

# KHÁI QUÁT CHUNG CỦA LUẬN ÁN

## 1. Tính cấp thiết

Bình Phước và Đắc Nông là 2 tỉnh nằm trong vùng sốt rét lưu hành nặng. Mỗi năm có hàng nghìn bệnh nhân sốt rét được phát hiện ở các trạm y tế xã. Trong đó sốt rét *P. falciparum* chiếm trên 50%, kháng đa thuốc cả với artesunate. Để hiểu rõ thực trạng vector truyền sốt rét, mức kháng thuốc và sự thay đổi di truyền liên quan đến kháng thuốc của KST ở khu vực này tác động đến tình hình dịch tễ sốt rét như thế nào là rất cần thiết cho công tác phòng chống bệnh. Do vậy chúng tôi tiến hành đề tài luận án.

## 2. Mục tiêu

- Xác định thành phần và sự phân bố của các loài muỗi Anopheles.
- Xác định tỷ lệ nhiễm thoa trùng Plasmodium của vector sốt rét.
- Phát hiện đột biến gen MDR - 1 và ATPase6, sự thay đổi axit amin của protein Phg -1 và enzyme ATPase6 của *P. falciparum* ở bệnh nhân sốt rét thử nghiệm *in vivo* với thuốc artesunate.

## 3. Tính mới và những đóng góp cho thực tiễn

Kết quả điều tra đã xác định ở Bình Phước phân bố 19 loài Anopheles, so với 7 loài đã được công bố ở các nghiên cứu trước. Xác nhận sự có mặt của 3 loài vector đó là *An. minimus*, *An. aconitus* và *An. jeporiensis* mà các nghiên cứu trước chưa điều tra thấy. Xác định sự phân bố của 2 vector chính *An. dirus* và *An. minimus* ở 3 sinh cảnh thôn bản, bìa rừng và trong rừng thuộc điểm nghiên cứu đều có dân ở tập trung đông sinh sống và lao động.

Kết quả nghiên cứu *in vivo* xác định *P. falciparum* ở Bình Phước và Đắc Nông đã kháng artesunate. Gen ATPase6 liên quan kháng đã được giải mã và phát hiện 4 axit amin của enzym ATPase6 bị thay thế do đột biến ở các vị trí N465S, I569L, I654K và T656P. Kết quả nghiên cứu là chỉ số dịch tễ học phân tử sốt rét kháng thuốc và mở ra hướng mới trong nghiên cứu KST kháng artemisinin ở Việt Nam.

Kết quả nghiên cứu còn là dữ liệu có ý nghĩa và giá trị làm cơ sở cho công tác phòng chống vector sốt rét và giám sát ngăn chặn sự phát triển sốt rét và lan rộng KST kháng thuốc ở Việt Nam.

## MỞ ĐẦU

Việt Nam đã đạt được nhiều thành tựu to lớn trong công tác phòng chống sốt rét. Tuy nhiên hai tỉnh Bình Phước và Đắc Nông vẫn có tỷ lệ sốt rét cao trong nhiều năm qua. Điều kiện tự nhiên, kinh tế và xã hội thuận lợi cho muỗi Anopheles phát triển truyền bệnh quanh

năm. Di biến động dân cư từ vùng không có sốt rét đến khu vực này diễn biến phức tạp. Trong khi các chỉ số muỗi *Anopheles* có được ở khu vực này không tương quan với tình hình dịch tễ bệnh, chưa phản ánh được sự lan truyền bệnh và phát triển sốt rét.

Cơ chế kháng artemisinin của *P. falciparum* được đề xuất liên quan đến 2 gen ATPase6 và MDR-1. Kết quả nghiên cứu cho thấy đột biến gen xuất hiện ở nhiều điểm, không giống nhau ở *P. falciparum* các nước trên thế giới và với mỗi loại dẫn xuất artemisinin. Ở nước ta đã có một số nghiên cứu gen MDR-1 của *P. falciparum* kháng artemisinin, nhưng với gen ATPase6 chưa có công trình nào được công bố. Trong khi artesunate tiêm vẫn được chỉ định điều trị sốt rét nặng và ác tính do *P. falciparum*. Artemisinin hoặc dẫn xuất của artemisinin vẫn là 1 thành phần chính của liệu pháp phối hợp ACT chống *P. falciparum* kháng.

Chính vì vậy việc nghiên cứu thành phần loài, sự phân bố, mức độ nhiễm toa trùng Plasmodium của muỗi *Anopheles* truyền sốt rét và phát hiện đột biến gen kháng artemisinin ở *P. falciparum* để làm dấu hiệu phân tử giám sát ngăn chặn sự phát triển và lan truyền kiểu gen kháng của ký sinh trùng là rất cần thiết ở vùng sốt rét kháng thuốc. Xuất phát từ những vấn đề nêu trên, nghiên cứu sinh thực hiện đề tài luận án: **Nghiên cứu thành phần loài, tỷ lệ nhiễm toa trùng sốt rét của muỗi *Anopheles* và đột biến gen của *P. falciparum* kháng artesunate ở tỉnh Bình Phước và Đắk Nông.**

## CHƯƠNG 1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Hiện nay đã xác định được vai trò truyền sốt rét và vùng phân bố của 41 loài *Anopheles* trên thế giới. Ở Việt Nam có 3 vector chính và 6 vector phụ. Miền Bắc phân bố 1 vector chính *An. minimus*, 3 vector phụ *An. aconitus*, *An. maculatus* và *An. jeyporiensis*. Miền Tây Nam Bộ và ven biển phân bố 1 vector chính *An. epiroticus*, 3 vector phụ *An. supictus*, *An. vagus* và *An. sisnensis*. Miền Trung - Tây Nguyên và Miền Đông Nam Bộ phân bố 2 vector chính *An. minimus* và *An. dirus*, 3 vector phụ *An. aconitus*, *An. maculatus* và *An. jeyporiensis*. Đặc điểm sinh thái và khả năng truyền bệnh của mỗi loài *Anopheles* khác nhau. Sự phân bố và phong phú của *Anopheles* tùy thuộc sinh địa cảnh và được quyết định bởi chất lượng môi trường sinh thái bọ gậy. Mỗi loài *Anopheles* đều có hoạt động đốt mồi, trú ẩn tiêu máu của *Anopheles* ở trong hoặc ngoài nhà tùy theo từng loài và khả năng thay đổi vị trí để tránh tác dụng của hóa chất. Nhiệt độ và độ ẩm môi trường là 2 yếu tố

quan trọng nhất chi phối sự phát triển của muỗi và KST trong muỗi, ảnh hưởng đến sự lan truyền sốt rét.

Chu trình sinh học của KSTSR trải qua 2 vật chủ là người và muỗi Anopheles. Giai đoạn ký sinh và phát triển ở người KST gây bệnh sốt rét, ở Anopheles có vai trò truyền bệnh. Các yếu tố KSTSR, muỗi Anopheles truyền sốt rét và người cảm thụ tương tác với nhau trong môi trường tự nhiên tạo nên tình trạng dịch tễ sốt rét ở từng vùng. Trong đó sốt rét *P. falciparum* chiếm trên 50% ở đa số các vùng sốt rét, kháng đa thuốc cả với artemisinin. Cơ chế kháng của hầu hết các loại thuốc sốt rét đã được xác định là do đột biến gen mã hóa enzyme liên quan đến hoạt tính của thuốc. Đột biến gen còn gây kháng chéo các thuốc cùng nhóm như mefloquine và halofantrine thuộc nhóm amino alcohol, hoặc cycloquanil và pyrimethamine nhóm antifolate. Đối với artemisinin, cơ chế kháng được đề xuất là do đột biến 2 gen MDR-1 và ATPase6. Gen MDR - 1 đột biến làm thay thế axit amin Pgh-1 ở vị trí N86Y liên quan kháng các thuốc chloroquin và quinin, tăng nhạy cảm với mefloquin hoặc artemisinin. Đột biến gen ATPase6 làm thay đổi axit amin enzym ATPase6 ở các vị trí L263E, E431K, A623E và S769N liên quan tăng giá trị IC50 của artemisinin và artemether...

## ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Muỗi Anopheles thu thập ở thực địa.
- Thoa trùng Plasmodium nhiễm ở muỗi Anopheles.
- Bệnh nhân sốt rét ở thực địa.
- Ký sinh trùng *P. falciparum* ở bệnh nhân thử nghiệm *in vivo* với artesunate.

### 2.2. Thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trong 3 năm từ 2011- 2014

### 2.3. Địa điểm nghiên cứu

- Nghiên cứu thực địa thu thập muỗi và thử nghiệm *in vivo* được thực hiện ở hai tỉnh Bình Phước và Đắk Nông.
- Nghiên cứu phân tích mẫu được tiến hành ở labo Khoa Sinh phân tử Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương.

### 2.4. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.4.1. Thiết kế nghiên cứu:

- Điều tra cắt ngang xác định thành phần loài, sự phân bố và tỷ lệ nhiễm thoa trùng của muỗi Anopheles ở các sinh cảnh.
- Mô tả đột biến gen MDR-1 và ATPase6 của *P. falciparum* ở bệnh nhân *in vivo*

#### 2.4.2. Kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:

- Điều tra thu thập muỗi Anopheles ở thực địa bằng 5 phương pháp bẫy đèn trong nhà và ngoài nhà ban đêm. Mời người trong và ngoài nhà ban đêm. Soi bắt muỗi ở chuồng gia súc ban đêm.
- Đánh giá sự đáp ứng của *P. falciparum* với artesunate bằng kỹ thuật *in vivo* 28 ngày.
- Phát hiện thoa trùng sốt rét trong muỗi và KST máu bệnh nhân thấm trên giấy WHATMAN 3mm bằng kỹ thuật nested - PCR.
- Phân biệt *P. falciparum* tái phát - tái nhiễm bằng kỹ thuật multiplex nested - PCR.
- Phát hiện đột biến gen bằng giải trình tự ADN và phần mềm MEGA4.0.
- Kiểm định sự thay đổi mật độ muỗi ở các sinh cảnh và thời điểm điều tra bằng phần mềm SPSS.

### KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Kết quả điều tra muỗi Anopheles ở điểm nghiên cứu.

##### 3.1.1. Thành phần loài Anopheles

Kết quả 3 đợt điều tra 10/2014, 12/2012-1/2013 và 12/2013 đã thu thập được 2063 cá thể muỗi, định loại được 19 loài Anopheles, tỷ lệ của mỗi loài Anopheles trình bày ở bảng 3.1.

**Bảng 3. 1. Thành phần loài Anopheles ở điểm nghiên cứu**

TT	Loài Anopheles	Số muỗi thu thập	Tỷ lệ %
1	<i>An.(Cell.) aconitus</i> Dönitz 1902**	15	0,73
2	<i>An. (Ano.) barbirostris</i> Wulp1884**	3	0,15
3	<i>An. (Ano.) campestris</i> Reid 1962**	11	0,53
4	<i>An. (Ano.) crawfordi</i> Reid 1953*	8	0,39
5	<i>An. (Nyss.) darlingi</i> Root, 1926**	1	0,05
6	<i>An. (Cell.) dirus</i> Peyton & Harrison*	1377	66,75
7	<i>An. (Cell.) jamesii</i> Theobald 1901**	15	0,73
8	<i>An. (Cell.) jeyporiensis</i> James1902**	2	0,10
9	<i>An. (Cell.) kochi</i> Dönitz 1901**	2	0,10
10	<i>An.(Cell.) karwari</i> James 1903**	1	0,05
11	<i>An. (Cell.) maculatus</i> Theobald 1901*	62	3,01
12	<i>An. (Cell.) minimus</i> Theobald1901**	28	1,36
13	<i>An. (Cell.) nivipes</i> Theobald 1903*	11	0,53

**Bảng 3. 1. Thành phần loài Anopheles ở điểm nghiên cứu**

TT	Loài Anopheles	Số muỗi thu thập	Tỷ lệ %
14	<i>An. (Cell.) philippinensis</i> Ludlow 1902*	489	23,7
15	<i>An. (Ano.) peditaeniatus</i> Leicester 1908*	1	0,05
16	<i>An. (Ano.) sinensis</i> Wiedemann 1828**	10	0,48
17	<i>An. (Cell.) splendidus</i> Koizumi 1920**	23	1,11
18	<i>An. (Cell.) tessellatus</i> Theobald 1901**	1	0,05
19	<i>An. (Cell.) vagus</i> Dönitz: 1902*	3	0,15
<b>Tổng số muỗi của 19 loài</b>		<b>2063</b>	<b>100</b>

\* Loài Anopheles đã điều tra được ở các nghiên cứu trước.

\*\* Loài Anopheles mới điều tra được ở nghiên cứu này.

Trong 19 loài Anopheles có 12 loài đánh dấu \*\* mới điều tra được ở nghiên cứu này, 7 loài đánh dấu \* đã điều tra được ở các nghiên cứu trước. Trong đó có 5 loài chiếm tỷ lệ cao nhất đó là *An. dirus* chiếm 66,75%, *An. philippinensis* chiếm 23,70%, *An. minimus* 1,36%, *An. maculatus* 3,01% và *An. splendidus* 1,11%, 14 loài Anopheles còn lại chiếm tỷ lệ thấp chỉ từ 0,05% - 0,73%.

### 3.1.2. Phân bố của muỗi Anopheles ở các sinh cảnh

Trong 3 sinh cảnh điều tra thôn bản phân bố nhiều loài Anopheles nhất (17 loài), chiếm 33,74% số muỗi. Bìa rừng phân bố 6 loài Anopheles, chiếm 11,44% số muỗi. Trong rừng phân bố 3 loài Anopheles, chiếm 54,82% số muỗi như trình bày ở bảng 3.2.

**Bảng 3.2. Thành phần loài Anopheles phân bố ở các sinh cảnh**

TT	Tên loài Anopheles	Tổng số muỗi	Thôn bản		Bìa rừng		Trong rừng	
			Số muỗi	Tỷ lệ (%)	Số muỗi	Tỷ lệ (%)	Số muỗi	Tỷ lệ (%)
1	<i>An. aconitus</i>	15	15	100	0	0	0	0
2	<i>An. barbirostris</i>	3	2	66,67	1	33,3	0	0
3	<i>An. campestris</i>	11	0	0	0	0	11	100
4	<i>An. crawfordi</i>	8	6	75	2	25	0	0
5	<i>An. darlingi</i>	1	1	100	0	0	0	0
6	<i>An. dirus</i>	1377	52	3,78	223	16,1	1102	80,03
7	<i>An. jamessi</i>	15	15	100	0	0	0	0
8	<i>An. jeyporiensis</i>	2	2	100	0	0	0	0
9	<i>An. karwari</i>	1	1	100	0	0	0	0
10	<i>An. kochi</i>	2	2	100	0	0	0	0
11	<i>An. maculatus</i>	62	57	91,94	5	8,06	0	0

TT	Tên loài Anopheles	Tổng số muỗi	Thôn bản		Bìa rừng		Trong rừng	
			Số muỗi	Tỷ lệ (%)	Số muỗi	Tỷ lệ (%)	Số muỗi	Tỷ lệ (%)
12	<i>An. minimus</i>	28	6	21,43	4	14,2	18	64,29
13	<i>An. nivipes</i>	11	11	100	0	0	0	0
14	<i>An. peditaeniatus</i>	1	1	100	0	0	0	0
15	<i>An. philippinensis</i>	489	489	100	0	0	0	0
16	<i>An. sinensis</i>	10	10	100	0	0	0	0
17	<i>An. splendidus</i>	23	23	100	0	0	0	0
18	<i>An. tessellatus</i>	1	0	0	1	100	0	0
19	<i>An. vagus</i>	3	3	100	0	0	0	0
<b>Tổng số cá thể muỗi</b>		<b>2063</b>	<b>696</b>	<b>33,74</b>	<b>236</b>	<b>11,4</b>	<b>113</b>	<b>54,82</b>
<b>Số loài</b>		<b>19</b>	<b>17</b>		<b>6</b>		<b>3</b>	

Số liệu ở bảng 3.2 cho thấy thôn bản phân bố nhiều loài Anopheles hơn ở sinh cảnh rừng, nhưng số muỗi điều tra được ít nhất.

### 3.1.3. Vector sốt rét ở điểm nghiên cứu

Căn cứ vào kết quả điều tra xác định ở điểm nghiên cứu bố 5 loài vector sốt rét. Thành phần và tỷ lệ của mỗi loài vector trình bày bảng ở 3.3.

**Bảng 3.3. Thành phần loài vector ở điểm nghiên cứu**

TT	Loài vector sốt rét	Số muỗi điều tra	Tỷ lệ (%)
1	<i>An. aconitus</i>	15	1,0
2	<i>An. dirus</i>	1377	92,8
3	<i>An. jeyporiensis</i>	2	0,1
4	<i>An. maculatus</i>	62	4,2
5	<i>An. minimus</i>	28	1,9
Tổng số		1484	100

Số liệu ở bảng 3.3 cho thấy ở điểm nghiên cứu phân bố 5 loài vector sốt rét, nhưng số muỗi chiếm hơn 2/3 (72.8%) số muỗi của 19 loài Anopheles (1484 so với 2063). Trong đó vector chính *An. dirus* chiếm ưu thế với 92,8%. Bốn loài vector còn lại chiếm tỷ lệ thấp, trong đó *An. minimus* chiếm 1,9%, *An. maculatus* chiếm 4,2%, *An. aconitus* 1% và *An. jeyporiensis* 0,1%.

### 3.1.4. Vector sốt rét phân bố ở các sinh cảnh

Trong 3 sinh cảnh điều tra thôn bản, bìa rừng và trong rừng đều có dân sinh sống và lao động. Thành phần và tỷ lệ của muỗi loài vector sốt rét ở các sinh cảnh trình bày ở bảng 3.4.

**Bảng 3.4. Vector sốt rét phân bố ở các sinh cảnh**

TT	Loài vector	Sinh cảnh điều tra						Tổng số muỗi
		Thôn bản		Bìa rừng		Trong rừng		
		Số muỗi	Tỷ lệ (%)	Số muỗi	Tỷ lệ (%)	Số muỗi	Tỷ lệ (%)	
1	<i>An. aconitus</i>	15	100	0	0	0	0	15
2	<i>An. dirus</i>	52	3,78	223	16,19	1102	80,03	1377
3	<i>An. jeyporiens</i>	2	100	0	0	0	0	2
4	<i>An. maculatus</i>	57	91,94	5	8,06	0	0	62
5	<i>An. minimus</i>	6	21,43	4	14,29	18	64,29	28
Cộng chung		132	9	232	16	1120	75	1484
Số loài vector		5		3		2		
Số loài Anopheles		17		6		3		

Vector sốt rét có mặt ở cả 3 sinh cảnh, trong đó thôn bản có 5 loài, *An. dirus* chiếm tỷ lệ thấp nhất (3,78%), vector phụ *An. aconitus* và *An. jeyporiensis* chiếm 100%, *An. maculatus* chiếm 91,94%. Bìa rừng phân bố chủ yếu là *An. dirus* và *An. minimus*, vector phụ chỉ có *An. maculatus* chiếm tỷ lệ thấp (8,06%). Trong rừng chỉ phân bố 2 vector chính *An. dirus* và *An. minimus*, với đa số lượng muỗi điều tra được (80,03% và 64,29%). Như vậy vector chính có mặt ở cả 3 sinh cảnh, vector phụ chỉ phân bố ở thôn không điều tra thấy ở rừng.

### 3.1.5. Sự thay đổi mật độ của *An. dirus* và *An. minimus*

Mật độ của *An. dirus* và *An. minimus* ở ngoài nhà vào thời điểm đầu mùa khô (12/2012 - 1/2013) đều tăng so với cuối mùa mưa (10/2012) ở cả 3 sinh cảnh ( $p < 0,05$ ). Mật độ của *An. dirus* ở 3 sinh cảnh của 2 đợt điều tra trình bày ở bảng 3.5.

**Bảng 3.5. Mật độ *An. dirus* ở các sinh cảnh 2 thời điểm điều tra**

Thời điểm điều tra	Sinh cảnh điều tra		
	Thôn bản	Bìa rừng	Trong rừng
Tháng 10/2012 (cuối mùa mưa)	0,003 ± 0,01	0,081 ± 0,06	0,970 ± 0,8
12/2012 – 1/2013 (đầu mùa khô)	0,015 ± 0,02	0,550 ± 0,27	5,550 ± 5,19
So sánh	Tăng 5 lần	Tăng 6,8 lần	Tăng 5,7 lần
Giá trị p	<0,05		

Mật độ muỗi : con/giờ/người

Số liệu ở bảng 3.5 cho ở thấy vào cuối mùa mưa mật độ *An. dirus* rất thấp. Thôn bản là 0,003, ở bìa rừng 0,081 và trong rừng là 0,97. Đầu mùa khô ở thôn bản mật độ muỗi tăng 5 lần (0,015), ở bìa rừng tăng 6,97 lần (0,55) và trong rừng tăng 5,72 lần (5,550).

Đối với *An. minimus* trong đợt điều tra 10/2012 (cuối mùa mưa) ở thôn bản và bìa rừng đều không bắt được, trong rừng mật độ rất thấp (0,006). Đợt điều tra 12/2012 - 1/2013 (đầu mùa khô) đều điều tra được ở cả 3 sinh cảnh. Ở thôn bản và bìa rừng có mật độ 0,012, tăng so với đợt điều tra cuối mùa mưa. Trong rừng mật độ muỗi là 0,1, tăng 16,67 lần so với cuối mùa mưa, như trình bày ở bảng 3.6.

**Bảng 3.6. Mật độ *An. minimus* các sinh cảnh 2 thời điểm điều tra**

Thời điểm điều tra	Sinh cảnh điều tra		
	Thôn bản	Bìa rừng	Trong rừng
Tháng 10/2012 (cuối mùa mưa)	0	0	0,006 ± 0,02
Tháng 12/2012 – 1/2013 (đầu mùa khô)	0,012 ± 0,016	0,012 ± 0,016	0,100 ± 0,089
So sánh	Tăng	Tăng	16,67
Giá trị p	<0,05		

Mật độ muỗi : con/giờ/người

### 3.2. Kết quả xác định tỷ lệ nhiễm thoa trùng của vector sốt rét

#### 3.2.1. Phát hiện muỗi *Anopheles* nhiễm thoa trùng

Sử dụng kỹ thuật nested - PCR phát hiện thoa trùng 4 loài Plasmodium cho 2063 cá thể muỗi của 19 loài *Anopheles*. Kết quả phân tích trình bày ở bảng 3.7.

**Bảng 3.7. Tỷ lệ nhiễm thoa trùng sốt rét của muỗi *Anopheles***

Loài vector	Số muỗi phân tích	Số muỗi nhiễm	Tỷ lệ nhiễm (%)	Loài ký sinh trùng			
				<i>P. falciparum</i>		<i>P. vivax</i>	
				Tổng số	Tỷ lệ (%)	Tổng số	Tỷ lệ (%)
<i>An. dirus</i>	1377	8	0,58	4	50%	4	50%
<i>An. minimus</i>	28	0	0	0	0	0	0
<i>An. maculatus</i>	62	0	0	0	0	0	0
<i>An. aconitus</i>	15	0	0	0	0	0	0
<i>An. jeyporiens</i>	2	0	0	0	0	0	0
Loài <i>Anopheles</i> khác	579	0	0	0	0	0	0



Kết quả phân tích chỉ phát hiện *An. dirus* nhiễm thoa trùng sốt rét với tỷ lệ là 0,58%. *An. minimus* và 3 loài vector phụ *An. maculatus*, *An. jeporiensis*, *An. aconitus* cùng các loài Anopheles khác không phát hiện nhiễm thoa trùng. Trong 8 cá thể *An. dirus* nhiễm thoa trùng có 4 cá thể muỗi nhiễm thoa trùng *P. falciparum* (50%) và 4 cá thể muỗi nhiễm thoa trùng *P. vivax* (50%).

### 3.2.2. *An. dirus* nhiễm thoa trùng phân bố ở các sinh cảnh

Phân bố của *An. dirus* nhiễm thoa trùng ở các sinh cảnh trình bày bảng 3.8.

**Bảng 3.8. *An. dirus* nhiễm thoa trùng phân bố ở các sinh cảnh**

TT	Sinh cảnh điều tra	Kết quả phân tích		
		Số muỗi phân tích	Số muỗi nhiễm thoa trùng	Tỷ lệ (%)
1	Thôn bản	52	0	0
2	Bìa rừng	223	1	0,45
3	Trong rừng	1102	7	0,64
Cộng		1377	8	100

Số liệu bảng 3.8 cho thấy *An. dirus* nhiễm thoa trùng bắt được ở cả bìa rừng và trong rừng với tỷ lệ tương ứng là 0,45% và 0,64%. Không phát hiện muỗi ở thôn nhiễm thoa trùng.

### 3.3. Kết quả phát hiện đột biến gen MDR-1 và ATPase6 của *P. falciparum*

Trước khi phát hiện đột biến gen MDR-1 và ATPase6 liên quan kháng ở *P. falciparum*. Chúng tôi tiến hành đánh giá sự đáp ứng của *P. falciparum* với artesunate ở bệnh nhân sốt rét thực địa. Sau đó sàng lọc các mẫu *P. falciparum* kháng và nhạy thuốc để phân tích phát hiện đột biến gen.

#### 3.3.1. Kết quả đánh giá sự đáp ứng với artesunate của *P. falciparum*

Tổng số 83 bệnh nhân thử nghiệm *in vivo* đạt tiêu chuẩn và đánh giá được kết quả có 50,6% bệnh nhân còn KST đến D2 (kéo thời gian sạch KST tới sau 48 giờ so với 32 giờ trước đây). Bệnh nhân còn KST ở D3 (giảm hiệu lực) là 19,3%. Bệnh nhân thất bại điều trị là 10,8% (xuất hiện lại KST trong vòng 28 ngày theo dõi). Các chỉ số này đều vượt qua ngưỡng các định kháng theo hướng dẫn của WHO, 2010. Kết quả trình bày ở bảng 3.9.

**Bảng 3.9. Kết quả thử nghiệm *in vivo* đánh giá sự đáp ứng của *P. falciparum* với artesunate**

Kết quả <i>in vivo</i>	Địa điểm nghiên cứu				Tính chung	
	Bình Phước		Đắk Nông			
	Số bệnh nhân	Tỷ lệ (%)	Số bệnh nhân	Tỷ lệ (%)	Số bệnh nhân	Tỷ lệ (%)
Đáp ứng điều trị	43	86	31	94	74	89,2
D2 còn KST	30	60	12	36,3	42	50,6
D3 còn KST	10	20	6	18	16	19,3
Thất bại điều trị	7	14	2	6	9	10,8
Cộng	50	100	33	100	83	100

### 3.3.2. Kết quả phân biệt *P. falciparum* tái phát - tái nhiễm

Những bệnh nhân thất bại điều trị có KST xuất hiện lại được phân tích so sánh kiểu gen KST giữa D0 với KST xuất hiện lại để xác định KST tái phát lại là do không đáp ứng điều trị hay là nhiễm KST mới sau khi điều trị khỏi. Kết quả phân tích được trình bày ở bảng 3.10.

### 3.10. Kết quả xác định *P. falciparum* tái phát - tái nhiễm

Kiểu gen	Cặp mẫu D0 và D xuất hiện lại KST								+	Kết quả phân tích		
	D0	D0	D0	D0	D0	D0	D0	D0		Tái phát	Tái nhiễm	Phối hợp
	D11	D19	D22	D23	D24	D26	D27	D28				
Giống nhau		1		1	1	1	1		5	5		
Khác nhau	1							1	2		2	
Giống và khác nhau			1					3	4			4
Cộng	1	1	1	1	1	1	1	4	11	5	2	4

Trong 1 cặp mẫu phân tích có 6 mẫu *P. falciparum* xuất lại vào các ngày D19, D23, D24, D26 và D27 được xác định là tái phát. Hai mẫu *P. falciparum* xuất hiện lại vào D11 và D28 xác định là tái nhiễm. Bốn mẫu *P. falciparum* xuất hiện lại vào D21, D22 và D28 xác định là phối hợp tái phát và tái nhiễm, trong đó có 1 mẫu D21, 1 mẫu D22 và 2 mẫu D28. Kết quả cuối cùng xác định 9 mẫu *P. falciparum* tái phát, chiếm 82% và 2 mẫu nhiễm KST mới, chiếm 12%.

### 3.3.3. Kết quả phát hiện đột biến gen MDR-1 và axit amin ở protein Pgh-1 bị thay thế

Kết quả giải trình tự ADN và phân tích so sánh 600bp của đoạn gen MDR-1 có chứa bộ ba mã hóa axit amin ở vị trí 86 của protein Pgh-1 của 9 mẫu *P. falciparum* kháng, 2 mẫu *P. falciparum* nhạy và chủng *P. falciparum* K1 đã phát hiện 3 điểm đột biến làm thay thế ở 2

axit amin của protein Pgh-1. Trong đó có 1 axit amin ở vị trí I107T của *P. falciparum* kháng thuốc và 1 axit amin ở vị trí F170I của *P. falciparum* nhạy. Những đột biến thay thế này không liên quan đến kháng artesunate và chưa thấy nghiên cứu nào công bố.

Kết quả phân tích cũng xác định các mẫu *P. falciparum* kháng đều có axit amin ở vị trí N86 mang kiểu dại. Tương tự với kết quả của các nghiên cứu trong và ngoài nước xác định liên quan kháng artemisinin và một số thuốc sốt rét nhóm amino alcohol.

Hình ảnh phân tích trình tự ADN phát hiện đột biến gen MDR-1 và axit amin của protein Pgh-1 bị thay thế trình bày ở hình 3.1 và 3.2.

```

gi.9/D0      AATATTAAAGAACATGAATTTAGGTGATGATATTAATCCTATAATATTATCATTAGTATC 300
gi.24/D0     AATATTAAAGAACATGAATTTAGGTGATGATATTAATCCTATAATATTATCATTAGTATC 300
gi.5/D0      AATATTAAAGAACATGAATTTAGGTGATGATATTAATCCTATAATATTATCATTAGTATC 300
gi.48/D0     AATATTAAAGAACATGAATTTAGGTGATGATATTAATCCTATAATATTATCATTAGTATC 300
gi.15/D0     AATATTAAAGAACATGAATTTAGGTGATGATATTAATCCTATAATATTATCATTAGTATC 300
gi.K1        AATATTAAAGAACATGAATTTAGGTGATGATATTAATCCTATAATATTATCATTAGTATC 300
gi.29/D0     AATATTAAAGAACATGAATTTAGGTGATGATATTAATCCTATAATATTATCATTAGTATC 300
gi.14/D0     AATATTAAAGAACATGAATTTAGGTGATGATATTAATCCTATAATATTATCATTAGTATC 300
gi.62/D0     AATATTAAAGAACATGAATTTAGGTGATGATATTAATCCTATAATATTATCATTAGTATC 300
gi.1/D0      AATATTAAAGAACATGAATTTAGGTGATGATATTAATCCTATAATATTATCATTAGTATC 300
*****.*****

gi.9/D0      TATAGGTTTAGTACAATTTTATATTATCAATGATATCAAGTTATTGTATGGATGTAATTAC 360
gi.24/D0     TATAGGTTTAGTACAATTTTATATTATCAATGATATCAAGTTATTGTATGGATGTAATTAC 360
gi.5/D0      TATAGGTTTAGTACAATTTTATATTATCAATGATATCAAGTTATTGTATGGATGTAATTAC 360
gi.48/D0     TATAGGTTTAGTACAATTTTATATTATCAATGATATCAAGTTATTGTATGGATGTAATTAC 360
gi.15/D0     TATAGGTTTAGTACAATTTTATATTATCAATGATATCAAGTTATTGTATGGATGTAATTAC 360
gi.K1        TATAGGTTTAGTACAATTTTATATTATCAATGATATCAAGTTATTGTATGGATGTAATTAC 360
gi.29/D0     TATAGGTTTAGTACAATTTTATATTATCAATGATATCAAGTTATTGTATGGATGTAATTAC 360
gi.14/D0     TATAGGTTTAGTACAATTTTATATTATCAATGATATCAAGTTATTGTATGGATGTAATTAC 360
gi.62/D0     TATAGGTTTAGTACAATTTTATATTATCAATGATATCAAGTTATTGTATGGATGTAATTAC 360
gi.1/D0      TATAGGTTTAGTACAATTTTATATTATCAATGATATCAAGTTATTGTATGGATGTAATTAC 360
*****

gi.9/D0      ATCAAAAATATTAAAACTTTAAAGCTTGAATATTTAAGAAGTGTTTTTATCAAGATGG 420
gi.24/D0     ATCAAAAATATTAAAACTTTAAAGCTTGAATATTTAAGAAGTGTTTTTATCAAGATGG 420
gi.5/D0      ATCAAAAATATTAAAACTTTAAAGCTTGAATATTTAAGAAGTGTTTTTATCAAGATGG 420
gi.48/D0     ATCAAAAATATTAAAACTTTAAAGCTTGAATATTTAAGAAGTGTTTTTATCAAGATGG 420
gi.15/D0     ATCAAAAATATTAAAACTTTAAAGCTTGAATATTTAAGAAGTGTTTTTATCAAGATGG 420
gi.K1        ATCAAAAATATTAAAACTTTAAAGCTTGAATATTTAAGAAGTGTTTTTATCAAGATGG 420
gi.29/D0     ATCAAAAATATTAAAACTTTAAAGCTTGAATATTTAAGAAGTGTTTTTATCAAGATGG 420
gi.14/D0     ATCAAAAATATTAAAACTTTAAAGCTTGAATATTTAAGAAGTGTTTTTATCAAGATGG 420
gi.62/D0     ATCAAAAATATTAAAACTTTAAAGCTTGAATATTTAAGAAGTGTTTTTATCAAGATGG 420
gi.1/D0      ATCAAAAATATTAAAACTTTAAAGCTTGAATATTTAAGAAGTGTTTTTATCAAGATGG 420
*****

gi.9/D0      ACAATTTTCATGATAATAATCCTGGATCTAAATTAAGATCTGATTTAGATTTTTATTTAGA 480
gi.24/D0     ACAATTTTCATGATAATAATCCTGGATCTAAATTAAGATCTGATTTAGATTTTTATTTAGA 480
gi.5/D0      ACAATTTTCATGATAATAATCCTGGATCTAAATTAAGATCTGATTTAGATTTTTATTTAGA 480
gi.48/D0     ACAATTTTCATGATAATAATCCTGGATCTAAATTAAGATCTGATTTAGATTTTTATTTAGA 480
gi.15/D0     ACAATTTTCATGATAATAATCCTGGATCTAAATTAAGATCTGATTTAGATTTTTATTTAGA 480
gi.K1        ACAATTTTCATGATAATAATCCTGGATCTAAATTAAGATCTGATTTAGATTTTTATTTAGA 480
gi.29/D0     ACAATTTTCATGATAATAATCCTGGATCTAAATTAAGATCTGATTTAGATTTTTATTTAGA 480
gi.14/D0     ACAATTTTCATGATAATAATCCTGGATCTAAATTAAGATCTGATTTAGATTTTTATTTAGA 480
gi.62/D0     ACAATTTTCATGATAATAATCCTGGATCTAAATTAAGATCTGATTTAGATTTTTATTTAGA 480
gi.1/D0      ACAATTTTCATGATAATAATCCTGGATCTAAATTAAGATCTGATTTAGATTTTTATTTAGA 480
*****

gi.9/D0      ACAAGTGAGTTCAGGAATTGGTACGAAATTTATAACAATTTTTACATATGCCAGTTCCTT 540
gi.24/D0     ACAAGTGAGTTCAGGAATTGGTACGAAATTTATAACAATTTTTACATATGCCAGTTCCTT 540
gi.5/D0      ACAAGTGAGTTCAGGAATTGGTACGAAATTTATAACAATTTTTACATATGCCAGTTCCTT 540
gi.48/D0     ACAAGTGAGTTCAGGAATTGGTACGAAATTTATAACAATTTTTACATATGCCAGTTCCTT 540

```

```

gi.15/D0 ACAAGTGAGTTCAGGAATTGGTACGAAATTTATAACAATTTTTACATATGCCAGTTCCTT 540
gi.K1 ACAAGTGAGTTCAGGAATTGGTACGAAATTTATAACAATTTTTACATATGCCAGTTCCTT 540
gi.29/D0 ACAAGTGAGTTCAGGAATTGGTACGAAATTTATAACAATTTTTACATATGCCAGTTCCTT 540
gi.14/D0 ACAAGTGAGTTCAGGAATTGGTACGAAATTTATAACAATTTTTACATATGCCAGTTCCTT 540
gi.62/D0 ACAAGTGAGTTCAGGAATTGGTACGAAATTTATAACAATTTTTACATATGCCAGTTCCTT 540
gi.1/D0 ACAAGTGAGTTCAGGAATTGGTACGAAATTAATAACAATTTTTACATATGCCAGTTCCTT 540
*****

```

Hình 3.1. Trình tự ADN đoạn gen MDR-1 *P. falciparum* ở D0 của bệnh nhân *in vivo* và mẫu *P. falciparum* K1. Chữ in đậm gạch chân màu đen là các vị trí nucleotide bị đột biến thay thế.

```

gi.15/D0 MGKEQKEKKDGNLSIKEEVEKELNKKSTAEFRKIKNEKISFFLPFKCLPAQHRKLLFIS 60
gi.K1 MGKEQKEKKDGNLSIKEEVEKELNKKSTAEFRKIKNEKISFFLPFKCLPAQHRKLLFIS 60
gi.62/D0 MGKEQKEKKDGNLSIKEEVEKELNKKSTAEFRKIKNEKISFFLPFKCLPAQHRKLLFIS 60
gi.14/D0 -----DGNLSIKEEVEKELNKKSTAEFRKIKNEKISFFLPFKCLPAQHRKLLFIS 51
gi.29/D0 MGKEQKEKKDGNLSIKEEVEKELNKKSTAEFRKIKNEKISFFLPFKCLPAQHRKLLFIS 60
gi.24/D0 MGKEQKEKKDGNLSIKEEVEKELNKKSTAEFRKIKNEKISFFLPFKCLPAQHRKLLFIS 60
gi.5/D0 -----SIKEEVEKELNKKSTAEFRKIKNEKISFFLPFKCLPAQHRKLLFIS 47
gi.9/D0 -----ELNKKSTAEFRKIKNEKISFFLPFKCLPAQHRKLLFIS 39
gi.48/D0 --KEQKEKKDGNLSIKEEVEKELNKKSTAEFRKIKNEKISFFLPFKCLPAQHRKLLFIS 58
gi.1/D0 -----IKEEVEKELNKKSTAEFRKIKNEKISFFLPFKCLPAQHRKLLFIS 46
*****

gi.15/D0 FVCAVLSGGTLPFFISVFGVILKNMNLGDDINPIILSLVSI GLVQFILSMISSYCMDVIT 120
gi.K1 FVCAVLSGGTLPFFISVFGVILKNMNLGDDINPIILSLVSI GLVQFILSMISSYCMDVIT 120
gi.62/D0 FVCAVLSGGTLPFFISVFGVILKNMNLGDDINPIILSLVSI GLVQFILSMISSYCMDVIT 120
gi.14/D0 FVCAVLSGGTLPFFISVFGVILKNMNLGDDINPIILSLVSI GLVQFILSMISSYCMDVIT 111
gi.29/D0 FVCAVLSGGTLPFFISVFGVILKNMNLGDDINPIILSLVSI GLVQFILSMISSYCMDVIT 120
gi.24/D0 FVCAVLSGGTLPFFISVFGVILKNMNLGDDINPIILSLVSI GLVQFILSMISSYCMDVIT 120
gi.5/D0 FVCAVLSGGTLPFFISVFGVILKNMNLGDDINPIILSLVSI GLVQFILSMISSYCMDVIT 107
gi.9/D0 FVCAVLSGGTLPFFISVFGVILKNMNLGDDINPIILSLVSI GLVQFILSMISSYCMDVIT 99
gi.48/D0 FVCAVLSGGTLPFFISVFGVILKNMNLGDDINPIILSLVSI GLVQFILSMISSYCMDVIT 118
gi.1/D0 FVCAVLSGGTLPFFISVFGVILKNMNLGDDINPIILSLVSI GLVQFILSMISSYCMDVIT 106
*****

gi.15/D0 SKILKTLKLEYLRSVIFYQDGQFHDNPPGSKLRSDLDFYLEQVSSGIGTKFITIFTYASSF 180
gi.K1 SKILKTLKLEYLRSVIFYQDGQFHDNPPGSKLRSDLDFYLEQVSSGIGTKFITIFTYASSF 180
gi.62/D0 SKILKTLKLEYLRSVIFYQDGQFHDNPPGSKLRSDLDFYLEQVSSGIGTKFITIFTYASSF 180
gi.14/D0 SKILKTLKLEYLRSVIFYQDGQFHDNPPGSKLRSDLDFYLEQVSSGIGTKFITIFTYASSF 171
gi.29/D0 SKILKTLKLEYLRSVIFYQDGQFHDNPPGSKLRSDLDFYLEQVSSGIGTKFITIFTYASSF 180
gi.24/D0 SKILKTLKLEYLRSVIFYQDGQFHDNPPGSKLRSDLDFYLEQVSSGIGTKFITIFTYASSF 180
gi.5/D0 SKILKTLKLEYLRSVIFYQDGQFHDNPPGSKLRSDLDFYLEQVSSGIGTKFITIFTYASSF 167
gi.9/D0 SKILKTLKLEYLRSVIFYQDGQFHDNPPGSKLRSDLDFYLEQVSSGIGTKFITIFTYASSF 159
gi.48/D0 SKILKTLKLEYLRSVIFYQDGQFHDNPPGSKLRSDLDFYLEQVSSGIGTKFITIFTYASSF 178
gi.1/D0 SKILKTLKLEYLRSVIFYQDGQFHDNPPGSKLRSDLDFYLEQVSSGIGTKFITIFTYASSF 166
*****

```

Hình 3.2. Trình tự acid amin của protein Phg-1 ở *P. falciparum* bệnh nhân *in vivo* và mẫu chủng *P. falciparum* K1. Axit amin bị thay thế có màu đen, in đậm và gạch chân.

### 3.3.4. Kết quả phát hiện đột biến gen ATPase6 và axit amin enzyme ATPase6 bị thay thế ở *P. falciparum*.

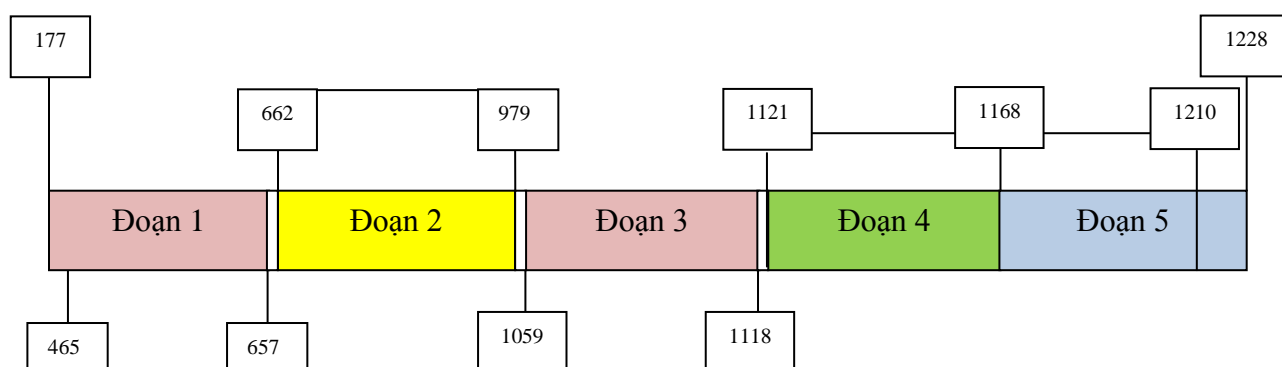
Kết quả giải trình tự và phân tích so sánh đoạn gen ATPase6 dài 3015bp của *P. falciparum* ở bệnh nhân *in vivo* và chủng *P. falciparum* 3D7 đã phát hiện được 83 điểm đột biến ở *P. falciparum* bệnh nhân *in vivo* trình bày ở bảng 3.11.

**Bảng 3.11. Kết quả phát hiện đột biến gen ATPase6 ở *P. falciparum***

Kết quả phân tích	Kết quả thử nghiệm <i>in vivo</i>				Tổng số
	Nhạy	Tái nhiễm	Tái phát	D3 còn KST bỏ NC	
Có đột biến	2	2	7	1	12
Không đột biến	4	0	2	2	8
Tổng số mẫu	6	2	9	3	20

Số liệu bảng 3.11 cho thấy trong số 12 mẫu *P. falciparum* đột biến có 7 mẫu kháng, 2 mẫu nhiễm mới, 2 mẫu nhạy và 1 mẫu của bệnh nhân D3 còn KST bỏ nghiên cứu (không xác định kết quả *in vivo*). Còn lại 8 mẫu *P. falciparum* không đột biến có 2 mẫu kháng, 2 mẫu của bệnh nhân có D3 còn KST bỏ nghiên cứu và 4 mẫu nhạy.

Phân tích so sánh trình tự axit amin của enzym ATPase6 ở những mẫu *P. falciparum* có đột biến đã phát hiện 49 axit amin bị thay thế. Trong đó có 33 axit amin chỉ xuất hiện ở *P. falciparum* kháng và 16 axit amin xuất hiện ở cả *P. falciparum* nhạy, tái nhiễm và kháng. Những axit amin bị thay thế phân bố thành 5 đoạn như hình 3.3



Hình 3.3. Mô hình enzym ATPase6 của *P. falciparum* ở bệnh nhân *in vivo*. Ô số nhỏ phía trên và dưới chỉ giới hạn vị trí nucleotide của đoạn có axit amin bị thay thế.

Trong 33 axit amin bị thay thế ở *P. falciparum* kháng có 14 axit amin phân bố ở đoạn 1 (từ vị trí 403- 657), có 4 axit amin ở các vị trí N465S, I569L, T654K và T656S xuất hiện ở 3 mẫu *P. falciparum* kháng là đáng quan tâm nhất. Hai axit amin phân bố ở đoạn 2 (từ vị trí 662-979) và 17 axit amin phân bố ở đoạn 3 (từ vị trí 1059 - 1118).

Trong 16 axit amin thay thế ở cả *P. falciparum* nhạy, tái nhiễm và kháng có 9 axit amin ở *P. falciparum* nhạy phân bố ở đoạn 1 và 2, hai axit amin ở *P. falciparum* tái nhiễm phân bố ở đoạn 2, 4 axit amin ở *P. falciparum* kháng và nhạy phân bố ở đoạn 2 và 3, 1 axit amin ở cả

*P. falciparum* kháng, tái nhiễm và nhạy phân bố ở đoạn 2.

Ngoài ra còn 90 axit amin có trình tự khác chủng *P. falciparum* 3D7 như hình 3.4.

1120	ASTLSLSVLVLIEMFNLALNALSEYNSLFEIPPWARNMYLVLATIGSLLLHVLIYIPPLARIFGVVPLSAYDWFLVFLWSFPVILDEIKF	1210
V-----	-----INIVHCHKHTHTHIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIFLYIYFFI	
V-----	-----INIVHCHKHTHTHIYIYIYIYIYIYMVCCVYIYKYTYIYIYI	
V-----	-----INIVHCHKHTHTHIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYF	
V-----	-----INIVHCHKHTHTHIYIYIYIYIYIYMYIYIYIYIYIYIYIYIYFFI	
<hr/>		
V-----	-----INIVHCHKHTHTHIYIYVYLRIMYIFIFIHLFIYFFIF-----	
V-----	-----INIVHCHKHTHTHIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYF	
V-----	-----INIVHCHKHTHTHIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYF	
V-----	-----INIVHCHKHTHTHIYIYIYIYIYIYMYIYIYIYIYIYIYIYIYIYF	
V-----	-----INIVHCHKHTHTHIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYLYI	
V-----	-----INIVHCHKHTHTHIYIYVYLRIMYIFIFIHLFIYFFIF-----	
V-----	-----INIVHCHKHTHTHIYIYIYIYIYIYIYIYIYMYIYIYIYIYIYIYIYFF	
V-----	-----INIVHCHKHTHTHIYIYIYIYIYIYMYIYIYIYIYIYIYIYIYIYF	
V-----	-----INIVHCHKHTHTHIYIYIYIYIYMYI--YVYMYIFIFIHLFIYF	
V-----	-----INIVHCHKHTHTHIYIYIYVYLR-----IYMYIFIFIHLFIYF	
V-----	-----INIVHCHKHTHTHIYIYIYVYLR-----IYMYIFIFIHLFIYF	
V-----	-----INIVHCHKHTHTHIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYIYF	

Hình 3.4. Trình tự acid amin đoạn 4 và 5 của enzym ATPase6 ở *P. falciparum* bệnh nhân *in vivo* và chủng 3D7 từ ngân hàng gen.

Trình tự axit amin ở dòng trên cùng màu đỏ của *P. falciparum* 3D7. Trình tự axit amin các dòng dưới của *P. falciparum* ở bệnh nhân Đường gạch ngang là những axit amin bị mất

Trình tự axit amin ở hình 3.4 cho thấy có 48 axit amin tương ứng với vị trí nucleotide 1120 đến 1168 bị mất hoàn toàn (đoạn 4 có đường gạch ngang) và 42 axit amin tương ứng vị trí 1169 đến 1210 có trình tự khác hoàn toàn so với mẫu *P. falciparum* 3D7 (đoạn 5).

Một số axit amin enzym ATPase6 bị thay thế trình bày ở hình 3.5.

>>3d7	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.32D0	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.5D0	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.9D0	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.15D0	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.17D0	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.46D0	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.33D0BP	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.14D0	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.1D0	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWR <b>K</b> ECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.48D0	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.24D0	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.36D0	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.29D0DN	<b>NINYYHH</b> NNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.44D0	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.62D0	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.33D0DN	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.20D0	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.34D0	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
>>gi.29D0BP	NNNNNNNNNSNSVPSECISSWRNECKQIKIIEFTRERKLM SVIVENKKKEIILYCKGAP E	720
	* * :.:*****.*****	

Hình 3.5. Trình tự 1 đoạn axit amin của enzym ATPase6 ở *P. falciparum* và chủng *P. falciparum* 3D7 từ ngân hàng gen. Axit amin bị thay thế có màu đen, in đậm và gạch chân

Vị trí 49 axit amin enzym ATPase6 bị thay thế trình bày ở bảng 3.12.

**Bảng 3.12. Vị trí axit amin enzym ATPase6 bị đột biến thay thế**

TT	Vị trí aa thay thế	Axit amin bị thay thế ở <i>P. falciparum</i>				
		Thất bại	Đáp ứng	Tái nhiễm	Tái phát	Tái phát
1	403		T403A			
<b>2</b>	<b>465</b>	<b>N465S</b>				
3	478	K478E				
4	504	Y504C				
5	519	N519S				
6	522	N522H				
7	526	N526D				
<b>8</b>	<b>569</b>	<b>N569K</b>				
9	578	K578T				
10	593	K593Q				
11	594	N594D				
12	652	N652Y				
13	<b>654</b>	<b>I654K</b>				
<b>14</b>	<b>656</b>	<b>I656S</b>				
15	657	I657P				
16	662		N662I			
17	664		N664Y			
18	665		N665H			
19	666		N666H			
20	683		I859T			
21	859		Y862S			
22	870			F870S		
23	889			C889Y		
24	927	I927L				
25	936		T936S			
26	939				A939S	
27	940					K940N
28	941	E941Q				
29	944				D944N	
30	978				S978I	
31	979		S979I			
32	1059	A1059D				
33	1064	F1064Y				
34	1065	V1065M				
35	1066	Y1066C				
36	1073				D1073E	
37	1077	H1077P				
38	1079	L1079W				
39	1084	Q1084L				
40	1089	N1089I				
41	1094	W1094R				
42	1098	R1098C				
43	1100	N1100Y				
44	1106	S1106C				
45	1107	E1107V				
46	1108	D1118G				
47	1109	H1109L				
48	1115	A1115P				
49	1118	I1118K				
<b>Axit amin thay thế</b>		<b>33</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>1</b>

## BÀN LUẬN

### 4.1. Thành phần loài Anopheles và vector sốt rét ở điểm nghiên cứu

#### 4.1.1. Thành phần loài và phân bố muỗi Anopheles ở các sinh cảnh

Kết quả điều tra đã xác định ở điểm nghiên cứu có mặt 19 loài Anopheles, nhiều hơn 12 loài so với các nghiên cứu trước đây. Mật độ của hầu hết các loài Anopheles đều rất thấp. Trong 19 loài Anopheles chỉ 5 loài có tỷ lệ trên 1% đó là *An. dirus* 66,75%, *An. philippinesis* 23,7%, *An. maculatus* 3,01%, *An. minimus* 1,36% và *An. splendidus* 1,11%, 14 loài còn lại chiếm tỷ lệ rất thấp từ 0,05% - 0,73%. Vector chính *An. dirus* chiếm ưu thế nhất ở điểm nghiên cứu (66,75% tổng số muỗi của 19 loài Anopheles). Trong khi nhiều loài khác có tỷ lệ thấp nên những nghiên cứu trước đã không điều tra được, kể cả vector chính *An. minimus*.

Trong 3 sinh cảnh điều tra, thôn bản phân bố nhiều loài Anopheles nhất với 17/19 loài Anopheles điều tra được, nhưng số lượng muỗi bắt được chỉ chiếm 1/3 số lượng muỗi (33,74%). Sinh cảnh rừng phân bố ít loài Anopheles hơn, nhưng có số lượng muỗi chiếm 2/3 (66,26%). Sự phân bố này phù hợp với qui luật tự nhiên, nơi có số loài nhiều thì số cá thể của mỗi loài ít và càng gần rừng số loài Anopheles phân bố càng ít. Điều này cũng cho thấy môi trường sinh thái giữa các sinh cảnh khác nhau rõ rệt, thôn bản phù hợp cho nhiều loài Anopheles phát triển nhưng không thích hợp cho *An. dirus* phát triển, ngược lại sinh cảnh rừng. Kết quả nghiên cứu phù hợp với nhận định của Hồ Đình Trung và Nguyễn Tuyên Quang về sự phân bố của Anopheles ở tỉnh Ninh Thuận và Bình Định cũng có số loài Anopheles giảm khi vào gần rừng. Tương tự với kết quả điều tra của Nguyễn Văn Châu về khu hệ Anopheles ở rừng Cát Tiên Lâm Đồng cũng chỉ phân bố 8 loài Anopheles. Hoặc khu vực rừng bảo tồn thiên nhiên huyện Cần Giờ thành phố Hồ Chí Minh phân bố 3 loài.

#### 4.1.2. Thành phần và phân bố của vector sốt rét ở các sinh cảnh điểm nghiên cứu

Kết quả điều tra cho thấy ở điểm nghiên cứu phân bố 5 loài vector sốt rét. Bao gồm 2 vector chính *An. dirus* và *An. minimus*, 3 vector phụ *An. maculatus*, *An. jeyporiensis* và *An. aconitus* đều là những loài có vùng phân bố ở khu vực Miền Trung - Tây Nguyên nước ta. Kết quả điều tra cũng xác định sự phân bố của vector chính *An. minimus* và 2 vector phụ *An. jeyporiensis*, *An. aconitus* mà chưa thấy nghiên cứu nào trước đây công bố. Vector phân bố ở điểm nghiên cứu tuy chỉ có 5 loài nhưng số muỗi chiếm 72,8% lượng muỗi của 19 loài (1484 cá thể so với 2063). Trong đó vector chính *An. dirus* có số



lượng nhiều nhất, chiếm 55,67% số muỗi của 19 loài và 92,8% số muỗi của 5 loài vector. Bốn loài vector còn lại khác chiếm tỷ lệ thấp (7,28%). Như vậy với ưu thế của vector chính *An. dirus*, loài có khả năng truyền được cả 4 loài KSTSR người và một số loài KSTSR khi, ái tính với KST kháng thuốc đã tạo nên yếu tố vector thuận lợi cho sự lan truyền sốt rét và KST kháng thuốc. Đó cũng là những nguyên nhân làm cho tỷ lệ bệnh và dịch tễ sốt rét ở khu vực này liên tục lưu hành ở mức cao và diễn biến phức tạp trong nhiều năm qua. *An. minimus* tuy chỉ chiếm 1,9%, nhưng cũng là vector chính sống trong nhà gần người, khả năng truyền sốt rét mạnh chỉ sau *An. dirus*. Vì thế mà không nên coi nhẹ sự có mặt của loài vector này cho dù mật độ thấp.

Sự phân bố của vector rất khác nhau ở các sinh cảnh. Thôn bản phân bố 5 loài vector sốt rét, nhưng số muỗi điều tra được ít nhất (chiếm 9%). Vector phụ phân bố chủ yếu ở thôn, *An. maculatus* phân ở thôn bản 91,94%, bìa rừng chiếm 8,06%, trong rừng không điều tra thấy. Sự phân bố của *An. maculatus* ở điểm nghiên cứu ngược với *An. maculatus* ở Ninh Thuận chiếm ưu thế ở cả 3 sinh cảnh, mật độ đốt người của *An. maculatus* trong rừng gấp 1,2 lần bìa rừng và 2,7 lần thôn bản. Hai vector phụ còn lại *An. aconitus* và *An. jeyporiensis* chiếm tỷ lệ không đáng kể (0,73% và 0,1%,) và chỉ bắt được ở thôn, không điều tra thấy ở sinh cảnh rừng. Ở thôn 2 vector chính *An. dirus* và *An. minimus* cũng chiếm tỷ lệ thấp, chỉ điều tra được ở các nhà dưới vườn điều hoặc cao su xen lẫn cây rừng tự nhiên sót lại hai bên suối gần nhà. Mật độ *An. dirus* chỉ từ 0,003 - 0,015 con/giờ/người (tùy theo thời điểm điều tra) thấp hơn so với mật độ của *An. dirus* ở xã Khánh Phú tỉnh Khánh Hòa giai đoạn từ 2002 - 2004 (0,16), hoặc *An. dirus* ở xã Đắc Ô năm 2005 (0,36). Điều này cho thấy *An. dirus* vẫn có thể phát triển với mật độ thấp ở sinh thái rừng nhân tạo thay thế rừng tự nhiên. Tương tự nghiên cứu của Van Bortel ở Thái Lan cũng cho thấy *An. dirus* phân bố với mật độ thấp ở rừng cao su đã khép tán. Ở thôn vào thời điểm điều tra cuối mùa mưa không bắt được *An. minimus*, sang thời điểm đầu mùa khô cũng có mật độ muỗi rất thấp (0,012 con/giờ/người).

Sự phân bố của 5 loài vector ở thôn, gồm cả 2 vector chính *An. dirus* và *An. minimus* cho thấy khả năng lây nhiễm sốt rét vẫn có thể xảy ra ở ngay tại các thôn. Vì ở hầu hết các thôn vẫn có mầm bệnh từ những người bị sốt rét sau mỗi đợt đi rừng làm rẫy trở về. Thống kê của trạm y tế xã Đắc Nhau từ năm 2011 - 2013 vẫn có 7 trong số 8 thôn của xã vẫn thường xuyên phát hiện được bệnh nhân sốt rét ở rải rác tất cả các tháng trong năm. Trong khi chỉ cần một quần thể *An. dirus* nhỏ vẫn có thể duy trì sự lan truyền sốt rét nếu có mầm bệnh.

Tuy nhiên số bệnh nhân bị mắc ở thôn không nhiều bằng nương rẫy ở rừng, do mật độ *An. dirus* ở thôn rất thấp, chỉ bằng từ 1/370 đến 1/37 ở sinh cảnh rừng. Trong khi khả năng muỗi phát tán từ rừng về thôn là rất hiếm, vì phạm vi hoạt động của *An. dirus* chỉ khoảng 1,2 km. Căn cứ vào sự phân bố vector cho thấy khả năng lan truyền sốt rét ở thôn hiện nay đã giảm hơn rất nhiều so với những năm trước đây do công tác phòng chống muỗi ở thôn bản hiện nay tốt hơn trước. Khoảng cách giữa khu dân cư với rừng tự nhiên xa hơn so với những năm trước đây.

Ở bìa rừng phân bố 3 loài vector, chiếm 16% số lượng vector và chủ yếu là vector chính. Vector phụ chỉ điều tra thấy *An. maculatus* với tỷ lệ thấp chỉ có 8,06%. Trong rừng phân bố 2 vector chính *An. dirus* và *An. minimus* nhưng chiếm 75%, bằng 3/4 số muỗi của cả 5 loài vector. Trong đó *An. dirus* chiếm 80,3%, *An. minimus* 64,29% số muỗi của mỗi loài. Không điều tra thấy loài vector phụ nào ở trong rừng.

Vector chính *An. dirus* và *An. minimus* phân bố ở 3 sinh cảnh nhưng mật độ rất khác nhau. Trong rừng *An. dirus* có mật độ gấp 10 lần bìa rừng và 370 lần ở thôn bản, cao hơn ở một số vùng sốt rét lưu hành như xã Khánh Phú tỉnh Khánh Hòa có mật độ *An. dirus* trong rừng gấp 2 lần bìa rừng, 10 lần thôn bản. Ở tỉnh Ninh Thuận có mật độ *An. dirus* trong rừng gấp 1,3 lần bìa rừng và 7,9 lần thôn bản. Xã Đắc Ô năm 2005 cũng có tỷ số mật độ *An. dirus* giữa thôn bản : bìa rừng : trong rừng là 1 : 6,7 : 19,8 so với tỷ số mật độ *An. dirus* giữa thôn bản : bìa rừng : trong rừng của nghiên cứu này là 1 : 27 : 323 ở thời điểm cuối mùa mưa, hoặc 1 : 37 : 370 ở thời điểm đầu mùa khô. Điều này cho thấy sinh thái giữa các sinh cảnh ở khu vực điểm nghiên cứu xã Đắc Ô hiện nay khác nhau nhiều hơn so với năm 2005.

Căn cứ vào kết quả nghiên cứu có thể nhân định sự lây nhiễm sốt rét ở điểm nghiên cứu hiện nay diễn ra chủ yếu ở sinh cảnh rừng. Khu vực người dân thường xuyên đến làm nương rẫy ngủ lại trong các chòi lán đơn sơ tạm bợ ở rừng, không được bảo vệ hóa chất và thiếu phương tiện phòng chống muỗi đốt. Quá trình điều tra muỗi ở sinh cảnh rừng cho thấy nhiều người ngủ không có màn, hoặc có màn nhưng sử dụng không đúng cách. Họ thường dùng màn để đắp chung 3-5 người, nên không đảm bảo phòng chống muỗi đốt. Trong khi ở sinh cảnh rừng *An. dirus* chiếm ưu thế, hoạt động đốt mồi suốt đêm. Ngoài ra mỗi năm còn hàng nghìn người từ các nơi đến làm thuê ngủ lại nương rẫy nhất là vào mùa khô thu hoạch nông sản, trùng thời điểm mật độ *An. dirus* tăng cao làm gia tăng nguy cơ lan truyền sốt rét. Đây chính là nguyên nhân làm cho tỷ lệ sốt rét thường tăng đột biến vào mùa khô hàng năm. Các nghiên cứu ở Campuchia, Myanmar và Malaysia cũng đều cho thấy nhóm *An. dirus* là vector chính truyền

KSTSR người và khi ở rừng nhiệt đới. Điều này cho thấy sự nguy hiểm của nhóm *An. dirus*, một loài vector sống hoang dại ngoài nhà, rất phong phú ở rừng tự nhiên Bù Gia Mập. Như vậy với sự phân bố và phong phú của *An. dirus* và *An. minimus* ở sinh cảnh rừng đầm nghiên cứu, nếu người dân ngủ lại nương rẫy ở rừng bị muỗi đốt gần như chắc chắn là vector chính. Nghiên cứu của Sharma ở một số nước khu vực Đông Nam Á cũng cho thấy chỉ số lan truyền sốt rét giảm mạnh khi ra khỏi rừng. Nghiên cứu của Chaveepojnkanjorn ở Thái Lan chỉ ra rằng nguy cơ sốt rét đối với người thường xuyên ngủ rừng cao hơn 6-13 lần người ngủ ở thôn. Nghiên cứu của Chambers ở khu vực Miền Trung và Đông Nam Bộ Việt Nam cũng cho kết quả tương tự với nguy cơ sốt rét của người thường xuyên ngủ rừng cao hơn từ 2 đến 4 lần người ngủ ở khu dân cư.

Căn cứ vào sự phân bố và mật độ vector ở điểm nghiên cứu hiện nay có thể nhận định nguy cơ lây nhiễm sốt rét ở thôn đã giảm nhiều so với năm 2005, nhưng ở khu vực rừng vẫn còn rất cao. Trong khi biến động dân cư ở điểm nghiên cứu vẫn thường xuyên diễn biến phức tạp với hàng nghìn người từ các nơi đến làm thuê vào mùa khô hàng năm. Người dân đi làm tự do theo thời vụ ngoài việc gây nhiều khó khăn cho công tác quản lý nhân khẩu và giám sát sốt rét của y tế cơ sở. Nhiều người trong số họ tự mua thuốc điều trị khi bị sốt rét và thường không uống đủ liều hoặc không đúng phác đồ. Đó là một trong những nguyên nhân chính gây kháng thuốc ở KST. Nguy hiểm hơn nữa khi họ trở về quê mang theo KST kháng, tạo cơ hội cho sốt rét phát triển trở lại và lan rộng KST kháng thuốc ở những vùng có muỗi *Anopheles*. Quá trình theo dõi và phòng vấn bệnh nhân sốt rét nghiên cứu *in vivo* với artesunate ở điểm nghiên cứu trong 2 năm cho thấy hầu hết họ đều xác nhận bị sốt rét do đi làm rừng ngủ rẫy. Trong khi nương rẫy chiếm phần lớn diện tích và là nơi canh tác chính của người dân địa phương. Do vậy việc đi rừng ngủ ở nương rẫy của người dân ở đây sẽ vẫn tiếp tục cho dù có thể bị sốt rét. Vì vậy phòng chống vector hiệu quả cho đối tượng người dân đi rừng ngủ rẫy và quản lý tốt bệnh nhân sốt rét, nhất là dân từ các nơi đến làm thuê sẽ góp phần làm giảm mạnh tỷ lệ sốt rét không chỉ ngay tại địa phương mà còn ngăn chặn sự lan rộng KST kháng thuốc.

#### **4.1.3. Sự thay đổi mật độ của vector chính *An. dirus* và *An. minimus* ở 2 thời điểm điều tra cuối mùa mưa - đầu mùa khô.**

Vector chính *An. dirus* và *An. minimus* phân bố ở cả 3 sinh cảnh và 2 đợt điều tra 10/2012 (cuối mùa khô) và 12/2012-1/2013 (đầu mùa khô). Tuy nhiên mật độ muỗi tăng cao nhanh giữa 2 thời điểm điều tra trong khoảng thời gian cách nhau chưa đầy 2 tháng. Ở thôn vào thời

điểm điều tra 12/2012-1/2013, mật độ *An. dirus* tăng 5 lần so với thời điểm 10/2012 cuối mùa mưa. Ở bìa rừng mật độ *An. dirus* tăng 6,79 lần, trong rừng tăng 5,72 lần. Đối với *An. minimus* vào thời điểm cuối mùa mưa không điều tra thấy ở thôn bản và bìa rừng, nhưng vào đầu mùa khô mật độ muỗi là 0,012 con/giờ/người, trong rừng mật độ muỗi tăng 16,67 lần so với thời điểm điều tra cuối mùa mưa.

Như vậy, thời điểm đầu mùa khô 12/2012-1/2013 ở cả 3 sinh cảnh đều có mật độ *An. dirus* và *An. minimus* tăng so với thời điểm 10/2012 cho dù trước khi điều tra ở điểm nghiên cứu đã được phun hóa chất diệt muỗi. Tuy nhiên mật độ muỗi vẫn tăng, ngay cả ở khu vực thôn bản nơi được phun hóa chất định kỳ đúng theo chỉ đạo của chương trình sốt rét Quốc gia. Số liệu trên cho thấy hiệu quả của giải pháp này chưa được cao, nhất là ở sinh cảnh rừng. Do vậy cần nghiên cứu giám sát giải pháp phòng chống vector hiệu quả và phù hợp hơn nữa cho người dân ở sinh cảnh này, nhất là vào mùa khô. Bởi vì đây là thời vụ người dân tập trung đông ở rừng rẫy để thu hoạch nông sản và cũng tương quan với tỷ lệ sốt rét tăng cao hàng năm. Thống kê của trạm y tế xã Đắk Nhau trong 4 tháng mùa khô (1/3 năm) của 3 năm từ 2010 - 2012 đều có số bệnh nhân sốt rét chiếm 60%, bằng 2/3 số ca bệnh của cả năm. Tương tự ở xã Đắk Ô từ năm 2010 đến 2013 cũng có 57% số bệnh nhân sốt rét được phát hiện trong 4 tháng mùa khô.

Vì vậy phòng chống vector đúng đối tượng và thời điểm vector phát triển sẽ làm giảm mạnh mật độ muỗi, hạn chế sự lan truyền sốt rét. Điều này đã được chứng minh bằng chỉ số KST ở xã Đắk Ô huyện Bù Gia Mập 6 tháng đầu năm 2014 đã giảm 60% so với năm 2013 và 65% so với 4 năm từ 2010 – 2013. Bởi vì cuối năm 2013 toàn bộ sinh cảnh từ thôn bản đến các nhà rẫy ở khu vực bìa rừng điểm nghiên cứu đã được tăng cường và giám sát chặt chẽ liên tiếp 2 đợt phun hóa chất diệt muỗi (Số liệu của Dự án giám sát sốt rét trọng điểm của Chương trình Quốc gia thực hiện tháng 7 năm 2014 tại Trạm y tế xã Đắk Ô). Hiệu quả của hóa chất ngoài tác dụng diệt muỗi trưởng thành còn có tác dụng xua *An. dirus* lùi sâu vào trong rừng, làm gia tăng khoảng cách giữa người với vector cũng góp phần hạn chế mạnh sự lan truyền sốt rét. Ngoài ra còn một yếu tố khách quan nữa theo nhận định của người dân địa phương là do năm 2013 nông sản mất mùa nên lượng người dân đến làm thuê giảm nhiều so với các năm trước. Vì vậy muốn tỷ lệ sốt rét tiếp tục giảm và không phát triển trở lại nên tiếp tục duy trì giải pháp này.

#### **4.2. Kết quả phát hiện thoa trùng sốt rét trong muỗi *Anopheles***

Kết quả phân tích PCR chỉ phát hiện *An. dirus* nhiễm thoa trùng với tỷ lệ 0,58%. Tỷ lệ *An. dirus* nhiễm thoa trùng tuy thấp, nhưng phân

bỏ ở cả bìa rừng và trong rừng, thời điểm cuối mùa mưa và đầu mùa khô. Muỗi nhiễm toa trùng thu thập được ở sinh cảnh rừng thuộc địa phận các xã Đắc Ô tỉnh Bình Phước, xã Đắc Ngo và Quảng Trục tỉnh Đắc Nông là những khu vực tập trung nhiều nương rẫy. Giáp xã Đắc Nhau, Bom Bo và Đường 10 nên đã thu hút nhiều người dân ở các xã này và từ các nơi về làm thuê theo thời vụ vào mùa khô mỗi năm. Thống kê của trạm y tế xã Đắc Ô từ năm 2011 đến 2013 trung bình mỗi năm có trên 600 bệnh nhân sốt rét có KST được phát hiện. Trong đó có trên 30% là dân ở các xã Đắc Nhau, Bom Bo, Đường 10 huyện Bù Đăng và các tỉnh khác đến xâm canh hoặc làm thuê bị sốt rét. Tại trạm y tế xã Đắc Nhau từ năm 2011 đến 2013 trung bình mỗi năm có 127 bệnh nhân sốt rét có KST được phát hiện. Trong đó 85% số bệnh nhân xác nhận họ bị sốt rét trong thời gian đi làm rẫy ở rừng Bù Gia Mập thuộc các xã Đắc Ô tỉnh Bình Phước, hoặc rừng xã Quảng Trục và Đắc Ngo tỉnh Đắc Nông đều là những vị trí thuộc điểm nghiên cứu được chọn điều tra. Vector chính *An. minimus* và vector phụ *An. aconitus*, *An. maculatus* và *An. jeyporiensis* không phát hiện nhiễm toa trùng do số lượng muỗi phân tích ít. Tuy nhiên *An. minimus* cũng là một vector có khả năng truyền sốt rét mạnh. Tỷ lệ *An. minimus* nhiễm toa trùng trong các nghiên cứu ở hầu hết các vùng sốt rét khác chỉ đứng sau *An. dirus*. Các loài vector phụ cũng đều có tỷ lệ nhiễm toa trùng thấp ở những nghiên cứu trước đây. Nghiên cứu mới đây của Ron, 2011 ở xã Khánh Phú tỉnh Khánh Hòa có tỷ lệ *An. maculatus* nhiễm toa trùng là 0,012%.

### **4.3. Kết quả nghiên cứu kháng thuốc và phát hiện đột biến gen**

#### **4.3.1. Đáp ứng với thuốc artesunate của *P. falciparum***

Artemisinin và dẫn xuất đã từng có hiệu lực cao với *P. falciparum* kháng thuốc ở những năm đầu của thập kỷ 90 thế kỷ trước. Tuy nhiên tỷ lệ *P. falciparum* thất bại điều trị bằng artesunate hoặc artemether đơn thuần 5 ngày đã tăng đáng kể tại một số điểm nghiên cứu ở Bình Phước. Năm 2000 đã có gần 50% bệnh nhân *P. falciparum* ở xã Phú Trung tỉnh Bình Phước thất bại điều trị bằng artesunate. Liều điều trị artesunate đơn thuần 5 ngày sau đó được tăng thêm 2 ngày, nâng liệu trình điều trị lên 7 ngày. Tuy nhiên đến năm 2003 phác đồ artesunate 7 ngày đối với *P. falciparum* lại giảm hiệu lực. Ở một số điểm nghiên cứu xã Phú Trung, Đắc Ô và Đắc Nhau tỉnh Bình Phước đã có 16,4% bệnh nhân sốt rét *P. falciparum* còn KST ở D3 sau 7 ngày điều trị artesunate.

Kết quả nghiên cứu *in vivo* cho thấy *P. falciparum* ở cả Bình Phước và Đắc Nông đã kháng artesunate. Tỷ lệ bệnh nhân kéo dài thời gian cắt KST đến hơn 48 giờ (D2 còn KST) chiếm 50,6%, dài hơn so với 1,9 ngày ở Ninh Thuận và Gia Lai ( $p < 0,01$ ). Tỷ lệ bệnh nhân ở Đắc

Nông còn KST ở D3 là 15,%, Bình Phước 20% tăng so với năm 2003 và 2009 (13,2% và 16%). Tỷ lệ bệnh nhân thất bại điều trị ở Đăk Nông và Bình Phước tương ứng là 9,1% và 14%, tương đương với kết quả của Tạ Thị Tĩnh năm 2009 ở xã Đăk Nhau tỉnh Bình Phước. Như vậy tỷ lệ bệnh nhân có D3 còn KST và thất bại điều trị bằng phác đồ artesunate 7 ngày ở cả Bình Phước và Đăk Nông đều quá ngưỡng 10% xác định kháng thuốc sớm và không được sử dụng thuốc tại cộng đồng theo qui định của Bộ Y tế.

#### **4.3.2. Kết quả phát hiện đột biến gen MDR-1 và axit amin protein Pgh-1 của *P. falciparum* bị thay thế do đột biến gen**

Trước khi giải trình tự ADN phát hiện đột biến gen *P. falciparum* của bệnh nhân thất bại điều trị xuất hiện lại KST được phân tích kiểu gen phân biệt *P. falciparum* tái phát hoặc tái nhiễm. Kết quả đã xác định chỉ trong số 11 mẫu *P. falciparum* xuất hiện lại KST ở bệnh nhân thất bại điều trị có 9 mẫu *P. falciparum* tái phát, còn lại 2 mẫu *P. falciparum* được xác định là nhiễm mới. Kết quả phân tích trình tự ADN đoạn gen MDR-1 của 9 mẫu *P. falciparum* (7 mẫu kháng và 2 mẫu nhạy) chỉ phát hiện 3 điểm đột biến làm 2 axit amin bị thay thế ở vị trí 107 (I107T) của 1 mẫu *P. falciparum* kháng và vị trí 170 (F170I) của 1 mẫu *P. falciparum* nhạy. Những đột biến này phân bố đều ở cả *P. falciparum* nhạy và kháng với tần xuất thấp và chưa thấy nghiên cứu nào công bố nên chỉ xác định là đột biến ngẫu nhiên ở *P. falciparum* thực địa. Kết quả phân tích không phát hiện mẫu *P. falciparum* kháng thuốc nào có đột biến thay thế axit amin ở vị trí 86.

Kiểu đại của axit amin ở vị trí 86 cũng được Thanh Ngo phát hiện ở *P. falciparum* kháng artemisinin năm 2003 và Maja xác định năm 2013 ở *P. falciparum* kháng phác đồ artemether phối hợp lumefantrine ở Tanzania. Tác giả xem đó là dấu hiệu phân tử xác định kháng liệu pháp ACT của *P. falciparum* thực địa. Các tác giả nước ngoài khác cũng đều có nhận định tương tự là đột biến gen MDR - 1 ở *P. falciparum* không làm giảm nhạy cảm mefloquin hoặc artemisinin và dẫn xuất như chloroquin hoặc quinin. Durasinght và Reed cho rằng đột biến gen làm axit amin của protein Pgh-1 ở vị trí 86 bị đột biến thay thế liên quan đến tăng mức độ nhạy cảm của *P. falciparum* với artemisinin và mefloquine là do tính acid ở không bào tiêu hóa của KST không liên quan đến quá trình hấp thụ và thải trừ thuốc. Đột biến gen MDR - 1 ở *P. falciparum* chỉ làm tăng mức độ kháng, không quyết định tính kháng như đột biến vị trí 76 gen CRT kháng chloroquin, hoặc đột biến điểm 263 gen CYT - b kháng autovaquion...

Mối liên quan ngược giữa kiểu đại của axit amin vị trí 86 với kháng artemisinin ở *P. falciparum* có thể giải thích bằng giả thuyết cơ

ché đột biến nghịch. Khi *P. falciparum* kháng chloroquin xuất hiện đột biến gen làm axit amin ở vị trí 86 protein Pgh-1 bị thay thế. Khi artemisinin được sử dụng thay chloroquin điều trị *P. falciparum* kháng xuất hiện đột biến thay thế axit amin ở vị trí 86 từ kiểu đột biến ngược trở về kiểu đại ban đầu.

#### **4.3.2. Kết quả phát hiện đột biến gen ATPase6 của *P. falciparum***

Kết quả phân tích trình tự ADN gen Atpase6 đã phát hiện 83 đột biến điểm làm thay thế 49 axit amin của enzyme ATPase6. Trong đó chỉ có 4 axit amin ở các vị trí N465S, I569 K, I654K và I656S ở 3 mẫu *P. falciparum* kháng là đáng quan tâm. Những axit amin này phân bố ở đoạn 1 từ vị trí axit amin 403 đến 657 thuộc vùng chức năng của enzyme, cũng đã được Lionel phát hiện ở *P. falciparum* thu thập tại Đắc Nông Việt Nam năm 2010. Mallika Imwong phát hiện ở *P. falciparum* Thái Lan. Hoặc Jambou phát hiện ở *P. falciparum* thu thập từ một số nước Châu Mỹ, Châu Á và Châu Phi. Kết quả phân tích không phát hiện đột biến thay thế axit amin ở các vị trí L263S, H243Y, S769N liên quan đến tăng giá trị IC50 đối với dihydroartemisinin như Cojean và Uhlemann đã phát hiện ở *P. falciparum* Châu Phi. Hoặc đột biến thay thế axit amin ở vị trí E431K và A623E liên quan đến giảm nhạy với artemether như Jambou phát hiện ở *P. falciparum* Guyana. Trong số 16 axit amin bị đột biến thay thế ở cả *P. falciparum* tái nhiễm, nhạy và kháng thuốc chưa thấy nghiên cứu nào công bố có liên quan đến sự thay đổi đáp ứng với artesunate.

Tóm lại hầu hết các đột biến phát hiện được là ngẫu nhiên, không liên quan đến sự thay đổi đáp ứng thuốc. Nghiên cứu của Uhlemans đã chỉ ra rằng có khoảng 5% đột biến tự nhiên ở *P. falciparum* thực địa. Ngoài 49 axit amin bị thay thế, còn 90 axit amin ở đoạn cuối thứ 4 và 5 của enzym ATPase6 ở 20 mẫu *P. falciparum* thực địa có trình tự khác so với mẫu *P. falciparum* 3D7 từ ngân hàng gen. Những thay đổi này không liên quan đến kháng artesunate. Sự khác biệt này biểu hiện đặc điểm di truyền của enzyme ATPase6 ở quần thể *P. falciparum* Việt Nam.

Như vậy trong số 49 axit amin của enzym ATPase6 bị thay thế do đột biến gen chỉ có 4 axit amin ở vị trí N465S, I569L, I654k và T656S xuất hiện ở 3 mẫu *P. falciparum* kháng artesunate như một số nghiên cứu ở nước ngoài đã công bố. Tuy nhiên số mẫu trong nghiên cứu này còn ít, do vậy cần tiếp tục nghiên cứu thêm với số mẫu lớn hơn. Tham chiếu với chủng *P. falciparum* tạo kháng được từ chủng nhạy trong phòng thí nghiệm để có kết luận chính xác hơn.

## KẾT LUẬN

1. Điểm nghiên cứu phân bố 19 loài Anopheles. Trong đó *An. dirus* chiếm 66,75%, *An. philippinensis* 23,7%, *An. maculatus* 3,01%, *An. minimus* 1,36%, *An. splendidus* 1,11%, *An. aconitus* 0,73% và *An. jeyporiensis* 0,10%, 12 loài Anopheles còn lại khác chiếm tỷ lệ thấp từ 0,05% - 0,73%.

Thôn bản phân bố 17 loài Anopheles, trong đó có 5 loài là vector sốt rét gồm 2 vector chính và 3 vector phụ. Bìa rừng phân bố 6 loài Anopheles, trong đó có 3 loài là vector sốt rét bao gồm 2 vector chính và 1 vector phụ. Trong rừng phân bố 3 loài Anopheles, trong đó có 2 loài là vector chính.

Vector chính *An. dirus* và *An. minimus* phân bố ở 3 sinh cảnh thôn bản, bìa rừng và trong rừng. Mật độ muỗi cao nhất ở trong rừng, sau đó đến bìa rừng, thấp nhất ở thôn bản. Thời điểm đầu mùa khô mật độ muỗi cao hơn thời điểm cuối mùa mưa từ 5 - 7 lần tùy theo sinh cảnh. Vector sốt rét phụ phân bố ở thôn bản, không điều tra thấy ở sinh cảnh rừng.

2. Tỷ lệ *An. dirus* nhiễm thoa trùng sốt rét là 0,58%. Bìa rừng có tỷ lệ *An. dirus* nhiễm thoa trùng là 0,45%, trong rừng là 0,64%, không phát hiện *An. dirus* ở thôn bản nhiễm thoa trùng. Tỷ lệ *An. dirus* nhiễm thoa trùng ở thời điểm cuối mùa mưa là 0,44%, đầu mùa khô là 0,61%. Các loài Anopheles khác không phát hiện nhiễm thoa trùng.

3. Phát hiện 3 điểm đột biến gen MDR-1 làm thay thế 2 axit amin của protein Pgh-1 tại vị trí I107T và I170F, không liên quan đến kháng artesunate ở *P. falciparum*. Xác định axit amin ở vị trí 86 của protein Pgh - 1 ở *P. falciparum* kháng artesunate mang kiểu dại.

Phát hiện 83 điểm đột biến gen ATPase6 làm 49 axit amine của enzyme ATPase6 bị thay thế. Trong đó có 4 axit amin bị đột biến thay thế ở các vị trí N465S, I569L, I654K và T656P của *P. falciparum* kháng artesunate.

## KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu đã đạt được một số kết quả có ý nghĩa cho khoa học và đóng góp mới cho thực tiễn công tác phòng chống sốt rét, nhưng vẫn còn một số tồn tại kiến nghị nghiên cứu tiếp:

1. Tiếp tục nghiên cứu ATPase6 và phát triển nghiên cứu gen K13 của *P. falciparum* để phát hiện và sàng lọc điểm đột biến liên quan kháng thuốc nhóm sesquiterpene lactone.
2. Nghiên cứu phân biệt *P. falciparum* tái phát - tái nhiễm và phát hiện đột biến gen nên phân tích đồng thời các mẫu thu thập ở 3 thời điểm D0 - D3 - D xuất hiện lại KST.