

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO **BỘ Y TẾ**
VIỆN SỐT RÉT - KÝ SINH TRÙNG - CÔN TRÙNG
TRUNG ƯƠNG

NGUYỄN THỊ MINH TRINH

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN LOÀI, MẬT ĐỘ, TẬP
TÍNH MUỖI *Anopheles*, TỶ LỆ NHIỄM *Plasmodium*
spp. TRÊN VÉC TƠ CHÍNH VÀ CHỈ ĐIỂM GEN
KHÁNG THUỐC CỦA *Plasmodium falciparum*
TẠI BỐN TỈNH TÂY NGUYÊN**

Chuyên ngành: CÔN TRÙNG HỌC

Mã số: 942 01 06

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ

HÀ NỘI, 2024

**CÔNG TRÌNH ĐÃ ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI
VIỆN SÓT RÉT - KÝ SINH TRÙNG - CÔN TRÙNG TRUNG ƯƠNG**

Cán bộ hướng dẫn khoa học

- 1. Hướng dẫn 1: PGS.TS.BS. Nguyễn Thu Hương**
- 2. Hướng dẫn 2: TS.BS. Nguyễn Xuân Xã**

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá chất lượng luận án tiến sỹ cấp Viện tại Viện Sốt rét-Ký sinh trùng-Côn trùng Trung ương vào hồi:

.....giờ, ngày.....tháng.....năm 2024

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- 1. Thư viện Quốc gia Việt Nam**
- 2. Thư viện Viện Sốt rét-Ký sinh trùng-Côn trùng Trung ương**

ĐẶT VẤN ĐỀ

1. Tính cấp thiết

Trong hơn thập niên qua, Việt Nam đã và đang đạt được nhiều thành quả quan trọng trong phòng chống và tiến tới loại trừ sốt rét. Mặc dù vậy, khu vực miền Trung-Tây Nguyên vẫn đang đối mặt với thách thức như sốt rét trên nhóm dân giao lưu biên giới, di biến động, đi rừng, ngủ rẫy khó kiểm soát, muỗi kháng hóa chất và ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc điều trị. Sự thay đổi các yếu tố vi khí hậu, điều kiện tự nhiên, môi trường và tác động của con người đã ảnh hưởng đến phân bố, tập tính, thành phần loài cũng như vai trò truyền bệnh muỗi *Anopheles*. Việc xác định nhiễm *Plasmodium* trong cơ thể muỗi rất quan trọng để hiểu được sinh thái, phân bố địa lý, số lượng và hành vi loài véc tơ đặc biệt ở vùng địa lý có sốt rét lưu hành (SRLH). Hiện nay, các phương pháp để phát hiện thoa trùng như mô tuyến nước bọt, xét nghiệm miễn dịch hấp phụ liên kết enzyme (ELISA), sinh học phân tử như PCR, realtime PCR hoặc gần đây nhất là ddPCR.

Tình hình kháng thuốc artemisinin và giảm nhạy với thuốc phối hợp có thành phần artemisinin (ACTs) do *P. falciparum* được xác định tại Tiểu vùng Sông Mê Kông mở rộng đã và đang đe dọa đến thành quả PC<SR. Hiện nay, ưu tiên phát triển chiến lược nhằm giảm áp lực chọn lọc và giảm lan rộng chủng *P. falciparum* kháng thuốc trong khi vẫn đảm bảo ưu tiên giảm tỷ lệ mắc và tử vong [1]. Việc xác định các chỉ điểm phân tử trên quần thể *P. falciparum* là cần thiết để theo dõi phân bố, bản đồ phân bố kháng thuốc, đồng thời hiểu rõ hơn sự tiến hóa và cơ chế kháng thuốc, kể cả artemisinin và các ACTs. Hơn nữa, cả về mặt lý thuyết và thực hành trên một khu vực có bệnh sốt rét lưu hành, nếu quần thể ký sinh trùng *Plasmodium* spp. nói chung và *P. falciparum* nói riêng kháng thuốc được mang bởi quần thể vector sốt rét *Anopheles* spp. chính và phụ sẽ rất nguy hiểm do chúng phát tán rộng chủng ký sinh trùng kháng thuốc [2], [3], trong khi các thuốc hiện dùng có số lượng hạn hữu và thuốc mới vẫn đang trong giai đoạn thử nghiệm.

Với ý nghĩa như trên, chúng tôi tiến hành đề tài “Nghiên cứu thành phần loài, mật độ, tập tính muỗi *Anopheles*, tỷ lệ nhiễm *Plasmodium* spp. trên véc tơ chính và chỉ điểm gen kháng thuốc của *Plasmodium falciparum* tại bốn tỉnh Tây Nguyên”.

2. Mục tiêu nghiên cứu

1. Xác định thành phần loài, mật độ, tập tính của muỗi *Anopheles* spp. và tỷ lệ *An. minimus* và *An. dirus* nhiễm *Plasmodium* spp. bằng kỹ thuật sinh học phân tử tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2019-2022.
2. Phân tích các chỉ điểm phân tử kháng thuốc (K_{13} , *plasmepsin 2*, *exonulcease*, *Pfmdr1*, *Pfprt*) trong quần thể *Plasmodium falciparum* tại điểm nghiên cứu.

3. Tính mới, tính khoa học và tính thực tiễn của đề tài

- Nghiên cứu đã điều tra và phân tích xác định sự hiện diện các véc tơ sốt rét chính *An. minimus* và *An. dirus* tại từng tỉnh ở khu vực Tây Nguyên - nơi có lưu hành sốt rét phức tạp và dai dẳng.
- Nghiên cứu cho thấy tỷ lệ nhiễm *Plasmodium* spp. trong muỗi tại 4 tỉnh Tây Nguyên đang trong giai đoạn lộ trình tiến tới loại trừ sốt rét khá thấp (<3%).
- Nghiên cứu đã áp dụng các phương pháp điều tra, phân tích từ cổ điển đến hiện đại như nested-PCR, ddPCR, realtime-qPCR và giải trình tự gen để làm rõ các khía cạnh phân tử, thành phần loài *Anopheles* spp. và đột biến gen liên quan đến kháng thuốc trên

quần thể KST *Plasmodium* spp.

- Sự kết nối hai nội dung nghiên cứu có ý nghĩa bởi hầu hết các điểm điều tra côn trùng và KSTSR kháng thuốc là các điểm nóng còn lưu hành bệnh, điều này giúp cho các nhà làm chính sách nhận ra sự tồn tại các véc tơ chính nhiễm *Plasmodium* spp. kháng thuốc sẽ có nguy cơ lan rộng thông qua quần thể muỗi phát tán và sự giao gen nhảy và gen kháng giữa các vùng có thể làm thất bại các thành quả đạt được hiện nay.

4. **Bổ lục luận án**

Luận án dày 141 trang, gồm: Đặt vấn đề 2 trang; Tổng quan 33 trang; Phương pháp nghiên cứu 26 trang; Kết quả nghiên cứu 43 trang; Bàn luận 34 trang; Kết luận 2 trang; Kiến nghị 1 trang. Luận án có 22 hình, 29 bảng số liệu và 139 tài liệu tham khảo.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Khái quát chung về muỗi *Anopheles* truyền bệnh sốt rét

Muỗi *Anopheles* thuộc giới động vật, ngành chân khớp, lớp côn trùng, bộ hai cánh, họ Culicidae, giống *Anopheles*, có mặt khắp ở các vùng ôn đới và nhiệt đới trên thế giới với 721 loài được xếp vào hai phân họ Anophelinae và Culicinae gồm 113 giống [5]. Ở Việt Nam hiện xác định có 64 loài *Anopheles* thuộc 2 phân giống [44], gồm các véc tơ sốt rét chính, véc tơ phụ.

Phức hợp *Minimus*: Phức hợp *An. minimus* có 3 loài đồng hình, là *An. minimus* và *An. harrisoni* và *An. minimus* E [5]. Nghiên cứu cho thấy *An. minimus* và *An. harrisoni* là các véc tơ chính ở vùng đồi núi ở các nước phương Đông và thường ở độ cao từ 200-900m [15]. *An. minimus* và *An. harrisoni* tìm thấy phân bố cùng nhau trên diện rộng ở miền Bắc, miền Trung Việt Nam, phía Nam Trung Quốc, Phía bắc Lào và Tây Thái Lan [5]. Tại Việt Nam, *An. minimus* là véc tơ chính truyền sốt rét, phân bố khu vực rừng núi trên cả nước, sinh cảnh núi đồi, nước chảy, rừng thưa, savan, vùng nhiều khe suối có cát sỏi, ruộng bậc thang [30]. *An. minimus* hoạt động đốt máu về đêm, cao điểm từ 21 giờ đến 3 giờ, về mùa đông có thể sớm hơn [35]. Tại Tây Nguyên, muỗi phát triển quanh năm, có đỉnh thứ nhất vào tháng 5 và đỉnh thứ 2 vào tháng 9-11; *An. minimus* hoạt động đốt máu suốt đêm và có mật độ cao nhất từ 22 giờ đến 4 giờ sáng [36].

Phức hợp *Dirus*: *An. dirus* thuộc nhóm loài *An. leucosphyrus* Donitz, là véc tơ chính ở Thái Lan và Đông Nam Á. Phức hợp *Dirus* có 8 thành viên gồm *An. dirus*, *An. cracens*, *An. scanloni*, *An. baimaii*, *An. elegans*, *An. nemophilous*, *An. takasagoensis* và loài mới được thêm vào gần đây là *An. aff. takasagoensis* [5]. Trong số đó, *An. dirus* và *An. baimaii* là các vectơ ưa đốt máu người và đóng vai trò chính trong việc truyền sốt rét qua đốt người cả trong và ngoài nhà [5]. Tại Việt Nam, *An. dirus* cũng là véc tơ sốt rét chính, nghiên cứu về *An. dirus* Nguyễn Đức Mạnh (1998) cho thấy phân bố ở sinh cảnh rừng rậm, rừng tái sinh rừng nhiều tầng và rừng rậm từ 20 độ vĩ Bắc trở vào [39]. *An. dirus* thích đốt máu người và có tập tính rình mồi trước khi đốt máu. Muỗi hoạt động đốt máu vào ban đêm, cao điểm từ nửa đêm về sáng, thường đốt máu người trong và ngoài nhà, trú ẩn tiêu máu ngoài nhà. Muỗi phát triển đỉnh điểm vào các tháng mùa mưa.

1.2. Xác định vai trò truyền bệnh sốt rét của muỗi *Anopheles*

Điều kiện cần thiết để một loài *Anopheles* đóng vai trò véc tơ sốt rét là có sự tương hợp di truyền giữa muỗi với các loài ký sinh trùng sốt rét (KSTSR), sự tương hợp này cho phép KSTSR có thể phát triển trong cơ thể muỗi [42].

An. minimus s.l. là véc tơ chính trong vùng nơi mà nó có mặt. Năm 1990, *An.*

minimus s.l. được ghi nhận nhiễm thoa trùng quanh năm ở Assam (Ấn Độ), ngoại trừ tháng 8-9. Tỷ lệ nhiễm thấp nhất vào tháng 3 (0,7%) và cao nhất vào tháng 10 (8,5%) [58]. Nghiên cứu của Thin OO và cộng sự (2003) [59] về *An. dirus* và vai trò của chúng trong lan truyền sốt rét ở Myanmar cho biết *An. dirus* là véc tơ chính lây nhiễm *P. falciparum*. Ở Campuchia và miền Trung Việt Nam, *An. minimus* được phát hiện nhiễm *P. falciparum* và *P. vivax* (Pv210 và Pv247) bằng kỹ thuật ELISA [18]. Ở Tây Nguyên, mỗ muỗi cũng xác định 1,8% *An. minimus* nhiễm KSTSR. Nghiên cứu của Hồ Đình Trung và cộng sự (2004) [18] xác định tỷ lệ nhiễm thoa trùng của *An. dirus* tại xã Diên Tân, huyện Diên Khánh-Khánh Hòa là 2,8% và tại Bình Thuận là 1,2%. Nghiên cứu Nguyễn Xuân Quang tại các vườn Quốc gia ở Kom Tum, Gia Lai và Khu bảo tồn thiên nhiên Ea Sô ở Đắk Lắk cho thấy tỷ lệ nhiễm KSTSR của *An. minimus* là 2,19% và của *An. dirus* là 3,62% [67].

1.3. Ứng dụng sinh học phân tử trong định loại loài và xác định ký sinh trùng sốt rét trong cơ thể muỗi

Định loại sinh học phân tử, thành viên phức hợp Minimus được ghi nhận ở Campuchia [16], miền nam Trung Quốc, Đài Loan, Nhật Bản, Lào, Thái Lan, Việt Nam [17], [18]. *An. harrisoni* được ghi nhận ở Việt Nam, Lào, Thái Lan, miền Trung Myanmar và Nam Trung Quốc (đến vĩ độ bắc 32,5N). Hồ Đình Trung và cộng sự (2001) sử dụng phương pháp RFLP-PCR để phân biệt 2 loài *An. minimus* A và *An. minimus* C tại Phú Cường, Tân Lạc-Hòa Bình. Bằng phương pháp định loại phân tử PCR, Ngô Thị Hương và cộng sự (2004; 2007) đã xác định phức hợp Minimus tại các tỉnh miền Trung-Tây Nguyên bao gồm 2 loài là *An. minimus* và *An. harrisoni*; phức hợp Dirus thì chỉ mới phát hiện loài *An. dirus*.

Việc xác định nhiễm *Plasmodium* trong cơ thể muỗi là điều kiện tiên quyết để hiểu được sinh thái, phân bố địa lý, số lượng và hành vi loài véc tơ. Điều này đặc biệt quan trọng ở vùng địa lý có SRLH. Cho đến hiện nay có 3 phương pháp chính sử dụng để xác định nhiễm trùng thoa trùng như mỗ tuyến nước bọt xác định thoa trùng, sử dụng kỹ thuật ELISA, phương pháp PCR đang được ứng dụng rộng rãi trong việc phát hiện sự hiện diện của KSTSR trong muỗi và tuyến nước bọt của muỗi. Claire Y.T Wang và cộng sự (2018) [73] so sánh 2 kỹ thuật 18S qPCR được điều chỉnh theo PCR kỹ thuật số dạng giọt (digital droplet PCR-ddPCR) và định lượng *P. falciparum* bằng xét nghiệm Taqman qPCR với mục tiêu gen 18S rRNA. Độ phù hợp cao giữa ddPCR và qPCR đã được ghi nhận khi dùng cả tiêu chuẩn plasmid DNA syn18S và ruột giữa dương tính với nang trứng bằng kính hiển vi. Các nghiên cứu gần đây về ddPCR để phát hiện *Plasmodium* trong nuôi cấy và các muỗi nhiễm *Plasmodium* spp. cũng báo cáo sự thống nhất tốt trong ước tính KST giữa ddPCR và qPCR, nhưng độ nhạy và độ chính xác được cải thiện khi dùng ddPCR, đặc biệt khi mật độ thấp [74].

1.4. Tình hình kháng thuốc sốt rét trên Thế giới và Việt Nam

Sự lan rộng của chủng *P. falciparum* kháng CQ với tỷ lệ thất bại từ 70-100% đã được báo cáo từ các nước khác nhau trong Tiểu vùng Sông Mê Kông mở rộng nên thuốc này không còn khuyến cáo. Ngoài CQ, các thuốc khác cũng tăng kháng, kể cả artemisinin và dẫn suất. Do vậy, nhu cầu cần nhiều nghiên cứu đánh giá hiệu lực thuốc mới hoặc thuốc phối hợp dựa trên thuốc đơn thuần hiện dùng tại các nước này. Tại tiểu vùng Sông Mê Kông, tình trạng chậm làm sạch *P. falciparum* và kháng artemisinin đang diễn tiến phức tạp và tỷ lệ tồn tại thể vô tính ngày D₃ được ghi nhận ngày càng tăng. Số số ca *P. falciparum* đã giảm, nhưng tỷ lệ ca sau khi điều trị DHA-PPQ tồn tại

thể vô tính D₃ tăng từ 26% đến 45% song song với gia tăng thất bại trong điều trị với DHA-PPQ được báo cáo từ 2008-2013 [78].

1.5. Ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium* gây bệnh ở người

P. falciparum có phổ lâm sàng đa dạng và bệnh lý bệnh phức tạp, gây ác tính, tử vong và đa kháng thuốc so với các loài khác. Đến nay, đã ghi nhận 5 loài gây bệnh cho người, gồm *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* và *P. knowlesi*.

1.6. Một số chỉ điểm phân tử liên quan kháng thuốc sốt rét ở *P. falciparum*

1.6.1. Gen mã hóa cho protein Kelch (K₁₃)-chỉ điểm phân tử kháng artemisinin

Gen Kelch 13 nằm trong đoạn gen từ nucleotide 1724848 đến nucleotide 1727028 với chiều dài 2180 nucleotide mã hóa cho protein Kelch có 726 acid amin. Gen K₁₃ được xác định liên quan kháng artemisinin đầu tiên bởi Ariey và cộng sự (2014) tại Campuchia với 17 alen đột biến, trong đó có 3 đột biến xuất hiện với tần số cao, kiểu gen C580Y, R539T và Y493H [89],[91].

Bảng 1.1. Các đột biến trên gen K₁₃ theo phân loại Tổ chức Y tế thế giới [92]

Vị trí đột biến xác định kháng		Vị trí đột biến có liên quan kháng	
F446I	P553L	P441L	G538V
N458Y	R561H	G449A	V568G
M476I	C580Y	C469F	P574L
Y493H		A481V	F673I
R539T		P527H	A675V
I543T		N537I	

1.6.2. Chỉ điểm phân tử để xác định kháng piperaquine phosphate

P. falciparum kháng một phần artemisinin và hiện nay đã xác định được chỉ điểm phân tử kháng artemisinin là đột biến trên gen K₁₃. Các nghiên cứu của Benoit Witkowski (2017), Roberto Amato và cộng sự (2017) [100],[101] được thực hiện ở Campuchia phát hiện ra các chỉ điểm phân tử kháng piperaquine (PPQ) là các biến thể đa hình trên gen *Plasmepsin 2* (*PM2*) và *Plasmepsin 3* (*PM3*) trên nhiễm sắc thể 14. Họ gen *plasmepsin* gồm 4 gen *plasmepsin* I, II, III, IV [101], trong đó chỉ có gen *PM2-3* liên quan đến gia tăng tỷ lệ IC₅₀ trong thử nghiệm với PPQ. Dạng hoang dại của KST chỉ mang 1 bản sao của gen *PM 2-3*; dạng đột biến mang 2 bản sao gen *PM2-3*.

Amato và cộng sự (2017) [101] xác định bên cạnh biến thể đa hình trên gen *PM 2/3* còn có một marker bổ sung là các đột biến đa hình trên gen exonuclease trên nhiễm sắc thể số 13 (*exoE415G*).

1.6.3. Một số chỉ điểm đa kháng thuốc của ký sinh trùng *P. falciparum*

- *P. falciparum* chloroquine resistance transporter (*Pfcr*)

P. falciparum chloroquine resistance transporter (*Pfcr*) là một đoạn gen 13-exon nằm trên phân đoạn 36kb của nhiễm sắc thể số 7, gen này có đột biến điểm liên quan kháng CQ từ Châu Á, Châu Phi và Nam Mỹ [105]. *Pfcr* là chỉ điểm đề cập *P. falciparum* kháng CQ thông qua đột biến trên kênh vận chuyển thuốc CQ. Các đột biến trên kênh vận chuyển (*crt*) kích hoạt quá trình đẩy CQ ra khỏi không bào tiêu hóa, ngăn cản CQ liên kết với nhân heme. Chen (2003) [108] đã phát hiện đột biến gen *Pfcr* kháng CQ tại vị trí acid amin 72, 74, 75, 76, 97, 144, 160, 220, 271, 326, 356, 371.

- Chỉ điểm *P. falciparum* multi-drugs resistance (*Pfmdr1*)

Pfmdr1 là gen đa kháng thuốc liên quan thay đổi tính nhạy với nhiều thuốc. Gen *Pfmdr1* nằm trên nhiễm sắc thể 5, mã hóa protein số 12 domain xuyên màng được gọi là

Pfmdr1 hay “Pgh-1”. *Pfmdr1* định vị ở không bào tiêu hóa, là nơi hoạt động của CQ, kể cả thuốc quinine. Dữ liệu nghiên cứu về MQ bổ sung nghiên cứu lâm sàng về mối liên quan giữa tăng số lượng bản sao *Pfmdr1* và tăng nguy cơ thất bại của liệu pháp đơn trị liệu MQ hoặc phối hợp ASMQ [113].

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu của mục tiêu 1

Xác định thành phần loài, mật độ, tập tính của muỗi *Anopheles* spp. và tỷ lệ *An. minimus* và *An. dirus* nhiễm *Plasmodium* spp. bằng kỹ thuật sinh học phân tử tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2019-2022.

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

Đối tượng nghiên cứu: Muỗi *Anopheles* trưởng thành thu thập tại các điểm điều tra và ký sinh trùng *Plasmodium* spp. trong cơ thể muỗi sốt rét.

Thời gian nghiên cứu: Từ năm 2019 đến năm 2022.

Địa điểm nghiên cứu: Chọn các địa điểm nghiên cứu có sốt rét lưu hành phức tạp và diễn tiến dai dẳng của 4 tỉnh Tây Nguyên Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông.

2.1.2. Phương pháp nghiên cứu

2.1.2.1. Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu ngang mô tả.

2.1.2.2. Cơ mẫu: để xác định thành phần loài *Anopheles*: sử dụng toàn bộ muỗi *Anopheles* thu thập được qua các phương pháp đều được định loại bằng hình thái ngoài xác định thành phần loài *Anopheles* tại các điểm nghiên cứu.

2.1.3. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- Kỹ thuật điều tra muỗi *Anopheles*, kỹ thuật bắt muỗi *Anopheles* bằng bẫy đèn trong và ngoài nhà ban đêm, bắt muỗi *Anopheles* mỗi người trong và ngoài nhà ban đêm, bắt muỗi bằng bẫy màn mỗi gia súc.

- Kỹ thuật định loại muỗi *Anopheles*.

- Kỹ thuật tách chiết DNA tổng số của muỗi *Anopheles*

- Kỹ thuật PCR để định loại *An. minimus* s.l. và *An. dirus* s.l.

Kỹ thuật PCR để định loại *An. minimus* s.l.: Phản ứng PCR được thực hiện sử dụng các cặp mồi xác định phức hợp loài theo Hoàng Kim Phúc và cs (2003).

Kỹ thuật PCR để định loại *An. dirus* s.l.: Phản ứng PCR được thực hiện theo quy trình của Ngô Thị Hương và cs. (2001).

Kỹ thuật ddPCR phát hiện nhiễm *KSTSR* trong muỗi: Phản ứng ddPCR xét nghiệm *Plasmodium* được tiến hành với mẫu DNA đã tách chiết với trình tự mồi qMAL được thiết kế trên vùng gen 18S rRNA đặc hiệu cho *Plasmodium* spp. theo nghiên cứu của Wampfler và cộng sự (2013). Trình tự mồi bao gồm:

QMAL_fw	TTA GAT TGC TTC CTT CAG TRC CTT ATG
QMAL_rev	TGT TGA GTC AAA TTA AGC CGC AA

2.1.4. Các thuật ngữ và chỉ số sử dụng trong mục tiêu 1

- Các thuật ngữ: thành phần loài *Anopheles*, mật độ muỗi *Anopheles*, tỷ lệ nhiễm ký sinh trùng sốt rét trong cơ thể muỗi.

- Các chỉ số trong nghiên cứu muỗi *Anopheles*: Muỗi *Anopheles* thu thập bằng mồi người được tính mật độ theo công thức, Muỗi *Anopheles* thu thập bằng bẫy đèn được tính mật độ theo công thức, Mật độ muỗi bắt ở chuồng gia súc, thành phần loài muỗi

Anopheles, tỷ lệ nhiễm ký sinh trùng sốt rét trong cơ thể muỗi.

2.2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu của mục tiêu 2

Phân tích các chỉ điểm phân tử kháng thuốc: K_{13} , *Plasmepsin 2*, *Exonulcease*, *Pfmdr1*, *Pfcr* trong quần thể *Plasmodium falciparum* tại điểm nghiên cứu.

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

Đối tượng nghiên cứu: Mẫu máu khô trên giấy thấm Whatman từ các bệnh nhân sốt rét nhiễm loài *P. falciparum* đơn thuần hoặc nhiễm phối hợp có *P. falciparum* tại các vùng SRLH và tại các cơ sở khám chữa bệnh - nơi bệnh nhân đến khám và điều trị thuộc bốn tỉnh Tây Nguyên.

Thời gian nghiên cứu: Từ năm 2019 đến năm 2022.

Địa điểm nghiên cứu: Chọn các địa điểm nghiên cứu dựa trên một số xã, huyện, tỉnh đang có sốt rét lưu hành phức tạp và diễn tiến dai dẳng của 4 tỉnh Tây Nguyên Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông.

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.2.1. **Thiết kế nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả có phân tích.

2.2.2.2. **Cỡ mẫu, chọn mẫu:** thu thập mẫu thuận tiện, thu thập tất cả các mẫu máu dương tính với *P. falciparum* từ các địa điểm nghiên cứu từ năm 2019 đến 2022.

2.2.3. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu

- **Kỹ thuật tách chiết DNA tổng số**

- **Kỹ thuật PCR xác định chủng loại KSTSR:** Các cặp mồi đặc hiệu được dùng gồm P5-P6; FF-FR; VF-VR; MF-MR; OF-OR. Quy trình định loài *Plasmodium* spp. cũng được sử dụng theo quy trình đề cương của TCYTTG.

- **Kỹ thuật PCR - giải trình tự phát hiện đột biến điểm trên gen K_{13} :** Phản ứng nested-PCR được thực hiện với 2 cặp mồi trên vùng gen K_{13} propeller [89].

K13_PCR_F	5'-CGGAGTGACCAAATCTGGGA-3'
K13_PCR_R:	5'-GGGAATCTGGTGGTAACAGC-3'
K13_N1_F:	5'-GCCAAGCTGCCATTCATTTG-3'
K13_N1_R:	5'-GCCTTGTTGAAAGAAGCAGA-3'

- **Kỹ thuật thực hiện PCR - giải trình tự phát hiện đột biến điểm trên gen *exonuclease* liên quan đến kháng piperazine phosphate**

Sản phẩm DNA sau khi tách chiết sẽ được tiếp tục sử dụng để thu nhận vùng gen *exonuclease* để phân tích đột biến E415G theo chu trình của Amato và cộng sự (2017). Trình tự mồi để thu nhận gen *exonuclease* liệt kê bảng sau [101].

Mồi xuôi	5'- GCA CCT CCT ATC ATC AGA TGA TAC C -3'
Mồi ngược	5'- GAA GGT GTT CCT TCC TCT TTT CTT G -3'

- **Kỹ thuật thực hiện realtime - PCR xác định các biến thể đa hình của gen *Plasmepsin 2* liên quan đến kháng piperazine phosphate**

Sử dụng kỹ thuật realtime-PCR dùng Taqman probe để xác định biến thể đa hình của gen *Plasmepsin 2* liên quan đến kháng piperazine phosphate theo quy trình của Ansbro và cộng sự (2020) [117], trình tự mồi và probe theo bảng dưới đây.

plasmepsinII-1F	5' -ATGGTGATGCAGAAGTTGGA- 3'
plasmepsinII-1R	5' -AACATCCTGCAGTTGTACATTTAAC- 3'
plasmepsinII-probe	5'Fam -CAGGATCTGCTAATTTATGGGTCCCA - BHQ1
β tubulin-1F	5' -TGTGCGCAAGTGATCC- 3'
β tubulin-1R	5' -TTTGTGGACATTCTTCCTC- 3'
β -tubulin-probe	5'HEX-CACATGCCGTTAAATATCTTCCATGTCT-BHQ1

- **Kỹ thuật PCR-giải trình tự phát hiện đột biến điểm trên gen *Pfprt***: Sản phẩm DNA sau khi tách chiết sẽ được tiếp tục sử dụng để thu nhận vùng gen *Pfprt* sử dụng kỹ thuật PCR để phân tích đột biến SNP theo chu trình của Chen và cộng sự (2003). Trình tự mỗi để thu nhận gen được liệt kê trong bảng sau.

D1	5'-TGT GCT CAT GTG TTT AAA CTT-3'
D3	5'-AAA GCT TCG GTG TCG TTC-3'
E3	5'-CTT ATA CAA TTA TCT CGG AGC AGT-3'
F1	5'-GTC ATG TTT GAA AAG CAT ACA GG-3'
E4	5'-CCA AGA ATA AAC ATG CGA AAC C-3'
F2	5'-ATT TCT TAT AGG CTA TGG TAT CC-3'
4A	5'-TAGGAACGACACCGAAG-3'
4B	5'-ATAGTATACTTACCTATATC-3'

- **Kỹ thuật realtime-PCR xác định biến thể đa hình của gen *Pfmdr1***

Sử dụng kỹ thuật realtime-PCR dựa trên SYBR green để xác định biến thể đa hình của gen *Pfmdr1* liên quan đến kháng mefloquine theo quy trình của Chavchich M. và cộng sự (2010) [118]. trình tự mỗi theo bảng dưới đây:

MDR1-T1F	TATGCATTTGTGGGAGAATCAG
MDR1-T1R	CTCCTTCGGTTGGATCATAAAG
LDH-T1F	AGGACAATATGGACACTCCGAT
LDHT1R	TTTCAGCTATGGCTTCATCAA

2.2.4. Các biến số sử dụng trong mục tiêu 2

- Tỷ lệ các đột biến kháng thuốc, tỷ lệ các đột biến kháng thuốc theo năm.

2.3. Phân tích và xử lý số liệu

- Số liệu thu thập được ghi vào các biểu mẫu đã thiết kế sẵn trong form; Phân tích, xử lý theo phần mềm Excel; Ứng dụng các phần mềm Sinh tin như Geneious R8, dữ liệu gen trên Genbank để phân tích các trình tự nucleotide các gen kháng thuốc của *P. Falciparum*; Ứng dụng phần mềm R vẽ bản đồ phân bố các gen kháng thuốc.

2.4. Khía cạnh đạo đức trong nghiên cứu

- Đề cương luận án được thông qua Hội đồng phê duyệt đề cương và Hội đồng Đạo

đức Y sinh của Viện Sốt rét-KST-CT Trung ương;

- Đề cương đã thông qua Hội đồng Khoa học và Hội đồng Đạo đức Y sinh Viện Sốt rét-KST-CT Quy Nhơn trước khi triển khai nghiên cứu tại Viện;

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả xác định thành phần loài, mật độ, tập tính của muỗi *Anopheles* spp. và tỷ lệ *An. minimus* và *An. dirus* nhiễm *Plasmodium* spp. bằng kỹ thuật sinh học phân tử tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2019-2022

3.1.1. Thành phần loài muỗi *Anopheles* tại các điểm nghiên cứu

Tổng số cá thể muỗi thu thập được trong nghiên cứu gồm 6957 cá thể, trong đó tại Kon Tum thu được 13 loài, tại Gia Lai là 14 loài, tại Đắk Lắk là 13 loài và tại Đắk Nông là 12 loài.

Bảng 3.1. Số lượng *Anopheles* tại các điểm nghiên cứu bằng định loại hình thái

TT	Tên loài	Địa điểm nghiên cứu				Tổng cộng
		Kon Tum	Gia Lai	Đắk Lắk	Đắk Nông	
1	<i>An. (Cell.) dirus</i> Peyton & Harrison, 1979	89	0	157	141	387
2	<i>An. (Cell.) minimus</i> Theobald, 1901	117	199	0	12	328
3	<i>An. (Cell.) aconitus</i> Doenitz, 1902	266	293	284	79	922
4	<i>An. (Cell.) maculatus</i> Theobald, 1901	135	345	370	303	1153
5	<i>An. (Cell.) annularis</i> Haga 1930	0	16	0	0	16
6	<i>An. (Ano.) barbirostris</i> Van der Wulp, 1884	38	95	22	263	418
7	<i>An. (Ano.) crawfordi</i> Reid, 1953	14	13	36	140	203
8	<i>An. (Cell.) jamesi</i> Theobald, 1901	229	523	33	212	997
9	<i>An. (Ano.) peditaeniatus</i> Leicester, 1908	25	114	195	296	630
10	<i>An. (Cell.) philippinensis</i> Ludlow, 1902	215	163	35	150	563
11	<i>An. (Ano.) sinensis</i> Wiedemann, 1828	15	37	141	155	348
12	<i>An. (Cell.) splendidus</i> Koidzumi 1920	0	291	48	0	339
13	<i>An. (Cell.) tessellatus</i> Theobald, 1901	9	16	23	0	48
14	<i>An. (Cell.) vagus</i> Doenitz, 1902	26	12	123	60	221
15	<i>An. (Cell.) varuna</i> Iyengar, 1924	13	236	10	125	384
Tổng cộng		1191	2353	1477	1936	6957

Thu thập 715 véc tơ sốt rét chính *An. dirus* và *An. minimus* tại 4 tỉnh Tây Nguyên Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk và Đắk Nông, trong đó tại Kon Tum và Đắk Nông có mặt cả 2 véc tơ chính là, các tỉnh còn lại chỉ phát hiện *An. dirus* hoặc *An. minimus*, thu được véc tơ phụ vùng đồi núi gồm *An. aconitus* và *An. maculatus*, với số lượng nhiều nhất là *An.*

maculatus gồm 1153 cá thể (16,57%).

3.1.2. Mật độ và tập tính hoạt động đốt người *Anopheles* tại các điểm nghiên cứu

3.1.2.2. Mật độ véc tơ sốt rét

Bảng 3.14. Mật độ véc tơ sốt rét qua các phương pháp ở Kon Tum

TT	Thành phần loài	Phương pháp thu thập muỗi				
		BĐTN c/d/d	BĐNN c/d/d	MNTN c/ng/d	MNNN c/ng/d	BMGS c/m/d
1	<i>An. dirus</i>	0,25	0	0,38	0,88	2,71
2	<i>An. minimus</i>	0,31	0	0	0,44	4,38
3	<i>An. aconitus</i>	1,00	0	0,31	0,44	9,92
4	<i>An. maculatus</i>	1,19	0	0,13	0,63	4,33
Số loài		5	3	4	5	13

Tại Kon Tum, BMGS bắt được nhiều loài nhất gồm 13 loài với mật độ cao; phát hiện được cả hai véc tơ chính *An. dirus* và *An. minimus* bằng các phương pháp BĐTN, MNTN, MNNN, BMGS, không bắt được muỗi ở phương pháp BĐNN; bằng phương pháp mỗi người thu được 5 loài *Anopheles*, trong nhà là 4 loài và ngoài nhà là 5 loài, mật độ chung đốt người ngoài nhà là 2,39 c/ng/d cao hơn nhiều so với đốt người trong nhà.

Bảng 3.15. Mật độ véc tơ sốt rét qua các phương pháp ở Gia Lai

TT	Thành phần loài	BĐTN c/d/d	BĐNN c/d/d	MNTN c/ng/d	MNNN c/ng/d	BMGS c/m/d
1	<i>An. minimus</i>	0,25	0	0	0	8,13
2	<i>An. aconitus</i>	0,5	0	0	0	11,87
3	<i>An. maculatus</i>	1,82	0,12	0,69	2,81	10,75
Số loài		8	4	3	6	14

Tại Gia Lai, tương tự tại Kon Tum thu thập muỗi nhiều nhất là BMGS; chỉ phát hiện được véc tơ *An. minimus* bằng các phương pháp BĐTN và BMGS, không bắt được ở phương pháp BĐNN và mỗi người; bằng phương pháp mỗi người thu được 6 loài *Anopheles*, trong nhà là 3 loài và ngoài nhà là 6 loài, mật độ chung đốt người ngoài nhà là 2,81 c/ng/d cao hơn nhiều so với đốt người trong nhà (0,69 c/ng/d).

Bảng 3.16. Mật độ véc tơ sốt rét qua các phương pháp ở Đắk Lắk

TT	Thành phần loài	BĐTN c/d/d	BĐNN c/d/d	MNTN c/ng/d	MNNN c/ng/d	BMGS c/m/d
1	<i>An. dirus</i>	2,69	0	0,31	4,38	1,63
2	<i>An. aconitus</i>	1,13	0	0,06	0,06	11
3	<i>An. maculatus</i>	0,94	0,06	0,5	1,44	13,12
Số loài		9	3	4	8	13

Tại Đắk Lắk, phương pháp BMGS bắt được nhiều loài nhất gồm 13 loài với mật độ cao; chỉ phát hiện được véc tơ *An. dirus* bằng các phương pháp BĐTN, MNTN, MNNN, BMGS, không bắt được ở phương pháp BĐNN; bằng phương pháp mỗi người thu được 8 loài *Anopheles*, trong nhà là 4 loài và ngoài nhà là 8 loài, mật độ chung đốt người ngoài nhà là 5,88 c/ng/d cao hơn nhiều so với đốt người trong nhà.

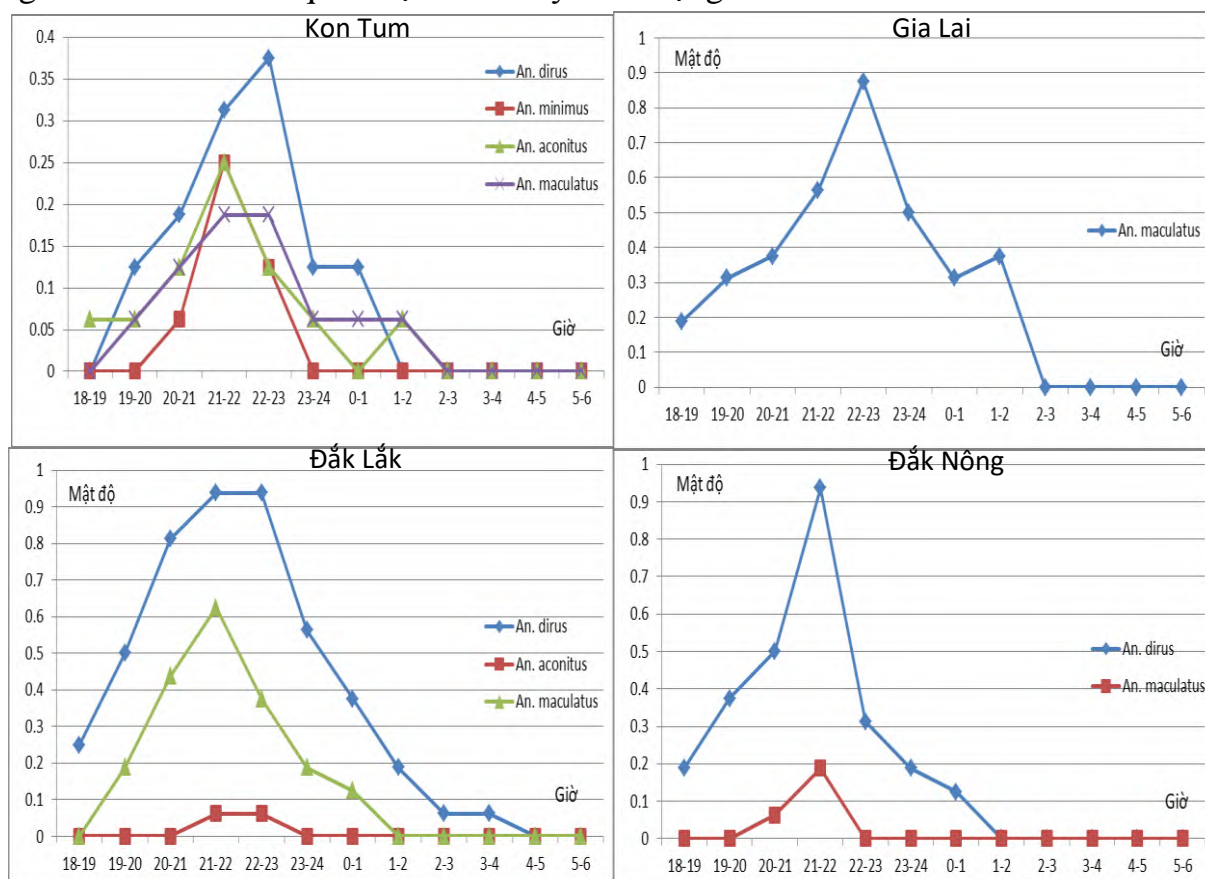
Bảng 3.17. Mật độ véc tơ sốt rét qua các phương pháp ở Đắk Nông

TT	Thành phần loài	BĐTN c/d/d	BĐNN c/d/d	MNTN c/ng/d	MNN N c/ng/d	BMGS c/m/d
1	<i>An. dirus</i>	1	0	0,81	1,81	3,46
2	<i>An. minimus</i>	0	0	0	0	0,50
3	<i>An. aconitus</i>	0	0	0	0	3,29
4	<i>An. maculatus</i>	0,75	0	0	0,25	11,96
Số loài		5	1	2	3	12

Tại Đắk Nông, BMGS bắt được nhiều loài muỗi nhất gồm 12 loài với mật độ cao; phát hiện được cả hai véc tơ chính *An. dirus* và *An. minimus* bằng các phương pháp BĐTN, MNTN, MNNN, BMGS, không bắt được ở phương pháp BĐNN; bằng phương pháp môi người thu được 3 loài *Anopheles*, trong nhà là 1 loài và ngoài nhà là 3 loài, mật độ chung đốt người ngoài nhà là cao hơn nhiều so với đốt người trong nhà.

3.1.2.3. Tập tính hoạt động đốt người ban đêm của *Anopheles*

Để xác định thời gian hoạt động đốt người trong đêm của các véc tơ sốt rét, kỹ thuật môi người trực tiếp suốt đêm trong và ngoài nhà được thực hiện tại các điểm nghiên cứu. Các kết quả được trình bày dưới dạng các hình vẽ biểu đồ.



Hình 3.1., 3.2., 3.3., 3.4.: Thời gian đốt người trong đêm của các véc tơ tại các điểm nghiên cứu

Tại Kom Tum, các véc tơ bắt đầu đốt người từ rất sớm (18 – 19 giờ), mật độ tăng cao vào khoảng thời gian từ 20-24 giờ và sau đó giảm dần về sáng. Véc tơ sốt rét chính *An. dirus* có mật độ đốt người đạt đỉnh từ 22-23 giờ với mật độ cao nhất là 0,38 c/g/ng;

sốt rét chính *An. minimus* có mật độ cao nhất lúc 21-22 giờ với chỉ số 0,25 c/g/ng; véc tơ phụ *An. aconitus* và *An. maculatus* có mật độ đạt đỉnh lần lượt là 0,25 c/g/ng và 0,19 c/g/ng vào lúc 21-23 giờ.

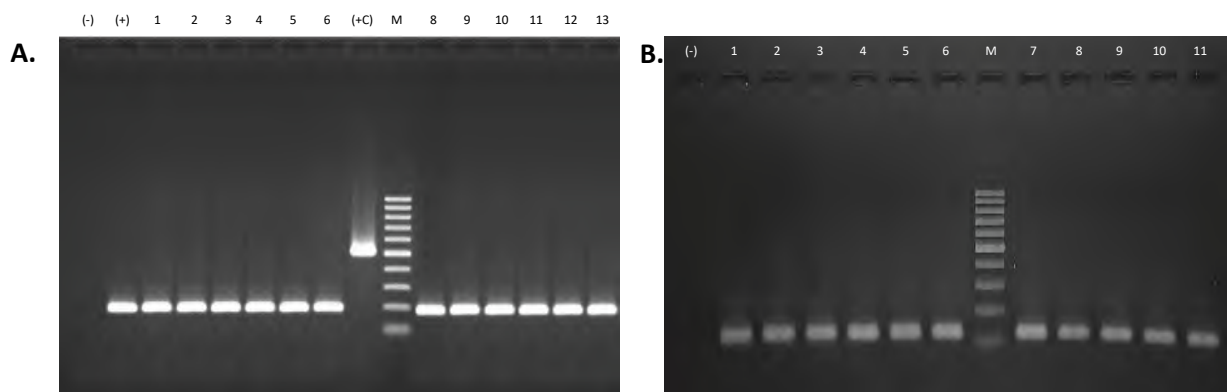
Tại Gia Lai, chỉ bắt được *An. maculatus* bằng phương pháp môi người, và véc tơ phụ này bắt đầu đốt người từ rất sớm (18 – 19 giờ), mật độ tăng cao đạt 0,88 c/g/ng vào khoảng thời gian từ 22-23 giờ và sau đó giảm dần.

Tại Đăk Lăk, các véc tơ bắt đầu đốt người từ rất sớm (18 – 19 giờ), mật độ tăng cao vào khoảng thời gian từ 20-24 giờ và sau đó giảm dần về sáng. Véc tơ sốt rét chính *An. dirus* có mật độ đốt người đạt đỉnh từ 21-23 giờ với mật độ cao nhất là 0,94 c/g/ng; hai véc tơ phụ *An. aconitus* và *An. maculatus* có mật độ đạt đỉnh cao lần lượt là 0,06 c/g/ng và 0,63 c/g/ng vào lúc 21-23 giờ.

Tại Đăk Nông, các véc tơ bắt đầu đốt người từ rất sớm (18 – 19 giờ), mật độ tăng cao vào khoảng thời gian từ 20-23 giờ và sau đó giảm dần. Véc tơ sốt rét chính *An. dirus* có mật độ đốt người đạt đỉnh từ 20-22 giờ với mật độ cao nhất là 0,94 c/g/ng; véc tơ phụ *An. maculatus* có mật độ đạt đỉnh là 0,19 c/g/ng vào lúc 21-22 giờ.

3.1.3. Xác định Phức hợp Minimus và Dirus bằng kỹ thuật PCR

Các mẫu muỗi là *An. minimus* s.l và *An. dirus* s.l. sẽ được tách chiết DNA và thực hiện phản ứng PCR với đoạn mỗi mục tiêu để định loại chính xác loài với kích thước lý thuyết dự đoán khoảng 185 bp cho *An. minimus* và 120 bp cho *An. dirus*. Kết quả được thể hiện qua Hình 3.5-3.7 và Bảng 3.19.



Hình 3.5. và Hình 3.6. Điện di sản phẩm PCR xác định loài *Anopheles*.

Ghi chú: A. (-); chứng âm; (+): chứng *An. harrisoni*, 503bp; giếng 7: chứng *An. minimus*, 185bp; giếng 1-13: mẫu *An. minimus*, 185bp; M: thang chuẩn 100bp. B. (-); chứng âm; giếng 1: chứng dương *An. dirus*, 120bp; giếng 2-11: mẫu *An. dirus*, 120bp; M: thang chuẩn 100bp.

Bảng 3.19. Kết quả định loại phức hợp Minimus và Dirus bằng kỹ thuật PCR

TT	Địa điểm	Định loại hình thái		Định loại PCR		
		<i>An. minimus</i> <i>s.l</i>	<i>An.dirus</i> <i>s.l</i>	<i>An. minimus</i>	<i>An. dirus</i>	<i>Anopheles</i> khác
1	Kon Tum	117	89	107	89	2 <i>An. aconitus</i> 1 <i>An. pampanai</i> 7 <i>An. varuna</i>
2	Gia Lai	199	-	190	-	1 <i>An. aconitus</i>

						2 <i>An. pampanai</i> 6 <i>An. varuna</i>
3	Đắk Lắk	-	157	-	157	-
4	Đắk Nông	12	141	10	141	2 <i>An. varuna</i>
	Tổng số	328	387	307	387	21

Như vậy, trong tổng số 715 mẫu véc tơ véc tơ chính qua định loại PCR cho thấy toàn bộ 387 mẫu *An. dirus s.l* thu được trong nghiên cứu đề cho kết quả là *An.dirus* dạng A; đối với 328 mẫu *An. minimus s.l* có 307/328 mẫu được định loại là *An. minimus* và 21/328 mẫu cho kết quả định loại là loài *An. varuna*, *An. pampanai*, *An. aconitus*.

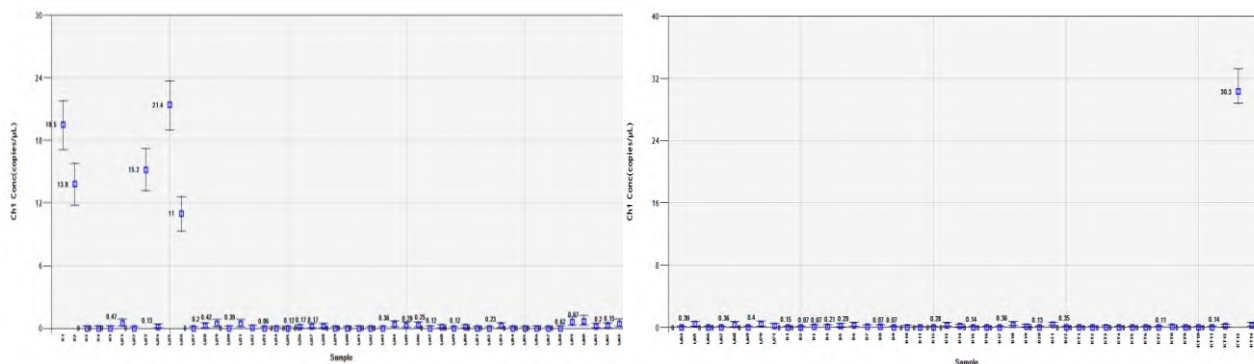
3.1.4. Kết quả xác định ký sinh trùng sốt rét trong *An. minimus* và *An. dirus*

Trong nghiên cứu này, phân tích tổng số 694 mẫu muỗi *An. minimus* và *An. dirus*.

Bảng 3.21. Số lượng mẫu sử dụng phân tích ddPCR xác định KSTSR trong muỗi

Thành phần loài <i>Anopheles</i>	Địa điểm nghiên cứu				Tổng cộng
	Kon Tum	Gia Lai	Đắk Lắk	Đắk Nông	
<i>An. minimus</i>	107	190	0	10	307
<i>An. dirus</i>	89	0	157	141	387
Tổng cộng	196	190	157	151	694

Kết quả xét nghiệm bằng kỹ thuật ddPCR cho thấy có 6 mẫu dương tính với gen mục tiêu ở nồng độ cao trong phản ứng, lần lượt là mẫu M26 (11 bản/μl), K2 (13,8 bản/μl), M23 (15,2 bản/μl), K1 (19,5 bản/μl), M25 (21,4 bản/μl), KT13 (30,3 bản/μl). Từ kết quả này, chúng tôi tính ra được nồng độ mục tiêu trong mẫu DNA tách chiết ban đầu là: 44 bản/μl (M26), 55,2 bản/μl (K2), 60,8 bản/μl (M23), 78 bản/μl (K1), 85,6 bản/μl (M25), 121,2 bản/μl (KT13). Các mẫu còn lại, không phát hiện vi giọt dương. Đây là những mẫu âm tính hoàn toàn.



Hình 3.13. Đồ thị nồng độ mục tiêu trong phản ứng của các mẫu xét nghiệm trong nghiên cứu này (đơn vị: bản/μl).

Các mẫu dương được ghi nhận qua kỹ thuật ddPCR được kiểm tra cho kết quả số lượng và tỷ lệ nhiễm KSTSR trên véc tơ chính được trình bày theo Bảng 3.22.

Bảng 3.22. Tỷ lệ nhiễm KSTSR trên mẫu *An. minimus* và *An. dirus* bằng ddPCR

TT	Địa điểm nghiên cứu	Loài véc tơ chính					
		<i>An. minimus</i>			<i>An. dirus</i>		
		SL	(+) <i>Plasmodium</i>		SL	(+) <i>Plasmodium</i>	
			SL	%		SL	%
1	Kon Tum	107	3	2,8	89	0	0

2	Gia Lai	190	3	1,58	-	-	-
3	Đắk Lắk	-		-	157	0	0
4	Đắk Nông	10		0	141	0	0
	Tổng số	307	6	1,95	387	0	0

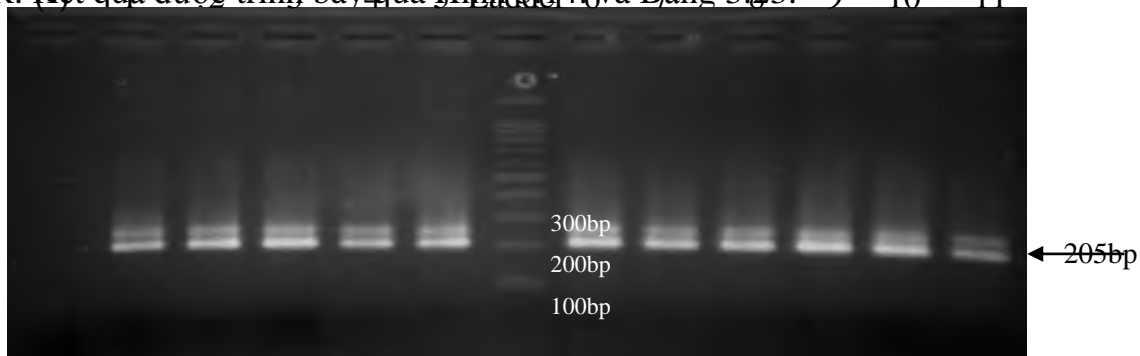
Ghi chú: (+): Dương tính; SL: số lượng

Tại Kon Tum, kết quả phân tích tỷ lệ nhiễm *Plasmodium* spp. trong 196 mẫu cho thấy chỉ ghi nhận 3 mẫu *An. minimus* có nhiễm với tỷ lệ 2,8%. Tại Gia Lai, qua phân tích phân tích nhiễm KSTSR bằng kỹ thuật ddPCR 190 mẫu *An. minimus* ghi nhận có 3 trường hợp có sự hiện diện *Plasmodium* spp. chiếm 1,58%. Các điểm còn lại trong nghiên cứu này không phát hiện được mẫu có nhiễm KSTSR trong các véc tơ chính *An. minimus* và *An. dirus*

3.2. Phân tích các chỉ điểm phân tử kháng thuốc *K₁₃*, *plasmepsin 2*, *exonulcease*, *Pfmdr1*, *Pfcrtr* trong quần thể *Plasmodium falciparum* tại điểm nghiên cứu

3.2.1. Xác định loài ký sinh trùng *Plasmodium* spp. của các mẫu nghiên cứu

Trong thời gian nghiên cứu, nhóm thực hiện thu thập tổng cộng 562 mẫu máu khô vào trên giấy thấm chuyên dụng Whatman 3MM từ các bệnh nhân sốt rét nhiễm loài *P. falciparum* đơn thuần hoặc nhiễm phối hợp có *P. falciparum*. Các mẫu giấy thấm có chứa KSTSR sẽ được tiến hành tách chiết DNA và định loài lại bằng kỹ thuật nested-PCR. Kết quả được trình bày qua Hình 3.14 và Bảng 3.23.



Hình 3.14. Kết quả điện di định loài các mẫu *P. falciparum*.

Ghi chú: (-); chứng âm; 1: chứng dương *P. falciparum* với kích thước 205 bp; 2-11: mẫu dương tính với *P. falciparum*; M: thang chuẩn là ladder 100bp.

Bảng 3.23. Kết quả xác định loài các mẫu máu nhiễm *P. falciparum*

Thời gian	Địa điểm nghiên cứu				Tổng cộng (n = 562)
	Kon Tum	Gia Lai	Đắk Lắk	Đắk Nông	
2019	23	86	83	44	236
2020	-	89	48	82	219
2021	-	76	31	-	107
Tổng	23	251	162	126	562

Qua phân tích kết quả xác định loài KST SR bằng kỹ thuật PCR cho thấy các mẫu đều được xác định loài *P. falciparum* với kích thước 205bp.

3.2.2. Kết quả xác định đột biến điểm trên gen mã hóa K₁₃ của *P. falciparum*

Tổng số 562 mẫu *P. falciparum* tại các điểm nghiên cứu, trong đó tại Kon Tum có 23 mẫu, Gia Lai 251 mẫu, Đắk Lắk 162 mẫu và Đắk Nông là 126 mẫu được phân tích đầy đủ đã phát hiện sự có mặt của 4 vị trí đột biến là R539T, C580Y, I446F và A578S. Số lượng và tỷ lệ từng loại đột biến gen K₁₃ được tổng hợp và thể hiện trong Bảng 3.24.

Bảng 3.24. Số lượng và tỷ lệ các đột biến trên gen K₁₃ tại các điểm nghiên cứu

Thời gian	Đột biến gen K ₁₃	Địa điểm thu thập mẫu nghiên cứu			
		Kon Tum (N = 23)	Gia Lai (N = 251)	Đắk Lắk (N = 162)	Đắk Nông (N = 126)
2019	<i>Pfkelch13-C580Y</i>	30,43% (7/23)	69,77% (60/86)	87,95% (73/83)	79,55% (35/44)
	<i>Pfkelch13-R539T</i>	8,70% (2/23)	0%	0%	0%
2020	<i>Pfkelch13-C580Y</i>	-	98,88% (88/89)	77,08% (37/48)	100% (82/82)
	<i>Pfkelch13-R539T</i>	-	0%	2,1% (1/48)	1,3% (1/82)
	<i>Pfkelch13-F446I</i>	-	0%	0%	25,6%(21/82)
2021	<i>Pfkelch13-C580Y</i>	-	97,4% (74/76)	100% (31/31)	-
	<i>Pfkelch13-R539T</i>	-	0%	0%	-
	<i>Pfkelch13-A578S</i>	-	1,32% (1/76)	0%	-
Tổng cộng	<i>Pfkelch13-C580Y</i>	30,43%(7/23)	88,45% (222/251)	87,04% (141/162)	87,3% (110/126)
	<i>Pfkelch13-R539T</i>	8,70% (2/23)	0%	0,62% (1/162)	0,79% (1/126)
	<i>Pfkelch13-F446I</i>	-	0%	0%	16,67% (21/126)
	<i>Pfkelch13-A578S</i>		0,40% (1/251)	0%	0%

Như vậy, tại 4 tỉnh Tây Nguyên đã ghi nhận sự có mặt của đột biến C580Y với tỷ lệ tương đối cao 88,45% (222/251), 87,04% (141/162), 87,3% (110/126) tương ứng ở các vùng sốt rét lưu hành của tỉnh Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông, riêng tại Kon Tum tỷ lệ đột biến này không cao bằng chỉ 30,43% (7/23); đặc biệt phát hiện sự có mặt của đột biến mới F446I với tỷ lệ là 16,67% (21/126) trong nhóm mẫu của Đắk Nông; và một tỷ lệ nhỏ đột biến R539T và A578S.

3.2.3. Kết quả xác định biến thể đa hình gen *Plasmepsin 2* của *P. falciparum*

Qua phân tích realtime-PCR sử dụng probe để phát hiện biến thể đa hình trên gen *plasmepsin 2*, các trường hợp đều có phản ứng khuếch đại gen, các giá trị số bản sao được ghi nhận và tổng hợp vào Bảng 3.26.

Bảng 3.26. Số lượng và tỷ lệ biến thể đa hình gen *plasmepsin2* tại điểm nghiên cứu

Thời gian	Biến thể đa hình gen <i>plasmepsin2</i>		Địa điểm nghiên cứu			
			Kon Tum (N = 23)	Gia Lai (N = 251)	Đắk Lắk (N = 162)	Đắk Nông (N = 126)
2019	PM2/3 (>1,5)	CNV	8,70% (2/23)	69,77% (60/86)	42,17% (35/83)	34,09% (15/44)
2020	PM2/3 (>1,5)	CNV	-	58,4% (52/89)	79,17% (38/48)	31,71% (26/82)
2021	PM2/3 (>1,5)	CNV	-	1,32% (1/76)	19,35% (6/31)	-
Tổng số	PM2/3 (>1,5)	CNV	8,70% (2/23)	45,82% (113/251)	48,77% (79/162)	32,54% (41/126)

Như vậy, tại Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông từ năm 2019 đến năm 2021 đã ghi nhận sự có mặt của biến thể đa hình gen *plasmepsin2* với tỷ lệ tương ứng cho từng tỉnh ở trên là 8,7% (2/23), 45,82% (113/251), 48,77% (79/162) và 32,54% (41/126).

3.2.4. Xác định đột biến điểm trên gen exonuclease liên quan đến kháng piperazine phosphate của *P. falciparum*

Các trình tự gen *exonuclease* của 562 mẫu phân lập *P. falciparum* tại các điểm nghiên cứu được phân tích bằng phần mềm Geneious R8 và đã phát hiện sự có mặt của đột biến E415G tại các điểm nghiên cứu, Kết quả phân tích số lượng và tỷ lệ từng loại đột biến thể hiện trong Bảng 3.27.

Bảng 3.27. Số lượng và tỷ lệ đột biến *Exonuclease* E415G tại các tỉnh

Thời gian	Đột biến Exo E415G	Địa điểm nghiên cứu các tỉnh			
		Kon Tum (N = 23)	Gia Lai (N = 251)	Đắk Lắk (N = 162)	Đắk Nông (N = 126)
2019	<i>Exo E415G</i>	30,43% (7/23)	12,79% (11/86)	49,4% (41/83)	54,55% (24/44)
2020	<i>Exo E415G</i>	-	1,12% (1/89)	4,17% (2/48)	59,75% (49/82)
2021	<i>Exo E415G</i>	-	3,95% (3/76)	80,6% (25/31)	-
Tổng cộng	<i>Exo E415G</i>	30,43% (7/23)	5,98% (15/251)	41,98% (68/162)	57,94% (73/126)

Tính về tổng thể, tại tỉnh Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông từ năm 2019-2021 ghi nhận có mặt đột biến *exonuclease* E415G với tỷ lệ tương ứng ở từng tỉnh 30,43% (7/23), 5,98% (15/251), 41,98% (68/162) và 57,94% (73/126).

3.2.5. Kết quả xác định các đột biến điểm trên gen *Pfprt* của *P. falciparum*

Các trình tự gen *Pfprt* thu nhận được từ quá trình giải trình tự bằng phần mềm Geneious R8 của 562 mẫu *P. falciparum* tại các điểm nghiên cứu được phân tích so sánh, và đã phát hiện sự có mặt đột biến *Pfprt* F145I, *Pfprt* T93S, *Pfprt* H97Y, *Pfprt* I218V, *Pfprt* A220S và các đột biến vùng 72-76 trên các đoạn gen *Pfprt* tại 4 tỉnh nghiên cứu. Kết quả phân tích số lượng và tỷ lệ đột biến thể hiện trong Bảng 3.28.

Bảng 3.28. Số lượng và tỷ lệ đột biến trên gen *Pfcr*t tại điểm nghiên cứu

Thời gian	Đột biến gen <i>Pfcr</i> t	Địa điểm nghiên cứu			
		Kon Tum (N = 23)	Gia Lai (N = 251)	Đắk Lắk (N = 162)	Đắk Nông (N = 126)
2019	<i>Pfcr</i> t (72-76 CVIET)	95% (22/23)	100% (86/86)	95,2% (79/83)	100% (44/44)
	<i>Pfcr</i> t (72-76 CVIDT)	4,3% (1/23)	0%	2,4% (2/83)	0%
	<i>Pfcr</i> t (72-76 CVVET)	0%	0%	1,2% (1/83)	0%
	<i>Pfcr</i> t (72-76 WGIET)	0%	0%	1,2% (1/83)	0%
	<i>Pfcr</i> t F145I	0%	0%	2,4% (2/83)	18,2% (8/44)
	<i>Pfcr</i> t T93S	13% (3/23)	1,2% (1/86)	18,07% (15/83)	11,36% (5/44)
	<i>Pfcr</i> t H97Y	4,3% (1/23)	0%	6,02% (5/83)	15,9% (7/44)
	<i>Pfcr</i> t I218F	0%	0%	4,82% (4/83)	2,3% (1/44)
	<i>Pfcr</i> t A220S	100%	100%	100%	100%
2020	<i>Pfcr</i> t (72-76 CVIET)	-	100% (89/89)	100% (48/48)	100% (82/82)
	<i>Pfcr</i> t F145I	-	0%	4,2% (2/48)	6,1% (5/82)
	<i>Pfcr</i> t T93S	-	5,6% (5/89)	0%	56,1% (46/82)
	<i>Pfcr</i> t I218F	-	0%	0%	6,1% (5/82)
	<i>Pfcr</i> t I218V	-	0%	0%	2,4% (2/82)
	<i>Pfcr</i> t A220S	-	100%	100%	100%
2021	<i>Pfcr</i> t (72-76 CVIET)	-	100% (76/76)	100% (31/31)	-
	<i>Pfcr</i> t F145I	-	0%	6,45% (2/31)	-
	<i>Pfcr</i> t T93S	-	1,3% (1/76)	74,19% (23/31)	-
	<i>Pfcr</i> t A220S	-	100%	100%	-

Như vậy, trong số 562 mẫu phân lập *P. falciparum* thu thập tại 4 tỉnh nghiên cứu, kết quả phân tích đột biến trên vùng gen *Pfcr*t ghi nhận sự có mặt 4 kiểu motif của vùng 72-76 là CVIET, CVIDT, CVVET và WGIET và 5 loại đột biến khác là gồm *Pfcr*t F145I, *Pfcr*t T93S, *Pfcr*t H97Y, *Pfcr*t I218V và *Pfcr*t A220S. Trong đó, kiểu motif CVIET của vùng gen 72-76 và *Pfcr*t A220S chiếm ưu thế với tỷ lệ gần như tuyệt đối, tỷ lệ thu được hầu như 100% ở các điểm nghiên cứu trừ nhóm mẫu tại Kon Tum và Đắk Lắk từ năm 2019-2019.

3.2.6. Kết quả xác định biến thể đa hình của gen *Pfmdr1* của *P. falciparum*

Qua phân tích realtime-PCR sử dụng probe để phát hiện biến thể đa hình trên gen *Pfmdr1*, các trường hợp đều có phản ứng khuếch đại gen, các giá trị số bản sao được ghi nhận và tổng hợp vào bảng 3.30.

Bảng 3.30. Số lượng và tỷ lệ biến thể đa hình gen *Pfmdr1* tại các địa điểm

Thời gian	Đột biến	Địa điểm nghiên cứu			
		Kon Tum (N = 23)	Gia Lai (N = 251)	Đắk Lắk (N = 162)	Đắk Nông (N = 126)
2019	<i>Pfmdr1</i> CNV (>1,5)	8,7% (2/23)	5,81% (5/86)	15,66% (13/83)	15,91% (7/44)
2020	<i>Pfmdr1</i> CNV (>1,5)	-	0%	14,58% (7/48)	28,1% (23/82)
2021	<i>Pfmdr1</i> CNV (>1,5)	-	1,32% (1/76)	35,5% (11/31)	-
Tổng số	<i>Pfmdr1</i> CNV (>1,5)	8,7% (2/23)	2,39% (6/251)	19,14% (31/162)	23,81% (30/126)

Như vậy, tại các tỉnh Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông từ năm 2019 đến năm 2021 ghi nhận sự có mặt biến thể đa hình gen *Pfmdr1* với tỷ lệ tương ứng cho từng tỉnh ở trên là 8,7% (2/23), 2,39% (6/251), 19,14% (31/162) và 23,81% (30/126).

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Về kết quả xác định thành phần loài, mật độ, tập tính của muỗi *Anopheles* spp. và tỷ lệ *An. minimus* và *An. dirus* nhiễm *Plasmodium* spp. bằng kỹ thuật sinh học phân tử tại 4 tỉnh Tây Nguyên, 2019-2022

4.1.1. Thành phần loài muỗi *Anopheles* tại các điểm nghiên cứu

Tổng số 6957 cá thể muỗi thu thập được trong nghiên cứu, tại Kon Tum thu được 13 loài, tại Gia Lai là 14 loài, tại Đắk Lắk là 13 loài và tại Đắk Nông là 12 loài, cho thấy có mặt các véc tơ chính bao *An. dirus* và *An. minimus*, các véc tơ phụ được phát hiện bao gồm *An. maculatus* và *An. Aconitus*, thu được nhiều nhất là *An. maculatus* với 1153 cá thể chiếm tỷ lệ 16,57%. Kết quả định loại bằng hình thái đã xác định 15 loài *Anopheles* đã thu thập thuộc hai phân giống: Phân giống *Anopheles* Meigen, 1818 có 4 loài và phân giống *Cellia* Theobald, 1902 có 11 loài.

Thành phần loài *Anopheles* ở miền Trung-Tây Nguyên cũng như cả nước có sự khác nhau đáng kể giữa các vùng, sinh cảnh cũng như thay đổi thành phần loài theo mùa, theo vật chủ và theo mốc thời gian. Nghiên cứu của Lê Khánh Thuận (1998) ở miền Trung-Tây Nguyên có 48 loài *Anopheles*, trong đó có 2 véc tơ sốt rét chính gồm *An. dirus*, *An. minimus* và 3 véc tơ phụ là *An. aconitus*, *An. maculatus* và *An. jeyporiensis*; Nghiên cứu muỗi *Anopheles* ở Tây Nguyên của Nguyễn Xuân Quang (2011) [46] cho biết, khu bảo tồn thiên nhiên Đắk Hà - Kon Tum có 14 loài *Anopheles*, vườn quốc gia Yok Đôn 17 loài, Đắk Lắk 15 loài *Anopheles*; một nghiên cứu khác của Nguyễn Xuân Quang và cộng sự (2015) [49], cho biết, Gia Lai 15 loài; Như vậy, thành phần loài trong nghiên cứu này thấp hơn so với các nghiên cứu trước [67].

Kết quả này chứng tỏ thành phần loài không có sự đồng nhất trong các nghiên cứu, có nhiều biến đổi, thay đổi theo thời gian. Hầu hết các nghiên cứu trong các giai đoạn trước đây, thành phần loài thường phong phú hơn so với nghiên cứu trong 05 năm gần đây. Điều này một phần do sinh cảnh có sự thay đổi nhiều, diện tích rừng tự nhiên giảm dần.

Dựa vào sự có mặt của véc tơ sốt rét chính *An. dirus* và *An. minimus* tại khu vực nghiên cứu cho thấy tại các điểm nghiên cứu của 4 tỉnh Tây Nguyên đều có nguy cơ lan truyền sốt rét và nguy cơ mắc sốt rét cho người dân sinh sống tại địa phương.

4.1.2. Một số đặc điểm sinh thái và tập tính của *Anopheles* tại các điểm nghiên cứu

4.1.2.1. Mật độ véc tơ sốt rét

Tại các điểm nghiên cứu của khu vực Tây Nguyên, phát hiện được cả hai véc tơ chính *An. dirus* và *An. minimus* bằng các phương pháp BDTN, MNTN, MNNN, BMGS. Phương pháp BDTN bắt được rất ít muỗi *Anopheles* và hầu như không bắt được véc tơ sốt rét. Có thể rằng khi đặt bẫy đèn trong nhà, nguồn sáng tập trung hơn nên thu hút muỗi vào đèn nhiều hơn, do đó phương pháp này không phản ánh chính xác tập tính hoạt động ban đêm của muỗi là ở trong hay ngoài nhà. Tập tính này được đánh giá chính xác hơn qua phương pháp môi người.

Qua các kết quả nghiên cứu cho thấy muỗi *Anopheles* tại các điểm nghiên cứu của khu vực Tây Nguyên có tập tính hoạt động đốt người ngoài nhà cao hơn trong nhà. Một số nghiên cứu khác cũng cho kết quả tương tự. Obsomer và cộng sự (2007) khi nghiên cứu sự khác nhau về tập tính *Anopheles* ở Đông Nam Á có liên quan đến rừng, đồi núi và yếu tố của *An. dirus* A và *An. minimus* A cho thấy mức độ hoạt động của muỗi ở ngoài nhà cao hơn trong nhà [20]. Nguyễn Xuân Quang và cộng sự (2015) [49], khi nghiên cứu tập tính, vai trò truyền bệnh của véc tơ sốt rét ở khu dân cư và nhà rẫy tại một số vùng SRLH miền Trung-Tây Nguyên, cho thấy véc tơ chính *An. dirus* và *An. minimus* với mật độ đốt ngoài nhà cao hơn.

4.1.2.3. Hoạt động đốt người ban đêm của các véc tơ sốt rét

Tại các điểm nghiên cứu của Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk và Đắk Nông, các véc tơ sốt rét có tập tính đốt người suốt đêm và hoạt động rất sớm (18 - 19 giờ), mật độ tăng cao sớm và thường đạt đỉnh vào lúc 22 - 23 giờ. Kết quả nghiên cứu này giống với kết quả các nghiên cứu trước đây ở Tây Nguyên: *An. minimus* hoạt động đốt máu suốt đêm và có mật độ cao nhất từ 22 đến 4 giờ sáng (Lê Khánh Thuận, 1997) [36]. Đỉnh hoạt động đốt môi của *An. dirus* phổ biến là từ 20 giờ đến 24 giờ.

Các nghiên cứu trước đây cũng cho thấy *An. minimus* đốt máu suốt đêm nhưng đỉnh hoạt động đốt máu thay đổi theo mùa và vùng địa lý. *An. minimus* hoạt động đốt máu về đêm, cao điểm từ 21 giờ đến 3 giờ, mùa đông có thể sớm hơn [35]. So với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Xuân Quang (2011), (2019) [67], các kết quả về thời gian hoạt động của véc tơ và đỉnh hoạt động tương đối có sự giống nhau. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Xuân Quang tại các Vườn quốc gia của Tây Nguyên và tại Khánh Hoà cho thấy muỗi sốt rét thu được có tập tính đốt người suốt đêm và hoạt động rất sớm (18 - 19 giờ), mật độ tăng cao sớm và thường đạt đỉnh vào lúc 21 - 23 giờ; trong đó *An. dirus* thường xuất hiện đỉnh sớm nhất.

4.1.3. Xác định Phức hợp *Minimus* và *Dirus* bằng kỹ thuật PCR

Trong tổng số 715 mẫu véc tơ chính qua định loại PCR cho thấy toàn bộ 387

mẫu *An. dirus s.l* thu được trong nghiên cứu đề cho kết quả là *An.dirus* dạng A; đối với 328 mẫu *An. minimus s.l* có 307/328 mẫu được định loại là *An. minimus* và 21/328 mẫu cho kết quả định loại là loài *An. varuna*, *An. pampanai*, *An. aconitus*.

So sánh kết quả nghiên cứu với các tác giả khác thực hiện tại khu vực Tây Nguyên cho thấy, nghiên cứu Ngô Thị Hương và cộng sự (2004; 2007) bằng phương pháp PCR đã xác định phức hợp *Minimus* tại các tỉnh MT- TN bao gồm 2 loài là *An. minimus* và *An. harrisoni*; phức hợp *Dirus* thì chỉ mới phát hiện loài *An. dirus*; Qua phân tích bằng kỹ thuật PCR cho thấy tất cả cá thể *An. dirus s.l* thu thập tại các điểm nghiên cứu đều cho kết quả là *An. dirus* dạng A. Kết quả này giống với kết quả của Baimai và cộng sự (1987), Ngô Thị Hương và cộng sự (2004) [17], Trương Văn Có và cộng sự (2005) [31].

Như vậy, để xác định chính xác về loài cũng như nghiên cứu đánh giá về tập tính và vai trò truyền bệnh của từng loài trong phức hợp *Minimus*, nhất là ở những nơi mà cả 2 loài trong phức hợp cùng tồn tại hoặc cùng phân bố với một số loài có quan hệ gần gũi như *An. varuna*, *An. pampanai*, *An. aconitus*, *An. jeyporiensis* thì việc áp dụng các kỹ thuật sinh học phân tử trong các điều tra về côn trùng là hết sức cần thiết và quan trọng.

4.1.4. Xác định ký sinh trùng sốt rét trong *An. minimus* và *An. dirus*

Phân tích tỷ lệ nhiễm KSTSR ở các véc tơ chính *An. minimus* và *An. dirus* trong nghiên cứu này cho thấy chỉ phát hiện 6 trường hợp muỗi *An. minimus* dương tính với KSTSR với tỷ lệ là 2,8% tại Kon Tum và 1,58% tại Gia Lai. Các nghiên cứu trước đây cho thấy tỷ lệ nhiễm KSTSR của *An. minimus* là 2,19% và của *An. dirus* là 3,62% tại các vườn Quốc gia ở Kon Tum, Gia Lai và Khu bảo tồn thiên nhiên Ea Sô ở Đắk Lắk (Nguyễn Xuân Quang, 2012); tại Tây nguyên, kết quả mô muỗi cũng đã xác định có 1,8% *An. minimus* nhiễm KSTSR. Tại xã Iakor, tỉnh Gia Lai tỷ lệ nhiễm thoa trùng của *An. minimus* là 2,58 % vào năm [36]; Ngô Thị Hương và cộng sự cũng đã xác định muỗi *An. dirus* nhiễm bằng kỹ thuật ELISA với tỷ lệ 1,22% ở Gia Lai và 1,16% ở Đắk Nông [124]. Kết quả tỷ lệ muỗi nhiễm trong nghiên cứu này thấp hơn nghiên cứu trước đây, cụ thể Nguyễn Xuân Quang và cộng sự (2019) bằng kỹ thuật ELISA đã xác định tỷ lệ dương tính của *An. minmus* tại Chư R' Căm lên đến 11,3% hay Chư Gu là 20% hay Ia Kor là 3,85%; tỷ lệ dương tính trong *An. dirus* tại Chư Gu là 4,62%; Điều này cho thấy, các loài véc tơ *An. minimus* và *An. dirus* vẫn giữ vai trò chính trong việc lan truyền sốt rét trong khu vực thông qua tỷ lệ muỗi nhiễm KSTSR với tỷ lệ cao ở các vùng sốt rét lưu hành.

4.2. Phân tích các chỉ điểm phân tử kháng thuốc K_{13} , *Plasmepsin 2*, *Exonulcease*, *Pfmdr1*, *Pfprt* trong quần thể *Plasmodium falciparum* tại điểm nghiên cứu

4.2.1. Xác định các đột biến điểm trên gen mã hóa K_{13} propeller

Qua phân tích các kết quả thu được, cho thấy đột biến C580Y được tìm thấy trên các mẫu phân lập *P. falciparum* tại cả 4 tỉnh Tây Nguyên Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk và Đắk Nông với tỷ lệ tương đối cao 88,45% (222/251), 87,04% (141/162), 87,3% (110/126) tương ứng tại các tỉnh Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông, riêng tại tỉnh Kon Tum thì tỷ lệ đột biến này chỉ có 30,43% (7/23). Đột biến này cũng là đột biến chủ yếu được phát hiện trong nghiên cứu của Ariey và cộng sự (2014) [89] và phổ biến nhất tại khu vực Tiểu vùng Sông Mê Kông mở rộng với đột biến C580Y chiếm

khoảng 85%, cùng với các đột biến có ý nghĩa khác là R539T và Y493H. Đây là đột biến chính được tìm thấy trong các nghiên cứu về đột biến trên vùng gen K_{13} trong khu vực Tiểu vùng Sông Mê Kông. Đột biến C580Y cũng đã được xác nhận là có liên quan hay ảnh hưởng mạnh đến quá trình chậm làm sạch ký sinh trùng thể vô tính của *P. falciparum* (WHO, 2015).

Ngoài ra, kết quả phân tích các đột biến khác trên vùng gen K_{13} cũng ghi nhận sự có mặt một số đột biến khác chưa từng được báo cáo. Đặc biệt, dữ liệu chỉ rằng đã phát hiện đột biến F446I với tỷ lệ là 16,67% (21/126) trong nhóm mẫu của Đắk Nông và một tỷ lệ nhỏ đột biến R539T và A578S. Đây là đột biến được cho là liên quan đến chậm “thanh thải hay làm sạch” thể vô tính của *P. falciparum* sau khi điều trị bằng artemisinin [131].

4.2.2. Xác định biến thể đa hình của gen *Plasmepsin 2*

Qua phân tích realtime-PCR sử dụng mẫu dò để phát hiện biến thể đa hình trên gen *plasmepsin 2*, các trường hợp đều có phản ứng khuếch đại gen. Trong giai đoạn từ năm 2019-2021 đã ghi nhận sự có mặt của biến thể đa hình gen *plasmepsin* với tỷ lệ 8,7% (2/23); 45,82% (113/251), 48,77% (79/162), 32,54% (41/126) tương ứng với các tỉnh Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông. Tỷ lệ này thấp hơn các nghiên cứu khác. Theo Amato và cộng sự (2017), tỷ lệ biến thể đa hình trên gen *plasmepsin-2* tăng từ 2010 đến năm 2013, tại Pursat là 82%, tại Preah Vihear là 40%, Ratanakiri là 15% [101]. Theo nghiên cứu của B Witkowski và cộng sự (2017), tỷ lệ đa hình trên gen *plasmepsin* cao tại một số tỉnh giai đoạn 2014-2015, cụ thể tại tỉnh Pailin, Raranakira, Mondulkiri, Siemriep, Stungtreng với tỷ lệ lần lượt là 91,2%; 45,5%; 25,4%; 91,2% và 63% [100]. Nghiên cứu của Imwong và cộng sự (2020) cũng thấy biến thể đa hình gen *plasmepsin-2* chiếm tỷ lệ cao ở một số vùng của Campuchia như Pursat, Pailin hay Champasak và Srisaket [129].

Tại Việt Nam, thông qua các dữ liệu nghiên cứu *in vivo* với sốt rét do *P. falciparum* bằng thuốc DHA-PPQ ở đa trung tâm, tỷ lệ thất bại trên 10%, tỷ lệ bệnh nhân còn tồn tại thể vô tính trên 10%, đồng thời trên các phân lập *P. falciparum* có xuất hiện cả đột biến gen K_{13} và tăng số bản sao *plasmepsine* biểu hiện kháng cả dẫn suất artemisinin là dihydroartemisinin và piperaquine phosphate, nên các dữ liệu này đủ mình chứng kháng cả hai thành phần trong viên DHA-PPQ nên đã giúp bổ sung dữ liệu góp phần cơ sở thay đổi chính sách thuốc sốt rét quốc gia từ thuốc DHA-PPQ chuyển sang dùng pyronaridine tetrphosphate-artesunate (Pyramax®) phổ biến từ cuối năm 2020 đến nay.

4.2.3. Xác định đột biến điểm trên gen *exonuclease* liên quan kháng piperaquine phosphate

Qua phân tích số liệu tại Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông từ năm 2019-2021, đã ghi nhận sự có mặt đột biến *exonuclease* E415G với tỷ lệ tương ứng tại từng tỉnh là 30,43% (7/23), 5,98% (15/251), 41,98% (68/162), 57,94% (73/126). Nghiên cứu của Amato và cộng sự (2017) tại Ratanakiri tỷ lệ xuất hiện đột biến này là 8%, tuy nhiên tại Preah Vihear và Pursat có tỷ lệ khá cao lần lượt là 37% và 82% trên các mẫu năm 2013 cũng tương tự [101].

4.2.4. Xác định các đột biến điểm trên gen *Pfprt*

Trong số 562 mẫu *P. falciparum* thu thập, kết quả phân tích các đột biến trên

vùng gen *Pfprt* ghi nhận sự có mặt 4 kiểu motif của vùng 72-76 là CVIET, CVIDT, CVVET và WGIET và 5 loại đột biến khác là *Pfprt F145I*, *Pfprt T93S*, *Pfprt H97Y*, *Pfprt I218V* và *PfprtA220S*. Trong đó kiểu motif CVIET của vùng gen 72-76 và *PfprtA220S* chiếm ưu thế gần 100% ở các điểm nghiên cứu, ngoại trừ tại tỉnh Kon Tum và Đắk Lắk năm 2019. Điều này cũng được báo cáo trong nghiên cứu của Imwong và cộng sự (2020), kết quả nghiên cứu cho thấy locus từ vị trí 72-76 trên gen *Pfprt* đột biến thành kiểu gen CVIET ở hầu hết quần thể mẫu phân lập của *P. falciparum* tại khu vực Tiểu vùng Sông Mê Kông [129].

Sự làm rõ về cơ chế kháng và con đường lây lan kháng các thuốc sốt rét không chỉ cung cấp những hướng đi mới cho nghiên cứu về bệnh sốt rét và giúp chúng ta hiểu sâu hơn về dịch tễ học phân tử của bệnh sốt rét do *P. falciparum*, mà còn góp phần vào việc phát triển các biện pháp mới kiểm soát về mặt di truyền đối với bệnh sốt rét. Sự hiểu biết sâu sắc hơn này cũng có thể cải thiện việc quản lý các bệnh truyền nhiễm khác có liên quan đến vấn đề kháng thuốc.

4.2.5. Xác định biến thể đa hình của gen *Pfmdr1* trên *P. falciparum*

Qua phân tích realtime PCR sử dụng probe để phát hiện biến thể đa hình trên gen *Pfmdr1*, các trường hợp đều có phản ứng khuếch đại gen. Trong giai đoạn từ năm 2019-2021, trong số 562 mẫu đã ghi nhận sự có mặt biến thể đa hình gen *Pfmdr1* với tỷ lệ 8,1% (2/23), 2,39% (6/251), 19,14% (31/162), 23,81% (30/126) tương ứng tại các tỉnh Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông. Tỷ lệ này tương tự như các nghiên cứu khác tại Campuchia, như nghiên cứu của Amato và cộng sự (2017), tỷ lệ biến thể đa hình trên gen *Pfmdr1* tại Preah Vihear là 15%, Pursat là 8% và tại Ratanakiri không ghi nhận mẫu nào có biến thể đa hình gen *Pfmdr1* [101]. Tỷ lệ biến thể đa hình gen *Pfmdr1* tại các điểm trong nghiên cứu tại 4 tỉnh Tây Nguyên - Việt Nam cũng tương tự với một số khu vực tiểu vùng sông Mê Kông, cụ thể kết quả nghiên cứu Imwong và cộng sự (2020) cho thấy tỷ lệ đột biến này là 13% ở Mandalay, 19% ở Maesot (Thái Lan), Nam Lào là 4% và 8% ở Stung Treng (Bắc Campuchia) [129]. Kết quả này cũng phù hợp với dữ liệu của các nghiên cứu lâm sàng cho thấy mối liên quan giữa tăng số lượng bản sao *Pfmdr1* và tăng nguy cơ thất bại của liệu pháp đơn trị liệu mefloquine hoặc phối hợp artesunate-mefloquine về khía cạnh sinh học phân tử [113]. TCYTTG cũng đã xác nhận sự gia tăng số lượng bản sao của gen *Pfmdr1* có liên quan đến kháng mefloquine [132].

Tình trạng kháng artemisinin và các thuốc phối hợp ở cấp độ phân tử đã lan rộng cả khu vực Tây Nguyên; các chỉ thị phân tử kháng artemisinin có sự gia tăng theo thời gian, cụ thể theo nghiên cứu của Huỳnh Hồng Quang và cộng sự (2016) xác định tỷ lệ đột biến C580Y tại Gia Lai là 36,5% và tại Đắk Nông là 24,6% [127]; nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Trinh và cộng sự (2016) cũng đã xác định tại Gia Lai là 11,59% (11/96) [128]; đến 2019 theo kết quả ở trên thì tỷ lệ của đột biến C580Y này tại 4 tỉnh Tây Nguyên dao động từ lần lượt là 30,4% đến 87,95%, đến năm 2020-2021 tỷ lệ tăng lên đến 100% ở Đắk Nông và Đắk Lắk, cho thấy tình trạng kháng artemisinin đang mở rộng vùng phân bố. Đối với các thuốc phối hợp cũng cho kết quả tương tự, biến thể đa hình gen *plasmepsin 2* và đột biến E415G trên gen *exonulease*, là chỉ thị phân tử cho kháng PPQ, các đột biến trên gen *Pfprt* liên quan kháng PPQ và biến thể đa hình gen *Pfmdr1* liên quan kháng MQ và đa kháng cũng

gia tăng theo thời gian.

Kết quả này cùng với tỷ lệ thất bại điều trị trên lâm sàng và tỷ lệ thể vô tính còn tồn tại ngày D3 cho thấy bức tranh kháng thuốc cấp độ phân tử ở khu vực Tây Nguyên và ở Việt Nam đang ở mức cảnh báo; điều này đã được chứng minh bằng việc thay đổi chính sách thuốc sốt rét chuyển từ DHA-PPQ sang dùng pyronaridine tetraphosphate-artesunate phổ biến từ cuối năm 2020 đến nay. Hiện nay, tình trạng kháng thuốc lan rộng và giảm nhạy với một số thuốc có hiệu lực cao hiện dùng trong Chính sách thuốc sốt rét Quốc gia như hiện nay có xu hướng lan rộng, nếu không có thuốc ứng viên thay thế là một thách thức. Trong thực hành lâm sàng điều trị sốt rét do *P. falciparum* tại Việt Nam là chỉ định dùng thuốc phối hợp artesunate-pyronaridine (Pyramax®) còn hiệu lực cao, song tỷ lệ tồn tại thể vô tính ngày D3 dương tính còn cao trên 30%, đồng thời các chỉ điểm phân tử đột biến gen K_{13} , đặc biệt kiểu hình C580Y liên quan đến kháng artesunate trong thành phần thứ nhất của viên Pyramax trên quần thể *P. falciparum* là tình trạng kháng thuốc một phần đối với artesunate, điều đó chỉ ra chúng ta cần nghiên cứu giám sát hiệu lực thuốc *in vivo* trên lâm sàng và việc sử dụng và theo dõi giám sát hiệu lực thuốc thường xuyên là cần thiết.

Hai kết quả trên đây là hai khía cạnh đang được quan tâm hàng đầu trong chiến lược loại trừ sốt rét trong giai đoạn từ nay đến 2030, đó là tình trạng kháng thuốc điều trị sốt rét và vấn đề kiểm soát véc tơ sốt rét. Bức tranh kháng thuốc sốt rét này kết hợp với tình trạng có một tỷ lệ muỗi nhiễm KSTSR tại cùng điểm nghiên cứu trong cùng khoảng thời gian, điều này giống lên hồi chuông cảnh báo về sự lây lan kháng thuốc trong khu vực. Vấn đề này cũng đã được nghiên cứu bởi một số tác giả gần đây, các nhóm nghiên cứu này tìm cách chứng minh con đường KSTSR kháng thuốc lan truyền thông qua muỗi *Anopheles*. Nghiên cứu của Kathrin Witmer và cộng sự (2020) đã chỉ ra bằng chứng rõ ràng của việc các chủng lâm sàng đã xác định kháng artemisinin dựa trên các chỉ điểm phân tử trên gen K_{13} cũng có khả năng lan truyền tính kháng thuốc cho muỗi trong phạm vi bao phủ của thuốc sốt rét. Kết quả này mở ra một hướng mới trong nghiên cứu kháng thuốc hiện nay: liệu rằng tình trạng kháng lan rộng có liên quan đến muỗi và vai trò của chúng trong lan truyền KSTSR kháng thuốc hiện nay [137].

KẾT LUẬN

1. Thành phần loài, mật độ, tập tính của muỗi *Anopheles* spp. và tỷ lệ *An. minimus* và *An. dirus* nhiễm *Plasmodium* spp. tại bốn tỉnh Tây Nguyên, 2019-2022

- Đã phát hiện được 6957 cá thể muỗi cái trưởng thành tại 4 tỉnh Tây Nguyên qua phương pháp bẫy đèn trong nhà, bẫy đèn ngoài nhà, mời người trong nhà, mời người ngoài nhà và bẫy màn gia với số loài như sau: tại Kon Tum có 13 loài, Gia Lai là 14 loài, Đắk Lắk là 13 loài và Đắk Nông là 12 loài;
- Trong tổng số 6957 cá thể muỗi cái trưởng thành, đã thu được 715 véc tơ sốt rét chính *An. dirus* và *An. minimus* tại 4 tỉnh Tây Nguyên Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk và Đắk Nông, hiện diện hai véc tơ chính tại tỉnh Kon Tum và Đắk Nông (*An.*

minimus và *An. dirus*), trong khi tại Gia Lai chỉ có *An. minimus* và Đăk Lăk chỉ có *An. dirus*;

- Tại các điểm nghiên cứu, thu thập muỗi bằng phương pháp bẫy màn gia súc là nhiều nhất, mật độ đốt người ngoài nhà cao hơn trong nhà, trong các phương pháp thu thập muỗi thì phương pháp bẫy đèn ngoài nhà bắt được rất ít muỗi *Anopheles* và không bắt được véc tơ sốt rét;
- Các véc tơ sốt rét tại các điểm nghiên cứu có tập tính đốt người suốt đêm và hoạt động rất sớm (18 - 19 giờ), mật độ tăng cao sớm và thường đạt đỉnh vào lúc 22 - 23 giờ;
- Trong số 715 mẫu véc tơ sốt rét chính, định loại bằng PCR cho thấy toàn bộ 387 mẫu *An. dirus s.l* thu được trong nghiên cứu đều là *An. dirus* dạng A; 328 mẫu *An. minimus s.l* thì có 307/328 mẫu định loại là *An. minimus* và 21/328 mẫu định loại là *An. varuna*, *An. pampanai*, *An. aconitus*. Trong 307 mẫu *An. minimus*, tại Kon Tum có 107 mẫu, 190 mẫu thu tại Gia Lai và 10 mẫu thu tại Đăk Nông;
- Đã phát hiện tỷ lệ nhiễm *Plasmodium* spp. trong cơ thể muỗi *An. minimus* tại 2 tỉnh Kon Tum là 2,8% và Gia Lai là 1,58%. Mẫu thu thập từ các điểm khác chưa ghi nhận nhiễm *Plasmodium* spp.

2. Chỉ điểm phân tử kháng thuốc (K_{13} , *plasmepsin2*, *Exonulcease E415G*, *Pfprt*, *Pfmdr1*) trong quần thể *Plasmodium falciparum* tại bốn tỉnh Tây Nguyên

Đã phát hiện các chỉ điểm phân tử kháng các thuốc sốt rét artemisinin, piperazine, chloroquine và mefloquine tại các điểm nghiên cứu, cụ thể:

- Xác định các đột biến điểm trên gen K_{13} liên quan kháng artemisinin trên quần thể *P. falciparum* trong giai đoạn 2019-2021: đột biến C580Y có tỷ lệ xuất hiện tại Kon Tum là 30,43% (7/23), tại Gia Lai dao động từ 69,77% (60/86) đến 98,88% (88/89), tại Đăk Lăk từ 77,08% (37/48) đến 100% (31/31) và tỷ lệ dao động từ 79,55% (35/44) và 100% (82/82) tại Đăk Nông; phát hiện kiểu gen đột biến mới F446I liên quan chậm thanh thải artemisinin với tỷ lệ 16,67% (21/126) tại Đăk Nông và đột biến R539T tại Kon Tum là 8,7% (2/23), Đăk Lăk 0,62% (1/162) và Đăk Nông là 0,79% (1/126);
- Biến thể đa hình gen *plasmepsin2* liên quan kháng piperazine phosphate với tỷ lệ 8,7% (2/23) tại Kon Tum; 45,82% (113/251) tại Gia Lai; 48,77% (79/162) tại Đăk Lăk và 32,54% (41/126) tại Đăk Nông;
- Xác định đột biến E415G trên gen *exonuclease* của *P. falciparum* liên quan kháng piperazine phosphate tại Kon Tum là 30,43% (7/23), Gia Lai là 5,98% (15/251), Đăk Lăk là 41,98% (68/162), Đăk Nông là 57,94% (73/126);
- Xác định các đột biến trên gen *Pfprt* liên quan kháng chloroquin, phát hiện 4 kiểu motif vùng 72-76 là CVIET, CVIDT, CVVET và WGIET và 5 đột biến *Pfprt*F145I, *Pfprt* T93S, *Pfprt* H97Y, *Pfprt* I218V, *Pfprt*A220S trên quần thể *P. falciparum* kháng chloroquin. Trong đó, kiểu haplotype CVIET trên vùng gen 72-76 chiếm tỷ lệ từ 95% đến 100% và đột biến *Pfprt*A220S chiếm tỷ lệ 100% ở tất cả 4 tỉnh;
- Xác định biến thể đa hình của gen *Pfmdr1* trên quần thể *P. falciparum* liên quan kháng mefloquine tại Kon Tum là 8,7% (2/23), Gia Lai là 2,39% (6/251), Đăk Lăk là 19,14% (31/162) và Đăk Nông với tỷ lệ là 23,81% (30/126).

KHUYẾN NGHỊ

- Tiếp tục nghiên cứu để xác định thêm các đột biến khác cũng như nghiên cứu mở rộng điểm nghiên cứu đặc biệt là các vùng SRLH nặng tại khu vực miền Trung - Tây Nguyên, góp phần bổ sung dữ liệu về kháng thuốc phân tử và là một số số hiệu cảnh báo sớm kháng thuốc. Trong đó cần chú trọng nghiên cứu phát hiện các chỉ điểm phân tử tiềm năng liên quan nhạy-kháng pyronaridine tetrphosphate trong viên Pyramax, là loại thuốc hiện dùng đầu tay trong điều trị sốt rét do *P. falciparum* chưa biến chứng ở Việt Nam.
- Nghiên cứu vai trò của muỗi trong lan truyền KSTSR kháng thuốc hiện nay, sự tồn tại các véc tơ chính nhiễm *Plasmodium* spp. kháng thuốc sẽ có nguy cơ lan rộng thông qua quần thể muỗi phát tán và sự giao gen nhạy và gen kháng giữa các vùng có thể làm thất bại các thành quả đạt được hiện nay.

DANH SÁCH CÁC BÀI BÁO KHOA HỌC LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN ĐÃ CÔNG BỐ

1. Nguyễn Thị Minh Trinh, Lê Ái Quốc, Lê Thị Hạnh Diệu, Nguyễn Thị Liên Hạnh, Nguyễn Xuân Quang, Đỗ Văn Nguyên, Nguyễn Hồng Sang, Nguyễn Thu Hương, Nguyễn Xuân Xã, Huỳnh Hồng Quang (2024). Xác định thành phần loài và tỷ lệ nhiễm ký sinh trùng sốt rét *Plasmodium* spp. trên muỗi bằng kỹ thuật sinh học phân tử tại Tây Nguyên. *Tạp chí Y học Cộng đồng*, ISSN 2354-0613, Vol 65, No. 6, 64-71.
2. Nguyễn Thị Minh Trinh, Lê Thị Hạnh Diệu, Nguyễn Thị Liên Hạnh, Nguyễn Thu Hương, Nguyễn Xuân Xã, Huỳnh Hồng Quang (2024). Sự phân bố các chỉ điểm chỉ điểm gen liên quan kháng thuốc của *Plasmodium falciparum* tại bốn tỉnh Tây Nguyên (2019-2021). *Tạp chí Y học Cộng đồng*, ISSN 2354-0613, Vol 65, No. 6, 79-86.
3. Nguyễn Thị Minh Trinh, Lê Thị Hạnh Diệu, Nguyễn Thị Liên Hạnh, Nguyễn Thu Hương, Nguyễn Xuân Xã, Huỳnh Hồng Quang (2024). Diễn biến tình trạng kháng artemisinin ở mức độ phân tử của *Plasmodium falciparum* tại một số tỉnh Tây Nguyên giai đoạn 2016-2021. *Tạp chí Y học Cộng đồng*, ISSN 2354-0613, Vol 65, No. 6, 72-78.

