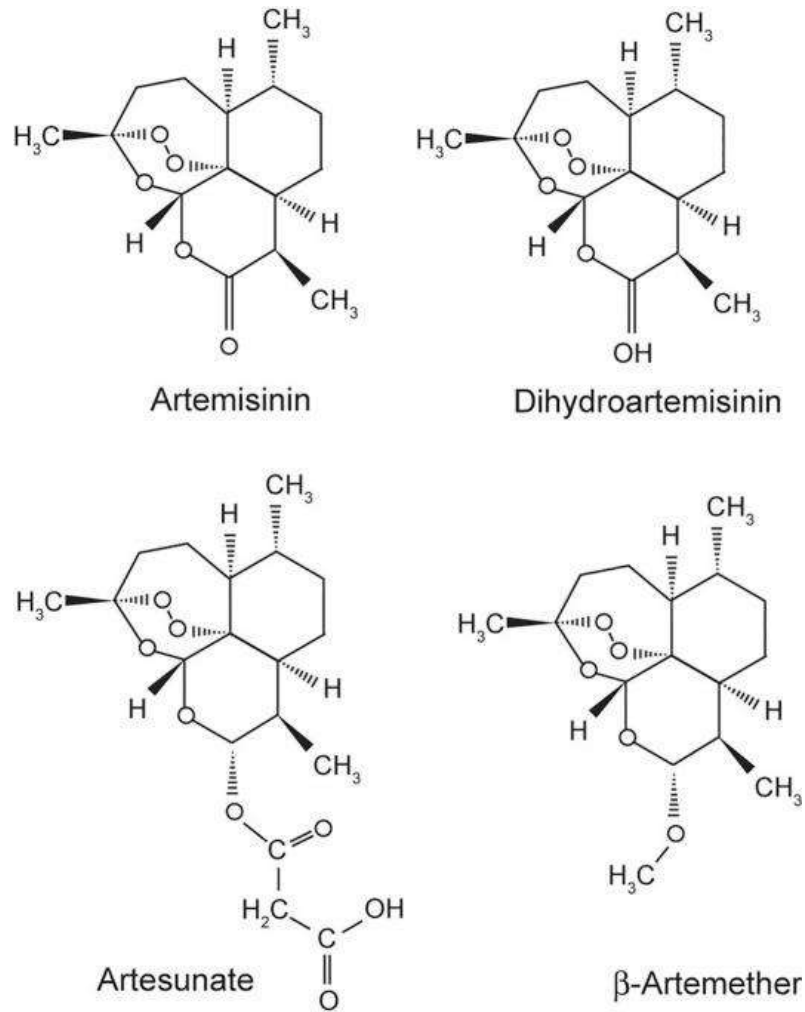
Nhìn chung việc chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét giữ vai trò trung tâm trong quản lý và kiểm soát bệnh sốt rét, cả về mặt lâm sàng lẫn dịch tễ học. Việc xác định nhanh chóng và chính xác tình trạng nhiễm bệnh là cực kỳ quan trọng để phân biệt sốt rét với các bệnh có triệu chứng tương tự như sốt xuất huyết hay nhiễm trùng huyết, từ đó hướng dẫn việc lựa chọn phác đồ điều trị phù hợp. Điều này không chỉ giúp giảm tỉ lệ tử vong và biến chứng do sốt rét mà còn tránh việc sử dụng thuốc không cần thiết hoặc sai lầm. Chẩn đoán chính xác cũng có tầm quan trọng trong việc giảm lây lan bệnh sốt rét trong cộng đồng, qua việc cách ly kịp thời và điều trị hiệu quả cho người bệnh. Như vậy, chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét không chỉ quan trọng đối với sức khỏe cá nhân mà còn đóng góp vào nỗ lực kiểm soát và loại bỏ sốt rét trên phạm vi rộng lớn.

1.2. Điều trị sốt rét do *P. falciparum*

1.2.1. Lịch sử điều trị sốt rét do *P. falciparum*

Chloroquine, được phát hiện vào những năm 1930, trở thành phương pháp điều trị chính cho sốt rét trong thập kỷ 1940 nhờ hiệu quả cao và chi phí thấp. Thuốc hoạt động bằng cách ngăn chặn quá trình polymer hóa heme – sản phẩm phụ độc hại của quá trình tiêu hóa hemoglobin – từ đó giết chết ký sinh trùng. Tuy nhiên, từ những năm 1950-1960, tình trạng kháng chloroquine xuất hiện, đặc biệt ở Đông Nam Á và châu Phi, làm giảm hiệu quả điều trị. Để đối phó, các phương pháp khác đã được triển khai. Quinine, chiết xuất từ cây cinchona, là thuốc điều trị sốt rét lâu đời nhất, nhưng do tác dụng phụ nghiêm trọng và thời gian điều trị dài, việc sử dụng bị hạn chế. Sulfadoxine-pyrimethamine (SP), được giới thiệu vào thập niên 1960-1970, cũng nhanh chóng bị kháng thuốc, gây thêm thách thức cho công tác điều trị sốt rét [9].

Artemisinin, một hợp chất chiết xuất từ cây thanh hao hoa vàng (*Artemisia annua*), đã đánh dấu một bước ngoặt quan trọng trong lịch sử điều trị sốt rét [42, 43]. Sự phát hiện ra artemisinin được ghi nhận vào những năm 1970 trong một nỗ lực nghiên cứu nhằm tìm ra phương pháp điều trị hiệu quả cho bệnh sốt rét trong bối cảnh khi mà các phương pháp điều trị truyền thống không còn hiệu quả trước các chủng ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc [43].



Hình 1.3: Cấu trúc hóa học của Artemisinin và dẫn xuất [35]

(Nguồn: Youyou Tu và cộng sự, 2020)

Các dẫn xuất chính của artemisinin bao gồm DHA, artesunate, β-artemether, mỗi dẫn xuất này được phát triển để cải thiện các đặc tính dược lý của artemisinin, như tăng cường độ tan trong nước hoặc dầu, cải thiện khả năng hấp thu và kéo dài thời gian tác dụng (Hình 1.3) [43]. Artemisinin và dẫn xuất có cấu trúc đặc trưng chứa cầu nối endoperoxide, được cho là yếu tố chính giúp tiêu diệt ký sinh trùng sốt rét thông qua việc tạo ra các gốc tự do gây hại cho tế bào ký sinh trùng [43].

Artemisinin và dẫn xuất có một số ưu điểm nổi bật so với các loại thuốc khác trong điều trị sốt rét như:

(1) Tác dụng nhanh chóng trong giảm số lượng ký sinh trùng sốt rét trong máu, điều này giúp giảm triệu chứng và cải thiện sức khỏe bệnh nhân.

(2) Hiệu quả trong điều trị loại sốt rét do *P. falciparum* đã phát triển khả năng kháng thuốc với các loại thuốc sốt rét truyền thống (Chloroquine, Quinine, SP).

(3) Trong điều trị sốt rét nặng, các thuốc dựa trên artemisinin đã chứng minh là giảm đáng kể tỉ lệ tử vong so với các phương pháp điều trị khác [35].

Tuy nhiên, việc sử dụng artemisinin dưới dạng đơn trị liệu đã dẫn đến sự phát triển nhanh chóng của tình trạng kháng thuốc. Để đối phó với tình trạng này, WHO đã cấm sử dụng đơn trị liệu artemisinin để ngăn chặn sự phát triển của tình trạng kháng thuốc và duy trì hiệu quả của các phác đồ ACT trong điều trị. Phác đồ ACT kết hợp artemisinin với một hoặc nhiều loại thuốc khác, giúp tăng cường hiệu quả điều trị và giảm nguy cơ phát triển kháng thuốc [44]. Năm 2001, WHO chính thức khuyến nghị sử dụng ACT là liệu pháp tiêu chuẩn để điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* [44].

1.2.2. Phác đồ điều trị sốt rét hiện hành

Phác đồ điều trị sốt rét đã có nhiều thay đổi và cải tiến qua thời gian nhằm đối phó với sự phát triển kháng thuốc của ký sinh trùng. Hiện nay, liệu pháp ACT được xem là phác đồ ưu tiên trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*. Phác đồ ACT bao gồm việc kết hợp artemisinin hoặc dẫn xuất của nó với một loại thuốc khác, mỗi loại thuốc điều trị sốt rét tác động lên ký sinh trùng theo một cơ chế hoạt động khác nhau, làm giảm khả năng ký sinh trùng phát triển kháng thuốc đối với tất cả các loại thuốc cùng một lúc [12, 45]. Thuốc phối hợp điều trị thường có có thời gian bán thải dài sẽ ở lại trong cơ thể trong thời gian dài hơn, giúp duy trì nồng độ thuốc hiệu quả trong máu, điều này giúp kiểm soát bệnh lâu dài hơn, ngay cả sau khi ngưng uống thuốc [12]. Phác đồ ACT được sử dụng trong liệu trình điều trị kéo dài 3 ngày [3, 44].

Hiện nay, trên thế giới có 6 phác đồ ACT chính được WHO khuyến cáo sử dụng trong điều trị sốt rét không biến chứng, bao gồm [3]:

- DHA-PPQ: Phác đồ được sử dụng phổ biến tại khu vực Đông Nam Á.

- Artemether - Lumefantrine (AL): Đây là một trong những phác đồ phổ biến nhất, thường được sử dụng do tính hiệu quả cao và ít tác dụng phụ. AL có thời gian bán hủy dài, giúp duy trì nồng độ thuốc trong máu và tiêu diệt hoàn toàn ký sinh trùng, là phác đồ được sử dụng rộng rãi tại Châu Phi.

- Artesunate - Amodiaquine (AS - AQ): Phác đồ này cũng được sử dụng rộng rãi ở nhiều quốc gia, đặc biệt là ở Châu Phi. AS - AQ hiệu quả trong việc giảm nhanh triệu chứng và ngăn ngừa tái phát.

- Artesunate - Mefloquine (AS - MQ): Chủ yếu được sử dụng tại các khu vực Đông Nam Á. AS - MQ có hiệu quả cao nhưng lại gây ra tác dụng phụ nghiêm trọng.

- Artesunate - Sulfadoxine/Pyrimethamine (AS - SP): Sử dụng hạn chế do một số vùng có tỉ lệ kháng thuốc cao.

- Artesunate - Pyronaridine (AS - PY): Một phác đồ mới hơn, đang được triển khai và đánh giá tại một số quốc gia.

Nhìn chung, các phác đồ điều trị sốt rét ACT hiện hành đã chứng minh hiệu quả cao trong việc điều trị sốt rét không biến chứng. Một phân tích tổng hợp về hiệu quả của phác đồ ACT tại Châu Phi cho thấy tỉ lệ chữa khỏi vào ngày 28 là 96,3% và vào ngày 42 là 93,9%. Trong đó, phác đồ DHA-PPQ có tỉ lệ thành công cao nhất, đạt 99,8% vào ngày 28 và 99,6% vào ngày 42, phác đồ AL và AS - AQ cũng cho thấy hiệu quả cao, với tỉ lệ thành công vào ngày 28 lần lượt là 96,8% và 96,3%. Một số nghiên cứu ghi nhận tỉ lệ thất bại điều trị cao hơn 10% đối với AL tại Angola và Ghana, cao hơn 5% nhưng dưới 10% đối với AS - AQ tại một số quốc gia như Angola, Burkina Faso, Kenya, Madagascar, Ghana, và Tanzania [46]. Tuy nhiên nghiên cứu cho rằng ACT, đặc biệt là DHA-PPQ, là lựa chọn hiệu quả và an toàn cho điều trị sốt rét không biến chứng, với tỉ lệ thành công cao và khả năng dung nạp tốt [44].

Tại Sudan, các phác đồ ACT đều cho tỷ lệ thành công cao trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*. Phác đồ DHA-PPQ đạt tỷ lệ thành công cao nhất với 99,1% (95%CI: 97,5–100%), tiếp theo là AL với 98,9% (95%CI: 98,4–99,4%) và AS-SP với 97,1% (95%CI: 95,5–98,6%). Các phác đồ khác như AS + AQ, AS + MQ và AS-SP dạng liều cố định cũng cho tỷ lệ thành công trên 90%. Nhìn chung, các liệu pháp kết hợp dựa trên artemisinin đều cho hiệu quả cao trong điều trị sốt rét *P. falciparum* không biến chứng ở Sudan, trong đó DHA-PPQ vượt trội với tỷ lệ thành công cao nhất [47].

Báo cáo tổng hợp hiệu quả của ACT tại một số quốc gia Châu Á như Ấn Độ, Campuchia, Thái Lan, Việt Nam giai đoạn từ 1996 đến 2002 cho thấy tỉ lệ thành công cao. Nghiên cứu cũng cho thấy, tại khu vực Đông Nam Á, phác đồ DHA –PPQ cho thấy hiệu quả vượt trội với tỉ lệ chữa khỏi cao nhất vào ngày 28 sau khi bắt đầu điều trị: DHA-PPQ có tỉ lệ chữa khỏi cao hơn đáng kể so với CQ (OR: 16,54, 95%CI 5,02–54,56) hay AL với OR =2,5; 95%CI:1,08-5,8) [48].

Tuy nhiên, ACT cũng gặp một số hạn chế, bao gồm sự phát triển của kháng thuốc đối với một số thành phần trong phác đồ [9]. Sự xuất hiện và lan rộng của kháng artemisinin, PPQ, đặc biệt ở khu vực Đông Nam Á, là một thách thức lớn đối với việc kiểm soát sốt rét, Ngoài ra, một số phác đồ ACT có thể gây ra tác dụng phụ không mong muốn ở một số bệnh nhân như buồn nôn, nôn mửa và rối loạn tiêu hóa [49, 50].

1.2.3. Vai trò của Dihydroartemisinin – Piperaquine trong điều trị sốt rét

1.2.3.1. Cơ chế hoạt động

DHA và PPQ là hai thành phần chính của phác đồ DHA-PPQ, việc phối hợp 2 loại thuốc trong phác đồ phối hợp dựa trên nguyên tắc DHA có thời gian bán thải ngắn, thường từ 1 đến 3 giờ và tác dụng nhanh chóng trong việc tiêu diệt ký sinh trùng sốt rét, điều này giúp giảm nhanh số lượng ký sinh trùng trong máu và cải thiện triệu chứng của bệnh nhân trong thời gian ngắn [12, 42, 44]. Trong khi đó thuốc phối hợp điều trị PPQ có thời gian bán thải tương đối dài (lên tới 42 ngày sau điều trị), thời gian bán thải dài này có lợi thế trong việc duy trì nồng độ thuốc trong máu ở mức điều trị trong một thời gian dài sau khi dùng thuốc giúp tiêu diệt các ký sinh trùng sốt rét còn sót lại và ngăn ngừa tái phát bệnh [12, 44].

Dihydroartemisinin (DHA), dẫn xuất của artemisinin, là một trong những thuốc điều trị sốt rét hiệu quả nhất hiện nay. DHA tạo ra các gốc tự do và hợp chất phản ứng cao, gây tổn hại protein, lipid và DNA của ký sinh trùng. Khi ký sinh trùng tiêu hóa hemoglobin, Fe^{2+} được giải phóng, kích hoạt DHA thông qua việc phân hủy cầu nối endoperoxide, tạo ra các gốc tự do tiêu diệt ký sinh trùng. DHA còn ức chế proteasome, khiến protein hồng tích tụ, gây stress nội bào và giết chết ký sinh trùng. Bên cạnh đó, DHA ức chế enzyme PI3K, làm giảm PI3P – một lipid quan trọng trong vận chuyển nội bào của ký sinh trùng – và ngăn chặn khả năng sinh tồn của chúng. Nhờ các

cơ chế đa dạng này, DHA tiêu diệt nhanh ký sinh trùng và giảm nguy cơ kháng thuốc. Piperaquine (PPQ), thuộc nhóm 4-aminoquinoline, hoạt động bằng cách ngăn cản quá trình kết tinh hemozoin – dạng không độc của heme – khiến heme tích tụ và gây độc cho ký sinh trùng. PPQ cũng tích tụ trong lysosome của ký sinh trùng, phá vỡ màng lysosome, giải phóng enzyme tiêu hóa và phá hủy tế bào ký sinh trùng. Khi kết hợp với artemisinin, PPQ duy trì nồng độ thuốc trong máu lâu hơn, tăng hiệu quả tiêu diệt ký sinh trùng, ngăn ngừa tái phát và giảm nguy cơ kháng thuốc [2, 43, 51, 52, 53, 54, 55].

1.2.3.2. Hiệu lực của phác đồ Dihydroartemisinin-Piperaquine trong điều trị sốt rét

Nhiều nghiên cứu lâm sàng đã được thực hiện để đánh giá hiệu quả và độ an toàn của DHA-PPQ trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* [42]. Nhìn chung, các nghiên cứu này đã chỉ ra rằng DHA-PPQ có hiệu quả cao trong việc giảm nhanh triệu chứng sốt rét, tiêu diệt ký sinh trùng trong máu và ngăn ngừa tái phát bệnh. Tỷ lệ chữa khỏi bệnh thường trên 95% khi sử dụng đúng cách [44].

Một phân tích tổng hợp từ 17 nghiên cứu ngẫu nhiên có đối chứng trên 5043 bệnh nhân tại châu Á cho thấy DHA-PPQ có hiệu quả vượt trội trong điều trị sốt rét không biến chứng. Tỷ lệ chữa khỏi của DHA-PPQ cao hơn AL vào ngày 28 (OR 2,5, 95% CI: 1,08-5,8) và vượt trội so với AS-CQ (OR: 11,21, 95% CI: 3,4-36,89), khẳng định DHA-PPQ là phác đồ hiệu quả nhất tại châu Á. Tại châu Phi, DHA-PPQ cũng chứng tỏ ưu thế vượt trội với tỷ lệ chữa khỏi 99,8% vào ngày 28 và 99,6% vào ngày 42, cao hơn AL (96,8%) và AS-AQ (96,3%). DHA-PPQ còn có tỷ lệ phản ứng phụ thấp nhất (1,8%) so với AL (6,9%) và AS-AQ (4,4%). Kết quả này cho thấy DHA-PPQ là lựa chọn tối ưu để điều trị sốt rét không biến chứng tại châu Phi, nhờ hiệu quả vượt trội, khả năng dung nạp tốt và tiềm năng ngăn ngừa kháng thuốc [45, 46, 48].

Việc sử dụng DHA-PPQ đang gặp thách thức do sự xuất hiện của các chủng *P. falciparum* kháng artemisinin và thuốc kết hợp. Tình trạng kháng thuốc ACT đã được ghi nhận tại Đông Nam Á, đặc biệt ở Campuchia, Thái Lan, Lào và Việt Nam. Tại Campuchia, hiệu quả của DHA-PPQ giảm đáng kể theo thời gian. Từ 2008-2010, tỷ lệ hiệu quả là 75% tại Pailin và 89,3% tại Pursat. Đến 2012-2013, hiệu quả giảm xuống còn 63,2% tại Pursat, dù vẫn đạt 98,4% tại Ratanakiri. Nguyên nhân chính là do đột biến gen *pfK13* (liên quan

đến kháng artemisinin) và sự khuếch đại gen *pfpm2* và *pfpm3* (làm giảm hiệu quả của PPQ). Tại Thái Lan, tỷ lệ hiệu quả của DHA-PPQ giảm nghiêm trọng, chỉ còn 12,7% tại khu vực Đông Bắc, do sự gia tăng các đột biến gen *pfK13* và sự khuếch đại *pfpm2* và *pfpm3*. Tại Lào, nghiên cứu tại Savannakhet cũng ghi nhận sự suy giảm hiệu quả điều trị DHA-PPQ sau các đợt điều trị hàng loạt. Tình trạng tương tự cũng được ghi nhận ở Việt Nam, phản ánh mối lo ngại về sự lan rộng của các chủng ký sinh trùng kháng thuốc trong khu vực GMS [5].

Tại Việt Nam, hiệu lực điều trị của phác đồ DHA-PPQ đã có sự thay đổi rõ rệt qua các năm, theo các nghiên cứu được thực hiện tại Bình Phước, Ma Nối (Ninh Thuận), và Tuy Đức (Đắk Nông). Tại Bình Phước, hiệu lực ban đầu của DHA-PPQ trong năm 2007 là rất cao, với tỉ lệ ACPR đạt 100% và tỉ lệ ký sinh trùng ngày thứ 3 (D3) chỉ là 4% [56]. Tuy nhiên, hiệu lực này bắt đầu giảm dần qua các năm, đến năm 2009, ACPR giảm xuống còn 97,8% và tỉ lệ D3 tăng lên 15,3%. Tình hình tiếp tục xấu đi trong các năm 2010, 2012, và 2013 khi tỉ lệ D3 lần lượt tăng lên 22%, 30,6%, và 36% [56]. Đến năm 2015, hiệu lực của DHA-PPQ đã giảm rõ rệt, với ACPR chỉ còn 68,2% và tỉ lệ D3 lên tới 50%, đồng thời có sự xuất hiện của đột biến C580Y trên gen *pfK13* là chỉ thị phân tử xác định kháng artemisinin và sự gia tăng số lượng bản sao của *pfpm2/3* liên quan đến kháng thuốc PPQ. Năm 2019, tại Đắk Lắk dù phác đồ DHA-PPQ được điều chỉnh với liều dùng cao hơn, hiệu lực điều trị vẫn chỉ đạt 37%, nhưng tỉ lệ ký sinh trùng ngày D3 giảm từ 36% xuống còn 19,4% [56]. Tại xã Ma Nối, huyện Ninh Sơn, tỉnh Ninh Thuận, năm 2015, tỉ lệ ký sinh trùng thể vô tính ngày D3 là 10,9%, nhưng đến năm 2017, tỉ lệ này giảm xuống chỉ còn 3%. Trong khi đó, tại huyện Tuy Đức, tỉnh Đắk Nông, năm 2014, ACPR đạt 100% và tỉ lệ ký sinh trùng ngày D3 là 26,7%. Tuy nhiên, đến năm 2016, ACPR giảm xuống còn 84,6% và tỉ lệ D3 là 23,1% [56]. Những kết quả này cho thấy sự giảm hiệu lực của DHA-PPQ trong điều trị sốt rét do *P. falciparum* qua thời gian tại Việt Nam và sự cần thiết phải theo dõi và điều chỉnh phác đồ điều trị một cách thường xuyên để đảm bảo hiệu quả điều trị tốt nhất [56].

Tóm lại, các yếu tố ảnh hưởng chính bao gồm sự xuất hiện và lan rộng của đột biến gen *pfK13*, cùng với và sự khuếch đại gen *pfpm2* đã dẫn đến tình trạng kháng PPQ và giảm hiệu quả của phác đồ DHA-PPQ [12, 56].

1.2.3.3. Yếu tố ảnh hưởng tới hiệu lực điều trị của DHA-PPQ

Hiệu quả điều trị của DHA-PPQ, một liệu pháp ACT phổ biến trong điều trị sốt rét, có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố bao gồm yếu tố từ vật chủ, ký sinh trùng hoặc thuốc điều trị [57].

Trước hết, liều lượng và chế độ điều trị không đúng hoặc không tuân thủ có thể dẫn đến tái phát bệnh và tăng nguy cơ kháng thuốc. Nghiên cứu đã chỉ ra rằng, dùng liều DHA-PPQ không đủ (dưới 48 mg/kg) là yếu tố quan trọng dẫn đến tái phát ký sinh trùng và thất bại điều trị [58, 59]. Trẻ em từ 1 đến 5 tuổi có nguy cơ thất bại điều trị cao hơn khi nhận liều PPQ dưới mức này, với nguy cơ tăng gấp 2,3 đến 2,9 lần so với các nhóm tuổi khác. Mỗi 5 mg/kg giảm trong liều PPQ làm tăng nguy cơ tái phát ký sinh trùng lên 13% [59], để giảm nguy cơ thất bại điều trị, tăng liều PPQ mục tiêu tối thiểu ở trẻ em từ 1 đến 5 tuổi từ 48 mg/kg lên 59 mg/kg có thể giảm một nửa nguy cơ thất bại điều trị và đảm bảo chữa khỏi ít nhất 95% bệnh nhân. Việc tăng liều này đã không liên quan đến việc tăng nguy cơ độc tính đường tiêu hóa như nôn mửa hoặc tiêu chảy trong các nghiên cứu có thể đánh giá điều này. Tối ưu hóa liều lượng sử dụng DHA và PPQ là yếu tố then chốt với hiệu quả điều trị sốt rét [59].

Tình trạng sức khỏe của bệnh nhân, bao gồm tuổi tác, cân nặng, tình trạng dinh dưỡng, và các bệnh lý kèm theo như HIV, suy gan, suy thận, cũng có thể ảnh hưởng đến dược động học và dược lực học của DHA-PPQ. Đã có báo cáo ca bệnh về trường hợp bệnh nhân béo phì (> 100kg) thất bại điều trị, điều này có thể do trọng lượng cơ thể cao ảnh hưởng đến cách thức phân bố và hấp thu thuốc trong cơ thể. Với DHA-PPQ, PPQ có tính chất lipophilic và phân bố rộng rãi trong cơ thể, bệnh nhân thừa cân có thể cần liều lượng cao hơn để đạt được nồng độ thuốc trong huyết tương đủ để tiêu diệt ký sinh trùng một cách hiệu quả [60].

Phân tích dược động học cho thấy nồng độ PPQ trong máu sau 7 ngày điều trị tương quan với thời gian mà nồng độ thuốc vượt quá nồng độ ức chế tối thiểu của ký sinh trùng, nồng độ PPQ trong máu ngày 7 ở trẻ em thấp hơn so với người lớn, do trẻ em có thể tích phân bố nhỏ hơn, độ thanh thải cao hơn và thời gian bán hủy ngắn hơn. Điều này tương quan với nguy cơ thất bại điều trị cao hơn ở trẻ em. Việc không có công thức thuốc dành riêng cho trẻ em càng làm tăng nguy cơ nhận liều lượng không phù hợp [59].

Tuổi của bệnh nhân là một yếu tố quan trọng, với trẻ em dưới 2 tuổi có nguy cơ chậm thanh thải ký sinh trùng cao hơn đáng kể (OR = 2,13) [57]. Điều này có thể do hệ miễn dịch của trẻ nhỏ chưa phát triển đầy đủ để loại bỏ ký sinh trùng hiệu quả. Thứ hai, sự hiện diện của sốt trước và trong quá trình điều trị cũng là một yếu tố nguy cơ [57]. Bệnh nhân có nhiệt độ cơ thể $\geq 38^{\circ}\text{C}$, cả trước khi bắt đầu điều trị và một ngày sau đó, đều có nguy cơ chậm thanh thải ký sinh trùng cao hơn (OR = 1,33) [57]. Sốt có thể là dấu hiệu của một phản ứng miễn dịch không đặc hiệu, làm giảm khả năng cơ thể loại bỏ ký sinh trùng nhanh chóng [57]. Cuối cùng, mật độ ký sinh trùng cao trước khi điều trị ($>50.000/\mu\text{l}$) và sau một ngày điều trị ($>20.000/\mu\text{l}$) đều liên quan đến nguy cơ chậm thanh thải ký sinh trùng (OR = 2,21). Mật độ ký sinh trùng cao có thể gây khó khăn cho hệ miễn dịch trong việc kiểm soát và loại bỏ tất cả các ký sinh trùng, dẫn đến thời gian thanh thải kéo dài [57].

Tác giả Amaratunga và cộng sự có báo cáo về ảnh hưởng đặc điểm ký sinh trùng tới hiệu quả điều trị. Trong nghiên cứu, tác giả phân nhóm ký sinh trùng (PG1 và PG2) dựa vào 18 microsatellite markers trên 14 nhiễm sắc thể [61], kết quả cho thấy bệnh nhân nhiễm ký sinh trùng PG1 có nồng độ artesunate và DHA trong huyết tương cao hơn sau liều đầu tiên của artesunate so với những người nhiễm ký sinh trùng thuộc nhóm PG2 với nồng độ artesunate trong huyết tương cao hơn ở nhóm PG1 là 95,80 ng/mL so với 63,10 ng/mL ở nhóm PG2 ($p=0,043$). Như vậy, các yếu tố di truyền của ký sinh trùng có vai trò quan trọng trong việc quyết định tốc độ thanh thải ký sinh trùng [61].

Cuối cùng và là nguyên nhân quan trọng nhất là sự phát triển của kháng thuốc đối với artemisinin và PPQ có thể làm giảm hiệu quả của DHA-PPQ, đặc biệt ở những khu vực có tỉ lệ kháng thuốc cao [58, 62]. Tại Campuchia, tỉ lệ tái phát ký sinh trùng đã tăng từ 15,4% trong giai đoạn 2011-2013 lên 39% trong giai đoạn 2012-2014. Khoảng 84% bệnh nhân được điều trị có thời gian làm sạch $\frac{1}{2}$ ký sinh trùng dài hơn 5 giờ và 57% vẫn còn ký sinh trùng trong máu sau 3 ngày điều trị. Tất cả các ký sinh trùng mang đột biến C580Y thu thập từ các bệnh nhân tái phát sau khi điều trị 3 ngày bằng DHA-PPQ đều kháng PPQ trong thử nghiệm *in vitro* [60].

Ngoài ra, nghiên cứu tại Campuchia không chỉ chứng minh *pfpm2* là dấu hiệu kháng PPQ, mà còn cho thấy mối liên quan chặt chẽ giữa sự gia tăng số

lượng bản sao *pfpm2* và hiệu quả điều trị của DHA-PPQ Trong 12 địa điểm được nghiên cứu về hiệu quả của DHA-PPQ từ năm 2009 đến 2015, các nhà khoa học phát hiện rằng tỉ lệ mẫu bệnh phẩm có nhiều bản sao gen *pfpm2* có mối tương quan nghịch với tỉ lệ chữa khỏi vào ngày 42 ($r=-0,89$ [95%CI 0,77-0,95], $p<0,0001$). Điều này cho thấy khi số lượng bản sao *pfpm2* tăng, tỉ lệ chữa khỏi giảm. Mô hình hồi quy Cox cũng chỉ ra rằng nguy cơ tái phát sau liệu trình 3 ngày DHA-PPQ tăng đáng kể ($p<2 \times 10^{-16}$) khi phát hiện ký sinh trùng có nhiều bản sao *pfpm2* vào ngày đầu tiên, bất kể địa điểm nghiên cứu. Thêm vào đó, mô hình hồi quy tuyến tính cho thấy hiệu quả lâm sàng của DHA-PPQ vào ngày 42 giảm xuống dưới 90% khi tỉ lệ ký sinh trùng có nhiều bản sao *pfpm2* trên nền đột biến *pfK13* vượt quá 22%. Tóm lại, nghiên cứu này khẳng định rằng sự gia tăng số lượng bản sao *pfpm2* không chỉ làm giảm hiệu quả điều trị DHA-PPQ mà còn làm tăng nguy cơ tái phát của ký sinh trùng [15].

Báo cáo về hiệu quả điều trị của DHA-PPQ tại Papua và Sumatra, Indonesia cho thấy mặc dù DHA-PPQ vẫn duy trì hiệu quả cao trong điều trị sốt rét không biến chứng, sự tái phát ký sinh trùng ở một số trường hợp tại Papua đã phản ánh sự suy giảm hiệu quả điều trị và có thể liên quan đến tình trạng kháng piperazine. Cụ thể, tổng cộng 7 trường hợp tái phát của *P. falciparum* đã được ghi nhận tại Papua vào các ngày 21, 35 và 42 của quá trình theo dõi. Trong số 7 trường hợp này, 6 ca được phân tích số lượng bản sao gen *pfpm2*. Kết quả cho thấy 3/6 trường hợp có số lượng bản sao *pfpm2* không thay đổi (1 bản sao), cho thấy đây là các ca tái phát (recrudescence) do nhiễm trùng ban đầu không được loại bỏ hoàn toàn, làm giảm hiệu quả điều trị. Đáng chú ý, 3/6 trường hợp còn lại mang nhiều bản sao gen *pfpm2* (2–3 bản sao), chỉ ra rằng đây là các ca tái nhiễm (re-infection) với chủng *P. falciparum* kháng piperazine, điều này càng làm suy giảm thêm hiệu quả của liệu pháp DHA-PPQ. Như vậy, một nửa số bệnh nhân tái phát đã bị tái nhiễm với các chủng kháng thuốc mang nhiều bản sao gen *pfpm2*, cho thấy sự gia tăng số lượng bản sao gen *pfpm2* đã góp phần đáng kể vào việc suy giảm hiệu quả điều trị của DHA-PPQ tại Papua [63].

Như vậy, để đảm bảo hiệu quả điều trị cao nhất, cần phải cân nhắc tất cả các yếu tố này khi lựa chọn và quản lý điều trị bằng DHA-PPQ, cũng như giám sát chặt chẽ trong quá trình điều trị và tiến hành nghiên cứu liên tục để phát hiện và giải quyết các vấn đề kháng thuốc.

1.3. Các phương pháp theo dõi, đánh giá hiệu lực của thuốc điều trị sốt rét và kháng thuốc

1.3.1. Thử nghiệm hiệu lực điều trị (*Therapeutic Efficacy Study - TES*)

Thử nghiệm hiệu lực điều trị (*Therapeutic Efficacy Study - TES*) là phương pháp đánh giá hiệu lực của thuốc điều trị sốt rét bằng cách theo dõi và đánh giá lâm sàng trên bệnh nhân thực tế [64, 65]. Đây là một trong những phương pháp quan trọng và được sử dụng rộng rãi để giám sát hiệu quả điều trị và phát hiện kháng thuốc sốt rét.

Quy trình tuyển chọn và điều trị bệnh nhân sốt rét đảm bảo giám sát chặt chẽ và hiệu quả điều trị. Bệnh nhân được chọn dựa trên độ tuổi, giới tính, sức khỏe và mức độ nhiễm ký sinh trùng, xác nhận qua kính hiển vi hoặc PCR. Sau đó, họ được điều trị theo phác đồ quy định, với liều lượng và thời gian cụ thể, dưới sự giám sát trực tiếp của nhân viên y tế. Bệnh nhân được theo dõi trong 28-42 ngày, với các mốc kiểm tra vào ngày 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28 (hoặc 42) và lấy mẫu máu để kiểm tra ký sinh trùng. Hiệu quả điều trị được đánh giá qua tỷ lệ bệnh nhân còn ký sinh trùng vào ngày thứ 3 và tỷ lệ thất bại điều trị trong 28-42 ngày. Nếu tỷ lệ thất bại từ 10% trở lên, phác đồ điều trị quốc gia có thể được điều chỉnh [64,65].

Trong thử nghiệm TES, kết quả điều trị của bệnh nhân được phân loại theo các tiêu chí cụ thể về sự hiện diện của ký sinh trùng và biểu hiện lâm sàng trong suốt quá trình theo dõi. Kết quả này bao gồm bốn nhóm [64]:

(1) Thất bại điều trị sớm (ETF - Early Treatment Failure) khi bệnh nhân không đáp ứng với liệu trình điều trị ngay từ giai đoạn đầu, được xác định khi có 1 trong các dấu hiệu sau:

- Dấu hiệu nguy hiểm hoặc sốt rét ác tính vào ngày 1,2,3 kèm theo có ký sinh trùng sốt rét trong máu.
- Mật độ ký sinh trùng ngày D2 cao hơn D0 bất luận thân nhiệt.
- Còn ký sinh trùng ngày D3 với thân nhiệt $\geq 37,50C$.
- Mật độ ký sinh trùng ngày D3 $\geq 25\%$ so với ngày D0.

(2) Thất bại lâm sàng muộn (LCF - Late Clinical Failure), khi các triệu chứng lâm sàng tái xuất hiện mặc dù không còn ký sinh trùng, được xác định khi có dấu hiệu sau:

- Không có dấu hiệu nguy hiểm hoặc sốt rét ác tính hoặc thất bại sớm trước đó.
- Sự có mặt ký sinh trùng vào bất kỳ ngày nào từ D7 đến D42 với thân nhiệt $\geq 37,50C$.

(3) Thất bại ký sinh trùng muộn (LPF - Late Parasitological Failure), khi ký sinh trùng tái xuất hiện trong máu mà không có triệu chứng lâm sàng, được xác định khi có dấu hiệu sau:

- Sự xuất hiện ký sinh trùng vào bất kỳ ngày nào từ D7 đến D42 với nhiệt độ nách $< 37,50C$ trên các ca trước đó không đủ tiêu chuẩn ETF hay LCF.

(4) Đáp ứng lâm sàng và ký sinh trùng đầy đủ (ACPR - Adequate Clinical and Parasitological Response):) được xác định không có ký sinh trùng trong vòng 42 ngày, bất luận nhiệt độ nách và các ca trước đó không hội đủ tiêu chuẩn ETF, LCF, LPF.

Thử nghiệm TES có nhiều ưu điểm nổi bật trong việc đánh giá hiệu lực của thuốc điều trị sốt rét so với các phương pháp khác. Được thực hiện trực tiếp trên bệnh nhân trong môi trường điều trị thực tế, TES phản ánh chính xác hiệu quả của thuốc và phản ứng của hệ miễn dịch tự nhiên. Bệnh nhân được theo dõi chặt chẽ trong suốt và sau quá trình điều trị, giúp phát hiện sớm các trường hợp thất bại và tái phát, đồng thời đánh giá cả hiệu quả lâm sàng và ký sinh trùng. Nhờ việc theo dõi sự hiện diện của ký sinh trùng và khả năng ngăn ngừa tái phát, TES có khả năng phát hiện tình trạng kháng thuốc. Ngoài ra, TES tuân theo quy trình chuẩn hóa của WHO, đảm bảo tính nhất quán và khả năng so sánh giữa các nghiên cứu và khu vực khác nhau, cung cấp dữ liệu thực tế và đáng tin cậy cho việc xây dựng phác đồ điều trị và chính sách phòng chống sốt rét. So với các phương pháp in vitro, TES vượt trội hơn trong việc đánh giá hiệu quả thuốc trong cơ thể sống, đồng thời cung cấp dữ liệu theo dõi liên tục và các tiêu chí phân loại chi tiết [64, 66].

Mặc dù TES là phương pháp chuẩn mực để đánh giá hiệu quả của thuốc điều trị sốt rét, nhưng nó cũng gặp phải một số hạn chế đáng kể. Việc tổ chức TES đòi hỏi quy trình phức tạp và tốn kém, bao gồm tuyển chọn bệnh nhân, quản lý điều trị và theo dõi lâm sàng trong thời gian dài, gây ra chi phí cao và đòi hỏi nguồn lực lớn, điều này đặc biệt khó khăn đối với các quốc gia đang có

dịch sốt rét. Các yếu tố như khả năng miễn dịch, tình trạng dinh dưỡng, mức độ tuân thủ điều trị và biến đổi di truyền của bệnh nhân có thể ảnh hưởng đến kết quả, khiến việc đánh giá hiệu quả thuốc trở nên phức tạp hơn. Thời gian theo dõi dài, từ 28 đến 42 ngày hoặc hơn, cũng gây khó khăn trong việc duy trì sự tham gia của bệnh nhân. Những hạn chế này khiến TES trở thành thách thức lớn trong việc triển khai và duy trì, mặc dù nó vẫn là phương pháp quan trọng để giám sát hiệu quả của các phác đồ điều trị chống sốt rét [64, 66].

1.3.2. Phương pháp *in vitro*

1.3.2.1. Phương pháp WHO microtest

Kỹ thuật WHO microtest là một phương pháp chuẩn hóa do WHO phát triển để đánh giá độ nhạy cảm của ký sinh trùng sốt rét đối với các loại thuốc điều trị sốt rét. Kỹ thuật này dựa trên nguyên tắc nuôi cấy *P. falciparum* trong môi trường RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) của W. Trager và B. Jensen (1976). Bộ micro test KIT của WHO có các nồng độ thuốc được gắn trên các giếng của phiến nhựa 96 giếng, chia làm 12 hàng, mỗi hàng 8 giếng có 1 giếng chứng và 7 giếng có nồng độ thuốc khác nhau tùy thuộc vào mỗi loại thuốc thử nghiệm. Quy trình ngày để xác định sự nhạy cảm *in vitro* của *P. falciparum* với thuốc sốt rét tại thực địa.

1.3.2.2. Phương pháp test *in vitro* 48 giờ

Phương pháp này nhằm đánh giá mức độ nhạy cảm của *P. falciparum* đối với các loại thuốc điều trị sốt rét bằng cách theo dõi sự phát triển của KST sau 48 giờ nuôi cấy trong các giếng chứa nồng độ thuốc khác nhau.

Quy trình tiến hành:

- Mẫu máu chứa ký sinh trùng sốt rét (*P. falciparum*) được thu thập từ bệnh nhân hoặc qua nuôi cấy.
- Các mẫu này được pha loãng và cho vào các giếng của đĩa microtest, trong đó có chứa môi trường nuôi cấy RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) và thuốc thử nghiệm ở các nồng độ khác nhau.
- Các giếng của đĩa microtest được chia thành hai loại:
 - o Giếng chứng: không chứa thuốc, dùng để so sánh với các giếng có thuốc nhằm đánh giá mức độ phát triển bình thường của KST.
 - o Giếng chứa thuốc: các giếng này có chứa thuốc điều trị sốt rét với các nồng độ từ thấp đến cao để kiểm tra mức độ ức chế sự phát triển của KST.

- Nuôi cấy 48 giờ: Mẫu được ủ trong môi trường nhiệt độ chuẩn (thường là 37°C) trong 48 giờ. Trong thời gian này, sự phát triển của KST được theo dõi, và không cần thay đổi môi trường.
- Đánh giá kết quả
 - Sau 48 giờ, các mẫu từ mỗi giếng sẽ được thu hoạch và đánh giá bằng cách nhuộm (thường là nhuộm Giemsa) để đếm số lượng KST còn sống hoặc bị ức chế.
 - Tỷ lệ sống sót của KST trong các giếng chứa thuốc sẽ được so sánh với giếng chứng không có thuốc, nhằm xác định nồng độ ức chế (50%, 90%, 99% KST) và hiệu quả của thuốc thử nghiệm.

Phương pháp này cho phép đánh giá trực tiếp khả năng ức chế phát triển của ký sinh trùng *P. falciparum* bởi các thuốc điều trị sốt rét, từ đó đưa ra thông tin chi tiết về hiệu quả của từng loại thuốc và mức độ nhạy cảm của ký sinh trùng với thuốc.

Nhìn chung, phương pháp *in vitro* đóng vai trò quan trọng trong nghiên cứu và đánh giá kháng thuốc sốt rét với nhiều ưu điểm nổi bật. Các thử nghiệm *in vitro* có khả năng phát hiện sớm tình trạng kháng thuốc ở mức độ phân tử và tế bào, trước khi biểu hiện lâm sàng xuất hiện, định lượng chính xác mức độ phát triển và sự hiện diện của ký sinh trùng. Nhờ khả năng kiểm soát điều kiện thí nghiệm chặt chẽ, phương pháp *in vitro* đảm bảo tính lặp lại cao và loại bỏ các yếu tố gây nhiễu từ môi trường sống của bệnh nhân. Ngoài ra, phương pháp *in vitro* cho phép sàng lọc nhanh chóng nhiều hợp chất để tìm ra các thuốc mới hoặc phối hợp thuốc hiệu quả, hỗ trợ cho các nghiên cứu cơ chế tác động của thuốc ở mức độ tế bào và phân tử, từ đó cải tiến phác đồ điều trị.

Tuy nhiên, phương pháp này cũng có những hạn chế. Nó không thể mô phỏng đầy đủ hệ miễn dịch và các yếu tố sinh học phức tạp của cơ thể người, đòi hỏi trang thiết bị đặc biệt và kỹ năng chuyên môn cao. Việc chuẩn hóa giữa các phòng thí nghiệm có thể khó khăn, các thử nghiệm *in vitro* không cung cấp thông tin về tác dụng phụ và độc tính của thuốc đối với cơ thể.

1.3.3. Phương pháp sinh học phân tử

Phương pháp sinh học phân tử gồm một số kỹ thuật như PCR, realtime PCR, giải trình tự gen đóng vai trò quan trọng trong nghiên cứu kháng thuốc vì nó cho phép phát hiện các đột biến gen hoặc biến đổi số lượng bản sao của

các gen liên quan đến kháng thuốc ở ký sinh trùng. Điều này giúp theo dõi sự xuất hiện và lây lan của các dạng kháng thuốc, cung cấp thông tin quan trọng để cảnh báo sớm về các nguy cơ kháng thuốc và điều chỉnh chính sách điều trị phù hợp. Nhìn chung, phương pháp sinh học phân tử thường ít khi dùng độc lập mà thường phối hợp với các phương pháp khác khi nghiên cứu sốt rét kháng thuốc.

Kỹ thuật PCR có thể được sử dụng trong việc phân biệt giữa tái phát và tái nhiễm KST sốt rét trong thử nghiệm đánh giá hiệu lực điều trị sốt rét. Mẫu máu của bệnh nhân được thu thập tại thời điểm D0 (ngày bắt đầu điều trị) và sau khi xuất hiện lại ký sinh trùng để phân tích và so sánh, giúp xác định nguyên nhân của sự tái xuất hiện này là do tái phát hay nhiễm mới. Trong khi phương pháp nhuộm Giemsa không thể phân biệt rõ hai trường hợp này, phân tích sinh học phân tử qua PCR có thể xác định các kiểu gen ký sinh trùng tại các loci khác nhau như *MSP1*, *MSP2*, *GLURP*. Các kiểu gen như *MP1* (*merozoite surface protein 1*), *MP2* (*merozoite surface protein 2*), và *GLURP* (*glutamate-rich protein*) giúp phát hiện sự khác biệt di truyền giữa các chủng ký sinh trùng, từ đó phân biệt rõ ràng giữa tái phát và tái nhiễm.

Real-time PCR là một phương pháp phân tử cho phép phát hiện các biến đổi trong số lượng bản sao của gen cũng như các SNPs (Single nucleotide polymorphisms). Phương pháp này được thực hiện trên thiết bị chuyên dụng, cho phép quan sát sự khuếch đại DNA trong thời gian thực bằng cách sử dụng các chất nhuộm huỳnh quang như SYBR Green hoặc các đoạn mồi đánh dấu bằng huỳnh quang. Phương pháp này chủ yếu được sử dụng để đo lường chính xác sự thay đổi trong số lượng bản sao của gen và phát hiện SNPs. Trong quy trình này, khi PCR tiến hành, lượng sản phẩm khuếch đại (amplicon) sẽ tăng dần và tín hiệu huỳnh quang phát ra tỷ lệ thuận với lượng amplicon được tạo ra. Chu kỳ (cycle number) tại đó tín hiệu huỳnh quang vượt qua ngưỡng được gọi là giá trị Ct (threshold cycle), và giá trị này phản ánh nồng độ ban đầu của DNA mục tiêu trong mẫu.

Giải trình tự DNA, đặc biệt là giải trình tự gen *pfK13*, đóng vai trò quan trọng trong việc phát hiện, theo dõi các đột biến liên quan đến kháng thuốc sốt rét, đặc biệt là kháng artemisinin ở ký sinh trùng *P. falciparum*. Gen *pfK13* mã hóa cho protein Kelch13, và các đột biến trong gen này đã được chứng minh có liên quan trực tiếp đến kháng thuốc.

Quá trình giải trình tự *pfK13* giúp xác định các thay đổi trong chuỗi nucleotide của gen này. Các đột biến thường xuất hiện tại các vị trí nhất định trong vùng mã hóa của gen *pfK13*. Khi phân tích trình tự gen từ các mẫu ký sinh trùng sốt rét, các nhà khoa học có thể so sánh với chuỗi gen tham chiếu để phát hiện các đột biến. Ví dụ, các đột biến phổ biến như C580Y, Y493H, R539T, và I543T đã được ghi nhận là liên quan đến tình trạng kháng artemisinin. Sử dụng các phương pháp giải trình tự, chẳng hạn như giải trình tự Sanger hoặc giải trình tự thế hệ mới (NGS), các nhà nghiên cứu có thể nhanh chóng phát hiện và định danh các đột biến này trong quần thể ký sinh trùng. Điều này rất quan trọng cho việc giám sát kháng thuốc, theo dõi sự xuất hiện và lây lan của các chủng kháng thuốc trong các khu vực lưu hành bệnh sốt rét, cũng như giúp định hướng các chiến lược điều trị và phòng ngừa hiệu quả hơn.

Phương pháp sinh học phân tử cũng dùng để nghiên cứu sốt rét kháng thuốc. Tuy nhiên, phương pháp sinh học phân tử thường ít khi dùng độc lập mà thường phối hợp với các phương pháp khác khi nghiên cứu sốt rét kháng thuốc. Về mặt lý thuyết, các tần suất xuất hiện đột biến gen cụ thể trong một mẫu KST thu được từ bệnh nhân từ một khu vực nhất định có thể cung cấp một dấu hiệu của tần suất kháng thuốc trong khu vực đó tương tự như thông tin thu được từ các phương pháp *in vitro*. Ưu điểm bao gồm chỉ cần số lượng nhỏ vật liệu di truyền và khả năng tiến hành số lượng lớn kiểm tra trong một khoảng thời gian tương đối ngắn. Nhược điểm của phương pháp này khó khăn trong đánh giá mối liên quan giữa các đột biến nhất định và kháng thuốc, đặc biệt là khi sự kháng thuốc liên quan đến nhiều hơn một locus gen và nhiều đột biến. Nếu những phức tạp này có thể được giải quyết, kỹ thuật phân tử có thể trở thành một cực kỳ công cụ giám sát có giá trị để theo dõi sự xuất hiện, lan rộng hoặc tăng cường kháng thuốc

1.4. Ký sinh trùng *P. falciparum* kháng thuốc

1.4.1. Một số định nghĩa trong kháng thuốc sốt rét

Đến nay WHO đã chính thức công nhận kháng thuốc đối với 3 trong số 5 chủng KST sốt rét gây bệnh ở người bao gồm: *P. falciparum*, *P. vivax* và *P. malariae* trong đó chủng *P. falciparum* kháng đa thuốc và là loài duy nhất đã giảm nhạy cảm và kháng với artemisinin và dẫn xuất. Tuy nhiên, trên thực

hành lâm sàng vẫn còn nhầm lẫn giữa thuật ngữ “Kháng thuốc” và “Thất bại điều trị”.

Kháng thuốc kháng sốt rét được định nghĩa là khả năng của một chủng ký sinh trùng sống sót hoặc nhân lên mặc dù đã được sử dụng và hấp thụ một loại thuốc với liều lượng bằng hoặc cao hơn liều thường được khuyến cáo, nhưng vẫn trong giới hạn dung nạp của cơ thể [12].

Thất bại điều trị là thuật ngữ được sử dụng nhiều trong nghiên cứu hiệu lực thuốc gần đây. Thất bại điều trị được định nghĩa là tình trạng một thuốc mất khả năng làm sạch KST trong máu hoặc xuất hiện các triệu chứng nặng lên mặc dù đã được điều trị đủ liều theo qui định. Hiện tượng thất bại điều trị không phải lúc nào cũng đồng nghĩa với kháng thuốc. Thất bại điều trị còn do nguyên nhân khác như thuốc giả, thuốc quá hạn, uống không đủ liều, dung nạp thuốc kém, đáp ứng miễn dịch [67].

Kháng đa thuốc là tình trạng kháng đối với hơn hai loại thuốc kháng sốt rét thuộc các nhóm hóa học khác nhau [12].

Năm 2018, định nghĩa kháng một phần artemisinin (artemisinin partial resistance) được đưa ra bởi WHO khi có sự chậm làm sạch KST do kháng một phần artemisinin trên thể nhân. Tuy nhiên, phần lớn các bệnh nhân có hiện tượng chậm làm sạch KST vẫn sạch KST sau khi điều trị bằng liệu pháp ACT vì bên trong vẫn có vai trò của thuốc đi kèm (partner drug) vẫn có hiệu quả kéo dài đến 7 ngày. Theo định nghĩa mới bổ sung và cập nhật này thì:

+ Nghi ngờ khu vực kháng: $\geq 10\%$ người bệnh có thời gian giảm $\frac{1}{2}$ số lượng KST ≥ 5 giờ sau điều trị với ACT hoặc $\geq 5\%$ số người bệnh mang đột biến gen *pfK13* xác định kháng artemisinin hoặc $\geq 5\%$ người bệnh có thời gian cắt KST chậm sau ngày D3.

+ Xác định khu vực kháng artemisinin: $\geq 5\%$ số người bệnh mang đột biến gen *pfK13* xác định kháng artemisinin, tất cả người bệnh này có thời gian cắt KST chậm vào ngày D3 hoặc có thời gian giảm $\frac{1}{2}$ số lượng KST ≥ 5 giờ sau điều trị [67].

1.4.2. Chỉ thị phân tử trong theo dõi kháng Dihydroartemisinin-Piperaquine

Chỉ thị phân tử được sử dụng trong theo dõi kháng thuốc sốt rét là một phương pháp sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để phát hiện và theo dõi các đột biến di truyền liên quan đến khả năng kháng thuốc của ký sinh trùng sốt rét (*Plasmodium spp.*). Phương pháp này được coi là công cụ quan trọng

trong việc quản lý và kiểm soát tình trạng kháng thuốc của ký sinh trùng sốt rét, đặc biệt là ở các vùng có tỷ lệ kháng thuốc cao hoặc các "điểm nóng" về kháng thuốc như Đông Nam Á và châu Phi. Các kỹ thuật giám sát phân tử chủ yếu tập trung vào việc phân tích các gen đích có liên quan đến kháng thuốc, như gen *pfK13* đối với kháng artemisinin, hoặc gen *pfcr1* và *pfmdr1* đối với kháng chloroquine.

Các chỉ thị phân tử dùng để theo dõi tính kháng thuốc đảm bảo một số tiêu chí sau:

- i. Đặc hiệu cho từng loại thuốc: Chỉ thị phân tử thường liên quan đến các đột biến hoặc sự thay đổi trong một hoặc vài gen nhất định có liên quan đến khả năng kháng thuốc của tác nhân gây bệnh. Những gen này thường mã hóa cho các protein mục tiêu của thuốc hoặc các enzyme có khả năng vô hiệu hóa thuốc.
- ii. Phân bố địa lý và dịch tễ học: Các chỉ thị phân tử kháng thuốc có sự phân bố không đồng đều giữa các khu vực địa lý và quần thể ký sinh trùng, thường tập trung ở các "điểm nóng" kháng thuốc. Sự phân bố này giúp xác định và theo dõi sự lây lan của kháng thuốc trên phạm vi rộng.
- iii. Liên quan đến sự chọn lọc tự nhiên: Các đột biến kháng thuốc thường xuất hiện và gia tăng tần suất thông qua quá trình chọn lọc tự nhiên. Điều này xảy ra khi một nhóm cá thể có đột biến kháng thuốc sống sót và sinh sản mạnh hơn các cá thể không có đột biến dưới áp lực của liệu pháp điều trị.
- iv. Tính ổn định: Các chỉ thị phân tử thường là các điểm đột biến ổn định và có thể được theo dõi qua nhiều thế hệ của tác nhân gây bệnh, giúp việc giám sát và nghiên cứu dễ dàng hơn.
- v. Có liên hệ với kết quả điều trị: Chỉ thị phân tử có tính liên quan trực tiếp với hiệu quả điều trị. Ví dụ, sự xuất hiện của một số đột biến có thể dự báo tỷ lệ thất bại trong điều trị hoặc thời gian làm sạch ký sinh trùng kéo dài.
- vi. Dễ dàng phát hiện và phân tích: Các chỉ thị phân tử thường được thiết kế sao cho dễ dàng phát hiện bằng các kỹ thuật sinh học phân tử như PCR, giải trình tự gen, hoặc các phương pháp khác, giúp tăng hiệu quả và độ chính xác trong việc theo dõi kháng thuốc.

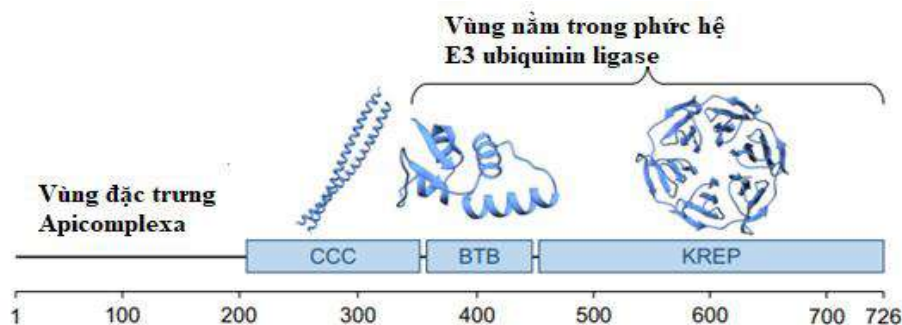
Việc lựa chọn các chỉ thị phân tử để giám sát kháng thuốc sốt rét đồng thời phụ thuộc chặt chẽ vào phác đồ điều trị hiện hành và loại thuốc đang được sử dụng trong khu vực. Điều này nhằm đảm bảo các chỉ thị phân tử được chọn có liên quan trực tiếp đến cơ chế kháng thuốc của ký sinh trùng đối với những loại thuốc đang được áp dụng, từ đó phản ánh chính xác tình trạng kháng thuốc trong quần thể ký sinh trùng tại địa phương.

Như vậy, theo dõi tình trạng kháng DHA-PPQ một trong những liệu pháp điều trị ACT phổ biến, tại Việt nam các chỉ thị phân tử thường được sử dụng bao gồm *pfK13* theo dõi kháng artemisinin và sự gia tăng số lượng bản sao *pfpm2*, điểm đột biến E415G theo dõi kháng PPQ.

1.4.2.1. Đột biến trên gen *pfK13* trong theo dõi kháng artemisinin

Gen *pfK13* mã hóa protein Kelch nằm trên nhiễm sắc thể số 13 của ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum*. Protein Kelch 13 gồm có 3 vùng chức năng với độ dài khoảng 726 axit amin [68]:

- Vùng N đặc trưng cho ngành *Apicomplexa*, khu vực này không được bảo tồn nhiều và có cấu trúc dạng cuộn ngẫu nhiên;
- Vùng CCC (a coiled-coil-containing) mã hóa cho axit amin 212-341, vùng BTB (Broad Complex hay BTB/POZ) mã hóa cho axit amin từ 350-437;
- Vùng Krep (Kelch-repeat propeller) hay motif Kelch mã hóa cho axit amin từ 443-726 đặc trưng bởi 6 vùng nhỏ hình cánh quạt điển hình và đây cũng là vùng xuất hiện hầu hết các đột biến liên quan đến kháng artemisinin (**Hình 1.4**).



Hình 1.4. Gen *pfK13* và các vùng chức năng [69]

(Nguồn Coppée R và cộng sự, 2019)

Protein Kelch13 là một protein quan trọng trong ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* đóng vai trò then chốt trong cơ chế kháng thuốc artemisinin [51,

52]. Chức năng chính của Kelch13 liên quan đến quá trình ubiquitin hoá, một quá trình hậu dịch mã trong đó ubiquitin gắn vào protein để đánh dấu chúng cho sự phân hủy bởi proteasome hoặc điều chỉnh các chức năng khác của protein. Kelch13 hoạt động như một bộ điều hợp của E3 ubiquitin ligase, điều chỉnh các protein liên quan đến chu kỳ tế bào, sao chép gen, vận chuyển màng, và đặc biệt là quá trình endocytosis, tức quá trình nhập bào [51, 52]. Tại cytostome của ký sinh trùng, Kelch13 giúp điều khiển quá trình hấp thụ hemoglobin từ tế bào hồng cầu chủ, sau đó hemoglobin được tiêu hóa trong không bào tiêu hóa của ký sinh trùng để cung cấp dưỡng chất. Các đột biến ở *pfK13* làm gián đoạn quá trình này, dẫn đến giảm lượng heme từ hemoglobin cần thiết để kích hoạt artemisinin, giúp ký sinh trùng sống sót trong giai đoạn vòng sớm của nhiễm trùng khi điều trị bằng artemisinin [51]. Ngoài ra, các đột biến *pfK13* còn giúp ký sinh trùng giảm căng thẳng proteotoxic do artemisinin gây ra bằng cách giảm hoạt động tiêu hóa hemoglobin và do đó giảm lượng heme kích hoạt artemisinin. Kết quả là đột biến *pfK13* có thể chịu đựng căng thẳng tốt hơn và có hệ thống phòng thủ mạnh mẽ hơn trước tác động của artemisinin [51, 52].

Cho đến hiện nay, đã phát hiện được hơn 200 loại đột biến trên gen *pfK13* tuy nhiên không phải dạng đột biến nào cũng liên quan tới kháng artemisinin [12, 70]. Theo phân loại của WHO, các đột biến *pfK13* được xác nhận là liên quan đến kháng artemisinin bao gồm: N458Y, Y493H, R539T, I543T, R561H và C580Y, những đột biến này đã được chứng minh là có liên quan chặt chẽ đến hiện tượng thanh thải ký sinh trùng chậm sau khi điều trị bằng artemisinin [12]. Ngoài ra, có một số đột biến ứng viên cũng có tiềm năng liên quan đến kháng artemisinin như: P441L, F446I, G449A, P553L, V568G, P574L và A675V [12]. Một số đột biến khác đã được báo cáo có liên quan đến kháng thuốc trong các thử nghiệm *in vivo* hoặc *in vitro* bao gồm: M476I, C469Y, A481V, S522C, N537I, N537D, G538V, M579I, D584V và H719N, các đột biến này được phân loại dựa trên mức độ liên quan đến hiện tượng thanh thải ký sinh trùng chậm và kết quả các nghiên cứu lâm sàng cũng như nghiên cứu trong phòng thí nghiệm [12, 71].

1.4.2.2. Điểm đa hình đơn E415G và chỉ thị phân tử kháng PPQ

Gen *exonuclease* của *P. falciparum* (*pfEXO* hoặc PF3D7_1362500) nằm trên NST số 13 của ký sinh trùng sốt rét mã hoá enzym exonuclease [6].

Exonuclease là các enzyme chủ chốt tham gia vào nhiều khía cạnh của quá trình chuyển hóa và duy trì tế bào và rất cần thiết cho sự ổn định của bộ gen, hoạt động để tách DNA khỏi các đầu tự do. Các exonuclease có thể đóng vai trò là bộ đọc sửa lỗi trong quá trình sao chép DNA, để loại bỏ các cấu trúc DNA bất thường phát sinh từ các vấn đề với tiến trình rẽ nhánh sao chép DNA và chúng có thể tham gia trực tiếp vào việc sửa chữa DNA bị hỏng. cách thức cả hoạt động exonuclease bên trong và bên ngoài góp phần vào độ chính xác của DNA polymerase trong quá trình sao chép DNA [72].

Đột biến E415G trên gen *pfEXO* làm thay đổi nucleotide adenin thành guanin dẫn đến làm thay đổi axit glutamic (E) thành glycine (G) ở vị trí 415 trên gen mã hóa [19]. Như tên gọi của chúng, exonuclease là các enzym phân cắt nucleotit từ đầu 3' hoặc 5' của DNA bằng cách thủy phân các liên kết photphodiester giữa các axit nucleic. Đây là đặc điểm chung của một số polymerase có “hoạt tính exo” và được phân biệt với hoạt động endonuclease bởi vì exonuclease phân cắt từ hai đầu cuối của chuỗi DNA trái ngược với phân cắt nucleotit tại một vị trí bên trong của “hoạt tính endo”. Nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng hoạt động exonuclease 3'-5' cũng cần thiết trong sửa chữa kết nối không tương đồng (NHEJ) cho thấy một vai trò đối với exonucleases không chỉ trong quá trình sao chép DNA mà còn trong các quá trình sửa chữa riêng biệt. Tuy nhiên vai trò của exonuclease này đối với ký sinh trùng *P. falciparum* vẫn chưa được nghiên cứu rõ ràng. Các giả thuyết được đưa ra rằng exonuclease của *P. falciparum* có vai trò sửa chữa trong quá trình sao chép DNA và thậm chí có thể sửa chữa DNA của ký sinh trùng. Nếu điều này chính xác thì khả năng đột biến E415G sẽ làm ảnh hưởng đến chức năng đọc lại hoặc sửa chữa của protein giả định này dẫn đến sự khác biệt đáng kể (tăng hoặc giảm) trong các đột biến tổng thể ở ký sinh trùng sốt rét, có thể hỗ trợ trong kiểu hình kháng thuốc.

Các báo cáo gần đây cho thấy E415G liên quan đến kháng PPQ, một thành phần trong phác đồ điều trị phối hợp DHA-PPQ [6, 14, 17]. Theo nghiên cứu của Boonyalai và cộng sự (2020) đã khám phá vai trò của đột biến E415G trong gen *pfEXO* liên quan đến khả năng kháng PPQ của ký sinh trùng *P. falciparum* ở Campuchia [17], kết quả cho thấy các ký sinh trùng mang đột biến E415G kết hợp với các đột biến mới của *pfCRT* (T93S, H97Y, F145I, và I218F) có khả năng kháng PPQ ngay cả khi không có sự gia tăng số lượng

bản sao *pfpm2*. Điều này cho thấy rằng đột biến E415G đóng vai trò quan trọng trong việc tạo ra kiểu hình kháng PPQ [17].

1.4.2.3 Gen *pfpm2* và chỉ thị phân tử kháng PPQ

Gen *plasmepsin* (*pfpm*) mã hoá cho enzyme aspartic protease, nằm trên nhiễm sắc thể số 14 của ký sinh trùng *P. falciparum* [73]. Ký sinh trùng *P. falciparum* có 10 loại *plasmepsin* (từ 1 đến 10), mỗi *plasmepsin* đóng vai trò nhất định trong chu kỳ sống của nó [73]. *Plasmepsin1/2* là các aspartic protease chính, chịu trách nhiệm phân giải hemoglobin trong không tiêu hóa của ký sinh trùng, cung cấp nguồn dinh dưỡng cần thiết cho sự sống còn và phát triển của chúng. *Plasmepsin3* (còn gọi là Histo-aspartic Protease hoặc HAP) và *plasmepsin 4* cũng tham gia vào quá trình tiêu hóa hemoglobin, nhưng ở mức độ ít rõ rệt hơn [73].

Ngay sau khi xâm nhập vào hồng cầu, ký sinh trùng sốt rét thuỷ phân hemoglobin với tốc độ khá nhanh chóng nhờ hoạt động của enzyme aspartic protease (*plasmepsin 1-4*), quá trình này cung cấp chất dinh dưỡng cần thiết cho hoạt động của ký sinh trùng sốt rét [74]. Khi ký sinh trùng sốt rét phân hủy hemoglobin, heme được giải phóng ra và có thể gây độc cho chúng nếu không được xử lý đúng cách. Để tránh điều này, ký sinh trùng biến heme thành một dạng không độc hại là các hạt không tan có tên là hemozoin [75]. Sự tích tụ nhân heme là quá trình ngăn chặn sự biến đổi của heme thành hemozoin, từ đó tạo ra môi trường độc hại cho ký sinh trùng và có thể dẫn đến cái chết của chúng. Đây là cơ sở của một số loại thuốc điều trị sốt rét như chloroquine và PPQ, làm việc bằng cách ngăn chặn sự tạo thành của hemozoin, từ đó tích tụ heme tự do trong ký sinh trùng và gây độc cho chúng [16, 76]. Sự gia tăng số lượng bản sao của *pfpm2* làm tăng mức độ biểu hiện của các protease này, giúp ký sinh trùng vượt qua tác động của PPQ bằng cách duy trì quá trình tiêu hóa hemoglobin và hình thành hemozoin, kể cả khi có sự hiện diện của thuốc [16].

Sự thay đổi số lượng bản sao gen (Copy Number Variation - CNV) là hình thức biến đổi di truyền khá phổ biến được quan sát thấy và được chứng minh là yếu tố chính góp phần vào phát triển kháng thuốc ở ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* [77].

Vai trò của chỉ thị phân tử *pfpm2* với tính kháng PPQ lần đầu tiên được báo cáo qua nghiên cứu của Witkowski và cộng sự [15, 78]. Tác giả sử dụng

thử nghiệm PSA (Piperaquine survival assay) để xác định tỉ lệ sống sót của ký sinh trùng khi tiếp xúc với PPQ, kết quả cho thấy tỉ lệ sống sót trung bình giữa các chủng có nhiều bản sao của *pfpm2* so với các chủng chỉ có một bản sao lần lượt là 51,7% (IQR 29,7–75,1) so với 0,004% (IQR 0,003–0,39), $p < 0,0001$. Như vậy, với kết quả này, tác giả cho rằng chỉ thị phân tử khuếch đại gen *pfpm2* là một dấu hiệu mạnh mẽ cho theo dõi kháng PPQ tại khu vực có dịch [15, 78].

Nghiên cứu của Roberto Amato và các cộng sự nhằm chứng minh sự khuếch đại bản sao *pfpm2* liên quan đến kháng PPQ, đã sử dụng một phương pháp toàn diện bao gồm phân tích toàn bộ bộ gen (GWAS) và phân tích số lượng bản sao. Cụ thể, nhóm nghiên cứu đã thu thập 297 mẫu *P. falciparum* từ Campuchia từ 2011 đến 2013 và tiến hành đo nồng độ ức chế 50% PPQ *in vitro*. Phân tích số lượng bản sao đã xác định sự khuếch đại của các gen *pfpm2* cũng liên quan đến tăng IC_{50} của PPQ [16].

Không chỉ được sử dụng là dấu hiệu của kháng PPQ, nghiên cứu tại Campuchia cho thấy *pfpm2* còn liên quan chặt chẽ tới hiệu quả điều trị của DHA-PPQ [15]. Trong 12 địa điểm nghiên cứu về hiệu quả của DHA-PPQ từ năm 2009 đến 2015, các nhà khoa học đã phát hiện rằng tỉ lệ mẫu bệnh phẩm có nhiều bản sao gen *pfpm2* có mối tương quan nghịch với tỉ lệ chữa khỏi vào ngày 42 ($r = -0,89$ [95%CI 0,77-0,95], $p < 0,0001$). Điều này có nghĩa là khi số lượng bản sao *pfpm2* tăng lên, tỉ lệ chữa khỏi giảm xuống. Một mô hình hồi quy Cox cho thấy nguy cơ tái phát sau liệu trình 3 ngày DHA-PPQ tăng lên đáng kể ($p < 2 \times 10^{-16}$) khi có sự hiện diện của ký sinh trùng với nhiều bản sao *pfpm2* vào ngày đầu tiên, bất kể địa điểm lấy mẫu. Ngoài ra, một mô hình hồi quy tuyến tính chỉ ra rằng hiệu quả lâm sàng của DHA-PPQ vào ngày 42 giảm xuống dưới 90% khi tỉ lệ ký sinh trùng có nhiều bản sao *pfpm2* trên nền đột biến *pfK13* vượt quá 22%. Nói cách khác, nghiên cứu này cho thấy rằng sự gia tăng số lượng bản sao của gen *pfpm2* có liên quan chặt chẽ đến việc giảm hiệu quả điều trị DHA-PPQ và tăng nguy cơ tái phát ký sinh trùng [15].

1.4.3. Tình hình ký sinh trùng *P. falciparum* kháng thuốc sốt rét

Trước khi artemisinin được sử dụng rộng rãi, khu vực GMS đã chứng kiến sự kháng thuốc của *P. falciparum* đối với các loại thuốc điều trị sốt rét truyền thống như chloroquine và SP [79].

Vào năm 2008, kháng artemisinin hay sự chậm thanh thải ký sinh trùng sốt rét lần đầu tiên được báo cáo tại Tây Campuchia [80]. Hiện tượng chậm thanh thải được đặc trưng bởi thời gian thanh thải ký sinh trùng kéo dài sau khi điều trị bằng artemisinin hoặc phác đồ ACT [45]. Thông thường, các ca nhiễm không chậm thanh thải ½ ký sinh trùng sốt rét sẽ giảm mạnh mức độ ký sinh trùng trong vòng khoảng 3 giờ sau khi điều trị bằng ACT, trong khi các ca nhiễm có sự chậm thanh thải ½ ký sinh trùng sốt rét cần nhiều thời gian hơn ($\geq 5-6$ giờ) để đạt được mức độ tương tự [81]. Mặc dù ca kháng artemisinin lâm sàng đến năm 2008 mới được báo cáo thì dữ liệu phân tử cho thấy khả năng kháng artemisinin đã xuất hiện miền Tây Campuchia đã xuất hiện từ những năm 2001 - 2002 với khoảng 70% ký sinh trùng đã mang đột biến *pfK13*, trong đó hơn 40% có đột biến C580Y [45, 78, 79, 80, 81, 82, 83].

Đến năm 2009, Dondorp và cộng sự công bố nghiên cứu cho thấy mức độ kháng artemisinin đang gia tăng ở Tây Campuchia, với tỉ lệ thất bại điều trị cao hơn đáng kể, lên đến 20-40% [78]. Cùng với đó, kháng artemisinin lan sang khu vực cận miền Tây Campuchia, trong giai đoạn từ 2011 đến 2013, tỉ lệ đột biến *pfK13* ở các khu vực lân cận miền tây Campuchia vẫn còn thấp, nhưng đến năm 2013, 63% mẫu từ Chey Saen, Đông Bắc Campuchia, đã mang đột biến này. Sự xuất hiện và lan rộng của hiện tượng kháng artemisinin đã dẫn đến sự giảm hiệu quả của nhiều liệu pháp ACT [82, 83]. Trong giai đoạn từ năm 2010 đến 2011, kháng artemisinin bắt đầu lan sang các khu vực khác của Đông Nam Á, bao gồm biên giới Thái Lan - Myanmar và miền Nam Việt Nam [82].

Tại Việt Nam, tình hình kháng artemisinin đã diễn biến phức tạp qua các giai đoạn khác nhau. Vào năm 2009, WHO báo cáo hiện tượng chậm thanh thải ký sinh trùng sốt rét lần đầu tiên tại Việt Nam, với khoảng 10% mẫu từ Bình Phước mang đột biến *pfK13* [83, 84]. Đến năm 2010 - 2011, tỉ lệ đột biến *pfK13* ở Bình Phước đã tăng lên hơn 20%, cho thấy sự gia tăng của kháng thuốc. Trong giai đoạn 2012 - 2013, hơn 80% mẫu từ huyện Nam Trà My, Quảng Nam, mang đột biến *pfK13*, chỉ ra rằng đột biến này đã

lan rộng từ miền nam lên miền trung. Đến năm 2014 - 2015, tại Gia Lai, phía nam Nam Trà My, đột biến *pfK13* tiếp tục được xác định, cho thấy sự lan rộng liên tục của kháng thuốc. Tỷ lệ thất bại điều trị với DHA-PPQ tại Bình Phước vượt quá 10% vào năm 2015, dẫn đến việc giới thiệu lại AS-MQ như liệu pháp điều trị thay thế [83].

Mặc dù chưa có bằng chứng nào cho thấy kháng artemisinin do đột biến *pfK13* đã lan rộng ngoài GMS. Tuy nhiên, vấn đề đáng lo ngại gần đây là *P. falciparum* mang một dấu hiệu kháng artemisinin, *pfK13* R561H, đã xuất hiện và lan rộng ở Rwanda [85]. Dòng ký sinh trùng kháng artemisinin ở Rwanda biểu hiện kiểu hình của kháng artemisinin, tức là thanh thải ký sinh trùng chậm kèm theo tăng tỉ lệ sống sót sau khi tiếp xúc *in vitro* với DHA, nhưng may mắn là chưa ảnh hưởng đến hiệu quả của AL, liệu pháp đầu tiên trong điều trị sốt rét ở Rwanda [85]. Thêm vào đó nghiên cứu cũng cho rằng kháng artemisinin tại khu vực này có nguồn gốc độc lập với kháng thuốc tại Châu Á [85].

Kháng thuốc đối tác của ACT có thể đã xuất hiện ở Đông Nam Á, và DHA –PPQ là một ví dụ [83]. Điều này gây ra sự thanh thải ký sinh trùng chậm. Hơn nữa, artemisinin có khả năng diệt thể vô tính rất tốt ở giai đoạn đầu và cuối vòng đời của ký sinh trùng, khiến cho các ký sinh trùng nhạy cảm ít dễ lây lan hơn và có thể cũng giảm khả năng sinh giao bào [83]. Ngược lại, những ký sinh trùng kháng artemisinin lại ít bị ảnh hưởng hơn và thậm chí có thể thúc đẩy sự hình thành giao bào, làm tăng sự lây truyền của các ký sinh trùng kháng thuốc khi ACT bắt đầu thất bại trong điều trị. Những yếu tố này tạo ra một lợi thế chọn lọc cho kháng artemisinin và đặc biệt là kháng đa thuốc, mở rộng sự phổ biến của chúng trong quần thể ký sinh trùng, đặc biệt là ở những khu vực có tỉ lệ lây truyền sốt rét thấp [83].

Kháng PPQ đã được báo cáo ở Campuchia và các nước lân cận [17]. Sự kháng thuốc này liên quan đến sự tăng số lượng bản sao của gen *pfpm2*, dẫn đến hiệu quả điều trị giảm PPQ [5]. Vào năm 2015, tất cả 8 nghiên cứu được thực hiện tại Campuchia cho thấy tỉ lệ tăng bản sao của gen *pfpm2* vượt quá 50%, điều này chỉ ra rằng tình trạng kháng PPQ ở Campuchia rất nghiêm trọng trong thời gian này [17]. Tuy nhiên, vào các năm 2018 và 2019, không có nghiên cứu nào báo cáo tỉ lệ này vượt quá 50%, sự thay đổi này có thể liên

quan đến việc thay đổi chính sách điều trị từ sử dụng DHA-PPQ sang AS-MQ từ năm 2014 [86, 87].

Đa kháng thuốc là một vấn đề phức tạp và khiến cho hiệu lực điều trị sốt rét giảm nghiêm trọng hơn [5, 83]. Ở những khu vực có *P. falciparum* kháng cả artemisinin và thuốc phối hợp trong liệu pháp ACT, tỉ lệ tái phát sẽ rất cao, như đã quan sát ở Campuchia và Việt Nam sau điều trị bằng DHA-PPQ. Sự kết hợp giữa đột biến pfK13 C580Y và sự nhân đôi pfp2/3 đã tạo ra một dòng ký sinh trùng đa kháng thuốc mạnh mẽ, gọi là "C580Y-co-lineage" [83] hoặc "KEL1/PLA1" [87]. Chủng ký sinh trùng này đã lan truyền từ Campuchia sang các nước láng giềng như Việt Nam và Thái Lan, điều này gây ra sự lây lan nhanh chóng sự đa kháng thuốc trên khắp Campuchia về phía Tây Việt Nam, làm suy giảm hiệu quả điều trị của DHA-PPQ tại các quốc gia này [5, 83, 87].

Tóm lại, tình trạng kháng thuốc và đa kháng thuốc của ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* tại khu vực GMS nói chung và Việt Nam nói riêng, đang trở nên ngày càng phức tạp, ảnh hưởng nghiêm trọng đến kết quả điều trị và công tác phòng chống sốt rét. Ngoài kháng artemisinin, hiện tượng kháng thuốc phối hợp điều trị như PPQ đã được ghi nhận, làm giảm hiệu lực các phương pháp điều trị hiện tại. Tình trạng này không chỉ gây khó khăn cho việc điều trị mà còn đe dọa đến thành tựu đã đạt được trong kiểm soát và phòng chống sốt rét.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. 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*

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

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 [30], 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.

* Địa điểm, thời gian nghiên cứu:

- Địa điểm: Viện Nghiên cứu Y dược học, Học Viện Quân y.
- Thời gian nghiên cứu từ tháng 8 năm 2018 đến tháng 3 năm 2023.

2.1.2. Hoá chất, trang thiết bị, dụng cụ

2.1.2.1. Hoá chất

Bộ kit tách chiết DNA tổng số GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); Hoá chất cần thiết cho phản ứng nhân gen bao gồm: Gotaq[®] mastermix (Promega, Mỹ); QuantiTect Probe PCR Master Mix (Qiagen, CHLB Đức); Đệm 10X (Fermentas, Mỹ); Nước khử ion (Thermo Scientific, Mỹ); Agarose (Thermo ScientificTM, Mỹ); Hóa chất pha đệm chạy điện di DNA (TAE): Tris base (Merck, CHLB Đức); Acetic acid (Merck, CHLB Đức); EDTA (Merck, CHLB Đức); DNA chuẩn 100bp, 1kb (Thermo Scientific, Mỹ); Bộ kit tinh sạch sản phẩm PCR GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); Ethanol 70%.

2.1.2.2. Thiết bị

Máy Luân nhiệt (Eppendorf AG, CHLB Đức); Máy real-time PCR (Qiagen, CHLB Đức); Máy lắc ổn nhiệt (Thermomixer, Mỹ); Máy ly tâm nhanh (Wealtech E- Catrifuge, Mỹ); Máy lắc (IKA® vortex genius 3 Rotamixer, CHLB Đức); Lò vi sóng (Sharp, Nhật Bản), Cân kỹ thuật (Mettler Toledo, Thụy Sĩ); Tủ lạnh âm 20°C, âm 80°C (Sanyo, Nhật Bản); Pipet các loại (Eppendorf Research Plus, CHLB Đức); Máy ly tâm, Máy quang phổ Biospectrometer và Máy điện di (Bio-Rad, Mỹ), Kính hiển vi quang học (Zeiss, CHLB Đức).

2.1.2.3. Dụng cụ

Lam kính, giấy Whatman, ống chứa máu EDTA-K2 (Việt Nam); Ống Eppendorf đựng mẫu thể tích 1,5 ml (Corning, Mỹ); ống Eppendorf 0,2 ml (QSP); Đầu côn các loại (Eppendorf, CHLB Đức).

2.1.3. Phương pháp nghiên cứu

2.1.3.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả kết quả thực nghiệm trong phòng thí nghiệm.

2.1.3.2. Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu

- **Cỡ mẫu:** cỡ mẫu tối thiểu được tính theo công thức xác định một tỉ lệ xuất hiện đột biến các gen kháng thuốc:

$$n = Z_{1-\alpha/2}^2 \frac{1-p}{\varepsilon^2 p}$$

Trong đó:

- n: là cỡ mẫu tối thiểu cần điều tra để phát hiện đột biến
- Sai lầm loại I với $\alpha=0,05$.
- ε : Độ chính xác tương đối, nhóm nghiên cứu lựa chọn $\varepsilon=0,1$
- p: Tỉ lệ xuất hiện các đột biến gen trong quần thể
- + Tham khảo tỉ lệ xuất hiện đột biến C580Y của gen *pfK13* tại khu Việt Nam giai đoạn 2015-2016 là 79,1% [88]. 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% [89]. Kết quả thay vào công thức ta có cỡ mẫu tối thiểu là **n = 307** mẫu bệnh nhân.
- + Tỉ 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% [90]. 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 trừ 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

- **Phương pháp chọn mẫu:** Mẫu được thu thập không ngẫu nhiên từ các bệnh nhân sốt rét do *P. falciparum* đơn thuần tại các địa điểm nghiên cứu.

2.1.4. Nội dung nghiên cứu và biến số nghiên cứu

2.1.4.1. Nội dung nghiên cứu

- **Phân tích sự biến đổi di truyền và khảo sát tần số đột biến trên gen *pfK13***

+ Xác định đột biến trên gen *pfK13*

+ Xác định tần suất xuất hiện các đột biến trên gen *pfK13*

+ Phân tích một số đặc điểm theo sự xuất hiện đột biến trên gen *pfK13*

- **Phân tích sự biến đổi di truyền và khảo sát tần số khuếch đại bản sao gen *pfpm2***

+ Xác định đặc điểm khuếch đại bản sao gen *pfpm2*

+ Xác định tần suất xuất hiện khuếch đại bản sao gen *pfpm2*

+ Phân tích một số đặc điểm theo sự xuất hiện đột biến trên gen *pfpm2*

- **Phân tích tính đa hình điểm đột biến E415G trên gen *pfEXO***

+ Xác định đột biến E415G trên gen *pfEXO*

+ Xác định tần suất xuất hiện đột biến E415G trên gen *pfEXO*

+ Phân tích một số đặc điểm theo sự xuất hiện đột biến E415G trên gen *pfEXO*

2.1.4.2. *Chỉ tiêu, biến số nghiên cứu biến đổi di truyền và tần số đột biến gen ứng viên*

Bảng 2.1. Chỉ tiêu, biến số nghiên cứu mục tiêu 1

| TT | Biến số | Định nghĩa, cách xác định | Phân loại biến số |
|---|------------|--|-------------------|
| Đặc điểm chung và triệu chứng lâm sàng | | | |
| 1 | Tuổi (năm) | Là thời gian tính từ khi đối tượng được sinh ra cho tới thời điểm bệnh nhân tham gia nghiên cứu, tính theo năm dương lịch. | Định lượng |
| 2 | Giới tính | Nam giới và nữ giới | Nhị phân |

| TT | Biến số | Định nghĩa, cách xác định | Phân loại biến số |
|------------------------------------|--|---|-------------------|
| 3 | Địa điểm nghiên cứu | Địa điểm bệnh nhân sinh sống và làm việc ngay trước thời điểm được chẩn đoán sốt rét chưa biến chứng | Định danh |
| 4 | Triệu chứng sốt | Nhiệt độ cơ thể được đo bằng nhiệt kế thủy ngân, vị trí đo tại hõm nách. Đánh giá và phân loại mức độ sốt theo Balli và cộng sự [91]: + Nhiệt độ bình thường: 36°C - 37,4°C + Sốt nhẹ: 37,5°C - 38°C + Sốt vừa: 38,1°C - 39°C + Sốt cao: 39,1°C - 41°C + Sốt rất cao: > 41°C | Phân hạng thứ bậc |
| 5 | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | Mật độ ký sinh trùng là số lượng ký sinh trùng / μ l máu. | Định lượng |
| Đặc điểm biến đổi di truyền | | | |
| 1 | Đột biến gen <i>pfK13</i> | Phân loại: Kiểu gen đột biến: Ký sinh trùng sốt rét mang đột biến trên gen <i>pfK13</i> . Kiểu gen đại: được định nghĩa là ký sinh trùng sốt rét không mang đột biến trên gen <i>pfK13</i> | Định tính |
| 2 | Sự thay đổi số lượng bản sao trên gen <i>pfpm2</i> | Số lượng bản sao được tính thông qua giá trị Ct của 2 gen (<i>pfpm2</i> , <i>β-tubulin</i>) của chủng chuẩn và mẫu bệnh phẩm để xác định số lượng bản sao <i>pfpm2</i> . Phân loại : Kết quả giá trị $\geq 1,5$ làm tròn lên 2, được xác định là ký sinh trùng mang nhiều bản sao gen <i>pfpm2</i> . Giá trị $< 1,5$ làm tròn xuống 1, được xác định là ký sinh trùng mang 1 bản sao gen <i>pfpm2</i> . | Định tính |
| 3 | Tính đa hình đột biến E415G trên gen <i>pfEXO</i> | Phân loại: Kiểu gen đột biến: Ký sinh trùng sốt rét mang đột biến E415G trên gen <i>pfEXO</i> . Kiểu gen đại: được định nghĩa là ký sinh trùng sốt rét không mang đột biến E415G trên gen <i>pfEXO</i> . | Định tính |

2.1.5. Kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

2.1.5.1. Kỹ thuật xác định ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* bằng lam máu soi kính hiển vi

Kỹ thuật phát hiện và xác định chính xác ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* được thực hiện bằng phương pháp soi kính hiển vi trên tiêu bản máu nhuộm Giemsa, tuân thủ theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO, 2016) [30]. Quy trình chi tiết của kỹ thuật này được trình bày trong Phụ lục 3 Luận án.

2.1.5.2. Kỹ thuật đếm mật độ ký sinh trùng sốt rét.

Kỹ thuật đếm mật độ ký sinh trùng sốt rét được thực hiện theo hướng dẫn của WHO (2016) [92]. Quy trình thực hiện chi tiết của kỹ thuật được trình bày trong Phụ lục 4 Luận án.

2.1.5.3. Kỹ thuật lấy máu bệnh nhân vào giấy thấm Whatman 3MM

Mẫu máu thu thập từ các bệnh nhân mắc sốt rét đơn nhiễm với ký sinh trùng *P. falciparum* sẽ được bảo quản trên giấy thấm Whatman. Quy trình thu thập và bảo quản mẫu được thực hiện theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO, 2016) và được mô tả chi tiết trong Phụ lục 5 luận án.

2.1.5.4. Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách từ mẫu máu trên giấy lọc Whaman của bệnh nhân tham gia nghiên cứu bằng bộ kit GeneJET Whole (Thermofisher, Mỹ). Quy trình tác chiết theo hướng dẫn chi tiết của của nhà sản xuất. Sản phẩm DNA sau tách chiết sẽ được bảo quản ở -20°C cho đến khi được sử dụng cho phản ứng nhân gen.

2.1.5.5. Định lượng và đánh giá độ sạch của DNA bằng quang phổ kế

Kiểm tra nồng độ và đánh giá chất lượng được DNA tổng số thực hiện trên máy NanoDrop 2000 (Thermofisher, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chất lượng DNA được đánh giá dựa trên hai tỉ số A260/A280 và A260/A230. Khi hai tỉ số nằm lần lượt trong khoảng từ 1,8-2 và 1,8-2,2 thì DNA được coi là đảm bảo độ sạch. Sản phẩm DNA tổng số sau khi kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch sẽ được bảo quản ở -20°C cho đến khi được sử dụng cho phản ứng nhân gen.

2.1.5.6. Xác định đột biến trên gen *pfK13*

Trong nghiên cứu này, để tăng độ nhạy của phản ứng khuếch đại gen *pfK13*, kỹ thuật PCR lồng (nested PCR) đã được sử dụng theo mô tả trong một nghiên cứu của Ariey và cộng sự [93].

Bảng 2.2: Trình tự cặp mồi nhân bản gen *pfK13*

| Tên mồi | Trình tự mồi (5'-3') |
|------------------|----------------------|
| <i>pf13</i> - 1F | GGGAATCTGGTGGTAACAGC |
| <i>pf13</i> - 1R | CGGAGTGACCAAATCTGGGA |
| <i>pf13</i> - 2F | GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA |
| <i>pf13</i> - 2R | GCCAAGCTGCCATTCATTTG |

Ghi chú: F: Forward - Mồi xuôi; R: Reverse r - Mồi ngược

Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt tối ưu để nhân bản gen *pfK13* được trình bày ở bảng dưới đây:

Bảng 2.3. Thành phần phản ứng cho phản ứng PCR nhân gen *pfK13*

| PCR vòng 1 | | PCR vòng 2 | |
|--|---------------|--|---------------|
| Thành phần | Thể tích (μl) | Thành phần | Thể tích (μl) |
| Mastermix | 10 | Mastermix | 10 |
| <i>pfK13</i> - 1F (10 μM) | 0,5 | <i>pfK13</i> -2F (10 μM) | 0,5 |
| <i>pfK13</i> - 1R(10 μM) | 0,5 | <i>pfK13</i> - 2R (10 μM) | 0,5 |
| H ₂ O | 7 | H ₂ O | 7 |
| DNA | 2 | DNA | 2 |
| Tổng số | 20 | Tổng số | 20 |
| Chu kỳ nhiệt: 94°C-5 phút, (94°C-45 giây, 51°C-45 giây, 72°C-1 phút 25 giây giây) x25, 72°C-5 phút. | | Chu kỳ nhiệt 95°C-5 phút, (94°C-45 giây, 50°C-45 giây, 72°C-45 giây) x30, 72°C-5 phút. | |

Sản phẩm PCR sau khi điện di, kiểm tra kích thước sẽ được tiến hành tinh sạch bằng bột kit PCR GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

Sản phẩm DNA sau tinh sạch sẽ được đo nồng độ trước khi giải trình tự. Sản phẩm PCR vòng 2 được gửi tới hãng Apical Scientific Sdn, Bhd (Malaysia) để tinh sạch và giải trình tự với mỗi *pfK13*-2F.

Khi có kết quả, sử dụng phần mềm Bioedit V7.2.5 so sánh với trình tự gen thu được với trình tự gen *pfK13* tham chiếu trên ngân hàng gen (NC_004331.3), được phân tích bằng thuật toán Clustal W multiple alignment để xác định đột biến.

2.1.5.7. Xác định số lượng bản sao gen *pfpm2*

Trong nghiên cứu này, xác định số lượng bản sao gen *pfpm2* ở ký sinh trùng sốt rét thông qua gen tham chiếu *β -tubulin*, trong đó sử dụng đầu dò Taqman để thực hiện phản ứng multiplex real-time PCR nhân đồng thời gen *pfpm2* và gen tham chiếu *β -tubulin*. Trình tự mỗi và probe tôi có tham khảo nghiên cứu của Robert và cs [94], được trình bày tại bảng dưới đây :

Bảng 2.4. Trình tự mỗi và đầu dò phản ứng nhân gen *pfpm2* và *β -tubulin*

| Tên mỗi | Trình tự mỗi (5'-3') |
|---|---|
| <i>pfpm2</i> F | GGA GAT AAC CAA CAA CCA TTT AC |
| <i>pfpm2</i> R | GTT GTA CAT TTA ACA CTT GGG A |
| <i>pfpm2</i> -probe | FAM-CCC ATA AAT TAG CAG ATC CTG TAT C-BHD |
| <i>β-tubulin</i> F | TGA TGT GCG CAA GTG ATC C |
| <i>β-tubulin</i> R | TCC TTT GTG GAC ATT CTT CCT C |
| <i>β-tubulin</i> - probe | VIC - TAG CAC ATG CCG TTA AAT ATC TTC CAT GTC T-BHD |

Ghi chú: F: Forward - Mỗi xuôi; R: Reverse - Mỗi ngược; Probe: Đầu dò

- **Thực hiện phản ứng real-time PCR nhân gen:** Thành phần cho phản ứng nhân gen xác định số lượng bản sao gen *pfpm2* ở ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* được trình bày ở bảng dưới:

Bảng 2.5. Thành phần phản ứng và chu kỳ nhiệt cho phản ứng nhân gen *pfpm2* và β -tubulin

| Thành phần | Nồng độ (μ M) | Thể tích (μ l) |
|------------------------|--------------------|---------------------|
| Master Mix | | 12,5 |
| <i>pfpm2</i> F | 0,4 | 1 |
| <i>pfpm2</i> R | 0,4 | 1 |
| β -tubulin F | 0,4 | 1 |
| β -tubulin R | 0,4 | 1 |
| <i>pfpm2</i> đầu dò | 0,1 | 0,25 |
| β -tubulin probe | 0,1 | 0,25 |
| H ₂ O | | 6 |
| DNA | | 2 |
| Thể tích | | 25 |
| Chu kỳ nhiệt | | |
| Hold | 45 chu kỳ | |
| 95° – 15 phút | 94° – 15 giây | 94° – 15 giây |

Sau khi thực hiện phản ứng real-time PCR cho tất cả các mẫu bệnh phẩm, giá trị đường ngưỡng của phản ứng được xác định bằng 5% giá trị tín hiệu huỳnh quang cao nhất và được điều chỉnh nhằm đảm bảo giá trị đường ngưỡng tương đối đồng đều ở tất cả các phản ứng. Xác định được giá trị đường ngưỡng, phần mềm của máy real-time PCR cho kết quả giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) của các mẫu. Giá trị Ct của tất cả các mẫu được đưa vào excel, xử lý bằng công thức Livak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ để tính số bản sao của gen *pfpm2* [95]. Trong đó

$$\Delta Ct = Ct_{pfpm2} - Ct_{\beta-tubulin}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{mẫu bệnh} - \overline{\Delta Ct_{mẫu 3D7}}$$

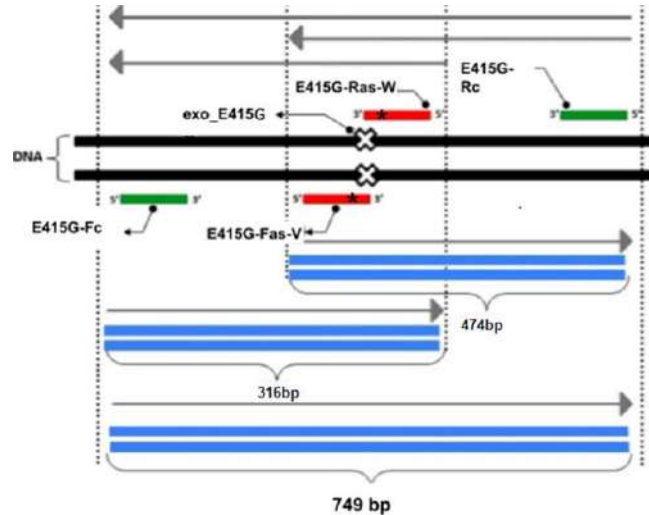
$\Delta Ct_{mẫu bệnh}$: hiệu giá trị Ct của gen *pfpm2* với gen tham chiếu β -tubulin của mẫu bệnh

$\overline{\Delta Ct_{mẫu 3D7}}$ giá trị trung bình của hiệu giá trị Ct của gen *pfpm2* với gen tham chiếu β -tubulin của mẫu đối chứng 3D7 ở tất cả các lần chạy.

Kết quả số bản sao của gen *pfpm2* được tính theo công thức $2^{-\Delta\Delta Ct}$ với giá trị phần nguyên sau khi được làm tròn.

2.1.5.8. Xác định tính đa hình E415G trên gen *pfEXO*

Nghiên cứu sử dụng phương pháp tetra-primer ARMS-PCR để xác định điểm đa hình E415G. Trước tiên, sử dụng phần mềm primer-blast để thiết kế mỗi nhân đoạn gen *pfEXO* của ký sinh trùng sốt rét có chứa điểm đa hình E415G, trình tự gen tham chiếu *PF3D7_1362500* có trên ngân hàng gen. Sơ đồ vị trí các mồi trong phản ứng tetra-ARMS PCR phát hiện điểm đa hình E415G được trình bày tại hình dưới đây:



Hình 2.1. 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 allen thường, mồi màu đỏ E415G-Fas-V (mồi trong) khuếch đại allen đột biến. Dấu “X” minh họa vị trí xảy ra đột biến; dấu “*” minh họa mismatch ở nucleotit số 2 tính từ đầu 3’ của mồi).

Các cặp mồi sau khi được thiết kế sẽ được thử nghiệm trên thực tế để kiểm tra độ đặc hiệu. Trình tự mồi thiết kế để phát hiện điểm đa hình E415G trên gen *pfEXO* ở ký sinh trùng sốt rét được trình bày dưới đây:

Bảng 2.6. Trình tự 4 mồi được sử dụng để phát hiện điểm đa hình E415G

| Tên mồi | Trình tự mồi (5' → 3') |
|-------------|--------------------------------------|
| E415G-Fc | GGA ATG TGC TTT AAC GAA TGG |
| E415G-Fas-V | TAT GGT TAT AAC GAT AAA AC* G |
| E415G-Rc | GGT GTT CCT TCC TCT TTT CTT G |
| E415G-Ras-W | CCC AAT GAT TGT TTA CTT CG* T |

(Nucleotit đặc hiệu cho allen ở tận cùng đầu 3’ của mồi (in đậm), nucleotit số 2 ở đầu 3’ được thiết kế không bắt cặp được kí hiệu (*)).

***Thực hiện phản ứng tetra ARMS PCR nhân gen *pfEXO*:**

Phát hiện điểm đột biến E415G ở ký sinh trùng sốt rét: Thành phần phản ứng nhân gen *pfEXO* như sau:

Bảng 2.7. Thành phần phản ứng phát hiện E415G trên gen *pfEXO* ở ký sinh trùng

| Thành phần | Thể tích (µl) | Nồng độ |
|--|---------------|---------|
| Gotaq Green Mastermix (2X) | 5 | |
| Môi xuôi (5µM) | 0,5 | 0,25 µM |
| Môi ngược (5µM) | 0,5 | 0,25 µM |
| H ₂ O | 3 | |
| ADN (30 ng/µl) | 1 | 3 ng/µl |
| Tổng | 10 | |
| Chu trình: 95°C-5 phút, (95°C-45 giây, gradient-45 giây, 72°C-35 giây) x40, 72°C-5 phút. | | |

Sau khi kết thúc phản ứng tetra ARMS - PCR, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 2%, dựa vào số lượng band, kích thước band để các định số lượng kiểu gen.

Kích thước các băng xuất hiện khi điện di sản phẩm phản ứng PCR sẽ cho biết kiểu gen của ký sinh trùng trong mẫu phẩm. Ký sinh trùng sốt rét mang alen thường (A) có các băng kích thước là 749bp và 316bp. Ký sinh trùng sốt rét mang alen đột biến (G) xuất hiện các băng kích thước là 749bp và 474bp.

Để kiểm tra độ chính xác của phương pháp ARMS-PCR, chúng tôi sử dụng phương pháp giải trình tự gen *pfEXO* làm đối chứng. Tiến hành giải trình tự gen *pfEXO* như sau:

***Giải trình tự gen *pfEXO*:**

Sử dụng cặp mồi E415G-Fc (Môi xuôi: 5'- GGA ATG TGC TTT AAC GAA TGG-3') và E415G-Rc (Môi ngược: 5'GGT GTT CCT TCC TCT TTT CTT G -3' để nhân gen *pfEXO*. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt phản ứng nhân gen *pfEXO* như sau:

Bảng 2.8. Thành phần phản ứng nhân gen *pfEXO*

| Thành phần phản ứng | Thể tích (µl) |
|---|----------------------|
| Gotaq Green Mastermix (2X) | 5 |
| E415G-Fc (5µM) | 0,5 |
| E415G-Rc (5µM) | 0,5 |
| H ₂ O | 3 |
| DNA (30 ng/µl) | 1 |
| Tổng | 10 |
| Chu trình: 95°C-5 phút, (95°C-45 giây, 54°C-45 giây, 72°C-35 giây) x40; 72°C-5 phút. | |

Sản phẩm PCR sau khi điện di, kiểm tra kích thước sẽ được tiến hành tinh sạch trước khi gửi đi giải trình tự. Sản phẩm PCR được gửi tới hãng Apical Scientific Sdn, Bhd (Malaysia) để giải trình tự với mồi E415G-Fc (Bảng 2.6).

Khi có kết quả, các trình tự thu được được ghép nối, chỉnh sửa bằng các công cụ tin sinh học như BioEdit. Trình tự thu được cuối cùng được so sánh với ngân hàng gen để xác định kiểu gen E415G của ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum* và so sánh đối chiếu với phương pháp ARMS-PCR xây dựng.

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

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

2.2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

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* theo quy trình thử nghiệm TES (WHO, 2009) 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.

- 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.

2.2.1.2. Địa điểm, thời gian nghiên cứu

- Địa điểm: Viện sốt rét – côn trùng và ký sinh trùng Trung ương, Viện nghiên cứu y dược học quân sự, Học viện Quân y.
- Thời gian: Thời gian nghiên cứu từ tháng 6 năm 2019 đến tháng 3 năm 2023.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu hồi cứu dựa trên phân tích hồ sơ bệnh án của bệnh nhân sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*.

2.2.2.2. Cỡ mẫu đánh giá hiệu quả phác đồ DHA-PPQ

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%.

Khi tỷ lệ $p = 0,10$ (10%) và $d = 15\%$, số bệnh nhân mất theo dõi hoặc rút khỏi nghiên cứu khoảng 15% yêu cầu cỡ mẫu tối thiểu là bệnh nhân (bao gồm 49 bệnh nhân chính và 8 bệnh nhân dự phòng). 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.

Bảng 2. 9. Cỡ mẫu ước tính dựa trên tỷ lệ thất bại lâm sàng (p) ở quần thể

| Tỷ lệ thất bại lâm sàng trên quần thể (p) với độ tin cậy 95% | | | | | | | | | | |
|---|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|
| d | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,35 | 0,4 | 0,45 | 0,5 |
| 0,05 | 73 | 138 | 196 | 246 | 288 | 323 | 350 | 369 | 380 | 384 |
| 0,1 | 18 | 35 | 49 | 61 | 72 | 81 | 87 | 92 | 95 | 96 |

2.2.3. Nội dung và biến số nghiên cứu đánh giá hiệu quả phác đồ DHA-PPQ

2.2.3.1. Nội dung nghiên cứu đánh giá hiệu quả phác đồ DHA-PPQ

- Xác định tỉ lệ ký sinh trùng sốt rét dương tính vào ngày D3 sau điều trị;
- Xác định tỉ lệ tái phát ký sinh trùng sốt rét;
- Xác định hiệu quả điều trị sau 42 ngày điều trị: bao gồm xác định tỉ lệ ETF; tỉ lệ LTF, LPF, LCF và tỉ lệ ACPR.

2.2.3.2. Chỉ tiêu, biến số nghiên cứu

Bảng 2.10. Chỉ tiêu, biến số nghiên cứu mục tiêu 2

| TT | Biến số | Định nghĩa, phân loại đánh giá | Phân loại biến số |
|----|---|---|-------------------|
| 1 | Ký sinh trùng sốt rét dương tính vào ngày D3 sau điều trị | Là bệnh nhân còn ký sinh trùng trong máu sau 3 ngày (72 giờ) điều trị bằng DHA-PPQ. | Định tính |
| 2 | Tái phát | Đây là tình trạng mà cùng chủng ký sinh trùng sốt rét quay lại và gây bệnh sau khi bệnh nhân đã được điều trị. Điều này có nghĩa là ký sinh trùng không bị loại bỏ hoàn toàn khỏi cơ thể sau lần điều trị ban đầu và sau đó chúng phát triển lại, gây ra triệu chứng sốt rét. | Định tính |

| TT | Biến số | Định nghĩa, phân loại đánh giá | Phân loại biến số |
|----|-----------|--|-------------------|
| 3 | Tái nhiễm | Là tình trạng bệnh nhân bị nhiễm một chủng ký sinh trùng sốt rét khác sau khi đã được điều trị và khỏi bệnh trước đó. Điều này có nghĩa là bệnh nhân bị nhiễm trùng lại từ môi trường bên ngoài với một chủng ký sinh trùng mới hoàn toàn khác với chủng trước đó. | Định tính |
| 4 | ETF | ETF (Thất bại điều trị sớm) được xác định khi có 1 trong các dấu hiệu sau: <ul style="list-style-type: none"> - Dấu hiệu nguy hiểm hoặc sốt rét ác tính vào ngày 1,2,3 kèm theo có ký sinh trùng sốt rét trong máu. - Mật độ ký sinh trùng ngày D2 cao hơn D0 bất luận thân nhiệt. - Còn ký sinh trùng ngày D3 với thân nhiệt $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$. - Mật độ ký sinh trùng ngày D3 $\geq 25\%$ so với ngày D0. | Định tính |
| 5 | LCF | LCF (Thất bại lâm sàng muộn) được xác định: <ul style="list-style-type: none"> - Không có dấu hiệu nguy hiểm hoặc sốt rét ác tính hoặc thất bại sớm trước đó. - Sự có mặt ký sinh trùng vào bất kỳ ngày nào từ D7 đến D42 với thân nhiệt $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$. | Định tính |
| 7 | LPF | LPF (Thất bại ký sinh trùng muộn) được xác định là sự xuất hiện ký sinh trùng vào bất kỳ ngày nào từ D7 đến D42 với nhiệt độ nách $< 37,5^{\circ}\text{C}$ trên các ca trước đó không đủ tiêu chuẩn ETF hay LCF. | Định tính |
| 7 | ACPR | ACPR (đáp ứng lâm sàng và ký sinh trùng đầy đủ) được định nghĩa là: không có ký sinh trùng trong vòng 42 ngày, bất luận nhiệt độ nách và các ca trước đó không hội đủ tiêu chuẩn ETF, LCF, LPF. <ul style="list-style-type: none"> - Sử dụng tương đương thuật ngữ: chữa khỏi, điều trị thành công, đáp ứng điều trị. | Định tính |

2.2.4. Kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

2.2.4.1. Kỹ thuật thu thập số liệu

- Sàng lọc và lựa chọn những hồ sơ đáp ứng tiêu chuẩn lựa chọn và không nằm trong tiêu chuẩn loại trừ.
- Ghi nhận đầy đủ thông tin cần thiết, bao gồm:
 - Thông tin hành chính (ẩn danh hóa sau đó).
 - Chẩn đoán lâm sàng và cận lâm sàng.
 - Quá trình điều trị, sử dụng thuốc.
 - Thông tin theo dõi trước, trong và sau điều trị.

2.2.4.2. Kỹ thuật mã hóa và ẩn danh số liệu

- Mã hóa thông tin cá nhân: Thay thế các thông tin nhận dạng như họ tên, địa chỉ, bằng mã hóa.

Ví dụ: mã số bệnh nhân (ID) sẽ được mã hóa như sau: D6.01 = bệnh nhân, 01= số thứ tự.

- Dữ liệu mã hóa phải được lưu trữ riêng biệt khỏi dữ liệu gốc.
- Bảng mã tham chiếu: Tạo bảng tham chiếu để lưu giữ liên kết giữa mã hóa và thông tin gốc. Bảng này cần bảo mật và chỉ sử dụng trong trường hợp cần thiết.

2.2.4.3. Kỹ thuật làm sạch và chuẩn hóa số liệu

- Rà soát dữ liệu: Kiểm tra toàn bộ hồ sơ để đảm bảo tính đầy đủ và chính xác:
 - Đảm bảo tất cả các biến số (như tuổi, giới tính, kết quả điều trị) được ghi đầy đủ.
 - Loại bỏ các hồ sơ bị mất thông tin quan trọng (không đáp ứng tiêu chuẩn nghiên cứu).
- Chuẩn hóa dữ liệu: Đảm bảo tính nhất quán trong cách ghi chép và định dạng dữ liệu:
 - Ví dụ: Tuổi được ghi bằng số nguyên, ngày tháng theo định dạng "DD/MM/YYYY".
 - Mã hóa các biến số định tính (ví dụ: Nam = 1, Nữ = 2).
- Xử lý dữ liệu thiếu: Đối với các biến số bị thiếu giá trị:
 - Liên hệ cơ sở dữ liệu gốc (nếu có thể) để bổ sung thông tin.

- Ghi chú rõ biến số thiếu để loại trừ hoặc sử dụng phương pháp thống kê thích hợp để xử lý.

2.2.4.4. Kỹ thuật lưu trữ và quản lý số liệu

- Sử dụng phần mềm quản lý dữ liệu

- Lưu trữ và quản lý dữ liệu hồ sơ bệnh án trong các phần mềm như:
 - Microsoft Excel: Phù hợp cho dữ liệu đơn giản.
 - R: Sử dụng cho phân tích thống kê và dữ liệu lớn.

2.2.4.5. Bảo mật dữ liệu

- Lưu trữ dữ liệu trong các tệp có mật khẩu bảo vệ.
- Phân quyền truy cập: Chỉ các thành viên trong nhóm nghiên cứu được phép truy cập dữ liệu.
- Lưu trữ tệp mã hóa và tệp dữ liệu phân tích riêng biệt.

2.3. Phân tích một số yếu tố liên quan tới hiệu quả của Dihydroartemisinin - Piperaquine trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*

2.3.1. Đối tượng nghiên cứu

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*.

2.3.2. Thiết kế nghiên cứu

- Nghiên cứu mô tả có phân tích

2.3.3. Nội dung nghiên cứu

- Mô tả đặc điểm của hiệu quả điều trị DHA-PPQ qua yếu tố gen.
- Xác định mối liên quan giữa hiệu quả điều trị và các yếu tố này có thể bao gồm đặc điểm của bệnh nhân, tình trạng ký sinh trùng, đặc điểm về đột biến gen
 - Đặc điểm của bệnh nhân
 - + Tuổi: Khảo sát các yếu tố nhân khẩu học như tuổi tác có ảnh hưởng đến hiệu quả điều trị hay không.
 - + Thể trạng bệnh nhân: Đánh giá thể trạng cơ thể bệnh nhân là mức độ béo phì hoặc gầy yếu thông qua chỉ số khối cơ thể (BMI) để xác định mối liên hệ với hiệu quả điều trị.
 - + Mức độ nhiễm ký sinh trùng: Đo lường mật độ ký sinh trùng trong máu trước khi điều trị bệnh nhân để đánh giá hiệu quả với thuốc.

- Đột biến gen ký sinh trùng: *pfK13*, số lượng bản sao gen *pfpm2*, điểm đột biến E415G trên gen *pfEXO*.

+ Sử dụng các phương pháp thống kê để xác định mối quan hệ giữa đột biến gen và hiệu quả điều trị.

+ Mô hình dự đoán: Xây dựng các mô hình dự đoán hiệu quả điều trị dựa trên dữ liệu gen đột biến, sự thay đổi số lượng bản sao gen *pfpm2* và điểm đột biến E415G, C580Y với hiệu quả điều trị.

2.3.4. Biến số, chỉ số nghiên cứu mối liên quan với hiệu quả phác đồ DHA-PPQ

Bảng 2.11. Các biến số, chỉ số nghiên cứu mục tiêu 3

| TT | Biến số | Định nghĩa, phân loại đánh giá | Phân loại biến số |
|---------------------|--|--|-------------------|
| Biến độc lập | | | |
| 1 | Tuổi (năm) | Là thời gian tính từ khi đối tượng được sinh ra cho tới thời điểm bệnh nhân tham gia nghiên cứu, tính theo năm dương lịch. | Định lượng |
| 2 | Địa điểm nghiên cứu | Địa điểm bệnh nhân sinh sống và làm việc ngay trước thời điểm được chẩn đoán sốt rét chưa biến chứng | Định danh |
| 3 | Mật độ KST | Mật độ ký sinh trùng là số lượng KST / μ l máu. | Định lượng |
| 4 | BMI (kg/m^2) | $\text{BMI} = \text{cân nặng (kg)} / \text{chiều cao}^2 \text{ (m)}$ | Định lượng |
| 5 | Đột biến gen <i>pfK13</i> | Phân loại: Kiểu gen đột biến: Ký sinh trùng sốt rét mang đột biến trên gen <i>pfK13</i> . Kiểu gen đại: được định nghĩa là ký sinh trùng sốt rét không mang đột biến trên gen <i>pfK13</i> | Định tính |
| 6 | Sự thay đổi số lượng bản sao trên gen <i>pfpm2</i> | Số lượng bản sao được tính thông qua giá trị Ct của 2 gen (<i>pfpm2</i> , <i>β-tubulin</i>) của chủng chuẩn và mẫu bệnh phẩm để xác định số lượng bản sao <i>pfpm2</i> . Phân loại : Kết quả giá trị $\geq 1,5$ làm tròn lên 2, được xác định là ký sinh trùng mang nhiều bản sao gen <i>pfpm2</i> . Giá trị $<1,5$ làm tròn xuống 1, được xác định là ký sinh trùng mang 1 bản sao gen <i>pfpm2</i> . | Định tính |

| TT | Biến số | Định nghĩa, phân loại đánh giá | Phân loại biến số |
|--|--|--|-------------------|
| 7 | Tính đa hình điểm đột biến E415G trên gen <i>pfEXO</i> | Phân loại: Kiểu gen đột biến: Ký sinh trùng sốt rét mang đột biến E415G trên gen <i>pfEXO</i> . Kiểu gen đại: được định nghĩa là ký sinh trùng sốt rét không mang đột biến E415G trên gen <i>pfEXO</i> . | Định tính |
| 8 | Kiểu đột biến phức | Sự xuất hiện đồng thời các đột biến trên các gen ứng kháng thuốc | Nhị phân |
| Biến phụ thuộc – hiệu quả phác đồ DHA-PPQ | | | |
| 1 | Kết quả điều trị | Phân loại điều trị được tiến hành sau ngày D42. Thất bại điều trị (gồm có 3 dạng ETF, LCF, LPF), đáp ứng điều trị (ACPR). | Định tính |

2.4. Phân tích và xử lý số liệu

Các chỉ số, biến số được nhập liệu bằng phần mềm Microsoft office excel 2016, phân tích thống kê sử dụng phần mềm R language vs 4.1.0 phiên bản dành cho window. Phân tích hiệu lực điều trị sốt rét theo phần mềm *in vivo* phiên bản 7.1 Pascal Ringwald, WHO (2009) [64].

- Thống kê mô tả:

+ Các biến định lượng được trình bày bằng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (số liệu tuân theo phân phối chuẩn được kiểm định bằng Shapiro-Wilk Test, biểu đồ QQ-plot) hoặc trung vị và bách phân vị hoặc giá trị nhỏ nhất, lớn nhất dành cho các biến không tuân theo phân phối chuẩn. Mật độ ký sinh trùng được biểu diễn dưới dạng trung bình nhân (Geomean) do sự phân bố chênh lệch lớn giữa các cá thể.

+ Các biến định tính: Biến nhị phân, phân loại, thứ bậc được mô tả bằng tần số xuất hiện (n) và tỉ lệ (%).

- Thông kê phân tích:

+ Các biến định lượng: So sánh trung bình giữa hai nhóm bằng kiểm định T – test dành cho các biến tuân thủ phân phối chuẩn, nếu không tuân theo quy luật phân phối chuẩn sẽ sử dụng các kiểm định phi tham số (Wilcoxon test).

+ Các biến định tính: So sánh tỉ lệ giữa hai nhóm sử dụng Chi-square test cho so sánh tỉ lệ giữa hai nhóm, trong đó tham số kỳ vọng <5 ít hơn 20%. Đối với so sánh tỉ lệ của nhiều nhóm hoặc có >20% tham số kỳ vọng <5 thì sử dụng Fisher's exact test, trong các trường hợp bảng có kích thước lớn hơn 2×2 thì sử dụng Pearson's Chi-squared test.

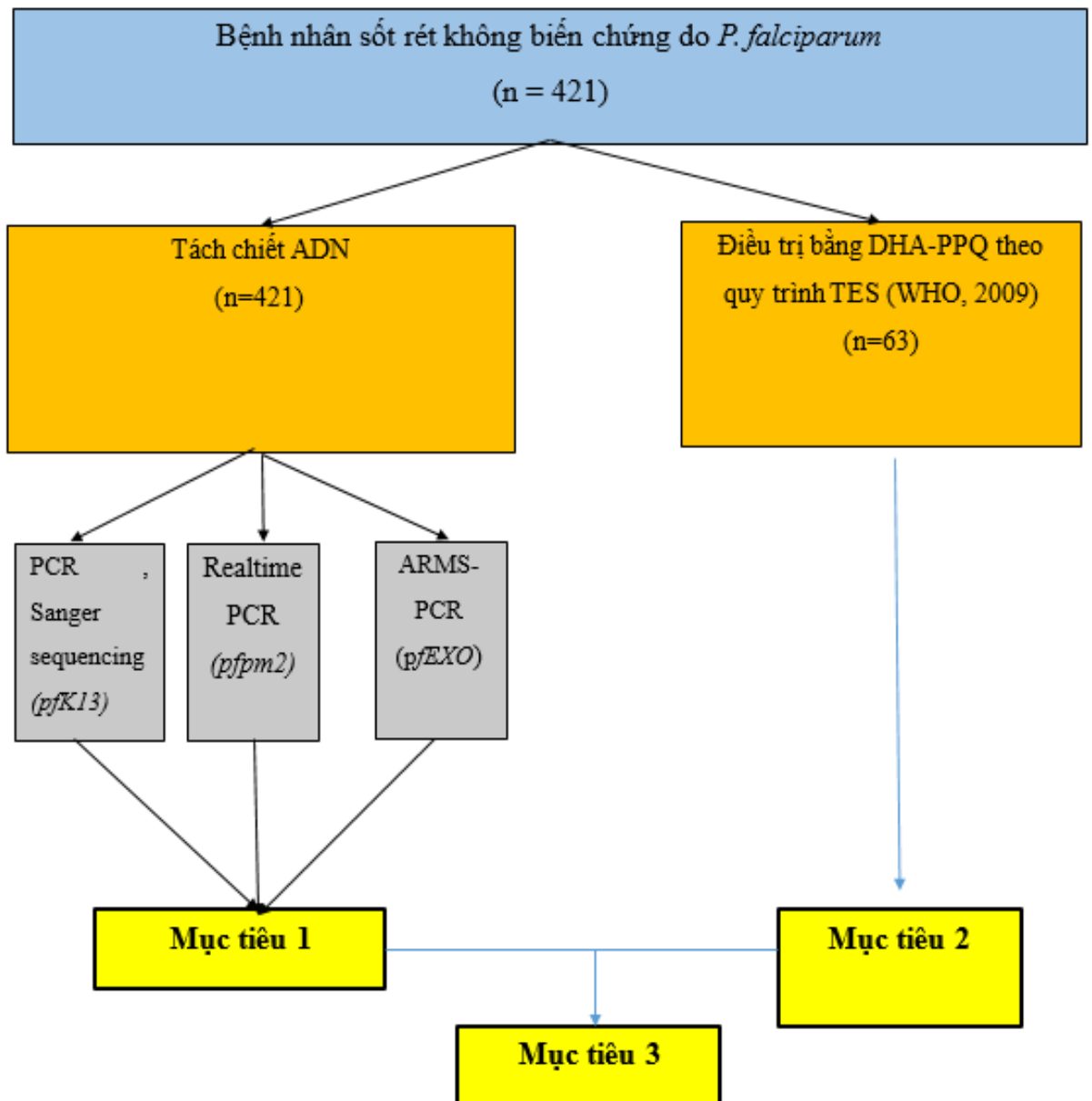
+ Phân tích tỉ lệ tái phát tích lũy sử dụng phân tích sống còn biểu diễn bằng đường Kaplan meier, kiểm định logrank test và ước lượng 95%CI.

+ Phân tích mối liên quan giữa các yếu tố với kết quả điều trị thất bại sử dụng mô hình hồi quy logistic đơn biến, đa biến với kiểm định Wald test. Xây dựng và lựa chọn mô hình xác định vai trò của các yếu tố liên quan với hiệu quả điều trị bằng phương pháp BMA, các tiêu chí lựa chọn mô hình là các chỉ số Akaike Information Criterion (AIC) và Bayesian Information Criterion (BIC), R^2 , xác suất hậu định, số biến của mô hình.

2.5. Đạo đức trong 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. Thông tin về tình trạng bệnh, thông tin cá nhân của đối tượng nghiên cứu được giữ bí mật và chỉ được sử dụng vào mục đích nghiên cứu, không dùng vào bất cứ mục đích nào khác.

2.6. Sơ đồ nghiên cứu



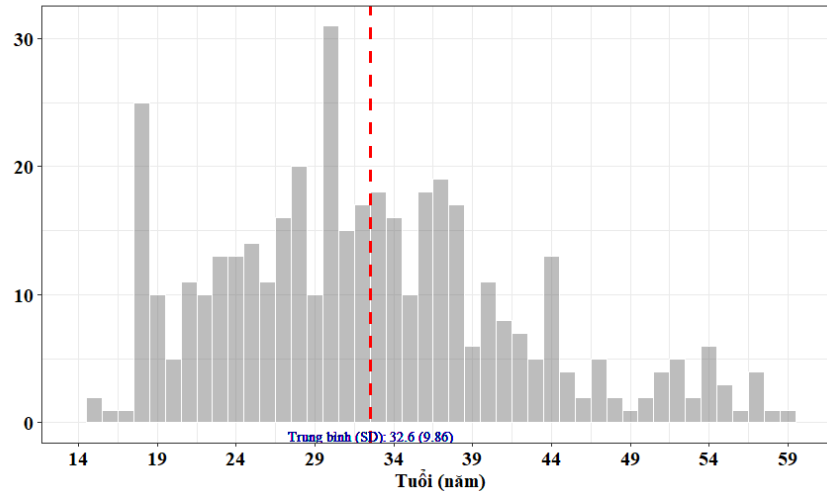
Hình 2.2. Sơ đồ nghiên cứu

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*

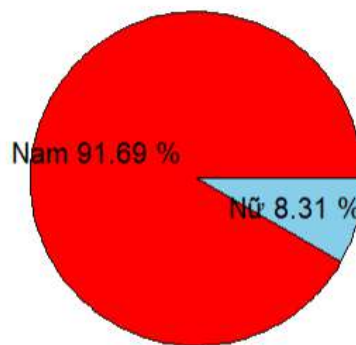
3.1.1. Đặc điểm chung bệnh nhân tham gia nghiên cứu

Đặc điểm về độ tuổi của các bệnh nhân tham gia nghiên cứu được trình bày ở hình dưới đây:



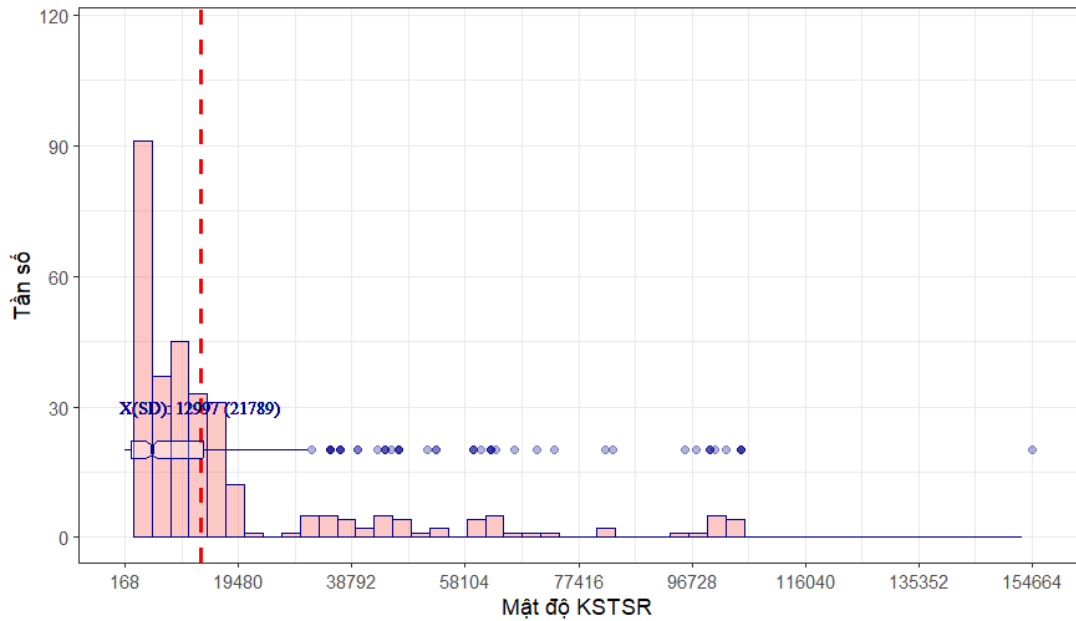
Hình 3.1. Đặc điểm về độ tuổi của các bệnh nhân tham gia nghiên cứu (n=421)

Kết quả cho thấy độ tuổi trung bình của bệnh nhân tham gia nghiên cứu là $32,6 \pm 9,86$ tuổi, độ tuổi nhỏ nhất là 14 tuổi, lớn nhất là 60 tuổi.



Hình 3.2. Đặc điểm giới tính của bệnh nhân tham gia nghiên cứu (n=421)

Phân bố giới tính của bệnh nhân tham gia nghiên cứu được trình bày trên hình 3.2, kết quả cho thấy phân bố nam giới (n=386) chiếm tỉ lệ 91,7%, nữ giới (n=35), chiếm tỉ lệ 8,3%. Như vậy tỉ lệ nam mắc sốt rét cao vượt trội so với bệnh nhân nữ.



Hình 3.3. Mật độ ký sinh trùng sốt rét ở bệnh nhân tham gia nghiên cứu (n=421)

Mật độ ký sinh trùng sốt rét ở bệnh nhân tham gia nghiên cứu được trình bày trên Hình 3.3, kết quả cho thấy mật độ ký sinh trùng sốt rét trung bình nhân là 7022 ký sinh trùng / μ l máu. Mật độ thấp nhất là 168 ký sinh trùng / μ l máu, cao nhất là 154 666 ký sinh trùng / μ l máu. Đa số bệnh nhân có mật độ ký sinh trùng tập trung dưới 19.500 ký sinh trùng / μ l máu.

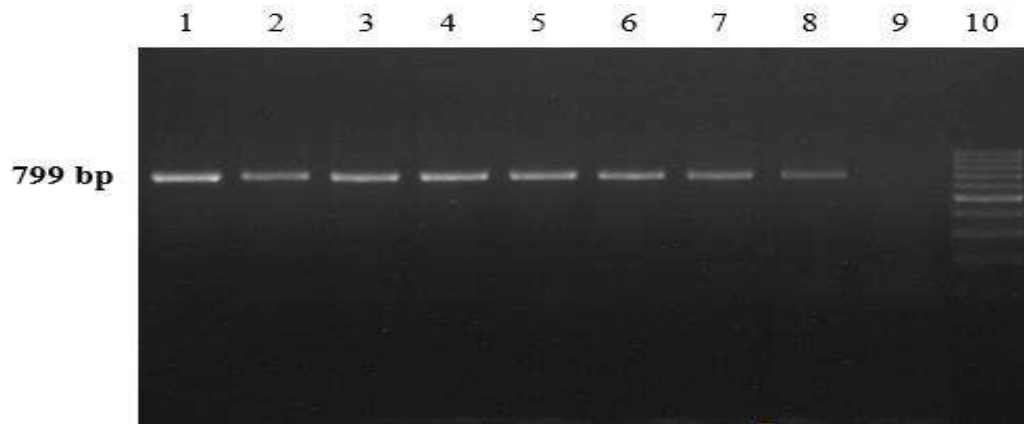
Bảng 3.1. Phân loại tình trạng sốt ở bệnh nhân tham gia nghiên cứu (n=421)

| Tình trạng sốt | Số lượng | Tỉ lệ % |
|----------------|----------|---------|
| Không sốt | 6 | 1,5% |
| Sốt nhẹ | 94 | 22,3% |
| Sốt vừa | 243 | 57,7% |
| Sốt cao | 77 | 18,3% |
| Sốt rất cao | 1 | 0,2% |

Tình trạng sốt ở bệnh nhân tham gia nghiên cứu được trình bày trên Bảng 3.1, kết quả cho thấy đa số (55,7%) bệnh nhân sốt vừa, 22,3% sốt nhẹ, 18,3% bệnh nhân sốt cao và 0,2 % bệnh nhân sốt rất cao.

3.1.2. Sự biến đổi di truyền và tần số đột biến trên gen *pfK13* ở ký sinh trùng sốt rét

Sản phẩm DNA của các mẫu bệnh phẩm thu được sau khi tách chiết sẽ được sử dụng cho phản ứng nhân gen. Thực hiện phản ứng PCR lồng để nhân gen *pfK13*, sản phẩm PCR đặc hiệu có kích thước khoảng 800 bp sẽ được điện di kiểm tra kích thước và tinh sạch đủ điều kiện trước khi giải trình tự.



Hình 3.4. Kết quả điện di sản phẩm sau tinh sạch

(Giếng 10: Thang DNA chuẩn 100bp; Giếng 1-8: Sản phẩm DNA điện di sau tinh sạch; Giếng 9: Chứng âm).

Mẫu bệnh phẩm sau khi giải trình tự thành công, được so sánh với trình tự tham chiếu trên ngân hàng gen bằng công cụ BLAST (Basic local alignment search tool) (Hình 3.5).

| | Score 1485 bits(804) | Expect 0.0 | Identities 804/804(100%) | Gaps 0/804(0%) | Strand Plus/Plus |
|-------|-------------------------|---------------|---|-------------------|---------------------|
| Query | 1311 | | TAAATTTTTACCATTCCCATTAGTATTTTGTATAGGTGGATTTGATGGTGTAGAATATTT | | 1378 |
| Sbjct | 2 | | TAAATTTTTACCATTCCCATTAGTATTTTGTATAGGTGGATTTGATGGTGTAGAATATTT | | 61 |
| Query | 1371 | | AAATTCGATGGAATTATTAGATATTAGTCAACAATGCTGGCGTATGTGTACACCTATGTC | | 1438 |
| Sbjct | 62 | | AAATTCGATGGAATTATTAGATATTAGTCAACAATGCTGGCGTATGTGTACACCTATGTC | | 121 |
| Query | 1431 | | TACCAAAAAAGCTTATTTTGGAAAGTGCTGTATTGAATAATTTCTTATACGTTTTTGGTGG | | 1498 |
| Sbjct | 122 | | TACCAAAAAAGCTTATTTTGGAAAGTGCTGTATTGAATAATTTCTTATACGTTTTTGGTGG | | 181 |
| Query | 1491 | | TAATAACTATGATTATAAGGCTTTATTTGAAACTGAGGTGTATGATCGTTTAAGAGATGT | | 1558 |
| Sbjct | 182 | | TAATAACTATGATTATAAGGCTTTATTTGAAACTGAGGTGTATGATCGTTTAAGAGATGT | | 241 |
| Query | 1551 | | ATGGTATGTTTTCAAGTAATTTAAATATACCTAGAAGAAATAAATGTGGTGTACGTCAAA | | 1618 |
| Sbjct | 242 | | ATGGTATGTTTTCAAGTAATTTAAATATACCTAGAAGAAATAAATGTGGTGTACGTCAAA | | 301 |
| Query | 1611 | | TGGTAGAATTTATTGTATTGGGGGATATGATGGCTCTTCTATTATACCGAATGTAGAAGC | | 1678 |
| Sbjct | 302 | | TGGTAGAATTTATTGTATTGGGGGATATGATGGCTCTTCTATTATACCGAATGTAGAAGC | | 361 |
| Query | 1671 | | ATATGATCATCGTATGAAAGCATGGGTAGAGGTGGCACCTTTGAATACCCCTAGATCATC | | 1738 |
| Sbjct | 362 | | ATATGATCATCGTATGAAAGCATGGGTAGAGGTGGCACCTTTGAATACCCCTAGATCATC | | 421 |
| Query | 1731 | | AGCTATGTGTGTGCTTTTGATAATAAAAAATTTATGTCATTGGTGGAACTAATGGTGAGAG | | 1798 |
| Sbjct | 422 | | AGCTATGTGTGTGCTTTTGATAATAAAAAATTTATGTCATTGGTGGAACTAATGGTGAGAG | | 481 |
| Query | 1791 | | ATTAAATTCATTGAAGTATATGAAGAAAAAATGAATAAATGGGAACAATTTCCATATGC | | 1858 |
| Sbjct | 482 | | ATTAAATTCATTGAAGTATATGAAGAAAAAATGAATAAATGGGAACAATTTCCATATGC | | 541 |
| Query | 1851 | | CTTATTAGAAGCTAGAAGTTTCAGGAGCAGCTTTTAATTACCTTAATCAAATATATGTTGT | | 1918 |
| Sbjct | 542 | | CTTATTAGAAGCTAGAAGTTTCAGGAGCAGCTTTTAATTACCTTAATCAAATATATGTTGT | | 601 |
| Query | 1911 | | TGGAGGTATTGATAATGAACATAACATATTAGATTCCGTTGAACAATATCAACCATTTAA | | 1978 |
| Sbjct | 602 | | TGGAGGTATTGATAATGAACATAACATATTAGATTCCGTTGAACAATATCAACCATTTAA | | 661 |
| Query | 1971 | | TAAAAGATGGCAATTTCTAAATGGTGTACCAGAGAAAAAATGAATTTTGGAGCTGCCAC | | 2038 |
| Sbjct | 662 | | TAAAAGATGGCAATTTCTAAATGGTGTACCAGAGAAAAAATGAATTTTGGAGCTGCCAC | | 721 |
| Query | 2031 | | ATTGTCAGATTCCTTATATAAATTACAGGAGGAGAAAAATGGCGAAGTTCTAAATTCATGTCA | | 2098 |
| Sbjct | 722 | | ATTGTCAGATTCCTTATATAAATTACAGGAGGAGAAAAATGGCGAAGTTCTAAATTCATGTCA | | 781 |
| Query | 2091 | | TTTCTTTTCACCAGATACAAATGA 2114 | | |
| Sbjct | 782 | | TTTCTTTTCACCAGATACAAATGA 805 | | |

Hình 3.5. Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen *pfK13* (mẫu bệnh phẩm mã số D6.1) và trình tự gen *pfK13* chủng tham chiếu trên ngân hàng gen (Mã số MK 103619.1)

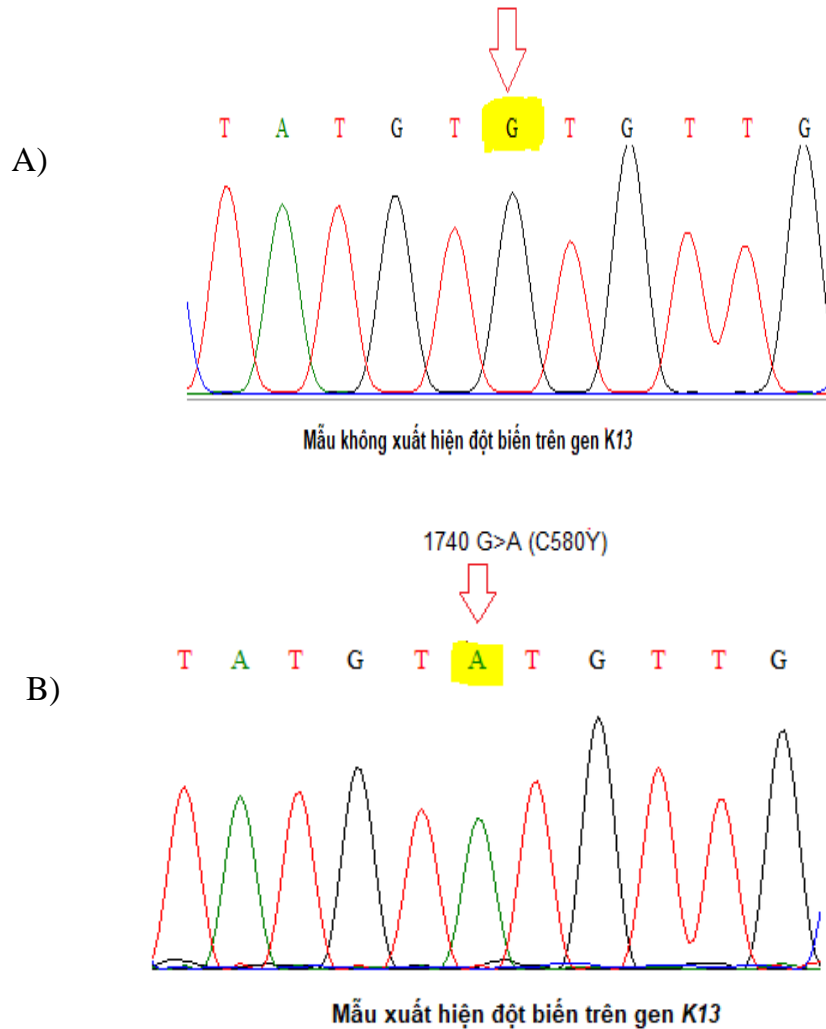
Hình ảnh 3.5 hiển thị kết quả so sánh trình tự DNA giữa hai mẫu, bao gồm "Query" (trình tự đầu vào, trình tự của mẫu bệnh phẩm mã số D6.1) và "Subject" (trình tự tham chiếu). Kết quả được trình bày theo định dạng BLAST,

Identities (Tỷ lệ tương đồng): Số lượng nucleotide trùng khớp giữa hai trình tự, được biểu thị bằng số lượng cặp trùng khớp tuyệt đối và phần trăm tương ứng, kết quả cho thấy mức độ tương đồng cao giữa hai trình tự với tỷ lệ tương đồng đạt 100% (804/804 cặp base); *Gaps* (Khoảng trống): Số lượng và tỷ lệ khoảng trống xuất hiện trong quá trình căn chỉnh hai trình tự. Khoảng trống xuất hiện khi có một đoạn trình tự không khớp giữa hai mẫu, kết quả so sánh 2 trình tự cho thấy 0 khoảng trống (*Gaps*: 0%); Giá trị kỳ vọng *E-value*, cho biết xác suất tìm thấy mức độ tương đồng này một cách ngẫu nhiên trong cơ sở dữ liệu. *E-value* càng nhỏ (thường là 0 hoặc xấp xỉ 0), sự tương đồng giữa hai trình tự càng có ý nghĩa. *E-value* bằng 0, cho thấy sự tương đồng có ý nghĩa cao. Các ký tự "|" biểu thị sự khớp hoàn toàn giữa hai trình tự.

Với kết quả hình 3.5 có thể thấy có thể nhận thấy trình tự "Query" và "Subject" có mức độ tương đồng rất cao (*Identities*: 804/804, tức 100%), không có khoảng trống (*Gaps*: 0/804, tức 0%), có thể kết luận quy trình nhân gen *pfK13* của ký sinh trùng sốt rét đã diễn ra thành công với độ chính xác cao. Sản phẩm của quy trình nhân gen *pfK13* đạt tiêu chuẩn để sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo nhằm xác định các đột biến.

Sử dụng phần mềm Bioedit V7.2.5 so sánh với trình tự gen thu được với trình tự gen *pfK13* tham chiếu trên ngân hàng gen (NC_004331.3), được phân tích bằng thuật toán Clustal W multiple alignment để xác định điểm đột biến.

Các mẫu gen *pfK13* sau tinh sạch được gửi đi giải trình tự với mỗi xuôi. Sử dụng phần mềm Bioedit v 7.2.5 để hiển thị và xác định trình tự nucleotide của các mẫu phân tích, kết quả được thể hiện ở hình dưới.

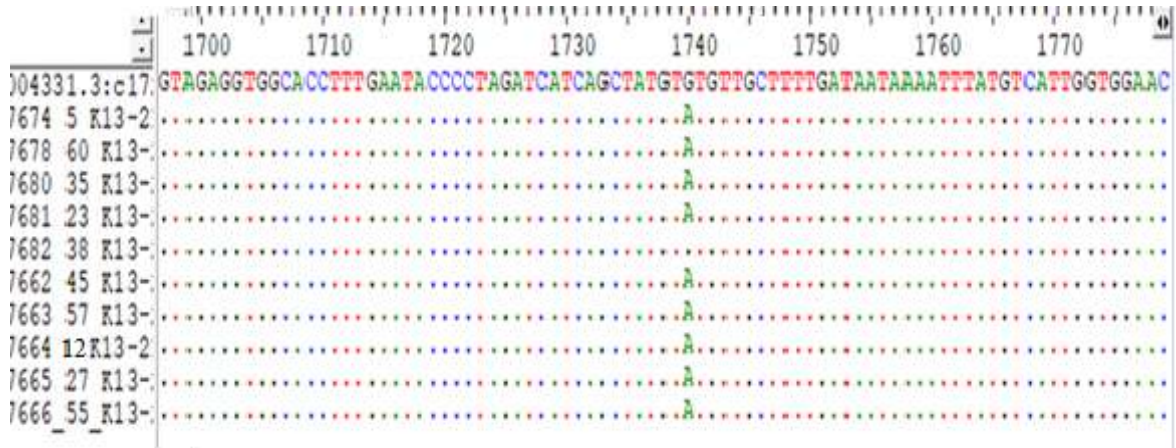


Hình 3.6. Minh họa đột biến trên gen *pfK13* ở ký sinh trùng sốt rét

A) Ký sinh trùng sốt rét không mang đột biến trên gen *pfK13* (Mã số D6.1); B) Ký sinh trùng sốt rét mang đột biến trên gen *pfK13* (Mã số D6.2)

(Các nucleotide được gắn màu huỳnh quang, Adenine (A): Màu xanh lá cây; Thymine (T): Màu đỏ; Guanine (G): Màu đen; Cytosine (C): Màu xanh nước biển)

Minh họa đột biến thay đổi Nucleotide trên gen *pfK13* của ký sinh trùng sốt rét. Vị trí Nucleotide thay đổi được đánh dấu mũi tên đỏ trên hình. Hình 3.6A là mẫu bệnh phẩm của ký sinh trùng sốt rét không mang đột biến. Hình 3.6B là mẫu bệnh phẩm ký sinh trùng sốt rét mang đột biến C580Y trên gen *pfK13* do sự thay đổi nucleotide G thành A tại vị trí 1740



Hình 3.7. Hình ảnh kết quả so sánh multiple sequence alignment của vùng gen *pfK13* từ nhiều mẫu bệnh phẩm ký sinh trùng sốt rét với trình tự tham chiếu chuẩn.

Dòng đầu tiên: Trình tự tham chiếu trên ngân hàng gen (mã số NC_004331.3), Dòng tiếp theo là các trình tự mẫu nghiên cứu (Mã số bệnh phẩm theo thứ tự từ trên xuống dưới lần lượt là D6.5, D6.60, D6.35, D6.23, D6.38, D6.45, D6.57, D6.12, D6.27, D6.55)

Trình tự chuẩn tại vị trí 1740 là nucleotide G, trong khi mẫu bệnh phẩm ký sinh trùng sốt rét mang đột biến có sự thay đổi thành nucleotide A.

Nghiên cứu của chúng tôi không phát hiện bất kỳ đột biến nào khác trên gen *pfK13* trên tất cả các đối tượng nghiên cứu.

Bảng 3. 2. Tỷ lệ đột biến gen *pfK13* tại các địa điểm nghiên cứu

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

¹Pearson's Chi-squared test

Trong tổng số 421 mẫu bệnh phẩm, chúng tôi giải trình tự thành công 390 mẫu, trong số các mẫu giải trình tự thành công, tỷ lệ ký sinh trùng sốt rét mang đột biến C580Y trên gen *pfK13* là 356 mẫu (91,3%), ký sinh trùng sốt rét không mang đột biến C580Y là 34 mẫu (8,7%) (Bảng 3.2). Như vậy trong nghiên cứu của chúng tôi, ký sinh trùng sốt rét chỉ phát sinh đột biến C580Y gen *pfK13*.

Bảng 3.2 trình bày tỉ lệ và tần số đột biến trên gen *pfK13* tại bốn tỉnh ở Việt Nam. Kết quả cho thấy Đắk Lắk có tỉ lệ đột biến C580Y cao nhất với 95,7%, trong khi Đắk Nông có tỉ lệ thấp nhất là 83,6%. Tỉ lệ đột biến C580Y chung cho cả bốn tỉnh là 91,3% (356/390).

Bảng 3.3. Đặc điểm dịch tễ của bệnh nhân theo đột biến gen C580Y

| Đặc điểm | Tổng, N = 390 | C580Y n = 356 | Kiểu đại n = 34 | p |
|-------------------|------------------|------------------|--------------------|---------------------|
| Giới tính | | | | 0,19 ⁽¹⁾ |
| Nam (n,%) | 357 (91,5%) | 328 (92,1%) | 29 (85,3%) | |
| Nữ (n,%) | 33 (8,5%) | 28 (7,9%) | 5 (14,7%) | |
| Tuổi (năm) | | | | 0,45 ⁽²⁾ |
| $\bar{X} \pm SD$ | 32,7 \pm 9,8 | 32,9 \pm 10,0 | 31,6 \pm 8,1 | |
| Min – Max | 14,0- 60,0 | 14 - 60,0 | 18,0- 42,0 | |

⁽¹⁾ Fisher's exact test; ⁽²⁾ Wilcoxon rank sum test; \bar{X} : trung bình; SD (standard deviation): độ lệch chuẩn; Min: nhỏ nhất; Max: lớn nhất

Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ phân bố giới tính và độ tuổi giữa hai nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng chứa đột biến gen *pfK13* và nhóm kiểu đại khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3. 4. Đặc điểm thân nhiệt và mật độ ký sinh trùng sốt rét của bệnh nhân theo đột biến gen C580Y

| Đặc điểm | Tổng, N = 390 | C580Y n = 356 | Kiểu đại n = 34 | p |
|-------------------------------------|------------------|------------------|--------------------|---------------------|
| Mật độ ký sinh trùng sốt rét | | | | 0,84 ⁽²⁾ |
| Geomean | 4483 | 4436 | 5007 | |
| Min– Max | 168 - 154 666 | 168 - 154666 | 644 – 100 571 | |
| Thân nhiệt (°C) | | | | >0,9 ⁽²⁾ |
| $\bar{X} \pm SD$ | 38,6 \pm 0,6 | 38,6 \pm 0,6 | 38,6 \pm 0,6 | |
| Min– Max | 36,0- 40,5 | 36,0- 40,5 | 37,6 - 40,0 | |
| Sốt | | | | >0,9 ⁽³⁾ |
| Không sốt | 6 (1,5%) | 6 (1,7%) | 0 (0%) | |
| Sốt nhẹ | 91 (23,3%) | 83 (23,3%) | 8 (23,5%) | |
| Sốt vừa | 227 (58,2%) | 207 (58,1%) | 20 (58,8%) | |
| Sốt cao | 66 (16,9%) | 60 (16,9%) | 6 (17,6%) | |
| Sốt rất cao | 6 (1,5%) | 6 (1,7%) | 0 (0%) | |

⁽²⁾ Wilcoxon rank sum test; ⁽³⁾ Pearson's Chi-squared test

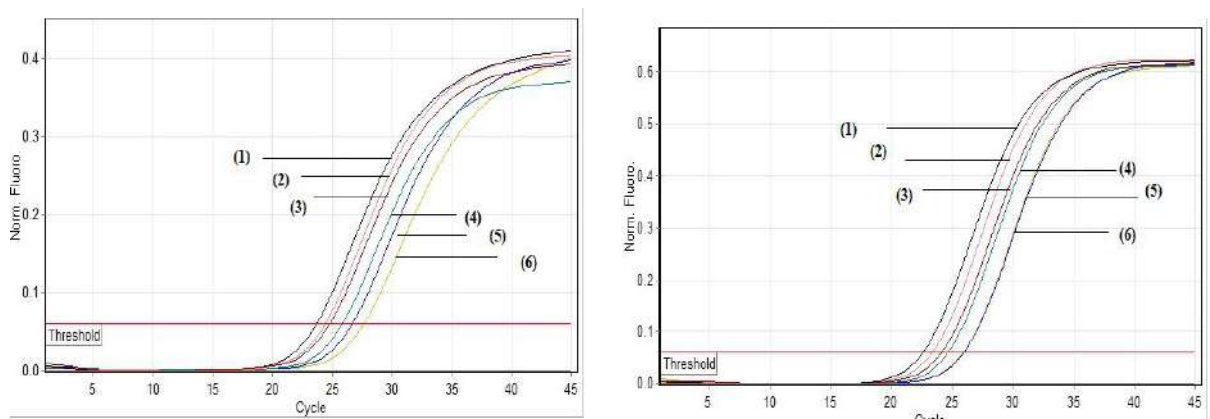
\bar{X} : trung bình; SD (standard deviation): độ lệch chuẩn; Geomean: Trung bình nhân; Min: nhỏ nhất; Max: lớn nhất

Kết quả nghiên cứu cho thấy không có sự khác biệt về đặc điểm thân nhiệt và mật độ ký sinh trùng sốt rét giữa nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng

sốt rét mang đột biến C580Y và nhóm mang gen kiểu dại trên gen *pfK13*, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

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

Sản phẩm DNA của các mẫu bệnh phẩm thu được sau khi được tách chiết sẽ được sử dụng cho phản ứng multiplex real-time PCR. Quy trình nhân gen xác định số lượng bản sao gen *pfpm2* thực hiện theo mục 2.1.5.5. Phản ứng multiplex real-time PCR cùng nhân hai gen *pfpm2* và β -*tubulin* trong cùng một ống phản ứng nhưng sử dụng sử dụng 2 đầu dò với 2 reporter (FAM và VIC) với kênh màu khác nhau (Kênh xanh lá và Kênh vàng). Đầu dò gắn với reporter FAM được thiết kế gắn với gen *pfpm2* và đầu dò với reporter VIC được thiết kế gắn với gen β -*tubulin*. Ống phản ứng trong một lần chạy bao gồm: chứng âm (nước cất), chủng chuẩn 3D7, mẫu bệnh phẩm, chúng tôi chạy phản ứng 2 lần, lấy kết quả Ct trung bình 2 lần chạy để xác định số lượng bản sao gen *pfpm2*. Chủng chuẩn 3D7 được sử dụng trong nghiên cứu là chủng được xác định mang một bản sao β -*tubulin*. Kết quả phản ứng real-time PCR nhân gen *pfpm2* và β -*tubulin* như sau:



Kênh xanh lá với reporter FAM

Kênh vàng với reporter VIC

Hình 3.8. Phản ứng nhân gen *pfpm2* và β -*tubulin* bằng kỹ thuật real-time PCR

(1), (2): Chủng chuẩn 3D7; (3) (4) (5) (6): Mẫu bệnh phẩm

FAM và VIC: thuốc nhuộm huỳnh quang đánh dấu các đầu dò

Do 2 gen sử dụng 2 reporter khác nhau kết quả được thể hiện ở trên 2 kênh màu khác nhau trong đó kênh green cho giá trị Ct của gen *pfpm2*, kênh yellow cho giá trị Ct của gen β -*tubulin*. Sử dụng giá trị Ct của 2 gen (*pfpm2*,

β-tubulin) của chủng chuẩn và mẫu bệnh phẩm để xác định số lượng bản sao *pfpm2*. Kết quả giá trị $\geq 1,5$ làm tròn lên 2, giá trị $<1,5$ làm tròn xuống 1.

Kết quả số lượng bản sao *pfpm2* của các mẫu nghiên cứu được trình bày ở bảng 3.4.

Bảng 3.5. Tỷ lệ bản sao gen *pfpm2* tại các địa điểm nghiên cứu

| <i>pfpm2</i> | | | | |
|----------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|
| Địa điểm | 1 bản sao | >1 bản sao | Tổng số | P ¹ |
| Bình Phước | 21 (55,3%) | 17 (44,7%) | 38 (100%) | 0,2 |
| Đắk Lắk | 52 (57,1%) | 39 (42,9%) | 91 (100%) | |
| Đắk 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%) | |

¹*Pearson's Chi-squared test*

Trong tổng số 421 mẫu bệnh phẩm, chúng tôi nhân thành công 355 mẫu. Trong đó, kết quả khảo sát sự thay đổi số lượng bản sao gen *pfpm2* trên nhóm đối tượng nghiên cứu được nhân gen thành công như sau: 51% (181/355) bệnh nhân có ký sinh trùng sốt rét 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 sốt rét mang nhiều hơn 1 bản sao *pfpm2* như sau: Đắk Nông (52,6%); Bình Phước (44,7%); Gia Lai (55,6%); Đắk Lắk (42,9%). Tỷ lệ ký sinh trùng sốt rét mang nhiều bản sao gen *pfpm2* thay đổi đáng kể theo địa điểm nghiên cứu. Tuy nhiên, không có sự khác biệt ý nghĩa giữa các địa điểm nghiên cứu dựa trên các giá trị thống kê được xác định ($p>0,05$).

Bảng 3.6 và Bảng 3.7 dưới đây trình bày về sự liên quan giữa đặc điểm lâm sàng và dịch tễ của bệnh nhân theo số bản sao gen *pfpm2*; kết quả nghiên cứu cho thấy không có sự khác biệt về độ tuổi, giới tính, mật độ ký sinh trùng cũng như đặc điểm sốt giữa nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng sốt rét có 1 bản sao và nhóm mang nhiều bản sao gen *pfpm2*, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p>0,05$.

Bảng 3. 6. Đặc điểm dịch tễ của bệnh nhân theo số bản sao gen *pfpm2*

| Đặc điểm | Tổng N = 355 | 1 bản sao n = 174 | >1 bản sao n = 181 | P² |
|-------------------|------------------------|-----------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Giới tính | | | | 0,25 ⁽¹⁾ |
| Nam (n,%) | 330 (93,0%) | 159 (91,4%) | 171 (94,5%) | |
| Nữ (n,%) | 25 (7,0%) | 15 (8,6%) | 10 (5,5%) | |
| Tuổi (năm) | | | | 0,55 ⁽²⁾ |
| $\bar{X} \pm SD$ | 32,5 \pm 9,9 | 32,1 \pm 9,9 | 32,8 \pm 10,0 | |
| Min-Max | 14,0- 60,0 | 14,0- 60,0 | 14,0- 60,0 | |

⁽¹⁾ Fisher's exact test; ⁽²⁾ Wilcoxon rank sum test;

\bar{X} : trung bình; *SD* (standard deviation): độ lệch chuẩn; *Min*: nhỏ nhất; *Max*: lớn nhất

Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ phân bố giới tính và độ tuổi giữa hai nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng chứa đột biến gen *pfpm2* và nhóm kiểu dại khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3. 7. Đặc điểm mật độ ký sinh trùng sốt rét và thân nhiệt theo số bản sao gen *pfpm2*

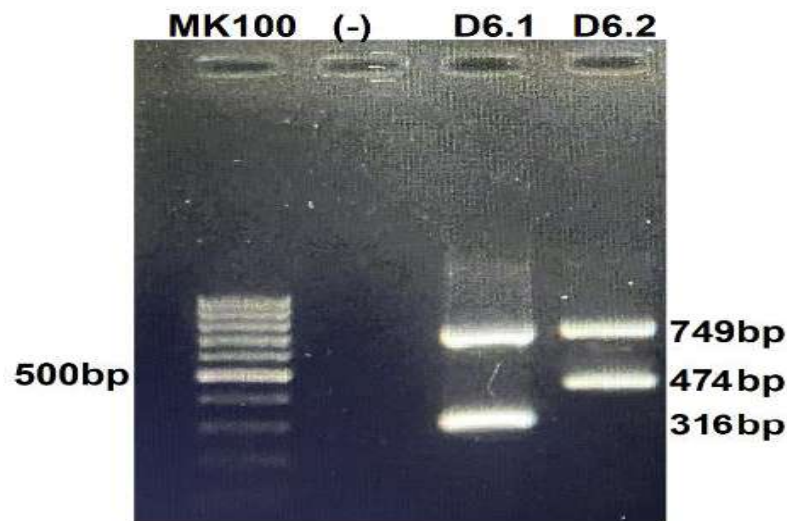
| Đặc điểm | Tổng N = 355 | 1 bản sao n = 174 | >1 bản sao n = 181 | P² |
|-------------------------------------|------------------------|-----------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Mật độ ký sinh trùng sốt rét | | | | 0,10 ⁽²⁾ |
| Geomean | 3930 | 4466 | 3476 | |
| Min-Max | 168- 154 666 | 173- 104 976 | 168- 154 666 | |
| Nhiệt độ (°C) | | | | 0,96 ⁽²⁾ |
| $\bar{X} \pm SD$ | 38,6 \pm 0,7 | 38,6 \pm 0,6 | 38,6 \pm 0,7 | |
| Min-Max | 36,0- 42,0 | 36,0- 40,5 | 36,3- 42,0 | |
| Sốt | | | | 0,6 ⁽³⁾ |
| Không sốt | 5 (1,4%) | 1 (0,6%) | 4 (2,2%) | |
| Sốt nhẹ | 80 (22,5%) | 41 (23,6%) | 39 (21,5%) | |
| Sốt vừa | 208 (58,6%) | 104 (59,8%) | 104 (57,5%) | |
| Sốt cao | 61 (17,2%) | 28 (16,1%) | 33 (18,2%) | |
| Sốt rất cao | 1 (0,3%) | 0 (0%) | 1 (0,6%) | |

⁽²⁾ Wilcoxon rank sum test; ⁽³⁾ Pearson's Chi-squared test

\bar{X} : trung bình; *SD* (standard deviation): độ lệch chuẩn; *Min*: nhỏ nhất; *Max*: lớn nhất

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

Kích thước các băng xuất hiện khi điện di sản phẩm phản ứng PCR sẽ cho biết kiểu gen của ký sinh trùng trong mẫu phẩm. Ký sinh trùng sốt rét mang alen thường (A) có các băng kích thước là 749bp và 316bp. Ký sinh trùng sốt rét mang alen đột biến (G) xuất hiện các băng kích thước là 749bp và 474bp.

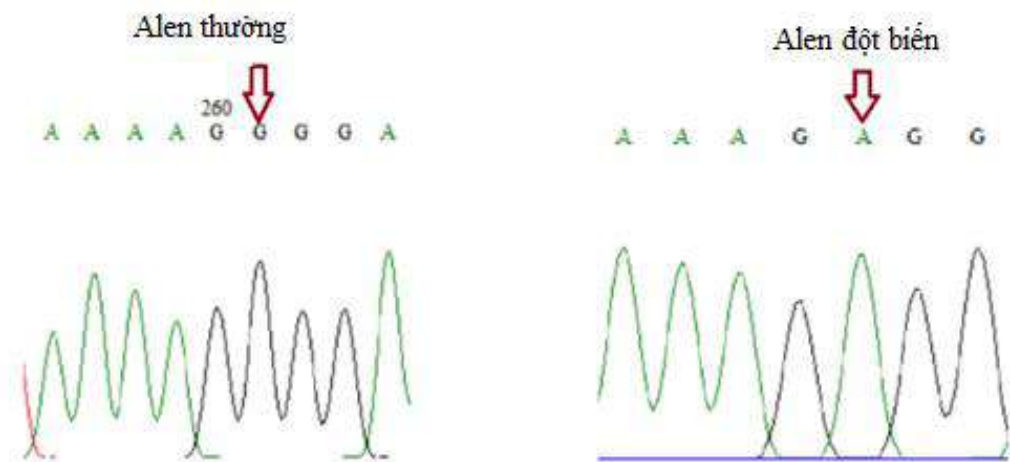


Hình 3.9. Kết quả phát hiện đột biến E415G ở ký sinh trùng sốt rét

D6.1: Ký sinh trùng không đột biến

D6.2: Ký sinh trùng mang đột biến E415G

Giải trình tự kiểm tra tính chính xác của quy trình xây dựng, kết quả được trình bày ở hình dưới:



Hình 3.10. Kết quả giải trình tự khẳng định tính chính xác phản ứng ARMS- PCR

Biểu đồ bên trái hiển thị alen thường với nucleotide G tại vị trí 261 (Mẫu bệnh phẩm D6.1). Biểu đồ bên phải hiển thị alen đột biến với sự thay đổi nucleotide từ G sang A tại cùng vị trí (Mẫu bệnh phẩm D6.2). Mũi tên chỉ vị trí nucleotide thay đổi.

Quy trình phát hiện đột biến E415G trên gen *pfEXO* bằng kỹ thuật ARMS-PCR được tiến hành trên mẫu bệnh phẩm thu thập được. Áp dụng phương pháp ARMS-PCR xây dựng được để phát hiện điểm đa hình E415G ở ký sinh trùng sốt rét, kết quả phân tích tần suất ký sinh trùng mang đột biến E415G được trình bày ở bảng dưới đây:

Bảng 3. 8. Tỷ lệ đột biến gen *pfEXO* tại các địa điểm nghiên cứu

| <i>pfEXO</i> | | | | |
|----------------|-------------|------------|------------|----------------|
| Địa điểm | E415G | Kiểu đại | Tổng số | P ¹ |
| Bình Phước | 27 (84,4%) | 5 (15,6%) | 32 (100%) | 0,014 |
| Đắk Lắk | 79 (85,9%) | 13 (14,1%) | 92 (100%) | |
| Đắk 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

Trong tổng số 421 mẫu bệnh phẩm, chúng tôi thực hiện phản ứng ARMS-PCR thành công trên 393 mẫu. Kết quả khảo sát tần suất đột biến trên mẫu bệnh phẩm được nhân gen thành công như sau: 76,1% (299/393) bệnh nhân có ký sinh trùng sốt rét 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 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 ($p < 0,05$).

Bảng 3. 9. Đặc điểm dịch tễ của bệnh nhân theo gen *pfEXO*

| Đặc điểm | Tổng N= 393 | E415G n= 299 | Kiểu đại n= 94 | p ² |
|-------------------|----------------|-----------------|-------------------|---------------------|
| Giới tính | | | | 0,72 ⁽¹⁾ |
| Nam (n,%) | 359 (91,3%) | 274 (91,6%) | 85 (90,4%) | |
| Nữ (n,%) | 34 (8,7%) | 25 (8,4%) | 9 (9,6%) | |
| Tuổi (năm) | | | | 0,63 ⁽²⁾ |
| $\bar{X} \pm SD$ | 32,9 \pm 9,9 | 32,8 \pm 9,8 | 33,1 \pm 10,5 | |
| Min-Max | 14,0- 60,0 | 14,0- 60,0 | 15,0- 58,0 | |

⁽¹⁾ Fisher's exact test; ⁽²⁾ Wilcoxon rank sum test

\bar{X} : trung bình; SD (standard deviation): độ lệch chuẩn; Min: nhỏ nhất; Max: lớn nhất.

Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ phân bố giới tính và độ tuổi giữa hai nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng chứa đột biến gen E415G trên gen *pfEXO* và nhóm kiểu đại khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3. 10. Đặc điểm thân nhiệt và mật độ ký sinh trùng sốt rét của bệnh nhân theo đột biến gen E415G

| Đặc điểm | Tổng N= 393 | E415G n= 299 | Kiểu đại n= 94 | p^2 |
|---|----------------|-----------------|-------------------|----------------|
| Mật độ ký sinh trùng sốt rét | | | | $<0,001^{(2)}$ |
| Geomean | 4521 | 5361 | 2629 | |
| Min-Max | 168 – 154 666 | 168 – 154 666 | 173 – 104 976 | |
| Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$) | | | | $0,82^{(2)}$ |
| $\bar{X} \pm SD$ | $38,6 \pm 0,7$ | $38,6 \pm 0,6$ | $38,6 \pm 0,7$ | |
| Min-Max | 36,0- 40,5 | 36,3- 40,5 | 36,0- 40,5 | |
| Sốt | | | | $0,62^{(1)}$ |
| Không sốt | 6 (1,5%) | 4 (1,3%) | 2 (2,1%) | |
| Sốt nhẹ | 89 (22,6%) | 71 (23,7%) | 18 (19,1%) | |
| Sốt vừa | 226 (57,5%) | 172 (57,5%) | 54 (57,4%) | |
| Sốt cao | 72 (18,3%) | 52 (17,4%) | 20 (21,3%) | |
| Sốt rất cao | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | |

⁽²⁾ Wilcoxon rank sum test; ⁽³⁾ Pearson's Chi-squared test

\bar{X} : trung bình; SD (standard deviation): độ lệch chuẩn; Geomean: trung bình nhân
Min: nhỏ nhất; Max: lớn nhất.

Kết quả phân tích cho thấy nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng có đột biến E415G trên gen *pfEXO* có mật độ ký sinh trùng sốt rét cao hơn so với nhóm mang gen kiểu đại, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Đặc điểm thân nhiệt giữa hai nhóm khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

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

Nghiên cứu của chúng tôi khảo sát tỉ lệ bệnh nhân có ký sinh trùng mang kiểu gen phức với sự biến đổi di truyền trên hai hoặc ba gen *pfK13*, *pfpm2* và *pfEXO*.

Bảng 3. 11. Phân bố kiểu gen C580Y/pfpm2 tại các địa điểm nghiên cứu

| Địa điểm nghiên cứu | | | | | | |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| Kiểu gen C580Y/pfpm2 | Bình Phước | Đắk Lắk | Đắk Nông | Gia Lai | Tổng số | P ¹ |
| Có | 13 (35,1%) | 33 (39,8%) | 6 (35,3%) | 98 (50,8%) | 150 (45,5%) | 0,13 |
| Không | 24 (64,9%) | 50 (60,2%) | 11 (64,7%) | 95 (49,2%) | 180 (54,5%) | |
| Tổng số | 37 (100%) | 83 (100%) | 17 (100%) | 193 (100%) | 330 (100%) | |

¹Pearson's Chi-squared test

Trong tổng số 421 mẫu bệnh phẩm, có 330 mẫu nhân thành công cả gen *pfK13* và *pfpm2*. Tần số KST mang kiểu gen phức C580Y/pfpm2 được tính toán trên số lượng này. Kết quả cho thấy tỉ lệ KST mang kiểu gen C580Y/pfpm2 là 45,5% (150/330) trên tổng số mẫu khảo sát. Phân bố cụ thể của kiểu gen phức C580Y/pfpm2 tại từng địa điểm nghiên cứu được trình bày trong Bảng 3.11.

Bảng 3. 12. Phân bố kiểu gen C580Y/E415G tại các địa điểm nghiên cứu

| Địa điểm nghiên cứu | | | | | | |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|------------------------------|----------------|
| Kiểu gen C580Y/E415G | Bình Phước | Đắk Lắk | Đắk Nông | Gia Lai | Tổng số | P ¹ |
| Có | 25 (80,6%) | 69 (82,1%) | 35 (67,3%) | 121 (60,8%) | 250 (68,3%) | 0,002 |
| Không | 6 (19,4%) | 15 (17,9%) | 17 (32,7%) | 78 (39,2%) | 116 (31,7%) | |
| Tổng số | 31 (100%) | 84 (100%) | 52 (100%) | 199 (100%) | 366 (100%) | |

¹Pearson's Chi-squared test

Trong tổng số 421 mẫu bệnh phẩm, có 366 mẫu được nhân thành công đồng thời cả gen *pfK13* và gen *pfEXO*. Tần số ký sinh trùng mang kiểu gen phức C580Y/E415G được xác định trên số lượng mẫu này. Kết quả cho thấy tỷ lệ ký sinh trùng mang kiểu gen phức C580Y/E415G tương đối cao, chiếm 68,3% (250/366) trên tổng số mẫu khảo sát.

Bảng 3. 13. Tỷ lệ kiểu gen *E415G/pfpm2* tại các địa điểm nghiên cứu

| Kiểu gen <i>E415G/pfpm2</i> | Địa điểm nghiên cứu | | | | Tổng | P ¹ |
|--------------------------------|---------------------|---------------|---------------|----------------|------------------------------|----------------|
| | Bình Phước | Đắk Lắk | Đắk Nông | Gia Lai | | |
| Có | 9 (33,3%) | 36 (43,4%) | 6 (37,5) | 74 (35,9%) | 125 (37,7%) | 0,7 |
| Không | 18 (66,7%) | 47 (56,6%) | 10 (62,5%) | 132 (64,1%) | 207 (62,3) | |
| Tổng số | 27 (100%) | 83 (100%) | 16 (100%) | 206 (100%) | 332 (100%) | |

¹*Pearson's Chi-squared test*

Trong tổng số 421 mẫu bệnh phẩm, có 332 mẫu được nhân thành công đồng thời cả gen *pfEXO* và gen *pfpm2*. Tần số ký sinh trùng mang kiểu gen phức *E415G/pfpm2* được xác định trên số lượng mẫu này. Kết quả khảo sát cho thấy tỷ lệ ký sinh trùng mang kiểu gen phức *E415G/pfpm2* tương đối cao, chiếm 37,7% trên tổng số mẫu khảo sát. Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các địa điểm nghiên cứu về tỷ lệ mang kiểu gen phức *E415G/pfpm2* ($p > 0,05$).

Bảng 3. 14. Đặc điểm phân bố xuất hiện đồng thời các đột biến trên 3 gen ứng viên theo địa điểm nghiên cứu

| | Địa điểm nghiên cứu | | | | Tổng | P ¹ |
|---------------------------------|---------------------|---------------|---------------|----------------|------------------------------|----------------|
| | Bình Phước | Đắk Lắk | Đắk Nông | Gia Lai | | |
| <i>C580Y/pfpm2/E415G</i> | | | | | | |
| Không xuất hiện | 17 (65,4%) | 45 (60,0%) | 10 (66,7%) | 134 (69,4%) | 206 (66,7%) | 0,5 |
| Xuất hiện | 9 (34,6%) | 30 (40,0%) | 5 (33,3%) | 59 (30,6%) | 103 (33,3%) | |
| Tổng | 26 (100%) | 75 (100%) | 15 (100%) | 193 (100%) | 309 (100%) | |

Pearson's Chi-squared test

Kết quả nghiên cứu cho thấy tỷ lệ lưu hành kiểu gen phức với sự xuất hiện đồng thời cả ba đột biến tại các địa điểm nghiên cứu là khoảng 33,3%. Trong đó tại Đắk Lắk có tỷ lệ cao hơn các tỉnh còn lại một chút với tỷ lệ lên tới 40%; tuy nhiên sự khác biệt giữa các địa điểm nghiên cứu không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

3.2. Đánh giá hiệu quả điều trị của Dihydroartemisinin-Piperaquine trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*

3.2.1. Đặc điểm bệnh nhân tham gia đánh giá hiệu quả điều trị sốt rét

Tổng số bệnh nhân tham gia nghiên cứu là 63 người (44 bệnh nhân ở Bình Phước và 19 bệnh nhân ở Đắk Nông). Bảng 3.12 trình bày đặc điểm về tuổi và giới tính của các đối tượng tham gia đánh giá điều trị với DHA-PPQ.

Bảng 3. 15. Đặc điểm tuổi và giới tính đối tượng tham gia điều trị (n=63)

| Đặc điểm | Tổng số N = 63 | Bình Phước n= 44 | Đắk Nông n = 19 | p ² |
|------------------------|-------------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| Giới tính: n(%) | | | | >0,99 ⁽¹⁾ |
| Nữ | 3 (4,8%) | 2 (4,5%) | 1 (5,3%) | |
| Nam | 60 (95,2%) | 42 (95,5%) | 18 (94,7%) | |
| Tuổi (năm) | | | | 0,80 ⁽²⁾ |
| $\bar{X} \pm SD$ | 30,7 ± 9,2 | 30,4 ± 9,1 | 31,5 ± 9,8 | |
| (Min-Max) | 16 - 53,0 | 16 - 53,0 | 19 - 52,0 | |

⁽¹⁾ Fisher's exact test ⁽²⁾ Wilcoxon rank sum test) \bar{X} : trung bình; SD (standard deviation): độ lệch chuẩn Min: nhỏ nhất; Max: lớn nhất

Đa số đối tượng nghiên cứu là nam giới chiếm 95,2%, sự khác biệt về tỉ lệ giới tính ở hai địa điểm nghiên cứu không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Kết quả nghiên cứu về độ tuổi cho thấy độ tuổi trung bình của đối tượng tham gia điều trị là 30,7 ± 9,2 tuổi. Sự khác biệt phân bố độ tuổi tham gia nghiên cứu giữa hai địa điểm nghiên cứu không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3. 16. Đặc điểm thể trạng đối tượng tham gia điều trị

| Đặc điểm | Tổng số N= 63 ¹ | Bình Phước n = 44 ¹ | Đắk Nông n = 19 ¹ | p ² |
|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| BMI (kg/m²) | | | | 0,031⁽²⁾ |
| $\bar{X} \pm SD$ | 21,3 ± 1,9 | 21,7 ± 2,0 | 20,5 ± 1,4 | |
| (Min-Max) | 17,7-26,1 | 18,0- 26,1 | 17,7- 22,5 | |
| Cân nặng (kg) | | | | 0,066 ⁽²⁾ |
| $\bar{X} \pm SD$ | 59,4 ± 7,2 | 60,7 ± 7,3 | 56,5 ± 6,1 | |
| (Min-Max) | 45,0- 80,0 | 48,0- 80,0 | 45,0- 66,0 | |
| Chiều cao (cm) | | | | 0,32 ⁽²⁾ |
| $\bar{X} \pm SD$ | 166,7 ± 5,5 | 167,1 ± 5,6 | 165,8 ± 5,5 | |
| (Min-Max) | 152,0- 175,0 | 152,0- 175,0 | 154,0- 173,0 | |

⁽²⁾ Wilcoxon rank sum test; \bar{X} : Trung bình; SD (standard deviation): Độ lệch chuẩn Min: nhỏ nhất; Max: lớn nhất

Bệnh nhân tham gia điều trị có thể trạng trung bình là 21,3 kg/m². Trong đó, tại Đắk Nông bệnh nhân có BMI trung bình là 20,5 ± 1,4 kg/m², tại Bình

Phước là $21,7 \pm 2 \text{ kg/m}^2$, sự khác biệt giữa hai địa điểm nghiên cứu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

Bảng 3. 17. Đặc điểm sốt và mật độ ký sinh trùng sốt rét trước điều trị

| Đặc điểm | Tổng số N = 63 | Bình Phước n = 44 | Đắk Nông n = 19 | p |
|-----------------------------|-------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| Mật độ ký sinh trùng | | | | 0,50 ⁽²⁾ |
| Geomean | 7022 | 7405 | 6210 | |
| (Min-Max) | 560 - 154 666 | 560 - 95 428 | 1 000 - 154 666 | |
| Tình trạng sốt | | | | 0,17 ⁽¹⁾ |
| Sốt nhẹ | 14,0 (22,2%) | 7,0 (15,9%) | 7,0 (36,8%) | |
| Sốt vừa | 36,0 (57,1%) | 28,0 (63,6%) | 8,0 (42,1%) | |
| Sốt cao | 13 (20,6%) | 9 (20,5%) | 4 (21,1%) | |

⁽¹⁾ Fisher's exact test; ⁽²⁾ Pearson's Chi-squared test

Geomean: trung bình nhân; Min: nhỏ nhất; Max: lớn nhất

Kết quả nghiên cứu cho thấy đa số bệnh nhân ở mức sốt vừa chiếm 57,1% và sốt cao chiếm 20,6%. Không có trường hợp nào không sốt, sự khác biệt đặc điểm sốt ở hai địa điểm nghiên cứu không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Kết quả phân tích cho thấy mật độ ký sinh trùng dao động rộng với trong khoảng từ 560 ký sinh trùng/ μl đến 154 666 ký sinh trùng/ μl , sự khác biệt đặc điểm phân bố mật độ ký sinh trùng giữa hai địa điểm không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3. 18. Đặc điểm biến đổi các gen kháng thuốc của ký sinh trùng sốt rét

| Đặc điểm | Tổng số n = 63 ¹ | Bình Phước n = 44 ¹ | Đắk Nông n = 19 ¹ | p ² |
|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------|
| <i>pfpm2</i> n(%) | | | | 0,57 |
| >1 bản sao | 24 (47,1%) | 17 (44,7%) | 7 (53,8%) | |
| 1 bản sao | 27 (52,9%) | 21 (55,3%) | 6 (46,2%) | |
| <i>pfK13</i> n(%) | | | | 0,15 |
| C580Y | 49 (80,3%) | 37 (86,0%) | 12 (66,7%) | |
| Kiểu đại | 12 (19,7%) | 6 (14,0%) | 6 (33,3%) | |
| <i>pfEXO</i> | | | | 0,46 |
| E415G | 39 (81,3%) | 27 (84,4%) | 12 (75,0%) | |
| Kiểu đại | 9 (18,8%) | 5 (15,6%) | 4 (25,0%) | |

¹n (%) ²Fisher's exact test

3.2.2. Kết quả đánh giá điều trị Dihydroartemisinin-Piperaquine trên bệnh nhân sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*

Bảng 3. 19. Tình trạng sốt của bệnh nhân trong ba ngày đầu tiên sau điều trị

| Ngày | Tổng số n = 63 ¹ | Bình Phước n = 44 ¹ | Đắk Nông n = 19 ¹ | P |
|---------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Ngày 1 | | | | >0,42 ⁽³⁾ |
| Không sốt | 52 (86,7) | 36(81,8) | 16 (100) | |
| Sốt nhẹ | 6(10,0) | 6(13,6) | 0(0) | |
| Sốt vừa | 1(1,7) | 1(2,3) | 0(0) | |
| Sốt cao | 1(1,7) | 1(2,3) | 0(0) | |
| Sốt rất cao | 0(0) | 0(0) | 0(0) | |
| Ngày 2 | | | | >0,99 ⁽²⁾ |
| Không sốt | 60 (100,0%) | 44 (100,0%) | 16 (100,0%) | |
| Ngày 3 | | | | |
| Không sốt | 60 (100,0%) | 44 (100,0%) | 16 (100,0%) | |

¹n (%)

²Fisher's exact test; ³Pearson's Chi-squared test

Kết quả theo dõi sự thay đổi nhiệt độ cho thấy đa số bệnh nhân đã không còn sốt sau 1 ngày sử dụng thuốc. Tỷ lệ sốt cao và sốt nhẹ giảm dần qua các ngày 2 và tới ngày 3 thì 100% bệnh nhân tham gia nghiên cứu cắt sốt.

Bảng 3. 20. Tỷ lệ dương tính KST sốt rét vào ngày D3 sau điều trị

| Đặc điểm | Tổng số n = 63 ¹ | Bình Phước n = 44 ¹ | Đắk Nông n = 19 ¹ | p ² |
|---------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------|
| Ngày 1 | | | | 0,054 |
| Âm tính | 4 (6,7%) | 1 (2,3%) | 3 (18,8%) | |
| Dương tính | 56 (93,3%) | 43 (97,7%) | 13 (81,3%) | |
| Ngày 2 | | | | 0,58 |
| Âm tính | 26 (43,3%) | 18 (41,9%) | 8 (50,0%) | |
| Dương tính | 34 (56,7%) | 26 (58,1%) | 8 (50,0%) | |
| Ngày 3 | | | | >0,99 |
| Âm tính | 47 (78,3%) | 34 (77,3%) | 13 (81,3%) | |
| Dương tính | 13 (21,7%) | 10 (22,7%) | 3 (18,8%) | |

¹n (%)

²Fisher's exact test

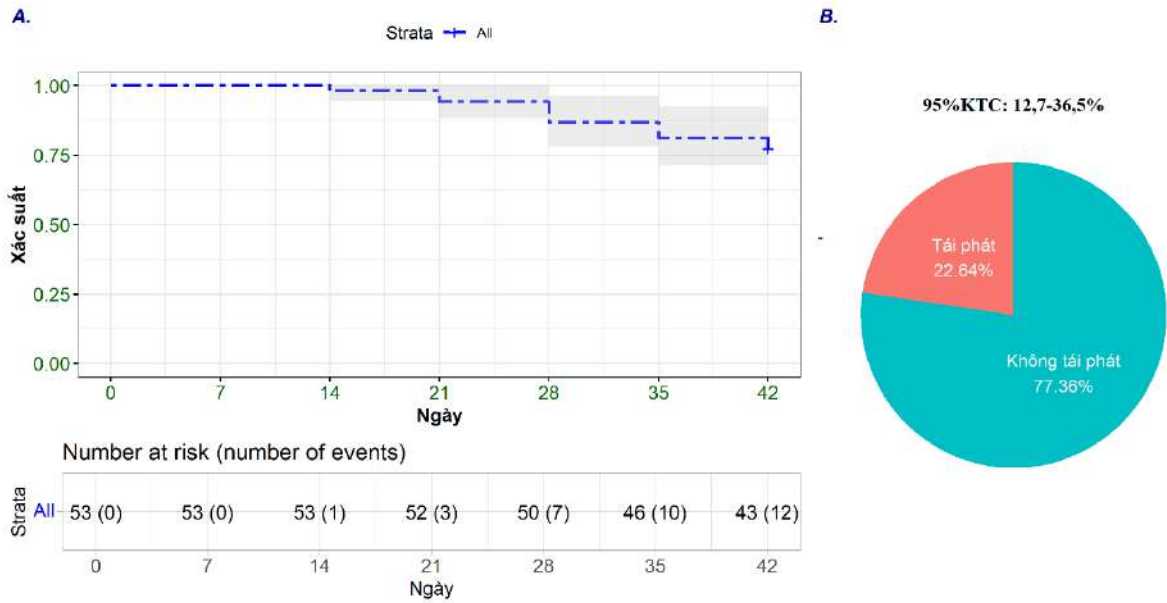
Kết quả theo dõi cho thấy mặc dù mật độ ký sinh trùng giảm nhanh sau ngày đầu tiên sử dụng thuốc, nhưng tỉ lệ dương tính với ký sinh trùng còn khá cao với tỉ lệ dương tính vào ngày D1 sau điều trị chung chiếm 93,3%. Sự khác biệt tỉ lệ giữa các địa điểm nghiên cứu không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Kết quả sau 3 ngày điều trị, tỉ lệ dương tính với ký sinh trùng còn 21,7%, trong đó tỉ lệ này ở Bình Phước là 22,7%, ở Đắc Nông là 18,8%, sự khác biệt tỉ lệ giữa các địa điểm nghiên cứu không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Vào các ngày 3, 7, 14, 21, 28, 35 và 42, bệnh nhân được theo dõi và lấy mẫu máu để kiểm tra sự hiện diện của ký sinh trùng. Sử dụng kỹ thuật PCR để phân biệt tái phát, tái nhiễm. Bảng 3.19 trình bày kết quả phân biệt giữa tái phát và tái nhiễm ở các bệnh nhân tại hai địa điểm Bình Phước và Đắc Nông.

Bảng 3. 21. Kết quả phân biệt tái phát, tái nhiễm ở bệnh nhân

| STT | Mã bệnh nhân | Địa điểm | Ngày tái xuất hiện | Tái phát/tái nhiễm |
|-----------|--------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | D6.40 | Đắc Nông | 21 | Tái phát |
| 2 | D6.42 | Đắc Nông | 21 | Tái phát |
| 3 | D6.44 | Đắc Nông | 14 | Tái phát |
| 4 | D6.45 | Bình Phước | 42 | Tái phát |
| 5 | D6.46 | Bình Phước | 35 | Tái phát |
| 6 | D6.47 | Bình Phước | 35 | Tái phát |
| 7 | D6.49 | Bình Phước | 28 | Tái phát |
| 8 | D6.53 | Bình Phước | 35 | Tái phát |
| 9 | D6.54 | Bình Phước | 28 | Tái nhiễm |
| 10 | D6.56 | Bình Phước | 28 | Tái phát |
| 11 | D6.59 | Bình Phước | 42 | Tái phát |
| 12 | D6.60 | Bình Phước | 21 | Tái nhiễm |
| 13 | D6.61 | Bình Phước | 28 | Tái phát |
| 14 | D6.63 | Bình Phước | 28 | Tái nhiễm |
| 15 | D6.64 | Bình Phước | 28 | Tái phát |

Qua theo dõi bệnh nhân, phát hiện 15 trường hợp có sự xuất hiện ký sinh trùng sốt rét sau điều trị. Sử dụng kỹ thuật PCR phân biệt tái phát, tái nhiễm, kết quả cho thấy có 3 trường hợp tái nhiễm chủng khác và 12 trường hợp tái phát.

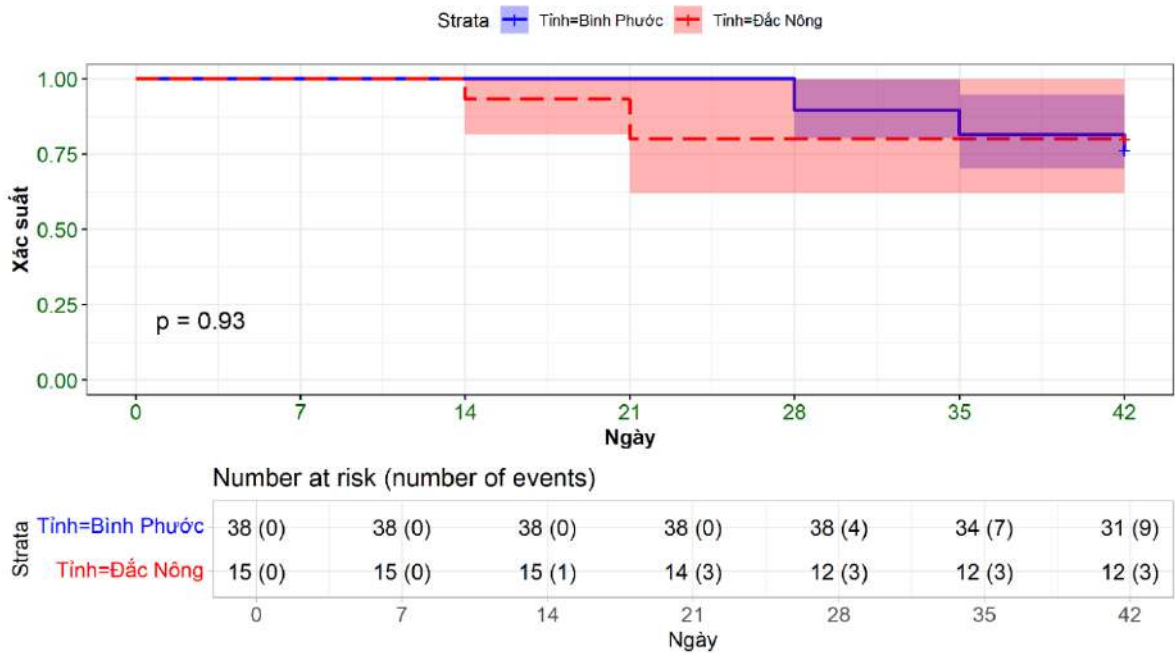


Hình 3.11. Tỷ lệ tái phát tích lũy sau điều trị

A. Đường Kaplan – Meier biểu diễn tình trạng tái phát tích lũy;

B. Tỷ lệ tái phát chung

Kết quả cho thấy có 1 trường hợp phát hiện tái phát ở ngày thứ 14, có 3 trường hợp tái phát tích lũy ngày 21, 7 trường hợp tái phát tích lũy ngày 28, 10 trường hợp tái phát tích lũy ngày 35 và sau 42 ngày theo dõi có 22,6% tái phát (95%CI từ 12,7-36,5%). Sự xuất hiện ca tái phát ký sinh trùng sốt rét từ ngày 3 đến ngày 42 tại các địa điểm nghiên cứu được thể bằng hình dưới đây:



Hình 3.12. Kaplan – Meier biểu diễn tình trạng tái phát tại địa điểm nghiên cứu

Như vậy, sau 42 ngày theo dõi, sự tỉ lệ tái phát tích lũy giữa hai địa điểm nghiên cứu không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

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. 22. 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 (0) | 0,042 |
| | LCF | 14 (31,8) | 1 (5,3) | 15 (23,8) | |
| | LPF | 3 (6,8) | 3 (15,8) | 6 (9,5) | |
| | ACPR | 21 (47,7) | 11 (57,9) | 32 (50,8) | |
| LOSS/WTH* | LOSS | 3 (6,8) | 4 (21,1) | 7 (11,1) | |
| | WTH | 3 (6,8) | 0 (0) | 3 (4,8) | |

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

Bảng 3.19 trình bày kết quả điều trị bằng DHA-PPQ sau 42 ngày theo dõi tại hai tỉnh Bình Phước và Đắk Nông. Số bệnh nhân mất theo dõi hoặc rút khỏi nghiên cứu (LOSS/WTH), Bình Phước có 6,8% bệnh nhân mất theo dõi và 6,8% bệnh nhân rút khỏi nghiên cứu, trong khi Đắk Nông có 21,1% bệnh nhân mất theo dõi và không có bệnh nhân nào 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%.

Tóm lại kết quả đánh giá hiệu quả điều trị DHA-PPQ với bệnh nhân sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* cho thấy: tỉ lệ ký sinh trùng ngày D3 cao ($>10\%$ ở cả 2 địa điểm nghiên cứu), tỉ lệ tái phát tích lũy cao. Điều

này cho thấy kháng thuốc xuất hiện kèm theo sự suy giảm hiệu lực điều trị sốt rét của DHA-PPQ tại Việt Nam.

3.3. 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*

3.3.1. Đặc điểm hiệu quả điều trị DHA-PPQ theo yếu tố gen

3.3.1.1. Đột biến C580Y trên *pfK13*

Bảng 3. 23. Tỷ lệ xuất hiện đột biến *pfK13* ở nhóm bệnh nhân dương tính KST vào ngày D3 sau điều trị

| Đặc điểm đột biến <i>pfk13</i> | Tổng số n= 13 ¹ | Bình Phước n = 10 ¹ | Đắk Nông n= 3 ¹ | p ² |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|----------------|
| Ký sinh trùng dương tính D3 sau điều trị n(%) | | | | 0,99 |
| Kiểu đại | 0(0) | 0(0) | 0(0) | |
| C580Y | 13(100) | 10(100) | 3(100) | |

¹n (%) ²Fisher's exact test

Bảng 3.23 thể hiện tỷ lệ xuất hiện đột biến gen *pfK13* ở nhóm bệnh nhân vẫn còn dương tính với ký sinh trùng vào ngày D3 sau khi kết thúc liệu trình điều trị. Kết quả cho thấy tỷ lệ bệnh nhân mang đột biến C580Y (đột biến xác định kháng artemisinin trên gen *pfK13*) ở cả Bình Phước và Đắk Nông đều là 100% trong số những bệnh nhân còn dương tính KST vào ngày D3. Như vậy, theo định nghĩa của WHO, hai địa điểm nghiên cứu đều là khu vực xác định kháng artemisinin.

Bảng 3. 24. Kết quả điều trị theo đột biến C580Y trên gen *pfK13*

| Đặc điểm | Tổng số n = 51 ¹ | C580Y n = 41 ¹ | Kiểu đại n = 10 ¹ | p ² |
|----------|--------------------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------|
| ACPR | 30 (58,8%) | 20 (48,8%) | 10 (100,0%) | 0,003 |
| LCF/LPF | 21 (41,2%) | 21 (51,2%) | 0 (0,0%) | |

¹n (%) ²Fisher's exact test

Kết quả nghiên cứu cho thấy nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng sốt rét đột biến C580Y trên gen *pfK13* có tỷ lệ điều trị thất bại cao hơn (51,2%) so với nhóm kiểu đại (0%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với p<0,05.

3.3.1.2. Số lượng bản sao gen *pfpm2***Bảng 3. 25. Kết quả điều trị theo số lượng bản sao gen *pfpm2***

| Đặc điểm | Tổng số n = 44 ¹ | >1 bản sao n = 20 ¹ | 1 bản sao n = 24 ¹ | p ² |
|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------|
| Kết quả điều trị | | | | 0,38 |
| ACPR | 23 (52,3%) | 9 (45,0%) | 14 (58,3%) | |
| LCF/LPF | 21 (47,7%) | 11 (55,0%) | 10 (41,7%) | |

¹n (%) ²Fisher's exact test

Kết quả nghiên cứu cho thấy nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng >1 bản sao gen *pfpm2* có tỉ lệ điều trị thất bại cao hơn (55,0%) so với nhóm có 1 bản sao (41,7%), tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với p>0,05.

3.3.1.3. Đột biến E415G trên gen *pfEXO***Bảng 3. 26. Kết quả điều trị theo đột biến E415G trên gen *pfEXO***

| Đặc điểm | Tổng số N = 39 ¹ | E415G N = 31 ¹ | Kiểu dại N = 8 ¹ | p ² |
|----------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------|----------------|
| ACPR | 24 (61,5%) | 18 (58,1%) | 6 (75,0%) | 0,45 |
| LCF/LPF | 15 (38,5%) | 13 (41,9%) | 2 (25,0%) | |

¹n (%) ²Fisher's exact test

Kết quả nghiên cứu cho thấy nhóm bệnh nhân mang đột biến E415G có tỉ lệ điều trị thất bại cao hơn (41,9%) so với nhóm kiểu dại (25%), tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với p>0,05.

3.3.1.4. Kiểu gen phức

Bảng 3. 27. Kết quả điều trị theo đột biến phức C580Y của gen *pfK13* và E415G trên gen *pfEXO*

| Kết quả điều trị | Tổng số n = 37 ¹ | Không n = 11 ¹ | C580Y + E415G n = 26 ¹ | p ² |
|------------------|--------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|----------------|
| ACPR | 22 (59,5%) | 9 (81,8%) | 13 (50,0%) | 0,14 |
| LCF/LPF | 15 (40,5%) | 2 (18,2%) | 13 (50,0%) | |

¹n (%) ²Fisher's exact test

Kết quả nghiên cứu cho thấy nhóm bệnh nhân mang đột biến phức trên 2 gen ứng viên là *pfK13* và *pfEXO* có tỉ lệ điều trị thất bại cao hơn (50,0%) so với nhóm không (18,2%), tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với p>0,05.

Bảng 3. 28. Kết quả điều trị theo đột biến phức C580Y của gen *pfK13* và số lượng bản sao gen *pfpm2*

| Kết quả điều trị | Tổng số n = 43 ¹ | Không n = 28 ¹ | C580Y + >1 bản sao n = 15 ¹ | p ² |
|------------------|--------------------------------|------------------------------|---|----------------|
| ACPR | 22 (51,2%) | 18 (64,3%) | 4 (26,7%) | 0,019 |
| LCF/LPF | 21 (48,8%) | 10 (35,7%) | 11 (73,3%) | |

¹n (%) ²Pearson's Chi-squared test

Kết quả nghiên cứu cho thấy nhóm bệnh nhân mang đột biến phức trên 2 gen ứng viên là *pfK13* và *pfpm2* có tỉ lệ điều trị thất bại cao hơn (73,3%) so với nhóm không (35,7%), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với p<0,05.

Bảng 3. 29. Kết quả điều trị theo đột biến phức tăng số lượng bản sao của gen *pfpm2* và E415G trên gen *pfEXO*

| Kết quả điều trị | Tổng số n = 32 ¹ | Không n = 21 ¹ | E415G + >1 bản sao n = 11 ¹ | p ² |
|------------------|--------------------------------|------------------------------|---|----------------|
| ACPR | 17 (53,1%) | 14 (66,7%) | 3 (27,3%) | 0,034 |
| LCF/LPF | 15 (46,9%) | 7 (33,3%) | 8 (72,7%) | |

¹n (%) ²Pearson's Chi-squared test

Kết quả nghiên cứu cho thấy nhóm bệnh nhân mang đột biến phức trên 2 gen ứng viên là *pfEXO* và *pfpm2* có tỉ lệ điều trị thất bại cao hơn (72,7%) so với nhóm không (3,3%), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với p<0,05.

Bảng 3. 30. Kết quả điều trị theo đột biến phức C580Y của gen *pfK13* và E415G trên gen *pfEXO* và tăng số lượng bản sao gen *pfpm2*

| Đặc điểm | Tổng số n = 31 ¹ | Không n = 20 ¹ | C580Y/E415G/ <i>pfpm2</i> n = 11 ¹ | p ² |
|----------|--------------------------------|------------------------------|--|----------------|
| ACPR | 16 (51,6%) | 13 (65,0%) | 3 (27,3%) | 0,044 |
| LCF/LPF | 15 (48,4%) | 7 (35,0%) | 8 (72,7%) | |

¹n (%) ²Pearson's Chi-squared test

Kết quả nghiên cứu cho thấy nhóm bệnh nhân mang đột biến phức trên 3 gen ứng viên là *pfK13*, *pfEXO* và tăng số lượng bản sao *pfpm2* có tỉ lệ điều trị thất bại cao hơn (72,7%) so với nhóm không (35,0%), sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê với p<0,05.

3.3.2. Mối liên quan giữa các yếu tố với hiệu quả điều trị

Bảng 3. 31. Kết quả phân tích mối liên quan giữa các yếu tố với kết quả điều trị thất bại

| Yếu tố | Kết quả điều trị | | OR (95%CI) | p | |
|--|-----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|-------|
| | Đáp ứng | Thất bại | | | |
| Tuổi (năm) ($\bar{X} \pm SD$) | 32,3 \pm 9,4 | 28,8 \pm 9,9 | 0,96 (0,90-1,02) | 0,198 | |
| Mật độ ký sinh trùng Geomean (min-max) | 6920 (736-100 571) | 5806 (560-154 666) | 1,00 (1,00-1,00) | 0,741 | |
| Vị trí địa lý | Bình Phước | 21 (55,3) | 17 (44,7) | - | 0,231 |
| | Đắk Nông | 11 (73,3) | 4 (26,7) | 0,45 (0,11-1,58) | |
| BMI (kg/m ²) ($\bar{X} \pm SD$) | 21,2 \pm 1,9 | 21,2 \pm 1,9 | 0,98 (0,73-1,33) | 0,912 | |

Geomean: trung bình nhân; Min: nhỏ nhất; Max: lớn nhất

\bar{X} : trung bình; *SD (standard deviation): Độ lệch chuẩn*

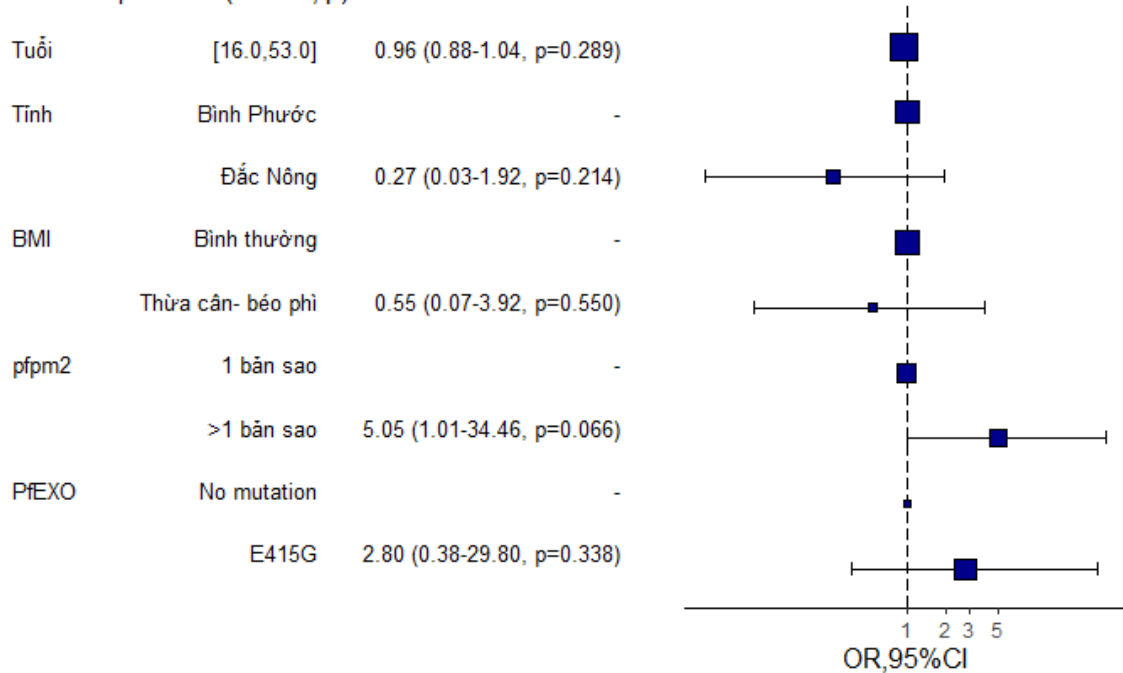
Kết quả phân tích mối liên quan giữa các yếu tố đặc điểm nhân trắc và đột biến trên các gen ứng viên cho thấy không có yếu tố nào cho thấy có mối liên quan với tình trạng điều trị thất bại ký sinh trùng. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với các khoảng 95%CI đều chứa 1.

Bảng 3. 32. Kết quả phân tích mối liên quan giữa các đột biến với kết quả điều trị thất bại

| Yếu tố | | Kết quả điều trị | | | OR (95%CI) |
|--------------|-------------|------------------|-----------|-----------|-------------------------|
| | | Thất bại | Đáp ứng | Tổng | |
| <i>pfpm2</i> | >1 bản sao | 9 | 11 | 20 | 1,7 (0,52-5,81) |
| | 1 bản sao | 14 | 10 | 24 | |
| | Tổng | 13 | 22 | 54 | |
| <i>pfK13</i> | C450Y | 20 | 21 | 41 | 121431229 (0.00 - ∞) |
| | Kiểu đại | 10 | 0 | 10 | |
| | Tổng | 30 | 21 | 51 | |
| <i>pfEXO</i> | E415G | 18 | 13 | 31 | 2,17 (0,42-16,43) |
| | Kiểu đại | 6 | 2 | 8 | |
| | Tổng | 24 | 15 | 39 | |

Kết quả phân tích mối liên quan giữa các yếu tố đặc điểm đột biến trên các gen ứng viên cho thấy không có yếu tố nào cho thấy có mối liên quan với tình trạng điều trị thất bại ký sinh trùng. Sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với các khoảng 95%CI đều chứa 1.

Yếu tố liên quan: OR (95%CI, p)



Hình 3. 13. Mối liên quan giữa đột biến E415 trên *pfEXO* và *pfpm2* với kết quả điều trị thất bại hiệu chỉnh bằng đặc điểm chung

Biểu đồ Forest plot mô tả mối liên quan giữa các yếu tố như tuổi, địa phương (Bình Phước, Đắc Nông), BMI và đột biến E415 trên *pfEXO* và *pfpm2* với nguy cơ thất bại điều trị. Hình vuông biểu thị giá trị OR (Odds Ratio) ước tính, trong khi thanh ngang đại diện cho khoảng tin cậy 95% (95%CI). Nếu thanh ngang cắt trực OR = 1, nghĩa là không có sự khác biệt có ý nghĩa về xác suất xảy ra kháng thuốc giữa các nhóm có và không có yếu tố liên quan. Trong hình, tất cả các thanh ngang đều cắt trực OR = 1, cho thấy các yếu tố này không có mối liên quan đáng kể với thất bại điều trị trong mẫu nghiên cứu.

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 đột biến E415 trên *pfEXO* và *pfpm2* không có mối liên quan với tình trạng điều trị thất bại, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3. 33. Kết quả phân tích mối liên quan giữa đột biến gen phức với kết quả điều trị thất bại

| Yếu tố | | Kết quả điều trị | | | OR (95%CI) |
|--------------------------|-------------|------------------|-----------|-----------|----------------------|
| | | Thất bại | Đáp ứng | Tổng | |
| <i>pfK13/pfEXO</i> | Có | 13 | 0 | 13 | - |
| | Không | 2 | 9 | 11 | |
| | Tổng | 15 | 9 | 24 | |
| <i>pfK13/pfpm2</i> | Có | 11 | 4 | 15 | 4,95 (1,32-21,88) |
| | Không | 10 | 18 | 28 | |
| | Tổng | 21 | 22 | 43 | |
| <i>pfpm2/pfEXO</i> | Có | 8 | 3 | 11 | 5,33 (1,15-30,81) |
| | Không | 7 | 14 | 21 | |
| | Tổng | 15 | 17 | 24 | |
| <i>pfK13/pfpm2/pfEXO</i> | Có | 8 | 3 | 11 | 4,95 (1,06-28,75) |
| | Không | 7 | 13 | 20 | |
| | Tổng | 15 | 16 | 31 | |

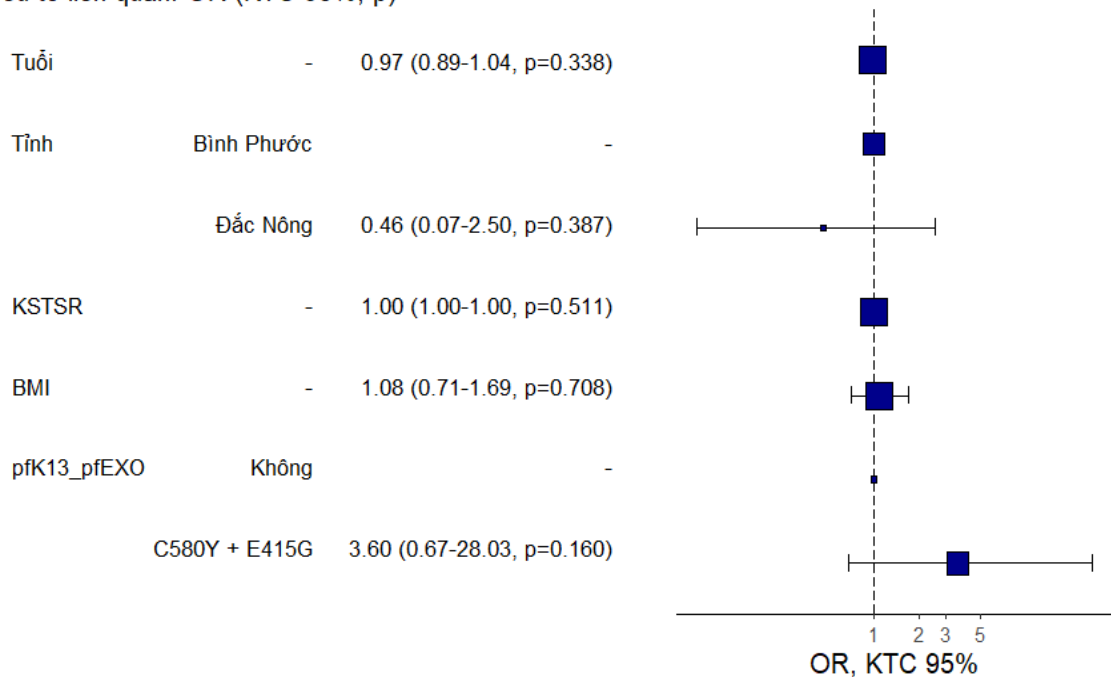
Kết quả nghiên cứu cho thấy sự xuất hiện kiểu gen phức *pfK13/pfpm2*, *pfpm2/pfEXO* và đột biến trên cả 3 gen ứng viên cho thấy có mối liên quan với tình trạng điều trị thất bại. Cụ thể nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng sốt rét chứa đột biến trên *pfK13/pfpm2* có nguy cơ điều trị thất bại cao gấp 4,95 lần so với nhóm không, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với 95%CI từ 1,32-21,88.

Nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng chứa 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 95%CI từ 1,15-30,81.

Nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng sốt rét chứa đột biến trên *pfK13/pfpm2/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 95%CI từ 1,06-28,75.

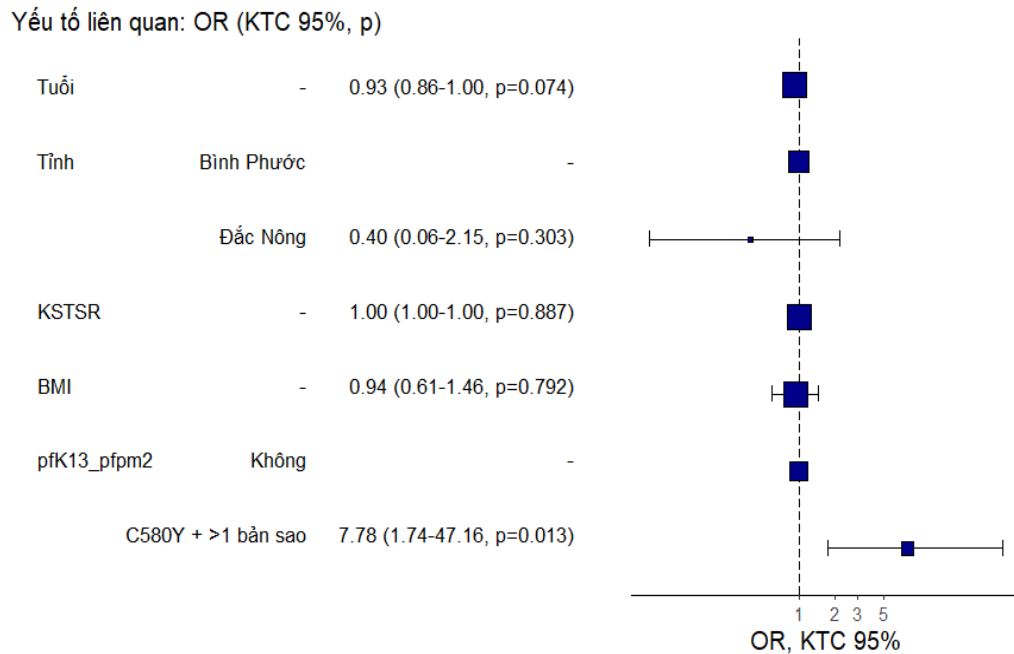
Vì vai trò của các yếu tố ảnh hưởng không ngang bằng nhau trong ảnh hưởng đến kết quả điều trị, vì có yếu tố ảnh hưởng nhiều, yếu tố ảnh hưởng ít nên chúng tôi thực hiện phân tích hồi quy logistic nhằm tìm ra yếu tố có vai trò ảnh hưởng lớn nhất.

Yếu tố liên quan: OR (KTC 95%, p)



Hình 3.14. Mối liên quan giữa đột biến gen phức C580Y trên *pfK13* và E415 trên *pfEXO* với kết quả điều trị thất bại hiệu chỉnh bằng đặc điểm chung. Biểu đồ Forest plot mô tả mối liên quan giữa các yếu tố như tuổi, địa phương (Bình Phước, Đắc Nông), KST, BMI và đột biến kép trên gen *pfK13* và *pfEXO* (C580Y + E415G) với nguy cơ thất bại điều trị. Hình vuông biểu thị giá trị OR (Odds Ratio) ước tính, trong khi thanh ngang đại diện cho khoảng tin cậy 95% (95%CI). Nếu thanh ngang cắt trực OR = 1, nghĩa là không có sự khác biệt có ý nghĩa về xác suất xảy ra kháng thuốc giữa các nhóm có và không có yếu tố liên quan. Trong hình, tất cả các thanh ngang đều cắt trực OR = 1, cho thấy các yếu tố này không có mối liên quan đáng kể với thất bại điều trị trong mẫu nghiên cứu.

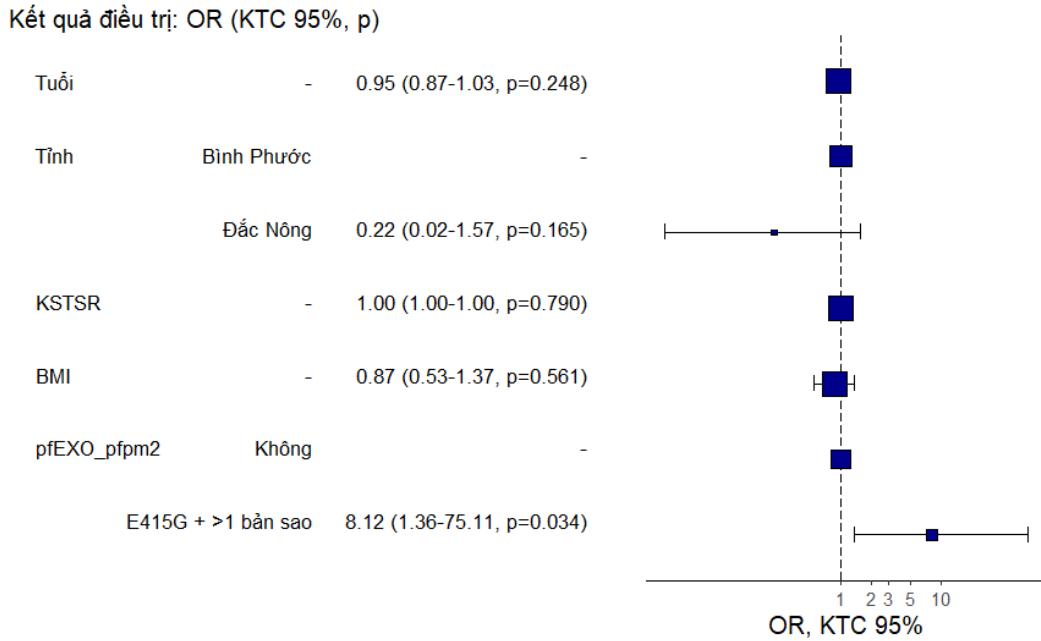
Kết quả hiệu chỉnh bằng các yếu tố đặc điểm chung bao gồm tuổi, địa điểm nghiên cứu, mật độ ký sinh trùng sốt rét, BMI cho thấy nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng sốt rét chứa đột biến C580Y trên *pfK13* và E415 trên *pfEXO* không có mối liên quan với tình trạng điều trị thất bại, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.



Hình 3.15. Môi liên quan giữa đột biến C580Y trên *pfK13* và tăng số lượng bản sao *pfp2* với kết quả điều trị thất bại hiệu chỉnh bằng đặc điểm chung Hình ảnh biểu diễn một biểu đồ Forest plot so sánh các yếu tố liên quan đến đột biến gen *pfK13* ở ký sinh trùng sốt rét và khả năng kháng thuốc của chúng. Biểu đồ hiển thị các giá trị OR (Odds Ratio), khoảng tin cậy 95% (95%CI) và giá trị p cho từng yếu tố; Các yếu tố bao gồm: tuổi, khu vực địa lý (Bình Phước và Đắc Nông), KST, BMI, kiểu gen C580Y/pfp2.

Kết quả cho thấy: Đột biến C580Y với hơn 1 bản sao gen *pfp2* có OR là 7,78, khoảng tin cậy 95% (1,74-47, 16) và giá trị $p=0.013$, chỉ ra rằng yếu tố này có ý nghĩa thống kê và có liên quan chặt chẽ đến tính kháng thuốc sốt rét. Hình vuông và thanh ngang: Hình vuông đại diện cho giá trị OR ước tính, còn thanh ngang là khoảng tin cậy 95%. Nếu thanh ngang cắt qua trục $OR = 1$, nghĩa là không có sự khác biệt có ý nghĩa về xác suất xảy ra sự kiện giữa hai nhóm (với yếu tố liên quan và không liên quan).

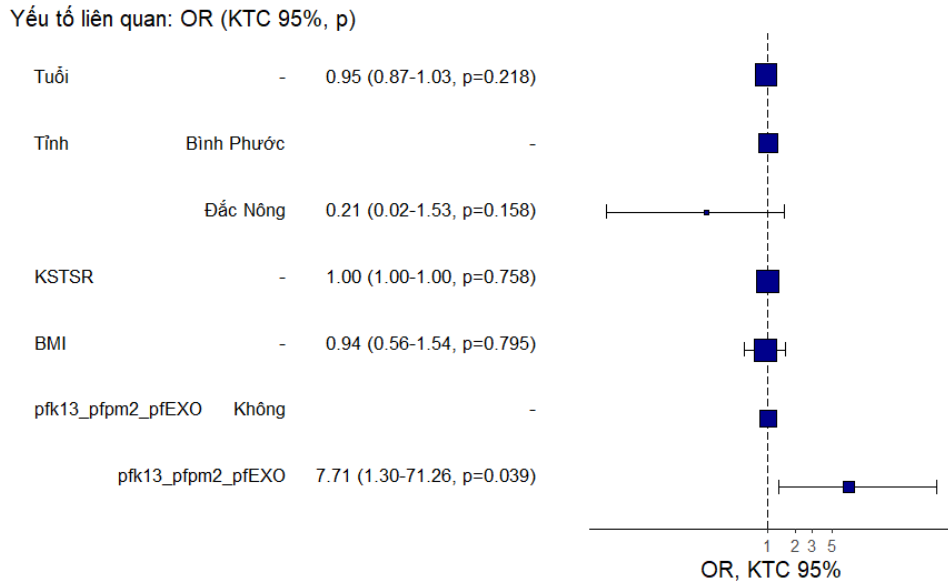
Kết quả hiệu chỉnh bằng các yếu tố đặc điểm chung bao gồm tuổi, địa điểm nghiên cứu, mật độ ký sinh trùng sốt rét, BMI cho thấy nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng sốt rét chứa đột biến số lượng bản sao gen *pfp2* và C580Y trên *pfK13* có mối liên quan với tình trạng điều trị thất bại, cụ thể, sau hiệu chỉnh cho thấy OR tăng lên tới 7,78 lần, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p<0,05$.



Hình 3.16. Mối liên quan giữa đột biến E415G trên *pfEXO* và tăng số lượng bản sao *pfp2* với kết quả điều trị thất bại hiệu chỉnh bằng đặc điểm chung. Biểu đồ Forest plot biểu diễn mối liên quan giữa các yếu tố như tuổi, khu vực địa lý (Bình Phước, Đắc Nông), KST (khả năng ký sinh trùng sốt rét), BMI và Kiểu gen E415G/pfp2 với kết quả điều trị bệnh sốt rét. Hình vuông đại diện cho giá trị OR (Odds Ratio) ước tính và thanh ngang biểu thị khoảng tin cậy 95% (95%CI). Nếu thanh ngang cắt trục $OR = 1$, nghĩa là không có sự khác biệt có ý nghĩa về xác suất xảy ra kết quả điều trị giữa các nhóm.

Kết quả cho thấy đột biến E415G với hơn 1 bản sao có mối liên quan có ý nghĩa thống kê đến kết quả điều trị ($OR = 8.12$, 95%CI: 1.36-75.11, $p = 0.034$). Các yếu tố khác như tuổi, khu vực địa lý, KST và BMI đều không có ý nghĩa thống kê ($p > 0.05$), cho thấy chúng không có mối liên quan đáng kể đến kết quả điều trị trong mẫu nghiên cứu này.

Kết quả hiệu chỉnh bằng các yếu tố đặc điểm chung bao gồm tuổi, địa điểm nghiên cứu, mật độ ký sinh trùng, BMI cho thấy nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng sốt rét chứa đột biến số lượng bản sao gen *pfp2* > 1 bản sao và E415G trên *pfEXO* có mối liên quan với tình trạng điều trị thất bại, cụ thể, sau hiệu chỉnh cho thấy OR tăng lên tới 8,12 lần, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$.

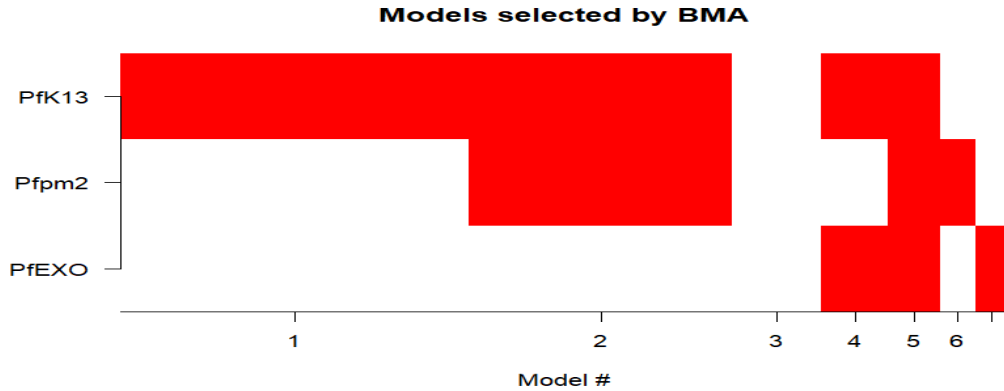


Hình 3.17. Mối liên quan giữa biến đổi di truyền trên cả 3 gen với kết quả điều trị thất bại hiệu chỉnh bằng đặc điểm chung

Biểu đồ Forest plot hiển thị mối liên quan giữa các yếu tố như tuổi, khu vực địa lý (Bình Phước, Đặc Nông), KST (khả năng ký sinh trùng sốt rét), BMI và sự hiện diện của đột biến trên các gen *pfK13*, *pfpm2* và *pfEXO* với kết quả điều trị sốt rét. Hình vuông đại diện cho giá trị OR ước tính, thanh ngang biểu thị khoảng tin cậy 95% (95%CI). Nếu thanh ngang cắt trục $OR = 1$, nghĩa là không có sự khác biệt có ý nghĩa về xác suất xảy ra kết quả điều trị giữa các nhóm có và không có yếu tố liên quan.

Kết quả cho thấy đột biến *pfK13_pfp2_pfEXO* có mối liên quan có ý nghĩa thống kê đến kết quả điều trị ($OR = 7.71$, 95%CI: 1.30-71.26, $p = 0.039$), cho thấy yếu tố này có thể ảnh hưởng đến kết quả điều trị bệnh sốt rét. Các yếu tố còn lại như tuổi, khu vực địa lý, KST và BMI đều không có ý nghĩa thống kê ($p > 0.05$), cho thấy chúng không có mối liên quan đáng kể đến kết quả điều trị trong mẫu nghiên cứu này.

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 *pfpm2*, *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 $p < 0,05$.



Hình 3.18. Vai trò của đột biến trên các gen ứng viên trong mối liên quan với điều trị thất bại

Biểu đồ hiển thị các mô hình (Models) được chọn bởi phân tích BMA (Bayesian Model Averaging) để đánh giá sự liên quan của các gen *pfK13*, *pfpM2*, và *pfEXO* trong nghiên cứu. Trục ngang (Model #) biểu thị các mô hình khác nhau được chọn, trong khi trục dọc liệt kê các gen. Các thanh màu đỏ chỉ ra gen tương ứng (*pfK13*, *pfpM2*, *pfEXO*) được chọn trong mô hình cụ thể.

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 *pfpM2* 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. 34. 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</i> (C580Y) | 0,58 | 0,61 | - | 0,55 | 0,57 |
| <i>pfpM2</i> (>1 bản sao) | - | 0,27 | - | - | 0,27 |
| <i>pfEXO</i> (E415G) | - | - | - | 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 |

Bảng 3.34 trình bày kết quả của phân tích trung bình mô hình BMA với năm mô hình khác nhau, dựa trên sự hiện diện của các đột biến gen *pfK13* (C580Y), *pfpm2* (>1 bản sao) và *pfEXO* (E415G). Mỗi mô hình được mô tả qua các thông số như hệ số chặn, hệ số của từng đột biến, số biến trong mô hình, giá trị R^2 , BIC (Bayesian Information Criterion), và xác suất hậu định. Hệ số chặn (Intercept) cho biết giá trị trung bình của biến kết quả khi không có đột biến nào hiện diện, và hệ số của từng đột biến biểu thị mức độ ảnh hưởng của chúng đến kết quả điều trị. Giá trị R^2 biểu thị khả năng giải thích sự biến thiên của biến kết quả bởi các yếu tố trong mô hình. Giá trị BIC, được sử dụng để đánh giá mức độ phù hợp của mô hình (càng thấp càng tốt).

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.

Mô hình 1:

Các yếu tố sử dụng: Chỉ gen *pfK13* C580Y.

Hệ số hồi quy của *pfK13* C580Y: 0,58.

Công thức tính xác suất thất bại điều trị:

$$P(\text{thất bại điều trị}) = \frac{e^{0.58.X_1}}{1 + e^{0.58.X_1}}$$

Trong đó:

- $X_1 = 1$ nếu đột biến *pfK13* C580Y xuất hiện.
- $X_1 = 0$ nếu không có đột biến.

Do đó, nếu *pfK13* C580Y có mặt ($X_1=1$) xác suất điều trị thất bại sẽ là 64,1%.

Mô hình 2:

- Các yếu tố sử dụng: Kết hợp gen *pfK13* C580Y và *pfpm2* (>1 bản sao).
- Hệ số hồi quy:
 - *pfK13* C580Y: 0,61.
 - *pfpm2* (>1 bản sao): 0,27.
- Công thức tính xác suất thất bại điều trị:

$$P(\text{thất bại điều trị}) = \frac{e^{0.61.X_1 + 0.27.X_2}}{1 + e^{0.61.X_1 + 0.27.X_2}}$$

- $X_1 = 1$ nếu đột biến *pfK13* C580Y xuất hiện; $X_1 = 0$ nếu không có
- $X_2 = 1$ nếu có hơn 1 bản sao của *pfpm2*; $X_2 = 0$ nếu không có

Nếu cả hai đột biến cùng xuất hiện ($X_1=1, X_2=1$) xác suất thất bại điều trị là **70%**.

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Sự biến đổi di truyền và tần số đột biến của một số gen kháng thuốc ở ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum*

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

Sự xuất hiện các đột biến trong gen *pfK13*, đặc biệt trên vùng cánh quạt thì có liên quan đến tình trạng kháng artemisinin, tuy nhiên dữ liệu về tần suất đột biến trên gen *pfK13* được thu thập qua các nghiên cứu và giám sát định kỳ cho thấy tần suất đột biến *pfK13* tại GMS nói chung và các nước nói riêng bao gồm Việt Nam có diễn biến phức tạp, không đồng đều và có sự biến đổi theo thời gian và vị trí địa lý [96]. Hiện nay, có hơn 200 đột biến trên gen *pfK13* được phát hiện, tuy nhiên vai trò và mức độ ảnh hưởng của từng đột biến đối kháng artemisinin là khác nhau [12]. Về cơ chế dẫn đến sự kháng thuốc các nghiên cứu đã phát hiện thấy nhiều đột biến khác nhau tạo ra một kiểu hình tương tự cho thấy rằng các đột biến *pfK13* thể hiện sự mất chức năng một phần, thay vì tăng chức năng, tuy nhiên cơ chế chính xác của từng dạng đột biến như thế nào thì chưa xác định.

Tại khu vực GMS bao gồm Campuchia, Lào, Myanmar, Thái Lan, Việt Nam và khu vực Vân Nam của Trung Quốc, các đột biến trên gen *pfK13* có sự phân bố địa lý khác nhau, ảnh hưởng đến việc theo dõi và kiểm soát kháng thuốc sốt rét [96, 97]. Đột biến C580Y là một trong những đột biến phổ biến nhất, xuất hiện rộng rãi ở Campuchia, Lào, Myanmar, Thái Lan và Việt Nam, với tần suất cao [96]. Đột biến Y493H cũng phổ biến tại Campuchia nhưng ít gặp hơn ở Lào, Myanmar, Thái Lan, Việt Nam và Trung Quốc, đột biến R539T được tìm thấy chủ yếu ở Campuchia và ít phổ biến hơn ở các quốc gia khác trong khu vực, đột biến I543T hiếm gặp và phân bố rải rác ở một số khu vực của Campuchia, Lào, Myanmar, Thái Lan và Trung Quốc. Đột biến F446I phổ biến hơn ở Myanmar và Thái Lan, đặc biệt là ở các khu vực giáp biên giới, trong khi ít gặp hơn ở Campuchia, Lào, Việt Nam và Trung Quốc. Sự phân bố địa lý của các đột biến này là yếu tố quan trọng trong việc theo dõi kháng thuốc [96-98].

Đột biến C580Y trên gen *pfK13* đã được chứng minh là một trong những chỉ thị phân tử mạnh mẽ cho tình trạng kháng artemisinin ở *P. falciparum*, ký sinh trùng gây bệnh sốt rét [96]. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tần suất C580Y trên gen *pfK13* là 91,3%, đây cũng là đột biến duy nhất

trên gen *pfK13* được phát hiện và là đột biến được WHO xác nhận kháng với artemisinin. Tần suất C580Y cao nhất tại Đắk Lắk (95,7%), tiếp đó tỉnh Gia Lai (92,5%), hai địa điểm còn lại (Đắk Nông, Bình Phước) có tần suất thấp hơn nhưng đều trên 80%.

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. Giai đoạn 2011-2012, sáu đột biến phổ biến trên gen *pfK13* đó là F446I, M476I, Y493H, R539T, I543T, P553L và C580Y. Tỷ lệ ký sinh trùng mang đột biến *pfK13* tăng theo thời gian tăng từ 8,7% (20/231) năm 2009 lên 79,1% (34/43) năm 2016 ($P < 0,001$). Cùng với đó, C580Y ngày càng chiếm ưu thế trong dạng đột biến trên gen *pfK13*, C580Y tăng từ 1,7% (4/231) trong giai đoạn 2009-2010 lên 79,1% (34/43) giai đoạn 2015-2016 ($P < 0,001$). Ngược lại, đột biến I543T giảm tần số từ 10,2% (15/147) giai đoạn 2010-2011 xuống còn 2,1% (1/48) giai đoạn 2013-2014 và sau đó biến mất [12]. Ca kháng artemisinin lần đầu tiên được báo cáo tại tỉnh Bình Phước vào năm 2009 [99], dữ liệu về đột biến trên gen *pfK13* tại tỉnh này giai đoạn 2009 đến 2016 cho thấy xu hướng chung về sự biến đổi di truyền trên gen *pfK13* tại Việt Nam. Báo cáo cụ thể như sau: tỷ lệ đột biến C580Y tăng từ 1,7% (4/231) trong mùa 2009-2010 lên đến 79,1% (34/43) trong mùa 2015-2016 ($P < 0,001$). Ngược lại, đột biến Y543T giảm từ 10,2% (15/147) vào 2010-2011 xuống còn 2,1% (1/48) vào 2013-2014 và sau đó biến mất. Tương tự, tỷ lệ các ký sinh trùng sốt rét có đột biến Y493H tăng từ 0,7% (1/147) trong giai đoạn từ 2010 đến 2012 lên đến 12,5% (6/48) vào 2013-2014, nhưng sau đó không phát hiện đột biến này nữa, đột biến P553L cũng đã tăng tần suất ban đầu, từ 5,2% (12/231) trong 2009-2010 lên 15,4% (21/136) vào 2011-2012, nhưng sau đó trở nên hiếm hơn. Các đột biến còn lại chỉ được phát hiện ở tần suất thấp ($< 5\%$) như V568K và P574L từ năm 2009 đến 2012 và R539T vào mùa 2011-2012 [100]. Sau giai đoạn 2012-2013, các báo cáo giám sát định kỳ cho thấy C580Y tăng tần suất nhanh chóng với 34,5% (2014) tới 90,5% (2015) [101].

Báo cáo về đột biến trên gen *pfK13* tại khu vực Tây Nguyên giai đoạn 2009-2016 cho thấy: cả hai tỉnh Đắk Nông và tỉnh Đắk Lắk đều cho thấy tỷ lệ cao tương đối của các đột biến C580Y, lần lượt là 80,6% (29/36) tại tỉnh Đắk Nông và 83,6% (46/55) tại tỉnh Đắk Lắk [100]. Tuy nhiên, tỷ lệ đột biến

C580Y quan sát trong nghiên cứu này thấp hơn so với nghiên cứu hiệu quả điều trị đa trung tâm gần đây với pyronaridine-artesunate (Pyramax) được tiến hành từ năm 2017 đến 2018. Trong nghiên cứu đó, tỉ lệ này lần lượt là 96,2% (25/26) tại Đăk Nông và 57,8% (37/64) tại Gia Lai [102]. Tỉnh Kon Tum có tỉ lệ thấp hơn đáng kể các ký sinh trùng mang đột biến *pfK13* C580Y so với tỉnh Gia Lai, tỉ lệ đột biến C580Y tại Kon Tum là 30,4% (7/23), trong khi ở tỉnh Gia Lai là 38,5% (5/13) [100]. Ngoài ra, 2/23 bệnh nhân tại Kon Tum (8,7%) nhiễm ký sinh trùng chứa đột biến R539T, đột biến này phổ biến ở miền Tây Campuchia và tỉnh Bình Phước trước khi có sự tác động lựa chọn cực đại gần đây, dẫn đến sự thống trị hoàn toàn của C580Y trong các vùng đó [100].

Một đặc điểm đặc biệt thú vị là sự gia tăng chiếm ưu thế của đột biến C580Y tại Việt Nam tương tự như đã quan sát thấy ở các nước láng giềng Campuchia, Lào, Thái Lan [87, 96, 103]. Dữ liệu từ các nghiên cứu cho thấy sự tăng trưởng này bắt đầu từ những năm đầu thập kỷ 2010 và tiếp tục gia tăng mạnh mẽ trong các năm sau đó [96, 104, 105]. Tỉ lệ đột biến C580Y tại Pailin, phía Tây Campuchia đã tăng mạnh từ năm 2008 và đạt đến gần như 90% vào năm 2012, đây là khu vực đầu tiên tại GMS ghi nhận sự xuất hiện và lan rộng của đột biến này. Vào năm 2014, tỉ lệ ký sinh trùng có đột biến C580Y dẫn đến tỉ lệ dương tính với ký sinh trùng sốt rét sau 3 ngày điều trị là 41% ở Pailin và 13% ở Pursat, điều này cho thấy hiệu quả của liệu pháp DHA-PPQ đã giảm đáng kể [96].

Trong các nghiên cứu về ký sinh trùng *P. falciparum* tại Thái Lan, đột biến C580Y là phổ biến nhất, chiếm 84,8% trong tất cả các đột biến *pfK13*, được quan sát. Tỉ lệ đột biến này đã tăng từ 63% vào năm 2013 lên 100% vào năm 2015 [106]. Ngoài ra, các đột biến khác như R539T và R539I cũng được ghi nhận, nhưng ít phổ biến hơn so với C580Y [106]. Thử nghiệm RSA cho thấy các mẫu có đột biến C580Y có tỉ lệ sống sót cao hơn, minh chứng cho khả năng kháng artemisinin của chúng. Đột biến *pfK13*, đặc biệt là C580Y, đã trở nên phổ biến tại Thái Lan, phản ánh sự lan rộng của kháng artemisinin tại đất nước này [96].

Các dữ liệu về phân tích gen cho thấy đột biến C580Y có một nguồn gốc đơn lẻ tại ba quốc gia Campuchia, Thái Lan và Lào trong giai đoạn từ 2008 đến 2015 [103]. Dữ liệu từ các phân tích này đã chỉ ra rằng, các kiểu gen của C580Y tại Campuchia, Thái Lan và Lào có sự giống nhau đáng kể, cho

thấy một lan truyền mạnh mẽ của kiểu gen này trong khu vực. Cụ thể, nghiên cứu sử dụng microsatellite genotyping để so sánh các mẫu *P. falciparum* từ bốn quốc gia Đông Nam Á đã xác nhận rằng các mẫu từ Campuchia, Thái Lan và Lào có chung một nguồn gốc di truyền, chứng tỏ sự lan truyền của một dạng đột biến C580Y duy nhất trong khu vực này. Sự giống nhau trong các kiểu gen của C580Y ở các quốc gia này là bằng chứng mạnh mẽ cho thấy đột biến này xuất hiện từ một nguồn gốc đơn nhất và sau đó lan rộng ra các quốc gia lân cận [96].

Một câu hỏi quan trọng là liệu các ký sinh trùng mang đột biến *pfK13*, và đặc biệt là các ký sinh trùng mang đột biến C580Y, được nhập khẩu từ các quốc gia khác trong khu vực hay chúng xuất hiện độc lập tại Việt Nam do áp lực thuốc tại địa phương. Một nghiên cứu bao gồm một số ký sinh trùng từ tỉnh Bình Phước được đưa vào nghiên cứu này [107], tiết lộ rằng các mẫu Việt Nam mang các đột biến Y493H, I543T, và C580Y có các haplotype *pfK13* dài giống hệt như các ký sinh trùng Campuchia mang cùng đột biến này. Điều này gợi ý rằng các đột biến *pfK13* trong ký sinh trùng từ cả hai phía của biên giới Việt Nam-Campuchia có chung nguồn gốc, mặc dù không thể xác định chắc chắn hướng lan truyền của các chủng này. Ngược lại, phân tích tương tự cho thấy rằng các ký sinh trùng mang đột biến P553L có thể đã phát sinh độc lập tại Bình Phước. Hơn nữa, các đột biến *pfK13* thường xuất hiện trên nền di truyền với các đột biến trong các gen bao gồm *arps10* V127M, *fd* D193Y, *mdr2* T484I, và *crt* N326S [107]. Nhiều mẫu được giải trình tự từ tỉnh Bình Phước đã được đưa vào phân tích trước đó [107], kết luận rằng các đột biến *pfK13* ở tỉnh Bình Phước xuất hiện độc lập chỉ trong các ký sinh trùng mang nền di truyền này.

Phân tích haplotype xung quanh gen *pfK13* tại 3 tỉnh Bình Phước, Ninh Thuận và Gia Lai cho thấy có nhiều nguồn gốc khác nhau của đột biến C580Y tại ba địa điểm này [108]. Ký sinh trùng ở Ninh Thuận có haplotype giống với ký sinh trùng ở Gia Lai hơn là ở Bình Phước, các ký sinh trùng ở những khu vực này cũng cho thấy sự đa dạng haplotype lớn hơn, trong khi các đột biến C580Y ở Bình Phước có thể được chia thành hai nhóm với haplotype rất giống nhau. Một giả thuyết là đột biến C580Y của một haplotype hiện nay chiếm ưu thế ở Bình Phước có thể mới xuất hiện và chưa lan đến Gia Lai và Ninh Thuận, nơi mà các đột biến C580Y của haplotype

khác đã có từ trước [108], những đột biến sớm này có thể đã bị thay thế bởi đột biến C580Y mới cạnh tranh hơn. Nếu giả thuyết này đúng, có khả năng các haplotype thấy ở các đột biến C580Y tại Bình Phước sẽ lan rộng hơn trong tương lai [108]. Như vậy, đột biến C580Y có thể đã phát sinh từ nhiều nguồn gốc khác nhau, bao gồm cả việc du nhập từ Campuchia và sự phát sinh độc lập tại Việt Nam. Phân tích haplotype cho thấy có sự khác biệt rõ rệt giữa các khu vực, với Bình Phước có các haplotype khác biệt so với Ninh Thuận và Gia Lai. Sự khác biệt haplotype phản ánh sự đa dạng di truyền và các quá trình tiến hóa độc lập trong các quần thể *P. falciparum* tại các vùng khác nhau của Việt Nam [108].

Cho đến nay, có đến 125 đột biến được phát hiện trên gen *pfK13* 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 [109, 110], điều này không phải sự ngẫu nhiên. Đột biến C580Y lan truyền và phổ biến hơn các đột biến khác trên gen *pfK13* do một số yếu tố quan trọng như sự liên kết mạnh giữa đột biến kháng artemisinin và các vùng khác ngoài *pfK13*, đặc biệt là các vùng trên nhiễm sắc thể 14, cho thấy rằng các đột biến ở các vùng khác của bộ gen có thể cần thiết để bù đắp cho các tác động xấu về mặt khả năng thích nghi của các đột biến *pfK13* [107, 110, 111]. Các biến thể này có thể giúp giảm thiểu những tổn hại do đột biến *pfK13* gây ra, cho phép ký sinh trùng mang đột biến C580Y tồn tại và phát triển tốt hơn so với các đột biến khác trong môi trường không có áp lực thuốc. Điều này được chứng minh trong thực tế khi tỉ lệ cao chủng ký sinh trùng mang đột biến C580Y kết hợp với sự gia tăng số lượng bản sao gen *pfpm2* được quan sát thấy từ Campuchia phía Tây vào miền Nam Lào, Đông Bắc Thái Lan và Việt Nam [50-52].

Một giả thuyết khác là đột biến C580Y tạo cho KST có khả năng thích nghi tốt hơn so với các đột biến kháng artemisinin khác khi không có áp lực thuốc, chính vì vậy ký sinh trùng mang đột biến này cạnh tranh và vượt trội hơn trong các nhiễm trùng hỗn hợp và đạt mật độ ký sinh cao cần thiết cho việc truyền nhiễm nhanh hơn. Mặc dù đột biến C580Y không cho thấy tỉ lệ thanh thải ký sinh trùng vượt trội so với các đột biến khác khác và nguy cơ thất bại điều trị cũng tương đương với những bệnh nhân mang các đột biến khác trên *pfK13*. Ngoài ra, không có sự liên quan giữa các ký sinh trùng mang các đột biến kháng artemisinin trên *pfK13* và khả năng mang giao bào, điều này cho

thấy rằng sự thành công của C580Y không liên quan đến việc sản xuất giao bào hoặc khả năng thích nghi trong giai đoạn gan hoặc muỗi [111].

Đột biến *pfK13* ngoài khu vực GMS đã xuất hiện độc lập ở nhiều địa điểm khác nhau trên thế giới, bao gồm châu Phi và Nam Mỹ [83]. Tại Rwanda, đột biến *pfK13* R561H đã xuất hiện và lan rộng, với các ký sinh trùng mang đột biến này thể hiện dấu hiệu kháng artemisinin thông qua việc kéo dài thời gian thanh thải $\frac{1}{2}$ ký sinh trùng và tăng tỉ lệ sống sót sau khi tiếp xúc với DHA *in vitro* [83]. Ở Guyana, đột biến *pfK13* C580Y được phát hiện trong các cuộc khảo sát từ năm 2010 đến 2017 và cũng liên kết với kháng artemisinin, mặc dù tỉ lệ phổ biến của nó đã giảm dần. Tại New Guinea và Uganda, các đột biến *pfK13* đã xuất hiện, với sự gia tăng tỉ lệ đột biến A675V theo thời gian ở Uganda, và các đột biến này có liên quan đến kháng artemisinin. Như vậy, các đột biến *pfK13* ở các khu vực ngoài GMS đều liên quan đến kháng artemisinin, làm phức tạp hóa công tác điều trị và phòng chống bệnh sốt rét toàn cầu [83].

Tóm lại, các kết quả này cho thấy sự biến đổi đáng kể phân bố đột biến C580Y trên thế giới, tỉ lệ đột biến C580Y có sự khác biệt theo thời gian. 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. Sự thay đổi số lượng bản sao gen *pfpm2* ở ký sinh trùng sốt rét

Tỉ lệ ký sinh trùng sốt rét mang nhiều bản sao *pfpm2* trong nghiên cứu của chúng tôi là 51%. Tỉ lệ bệnh nhân có ký sinh trùng sốt rét mang nhiều bản sao *pfpm2* không có sự khác biệt ở địa điểm nghiên cứu. Sự gia tăng số lượng bản sao của *pfpm2* tại Việt Nam đã được báo cáo trước đó, theo tác giả Bùi Quang Phúc và cộng sự (2017) với tần suất bệnh nhân có ký sinh trùng sốt rét mang nhiều bản sao của gen *pfpm2* là 25/46 (54, 3%) [112]. Báo cáo tác giả Huỳnh Hồng Quang và cộng sự về chỉ điểm phân tử kháng thuốc tại vùng sốt rét lưu hành tình Đắk Lắk được tiến hành tại các xã Ea Dah, Dlie Ya, Ea Puk thuộc huyện Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk, từ tháng 4 năm 2019 đến tháng 3 năm 2021 [89]. Trong số 50 mẫu phân tích, tỉ lệ tăng số bản sao *pfpm2* là 72%, tức là có 36 mẫu cho thấy sự gia tăng số bản sao *pfpm2*. Sự tăng này được xác định là một chỉ điểm kháng PPQ, và đồng thời 72% số mẫu cũng xuất hiện cả hai chỉ điểm *pfK13* và *pfpm2*. Tác giả cho rằng mức độ kháng thuốc cao, đa kháng thuốc xuất hiện trong quần thể *P. falciparum* ở khu vực nghiên cứu [89]

Tại Việt Nam, sự gia tăng số lượng bản sao gen *pfpm2* chủ yếu được quan sát thấy ở các tỉnh giáp biên giới với Campuchia như Gia Lai và Bình Phước. Ngược lại, ở các tỉnh không giáp ranh như Khánh Hòa, Ninh Thuận và Quảng Trị, không có sự gia tăng đáng kể nào về số lượng bản sao gen *pfpm2* [113]. Mặc dù đến hiện nay, KST có gia tăng số lượng bản sao gen *pfpm2* tại Việt Nam chưa nhiều như ở Campuchia, nhưng mức độ tăng số lượng bản sao tại Việt Nam cũng khá nhanh. Tại tỉnh Gia Lai, tỉ lệ xuất hiện số lượng bản sao *pfpm2* tăng từ 16,7% (năm 2014) lên đến 53,3% (năm 2021) [113]. Một điểm lưu ý, tốc độ tăng số lượng bản sao thường cao hơn so với tốc độ thay đổi nucleotide [84], điều này cũng lý giải cho sự gia tăng nhanh chóng số lượng bản sao của gen *pfpm2* ở cả Campuchia cũng như Việt Nam khi mà sự gia tăng nhanh chóng số lượng bản sao của gen *pfpm2* được hỗ trợ bởi sự ngày càng kém hiệu quả của thuốc điều trị sốt rét.

Sự gia tăng số lượng bản sao của gen *pfpm2* đã được nghiên cứu trong 1252 mẫu bệnh phẩm được thu thập trên khắp Campuchia từ năm 2002 đến 2015, bao gồm cả trước và sau khi áp dụng điều trị bằng DHA-PPQ [15]. Việc lấy mẫu theo thời gian đã được thực hiện tại Pailin (miền tây Campuchia) và Rattanakiri (miền đông Campuchia), nơi DHA-PPQ được giới thiệu lần lượt vào năm 2008 và 2010. Tại Pailin, tỉ lệ ký sinh trùng có nhiều bản sao gen *pfpm2* tăng từ 27,9% (19 trong số 68 mẫu) vào năm 2008-2009 lên 91,2% (52 trong số 57 mẫu) vào năm 2014-2015. Tại Rattanakiri, ký sinh trùng có nhiều bản sao gen *pfpm2* rất hiếm gặp cho đến năm 2012-2013 (3,2%), nhưng đã tăng lên 45,5% (40 trong số 88 mẫu) vào năm 2014-2015. Sự gia tăng đều đặn của ký sinh trùng có nhiều bản sao gen *pfpm2* sau khi DHA-PPQ được giới thiệu cũng được ghi nhận ở các tỉnh khác như Preah Vihear và Pursat. Những dữ liệu này cho thấy việc sử dụng DHA-PPQ là phác đồ ưu tiên trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* có thể liên quan đến sự gia tăng số lượng ký sinh trùng mang nhiều bản sao gen *pfpm2*, điều này có thể ảnh hưởng đến hiệu quả của điều trị [15].

Tại Thái Lan, số lượng bản sao của gen *pfpm2* đã tăng đáng kể trong giai đoạn từ năm 2013 đến 2015. Cụ thể, năm 2013, chỉ có 7,4% các mẫu nghiên cứu chứa nhiều bản sao *pfpm2*. Tuy nhiên, tỉ lệ này tăng lên 51,3% vào năm 2014 và đạt 78,3% vào năm 2015 [106]. Các ký sinh trùng chứa nhiều bản sao *pfpm2* thường có giá trị IC₉₀ của PPQ cao hơn, cho thấy khả

năng kháng PPQ. Điều đáng chú ý là trong số các mẫu chứa nhiều bản sao *pfpm2*, một số cũng có đột biến *pfcr1-F145I*, làm tăng thêm mức độ kháng thuốc. Sự gia tăng đáng kể về số lượng bản sao *pfpm2* cùng với đột biến *pfcr1-F145I* cho thấy sự tiến hóa nhanh chóng của các kiểu gen kháng thuốc ở vùng biên giới Thái Lan-Campuchia [106].

Tác giả Fang Huang và cộng sự (2020) báo cáo có sự gia tăng số lượng bản sao của gen *pfpm2* trong *P. falciparum* dọc biên giới Trung Quốc-Myanmar. Kết quả cho thấy, trong tổng số 224 mẫu được kiểm tra, chỉ có một mẫu có nhiều bản sao *pfpm2*, trong khi các mẫu còn lại (99,6%, 223/224) không cho thấy sự gia tăng số lượng bản sao của *pfpm2*, mẫu duy nhất có nhiều bản sao *pfpm2* cũng mang đột biến *pfK13*. Điều này chứng tỏ rằng sự gia tăng số lượng bản sao của *pfpm2* không phổ biến trong các mẫu từ khu vực biên giới Trung Quốc-Myanmar. Dữ liệu cho thấy không có sự xuất hiện rộng rãi của kháng PPQ liên quan đến sự gia tăng số lượng bản sao gen *pfpm2* trong khu vực nghiên cứu [114].

Tại Tây Phi, tần số của đột biến nhân đôi gen *pfpm2* ở *P. falciparum* đã được ghi nhận đáng chú ý [115]. Cụ thể, trong tổng số 65 mẫu bệnh nhân tái phát sau khi điều trị bằng DHA-PPQ, có 7 mẫu (tương đương khoảng 10%) mang đột biến này. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng không có xu hướng rõ ràng về việc tái phát sớm hơn liên quan đến nhóm mang đột biến *pfpm2*, điều này đòi hỏi cần phải nghiên cứu thêm trên mẫu lớn hơn để hiểu rõ hơn về mối liên hệ này. Tần số của đột biến *pfpm2* ở mức 10% cho thấy khả năng kháng thuốc của *P. falciparum* có thể đang gia tăng, đòi hỏi sự giám sát và nghiên cứu liên tục để đánh giá và đưa ra các biện pháp ứng phó kịp thời.

Tóm lại, sự gia tăng số lượng bản sao của gen *pfpm2* ở các quốc gia trong GMS phản ánh tình trạng kháng thuốc PPQ ngày càng nghiêm trọng. Tỷ lệ ký sinh trùng mang nhiều bản sao *pfpm2* cao, đặc biệt ở các khu vực biên giới như Việt Nam và Campuchia, cho thấy sự lan rộng của kháng thuốc. Tốc độ gia tăng nhanh chóng ở một số khu vực như Gia Lai và Thái Lan là đáng lo ngại. Sử dụng DHA-PPQ liên quan đến sự gia tăng số lượng bản sao *pfpm2*, làm giảm hiệu quả điều trị. Ngoài ra, sự xuất hiện của các kiểu gen đa kháng thuốc cũng được ghi nhận. Tình trạng này đòi hỏi giám sát liên tục và nghiên cứu sâu hơn để đưa ra các biện pháp kiểm soát hiệu quả.

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

Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy E415G xuất hiện với tỉ lệ cao khá cao 76,1%, tại Đắk Lắk tần suất E415G lên tới 85,7%. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Huỳnh Hồng Quang và cộng sự (2019) cho thấy tại tỉnh Đắk Nông tỉ lệ ký sinh trùng sốt rét mang đột biến E415G chiếm 55,6%, tại tỉnh Đắk Lắk là 85,5% [6].

Huỳnh Hồng Quang và cộng sự báo cáo về tỉ lệ đột biến E415G kháng PPQ tại các tỉnh Tây Nguyên Việt Nam. Kết quả cho thấy tỉ lệ đột biến E415G khác nhau đáng kể giữa các tỉnh. Cụ thể, Đắk Nông có tỉ lệ 66,7% (24/36 mẫu), Đắk Lắk có tỉ lệ 85,5% (47/55 mẫu), Gia Lai có tỉ lệ 61,5% (8/13 mẫu), và Kon Tum có tỉ lệ thấp nhất với 30,4% (7/23 mẫu) [14].

Nghiên cứu chỉ điểm kháng thuốc thực hiện tại một số huyện của tỉnh Đắk Lắk, bao gồm Ea Kar, Ma Đrăk, kết quả cho thấy, trong giai đoạn 2017 - 2018, tần suất đột biến exonuclease E415G, liên quan đến kháng thuốc PPQ, là 85,5% (47/55 mẫu) [18]. Đến giai đoạn 2019 - 2020, tần suất này tăng lên 91,1% (72/79 mẫu). Sự gia tăng tần suất của đột biến E415G qua các năm cho thấy khả năng kháng thuốc PPQ đang trở nên phổ biến hơn trong quần thể *P. falciparum* tại khu vực nghiên cứu, Krông Năng, Đắk Lắk [18]

Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu của Nguyễn Chính Phong và cộng sự (2019) không tìm thấy điểm đa hình E415G [116], điều này được lý giải do nghiên cứu được tiến hành tại Ninh Thuận nơi mà cách xa khu vực Tây Nguyên khi hiệu quả điều trị với DHA-PPQ còn rất cao, 100% bệnh nhân không xuất hiện ký sinh trùng sốt rét ngày thứ 3 sau điều trị, nghiên cứu này cũng không tìm thấy điểm đa hình trên gen *pfK13* và bệnh nhân tham gia nghiên cứu đều không mang nhiều bản sao gen *pfpm2*.

Tác giả Ngô Việt Thanh và cộng sự (2015) cũng báo cáo về tần số xuất hiện cao của đột biến E415G ở bệnh nhân tái phát sau điều trị với 93% (13/14) mẫu mang đột biến [6].

Báo cáo cho thấy kháng PPQ đã xuất hiện tại khu vực biên giới Trung Quốc – Myanmar, tuy nhiên về mặt di truyền, không có mẫu nào mang đột biến E415G sự nhân đôi gen *pfpm2/3*, gợi ý rằng các cơ chế giảm nhạy cảm PPQ tại khu vực này khác với các cơ chế được mô tả ở các quốc gia khác trong khu vực. Các đột biến *pfK13* chính tại khu vực này (F446I và G533S) có liên quan đến giá trị AUC, IC₅₀, và IC₉₀ tăng, cho thấy khả năng kháng

PPQ có thể phát triển trong nền di truyền *pfK13* này. Mặc dù có sự xuất hiện của kháng PPQ tại khu vực biên giới Trung Quốc - Myanmar, sự kháng này không lan rộng đáng kể và hiệu quả lâm sàng của DHA-PPQ vẫn duy trì tốt tại khu vực này [117].

Ngoài các khu vực Campuchia, Việt Nam, hiện tại chưa có nhiều báo cáo về sự xuất hiện của đột biến E415G tại các khu vực khác như châu Phi hay Nam Mỹ [118]. Nghiên cứu của Robert và cộng sự cho thấy không có mẫu nào trong số 77 mẫu được giải trình tự trên exon 2 mang đột biến E415G, điều này cho thấy đột biến E415G không xuất hiện trong các mẫu từ Senegal trong nghiên cứu này [119]. Kết quả cũng tương tự với nghiên cứu tại Sudan, không quan sát thấy trường hợp đột biến E415G nào trong các mẫu *P. falciparum* [120]. Tại Mali, chỉ có hai mẫu từ Dangassa xuất hiện đột biến E415G, đột biến này không được tìm thấy ở Nioro-du-Sahel. Đột biến E415G đã được liên kết với sự gia tăng giá trị IC_{50} của PPQ trong các thí nghiệm *ex vivo* với các mẫu ký sinh trùng từ Campuchia [16]. Việc phát hiện đột biến này ở Mali có thể cho thấy sự tồn tại của tính kháng PPQ, tuy nhiên, sự hiện diện của nó vẫn còn rất hiếm trong các mẫu nghiên cứu từ vùng này [121].

Việc đột biến E415G trong gen exonuclease của *P. falciparum* chỉ xuất hiện tại Campuchia và Việt Nam thể hiện một số điểm đáng chú ý. Trước hết, điều này cho thấy tính cục bộ của đột biến kháng thuốc, phản ánh các yếu tố môi trường và áp lực chọn lọc từ việc sử dụng thuốc tại hai quốc gia này. Ngoài ra, Việt Nam và Campuchia có giai đoạn đều sử dụng DHA-PPQ là phác đồ ưu tiên trong điều trị sốt rét [122]. Việc sử dụng rộng rãi DHA-PPQ trong nhiều năm đã tạo ra áp lực chọn lọc mạnh mẽ, dẫn đến sự phát triển và duy trì của các đột biến kháng thuốc, bao gồm đột biến E415G trong gen exonuclease của *P. falciparum*. Sự xuất hiện của đột biến này chủ yếu tại Campuchia và Việt Nam không chỉ phản ánh tình trạng kháng thuốc tại hai quốc gia này mà còn là dấu hiệu cảnh báo về khả năng lan truyền của kháng thuốc nếu không có biện pháp kiểm soát hiệu quả.

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

Kết quả cho thấy các kiểu gen phức xuất hiện với tần số khá cao, tần số ký sinh trùng sốt rét mang kiểu gen C580Y/*pfpm2* hay là ký sinh trùng sốt rét mang dạng đột biến kết hợp giữa C580Y và sự nhân đôi *pfpm2* là 45,5%. Báo cáo tác giả Huỳnh Hồng Quang và cộng sự về chỉ điểm phân tử kháng thuốc

tại vùng sốt rét lưu hành tỉnh Đắk Lắk được tiến hành tại các xã Ea Dah, Dlie Ya, Ea Puk thuộc huyện Krông Năng, tỉnh Đắk Lắk, từ tháng 4 năm 2019 đến tháng 3 năm 2021 [89]. Trong số 50 mẫu phân tích, 72% số mẫu cũng xuất hiện cả hai chỉ điểm *pfK13* và *pfpm2*. Tác giả cho rằng mức độ kháng thuốc cao, đa kháng thuốc xuất hiện trong quần thể *P. falciparum* ở khu vực nghiên cứu [89].

Tại Tây Nguyên, dòng ký sinh trùng mang C580Y và *pfpm2* được phát hiện với tỉ lệ cao tại các tỉnh Đắk Nông, Đắk Lắk và Gia Lai, trong khi Kon Tum có tỉ lệ thấp hơn. Cụ thể, tại Đắk Nông, tỉ lệ này là 27,8%, tại Đắk Lắk là 16,4%, tại Gia Lai là 23,1%, và tại Kon Tum là 4,3% [14].

Sự kết hợp giữa đột biến *pfK13* C580Y và sự nhân đôi *pfpm2/3* đã tạo ra một dòng ký sinh trùng đa kháng thuốc mạnh mẽ, gọi là "C580Y-co-lineage" [83] hoặc "KEL1/PLA1" [87, 103]. Dòng ký sinh trùng này đã lan truyền từ Campuchia sang các nước láng giềng như Việt Nam và Thái Lan, điều này gây ra sự lây lan rất nhanh chóng sự đa kháng thuốc trên khắp Campuchia về phía Tây Việt Nam, dẫn đến suy giảm hiệu quả điều trị của DHA-PPQ tại các quốc gia này [5, 83, 87].

Hamilton và cộng sự có báo cáo về dòng ký sinh trùng đa kháng thuốc KEL1/PLA1 [87]. Tác giả cho rằng cũng cho rằng KEL1/PLA1 của ký sinh trùng *P. falciparum*, có nguồn gốc từ miền Tây Campuchia, là một trong những dòng ký sinh trùng đa kháng thuốc nổi bật nhất tại khu vực Đông Nam Á. Dòng KEL1/PLA1 lần đầu tiên được phát hiện trong các mẫu từ Campuchia, sau đó lan rộng ra các nước láng giềng bao gồm Lào, Thái Lan và Việt Nam [87, 103]. Trước năm 2009, dòng KEL1/PLA1 chỉ hiện diện ở miền Tây Campuchia, nhưng đến năm 2016-2017, nó đã chiếm hơn 50% tổng số mẫu ký sinh trùng ở tất cả các quốc gia khảo sát, ngoại trừ Lào, đặc biệt, ở miền Đông Bắc Thái Lan và Việt Nam, dòng này đã chiếm hơn 80% tổng số mẫu [87]. Tác giả cho rằng sự lan rộng nhanh chóng của KEL1/PLA1 được thúc đẩy bởi khả năng kháng cả artemisinin và PPQ, làm tăng tỉ lệ thất bại điều trị và góp phần làm gia tăng sự lây truyền của ký sinh trùng kháng thuốc trong khu vực [40, 87].

Imwong và các đồng nghiệp gọi dòng này là dòng *PfPailin*, gợi ý rằng dòng này đồng nhất tương tự như một chủng virus hoặc vi khuẩn [7, 82]. Tuy nhiên, ký sinh trùng sốt rét trải qua tái tổ hợp sinh dục trong mỗi chu kỳ

truyền, do đó, cách gọi này có thể gây hiểu nhầm. Dữ liệu cho thấy dòng KEL1 của kháng artemisinin được mang bởi các ký sinh trùng có nền tảng di truyền đa dạng và mặc dù các ký sinh trùng của dòng kết hợp KEL1/PLA1 có mức độ chung tổ tiên cao, chúng không đồng nhất về mặt di truyền. Dữ liệu cho thấy ký sinh trùng trong dòng KEL1 đã xuất hiện ở tần suất thấp ở phía tây Campuchia từ năm 2007. Lúc đó, chúng xuất hiện cùng các khuếch đại *pfmdr1*, liên quan đến kháng mefloquine và không mang các khuếch đại *pfpm2/3* [82, 103].

Dòng kết hợp KEL1/PLA1 lần đầu tiên được quan sát thấy vào năm 2008, cùng năm mà DHA – PPQ được giới thiệu như là thuốc điều trị sốt rét hàng đầu ở phía tây Campuchia. Tuy nhiên, PPQ đã được sử dụng rộng rãi ở phía tây Campuchia, như một liệu pháp đơn vào những năm 1990 và sau đó kết hợp với artemisinin vào cuối những năm 2000. Trong các tỉnh lân cận, các khuếch đại *pfpm2/3* đã lưu hành ở tần suất thấp vào năm 2002-2003, nhưng đã tăng lên vào năm 2008. Vì vậy, mặc dù không tìm thấy các khuếch đại *pfpm2/3* trong dữ liệu này vào năm 2007, có thể PLA1 đã tồn tại trước đó ở tần suất thấp, độc lập với KEL1 [103]. Trong khoảng thời gian và địa điểm khảo sát ở đây, PLA1 chủ yếu liên kết với KEL1, nhưng nó cũng được thấy ở ký sinh trùng thuộc haplogroup KEL2 và ở những ký sinh trùng không có đột biến *pfK13*.

Trước khi xuất hiện kháng DHA-PPQ, tần suất của các ký sinh trùng kháng artemisinin ở phía tây Campuchia đã rất cao, nhưng chúng bao gồm nhiều đột biến *pfK13* khác nhau từ nhiều nguồn gốc dịch tễ học khác nhau, mỗi nguồn gốc có xu hướng duy trì khá cục bộ [103]. Sau khi dòng kết hợp KEL1/PLA1 xuất hiện vào năm 2008, nó đã lan rộng và nhanh chóng trên toàn khu vực phía tây Campuchia, đạt tần suất hơn 60% trong quần thể ký sinh trùng [103]. Dữ liệu cho thấy dòng kết hợp KEL1/PLA1 đã xuất hiện ở phía bắc Campuchia vào năm 2012, có thể do sự lan truyền của các ký sinh trùng từ phía tây Campuchia. Theo Imwong và các đồng nghiệp sử dụng khác với những phương pháp trong nghiên cứu này, dường như dữ liệu của họ cho thấy các ký sinh trùng kháng DHA-PPQ xuất hiện ở đông bắc Thái Lan và Lào vào năm 2014-2015, và ở Việt Nam vào năm 2016, tương ứng với dòng kết hợp KEL1/PLA1 [7, 82].

Dòng KEL1 ban đầu liên kết với các khuếch đại *pfmdr1* là dấu hiệu của kháng mefloquine, nhưng sự liên kết này đã giảm dần theo thời gian, và các mẫu KEL1/PLA1 gần đây nhất trong bộ dữ liệu này không mang khuếch đại *pfmdr1* [103]. Do đó, hiện tại, các ký sinh trùng kháng DHA-PPQ vẫn nhạy cảm với mefloquine, và AS-MQ hiện đang được sử dụng thành công như liệu pháp chống sốt rét hàng đầu ở Campuchia [82, 103]. Bằng chứng cũng cho thấy rằng các ký sinh trùng kháng DHA-PPQ cũng đáp ứng với AS-PY, một liệu pháp kết hợp artemisinin mới [103].

Như vậy, ký sinh trùng kháng artemisinin trong dòng KEL1 có nền tảng di truyền đa dạng nhưng không đồng nhất về mặt di truyền, cho thấy sự tái tổ hợp di truyền qua các chu kỳ truyền bệnh [103]. Trong khi đó dòng PLA1 liên quan đến kháng PPQ có thể xuất hiện độc lập và cũng được tìm thấy trong các ký sinh trùng khác không có đột biến *pfK13* [103]. Các đặc điểm di truyền của dòng kết hợp KEL1/PLA1 phù hợp với các báo cáo về ký sinh trùng kháng DHA-PPQ ở Thái Lan, Lào và Việt Nam [7, 82].

4.2. Kết quả điều trị sốt rét Dihydroartemisinin-Piperaquine 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 đánh giá hồ sơ bệnh án của bệnh nhân tham gia thử nghiệm TES.

Đầu tiên, kết quả sau 3 ngày điều trị cho thấy 100% bệnh nhân cắt sốt, như vậy DHA-PPQ vẫn đảm bảo hiệu quả cắt triệu chứng lâm sàng của bệnh.

Ngoài ra, hiệu lực điều trị của DHA-PPQ còn thể hiện thông qua việc loại bỏ KST sau 3 ngày điều trị. Nhìn chung, 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*. [12]. 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%). Một tỷ lệ cao (trên 10%) bệnh nhân còn dương tính KST vào ngày D3 thể hiện việc giảm hiệu lực của DHA-PPQ trong việc loại bỏ KST sốt rét.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng đối với các báo cáo trước đó của tác giả Bùi Quang Phúc tại các khu vực lân cận với tỉ lệ dương tính với ký sinh trùng sốt rét sau 3 ngày sử dụng thuốc tại Đắc Lắc là 22,6% và 37,3% tại Gia Lai. Tác giả Huỳnh Hồng Quang và cộng sự (2021) nghiên cứu tại huyện Krông Năng, tỉnh Đắc Lắc, sự tồn tại ký sinh trùng sốt rét sau 3 ngày điều trị bằng liệu pháp DHA - PPQ được ghi nhận với tỉ lệ cao, cụ thể là 37,0% (95%CI 23,2-52,5) [89].

Kết hợp phân tích chỉ thị phân tử kháng artemisinin cho thấy trên 100 % bệnh dương tính với KST vào D3 xuất hiện đột biến *pfK13* tại Bình Phước và Đắc Nông. Với định nghĩa bổ sung cập nhật của WHO về kháng artemisinin 2018 có thể thấy 2 địa điểm nghiên cứu đều là vùng xác định kháng với artemisinin [67]. Điều này đặt ra vấn đề cấp thiết về tăng cường chương trình giám sát nhằm phát hiện sớm các trường hợp không đáp ứng điều trị, đồng thời tích cực chủ động kiểm soát để tránh lan truyền kháng thuốc sang khu vực lân cận.

Đột biến trên gen *pfK13* là một trong những đột biến chính liên quan đến tình trạng kháng artemisinin của ký sinh trùng sốt rét. Sự xuất hiện của đột biến này làm giảm khả năng tiêu diệt ký sinh trùng của các liệu pháp điều trị dựa trên artemisinin, bao gồm cả DHA-PPQ. Sự hiện diện của ký sinh trùng vào ngày D3 sau liệu trình điều trị bằng DHA-PPQ là một biểu hiện rõ ràng cho thấy sự suy giảm hiệu quả điều trị, vì theo phác đồ chuẩn, ký sinh trùng lẽ ra phải được loại bỏ hoàn toàn sau khi hoàn tất liệu trình. Nghiên cứu của tôi đã chỉ ra rằng tại Bình Phước và Đắc Nông (Việt Nam), 100% các trường hợp bệnh nhân dương tính với ký sinh trùng vào ngày D3 đều mang đột biến C580Y trên gen *pfK13*. Điều này chứng tỏ sự hiện diện của đột biến *pfK13* hay tình trạng kháng artemisinin này đã làm giảm hiệu quả của DHA-PPQ trong việc tiêu diệt ký sinh trùng, khiến cho liệu pháp điều trị này không còn khả năng kiểm soát tốt bệnh sốt rét như trước đây.

Trong trường hợp kháng artemisinin xuất hiện, tuy nhiên hiệu quả phác đồ điều trị vẫn có sự duy trì dưới sự hỗ trợ của thuốc phối hợp trong phác đồ. Nhìn chung, PPQ có thời gian bán thải tương đối dài (lên tới 42 ngày sau điều trị), thời gian bán thải dài này có lợi thế trong việc duy trì nồng độ thuốc trong máu ở mức điều trị trong một thời gian dài sau khi dùng thuốc, giúp tiêu diệt các ký sinh trùng sốt rét còn sót lại và ngăn ngừa tái phát bệnh.

Như vậy, kháng thuốc DHA-PPQ của *P. falciparum* là tình trạng khi ký sinh trùng không bị tiêu diệt hoàn toàn hoặc mất khả năng bị ức chế bởi sự kết hợp của hai thuốc này. Điều này thường liên quan đến sự phát triển các đột biến di truyền trong ký sinh trùng, như các đột biến liên quan đến kháng artemisinin. Tuy nhiên, một hiện tượng khác cũng cần được lưu ý là tăng sức chịu đựng của *P. falciparum* đối với DHA-PPQ, tức là ký sinh trùng có thể sống sót hoặc giảm độ nhạy cảm với thuốc mà không cần có đột biến di truyền rõ ràng. Tăng sức chịu đựng này có thể dẫn đến việc bệnh nhân vẫn có mật độ ký sinh trùng cao vào ngày thứ 3 sau khi điều trị, mặc dù không phát hiện các đột biến gen cụ thể. Các yếu tố có thể giải thích tình trạng này bao gồm việc thuốc không đủ liều hoặc thời gian tiếp xúc không đủ dài để tiêu diệt ký sinh trùng hoàn toàn, hoặc sự thay đổi sinh lý của ký sinh trùng khiến chúng có khả năng sống sót tốt hơn với thuốc. Điều này cho thấy rằng sự tăng sức chịu đựng của *P. falciparum* đối với DHA-PPQ có thể xảy ra mà không cần phải có sự thay đổi rõ rệt về gen, và hiện tượng này cần được theo dõi và nghiên cứu thêm để cải thiện hiệu quả điều trị và ngăn chặn sự lan rộng của tình trạng này.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi có 12 ca tái phát bệnh, tương đương tỉ lệ tái phát tích lũy 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 $p > 0,05$. Phân tích chỉ thị phân tử cho thấy 47,1% KST mang chỉ thị *pfpm2* và 81,3% KST mang chỉ thị E415G kháng PPQ. 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 Đắc 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, sự giảm hiệu quả điều trị tại các địa điểm nghiên cứu xuất phát từ tình trạng kháng cả hai thành phần trong phác đồ điều trị hiện hành tại 2 khu vực này.

Các nghiên cứu TES về thuốc DHA-PPQ trong giai đoạn 2010-2014 cho thấy hiệu quả điều trị vẫn duy trì ở mức trên 95%, dù tỷ lệ ký sinh trùng tồn tại vào ngày D3 đã tăng lên đến 36%. Tuy nhiên, vào năm 2015, một nghiên cứu tại Bình Phước cho thấy tỷ lệ thất bại điều trị đạt 10% sau khi sử dụng DHA-PPQ, và WHO đã xác nhận sự xuất hiện tình trạng kháng thuốc PPQ. Đến năm 2016, tình trạng thất bại khi điều trị bằng DHA-PPQ tiếp tục được ghi nhận tại Đắc Nông. Gần đây, các nghiên cứu cho thấy tình trạng thất

bại điều trị muộn và xuất hiện các đột biến liên quan đến kháng thuốc artemisinin và PPQ ở những khu vực lân cận, phản ánh rõ rệt dấu hiệu kháng thuốc. Trong giai đoạn 2016-2017, tỷ lệ thất bại điều trị muộn tại Đắk Nông và Bình Phước dao động từ 27% đến 56%. Ngoài ra, các nghiên cứu tại các huyện Krông Pa (Gia Lai), Krông Năng và Ea Kar (Đắk Lắk) cũng ghi nhận tỷ lệ cao các dấu hiệu kháng artemisinin và PPQ. Nghiên cứu TES năm 2019 cho thấy tỷ lệ thất bại điều trị muộn là 34% và 68% tại Gia Lai và Đắk Lắk, tương ứng [88].

Dựa trên một số nghiên cứu tiên hành tại khu vực miền Trung-Tây Nguyên, cụ thể là nghiên cứu đánh giá hiệu quả của thuốc DHA-PPQ đối với *P. falciparum* tại huyện Cư Jút, tỉnh Đắk Nông, cho thấy tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và loại bỏ ký sinh trùng đạt 100%, chứng tỏ hiệu lực của thuốc là rất cao. Tuy nhiên, khi đánh giá sau 12 giờ kể từ thời điểm sử dụng DHA-PPQ, tỷ lệ ký sinh trùng *P. falciparum* còn tồn tại vẫn được ghi nhận. Cụ thể, vào ngày D3, tỷ lệ ký sinh trùng tồn tại là 15,5%, sau đó giảm xuống còn 7,04% vào ngày D3 sau điều trị. Điều này chỉ ra rằng, mặc dù đã điều trị, ký sinh trùng vẫn có khả năng tồn tại, làm dấy lên nghi ngờ về tình trạng kháng thuốc tại khu vực này[88].

Các nghiên cứu tại các điểm ở Gia Lai cho thấy tình trạng đáp ứng tương tự như tại Bình Phước và Đắk Nông. Mặc dù khu vực này không giáp biên giới và không có sự giao lưu với Campuchia, nhưng vẫn xuất hiện dấu hiệu giảm hiệu quả lâm sàng với tỷ lệ KST ngày D3 có xu hướng tăng dần. Trong giai đoạn 2007-2008, tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và tiêu diệt KST đạt 100%, không ghi nhận KST tồn tại vào ngày D3. Tuy nhiên, đến năm 2010, tại xã Phú Thiện (tỉnh Gia Lai), tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và tiêu diệt KST chỉ còn 94,8%, trong khi tỷ lệ tồn tại KST ngày D3 tăng lên 11,7%. Năm 2010, 34 ca tại điểm Kon Chro cho thấy tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và tiêu diệt KST là 100% vào ngày D3, nhưng tỷ lệ tồn tại vào ngày D3 đã tăng lên 3%. Đặc biệt, tại huyện Krông Pa, tỷ lệ đáp ứng lâm sàng giảm dần và tỷ lệ tồn tại KST ngày D3 lần lượt là 23%, 26,4%, 44,2% và 29,4% [88].

Ngoài ra, một số nghiên cứu khác tại khu vực ven biển miền Trung như huyện Nam Trà My, Quảng Nam, với 89 ca nhiễm *P. falciparum*, cho thấy tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và tiêu diệt KST đạt 97,7%, nhưng tỷ lệ KST tồn tại vào ngày D3 vẫn lên đến 29,2%. Nghiên cứu tại huyện Khánh Vĩnh, Khánh Hòa,

từ năm 2011 trên 30 ca ghi nhận tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và KST đầy đủ là 100% và không có KST tồn tại vào ngày D3. Tuy nhiên, năm 2014, một nghiên cứu trên 46 ca cho thấy tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và tiêu diệt KST chỉ còn đạt 100% và tỷ lệ KST tồn tại vào ngày D3 là 17,4%. Đến năm 2016, nghiên cứu trên 29 ca cho thấy tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và tiêu diệt KST là 96,5%, và tỷ lệ KST tồn tại vào ngày D3 là 6,8% [88].

Song song với thử nghiệm TES đánh giá hiệu quả, nghiên cứu phân tử kháng thuốc cho thấy các mẫu tại Krông Năng, Đắk Lắk đều có 100% mang đột biến C580Y, biểu hiện khả năng kháng artemisinin rõ rệt. Đối với bản sao *pfpm2/3* 72% mẫu mang đột biến này phù hợp với chỉ điểm kháng PPQ, còn lại 28% số mẫu không kháng cả hai loại thuốc trên [89].

Các số liệu từ tỉnh Quảng Trị chỉ ra rằng một số mẫu có KST không mang bản sao của *pfpm2/3* nhưng vẫn có đột biến *pfK13* hoặc gia tăng bản sao gen *pfpm2/3* cùng đột biến không mang tính kháng V520I. Những trường hợp này được ghi nhận tại khu vực Tây Nguyên và cho thấy sự đa dạng về kiểu gen, mặc dù chúng không mang tính chất kháng thuốc rõ ràng khi điều trị bằng phác đồ phối hợp DHA và PPQ [89]. Khu vực Tuy Đức, Đắk Nông, tiếp giáp với Bình Phước và Campuchia, là nơi có tỷ lệ đột biến C580Y cao, tương đồng với các khu vực biên giới khác có sự lưu hành của kháng artemisinin. Đột biến C580Y khởi nguồn từ Pailin (Campuchia), sau đó lan rộng đến Champasack (Lào) và tiếp tục đến các khu vực biên giới của Việt Nam, bao gồm Bình Phước, Đắk Nông và các tỉnh lân cận. Bên cạnh đó, các đột biến như P574L hoặc V520I cũng xuất hiện nhưng với tần suất thấp hơn. Tình trạng kháng DHA-PPQ chủ yếu liên quan đến đột biến *pfK13* và sự gia tăng bản sao *pfpm2* tại khu vực miền Trung và Tây Nguyên, và tiếp tục lan rộng ra biên giới Campuchia [89]. Tại các tỉnh như Quảng Nam, Đắk Lắk, và Thừa Thiên Huế, tỷ lệ đột biến C580Y đã ghi nhận ở 50% số mẫu có biểu hiện kháng DHA-PPQ và KST có sự gia tăng bản sao *pfpm2*. Điều này phản ánh sự gia tăng của kháng thuốc trong khu vực và xu hướng lan rộng đến các tỉnh phía Nam Việt Nam [89].

Theo nghiên cứu của Tạ Thị Tĩnh (2017), so sánh phác đồ điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* giữa DHA-PPQ và AS-PY cho thấy cả hai đều có khả năng làm sạch KST thể vô tính với thời gian cắt KST trung bình lần lượt là 56 giờ và 60 giờ ($p = 0,20$). Tại thời điểm 108 giờ sau điều trị,

cả hai phác đồ đều đạt hiệu quả lam máu sạch KST hoàn toàn. Mặc dù tại thời điểm 24 giờ, phác đồ DHA-PPQ có tỷ lệ giảm KST cao hơn so với AS-PY ($p = 0,02$), nhưng sự khác biệt này không duy trì ở các thời điểm 48 giờ và 72 giờ, khi cả hai phác đồ cho kết quả tương đương nhau [123].

Tỷ lệ bệnh nhân còn dương tính với KST vào ngày D3 của phác đồ DHA-PPQ là 21%, cao hơn một chút so với phác đồ AS-PY (18,6%), tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Về tỷ lệ chữa khỏi, phác đồ AS-PY cho thấy hiệu quả vượt trội hơn với tỷ lệ đạt 97,9%, trong khi phác đồ DHA-PPQ chỉ đạt 78,7% ($p = 0,048$). Ngoài ra, số lượng bệnh nhân tái phát sau điều trị với phác đồ AS-PY ít hơn (dưới 5 trường hợp) so với phác đồ DHA-PPQ (11 trường hợp tái phát). Kết quả này chỉ ra rằng phác đồ AS-PY có khả năng kiểm soát tái phát và ngăn ngừa tái nhiễm KST tốt hơn so với phác đồ DHA-PPQ. Đặc biệt, tỷ lệ tái phát sau 3 ngày điều trị liên tiếp của AS-PY thấp hơn đáng kể, cho thấy phác đồ này có khả năng ngăn ngừa nguồn bệnh tái phát hiệu quả hơn. Ở ngày D3 và D7 sau điều trị, tỷ lệ tái phát của phác đồ AS-PY thấp hơn 5,6 lần so với DHA-PPQ ($p < 0,05$) [123]. Như vậy, AS-PY được chứng minh là một phác đồ điều trị hiệu quả hơn trong việc kiểm soát tái phát KST so với DHA-PPQ tại thời điểm đánh giá. Tuy nhiên do DHA-PPQ đã được sử dụng trong điều trị sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* tại Việt Nam trong một thời gian dài dẫn tới sự hình thành các chủng KST kháng artemisinin, PPQ và kết quả giảm hiệu quả điều trị sốt rét so với phác đồ khác.

Theo hướng dẫn của WHO, ngưỡng tỉ lệ thất bại điều trị trong điều trị sốt rét được đặt ra như một chỉ số quan trọng trong việc đánh giá và quyết định chính sách điều trị [12]. Cụ thể, WHO khuyến nghị rằng nếu tỉ lệ thất bại điều trị sốt rét vượt quá 10% trong một nghiên cứu tuân thủ theo protocol của WHO thì hướng dẫn điều trị quốc gia nên được xem xét để thay đổi [26]. Thêm vào đó, ngay cả khi tỉ lệ thất bại điều trị dưới 10% nhưng nếu có sự tăng đột biến rõ ràng trong tỉ lệ thất bại, việc thay đổi chính sách điều trị cũng nên được cân nhắc [26]. Ngoài ra, các thuốc điều trị sốt rét được chọn lựa nên có tỉ lệ chữa bệnh về mặt ký sinh trùng học lớn hơn 95% để đảm bảo hiệu quả điều trị cao. Những nguyên tắc này giúp đảm bảo rằng liệu pháp điều trị sốt rét được cập nhật liên tục để phản ánh tình hình kháng thuốc hiện tại, nhằm cung cấp điều trị hiệu quả và an toàn nhất cho bệnh nhân. Nhìn chung với dự

liệu về kháng thuốc và hiệu quả điều trị trên đều cho thấy sự thay thế phác đồ điều trị sốt rét *P. falciparum* nên được xem xét.

Trong khi đó, DHA-PPQ đã chứng tỏ có hiệu quả gần như hoàn hảo trong các thử nghiệm lâm sàng được thực hiện ở châu Phi [47, 115]. Tại Châu Phi, kết quả cho thấy DHA-PPQ có tỉ lệ chữa khỏi cao nhất trong các phác đồ ACT, đạt 99,8% vào ngày 28 và 99,6% vào ngày 42 [46]. So với các phác đồ khác như AL và AS-AQ. Phác đồ DHA-PPQ vượt trội về tỉ lệ thành công với AL đạt 96,8% và AS-AQ đạt 96,3% vào ngày 28. Ngoài ra, DHA-PPQ cũng có tỉ lệ phản ứng phụ thấp nhất, chỉ 1,8% so với 6,9% đối với AL và 4,4% đối với AS-AQ [46].

Nghiên cứu giai đoạn 2011 - 2016 đã thu nhận 4.710 bệnh nhân, trong đó 1.282 bệnh nhân thuộc nhóm DHA-PPQ và 3.428 bệnh nhân thuộc nhóm điều trị đối chứng tại 7 quốc gia châu Phi (như Burkina Faso, Guinea, Mali) tập trung vào đối tượng nhiễm KST *P. falciparum* với mật độ từ 0 - 200.000/ μ L máu. Các bệnh nhân được phân ngẫu nhiên vào nhóm sử dụng phác đồ DHA-PPQ hoặc các phác đồ so sánh khác như AS-AM, AL. Tất cả các phác đồ đều cho thấy hiệu quả tương đương nhau trong việc giảm triệu chứng sốt trong 3 ngày đầu, với tỷ lệ bệnh nhân khỏi bệnh được đánh giá vào các thời điểm D0, D1, D2, D3, D7, D14, D21, D28 và D42 [124]. Ngoài ra, tỷ lệ điều trị AS-AM (95,9%), không có sự khác biệt đáng kể ($p > 0,05$). Tuy nhiên, tỷ lệ tái phát sau điều trị của DHA-PPQ thấp hơn rõ rệt so với AL vào thời điểm D42 và D28. Ngoài ra, tỷ lệ âm tính với KST khi đánh giá bằng phương pháp PCR của DHA-PPQ đạt 99,5% so với 81,6% của AL [124].

Những kết quả này khẳng định rằng DHA-PPQ là một lựa chọn tối ưu trong điều trị sốt rét không biến chứng tại Châu Phi, với hiệu quả điều trị vượt trội và khả năng dung nạp tốt, góp phần duy trì hiệu quả điều trị và phòng ngừa sự phát triển của kháng thuốc sốt rét [124].

Ngoài ra, kể từ năm 2017, Sudan đã cập nhật chính sách điều trị sốt rét, ngoài AL làm phác đồ điều trị hàng đầu và DHA-PPQ làm phác đồ điều trị thứ hai, phác đồ DHA-PPQ cũng cho thấy hiệu quả rất cao với tỉ lệ thành công điều trị đạt 99,1% (95%CI: 97,5–100%) [47].

Nghiên cứu của chúng tôi đã chỉ ra sự tương đồng với các báo cáo trước đó, cho thấy hiệu lực điều trị của DHA-PPQ đang giảm dần theo thời gian. Bên cạnh đó, tỷ lệ bệnh nhân vẫn còn dương tính với ký sinh trùng sốt

rét vào ngày thứ 3 sau điều trị cũng có xu hướng gia tăng. Kết quả phân tích chỉ thị phân tử đã củng cố thêm bằng chứng về tình trạng kháng artemisinin và PPQ tại khu vực nghiên cứu, cho thấy khả năng kháng thuốc đang lan rộng tại Việt Nam.

Sự suy giảm hiệu quả điều trị của DHA-PPQ là hệ quả trực tiếp của tình trạng kháng thuốc. Điều này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc theo dõi sát sao tình trạng kháng thuốc thông qua những biến đổi di truyền và đánh giá sự thay đổi trong khả năng tác động của các loại thuốc như artemisinin và PPQ. Những dữ liệu này đóng vai trò quan trọng trong việc định hướng và đưa ra các quyết định quản lý điều trị sốt rét, đặc biệt trong bối cảnh kháng thuốc đang trở thành một thách thức nghiêm trọng.

Nghiên cứu này giúp các nhà khoa học và quản lý y tế có cơ sở để đánh giá lại hiệu quả của phác đồ điều trị hiện tại và xác định xem có cần thay đổi hoặc điều chỉnh liệu trình điều trị nhằm đối phó hiệu quả với tình trạng kháng thuốc hay không. Việc nắm rõ sự thay đổi trong tính kháng thuốc sẽ là chìa khóa để duy trì hiệu quả điều trị và kiểm soát sốt rét bền vững trong tương lai

4.3. 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*

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.

Khi phân tích một số đặc điểm về gen trên nhóm bệnh nhân dương tính KST cho thấy tất cả các bệnh nhân dương tính với ký sinh trùng vào ngày thứ ba sau điều trị đều mang đột biến C580Y trên gen *pfK13*. Điều này cho thấy rằng sự xuất hiện của đột biến C580Y trên gen *pfK13* đã làm giảm khả năng tiêu diệt ký sinh trùng của DHA-PPQ.

Ngoài ra, khi phân tích đặc điểm biến đổi di truyền trên nhóm bệnh nhân thất bại điều trị cho thấy nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng sốt rét đột biến C580Y trên gen *pfK13* có tỉ lệ điều trị thất bại cao hơn (51,2%) so với nhóm bệnh nhân không mang đột biến *pfK13*. Tỷ lệ này là 55% ở nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng >1 bản sao gen *pfpm2* so với nhóm có 1 bản sao (41,7%). Tương tự, nhóm bệnh nhân có KST mang đột biến E415G có tỉ lệ điều trị thất bại cao hơn (41,9%) so với nhóm kiểu dại (25%).

Các chỉ số trên cho thấy rằng bệnh nhân mang KST có các đột biến *pfK13* C580Y, E415G hoặc nhiều bản sao *pfpm2* đều có xu hướng thất bại điều trị cao hơn so với bệnh nhân không mang các đột biến này. Sự suy giảm hiệu quả điều trị của DHA-PPQ liên quan tới sự biến đổi di truyền trên các gen kháng thuốc khi sử dụng mô hình hồi quy phân tích, cụ thể như sau:

Kết quả phân tích sau khi hiệu chỉnh bằng các đặc điểm nhân trắc cho thấy nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng sốt rét chứa đột biến số lượng bản sao gen *pfpm2* và C580Y trên *pfK13* có mối liên quan với tình trạng điều trị thất bại, cụ thể, sau hiệu chỉnh 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 sốt rét chứa đột biến số lượng bản sao gen $pfpm2 > 1$ bản sao và E415G trên *pfEXO* có mối liên quan với tình trạng điều trị thất bại, cụ thể, sau hiệu chỉnh cho thấy OR tăng lên tới 8,12 lần, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Nhóm bệnh nhân mang ký sinh trùng sốt rét chứa 3 đột biến trên gen *pfpm2*, *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 $p < 0,05$.

Trong nghiên cứu hiện đại, phương pháp BMA là một công cụ hiệu quả trong tiên đoán hiệu quả điều trị và đánh giá nguy cơ thất bại điều trị sốt rét dựa trên các biến đổi di truyền ở các gen như *pfK13*, *pfpm2*, và *pfEXO*. Đây là các gen có liên quan đến khả năng kháng artemisinin và các dẫn xuất của nó, những loại thuốc chính trong điều trị sốt rét hiện nay. Việc sử dụng BMA trong lĩnh vực này giúp xử lý bất định về mô hình, vì sự kháng thuốc thường liên quan đến nhiều yếu tố di truyền và cách kết hợp của chúng. Một mô hình BMA có thể được sử dụng để tích hợp dữ liệu di truyền từ các biến đổi trên *pfK13*, *pfpm2*, và *pfEXO* với các yếu tố khác như đáp ứng lâm sàng và đặc điểm thể trạng của bệnh nhân. Thay vì dựa vào một mô hình duy nhất để dự đoán hiệu quả điều trị, BMA kết hợp tất cả các mô hình tiềm năng bằng cách tính toán trọng số dựa trên xác suất hậu nghiệm của từng mô hình. Điều này giúp xác định mức độ đóng góp của từng biến đổi gen hoặc tổ hợp gen vào khả năng kháng thuốc và hiệu quả điều trị.

Dựa trên phân tích các chỉ số đánh giá (R^2 , BIC, và xác suất hậu định) từ bảng 3.34, mô hình 1 được lựa chọn là mô hình tốt nhất để dự đoán thất bại điều trị sốt rét. Mô hình này chỉ sử dụng gen *pfK13* C580Y với hệ số là 0,58,

cho thấy vai trò quan trọng của yếu tố này trong việc giải thích nguy cơ kháng thuốc artemisinin. Mô hình 1 có BIC thấp nhất (-2,7), xác suất hậu định cao nhất (39,2%), và R^2 đạt 0,18, đủ để cung cấp dự đoán đáng tin cậy với cấu trúc đơn giản. Mô hình 1, được đánh giá là tốt nhất trong việc dự đoán thất bại điều trị sốt rét, mang ý nghĩa quan trọng trong công tác phòng chống bệnh, đặc biệt trong bối cảnh gia tăng kháng thuốc. Với việc chỉ sử dụng gen *pfK13* C580Y, mô hình này đơn giản, dễ triển khai, nhưng vẫn cung cấp thông tin quan trọng về nguy cơ kháng artemisinin – loại thuốc chủ chốt trong liệu pháp phối hợp điều trị sốt rét. Nhờ khả năng dự đoán hiệu quả điều trị đáng tin cậy, mô hình hỗ trợ các cơ quan y tế trong việc phát hiện sớm các khu vực xuất hiện kháng thuốc, từ đó kiểm soát sự lan rộng của tình trạng này. Đồng thời, tính đơn giản của mô hình giúp tối ưu hóa nguồn lực, giảm chi phí xét nghiệm, và tăng khả năng tiếp cận tại các vùng lưu hành sốt rét có điều kiện hạn chế. Ngoài ra, mô hình cũng cung cấp dữ liệu quan trọng để hỗ trợ hoạch định chiến lược điều trị, cho phép điều chỉnh kịp thời liệu pháp phù hợp khi tỷ lệ đột biến *pfK13* tăng cao. Tuy nhiên, mô hình này chưa bao gồm các yếu tố bổ sung như *pfpm2* hoặc *pfEXO*, vốn đóng vai trò trong các trường hợp thất bại điều trị phức tạp hơn, đặc biệt khi sử dụng liệu pháp phối hợp. Dù vậy, với tính hiệu quả và khả năng áp dụng thực tiễn, mô hình 1 vẫn là công cụ quan trọng trong giám sát kháng thuốc, góp phần giảm gánh nặng sốt rét và cải thiện hiệu quả phòng chống bệnh trên toàn cầu.

Trong khi đó, mô hình 2, với sự kết hợp của gen *pfK13* C580Y và *pfpm2* (>1 bản sao), đóng vai trò quan trọng trong công tác phòng chống sốt rét, đặc biệt trong bối cảnh kháng thuốc liên quan đến liệu pháp ACT. Mô hình này cải thiện khả năng dự đoán nguy cơ thất bại điều trị so với mô hình 1, khi đạt R^2 là 0,253 (so với 0,18 ở mô hình 1), nghĩa là nó giải thích được 25,3% sự biến đổi trong hiệu quả điều trị. Sự bổ sung gen *pfpm2* làm tăng khả năng phát hiện nguy cơ kháng PPQ, một loại thuốc thường được kết hợp với artemisinin trong điều trị sốt rét. Điều này đặc biệt hữu ích tại các khu vực lưu hành sốt rét nặng, nơi mà thất bại điều trị ACT có thể là mối đe dọa nghiêm trọng.

Vai trò của mô hình 2 trong phòng chống sốt rét nằm ở khả năng hỗ trợ giám sát đồng thời cả kháng artemisinin (thông qua *pfK13*) và kháng PPQ (thông qua *pfpm2*). Việc này giúp các cơ quan y tế nhanh chóng phát hiện và

quản lý các trường hợp kháng thuốc phức tạp hơn. Ngoài ra, mô hình 2 còn cung cấp thông tin quan trọng cho việc xây dựng các chiến lược thay thế thuốc, đặc biệt khi sự kết hợp của các liệu pháp phối hợp không còn hiệu quả. Tuy nhiên, mô hình này cũng có một số hạn chế. BIC của mô hình 2 cao hơn (-2,17 so với -2,7 của mô hình 1), cho thấy chi phí phức tạp của việc bổ sung thêm biến số *pfpm2*. Xác suất hậu định của mô hình 2 (29,7%) cũng thấp hơn mô hình 1 (39,2%), điều này chỉ ra rằng mức độ tin cậy của mô hình thấp hơn một chút. Ngoài ra, việc xét nghiệm *pfpm2* yêu cầu nhiều nguồn lực hơn, khiến mô hình 2 khó triển khai ở các khu vực có nguồn lực hạn chế. Tóm lại, mô hình 2 có vai trò quan trọng trong các chương trình giám sát kháng thuốc và quản lý điều trị sốt rét, đặc biệt ở những nơi mà kháng piperaquine và artemisinin đang gia tăng. Tuy nhiên, mô hình này phù hợp hơn với bối cảnh nghiên cứu chuyên sâu hoặc tại các vùng có nguồn lực đủ để thực hiện các xét nghiệm phức tạp hơn. Sự kết hợp giữa mô hình 1 và mô hình 2 có thể tạo nên một công cụ toàn diện, cân bằng giữa tính đơn giản, chi phí và hiệu quả trong phòng chống sốt rét.

Điểm đáng lưu ý, mặc dù đột biến E415G thuộc gen *pfEXO* có thể được sử dụng như một chỉ điểm trong theo dõi kháng PPQ, nhưng nó không đóng vai trò quan trọng trong việc dự đoán hiệu quả điều trị sốt rét. Trong các mô hình phân tích, E415G chỉ xuất hiện ở mô hình 4 và 5 với hệ số hồi quy thấp (0,07 và 0,09), cho thấy tác động rất nhỏ đến khả năng thất bại điều trị. Điều này chỉ ra rằng đột biến E415G chủ yếu mang tính hỗ trợ, không có sức ảnh hưởng lớn như các yếu tố chính như *pfK13* C580Y hoặc *pfpm2* (>1 bản sao). R^2 của các mô hình có E415G (18,3% ở mô hình 4 và 25,8% ở mô hình 5) chỉ tăng nhẹ so với các mô hình không có đột biến này, nhưng lại đi kèm với BIC cao hơn và xác suất hậu định thấp hơn, làm giảm tính thực tiễn. Do đó, mặc dù E415G có thể cung cấp thông tin bổ sung về cơ chế kháng thuốc, nó không đủ mạnh để được sử dụng độc lập hoặc làm yếu tố chính trong việc dự đoán hiệu quả điều trị. Thay vào đó, các chỉ điểm khác như *pfK13* và *pfpm2* vẫn là lựa chọn tối ưu trong giám sát và quản lý sốt rét.

Tuy nhiên mô hình có hạn chế như các mô hình có giá trị hệ số chặn khác nhau, với giá trị từ 0,00 đến -0,27, phản ánh sự thay đổi trong giá trị cơ bản của biến kết quả (thất bại điều trị) khi không có đột biến gen nào hiện diện. Mô hình 1 có hệ số chặn bằng 0,00, trong khi mô hình 2 có hệ số chặn

âm (-0,16), cho thấy sự thay đổi của kết quả điều trị giữa các mô hình là không đồng nhất. Điều này có thể ảnh hưởng đến khả năng so sánh và áp dụng các mô hình trong thực tế, đặc biệt là khi không có đột biến gen nào được xét đến. Mô hình 3 chỉ sử dụng 0 biến (không có đột biến gen nào được đưa vào), điều này có thể làm giảm khả năng giải thích sự biến thiên của kết quả điều trị. Trong khi đó, mô hình 1, 4, và 5 sử dụng 1 hoặc 2 biến, điều này có thể khiến cho các mô hình này không phản ánh hết được các yếu tố khác có thể ảnh hưởng đến kết quả điều trị. Việc hạn chế số lượng biến có thể làm giảm tính tổng quát và độ chính xác của mô hình. Giá trị R^2 trong các mô hình chỉ dao động từ 0 đến 0,258, cho thấy mô hình chỉ giải thích một phần nhỏ sự biến thiên của kết quả điều trị. Mặc dù mô hình 2 có R^2 cao nhất (0,253), nhưng vẫn còn một lượng lớn sự biến thiên chưa được giải thích. Điều này chỉ ra rằng có thể còn những yếu tố quan trọng khác ngoài các đột biến gen được xét đến trong mô hình, chưa được đưa vào phân tích, làm giảm khả năng dự đoán và tổng quát của mô hình.

Tuy nhiên, mô hình này vẫn được chấp nhận và sử dụng trong nghiên cứu vì mô hình vẫn cung cấp cái nhìn rõ ràng về sự ảnh hưởng của các đột biến gen, như *pfK13* và *pfpm2*, đến kết quả điều trị, qua đó đóng góp vào việc hiểu rõ hơn cơ chế kháng thuốc của ký sinh trùng sốt rét. Hơn nữa, mặc dù xác suất hậu định thấp ở một số mô hình, nhưng mô hình 1 với xác suất hậu định cao nhất (0,392) vẫn cho thấy giá trị trong việc dự đoán kết quả điều trị và hỗ trợ ra quyết định lâm sàng. Do đó, mặc dù có một số hạn chế, mô hình vẫn là công cụ hữu ích trong việc nghiên cứu và dự đoán hiệu quả điều trị, đồng thời mở ra hướng phát triển cho các nghiên cứu tiếp theo.

Trong thực tế, dòng ký sinh trùng nổi tiếng mang dạng đột biến trên phổ biến tại GMS được gọi là dòng phối hợp KEL1/PLA1 đóng vai trò quan trọng trong hiệu quả điều trị của thuốc DHA-PPQ [7, 82, 87, 103]. Sự xuất hiện của dòng này liên quan mật thiết đến sự kháng DHA-PPQ, khi mà ký sinh trùng thuộc dòng này có khả năng sống sót và tiếp tục phát triển ngay cả khi được điều trị bằng DHA-PPQ. Điều này dẫn đến thất bại trong điều trị và góp phần vào sự lan rộng của sốt rét kháng thuốc trong khu vực. Dòng phối hợp KEL1/PLA1 đóng vai trò quan trọng trong việc kháng DHA-PPQ, làm giảm hiệu quả của thuốc này trong điều trị sốt rét và gây ra những thách thức lớn cho việc kiểm soát và loại trừ bệnh sốt rét trong khu vực [87, 103].

Nhìn chung, 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* [5]. 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 [5].

Bốn đột biến trong gen *pfCRT* (T93S, H97Y, F145I, và I218F) cũng liên quan mạnh mẽ đến thất bại điều trị, Cụ thể, HR cho các đột biến T93S, T93S, F145I, và I218F) lần lượt là 2,713 ($p = 0,004$); 1,923 ($p = 0,034$); 2,353 ($p = 0,009$), và 2,167 ($p = 0,015$), cho thấy các đột biến này thay đổi cấu trúc của protein CRT, làm giảm khả năng của PPQ trong việc tiêu diệt ký sinh trùng, Đặc biệt, đột biến F145I còn liên quan đến nồng độ PPQ cao hơn trong huyết tương vào thời điểm ban đầu và ngày thứ 7, cho thấy nó có thể làm giảm tốc độ thải loại thuốc và tăng khả năng kháng thuốc [5].

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 *pfCRT*. Mô hình hồi quy đa biến cho thấy rằng tình trạng nhân đôi *pfpm2/3* 3 và các đột biến trên gen *pfCRT* 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 [5].

Trong nghiên cứu của Witkowski và cộng sự về hiệu quả của điều trị bằng DHA-PPQ đối với 725 bệnh nhân sốt rét tại Campuchia, các kết quả quan trọng đã được ghi nhận [15]. Trong số 443 bệnh nhân mang đột biến *pfK13*, có 116 bệnh nhân (26,2%) thất bại trong điều trị bằng DHA-PPQ vào ngày 42. Ngược lại, chỉ có 3 bệnh nhân (1,1%) trong số 282 bệnh nhân không

mang đột biến này gặp thất bại trong điều trị. Điều này cho thấy sự hiện diện của đột biến *pfK13* có liên quan mạnh mẽ đến việc thất bại trong điều trị, với tỉ lệ nguy cơ tương đối (RR) là 24,6 [95%CI 7,9-76,7], $p < 0,0001$ [15].

Một bản sao của gen *pfmdr1* được phát hiện trong 610 mẫu bệnh phẩm (chiếm 84,1%) trên tổng số 725 mẫu. Trong số các bệnh nhân mang ký sinh trùng có một bản sao *pfmdr1*, có 112 trường hợp (18,4%) thất bại trong điều trị DHA-PPQ. Ngược lại, trong số 115 bệnh nhân mang ký sinh trùng có nhiều bản sao *pfmdr1*, chỉ có 7 trường hợp (6,1%) gặp thất bại trong điều trị. Tỉ lệ RR là 3,0 [95%CI 1,4-6,3], với $p = 0,003$ [15].

Sau khi hiệu chỉnh các yếu tố đột biến *pfK13* và gen *pfmdr1*, số bản sao *pfpm2* vẫn là chỉ số phân tử quan trọng nhất liên quan đến thất bại điều trị DHA-PPQ với HR hiệu chỉnh (aHR) là 20,4 [95%CI 9,1-45,5], $p < 0,0001$. Tỉ lệ thất bại tích lũy của điều trị DHA-PPQ trong các bệnh nhân mang ký sinh trùng kháng artemisinin (có đột biến *pfK13*) tăng đáng kể khi số bản sao *pfpm2* tăng lên. Cụ thể, so với các bệnh nhân không có bản sao *pfpm2*, những bệnh nhân có từ hai bản sao trở lên có nguy cơ thất bại điều trị cao hơn 3,3 lần ([95%CI 1,8-6,0]) [15]. Như vậy, theo nghiên cứu của Witkowski và cộng sự, số bản sao *pfpm2* vẫn là chỉ số quan trọng liên quan đến thất bại điều trị DHA-PPQ. Điều này có nghĩa là sự gia tăng số bản sao *pfpm2* là một yếu tố dự báo độc lập và mạnh mẽ về thất bại điều trị, không bị ảnh hưởng bởi sự hiện diện của đột biến *pfK13* hoặc gen *pfmdr1* [15].

Nghiên cứu của Amato và cộng sự đã chỉ ra rằng các chỉ thị phân tử kháng PPQ có thể dự đoán hiệu quả điều trị bằng DHA-PPQ [16]. Đầu tiên là đột biến E415G, một biến thể di truyền gây ra thay đổi trong gen *pfEXO*. Các mẫu mang đột biến này chỉ có tỉ lệ sống sót sau 63 ngày điều trị là 38%, so với 93% ở các mẫu không mang đột biến này. Thứ hai là sự khuếch đại gen *pfpm2*, các mẫu mang sự khuếch đại này có tỉ lệ sống sót sau 63 ngày điều trị là 41%, so với 95% ở các mẫu không có sự khuếch đại này [16]. Thêm vào đó, kết quả nghiên cứu cho thấy rằng các đột biến E415G và sự gia tăng số bản sao *pfpm2* liên quan đến việc tăng nồng độ IC_{50} của PPQ và tỉ lệ sống sót cao hơn trong xét nghiệm PSA, điều này có ảnh hưởng trực tiếp đến sự tái phát của ký sinh trùng sau khi điều trị bằng DHA-PPQ. Trong 241 mẫu có dữ liệu lâm sàng, 133 mẫu mang đột biến E415G và sự gia tăng số bản sao *pfpm2* có tỉ lệ tái phát ký sinh trùng cao hơn nhiều. Chỉ số nguy cơ điều chỉnh của tái

phát ký sinh trùng là 13,4 lần (95%CI: 5,3-33,5) đối với đột biến E415G và 16,7 lần (95%CI: 5,8-48,1) đối với sự gia tăng số bản sao *pfpm2*. Ngay cả khi chỉ xét các mẫu mang đột biến *pfK13*, chỉ số aHR của sự gia tăng số bản sao *pfpm2* vẫn có ý nghĩa ($p=8,6 \times 10^{-3}$, aHR=5,2, 95%CI: 1,5-17,7), cho thấy sự gia tăng số bản sao *pfpm2* có thể độc lập ảnh hưởng đến kháng PPQ và gây thất bại điều trị [16].

Như vậy, các biến đổi di truyền trên các gen kháng thuốc của ký sinh trùng sốt rét có thể được sử dụng như chỉ thị phân tử cho thất bại điều trị, từ đó phát triển các phương pháp điều trị hiệu quả hơn và chiến lược kiểm soát bệnh tốt hơn. Việc hiểu rõ các biến đổi di truyền này cũng hỗ trợ trong việc thiết kế các thử nghiệm lâm sàng và phát triển các thuốc mới nhằm đối phó với các chủng ký sinh trùng kháng thuốc.

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*.
 - Trong đó, đột biến C580Y trên gen *pfK13* chiếm 91,3% và phổ biến nhất ở cả 4 tỉnh nghiên cứu.
 - Trên gen *pfpm2*, có số lượng bản sao tăng cao (51,0%).
 - Đột biến E415G trên *pfEXO* chiếm 76,1% trên tổng số mẫu nghiên cứu.
 - 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*.
 - 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%.
 - 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*.
 - Các yếu tố về nhân khẩu học như độ tuổi, giới tính và thể trạng bệnh nhân và địa điểm nghiên cứu không ảnh hưởng tới kết quả điều trị
 - 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 từ 7,71 đến 8,12 lần so với bệnh nhân có ký sinh trùng không mang đột biến.

KIẾN NGHỊ

Tăng cường theo dõi các đột biến di truyền của ký sinh trùng sốt rét, đặc biệt là các đột biến trên các gen *pfpm2*, *pfEXO*, và *pfK13*. Điều này có thể bao gồm việc triển khai các chương trình giám sát di truyền trên diện rộng để xác định sự phân bố và tần suất của các đột biến này.

Đánh giá ảnh hưởng của di dân và giao lưu giữa các vùng miền là nhân tố và nguy cơ lây lan kháng thuốc sốt rét, đặc biệt với ký sinh trùng sốt rét *P. falciparum*.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ 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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M. Fikadu and E. Ashenafi, 2023, Malaria: An Overview, *Infectious Drug Resistance*, 16,3339-3347
2. N.J. White, J. Farrar, et al., 2024, *Manson's Tropical Diseases Chapter 49 - Malaria*, in *Manson's Tropical Diseases (Twenty-Fourth Edition)*, Elsevier: Philadelphia (PA). p. 569-617.
3. WHO, 2023, *WHO guidelines for malaria treatment*, World Health Organization.
4. C. Amaratunga, P. Lim, S. Suon, S. Sreng, S. Mao, C. Sopha, B. Sam, D. Dek, V. Try, R. Amato, D. Blessborn, L. Song, G.S. Tullo, M.P. Fay, J.M. Anderson, J. Tarning, and R.M. Fairhurst, 2016, Dihydroartemisinin-piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a multisite prospective cohort study, *Lancet Infectious Disease*, 16(3),357-365
5. R.W. van der Pluijm, M. Imwong, N.H. Chau, N.T. Hoa, N.T. Thuy-Nhien, N.V. Thanh, P. Jittamala, B. Hanboonkunupakarn, K. Chutasmit, et al, 2019, Determinants of dihydroartemisinin-piperaquine treatment failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia, Thailand, and Vietnam: a prospective clinical, pharmacological, and genetic study, the *Lancet Infectious Disease*, 19(9),952-961
6. N.V. Thanh, N. Thuy-Nhien, N.T. Tuyen, N.T. Tong, N.T. Nha-Ca, L.T. Dong, H.H. Quang, J. Farrar, G. Thwaites, N.J. White, M. Wolbers, and T.T. Hien, 2017, Rapid decline in the susceptibility of *Plasmodium falciparum* to dihydroartemisinin-piperaquine in the south of Vietnam, *Malaria Journal*, 16(1),27
7. M. Imwong, T.T. Hien, N.T. Thuy-Nhien, A.M. Dondorp, and N.J. White, 2017, Spread of a single multidrug resistant malaria parasite lineage (*PfPailin*) to Vietnam, *The Lancet Infectious Disease* 17(10),1022-1023
8. WHO, 2018, *Strategy for malaria elimination in the greater melong subregion (2015-2030)*: World Health Organization.
9. M.M. Ippolito, K.A. Moser, J.B. Kabuya, C. Cunningham, and J.J. Juliano, 2021, Antimalarial Drug Resistance and Implications for the

- WHO Global Technical Strategy, *Current Epidemiology Reports*, 8(2),46-62
10. J. Chhibber-Goel and A. Sharma, 2019, Profiles of Kelch mutations in *Plasmodium falciparum* across South Asia and their implications for tracking drug resistance, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 11,49-58
 11. M.C. Pau, A. Pantaleo, I. Tsamesidis, H. Hoang, A. Tuan Tran, T.L. Hanh Nguyen, T.H. Giang Phan, P.A. Ton Nu, T.M. Chau Ngo, G. Marchetti, E. Schwarzer, P.L. Fiori, P.S. Low, C. Dinh Huynh, and F.M. Turrini, 2019, Clinical impact of the two ART resistance markers, K13 gene mutations and DPC3 in Vietnam, *PLoS One*, 14(4),e0214667
 12. WHO, 2019, *Report on antimalarial drug efficacy, resistance and response: 10 years of surveillance (2010-2019)*, World Health Organization.
 13. M.R. Ansbro, C.G. Jacob, R. Amato, M. Kekre, C. Amaratunga, S. Sreng, S. Suon, O. Miotto, R.M. Fairhurst, T.E. Wellems, and D.P. Kwiatkowski, 2020, Development of copy number assays for detection and surveillance of piperazine resistance associated plasmepsin 2/3 copy number variation in *Plasmodium falciparum*, *Malaria Journal*, 19(1),181
 14. Huynh Hong Quang and M. Chavchich, 2021, Multidrug-Resistant *Plasmodium falciparum* Parasites in the Central Highlands of Vietnam Jeopardize Malaria Control and Elimination Strategies, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 65 (4):10.1128/aac.01639-20.
 15. B. Witkowski, V. Duru, N. Khim et al , 2017, A surrogate marker of piperazine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria: a phenotype-genotype association study, *Lancet Infectious Disease*, 17(2),174-183
 16. R. Amato, P. Lim, O. Miotto, C. Amaratunga, D. Dek, R.D. Pearson, J. Almagro-Garcia, A.T. Neal, S. Sreng, S. Suon, E. Drury, D. Jyothi, J. Stalker, D.P. Kwiatkowski, and R.M. Fairhurst, 2017, Genetic markers associated with dihydroartemisinin-piperazine failure in *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: a genotype-phenotype association study, *The Lancet Infectious Disease*, 17(2),164-173

17. N. Boonyalai, B.A. Vesely, C. Thamnurak, C. Praditpol et al , 2020, Piperazine resistant Cambodian *Plasmodium falciparum* clinical isolates: in vitro genotypic and phenotypic characterization, *Malaria Journal*, 19(1),269
18. Huỳnh Hồng Quang, Nguyễn Thanh Thùy Nhiên, Châu Văn Khánh, Bùi Quang Phúc, Nguyễn Thị Minh Trinh, Nguyễn Thị Liên Hạnh, Trần Thanh Sơn, 2021, Chỉ điểm phân tử kháng thuốc sốt rét trên các phân lập *Plasmodium falciparum*: Một nghiên cứu quan sát tại Đắk Lắk từ 2017-2020, *Tạp Chí truyền nhiễm Việt Nam*,21-31
19. Viện sốt rét, ký sinh trùng, côn trùng Trung ương, 2022, *Báo cáo đánh giá công tác 2021, triển khai kế hoạch phòng chống và loại trừ sốt rét 2022*: Viện sốt rét, ký sinh trùng, côn trùng Trung ương, Hà Nội.
20. Bộ Y Tế, 2023, *Quyết định số 3377/QĐ-BYT về việc ban hành Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị sốt rét*, Bộ Y Tế, Hà Nội.
21. S. Sato, 2021, *Plasmodium*—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology, *Journal of Physiological Anthropology*, 40(1),1
22. WHO, 2023, *World malaria report 2023*: Geneva: World Health Organization.
23. Bộ Y Tế, 2020, *National Strategic Plan on Malaria Control and Elimination 2021–2025*, Bộ Y Tế, Hanoi.
24. Z. Chahine and K.G. Le Roch, 2022, Decrypting the complexity of the human malaria parasite biology through systems biology approaches, *Frontiers in Systems Biology*.
25. A.R. Jensen, Y. Adams, and L. Hviid, 2020, Cerebral *Plasmodium falciparum* malaria: The role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it, *Immunological Reviews*, 293(1),230-252
26. N.G. Sampaio, E.M. Eriksson, and L. Schofield, 2018, *Plasmodium falciparum* PfEMP1 Modulates Monocyte/Macrophage Transcription Factor Activation and Cytokine and Chemokine Responses, *Infection and Immunity*, 86(1)
27. T. Lestaris, H. Arwati, Y.P. Dachlan, S. Keman, and D. Safruddin, 2022, The use of archived giemsa-stained blood smears and RDP for

- PCR-based genotyping of *plasmodium vivax* merozoite surface protein-1 in central Kalimantan province, Indonesia, *African Journal of Infectious Diseases*, 16(1),13-20
28. W. Kudisthalert, K. Pasupa, and S. Tongsimma, 2020, Counting and Classification of Malarial Parasite From Giemsa-Stained Thin Film Images, *IEEE Access*, 8,78663-78682
 29. A.S. Weiland, 2023, Recent Advances in Imported Malaria Pathogenesis, Diagnosis, and Management, *Current Emergency and Hospital Medicine Reports*, 11(2),49-57
 30. WHO, 2016, *Microscopy examination of thick and thin blood films for identification of malaria parasites.*
 31. S.S. Abbas and T.M.H. Dijkstra, 2020, Detection and stage classification of *Plasmodium falciparum* from images of Giemsa stained thin blood films using random forest classifiers, *Diagnostic Pathology*, 15(1),130
 32. A. Kong, S.A. Wilson, Y. Ah, D. Nace, E. Rogier, and M. Aidoo, 2021, HRP2 and HRP3 cross-reactivity and implications for HRP2-based RDT use in regions with *Plasmodium falciparum hrp2* gene deletions, *Malaria Journal*, 20(1),207
 33. D. Niyukuri, D. Sinzinkayo, E.V. Troth, C.O. Oduma, M. Barengayabo, M. Ndereyimana, A. Holzschuh, C.A. Vera-Arias, Y. Gebre, K. Badu, J. Nyandwi, D. Baza, E. Juma, and C. Koepfli, 2022, Performance of highly sensitive and conventional rapid diagnostic tests for clinical and subclinical *Plasmodium falciparum* infections, and hrp2/3 deletion status in Burundi, *PLOS Global Public Health*, 2(7),e0000828
 34. O.S. Michael, A.E. Orimadegun, and C.O. Falade, 2021, Persistence of *Plasmodium falciparum* HRP2 antigen after effective antimalarial therapy, *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine* 19(1),15-21
 35. A. Alemayehu, 2023, Biology and epidemiology of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* gametocyte carriage: Implication for malaria control and elimination, *Parasite Epidemiology and Control*, 21,e00295

36. H.G. Lê, T.L. Thái, J.M. Kang, J. Lee, M. Moe, T.C. Võ, H. Naw, M.K. Myint, Z.T. Htun, T.S. Kim, H.J. Shin, and B.K. Na, 2020, Genetic polymorphism of merozoite surface protein-3 in Myanmar *Plasmodium falciparum* field isolates, *Malaria Journal*, 19(1),184.
37. P. Kumari, S. Sinha, R. Gahtori, C.P. Yadav, M.M. Pradhan, M. Rahi, V. Pande, and A.R. Anvikar, 2020, Prevalence of Asymptomatic Malaria Parasitemia in Odisha, India: A Challenge to Malaria Elimination, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(4),1510-1516
38. S.K. Lee, T.K. Nguyen, F. Mohring, J.H. Han, E.R. Firdaus, S.H. Na, W.S. Park, R.W. Moon, and E.T. Han, 2023, Merozoite surface protein 1 paralog is involved in the human erythrocyte invasion of a zoonotic malaria, *Plasmodium knowlesi*, *Front Cell Infectious Microbiol*, 13,1314533
39. A. Blank, K. Fürle, A. Jäschke, G. Mikus, M. Lehmann, J. Hüsing, K. Heiss, T. Giese, D. Carter, E. Böhnlein, M. Lanzer, W.E. Haefeli, and H. Bujard, 2020, Immunization with full-length *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 is safe and elicits functional cytophilic antibodies in a randomized first-in-human trial, *NPJ Vaccines*, 5(1),10
40. K. Punnath, K.K. Dayanand, V. Midya, V.N. Chandrashekar, R.N. Achur, S.B. Kakkilaya, S.K. Ghosh, S.N. Kumari, and D.C. Gowda, 2021, Acquired antibody responses against merozoite surface protein-119 antigen during *Plasmodium falciparum* and *P.vivax* infections in South Indian city of Mangaluru, *Journal of Parasitic Diseases*, 45(1),176-190
41. I. Felger, G. Snounou, I. Hastings, J.J. Moehrle, and H.-P. Beck, 2020, PCR correction strategies for malaria drug trials: updates and clarifications, *The Lancet Infectious Diseases*, 20(1),e20-e25
42. K.B. Campbell, J.E. Tisdale, 2022, *Torsades de Pointes Chapter 10 - Antimicrobial agents and torsades de pointes.*, Academic Press. p. 231-266.
43. N. Ma, Z. Zhang, F. Liao, T. Jiang, and Y. Tu, 2020, The birth of artemisinin, *Pharmacology & Therapeutics*, 216,107658

44. L. Guoqiao, et al., *Artemisinin-Based and Other Antimalarials Chapter 10 - Dihydroartemisinin and Artemisinin in Combination With Piperaquine (Artekin, Artequick); Primaquine and Malaria Transmission; and Malaria Elimination**Fast Elimination of Malaria by Source Eradication (FEMSE)*, 2018, Academic Press. p. 609-670.
45. B. Hanboonkunupakarn, J. Tarning, S. Pukrittayakamee, and K. Chotivanich, 2022, Artemisinin resistance and malaria elimination: Where are we now?, *Frontiers in Pharmacology*, 13,876282
46. W. Shibeshi, G. Alemkere, A. Mulu, and E. Engidawork, 2021, Efficacy and safety of artemisinin-based combination therapies for the treatment of uncomplicated malaria in pediatrics: a systematic review and meta-analysis, *BMC infectious diseases*, 21(1),326
47. I. Adam, Y. Ibrahim, and G.I. Gasim, 2018, Efficacy and safety of artemisinin-based combination therapy for uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Sudan: a systematic review and meta-analysis, *Malaria Journal*, 17(1),110
48. C. Naing, M.A. Whittaker, N.H. Htet, S.N. Aye, and J.W. Mak, 2019, Efficacy of antimalarial drugs for treatment of uncomplicated falciparum malaria in Asian region: A network meta-analysis, *PLoS One*, 14(12),e0225882
49. E. Leonardi, G. Gilvary, N.J. White, and F. Nosten, 2001, Severe allergic reactions to oral artesunate: a report of two cases, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(2),182-183
50. W.R. Taylor and N.J. White, 2004, Antimalarial drug toxicity: a review, *Drug Saf*, 27(1),25-61
51. S. Mok, B.H. Stokes, N.F. Gnädig, L.S. Ross, T. Yeo, C. Amaratunga, E. Allman, L. Solyakov, A.R. Bottrill, J. Tripathi, R.M. Fairhurst, M. Llinás, Z. Bozdech, A.B. Tobin, and D.A. Fidock, 2021, Artemisinin-resistant K13 mutations rewire *Plasmodium falciparum*'s intra-erythrocytic metabolic program to enhance survival, *Nature Communication*, 12(1),530
52. S.C. Xie, S.A. Ralph, and L. Tilley, 2020, K13, the Cytostome, and Artemisinin Resistance, *Trends Parasitol*, 36(6),533-544

53. F.A. Siddiqui, R. Boonhok, M. Cabrera, H.G.N. Mbenda, M. Wang, H. Min, X. Liang, J. Qin, X. Zhu, J. Miao, Y. Cao, and L. Cui, 2020, Role of Plasmodium falciparum Kelch 13 Protein Mutations in *P. falciparum* Populations from Northeastern Myanmar in Mediating Artemisinin Resistance, *mBio*, 11(1).
54. J.S. McCarthy and R.N. Price, 2015, *Principles and Practice of Infectious Diseases Eighth Edition Chapter 40 - Antimalarial Drugs*, in Mandell, Douglas, and Bennett's,), J.E. Bennett, R. Dolin, and M.J. Blaser, Editors., W.B. Saunders: Philadelphia. p. 495-509.e495.
55. T. Qidwai, 2020, Exploration of copy number variation in genes related to anti-malarial drug resistance in *Plasmodium falciparum*, *Gene*, 736,144414
56. Bùi Quang Phúc, Huỳnh Hồng Quang, 2021, Hiệu lực của phác đồ điều trị dihydroartemisinin -piperazine trên 151 bệnh nhân sốt rét do p.falciparum chưa biến chứng, năm 2019, *Tạp chí y học quân sự*, 353, tr. 72-76.
57. A. Sowunmi, E.O. Adewoye, G.O. Gbotsho, C.T. Happi, A. Sijuede, O.A. Folarin, T.M. Okuboyejo, and O.S. Michael, 2010, Factors contributing to delay in parasite clearance in uncomplicated *falciparum* malaria in children, *Malaria Journal*, 9(1),53
58. M.C. Duong, O.K.N. Pham, P.T. Nguyen, V.V.C. Nguyen, and P.H. Nguyen, 2021, Predictors of treatment failures of plasmodium falciparum malaria in Vietnam: a 4-year single-centre retrospective study, *Malaria Journal*, 20(1),205
59. The effect of dosing regimens on the antimalarial efficacy of dihydroartemisinin-piperazine: a pooled analysis of individual patient data, 2013, *PLoS Medicine*, 10(12),e1001564; discussion e1001564
60. J.B. Roseau, B. Pradines, N. Paleiron, S. Vedy, M. Madamet, F. Simon, and E. Javelle, 2016, Failure of dihydroartemisinin plus piperazine treatment of falciparum malaria by under-dosing in an overweight patient, *Malaria Journal*, 15,479
61. C. Amaratunga, S. Sreng, S. Suon, E.S. Phelps, K. Stepniewska, P. Lim, C. Zhou, S. Mao, J.M. Anderson, N. Lindegardh, H. Jiang, J. Song, X.Z. Su, N.J. White, A.M. Dondorp, T.J. Anderson, M.P. Fay, J.

- Mu, S. Duong, and R.M. Fairhurst, 2012, Artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Pursat province, western Cambodia: a parasite clearance rate study, , 12(11),851-858
62. C. Florimond, F. de Laval, A.M. Early *The Lancet Infectious Disease*, S. Sauthier, Y. Lazrek, S. Pelleau, W.M. Monteiro, M. Agranier, N. Taudon, F. Morin, M. Magris, M.V.G. Lacerda, G.M.R. Viana, S. Herrera, M.R. Adhin, M.U. Ferreira, C.J. Woodrow, G.R. Awab, H. Cox, M.P. Ade, E. Mosnier, F. Djossou, D.E. Neafsey, P. Ringwald, and L. Musset, 2024, Impact of piperazine resistance in *Plasmodium falciparum* on malaria treatment effectiveness in The Guianas: a descriptive epidemiological study, *The Lancet Infectious Disease*, 24(2),161-171
 63. P.B.S. Asih, I.E. Rozi, F.K. Dewayanti, S. Wangsamuda, S. Zulfah, M. Robaha, J. Hutahaean, N.D. Anggraeni, M. Kusumaningsih, P.S. Mulyani, E. Sariwati, H.H. Basri, M.D.G. Bustos, and D. Syafruddin, 2022, Efficacy and safety of dihydroartemisinin–piperazine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* malaria in Papua and Sumatra, Indonesia, *Malar J*, 21(1),95
 64. WHO, 2009, *Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy*, World Health Organization.
 65. N.J. White, 2022, The assessment of antimalarial drug efficacy *in vivo*, *Trends Parasitol*, 38(8),660-672
 66. Y. Xu, N. Shrestha, V. Pr at, and A. Beloqui, 2021, An overview of *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models for studying the transport of drugs across intestinal barriers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 175,113795
 67. WHO, 2018, *Artemisinin resistance and artemisinin-based combination therapy efficacy 2018*, World Health Organization.
 68. W.A. Azmi, A.F.M. Rizki, Y. Djuardi, I.M. Artika, and J.E. Siregar, 2023, Molecular insights into artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*: An updated review, *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 112,105460

69. R. Coppée, D.C. Jeffares, M.A. Miteva, A. Sabbagh, and J. Clain, 2019, Comparative structural and evolutionary analyses predict functional sites in the artemisinin resistance malaria protein K13, *Scientific Reports*, 9(1),10675
70. B.H. Stokes, S.K. Dhingra, K. Rubiano et al , 2021, *Plasmodium falciparum* K13 mutations in Africa and Asia impact artemisinin resistance and parasite fitness, *Elife*, 10
71. J. Straimer, N.F. Gnädig, B. Witkowski, C. Amaratunga, V. Duru, A.P. Ramadani, M. Dacheux, N. Khim, L. Zhang, S. Lam, P.D. Gregory, F.D. Urnov, O. Mercereau-Puijalon, F. Benoit-Vical, R.M. Fairhurst, D. Ménard, and D.A. Fidock, 2015, Drug resistance. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates, *Science*, 347(6220),428-431
72. P.A. Mason and L.S. Cox, 2012, The role of DNA exonucleases in protecting genome stability and their impact on ageing, *AGE*, 34(6),1317-1340
73. A.S. Nasamu, A.J. Polino, E.S. Istvan, and D.E. Goldberg, 2020, Malaria parasite plasmepsins: More than just plain old degradative pepsins, *Journal of Biological Chemistry*, 295(25),8425-8441
74. N. Abu Bakar, N. Klonis, E. Hanssen, C. Chan, and L. Tilley, 2010, Digestive-vacuole genesis and endocytic processes in the early intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*, *Journal of Cell Science*, 123(Pt 3),441-450
75. P.A. Sigala and D.E. Goldberg, 2014, The peculiarities and paradoxes of Plasmodium heme metabolism, *Annual Review of Microbiology*, 68,259-278
76. D.J. Sullivan, Jr., 2017, Quinolines block every step of malaria heme crystal growth, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(29),7483-7485
77. A.C. Huckaby, C.S. Granum, M.A. Carey, K. Szlachta, B. Al-Barghouthi, Y.H. Wang, and J.L. Guler, 2019, Complex DNA structures trigger copy number variation across the *Plasmodium falciparum* genome, *Nucleic Acids Research* , 47(4),1615-1627

78. A.M. Dondorp, 2017, New genetic marker for piperazine resistance in *Plasmodium falciparum*, *The Lancet Infectious Diseases*, 17(2),119-121
79. H.A. Antony and S.C. Parija, 2016, Antimalarial drug resistance: An overview, *Tropical Parasitology*, 6(1),30-41
80. H. Noedl, Y. Se, K. Schaecher, B.L. Smith, D. Socheat, and M.M. Fukuda, 2008, Evidence of artemisinin-resistant malaria in western Cambodia, *The New England Journal of Medicine*, 359(24),2619-2620
81. F.A. Siddiqui, X. Liang, and L. Cui, 2021, *Plasmodium falciparum* resistance to ACTs: Emergence, mechanisms, and outlook, *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 16,102-118
82. M. Imwong, M. Dhorda, K. Myo Tun, A.M. Thu et al, 2020, Molecular epidemiology of resistance to antimalarial drugs in the Greater Mekong subregion: an observational study, *Lancet Infect Dis*, 20(12),1470-1480
83. M. Dhorda, C. Amaratunga, and A.M. Dondorp, 2021, Artemisinin and multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* - a threat for malaria control and elimination, *Current Opinion in Infectious Diseases*, 34(5),432-439
84. WHO, 2014, *Status report on artemisinin resistance 2014*: World Health Organization
85. W. van Loon, R. Oliveira, C. Bergmann, F. Habarugira, J. Ndoli, A. Sendegeya, C. Bayingana, and F.P. Mockenhaupt, 2022, *In Vitro* Confirmation of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* from Patient Isolates, Southern Rwanda, 2019, *Emerging Infectious Diseases*, 28(4),852-855
86. C.M. Parobek, J.B. Parr, N.F. Brazeau, C. Lon, S. Chaorattanakawee, P. Gosi, E.J. Barnett, L.D. Norris, S.R. Meshnick, M.D. Spring, C.A. Lanteri, J.A. Bailey, D.L. Saunders, J.T. Lin, and J.J. Juliano, 2017, Partner-Drug Resistance and Population Substructuring of Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* in Cambodia, *Genome Biology and Evolution*, 9(6),1673-1686
87. W.L. Hamilton, R. Amato, R.W. van der Pluijm, et al, 2019, Evolution and expansion of multidrug-resistant malaria in southeast Asia: a

- genomic epidemiology study, *The Lancet Infectious Diseases*, 19(9),943-951.
88. Đỗ Mạnh Hà, 2022, *Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ học phân tử và đáp ứng của Plasmodium falciparum với dihydroartemisinin-piperaquine phosphate ở một số vùng sốt rét lưu hành*, Luận án tiến sĩ y học, Viện sốt rét- Côn trùng-Ký sinh trùng Trung ương, Hà Nội.
 89. Huỳnh Hồng Quang, Hồ Văn Hoàng, Bùi Quang Phúc, Nguyễn Thanh Thủy Nhiên, Lê Đình Vĩnh Phúc, 2021, Kháng thuốc lâm sàng và phân tử trên quần thể *Plasmodium falciparum* với liệu pháp thuốc sốt rét ưu tiên tại vùng sốt rét lưu hành tỉnh Đắk Lắk (2019-2021), *Tạp Chí truyền nhiễm Việt Nam*, 2(34),72-78.
 90. D. Leroya, F. Macintyre, M. Adanya, B. Laurijssens, R. Klopper, N. Khime, E Legrand, T.N. and D.M. Wells, High proportion of multiple copies of *Plasmodium falciparum* *Plasmepsin-2* gene in African isolates: Is piperaquine resistance emerging in Africa?.
 91. S. Balli, K.R. Shumway, and S. Sharan, 2024, *Physiology, Fever*, in StatPearls. StatPearls Publishing Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL) ineligible companies.
 92. WHO, 2016, *Malaria Parasite Counting*, World Health Organization.
 93. F. Arie, B. Witkowski, C. Amaratunga et al , 2014, A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria, *Nature*, 505(7481),50-55
 94. M.G. Robert, F. Foguim Tsombeng, M. Gendrot, J. Mosnier, R. Amalvict, N. Benoit, M. Torrentino-Madamet, and B. Pradines, 2018, Absence of a High Level of Duplication of the *Plasmepsin II* Gene in Africa, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(11)
 95. K.J. Livak and T.D. Schmittgen, 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25(4),402-408
 96. M.T. Zaw, Z. Lin, and N.A. Emran, 2020, Importance of kelch 13 C580Y mutation in the studies of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* in Greater Mekong Subregion, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 53(5),676-681

97. R. Ye, Y. Zhang, and D. Zhang, 2022, Evaluations of candidate markers of dihydroartemisinin-piperaquine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from the China-Myanmar, Thailand-Myanmar, and Thailand-Cambodia borders, *Parasite Vectors*, 15(1),130
98. M.P. Kyaw, M.H. Nyunt, K. Chit, M.M. Aye, K.H. Aye, M.M. Aye, N. Lindegardh, J. Tarning, M. Imwong, C.G. Jacob, C. Rasmussen, J. Perin, P. Ringwald, and M.M. Nyunt, 2013, Reduced susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artesunate in southern Myanmar, *PLoS One*, 8(3),e57689
99. WHO, 2014, Status report on artemisinin resistance, World Health Organization.
100. N. Thuy-Nhien, N.K. Tuyen, N.T. Tong, N.T. Vy, N.V. Thanh, H.T. Van, P. Huong-Thu, H.H. Quang, M.F. Boni, C. Dolecek, J. Farrar, G.E. Thwaites, O. Miotto, N.J. White, and T.T. Hien, 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),e01578-01516
101. Huỳnh Hồng Quang, Bùi Quang Phúc, 2015, Hiệu lực và hiệu quả thuốc phối hợp Dihydroartemisinin – Piperaquine trong điều trị sốt rét do *Plasmodium falciparum* chưa biến chứng tại xã Hàm Càn, huyện Hàm Thuận Nam, tỉnh Bình Thuận, *Tạp chí y học dự phòng*, 5
102. P. Quang Bui, Q. Hong Huynh, D. Thanh Tran, D. Thanh Le, T. Quang Nguyen, H. Van Truong, N. Khim, B. Witkowski, D. Cong Tran, M.D. Bustos, P. Ringwald, and T. Thi Ta, 2020, Pyronaridine-artesunate Efficacy and Safety in Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in Areas of Artemisinin-resistant Falciparum in Viet Nam (2017-2018), *Clinical Infectious Diseases*, 70(10),2187-2195
103. R. Amato, R.D. Pearson, J. Almagro-Garcia, C. Amaratunga, P. Lim, S. Suon, S. Sreng, E. Drury, J. Stalker, O. Miotto, R.M. Fairhurst, and D.P. Kwiatkowski, 2018, Origins of the current outbreak of multidrug-resistant malaria in southeast Asia: a retrospective genetic study, *The Lancet Infectious Diseases*18(3),337-345

104. C.J. Woodrow and N.J. White, 2017, The clinical impact of artemisinin resistance in Southeast Asia and the potential for future spread, *FEMS Microbiol Rev*, 41(1),34-48
105. D. Ménard, N. Khim, J. Beghain, A.A. Adegnik, et al, 2016, A Worldwide Map of *Plasmodium falciparum* K13-Propeller Polymorphisms, *The New England Journal of Medicine*, 374(25),2453-2464
106. N. Boonyalai, C. Thamnurak, P. Sai-Ngam, W et al , 2021, *Plasmodium falciparum* phenotypic and genotypic resistance profile during the emergence of Piperaquine resistance in Northeastern Thailand, *Scientific Reports*, 11(1),13419
107. O. Miotto, R. Amato, E.A. Ashley, et al , 2015, Genetic architecture of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum*, *Nature Genetics*, 47(3),226-234
108. N. Thuy-Nhien, N.K. Tuyen, N.T. Tong, N.T. Vy, N.V. Thanh, H.T. Van, P. Huong-Thu, H.H. Quang, M.F. Boni, C. Dolecek, J. Farrar, G.E. Thwaites, O. Miotto, N.J. White, and T.T. Hien, 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)
109. S. Nair, X. Li, G.A. Arya, M. McDew-White, M. Ferrari, F. Nosten, and T.J.C. Anderson, 2018, Fitness Costs and the Rapid Spread of C580Y Substitutions Conferring Artemisinin Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(9),e00605-00618
110. W. Si, Y. Zhao, X. Qin, Y. Huang, J. Yu, X. Liu, Y. Li, X. Yan, Q. Zhang, and J. Sun, 2023, What exactly does the *PfK13* C580Y mutation in *Plasmodium falciparum* influence?, *Parasites & Vectors*, 16(1),421
111. S. Nair, X. Li, G.A. Arya, M. McDew-White, M. Ferrari, F. Nosten, and T.J.C. Anderson, 2018, Fitness Costs and the Rapid Spread of k13-C580Y Substitutions Conferring Artemisinin Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(9)
112. B.Q. Phuc, C. Rasmussen, T.T. Duong, L.T. Dong, M.A. Loi, D. Ménard, J. Tarning, D. Bustos, P. Ringwald, G.L. Galappaththy, and N.Q. Thieu, 2017, Treatment Failure of

- Dihydroartemisinin/Piperaquine for *Plasmodium falciparum* Malaria, Vietnam, *Emerging Infectious Diseases*, 23(4),715-717
113. D. Leroy, F. Macintyre, Y. Adoke, S. Ouoba, A. Barry, G. Mombongoma, J.M. Ndong Ngomo, R. Varo, Y. Dossou, A.K. Tshetu, T.T. Duong, B.Q. Phuc, B. Laurijssens, R. Klopper, N. Khim, E. Legrand, and D. Ménard, 2019, African isolates show a high proportion of multiple copies of the *Plasmodium falciparum plasmepsin-2* gene, a piperaquine resistance marker, *Malaria Journal*, 18(1),126.
 114. F. Huang, B. Shrestha, H. Liu, L.H. Tang, S.S. Zhou, X.N. Zhou, S. Takala-Harrison, P. Ringwald, M.M. Nyunt, and C.V. Plowe, 2020, No evidence of amplified *Plasmodium falciparum plasmepsin II* gene copy number in an area with artemisinin-resistant malaria along the China-Myanmar border, *Malaria Journal*, 19(1),334.
 115. J. Inoue, M. Silva, B. Fofana, K. Sanogo, A. Mårtensson, I. Sagara, A. Björkman, M.I. Veiga, P.E. Ferreira, A. Djimde, and J.P. Gil, 2018, *Plasmodium falciparum* Plasmepsin 2 Duplications, West Africa, *Emerging Infectious Diseases*, 24(8),1591-1593.
 116. N.C. Phong, M. Chavchich, H.H. Quang, N.N. San, G.W. Birrell, I. Chuang, N.J. Martin, N.D. Manh, and M.D. Edstein, 2019, Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artemisinins and *Plasmodium vivax* to chloroquine in Phuoc Chien Commune, Ninh Thuan Province, south-central Vietnam, *Malaria Journal*, 18(1),10
 117. Y. Si, W. Zeng, N. Li, C. Wang, F. Siddiqui, J. Zhang, L. Pi, X. He, L. Zhao, S. Wang, H. Zhao, X. Li, Q. Yang, J. Miao, Z. Yang, and L. Cui, 2023, In Vitro Susceptibility of *Plasmodium falciparum* Isolates from the China-Myanmar Border Area to Piperaquine and Association with Candidate Markers, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 65(5).
 118. N. Boonyalai, K. Kirativanich, C. Thamnurak, C. Praditpol, B.A. Vesely, M. Wojnarski, J.S. Griesenbeck, and N.C. Waters, 2022, A single point mutation in the *Plasmodium falciparum* 3'–5' exonuclease does not alter piperaquine susceptibility, *Malaria Journal*, 21(1),130.
 119. M.G. Robert, F. Foguim Tsombeng, M. Gendrot, S. Diawara, M. Madamet, M.B. Kounta, K.A. Wade, M. Fall, M.W. Gueye, N. Benoit, A. Nakoulima, R. Bercion, R. Amalvict, B. Fall, B. Wade, B. Diatta,

- and B. Pradines, 2019, Baseline Ex Vivo and Molecular Responses of *Plasmodium falciparum* Isolates to Piperaquine before Implementation of Dihydroartemisinin-Piperaquine in Senegal, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 63(5)
120. M. Hussien, M.M. Abdel Hamid, E.A. Elamin, A.O. Hassan, A.H. Elaagip, A.H.A. Salama, M.H. Abdelraheem, and A.O. Mohamed, 2020, Antimalarial drug resistance molecular markers of *Plasmodium falciparum* isolates from Sudan during 2015-2017, *PLoS One*, 15(8),e0235401
 121. S.A.S. Diakité, K. Traoré, I. Sanogo, T.G. Clark, S. Campino, M. Sangaré, D. Dabita, A. Dara, D.S. Konaté, F. Doucouré, A. Cissé, B. Keita, M. Doumbouya, M.A. Guindo, M.B. Toure, N. Sogoba, S. Doumbia, G.A. Awandare, and M. Diakité, 2019, A comprehensive analysis of drug resistance molecular markers and *Plasmodium falciparum* genetic diversity in two malaria endemic sites in Mali, *Malaria Journal*, 18(1),361
 122. W.H. Organization, 2016, *Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance: status report*. World Health Organization.
 123. Huỳnh Hồng Quang, Nguyễn Ngọc Dũng, Đặng Đức Trí, Bùi Quang Phúc, 2020, Đánh giá hiệu lực và an toàn thuốc pyronaridine - artesunate (pyramax®) trong điều trị sốt rét do *Plasmodium falciparum* chưa biến chứng tại tỉnh đắk nông (2017 - 2019), *Tạp Chí truyền nhiễm Việt Nam*, 3(31),72-80
 124. Pyronaridine-artesunate or dihydroartemisinin-piperaquine versus current first-line therapies for repeated treatment of uncomplicated malaria: a randomised, multicentre, open-label, longitudinal, controlled, phase 3b/4 trial, 2018, *The Lancet*, 391(10128),1378-1390.

PHỤ LỤC NGHIÊN CỨU

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

-----*-----

**GIẤY CHO PHÉP SỬ DỤNG KẾT QUẢ ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU LÀM
LUẬN ÁN TIẾN SĨ**

Tôi tên là: PGS.TS. Nguyễn Văn Chuyên

Chủ nhiệm đề tài: **Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét và mô hình kết hợp quân dân y trong phòng chống bệnh sốt rét ở khu vực trọng điểm**. Mã số đề tài: **KC.10.32/16-20**.

Cơ quan chủ trì: Học viện Quân y

Chúng tôi đồng ý và cho phép NCS Trần Thị Thu Huyền (là nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, theo Quyết định công nhận nghiên cứu sinh số: 1606/QĐ-HVKHCN, ngày 05/12/2019 của Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ), hiện đang thực hiện đề tài luận án tiến sĩ: “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”, được sử dụng: **Mẫu bệnh phẩm từ bệnh nhân sốt rét không biến chứng do nhiễm *Plasmodium falciparum* thu thập từ bệnh nhân tại một số tỉnh lưu hành bệnh sốt rét trong giai đoạn 2018-2019 (Phụ lục kèm theo)**.

- Kỹ thuật xử lý mẫu: tách chiết DNA, nhân và giải trình tự gen kháng thuốc.
- Mục đích sử dụng: Nghiên cứu sinh chỉ được phép sử dụng số liệu cho mục đích nghiên cứu khoa học và hoàn thành luận án tiến sĩ.
- Nghiên cứu sinh cần đảm bảo và cam kết:
 - + Mọi thông tin cá nhân của bệnh nhân đã được mã hóa và ẩn danh để đảm bảo tính riêng tư. Không tiết lộ bất kỳ thông tin nào có thể nhận diện cá nhân bệnh nhân như tên, địa chỉ, số điện thoại hoặc bất kỳ thông tin cá nhân nào khác.

- + Cam kết bảo vệ số liệu khỏi truy cập trái phép bằng các biện pháp bảo mật thích hợp như mật khẩu, mã hóa và lưu trữ an toàn.
- + Tất cả các hoạt động liên quan đến việc sử dụng số liệu phải tuân thủ các quy định về bảo vệ dữ liệu cá nhân và quyền riêng tư của bệnh nhân.
- + Cam kết không sử dụng số liệu này vào mục đích cá nhân, thương mại hoặc bất kỳ mục đích nào khác có thể tạo ra mâu thuẫn lợi ích, đảm bảo tính khách quan và trung thực trong quá trình nghiên cứu.

Hà Nội, ngày 17 tháng 01 năm 2025

Chủ nhiệm đề tài



PGS.TS. Nguyễn Văn Chuyên

XÁC NHẬN CỦA CƠ QUAN CHỦ TRÌ



KT. GIÁM ĐỐC

**Thiếu tướng
Lê Quang Trí**



PHỤ LỤC

DANH SÁCH BỆNH NHÂN SỐT RÉT

(Thuộc đề tài “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sinh học phân tử chẩn đoán ký sinh trùng sốt rét và mô hình kết hợp quần dân y trong phòng chống bệnh sốt rét ở khu vực trọng điểm”, mã số KC.10.32/16-20)

| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | pfEXO | pfK13 | pfpm2 |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|----------|----------|-------------|
| 1 | D6.1 | Đắk Nông | 21 | Nam | 38,60 | 1242 | | C580Y | |
| 2 | D6.2 | Đắk Nông | 32 | Nam | 39,10 | 9346 | E415G | | |
| 3 | D6.3 | Đắk Nông | 32 | Nam | 38,20 | 18980 | E415G | C580Y | |
| 4 | D6.4 | Đắk Nông | 48 | Nam | 37,60 | 1053 | | Kiểu đại | 1 bản sao |
| 5 | D6.5 | Đắk Nông | 23 | Nam | 38,10 | 1254 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 6 | D6.6 | Đắk Nông | 22 | Nam | 37,80 | 13393 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 7 | D6.7 | Đắk Nông | 22 | Nam | 38,20 | 2992 | E415G | Kiểu đại | 1 bản sao |
| 8 | D6.8 | Đắk Nông | 43 | Nam | 38,60 | 4751 | Kiểu đại | Kiểu đại | |
| 9 | D6.9 | Đắk Nông | 52 | Nam | 38,20 | 100571 | E415G | Kiểu đại | |
| 10 | D6.10 | Đắk Nông | 41 | Nam | 37,90 | 1941 | Kiểu đại | Kiểu đại | > 1 bản sao |
| 11 | D6.11 | Đắk Nông | 28 | Nam | 38,10 | 3177 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 12 | D6.12 | Đắk Nông | 28 | Nam | 37,90 | 1865 | E415G | C580Y | |
| 13 | D6.13 | Đắk Nông | 36 | Nam | 37,70 | 66518 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 14 | D6.14 | Đắk Nông | 34 | Nam | 39,10 | 13582 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 15 | D6.15 | Đắk Nông | 30 | Nữ | 37,90 | 1740 | Kiểu đại | Kiểu đại | > 1 bản sao |
| 16 | D6.16 | Bình Phước | 18 | Nam | 38,80 | 30343 | E415G | Kiểu đại | 1 bản sao |
| 17 | D6.17 | Bình Phước | 30 | Nam | 38,60 | 1547 | | C580Y | 1 bản sao |
| 18 | D6.18 | Bình Phước | 22 | Nam | 38,60 | 4554 | | C580Y | |
| 19 | D6.19 | Bình Phước | 48 | Nam | 38,00 | 13449 | E415G | C580Y | 1 bản sao |

| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | pEXO | pFK13 | pfpM2 |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|----------|----------|-------------|
| 20 | D6.20 | Bình Phước | 33 | Nam | 39,00 | 9468 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 21 | D6.21 | Bình Phước | 37 | Nam | 38,60 | 4357 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 22 | D6.22 | Bình Phước | 30 | Nam | 39,00 | 1192 | E415G | | 1 bản sao |
| 23 | D6.23 | Bình Phước | 23 | Nam | 37,90 | 9592 | E415G | C580Y | |
| 24 | D6.24 | Bình Phước | 38 | Nữ | 39,00 | 60776 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 25 | D6.25 | Bình Phước | 28 | Nam | 40,00 | 9821 | E415G | C580Y | |
| 26 | D6.26 | Bình Phước | 30 | Nam | 39,50 | 63272 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 27 | D6.27 | Bình Phước | 41 | Nữ | 39,30 | 860 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 28 | D6.28 | Bình Phước | 30 | Nam | 39,50 | 736 | | C580Y | > 1 bản sao |
| 29 | D6.29 | Bình Phước | 44 | Nam | 40,00 | 13480 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 30 | D6.30 | Bình Phước | 28 | Nam | 39,50 | 70344 | | Kiểu đại | > 1 bản sao |
| 31 | D6.31 | Bình Phước | 50 | Nam | 38,00 | 1969 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 32 | D6.32 | Bình Phước | 25 | Nam | 39,00 | 1812 | | C580Y | 1 bản sao |
| 33 | D6.33 | Bình Phước | 30 | Nam | 39,00 | 12878 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 34 | D6.34 | Bình Phước | 22 | Nam | 38,00 | 16120 | | Kiểu đại | > 1 bản sao |
| 35 | D6.35 | Bình Phước | 30 | Nam | 38,40 | 20958 | E415G | C580Y | |
| 36 | D6.36 | Bình Phước | 42 | Nam | 38,50 | 95428 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 37 | D6.37 | Bình Phước | 18 | Nam | 38,10 | 83200 | E415G | C580Y | |
| 38 | D6.38 | Bình Phước | 30 | Nam | 38,80 | 1057 | Kiểu đại | Kiểu đại | > 1 bản sao |
| 39 | D6.39 | Bình Phước | 26 | Nam | 38,10 | 2388 | Kiểu đại | Kiểu đại | > 1 bản sao |
| 40 | D6.40 | Đắk Nông | 41 | Nam | 37,90 | 1000 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 41 | D6.42 | Đắk Nông | 19 | Nam | 38,50 | 7773 | | C580Y | 1 bản sao |
| 42 | D6.43 | Đắk Nông | 22 | Nam | 39,10 | 9706 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 43 | D6.44 | Đắk Nông | 24 | Nam | 39,10 | 154666 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |

| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | pfEXO | pfK13 | pfpm2 |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|----------|----------|-------------|
| 44 | D6.45 | Bình Phước | 32 | Nam | 38,90 | 638 | | C580Y | > 1 bản sao |
| 45 | D6.46 | Bình Phước | 24 | Nam | 38,50 | 560 | | C580Y | 1 bản sao |
| 46 | D6.47 | Bình Phước | 33 | Nam | 38,60 | 20400 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 47 | D6.48 | Bình Phước | 46 | Nam | 37,50 | 3722 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 48 | D6.49 | Bình Phước | 30 | Nam | 38,90 | 11960 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 49 | D6.50 | Bình Phước | 24 | Nam | 38,60 | 31847 | | C580Y | > 1 bản sao |
| 50 | D6.51 | Bình Phước | 44 | Nam | 39,50 | 4800 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 51 | D6.52 | Bình Phước | 21 | Nam | 38,60 | 4216 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 52 | D6.53 | Bình Phước | 27 | Nam | 38,50 | 2218 | | C580Y | 1 bản sao |
| 53 | D6.54 | Bình Phước | 28 | Nam | 38,60 | 8846 | | Kiểu đại | 1 bản sao |
| 54 | D6.55 | Bình Phước | 26 | Nam | 39,20 | 1954 | | C580Y | 1 bản sao |
| 55 | D6.56 | Bình Phước | 17 | Nam | 39,00 | 6901 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 56 | D6.57 | Bình Phước | 29 | Nam | 37,80 | 28594 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 57 | D6.58 | Bình Phước | 53 | Nam | 39,50 | 16642 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 58 | D6.59 | Bình Phước | 16 | Nam | 39,00 | 13386 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 59 | D6.60 | Bình Phước | 25 | Nam | 38,00 | 10480 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 60 | D6.61 | Bình Phước | 19 | Nam | 38,60 | 7768 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 61 | D6.62 | Bình Phước | 29 | Nam | 38,30 | 14823 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 62 | D6.63 | Bình Phước | 35 | Nam | 38,90 | 5449 | E415G | C580Y | |
| 63 | D6.64 | Bình Phước | 28 | Nam | 38,50 | 8199 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 64 | PT.1.1 | Gia Lai | 60 | Nam | 38,50 | 896 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 65 | PT.1.2 | Gia Lai | 33 | Nam | 39,00 | 2318 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 66 | PT.1.3 | Gia Lai | 30 | Nam | 38,50 | 368 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 67 | PT.1.4 | Gia Lai | 27 | Nam | 39,00 | 6463 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |



| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | pEXO | pFKI3 | pfpM2 |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|----------|-------|-------------|
| 68 | PT.1.5 | Gia Lai | 30 | Nam | 39,00 | 2766 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 69 | PT.1.6 | Gia Lai | 18 | Nam | 38,50 | 873 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 70 | PT.1.7 | Gia Lai | 19 | Nam | 39,00 | 328 | Kiểu đại | C580Y | |
| 71 | PT.1.10 | Gia Lai | 36 | Nam | 38,50 | 2943 | Kiểu đại | C580Y | |
| 72 | PT.1.17 | Gia Lai | 23 | Nam | 38,50 | 560 | Kiểu đại | C580Y | |
| 73 | PT.1.18 | Gia Lai | 57 | Nam | 39,00 | 396 | Kiểu đại | C580Y | |
| 74 | PT.1.19 | Gia Lai | 40 | Nam | 38,50 | 389 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 75 | PT.1.20 | Gia Lai | 31 | Nam | 38,50 | 896 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 76 | PT.1.21 | Gia Lai | 34 | Nam | 39,00 | 984 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 77 | PT.1.22 | Gia Lai | 21 | Nam | 39,50 | 670 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 78 | PT.1.23 | Gia Lai | 38 | Nữ | 38,50 | 489 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 79 | PT.1.28 | Gia Lai | 54 | Nam | 38,50 | 2386 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 80 | PT.1.30 | Gia Lai | 36 | Nam | 39,00 | 2481 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 81 | PT.1.31 | Gia Lai | 31 | Nam | 38,50 | 194 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 82 | PT.1.33 | Gia Lai | 38 | Nữ | 39,00 | 1597 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 83 | PT.1.34 | Gia Lai | 20 | Nam | 39,00 | 468 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 84 | PT.1.35 | Gia Lai | 54 | Nam | 39,00 | 325 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 85 | PT.1.36 | Gia Lai | 57 | Nam | 38,50 | 45400 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 86 | PT.1.37 | Gia Lai | 31 | Nam | 39,00 | 102486 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 87 | PT.1.38 | Gia Lai | 34 | Nam | 38,50 | 10433 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 88 | PT.1.39 | Gia Lai | 18 | Nam | 39,00 | 865 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 89 | PT.1.40 | Gia Lai | 18 | Nam | 38,50 | 986 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 90 | PT.1.41 | Gia Lai | 33 | Nam | 39,00 | 1524 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 91 | PT.1.42 | Gia Lai | 34 | Nữ | 39,00 | 350 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |

| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | pfEXO | pfK13 | pfpm2 |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|----------|----------|-------------|
| 92 | PT.1.43 | Gia Lai | 29 | Nam | 38,50 | 3217 | E415G | Kiểu đại | > 1 bản sao |
| 93 | PT.1.44 | Đắk Lắk | 39 | Nam | 39,50 | 4320 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 94 | PT.1.45 | Đắk Lắk | 31 | Nam | 38,70 | 9712 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 95 | PT.1.46 | Đắk Lắk | 28 | Nam | 37,90 | 6463 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 96 | PT.1.47 | Đắk Lắk | 44 | Nam | 39,20 | 2766 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 97 | PT.1.48 | Đắk Lắk | 32 | Nữ | 38,50 | 36873 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 98 | PT.1.49 | Đắk Lắk | 37 | Nam | 38,90 | 17920 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 99 | PT.1.50 | Đắk Lắk | 33 | Nữ | 40,20 | 2943 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 100 | PT.1.51 | Đắk Lắk | 27 | Nam | 38,70 | 893 | E415G | C580Y | |
| 101 | PT.1.52 | Đắk Lắk | 19 | Nam | 40,00 | 11396 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 102 | PT.1.53 | Đắk Lắk | 40 | Nữ | 39,20 | 12172 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 103 | PT.1.54 | Đắk Lắk | 14 | Nam | 39,50 | 17896 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 104 | PT.1.55 | Đắk Lắk | 32 | Nam | 38,00 | 62514 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 105 | PT.1.56 | Đắk Lắk | 44 | Nữ | 38,70 | 16405 | Kiểu đại | C580Y | |
| 106 | PT.1.57 | Đắk Lắk | 26 | Nam | 38,60 | 46834 | E415G | C580Y | |
| 107 | PT.1.58 | Đắk Lắk | 41 | Nam | 38,70 | 12436 | E415G | C580Y | |
| 108 | PT.1.59 | Đắk Lắk | 27 | Nam | 39,40 | 2481 | Kiểu đại | C580Y | |
| 109 | PT.1.60 | Đắk Lắk | 37 | Nam | 39,00 | 104976 | Kiểu đại | C580Y | |
| 110 | PT.1.61 | Đắk Lắk | 35 | Nam | 39,00 | 5000 | E415G | C580Y | |
| 111 | PT.1.62 | Đắk Lắk | 23 | Nam | 39,00 | 9712 | | C580Y | 1 bản sao |
| 112 | PT.1.63 | Đắk Lắk | 24 | Nam | 39,50 | 6463 | | C580Y | |
| 113 | PT.1.64 | Đắk Lắk | 43 | Nam | 38,50 | 2766 | Kiểu đại | C580Y | |
| 114 | PT.1.65 | Đắk Lắk | 24 | Nữ | 38,50 | 36873 | E415G | C580Y | |
| 115 | PT.1.66 | Đắk Lắk | 37 | Nam | 38,70 | 17920 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |



Handwritten signature in blue ink, located at the top right of the page.

| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | p/EXO | p/K13 | p/PM2 |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|----------|----------|-------------|
| 116 | PT.1.67 | Đắk Lắk | 44 | Nữ | 39,50 | 2943 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 117 | PT.1.68 | Đắk Nông | 27 | Nam | 39,10 | 1120 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 118 | PT.1.69 | Đắk Nông | 37 | Nam | 38,50 | 11396 | E415G | C580Y | |
| 119 | PT.1.71 | Đắk Nông | 38 | Nam | 39,00 | 12172 | E415G | Kiểu đại | 1 bản sao |
| 120 | PT.1.72 | Đắk Nông | 37 | Nam | 39,20 | 17896 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 121 | PT.1.74 | Đắk Nông | 25 | Nam | 39,20 | 62514 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 122 | PT.1.75 | Đắk Nông | 51 | Nam | 39,30 | 16405 | E415G | C580Y | |
| 123 | PT.1.76 | Đắk Nông | 26 | Nam | 39,50 | 46834 | E415G | Kiểu đại | |
| 124 | PT.1.78 | Đắk Nông | 32 | Nam | 39,00 | 12436 | E415G | Kiểu đại | |
| 125 | PT.1.82 | Đắk Nông | 36 | Nam | 39,20 | 2481 | Kiểu đại | C580Y | |
| 126 | PT.1.83 | Đắk Nông | 21 | Nam | 39,50 | 104976 | E415G | C580Y | |
| 127 | PT.1.84 | Đắk Nông | 28 | Nam | 39,20 | 5000 | E415G | | |
| 128 | PT.1.85 | Đắk Nông | 38 | Nam | 39,10 | 9712 | E415G | | |
| 129 | PT.1.86 | Đắk Nông | 28 | Nam | 39,20 | 6463 | Kiểu đại | C580Y | |
| 130 | PT.1.87 | Đắk Nông | 36 | Nam | 39,50 | 2766 | E415G | | > 1 bản sao |
| 131 | PT.1.88 | Đắk Nông | 31 | Nam | 39,20 | 36873 | | | > 1 bản sao |
| 132 | PT.1.89 | Đắk Nông | 38 | Nam | 38,00 | 17920 | Kiểu đại | C580Y | |
| 133 | PT.1.90 | Đắk Nông | 20 | Nam | 39,50 | 2943 | E415G | C580Y | |
| 134 | PT.1.91 | Đắk Nông | 54 | Nam | 38,00 | 560 | E415G | C580Y | |
| 135 | PT.1.92 | Đắk Nông | 57 | Nam | 38,00 | 11396 | E415G | C580Y | |
| 136 | PT.1.93 | Đắk Nông | 31 | Nam | 38,50 | 12172 | Kiểu đại | C580Y | |
| 137 | PT.1.94 | Đắk Nông | 34 | Nam | 37,80 | 17896 | E415G | C580Y | |
| 138 | PT.1.95 | Đắk Nông | 41 | Nam | 37,00 | 62514 | E415G | C580Y | |
| 139 | PT.1.96 | Đắk Nông | 39 | Nam | 38,80 | 16405 | E415G | C580Y | |

| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | pfEXO | pfK13 | pfpm2 |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|----------|-------|-------------|
| 140 | PT.1.97 | Đắk Nông | 21 | Nam | 38,00 | 46834 | E415G | C580Y | |
| 141 | PT.1.98 | Đắk Nông | 34 | Nam | 38,00 | 12436 | E415G | C580Y | |
| 142 | PT.1.99 | Đắk Nông | 29 | Nam | 38,20 | 2481 | E415G | C580Y | |
| 143 | PT.1.100 | Đắk Nông | 39 | Nam | 38,00 | 104976 | Kiểu đại | C580Y | |
| 144 | PT.1.101 | Đắk Nông | 31 | Nam | 37,20 | 5000 | E415G | C580Y | |
| 145 | PT.1.102 | Đắk Nông | 28 | Nam | 37,20 | 9712 | E415G | C580Y | |
| 146 | PT.1.103 | Đắk Nông | 44 | Nam | 39,00 | 6463 | E415G | C580Y | |
| 147 | PT.1.104 | Đắk Nông | 32 | Nữ | 39,50 | 2766 | E415G | C580Y | |
| 148 | PT.1.105 | Đắk Nông | 37 | Nữ | 38,30 | 36873 | Kiểu đại | C580Y | |
| 149 | PT.1.106 | Đắk Nông | 33 | Nữ | 40,50 | 17920 | E415G | C580Y | |
| 150 | PT.1.107 | Đắk Nông | 27 | Nữ | 38,30 | 2943 | E415G | C580Y | |
| 151 | PT.1.108 | Đắk Nông | 19 | Nữ | 40,00 | 560 | E415G | C580Y | |
| 152 | PT.1.109 | Đắk Nông | 40 | Nữ | 37,90 | 11396 | E415G | C580Y | |
| 153 | PT.1.110 | Đắk Nông | 19 | Nam | 39,00 | 12172 | E415G | C580Y | |
| 154 | PT.1.113 | Đắk Nông | 32 | Nam | 39,00 | 17896 | E415G | C580Y | |
| 155 | PT.1.114 | Đắk Nông | 44 | Nam | 39,50 | 62514 | Kiểu đại | C580Y | |
| 156 | PT.1.115 | Đắk Nông | 26 | Nam | 38,60 | 16405 | E415G | C580Y | |
| 157 | PT.1.116 | Đắk Nông | 41 | Nam | 38,70 | 46834 | E415G | C580Y | |
| 158 | PT.2.1 | Gia Lai | 27 | Nam | 37,20 | 12436 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 159 | PT.2.2 | Gia Lai | 37 | Nam | 39,50 | 2481 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 160 | PT.2.5 | Gia Lai | 35 | Nam | 38,00 | 104976 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 161 | PT.2.7 | Gia Lai | 23 | Nam | 38,00 | 173 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 162 | PT.2.8 | Gia Lai | 24 | Nam | 38,50 | 7890 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 163 | PT.2.9 | Gia Lai | 43 | Nữ | 37,80 | 6791 | E415G | C580Y | 1 bản sao |

9/2/2020




| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | p/EXO | p/K13 | p/PM2 |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|----------|----------|-------------|
| 164 | PT.2.10 | Gia Lai | 24 | Nữ | 37,00 | 3289 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 165 | PT.2.11 | Gia Lai | 23 | Nam | 38,80 | 3090 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 166 | PT.2.12 | Gia Lai | 44 | Nam | 38,00 | 2389 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 167 | PT.2.13 | Gia Lai | 27 | Nam | 38,00 | 569 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 168 | PT.2.14 | Gia Lai | 26 | Nam | 38,20 | 9870 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 169 | PT.2.15 | Gia Lai | 14 | Nam | 38,00 | 168 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 170 | PT.2.16 | Gia Lai | 36 | Nam | 37,20 | 9830 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 171 | PT.2.17 | Gia Lai | 42 | Nam | 37,20 | 678 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 172 | PT.2.18 | Gia Lai | 23 | Nam | 39,00 | 6781 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 173 | PT.2.19 | Gia Lai | 18 | Nữ | 39,50 | 5300 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 174 | PT.2.20 | Gia Lai | 23 | Nữ | 38,30 | 1783 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 175 | PT.2.21 | Gia Lai | 23 | Nam | 40,50 | 1200 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 176 | PT.2.22 | Gia Lai | 37 | Nam | 38,30 | 1879 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 177 | PT.2.23 | Gia Lai | 18 | Nam | 40,00 | 1789 | E415G | Kiểu đại | 1 bản sao |
| 178 | PT.2.24 | Gia Lai | 27 | Nam | 37,90 | 1983 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 179 | PT.2.25 | Gia Lai | 36 | Nữ | 39,00 | 1549 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 180 | PT.2.26 | Gia Lai | 52 | Nữ | 39,00 | 81983 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 181 | PT.2.27 | Gia Lai | 15 | Nam | 39,50 | 4750 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 182 | PT.2.28 | Gia Lai | 30 | Nam | 38,60 | 9226 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 183 | PT.2.29 | Gia Lai | 20 | Nam | 38,70 | 6139 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 184 | PT.2.30 | Gia Lai | 31 | Nam | 37,20 | 2627 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 185 | PT.2.31 | Gia Lai | 42 | Nam | 39,30 | 35029 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 186 | PT.2.32 | Gia Lai | 30 | Nam | 39,30 | 17024 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 187 | PT.2.33 | Gia Lai | 30 | Nam | 39,30 | 2795 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |

| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | pfEXO | pfK13 | pfpm2 |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|----------|-------|-------------|
| 188 | PT.2.34 | Gia Lai | 30 | Nam | 39,30 | 532 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 189 | PT.2.35 | Gia Lai | 28 | Nam | 39,00 | 10826 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 190 | PT.2.35 | Gia Lai | 28 | Nam | 39,00 | 11563 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 191 | PT.2.36 | Gia Lai | 38 | Nam | 39,00 | 17001 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 192 | PT.2.37 | Gia Lai | 52 | Nữ | 39,00 | 59388 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 193 | PT.2.38 | Gia Lai | 55 | Nam | 39,00 | 15584 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 194 | PT.2.39 | Gia Lai | 27 | Nam | 38,50 | 44492 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 195 | PT.2.40 | Gia Lai | 27 | Nam | 38,50 | 11814 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 196 | PT.2.41 | Gia Lai | 47 | Nam | 39,00 | 2356 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 197 | PT.2.42 | Gia Lai | 51 | Nam | 39,00 | 99727 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 198 | PT.2.43 | Gia Lai | 30 | Nam | 39,50 | 1517 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 199 | PT.2.44 | Gia Lai | 38 | Nữ | 38,00 | 12794 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 200 | PT.2.45 | Gia Lai | 40 | Nam | 39,00 | 51743 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 201 | PT.2.46 | Gia Lai | 18 | Nam | 39,00 | 43130 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 202 | PT.2.47 | Gia Lai | 30 | Nam | 38,00 | 97361 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 203 | PT.2.48 | Gia Lai | 33 | Nam | 39,00 | 9911 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 204 | PT.2.49 | Gia Lai | 32 | Nam | 39,00 | 17403 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 205 | PT.2.50 | Gia Lai | 26 | Nam | 38,00 | 17403 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 206 | PT.2.51 | Gia Lai | 29 | Nam | 39,00 | 1447 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 207 | PT.2.52 | Gia Lai | 33 | Nam | 38,50 | 332 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 208 | PT.2.53 | Gia Lai | 25 | Nam | 39,00 | 14894 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 209 | PT.2.54 | Gia Lai | 38 | Nam | 38,50 | 4750 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 210 | PT.2.55 | Gia Lai | 34 | Nam | 39,00 | 9226 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 211 | PT.2.56 | Gia Lai | 33 | Nam | 39,00 | 6139 | E415G | C580Y | 1 bản sao |

Handwritten signature and mark

Red stamp: S RA

| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | <i>pfEXO</i> | <i>pfK13</i> | <i>pfpm2</i> |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| 212 | PT.2.57 | Gia Lai | 21 | Nam | 38,00 | 2627 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 213 | PT.2.58 | Gia Lai | 20 | Nam | 38,00 | 35029 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 214 | PT.2.59 | Gia Lai | 33 | Nam | 38,00 | 17024 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 215 | PT.2.60 | Gia Lai | 28 | Nam | 38,50 | 2795 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 216 | PT.2.61 | Gia Lai | 28 | Nam | 39,00 | 532 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 217 | PT.2.62 | Gia Lai | 41 | Nam | 38,00 | 10826 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 218 | PT.2.63 | Gia Lai | 28 | Nam | 38,00 | 11563 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 219 | PT.2.64 | Gia Lai | 25 | Nam | 39,00 | 17001 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 220 | PT.2.65 | Gia Lai | 37 | Nam | 38,00 | 1209 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 221 | PT.2.66 | Gia Lai | 35 | Nam | 39,00 | 15584 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 222 | PT.2.67 | Gia Lai | 32 | Nam | 38,50 | 3298 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 223 | PT.2.69 | Gia Lai | 45 | Nam | 38,00 | 11814 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 224 | PT.2.70 | Gia Lai | 40 | Nam | 38,50 | 2356 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 225 | PT.2.71 | Gia Lai | 24 | Nam | 39,00 | 193 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 226 | PT.2.72 | Gia Lai | 21 | Nam | 39,00 | 4750 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 227 | PT.2.73 | Gia Lai | 42 | Nam | 38,00 | 9226 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 228 | PT.2.74 | Gia Lai | 24 | Nữ | 38,50 | 6139 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 229 | PT.2.75 | Gia Lai | 36 | Nam | 38,50 | 2627 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 230 | PT.2.76 | Gia Lai | 43 | Nam | 39,00 | 35029 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 231 | PT.2.77 | Gia Lai | 25 | Nam | 38,50 | 17024 | E415G | Kiểu đại | > 1 bản sao |
| 232 | PT.2.78 | Gia Lai | 15 | Nam | 38,50 | 2795 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 233 | PT.2.79 | Gia Lai | 21 | Nam | 38,50 | 532 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 234 | PT.2.80 | Gia Lai | 25 | Nam | 38,00 | 10826 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 235 | PT.2.81 | Gia Lai | 29 | Nam | 38,50 | 11563 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |

| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | pfEXO | pfK13 | pfpm2 |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|----------|----------|-------------|
| 236 | PT.2.82 | Gia Lai | 36 | Nam | 38,50 | 17001 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 237 | PT.2.83 | Gia Lai | 18 | Nữ | 39,00 | 59388 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 238 | PT.2.84 | Gia Lai | 38 | Nam | 38,50 | 15584 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 239 | PT.2.85 | Gia Lai | 32 | Nam | 38,00 | 44492 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 240 | PT.2.86 | Gia Lai | 53 | Nam | 39,00 | 11814 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 241 | PT.2.87 | Gia Lai | 54 | Nam | 38,50 | 2356 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 242 | PT.2.88 | Gia Lai | 18 | Nam | 38,50 | 99727 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 243 | PT.2.90 | Gia Lai | 40 | Nữ | 38,00 | 4750 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 244 | PT.2.91 | Gia Lai | 31 | Nam | 39,00 | 9226 | Kiểu đại | C580Y | |
| 245 | PT.2.92 | Đắk Lắk | 37 | Nam | 38,40 | 6139 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 246 | PT.2.93 | Đắk Lắk | 39 | Nam | 38,50 | 2627 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 247 | PT.2.94 | Đắk Lắk | 28 | Nam | 38,20 | 35029 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 248 | PT.2.95 | Đắk Lắk | 30 | Nam | 38,70 | 17024 | Kiểu đại | Kiểu đại | 1 bản sao |
| 249 | PT.2.96 | Đắk Lắk | 27 | Nam | 37,60 | 2795 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 250 | PT.2.97 | Đắk Lắk | 35 | Nam | 37,80 | 532 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 251 | PT.2.98 | Đắk Lắk | 37 | Nam | 39,40 | 10826 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 252 | PT.2.99 | Đắk Lắk | 18 | Nam | 38,00 | 11563 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 253 | PT.2.100 | Đắk Lắk | 22 | Nam | 38,40 | 17001 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 254 | PT.2.101 | Đắk Lắk | 25 | Nam | 39,40 | 988 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 255 | PT.2.102 | Đắk Lắk | 22 | Nam | 38,50 | 15584 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 256 | PT.2.103 | Đắk Lắk | 18 | Nam | 37,60 | 563 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 257 | PT.2.104 | Đắk Lắk | 40 | Nam | 37,40 | 814 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 258 | PT.2.105 | Đắk Lắk | 36 | Nam | 38,50 | 2356 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 259 | PT.2.106 | Đắk Lắk | 38 | Nam | 37,30 | 3421 | E415G | C580Y | 1 bản sao |

Handwritten signature or mark in blue ink.



| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | p/EXO | p/K13 | p/PM2 |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|----------|-------|-------------|
| 260 | PT.2.107 | Đắk Lắk | 31 | Nam | 38,40 | 4750 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 261 | PT.2.108 | Đắk Lắk | 24 | Nam | 38,50 | 9226 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 262 | PT.2.109 | Đắk Lắk | 32 | Nam | 39,00 | 6139 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 263 | PT.2.110 | Đắk Lắk | 36 | Nam | 37,90 | 2627 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 264 | PT.2.111 | Đắk Lắk | 33 | Nam | 38,50 | 35029 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 265 | PT.2.112 | Đắk Lắk | 35 | Nam | 38,00 | 17024 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 266 | PT.2.113 | Đắk Lắk | 51 | Nam | 39,50 | 2795 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 267 | PT.2.114 | Đắk Lắk | 26 | Nam | 39,50 | 673 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 268 | PT.2.115 | Đắk Lắk | 44 | Nam | 39,50 | 10826 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 269 | PT.2.116 | Đắk Lắk | 40 | Nam | 38,50 | 11563 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 270 | PT.2.117 | Đắk Lắk | 27 | Nam | 38,50 | 17001 | | C580Y | 1 bản sao |
| 271 | PT.2.118 | Đắk Lắk | 47 | Nam | 39,00 | 59388 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 272 | PT.2.119 | Đắk Lắk | 34 | Nam | 38,50 | 15584 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 273 | PT.2.120 | Đắk Lắk | 30 | Nam | 39,00 | 44492 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 274 | PT.2.121 | Đắk Lắk | 18 | Nam | 38,50 | 11814 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 275 | PT.2.122 | Đắk Lắk | 32 | Nam | 39,50 | 2356 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 276 | PT.2.123 | Đắk Lắk | 44 | Nam | 39,00 | 99727 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 277 | PT.2.124 | Đắk Lắk | 33 | Nam | 38,00 | 892 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 278 | PT.2.125 | Đắk Lắk | 30 | Nam | 39,00 | 7495 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 279 | PT.2.126 | Đắk Lắk | 36 | Nam | 39,00 | 6451 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 280 | PT.2.127 | Đắk Lắk | 42 | Nam | 38,50 | 3124 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 281 | PT.2.128 | Đắk Lắk | 36 | Nam | 38,50 | 2935 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 282 | PT.2.129 | Đắk Lắk | 35 | Nam | 38,50 | 2269 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 283 | PT.2.130 | Đắk Lắk | 36 | Nam | 38,00 | 540 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |

| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | pfEXO | pfK13 | pfpm2 |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|-------|----------|-------------|
| 284 | PT.2.131 | Đắk Lắk | 33 | Nam | 38,00 | 9376 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 285 | PT.2.132 | Đắk Lắk | 33 | Nam | 39,00 | 778 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 286 | PT.3.01 | Gia Lai | 42 | Nam | 38,50 | 9338 | E415G | Kiểu đại | 1 bản sao |
| 287 | PT.3.02 | Gia Lai | 36 | Nam | 38,00 | 644 | E415G | Kiểu đại | 1 bản sao |
| 288 | PT.3.03 | Gia Lai | 38 | Nam | 38,00 | 6441 | E415G | Kiểu đại | 1 bản sao |
| 289 | PT.3.04 | Gia Lai | 38 | Nam | 39,00 | 5035 | E415G | Kiểu đại | 1 bản sao |
| 290 | PT.3.05 | Gia Lai | 29 | Nam | 38,00 | 1693 | E415G | Kiểu đại | > 1 bản sao |
| 291 | PT.3.06 | Gia Lai | 31 | Nữ | 38,00 | 1140 | E415G | Kiểu đại | |
| 292 | PT.3.07 | Gia Lai | 40 | Nữ | 38,50 | 1785 | E415G | Kiểu đại | > 1 bản sao |
| 293 | PT.3.08 | Gia Lai | 28 | Nam | 38,50 | 1699 | E415G | Kiểu đại | > 1 bản sao |
| 294 | PT.3.09 | Gia Lai | 38 | Nữ | 39,00 | 1883 | E415G | Kiểu đại | > 1 bản sao |
| 295 | PT.3.10 | Gia Lai | 23 | Nữ | 38,50 | 1471 | E415G | Kiểu đại | 1 bản sao |
| 296 | PT.3.12 | Gia Lai | 30 | Nam | 39,00 | 73353 | E415G | Kiểu đại | > 1 bản sao |
| 297 | PT.3.13 | Gia Lai | 33 | Nam | 38,50 | 4250 | E415G | Kiểu đại | > 1 bản sao |
| 298 | PT.3.15 | Gia Lai | 29 | Nam | 39,00 | 8255 | E415G | | > 1 bản sao |
| 299 | PT.3.16 | Gia Lai | 31 | Nam | 39,00 | 5493 | E415G | | > 1 bản sao |
| 300 | PT.3.17 | Gia Lai | 34 | Nam | 38,00 | 2351 | E415G | | |
| 301 | PT.3.18 | Gia Lai | 22 | Nam | 38,50 | 31342 | E415G | | 1 bản sao |
| 302 | PT.3.19 | Gia Lai | 19 | Nam | 39,00 | 15232 | E415G | | > 1 bản sao |
| 303 | PT.3.20 | Gia Lai | 29 | Nam | 39,00 | 2501 | E415G | | > 1 bản sao |
| 304 | PT.3.22 | Gia Lai | 40 | Nam | 38,50 | 223 | E415G | | 1 bản sao |
| 305 | PT.3.23 | Gia Lai | 33 | Nam | 38,00 | 9686 | E415G | | > 1 bản sao |
| 306 | PT.3.24 | Gia Lai | 28 | Nam | 39,00 | 10346 | E415G | | > 1 bản sao |
| 307 | PT.3.25 | Gia Lai | 40 | Nam | 38,50 | 15211 | E415G | | > 1 bản sao |

[Handwritten signature]

[Red stamp]

| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | pEXO | pFK13 | pfpM2 |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|-------|-------|-------------|
| 308 | PT.3.27 | Gia Lai | 59 | Nam | 38,50 | 53136 | E415G | | 1 bản sao |
| 309 | PT.3.28 | Gia Lai | 30 | Nam | 38,50 | 13944 | E415G | | 1 bản sao |
| 310 | PT.3.29 | Gia Lai | 26 | Nam | 38,00 | 39808 | E415G | | 1 bản sao |
| 311 | PT.3.30 | Gia Lai | 49 | Nam | 38,00 | 10570 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 312 | PT.3.31 | Gia Lai | 26 | Nam | 38,50 | 2108 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 313 | PT.3.32 | Gia Lai | 30 | Nam | 39,00 | 721 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 314 | PT.3.33 | Gia Lai | 37 | Nam | 39,00 | 1357 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 315 | PT.3.34 | Gia Lai | 26 | Nam | 38,00 | 11447 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 316 | PT.3.35 | Gia Lai | 39 | Nam | 38,50 | 297 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 317 | PT.3.37 | Gia Lai | 32 | Nam | 38,00 | 487 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 318 | PT.3.38 | Gia Lai | 25 | Nam | 38,50 | 711 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 319 | PT.3.39 | Gia Lai | 20 | Nam | 38,50 | 621 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 320 | PT.3.40 | Gia Lai | 34 | Nam | 39,00 | 15571 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 321 | PT.3.41 | Gia Lai | 60 | Nam | 38,00 | 548 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 322 | PT.3.42 | Gia Lai | 25 | Nam | 38,50 | 1295 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 323 | PT.3.43 | Gia Lai | 55 | Nam | 39,50 | 297 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 324 | PT.3.44 | Gia Lai | 34 | Nam | 39,50 | 428 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 325 | PT.3.45 | Gia Lai | 46 | Nam | 39,00 | 4250 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 326 | PT.3.46 | Gia Lai | 33 | Nam | 38,00 | 8255 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 327 | PT.3.47 | Gia Lai | 34 | Nam | 38,00 | 5493 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 328 | PT.3.48 | Gia Lai | 21 | Nam | 38,00 | 2351 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 329 | PT.3.49 | Gia Lai | 23 | Nam | 38,50 | 31342 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 330 | PT.3.50 | Gia Lai | 30 | Nam | 39,00 | 15232 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 331 | PT.3.51 | Gia Lai | 21 | Nam | 38,50 | 2501 | E415G | C580Y | 1 bản sao |

| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | pfEXO | pfK13 | pfpm2 |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|-------|-------|-------------|
| 332 | PT.3.52 | Gia Lai | 27 | Nam | 38,00 | 476 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 333 | PT.3.53 | Gia Lai | 25 | Nam | 38,50 | 9686 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 334 | PT.3.54 | Gia Lai | 25 | Nam | 38,50 | 10346 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 335 | PT.3.55 | Gia Lai | 55 | Nam | 38,50 | 15211 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 336 | PT.3.56 | Gia Lai | 30 | Nam | 38,50 | 3137 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 337 | PT.3.57 | Gia Lai | 37 | Nam | 38,50 | 13944 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 338 | PT.3.58 | Gia Lai | 37 | Nam | 39,00 | 9867 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 339 | PT.3.59 | Gia Lai | 28 | Nam | 38,50 | 10570 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 340 | PT.3.60 | Gia Lai | 35 | Nam | 38,50 | 2108 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 341 | PT.3.61 | Gia Lai | 30 | Nam | 38,00 | 5632 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 342 | PT.3.62 | Gia Lai | 25 | Nam | 39,00 | 4250 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 343 | PT.3.65 | Gia Lai | 31 | Nam | 39,00 | 8255 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 344 | PT.3.66 | Gia Lai | 36 | Nam | 38,50 | 5493 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 345 | PT.3.67 | Gia Lai | 56 | Nam | 39,00 | 2351 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 346 | PT.3.68 | Gia Lai | 30 | Nam | 38,50 | 31342 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 347 | PT.3.69 | Gia Lai | 57 | Nam | 38,50 | 15232 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 348 | PT.3.70 | Gia Lai | 27 | Nam | 38,00 | 2501 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 349 | PT.3.72 | Đắk Lắk | 18 | Nam | 38,50 | 476 | | C580Y | 1 bản sao |
| 350 | PT.3.73 | Đắk Lắk | 45 | Nam | 39,00 | 9686 | | C580Y | > 1 bản sao |
| 351 | PT.3.74 | Đắk Lắk | 30 | Nam | 38,00 | 10346 | | C580Y | > 1 bản sao |
| 352 | PT.3.75 | Đắk Lắk | 45 | Nam | 38,50 | 15211 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 353 | PT.3.76 | Đắk Lắk | 47 | Nam | 38,50 | 53136 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 354 | PT.3.77 | Đắk Lắk | 47 | Nam | 39,00 | 13944 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 355 | PT.3.78 | Đắk Lắk | 47 | Nam | 38,50 | 39808 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |

[Handwritten signature]



| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | p/EXO | p/KI3 | p/pm2 |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|----------|----------|-------------|
| 356 | PT.3.79 | Đắk Lắk | 42 | Nam | 38,50 | 10570 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 357 | PT.3.80 | Đắk Lắk | 33 | Nam | 38,00 | 2108 | | C580Y | 1 bản sao |
| 358 | PT.3.81 | Đắk Lắk | 29 | Nam | 38,00 | 639 | | C580Y | 1 bản sao |
| 359 | PT.3.82 | Đắk Lắk | 30 | Nam | 38,00 | 4250 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 360 | PT.3.83 | Đắk Lắk | 32 | Nam | 39,00 | 596 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 361 | PT.3.84 | Đắk Lắk | 41 | Nam | 38,00 | 494 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 362 | PT.3.85 | Đắk Lắk | 43 | Nam | 38,50 | 2531 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 363 | PT.3.87 | Đắk Lắk | 18 | Nam | 38,50 | 321 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 364 | PT.3.88 | Đắk Lắk | 52 | Nam | 38,50 | 15232 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 365 | PT.3.89 | Đắk Lắk | 35 | Nam | 39,20 | 2501 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 366 | PT.3.90 | Đắk Lắk | 54 | Nam | 38,50 | 476 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 367 | PT.3.93 | Đắk Lắk | 39 | Nam | 39,20 | 687 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 368 | PT.3.94 | Đắk Lắk | 44 | Nam | 39,30 | 367 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 369 | PT.3.95 | Đắk Lắk | 36 | Nam | 38,70 | 212 | | C580Y | 1 bản sao |
| 370 | PT.3.96 | Đắk Lắk | 60 | Nam | 38,70 | 564 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 371 | PT.3.97 | Đắk Lắk | 34 | Nam | 38,70 | 944 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 372 | PT.3.98 | Đắk Lắk | 34 | Nam | 39,00 | 809 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 373 | PT.3.99 | Đắk Lắk | 28 | Nam | 39,50 | 9856 | E415G | Kiểu đại | > 1 bản sao |
| 374 | PT.3.100 | Đắk Lắk | 23 | Nam | 39,40 | 2108 | E415G | Kiểu đại | > 1 bản sao |
| 375 | PT.3.101 | Đắk Lắk | 30 | Nam | 39,50 | 649 | E415G | Kiểu đại | > 1 bản sao |
| 376 | PT.3.103 | Đắk Lắk | 36 | Nam | 40,20 | 250 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 377 | PT.3.104 | Đắk Lắk | 37 | Nam | 39,50 | 255 | Kiểu đại | | 1 bản sao |
| 378 | PT.3.105 | Đắk Lắk | 23 | Nữ | 38,70 | 494 | E415G | | 1 bản sao |
| 379 | PT.3.106 | Đắk Lắk | 32 | Nam | 40,20 | 2351 | E415G | | 1 bản sao |

| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | pfEXO | pfK13 | pfpm2 |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|----------|-------|-------------|
| 380 | PT.3.107 | Đắk Lắk | 18 | Nam | 38,90 | 342 | E415G | | 1 bản sao |
| 381 | PT.3.108 | Đắk Lắk | 19 | Nam | 40,00 | 232 | E415G | | > 1 bản sao |
| 382 | PT.3.109 | Đắk Lắk | 24 | Nam | 40,50 | 2501 | E415G | | > 1 bản sao |
| 383 | PT.3.110 | Đắk Lắk | 18 | Nam | 39,80 | 476 | E415G | | 1 bản sao |
| 384 | PT.3.111 | Đắk Lắk | 51 | Nam | 40,30 | 9686 | E415G | | > 1 bản sao |
| 385 | PT.3.112 | Gia Lai | 38 | Nam | 38,30 | 346 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 386 | PT.3.113 | Gia Lai | 44 | Nam | 36,50 | 212 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 387 | PT.3.114 | Gia Lai | 30 | Nam | 36,30 | 3137 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 388 | PT.3.115 | Gia Lai | 31 | Nam | 39,40 | 944 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 389 | PT.3.117 | Gia Lai | 37 | Nam | 38,60 | 809 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 390 | PT.3.118 | Gia Lai | 37 | Nam | 39,00 | 571 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 391 | PT.3.119 | Gia Lai | 31 | Nam | 38,30 | 2108 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 392 | PT.3.120 | Gia Lai | 24 | Nam | 38,60 | 230 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 393 | PT.3.121 | Gia Lai | 27 | Nam | 37,80 | 1239 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 394 | PT.3.122 | Gia Lai | 22 | Nam | 38,00 | 6706 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 395 | PT.3.123 | Gia Lai | 38 | Nam | 38,10 | 5772 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 396 | PT.3.124 | Gia Lai | 25 | Nam | 36,60 | 2795 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 397 | PT.3.125 | Gia Lai | 52 | Nam | 39,40 | 2626 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 398 | PT.3.126 | Gia Lai | 24 | Nam | 38,50 | 2030 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 399 | PT.3.127 | Gia Lai | 35 | Nam | 40,00 | 483 | E415G | C580Y | > 1 bản sao |
| 400 | PT.3.128 | Gia Lai | 38 | Nam | 38,50 | 8389 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 401 | PT.3.129 | Gia Lai | 50 | Nam | 39,90 | 195 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 402 | PT.3.130 | Gia Lai | 18 | Nam | 40,00 | 356 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 403 | PT.3.131 | Gia Lai | 19 | Nam | 38,80 | 576 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |



Handwritten signature and initials in blue ink.

| STT | Mã bệnh nhân | Tỉnh thành | Tuổi | Giới tính | Nhiệt độ | Mật độ ký sinh trùng sốt rét | p/EXO | p/fK13 | p/psm2 |
|-----|--------------|------------|------|-----------|----------|------------------------------|----------|--------|-------------|
| 404 | PT.3.132 | Gia Lai | 45 | Nam | 38,80 | 764 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 405 | PT.3.133 | Gia Lai | 18 | Nam | 38,20 | 1124 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 406 | PT.3.134 | Gia Lai | 18 | Nam | 37,80 | 516 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 407 | PT.3.137 | Gia Lai | 21 | Nam | 38,50 | 1020 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 408 | PT.3.138 | Gia Lai | 18 | Nam | 38,30 | 597 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 409 | PT.3.139 | Gia Lai | 18 | Nam | 38,00 | 1520 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 410 | PT.3.140 | Gia Lai | 32 | Nam | 38,00 | 686 | E415G | C580Y | 1 bản sao |
| 411 | PT.3.142 | Gia Lai | 54 | Nam | 36,00 | 1316 | Kiểu đại | C580Y | 1 bản sao |
| 412 | PT.3.143 | Gia Lai | 37 | Nam | 38,00 | 768 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 413 | PT.3.144 | Gia Lai | 34 | Nam | 37,50 | 327 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 414 | PT.3.145 | Gia Lai | 18 | Nam | 37,20 | 861 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 415 | PT.3.146 | Gia Lai | 58 | Nam | 38,00 | 1128 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 416 | PT.3.147 | Gia Lai | 34 | Nam | 40,00 | 552 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 417 | PT.3.148 | Gia Lai | 18 | Nam | 38,00 | 918 | Kiểu đại | C580Y | > 1 bản sao |
| 418 | PT.3.149 | Gia Lai | 18 | Nam | 38,30 | 3218 | Kiểu đại | | > 1 bản sao |
| 419 | PT.3.150 | Gia Lai | 19 | Nam | 42,00 | 467 | | | > 1 bản sao |
| 420 | PT.3.151 | Gia Lai | 44 | Nam | 38,80 | 318 | | | |
| 421 | PT.3.152 | Đăk Lăk | 22 | Nữ | 38,20 | 1791 | | | |

BIÊN BẢN BÀN GIAO MẪU NGHIÊN CỨU

Hôm nay, ngày 29 tháng 5 năm 2019, Chúng tôi đại diện Bên bàn giao mẫu và đại diện Bên nhận mẫu tiến hành bàn giao mẫu nghiên cứu theo thoả thuận phối hợp thực hiện nghiên cứu, cụ thể như sau:

Bên giao mẫu: Viện Sốt Rét - Ký Sinh Trùng – Côn Trùng Trung Ương.

Địa chỉ: Số 34 Đường Trung Văn, Trung Văn, Nam Từ Liêm, Hà Nội.

Đại diện: PGS.TS. Bùi Quang Phúc

Chức vụ: Trưởng khoa Nghiên cứu lâm sàng và thực nghiệm.

Bên nhận mẫu: Học Viện Quân Y

Địa chỉ: Số 160 Đường Phùng Hưng, Hà Đông, Hà Nội

Đại diện là: Ths. Trần Thị Thu Huyền

Chức vụ: Nghiên cứu viên.

Bên giao bàn giao cho bên nhận 63 mẫu máu toàn phần của bệnh nhân sốt rét và thông tin kèm theo (*Chi tiết trong phụ lục đính kèm*).

Hai bên cam kết thực hiện các điều khoản đã ký và tuân thủ quy định về Y đức trong nghiên cứu ./.

Đại diện bên giao mẫu
(Ký, ghi rõ họ tên)

PGS.TS. Bùi Quang Phúc

Đại diện bên nhận mẫu
(Ký, ghi rõ họ tên)

Ths. Trần Thị Thu Huyền

| STT | ID | Địa điểm | Tuổi | Giới | Cân nặng | Chiều cao | Nhiệt độD0 | MDKST D0 | Nhiệt độ D1 | MDKST D1 | Nhiệt độ D2 | MDKST D2 | Nhiệt độ D3 | MDKS TD3 | Nhiệt độ D7 | MDKST D7 | Nhiệt độ D14 | MDKST D14 | MDKS T D21 | Nhiệt độ D28 | MDKST D28 | Nhiệt độ D35 | MDKST D35 | Nhiệt độ D42 | MDKST D42 | |
|-----|-------|------------|-------|------|----------|-----------|------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|--------------|-----------|------------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|-------|
| 1 | D1.1 | Đặc Nồng | 21.00 | Nam | 49.00 | 159 | 38.60 | 1242 | 37.40 | 0 | 36.80 | 0 | 36.40 | 0 | 36.80 | 0 | 36.4 | 0 | 36.5 | 0 | 36.8 | 0 | 36.9 | 0 | 36.9 | 0 |
| 2 | D1.2 | Đặc Nồng | 32.00 | Nam | 61.00 | 168 | 39.10 | 9346 | 37.00 | 605 | 36.60 | 22 | 36.40 | 0 | 36.90 | 0 | 37.0 | 0 | 36.6 | 0 | 36.5 | 0 | 36.9 | 0 | 36.5 | 0 |
| 3 | D1.3 | Đặc Nồng | 32.00 | Nam | 48.00 | 160.00 | 38.20 | 18980 | 37.20 | 890 | 36.80 | 793 | 36.50 | 79 | 36.50 | 0 | 36.8 | 0 | 36.5 | 0 | 36.4 | 0 | 37.0 | 0 | 36.8 | 0 |
| 4 | D1.4 | Đặc Nồng | 43.00 | Nam | 50.00 | 168.00 | 37.60 | 1053 | 38.80 | 0 | 36.80 | 0 | 36.50 | 0 | 36.60 | 0 | 36.4 | 0 | 36.9 | 0 | 36.3 | 0 | 37.0 | 0 | 36.6 | 0 |
| 5 | D1.5 | Đặc Nồng | 28.00 | Nam | 60.00 | 168.00 | 38.10 | 1254 | 37.00 | 63 | 36.40 | 0 | 36.80 | 0 | 36.50 | 0 | 36.8 | 0 | 36.6 | 0 | 36.4 | 0 | 36.7 | 0 | 36.5 | 0 |
| 6 | D1.6 | Đặc Nồng | 22.00 | Nam | 55.00 | 162.00 | 37.80 | 13393 | 36.90 | 1313 | 36.80 | 239 | 36.50 | 18 | 36.40 | 0 | 36.9 | 0 | 36.6 | 0 | 36.5 | 0 | 36.8 | 0 | 37.0 | 0 |
| 7 | D1.7 | Đặc Nồng | 22.00 | Nam | 58.00 | 172.00 | 38.20 | 2992 | 37.00 | 790 | 36.40 | 19 | 36.60 | 0 | 36.80 | 0 | 36.7 | 0 | 36.8 | 0 | 36.5 | 0 | 36.8 | 0 | 37.0 | 0 |
| 8 | D1.8 | Đặc Nồng | 43.00 | Nam | 64.50 | 173.00 | 38.60 | 4751 | 37.50 | 26 | 37.00 | 0 | 36.60 | 0 | 36.90 | 0 | 36.8 | 0 | 36.6 | 0 | 36.5 | 0 | 36.8 | 0 | 37.0 | 0 |
| 9 | D1.9 | Đặc Nồng | 52.00 | Nam | 48.00 | 163.00 | 38.20 | 100571 | 36.90 | 6977 | 36.90 | 0 | 36.60 | 0 | 36.50 | 0 | 36.8 | 0 | 36.9 | 0 | 36.9 | 0 | 36.7 | 0 | 36.8 | 0 |
| 10 | D1.10 | Đặc Nồng | 41.00 | Nam | 54.00 | 158.00 | 37.80 | 1941 | 36.80 | 168 | 36.60 | 0 | 36.70 | 0 | 36.80 | 0 | 36.9 | 0 | 36.6 | 0 | 36.9 | 0 | 36.8 | 0 | 36.9 | 0 |
| 11 | D1.11 | Đặc Nồng | 28.00 | Nam | 66.00 | 172.00 | 38.10 | 3177 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | D1.12 | Đặc Nồng | 26.00 | Nam | 58.00 | 169.00 | 37.90 | 1965 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | D1.13 | Đặc Nồng | 36.00 | Nam | 64.00 | 173.00 | 37.70 | 66518 | 37.00 | 6208 | 36.60 | 109 | 36.90 | 0 | 36.60 | 0 | 36.9 | 0 | 36.8 | 0 | 36.8 | 0 | 36.6 | 0 | 36.9 | 0 |
| 14 | D1.14 | Đặc Nồng | 34.00 | Nam | 57.00 | 164.00 | 39.10 | 13582 | 37.30 | 1990 | 36.70 | 140 | 36.80 | 0 | 36.90 | 0 | 36.8 | 0 | 36.9 | 0 | 36.8 | 0 | 36.6 | 0 | 36.9 | 0 |
| 15 | D1.15 | Đặc Nồng | 30.00 | Nữ | 45.00 | 154.00 | 37.90 | 1740 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | D1.16 | Bình Phước | 18.00 | Nam | 57.00 | 168.00 | 38.80 | 30343 | 37.60 | 7399 | 37.50 | 234 | 37.00 | 0 | 36.50 | 0 | 36.5 | 0 | 36.6 | 0 | 36.6 | 0 | 36.7 | 0 | 36.7 | 0 |
| 17 | D1.17 | Bình Phước | 30.00 | Nam | 61.00 | 170.00 | 38.60 | 1547 | 36.70 | 318 | 36.80 | 0 | 36.40 | 0 | 36.60 | 0 | 36.7 | 0 | 36.7 | 0 | 36.6 | 0 | 36.6 | 0 | 36.6 | 0 |
| 18 | D1.18 | Bình Phước | 22.00 | Nam | 59.00 | 170.00 | 38.60 | 4554 | 36.70 | 872 | 36.80 | 133 | 36.40 | 0 | 36.60 | 0 | 36.8 | 0 | 36.7 | 0 | 36.6 | 0 | 36.6 | 0 | 36.8 | 0 |
| 19 | D1.19 | Bình Phước | 48.00 | Nam | 59.00 | 168.00 | 38.00 | 13449 | 37.50 | 1247 | 36.90 | 78 | 36.80 | 0 | 36.70 | 0 | 36.9 | 0 | 36.7 | 0 | 36.8 | 0 | 36.7 | 0 | 36.7 | 0 |
| 20 | D1.20 | Bình Phước | 33.00 | Nam | 58.00 | 161.00 | 39.00 | 9468 | 37.00 | 3294 | 36.60 | 159 | 36.80 | 0 | 36.60 | 0 | 36.4 | 0 | 36.5 | 0 | 36.8 | 0 | 36.5 | 0 | 36.9 | 0 |
| 21 | D1.21 | Bình Phước | 37.00 | Nam | 56.00 | 165.00 | 38.60 | 4357 | 37.00 | 78 | 36.90 | 0 | 36.60 | 0 | 36.60 | 0 | 36.6 | 0 | 36.7 | 0 | 36.6 | 0 | 36.7 | 0 | 36.9 | 0 |
| 22 | D1.22 | Bình Phước | 30.00 | Nam | 78.00 | 174.00 | 39.00 | 1192 | 36.90 | 875 | 36.90 | 0 | 36.80 | 0 | 36.80 | 0 | 36.9 | 0 | 36.7 | 0 | 36.6 | 0 | 36.8 | 0 | 36.8 | 0 |
| 23 | D1.23 | Bình Phước | 23.00 | Nam | 51.00 | 168.00 | 37.90 | 9592 | 37.00 | 78 | 36.60 | 26 | 36.40 | 0 | 36.40 | 0 | 36.8 | 0 | 36.9 | 0 | 36.6 | 0 | 36.8 | 0 | 36.8 | 0 |
| 24 | D1.24 | Bình Phước | 38.00 | Nữ | 51.00 | 168.00 | 39.00 | 60776 | 37.90 | 27351 | 36.70 | 640 | 36.70 | 63 | 36.80 | 0 | 36.8 | 0 | 36.9 | 0 | 36.8 | 0 | 36.9 | 0 | 36.9 | 0 |
| 25 | D1.25 | Bình Phước | 28.00 | Nam | 60.00 | 165.00 | 40.00 | 9821 | 38.00 | 429 | 36.90 | 0 | 36.80 | 0 | 36.80 | 0 | 36.7 | 0 | 36.9 | 0 | 36.9 | 0 | 36.8 | 0 | 36.9 | 0 |
| 26 | D1.26 | Bình Phước | 30.00 | Nam | 80.00 | 175.00 | 39.50 | 63272 | 37.30 | 44720 | 36.50 | 11789 | 37.00 | 1631 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 27 | D1.27 | Bình Phước | 41.00 | Nữ | 48.00 | 155.00 | 39.30 | 860 | 37.10 | 347 | 36.80 | 47 | 36.80 | 0 | 36.80 | 0 | 36.7 | 0 | 36.6 | 0 | 36.8 | 0 | 36.6 | 0 | 36.9 | 0 |
| 28 | D1.28 | Bình Phước | 30.00 | Nam | 59.00 | 163.00 | 39.50 | 796 | 37.30 | 0 | 36.80 | 0 | 36.90 | 0 | 36.90 | 0 | 36.8 | 0 | 36.8 | 0 | 36.7 | 0 | 36.6 | 0 | 36.7 | 0 |
| 29 | D1.29 | Bình Phước | 44.00 | Nam | 67.00 | 169.00 | 40.00 | 13480 | 36.70 | 8036 | 36.80 | 1271 | 36.80 | 0 | 36.80 | 0 | 36.8 | 0 | 36.8 | 0 | 36.7 | 0 | 36.6 | 0 | 36.9 | 0 |
| 30 | D1.30 | Bình Phước | 28.00 | Nam | 70.00 | 175.00 | 39.50 | 70344 | 36.90 | 11325 | 36.90 | 0 | 36.60 | 0 | 36.70 | 0 | 36.9 | 0 | 36.6 | 0 | 36.7 | 0 | 36.8 | 0 | 36.9 | 0 |
| 31 | D1.31 | Bình Phước | 50.00 | Nam | 70.00 | 171.00 | 38.00 | 1989 | 36.80 | 551 | 36.60 | 79 | 36.60 | 0 | 36.60 | 0 | 36.8 | 0 | 36.5 | 0 | 36.8 | 0 | 36.5 | 0 | 36.8 | 0 |
| 32 | D1.32 | Bình Phước | 25.00 | Nam | 65.00 | 170.00 | 39.00 | 1812 | 36.90 | 56 | 36.90 | 0 | 36.90 | 0 | 36.80 | 0 | 36.6 | 0 | 36.6 | 0 | 36.7 | 0 | 36.6 | 0 | 36.8 | 0 |
| 33 | D1.33 | Bình Phước | 30.00 | Nam | 68.00 | 167.00 | 39.00 | 12878 | 37.20 | 176 | 36.70 | 64 | 36.90 | 16 | 36.70 | 0 | 36.6 | 0 | 36.6 | 0 | 36.6 | 0 | 36.7 | 0 | 36.7 | 0 |
| 34 | D1.34 | Bình Phước | 22.00 | Nam | 51.00 | 160.00 | 38.00 | 16120 | 36.80 | 95 | 36.80 | 0 | 36.90 | 0 | 36.80 | 0 | 36.8 | 0 | 36.8 | 0 | 36.9 | 0 | 36.9 | 0 | 36.8 | 0 |
| 35 | D1.35 | Bình Phước | 30.00 | Nam | 64.00 | 172.00 | 38.40 | 20958 | 36.80 | 2930 | 36.50 | 0 | 36.60 | 0 | 36.70 | 0 | 36.5 | 0 | 36.9 | 0 | 36.6 | 0 | 36.6 | 0 | 36.6 | 0 |
| 36 | D1.36 | Bình Phước | 42.00 | Nam | 66.00 | 173.00 | 38.50 | 95428 | 36.60 | 24195 | 36.80 | 10000 | 36.80 | 286 | 36.60 | 0 | 36.6 | 0 | 36.6 | 0 | 36.7 | 0 | 36.6 | 0 | 36.9 | 0 |
| 37 | D1.37 | Bình Phước | 18.00 | Nam | 52.00 | 160.00 | 38.10 | 83200 | 36.90 | 29705 | 36.80 | 15681 | 36.50 | 63 | 36.60 | 0 | 36.6 | 0 | 36.7 | 0 | 36.7 | 0 | 36.9 | 0 | 36.9 | 0 |
| 38 | D1.38 | Bình Phước | 30.00 | Nam | 65.00 | 166.00 | 38.80 | 1057 | 37.10 | 172 | 36.80 | 47 | 36.80 | 0 | 36.80 | 0 | 36.8 | 0 | 36.8 | 0 | 36.9 | 0 | 36.9 | 0 | 36.9 | 0 |
| 39 | D1.39 | Bình Phước | 26.00 | Nam | 57.00 | 163.00 | 38.10 | 2388 | 36.80 | 15 | 36.80 | 0 | 36.60 | 0 | 36.50 | 0 | 36.9 | 0 | 36.8 | 0 | 36.8 | 0 | 36.8 | 0 | 36.8 | 0 |
| 40 | D1.40 | Đặc Nồng | 41.00 | Nam | 62.00 | 166.00 | 37.90 | 1000 | 36.90 | 0 | 36.80 | 0 | 36.60 | 0 | 36.40 | 0 | 36.5 | 0 | 36.8 | 0 | 36.7 | 0 | 36.6 | 0 | 36.6 | 0 |
| 41 | D1.42 | Đặc Nồng | 19.00 | Nam | 60.00 | 168.00 | 38.50 | 7773 | 37.20 | 780 | 36.80 | 94 | 36.50 | 0 | 36.40 | 0 | 36.5 | 0 | 36.8 | 0 | 36.7 | 0 | 36.6 | 0 | 36.6 | 0 |
| 42 | D1.43 | Đặc Nồng | 22.00 | Nam | 58.00 | 164.00 | 38.10 | 9708 | 36.90 | 2715 | 36.80 | 0 | 37.00 | 0 | 36.80 | 0 | 36.5 | 0 | 36.8 | 0 | 36.7 | 0 | 36.6 | 0 | 36.6 | 0 |
| 43 | D1.44 | Đặc Nồng | 24.00 | Nam | 56.00 | 170.00 | 39.10 | 154666 | 37.00 | 69000 | 36.90 | 2553 | 36.80 | 106 | 36.60 | 0 | 36.9 | 0 | 36.6 | 0 | 36.9 | 0 | 36.5 | 0 | 36.2 | 1078 |
| 44 | D1.45 | Bình Phước | 32.00 | Nam | 57.00 | 168.00 | 38.90 | 638 | 38.00 | 169 | 36.80 | 0 | 36.60 | 0 | 36.50 | 0 | 36.7 | 0 | 36.8 | 0 | 36.9 | 0 | 36.0 | 10653 | 36.0 | 10653 |
| 45 | D1.46 | Bình Phước | 24.00 | Nam | 54.00 | 153.00 | 38.50 | 560 | 36.60 | 92 | 36.80 | 0 | 36.60 | 0 | 36.60 | 0 | 36.7 | 0 | 36.8 | 0 | 36.8 | 0 | 37.8 | 151 | 37.8 | 151 |
| 46 | D1.47 | Bình Phước | 46.00 | Nam | 56.00 | 166.00 | 38.60 | 20400 | 36.80 | 12905 | 36.70 | 2213 | 36.70 | 263 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 47 | D1.48 | Bình Phước | 33.00 | Nam | 57.00 | 152.00 | 37.50 | 3722 | 36.70 | 17 | 36.40 | 0 | 36.40 | 0 | 36.60 | 0 | 36.8 | 0 | 36.7 | 0 | 36.8 | 0 | 36.0 | 10653 | 36.0 | 10653 |
| 48 | D1.49 | Bình Phước | 30.00 | Nam | 59.00 | 167.00 | 38.90 | 11960 | 36.80 | 2359 | 36.40 | 0 | 36.60 | 0 | 36.60 | 0 | 36.8 | 0 | 36.7 | 0 | 36.8 | 0 | 36.0 | 10653 | 36.0 | 10653 |
| 49 | D1.50 | Bình Phước | 24.00 | Nam | 54.00 | 173.00 | 38.60 | 31847 | 36.60 | 4059 | 36.70 | 53 | 36.60 | 0 | 36.60 | 0 | 36.8 | 0 | 36.7 | 0 | 36.8 | 0 | 36.0 | 10653 | 36.0 | 10653 |
| 50 | D1.51 | Bình Phước | 44.00 | Nam | 69.00 | 173.00 | 39.50 | 2080 | 36.90 | 192 | 36.90 | 0 | 36.70 | 0 | 36.70 | 0 | 36.8 | 0 | 36.7 | 0 | 36.8 | 0 | 36.0 | 10653 | 36.0 | 10653 |
| 51 | D1.52 | Bình Phước | 21.00 | Nam | 67.00 | 165.00 | 38.60 | 4216 | 36.90 | 311 | 36.80 | 0 | 36.80 | 0 | 36.80 | 0 | 36.8 | 0 | 36.6 | 0 | 36.5 | 0 | 37.8 | 95 | 37.8 | 95 |
| 52 | D1.53 | Bình Phước | 27.00 | Nam | 64.00 | 168.00 | 38.50 | 2218 | 37.30 | 31 | 37.00 | 0 | 36.80 | 0 | 36.80 | 0 | 36.7 | 0 | 36.8 | 0 | 36.8 | 0 | 36.0 | 10653 | 36.0 | 10653 |
| 53 | D1.54 | Bình Phước | 28.00 | Nam | 68.00 | 170.00 | 38.60 | 8846 | 37.00 | 126 | 36.80 | 0 | 36.70 | 0 | 36.80 | 0 | 36.7 | 0 | 36.9 | 0 | 36.8 | 0 | 36.0 | 10653 | 36.0 | 10653 |
| 54 | D1.55 | Bình Phước | 26.00 | Nam | 62.00 | 169.00 | 39.20 | 1954 | 38.60 | 169 | 36. | | | | | | | | | | | | | | | |

| STT | ID | Địa điểm | Tuổi | Giới | Cân nặng | Chiều cao | Nhiệt độ 0 | MDKST D0 | Nhiệt độ 1 | MDKST D1 | Nhiệt độ 2 | MDKST D2 | Nhiệt độ 3 | MDKS TD3 | Nhiệt độ 7 | MDKST D7 | Nhiệt độ 14 | MDKST ST D14 | Nhiệt độ 21 | MDKS T D21 | Nhiệt độ 28 | MDKST D28 | Nhiệt độ 35 | MDKST D35 | Nhiệt độ 42 | MDKST D42 |
|-----|------|------------|-------|------|----------|-----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|----------|-------------|--------------|-------------|------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|
| 62 | D163 | Bình Phước | 35.00 | Nam | 70.00 | 172.00 | 38.90 | 5449 | 36.80 | 1247 | 36.30 | 206 | 36.60 | 0 | 36.80 | 0 | 36.6 | — | 36.4 | 0 | 38.3 | 4884 | — | — | — | — |
| 63 | D164 | Bình Phước | 28.00 | Nam | 54.00 | 163.00 | 38.50 | 8199 | 36.70 | 1198 | 36.70 | 0 | 36.60 | 0 | 36.50 | 0 | 36.8 | — | 36.8 | 0 | 36.8 | 741 | — | — | — | — |

PHỤ LỤC 3:
QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT
***P. FALCIPARUM* BẰNG LAM MÁU SOI KÍNH HIỂN VI**

1. MỤC ĐÍCH VÀ PHẠM VI ÁP DỤNG

Quy trình này mô tả cách phát hiện và xác định chính xác ký sinh trùng sốt rét trong các tiêu bản máu nhuộm Giemsa bằng kính hiển vi. Tất cả các quy trình nêu ra đều là bắt buộc đối với tất cả các kỹ thuật viên kiểm tra sốt rét tại phòng thí nghiệm tham chiếu quốc gia, phòng thí nghiệm bệnh viện hoặc phòng thí nghiệm cơ sở y tế có thực hiện kiểm tra sốt rét.

2. CƠ SỞ

Việc xác định loại và giai đoạn của ký sinh trùng sốt rét và xác định mật độ ký sinh trùng là rất quan trọng trong việc quản lý lâm sàng bệnh nhân sốt rét, thử nghiệm hiệu quả thuốc, khảo sát dịch tễ học và các chương trình kiểm soát sốt rét. Do đó, chẩn đoán sốt rét dựa trên việc kiểm tra tiêu bản máu cần phải chính xác và số lượng ký sinh trùng phải được xác định một cách chính xác.

3. DỤNG CỤ, VẬT LIỆU VÀ THIẾT BỊ

- Kính hiển vi quang học, có mắt kính kép 10x, vật kính 10x, 40x và 100x, cùng bàn để tiêu bản cơ học (Có thể lắp thêm một vật kính đánh dấu hoặc vật kính 60x);
- Tiêu bản máu nhuộm Giemsa để kiểm tra;
- Dầu soi, loại A, chất lượng cao;
- Giấy lau kính;
- Bút và bút chì;
- Sổ đăng ký hoặc sổ ghi chép kết quả kiểm tra sốt rét;

4. QUY TRÌNH THỰC HIỆN

4.1. Kiểm tra tiêu bản máu dày

- Đặt tiêu bản máu nhuộm Giemsa trên bàn tiêu bản của kính hiển vi, sao cho nhãn tiêu bản ở bên trái và phần máu dày nằm dưới vật kính 10x;
- Bật kính hiển vi và điều chỉnh ánh sáng sao cho phù hợp;
- Đặt một giọt dầu soi lên phần máu dày;

- Quét qua tiêu bản và chọn một phần tiêu bản được nhuộm đều;
- Chuyển sang vật kính dầu 100x và để vật kính tiếp xúc với dầu;
- Sử dụng núm điều chỉnh tinh để lấy nét vào tiêu bản.

4.2. Xác định tiêu bản máu dày có chứa ký sinh trùng sốt rét và nhận diện loại ký sinh trùng

- Tiếp tục kiểm tra tiêu bản trong ít nhất 100 trường quan sát bằng vật kính 100x;
- Kiểm tra tối thiểu 100 trường quan sát trước khi kết luận không phát hiện ký sinh trùng sốt rét;
- Nếu phát hiện ký sinh trùng, tiếp tục kiểm tra thêm 100 trường quan sát để đảm bảo không bỏ sót nhiễm trùng hỗn hợp;
- Luôn kiểm tra tiêu bản máu mỏng để xác nhận loại ký sinh trùng;
- Xác định tất cả các loại ký sinh trùng và giai đoạn quan sát được, sau đó ghi vào sổ ghi chép kiểm tra sốt rét.

4.3. Kiểm tra tiêu bản máu mỏng để xác nhận loại ký sinh trùng và nhiễm trùng hỗn hợp

- Để xác nhận loại ký sinh trùng hoặc nhiễm trùng hỗn hợp sau khi kiểm tra tiêu bản máu dày, kiểm tra tiêu bản máu mỏng;
- Đặt một giọt dầu soi lên phần rìa mỏng của tiêu bản;
- Chuyển từ vật kính 10x sang vật kính dầu 100x và lấy nét vào tiêu bản;
- Kiểm tra phần rìa của tiêu bản máu mỏng, nơi các tế bào máu đỏ nằm cạnh nhau với mức độ chồng lấp tối thiểu;
- Tiếp tục kiểm tra tiêu bản máu mỏng cho đến khi xác nhận được sự hiện diện và loại ký sinh trùng sốt rét. Ghi lại tất cả các loại ký sinh trùng và giai đoạn quan sát được vào sổ ghi chép kiểm tra sốt rét.

5. LƯU Ý

Có thể tiến hành đếm ký sinh trùng trên tiêu bản máu mỏng nếu không có tiêu bản máu dày hoặc nếu tiêu bản máu dày bị nhuộm kém hoặc bị hỏng. Khi số lượng ký sinh trùng vượt quá 100 ký sinh trùng trong mỗi trường quan sát bằng vật kính dầu trên tiêu bản máu dày, nên sử dụng tiêu bản máu mỏng để tính mật độ ký sinh trùng.

6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

WHO. Bench aids for malaria diagnosis. Geneva, 2009.

WHO. Bench aids for the diagnosis of filarial infections. Geneva, 1997.

WHO. Bench aids for the morphological diagnosis of anaemia. Geneva, 2001.

WHO. QA manual for malaria microscopy, 2nd Edition. Geneva, 2015.

WHO. Basic malaria microscopy. Part I. Learner's guide. Second edition. Geneva, 2010.

WHO. National malaria slide bank standard operating procedures. Geneva, 2015.

PHỤ LỤC 4

QUY TRÌNH ĐẾM MẬT ĐỘ KÝ SINH TRÙNG SỐT RÉT

I. MỤC ĐÍCH VÀ PHẠM VI

Quy trình này mô tả cách đếm mật độ ký sinh trùng sốt rét. Tất cả các thủ tục trong quy trình này là bắt buộc đối với các chuyên viên soi ký sinh trùng tại các phòng thí nghiệm tham chiếu quốc gia, phòng thí nghiệm bệnh viện hoặc các cơ sở y tế thực hiện việc soi ký sinh trùng sốt rét.

II. DỤNG CỤ, VẬT LIỆU VÀ TRANG THIẾT BỊ

- Kính hiển vi với thị kính 10x và vật kính 10x, 40x và 100x, có bàn cơ học.
- Máy đếm nhiều khóa hoặc máy đếm hai khóa (một để đếm ký sinh trùng, một để đếm bạch cầu).
- Phiến kính máu đã nhuộm Giemsa.
- Dầu soi loại A.
- Giấy lau kính.
- Bút chì, bút bi.
- Máy tính cầm tay.

III. QUY TRÌNH THỰC HIỆN

3.1. Đếm Ký Sinh Trùng Trên Phiến Máu Dày

1. **Đặt phiến kính** lên bàn soi kính hiển vi với nhãn nằm ở bên trái.
2. **Kiểm tra mẫu** dưới vật kính 10x để tìm phần phiến có số lượng bạch cầu phân bố đều và nhuộm màu tốt.
3. **Nhỏ một giọt dầu soi** lên khu vực máu dày, tránh để đầu nhỏ tiếp xúc trực tiếp với lam kính.
4. **Chuyển sang vật kính 100x** (dầu soi) và sử dụng núm chỉnh tinh để lấy nét rõ.
5. **Đếm ký sinh trùng:**
 - Bắt đầu từ góc trên bên trái của phiến máu, di chuyển từng trường một theo chiều ngang.
 - Khi đếm, sử dụng máy đếm để ghi lại số lượng ký sinh trùng và bạch cầu trong mỗi trường.

6. Dừng đếm:

- Nếu đã đếm được ≥ 100 ký sinh trùng trong 200 bạch cầu, dừng lại và ghi nhận số ký sinh trùng/200 bạch cầu.
- Nếu đã đếm ≤ 99 ký sinh trùng trong 500 bạch cầu, dừng lại và ghi nhận số ký sinh trùng/500 bạch cầu.

7. Ghi kết quả vào sổ xét nghiệm.

Công thức tính mật độ ký sinh trùng trên phiến máu dày:

$$\text{Mật độ ký sinh trùng sốt rét (Ký sinh trùng}/\mu\text{l máu)} = \frac{\text{Số lượng ký sinh trùng đếm được} \times 8000}{\text{Số lượng bạch cầu đếm được}}$$

3. 2. Đếm Ký Sinh Trùng Trên Phiến Máu Mỏng

1. **Đặt phiến kính** lên bàn soi với nhãn ở bên trái.
2. **Nhỏ một giọt dầu soi** lên phần mỏng nhất của phiến máu.
3. **Chuyển sang vật kính 100x** (dầu soi) và điều chỉnh độ nét.
4. **Đếm ký sinh trùng:**
 - Bắt đầu từ mép mỏng của phiến, nơi các tế bào hồng cầu nằm rải rác và không chồng chéo.
 - Đếm số lượng hồng cầu nhiễm ký sinh trùng và hồng cầu không nhiễm ký sinh trùng trong 20 trường nhìn (khoảng 5000 hồng cầu).
5. **Ghi kết quả** vào sổ xét nghiệm.

Công thức tính mật độ ký sinh trùng trên phiến máu mỏng:

$$\text{Mật độ ký sinh trùng sốt rét (Ký sinh trùng}/\mu\text{l máu)} = \frac{\text{Số lượng hồng cầu nhiễm ký sinh trùng} \times 5000}{\text{Số lượng hồng cầu đếm được}}$$

4. Ghi Nhận Kết Quả:

- Ghi lại số lượng ký sinh trùng và bạch cầu (hoặc hồng cầu) đã đếm được trên phiếu xét nghiệm.
- Báo cáo kết quả theo đúng quy định trong quy trình của phòng thí nghiệm để đảm bảo tính chính xác và khách quan của kết quả xét nghiệm.

PHỤ LỤC 5

QUY TRÌNH LẤY MẪU BỆNH NHÂN VÀO GIẤY LỌC WHATMAN

1. Mục đích và phạm vi

Quy trình này nhằm mô tả cách chuẩn bị mẫu máu khô trên giấy lọc, phù hợp cho việc phân tích DNA. Quy trình này chỉ được điều chỉnh với sự phê duyệt của điều phối viên quốc gia về đảm bảo chất lượng xét nghiệm sốt rét.

Tất cả các bước trong quy trình này là bắt buộc đối với nhân viên xét nghiệm sốt rét làm việc tại phòng xét nghiệm tham chiếu quốc gia, phòng xét nghiệm bệnh viện hoặc phòng xét nghiệm y tế cơ bản có thực hiện xét nghiệm sốt rét.

Chỉ thu thập mẫu máu toàn phần đối với các bệnh nhân đã được xác định đơn nhiễm ký sinh trùng *P. falciparum* bằng kỹ thuật soi lam máu bằng kính hiển vi.

2. Bối cảnh

Xét nghiệm acid nucleic bằng phản ứng chuỗi polymerase (PCR) nhạy hơn trong chẩn đoán sốt rét so với phương pháp soi kính hiển vi, đặc biệt trong trường hợp nhiễm trùng hỗn hợp và có mật độ ký sinh trùng thấp. Một số mẫu trong phòng thí nghiệm có thể cần phân tích bằng PCR để xác nhận loài và tình trạng nhiễm trùng hỗn hợp. Các vết máu được thu thập trên giấy lọc cũng có thể được sử dụng để xác định kiểu gen ký sinh trùng, phân biệt tái phát tái nhiễm ký sinh trùng trong nghiên cứu in vivo về hiệu lực điều trị sốt rét.

3. Vật tư, nguyên liệu và thiết bị cần thiết

- Giấy lọc (Whatman FTA, Whatman 2 hoặc 3 hoặc Whatman 903) để phân tích kiểu gen và huyết thanh học.
- Micropipette có dung tích 20–200 μ L và các đầu tip dùng một lần.
- Túi nhựa ziplock, một túi cho mỗi bệnh nhân.
- Chất hút ẩm không chứa cobalt chloride (có thể sử dụng loại hút ẩm còn dư từ các túi xét nghiệm nhanh đã mở gần đây, nhưng phải không có thay đổi màu sắc; nếu không, cần mua chất hút ẩm từ thị trường).
- Máu toàn phần tươi hoặc máu có chất chống đông (EDTA, natri citrat, citrate dextrose hoặc heparin).
- Tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C (để bảo quản mẫu cần xét nghiệm trong vòng 4 tuần).

- Tủ đông ở nhiệt độ -20°C (để bảo quản mẫu cần xét nghiệm trong vòng 3 tháng).
- Tủ đông sâu ở nhiệt độ -80°C (để bảo quản mẫu cần xét nghiệm trong hơn 1 năm).

4. Quy trình thực hiện

Ghi nhãn giấy lọc:

- Ghi nhãn giấy lọc bằng mã phòng thí nghiệm, mã bệnh nhân hoặc ngày lấy mẫu máu. Có thể ghi thêm tên viết tắt của kỹ thuật viên thu thập mẫu.

Đối với thẻ Whatman FTA:

- Dùng pipette hút 125 μL máu (cho mỗi vòng tròn 2,54 cm) từ ống thu thập máu, rồi nhỏ vào khu vực vòng tròn in trên thẻ. Đảm bảo không để mẫu máu tràn ra ngoài và không chà hoặc bôi máu lên thẻ.

Đối với giấy lọc Whatman 2, 3 hoặc 903:

- Hút 0–50 μL máu từ ống thu thập máu, rồi nhỏ vào khu vực chỉ định trên giấy. Chuẩn bị hai hoặc ba vết máu cho mỗi bệnh nhân.

Lưu trữ mẫu:

- Các mẫu trên giấy lọc có thể được lưu trữ ngay lập tức ở nhiệt độ phòng.

Làm khô mẫu:

- Nếu cần xét nghiệm ngay sau khi lấy mẫu, để mẫu khô trong ít nhất 1 giờ ở nhiệt độ phòng trước khi cho vào túi nhựa ziplock. Không dùng nhiệt để rút ngắn thời gian khô.

Thêm chất hút ẩm:

- Cho chất hút ẩm vào trong mỗi túi ziplock chứa mẫu giấy lọc để bảo quản và vận chuyển ở nhiệt độ phòng.

Kiểm tra điều kiện bảo quản:

- Đảm bảo điều kiện bảo quản hoàn toàn khô ráo. Thường xuyên kiểm tra chất hút ẩm và thay mới nếu cần.

Bảo quản mẫu trong tủ lạnh hoặc tủ đông:

- Nếu mẫu được xét nghiệm trong vòng 4 tuần, bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Đối với thời gian bảo quản lâu hơn, bảo quản ở nhiệt độ -20°C hoặc -80°C.

5. Lưu ý khi thực hiện

- Luôn đeo găng tay để tránh làm nhiễm bẩn giấy lọc.
- Áp dụng các biện pháp phòng ngừa chuẩn và sử dụng đầy đủ thiết bị bảo hộ cá nhân như áo khoác hoặc áo choàng phòng thí nghiệm.
- Bảo quản mẫu trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C nếu xét nghiệm được tiến hành trong vòng 4 tuần sau khi thu thập.
- Bảo quản mẫu ở nhiệt độ -20°C nếu xét nghiệm được tiến hành trong vòng 3 tháng.
- Bảo quản mẫu trong tủ đông sâu ở nhiệt độ -80°C nếu cần bảo quản trên 1 năm.

7. Tham khảo

Tổ chức Y tế Thế giới. Quy trình vận hành chuẩn của ngân hàng hiến máu sốt rét quốc gia. Geneva; 2015.