

TÍNH ĐA DẠNG VÀ ĐỘT BIẾN MẤT GEN HISTIDINE - RICH PROTEIN 2/3 TRÊN CÁC PHÂN LẬP *PLASMIDIUM FALCIPARUM* (PfHRP 2/3) TẠI TÂY NGUYÊN VIỆT NAM

Đoàn Thị Mỹ Phương¹, Nguyễn Thị Minh Trinh²,
Hồ Văn Hoàng², Huỳnh Hồng Quang²

Mục tiêu: Xác định tỷ lệ mất gen *pfhrp2/3* trên phân lập *P. falciparum* đang lưu hành tại các tỉnh Tây Nguyên.

Đối tượng và phương pháp: Bệnh nhân sốt rét và nhiễm ký sinh trùng *P. falciparum*. 108 phân lập *P. falciparum* trên mẫu giấy thấm khô được tách chiết DNA sử dụng Chelex - 100. Nghiên cứu ngang mô tả và phân tích phòng thí nghiệm.

Kết quả: Trong số 108 mẫu *P. falciparum* được xác định bằng kính hiển vi, chỉ có 97,3% (105/108) dương tính với SD - Bioline test. Phân tích số liệu phân tử trên cả exon 2 của gen *pfhrp2* và khuếch đại vùng bảo tồn phát hiện 3/108 (2,7%) và gen *pfhrp3* phát hiện 5/108 (4,6%) mất gen ở các phân lập *P. falciparum*. Trong đó, tỷ lệ mất gen *Pfhrp2* ở Đắk Lắk, Đắk Nông và Gia Lai lần lượt là 5% (2/40), 4,5% (1/22) và 0%. Không có mẫu *P. falciparum* có hai đột biến mất gen *Pfhrp2/Pfhrp3* đồng thời. **Kết luận:** nghiên cứu đã cung cấp bằng chứng phân tử về các phân lập *P. falciparum* tại 3 tỉnh Tây Nguyên đã thiếu gen *Pfhrp2*(2,7%), *Pfhrp3*(4,6%) và trên vùng flanking của chúng. Việc tiếp tục đánh giá các RDTs và giám sát phân tử là cần thiết để tăng chất lượng chẩn đoán và giữ cho vai trò RDTs như một công cụ hữu ích nhất trong chẩn đoán tại các vùng sâu, vùng xa và nơi mà điểm kính không hoạt động không đủ chất lượng.

Từ khóa: Test chẩn đoán nhanh (RDTs), protein giàu histidine của *P. falciparum* (PfHRP - 2/3).

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sốt rét là một bệnh truyền nhiễm do muỗi truyền quan trọng, tiếp tục đe dọa tính mạng nhân loại trên toàn cầu, nhất là các khu vực châu Phi, châu Á - Thái Bình Dương (WHO, 2019). Hiện ba phương pháp đang được Tổ chức Y tế thế giới (WHO) và Bộ Y tế khuyến cáo để chẩn đoán xác định sốt rét dựa trên nền tảng ký sinh trùng sốt rét (KSTSR) là lam máu nhuộm giemsa soi dưới kính hiển vi (KHV), test chẩn đoán nhanh phát hiện kháng nguyên (AgRDTs) và phản ứng chuỗi trùng hợp PCR. Mỗi phương pháp đều có ưu điểm và nhược điểm, nên đôi khi bỏ sót ca bệnh trong thực hành.

AgRDTs phát hiện kháng nguyên KSTSR rất sớm, ngay cả khi mật độ thấp trong máu dưới ngưỡng phát hiện của KHV. Do vậy, AgRDTs hỗ trợ chẩn đoán lam máu, nhất là nơi khó tiếp cận cơ sở y tế, hệ thống điểm KHV hoạt động yếu. Tuy nhiên, hai nhược điểm của AgRDTs là dương tính kéo dài do kháng nguyên tồn tại sau điều trị, nên không dùng nó để theo dõi diễn tiến điều trị và gần đây một số điều tra tại nhiều vùng sốt rét lưu hành các nước Nam Mỹ và Tiểu vùng sông Mê Kông chỉ ra hiện tượng âm tính giả trên test AgRDTs ở một số ca có lam dương tính nhưng lại âm tính tính với test AgRDTs do *P. falciparum* có đột biến mất đoạn gen mã hóa Histidine - Rich protein 2/hoặc 3 (PfHRP2/3), nên không có kháng nguyên này để phát hiện trên test, khi đó kết quả test AgRDTs là âm tính, dễ dẫn đến bỏ sót chẩn đoán, điều trị không hợp lý, gây biến chứng.

Tại miền Trung - Tây Nguyên, phần lớn sốt rét tập trung ở tỉnh Gia Lai, Đắk Lắk, Đắk Nông và

⁽¹⁾Trung tâm Y tế huyện Đắk Mil, Đắk Nông. ⁽²⁾Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn.

Ngày nhận bài: 07/6/2021.

Ngày phản biện xong: 05/8/2021.

Ngày duyệt đăng: 20/8/2021.

Người chịu trách nhiệm nội dung khoa học: Đoàn Thị Mỹ Phương, Trung tâm Y tế huyện Đắk Mil, Đắk Nông.

Điện thoại: 0947022266. E-mail: phuonxndakmil@gmail.com.



P. falciparum chiếm ưu thế so với *P. vivax* trong cơ cấu. Tại các cơ sở y tế không điểm KHV, hoặc điểm KHV không hoạt động thì phải dùng test AgRDTs và nếu có tình trạng âm tính giả xảy ra như trên thì nguy cơ âm tính giả, bỏ sót chẩn đoán và sốt rét tiếp tục lan truyền. Với ý nghĩa đó, nghiên cứu được tiến hành nhằm mục tiêu: 1. Mô tả sự đa hình về di truyền gen HRP2/HRP3 của *Plasmodium falciparum* tại một số vùng sốt rét lưu hành của tỉnh Gia Lai, Đăk Lăk, Đăk Nông; 2. Xác định đột biến mất gen HRP2/HRP3 của *Plasmodium falciparum* liên quan đến kết quả âm tính giả trên test chẩn đoán nhanh sốt rét tại điểm nghiên cứu.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu: Gồm có (1) Bệnh nhân sốt rét do *P. falciparum* được chẩn đoán bằng KHV và (2) Test nhanh loại SD - Bioline malaria antigen Pf/Pv HRP2/pLDH còn hạn sử dụng.

Bệnh nhân sốt rét nhiễm ký sinh trùng *P. falciparum*.

Tiêu chuẩn chọn bệnh:

- Nhiễm đơn thuần hoặc phối hợp có loài *P. falciparum*.
- Chẩn đoán xác định bằng kính hiển vi có lam giemsa, nhưng test âm tính.
- Bất luận giới tính, nhóm tuổi, dân tộc, mật độ KSTSR *P. falciparum*.
- Đồng ý tham gia nghiên cứu từ bệnh nhân hay người giám hộ (nếu là trẻ em).

Tiêu chuẩn loại trừ:

- Bệnh nhân nhiễm các loài *Plasmodium* spp. không phải *P. falciparum*.
- Bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu.
- Bệnh nhân suy giảm miễn dịch (lao, HIV/AIDS, tiểu đường, suy gan, viêm khớp nặng, suy thận nặng, bệnh tự miễn, ung thư, đang dùng thuốc chống thải ghép).
- Test chẩn đoán nhanh loại SD - Bioline malaria antigen Pf/Pv HRP2/pLDH.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu: Thu thập mẫu từ tháng 5/2019 đến tháng 7/2021 và phân tích mẫu từ tháng 3/2021 đến tháng 10/2021. Địa

điểm phân tích đột biến mất gen và giải trình tự tại Labo sinh học phân tử Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn và Viện Sanger (Cambridge, Anh).

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu ngang mô tả và phân tích phòng thí nghiệm.

Nội dung nghiên cứu

- Tỷ lệ ca *P. falciparum* biểu hiện âm tính giả trên test AgRDTs loại SD - Bioline Pf/Pv HRP2/pLDH.
- Xác định mật độ KSTSR *P. falciparum* trên những ca có kết quả âm tính giả test AgRDTs.
- Xác định tỷ lệ ca có đột biến mất gen PfHRP2/3 trên số mẫu phân lập *P. falciparum* phân tích.

Phương pháp và kỹ thuật

- Thu thập mẫu máu tại thực địa: Xét nghiệm lam máu và test AgRDTs loại SD - Bioline xác định nhiễm *P. falciparum* đơn thuần hay phối hợp có *P. falciparum* đều được chọn nghiên cứu và thu mẫu máu vào giấy thấm Whatman 3MM để phân tích kỹ thuật Nested PCR và PCR - giải trình tự.
- Kỹ thuật tách chiết DNA tổng số, tinh sạch DNA, PCR và nested - PCR, cặp môi dung để khuếch đại.
- Quy trình PCR định loài *Plasmodium* spp. và giải trình tự, phát hiện đột biến và sự đa dạng trên gen PfHRP2/PfHRP3. Sản phẩm DNA sau khi tách chiết sẽ được tiếp tục dùng để phân tích đột biến mất gen trên protein giàu histidine 2/3 theo quy trình Fontecha G(2018)^[3] và WHO (2019)^[8].

Phân tích và xử lý số liệu: Phần mềm phân tích giải trình tự gen của Promega, V.2017 và Excel phân tích thống kê thường. Kiểm soát sai lệch thông tin qua từng mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân trước và sau xét nghiệm.

Khía cạnh đạo đức trong nghiên cứu: Nghiên cứu được thông qua Hội đồng Khoa học và Đạo đức y sinh Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Quy Nhơn. Bệnh nhân được chẩn đoán xác định sốt rét sẽ được cán bộ y tế điều trị theo Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị sốt rét của Bộ Y

tế (2016 và 2020). Mẫu bệnh phẩm được thu thập theo quy trình SOPs và mã số được bảo mật. Thực hiện đảm bảo an toàn sinh học sản phẩm nghiên cứu tuân thủ theo quy định.

KẾT QUẢ

Tổng số 108 phân lập *P. falciparum* thu thập được từ năm 2019 - 2021, trong đó 40 mẫu tại Đắk Lắk, 22 mẫu ở Đắk Nông và 46 mẫu ở Gia Lai. Một số kết quả phân tích đạt được:

Đặc điểm chung của mẫu phân lập thu được tại 3 tỉnh Gia Lai, Đắk Nông và Đắk Lắk

Bảng 1. Kết quả xét nghiệm sốt rét bằng lam máu giemsa và test nhanh tại 3 tỉnh

TT	Tỉnh (n = 108)	Số mẫu <i>P. falciparum</i>	Chẩn đoán KHV		Test SD - Bioline		Thu mẫu máu giấy thấm	
			Dương (%)	Âm (%)	Dương (%)	Âm (%)	SL	% Đạt
1	Tỉnh Đắk Lắk	40	40 (100)	0	37 (95,0)	2 (5,0)	40	100
2	Tỉnh Đắk Nông	22	22 (100)	0	21 (95,5)	1 (4,5)	22	100
3	Tỉnh Gia Lai	46	46 (100)	0	46 (100)	0	46	100
	Tổng số	108				3 (2,7)		

Nhận xét: Trong số 108 mẫu phân lập thu thập được tại 3 tỉnh đều dương tính với *P. falciparum* qua lam máu nhuộm giemsa soi dưới KHV, song có 3/108 (2,7%) mẫu lại âm tính với test chẩn đoán nhanh SD - Bioline. Tất cả mẫu phân lập đều được lấy giấy thấm theo hướng dẫn đạt chất lượng để tiếp tục phân tích sinh học phân tử.

Bảng 2. Kết quả xét nghiệm sốt rét bằng lam máu giemsa và test nhanh ở Đắk Lắk

TT	Đắk Lắk (n = 40)	Số ca <i>P. falciparum</i>	Chẩn đoán KHV		Test SD - Bioline	
			Dương (%)	Âm (%)	Dương (%)	Âm (%)
1	Huyện Ea Kar	11	11 (100)	0	10 (90,9)	1 (9,1)
2	Huyện Krông Năng	27	27 (100)	0	25 (96,3)	1 (3,7)
3	Huyện Ea H'Leo	2	2 (100)	0	2 (100)	0
	Tổng số	40				2 (5,0%)

Nhận xét: Trong số 40 phân lập *P. falciparum* tại Đắk Lắk, 100% số mẫu dương tính trên lam máu nhuộm giemsa và so sánh với kết quả test nhanh SD - Bioline thấy có 5% (2/40) âm tính.

Bảng 3. Kết quả xét nghiệm sốt rét bằng lam máu giemsa và test nhanh ở Đắk Nông

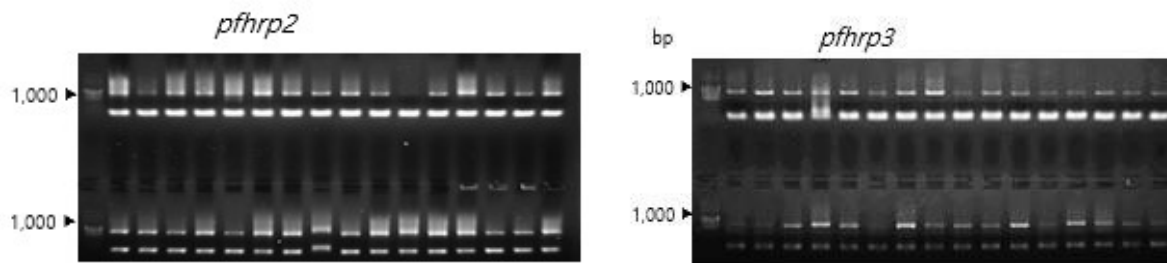
TT	Đắk Nông (n = 22)	Số ca <i>P. falciparum</i>	Chẩn đoán KHV		Test SD-Bioline	
			Dương (%)	Âm (%)	Dương (%)	Âm (%)
1	Huyện Tuy Đức	11	11 (100)	0	10 (90,9)	1 (9,1)
2	Huyện Đắk Mil	3	3 (100)	0	3 (100)	0
3	Huyện Cư Jút	8	8 (100)	0	8 (100)	0
	Tổng số	22				1 (4,5%)

Nhận xét: Trong số 22 phân lập *P. falciparum* tại Đắk Nông, 100% (22/22) số mẫu dương tính trên lam máu nhuộm giemsa và so sánh với kết quả test nhanh SD - Bioline thấy có 4,5% (1/22) âm tính.



Bảng 4. Kết quả xét nghiệm sốt rét bằng lam máu giemsa và test nhanh ở Gia Lai

TT	Gia Lai (n = 46)	Số ca <i>P. falciparum</i>	Chẩn đoán KHV		Test SD - Bioline	
			Dương (%)	Âm (%)	Dương (%)	Âm (%)
1	Huyện Krông Pa	38	38 (100)	0	38 (100)	0
2	Huyện Ia Pa	8	8 (100)	0	8 (100)	0
	Tổng số	46				0



Hình 1. Khuếch đại PCR của *Pfhrp2* và *Pfhrp3* trên các phân lập *P. falciparum*

Nhận xét: Trong số 46 phân lập *P. falciparum* tại Gia Lai, 100% (46/46) số mẫu dương tính trên lam máu nhuộm giemsa và phù hợp với kết quả test nhanh SD - Bioline.

Giải trình tự phát hiện đột biến mất gen *PfHRP2*/*HRP3* của phân lập *P. falciparum*

Nhằm khẳng định tình trạng đột biến mất gen *PfHRP2*/*PfHRP3* của *P. falciparum*, tiếp tục phân tích tại các vùng bảo tồn cao của *PfHRP2*/*PfHRP3* với các chỉ điểm MAL230 và MAL228 (đối với *PfHRP2* và MAL475 và MAL485 (đối với *PfHRP3*) vừa để làm rõ mất gen trên cả *PfHRP2* và 3.

Bảng 5. Đột biến mất gen *PfHRP2*/*HRP3* trên các phân lập *P. falciparum* ở Đắk Lắk

TT	Đắk Lắk (n = 40)	Kết quả <i>PfHRP2/3</i> Exon2		<i>Pfhrp2</i> Vùng bảo tồn cao		<i>Pfhrp3</i> Vùng bảo tồn cao	
		<i>pfhrp2</i>	<i>pfhrp3</i>	MAL230	MAL228	MAL475	MAL485
1	VNDLPF01	+	+				
2	VNDLPF02	+	+				
3	VNDLPF03	+	+				
4	VNDLPF04	+	+				
5	VNDLPF05	+	+				
6	VNDLPF06	+	+				
7	VNDLPF07	+	+				
8	VNDLPF08	+	+				
9	VNDLPF09	+	+				
10	VNDLPF10	+	-			+	-
11	VNDLPF11	+	+				
12	VNDLPF12	+	+				
13	VNDLPF13	+	+				
14	VNDLPF14	+	+				
15	VNDLPF15	+	+				
16	VNDLPF16	+	+				

17	VNDLPP17	+	+				
18	VNDLPP18	+	+				
19	VNDLPP19	+	+				
20	VNDLPP20	+	+				
21	VNDLPP21	+	+				
22	VNDLPP22	+	+				
23	VNDLPP23	-	+	-	-	+	+
24	VNDLPP24	+	+				
25	VNDLPP25	+	+				
26	VNDLPP26	+	+				
27	VNDLPP27	+	+				
28	VNDLPP28	+	+				
29	VNDLPP29	+	+				
30	VNDLPP30	+	+				
31	VNDLPP31	-	+	-	-	+	+
32	VNDLPP32	+	+				
33	VNDLPP33	+	+				
34	VNDLPP34	+	+				
35	VNDLPP35	+	+				
36	VNDLPP36	+	+				
37	VNDLPP37	+	+				
38	VNDLPP38	+	+				
39	VNDLPP39	+	+				
40	VNDLPP40	+	+				

+ Không mất gen; - Mất gen

Nhận xét: Phân tích tình trạng đột biến mất gen Pfh_{rp}2/Pfh_{rp}3 của *P. falciparum* tại Đắc Lắc trên cả PfHRP2/3 Exon2 và các vùng bảo tồn cao Pfh_{rp}2/Pfh_{rp}3 với các chỉ điểm MAL230 và MAL228 (đối với Pfh_{rp}2 và MAL475 và MAL485 (đối với Pfh_{rp}3) cho thấy có 2/40 (5%) là VNDLPP23 và VNDLPP31 mất gen Pfh_{rp}2 và 1/40 (2,5%) là VNDLPP10 mất gen Pfh_{rp}3 qua kết quả không khuếch đại PCR.

Bảng 6. Đột biến mất gen PfHRP2/HRP3 trên các phân lập *P. falciparum* ở Đắc Nông

TT	Đắc Nông (n = 22)	Kết quả PfHRP2/3 Exon2		Pfh _{rp} 2 Vùng bảo tồn cao		Pfh _{rp} 3 Vùng bảo tồn cao	
		<i>pfhrp2</i>	<i>pfhrp3</i>	MAL230	MAL228	MAL475	MAL485
1	VNDNPF01	+	+				
2	VNDNPF02	+	+				
3	VNDNPF03	+	+				
4	VNDNPF04	+	+				
5	VNDNPF05	+	+				
6	VNDNPF06	-	+	-	-	+	+
7	VNDNPF07	+	+				
8	VNDNPF08	+	+				
9	VNDNPF09	+	+				



10	VNDNPF10	+	+				
11	VNDNPF11	+	+				
12	VNDNPF12	+	+				
13	VNDNPF13	+	+				
14	VNDNPF14	+	+				
15	VNDNPF15	+	+				
16	VNDNPF16	+	+				
17	VNDNPF17	+	+				
18	VNDNPF18	+	+				
19	VNDNPF19	+	+				
20	VNDNPF20	+	+				
21	VNDNPF21	+	+				
22	VNDNPF22	+	+				

+ Không mất gen; - Mất gen

Nhận xét: Phân tích tình trạng đột biến mất gen Pfhrr2/Pfhrr3 của *P. falciparum* tại Đắc Nông trên cả PfHRP2/3 Exon2 và các vùng bảo tồn cao Pfhrr2/Pfhrr3 với các chỉ điểm MAL230 và MAL228 (đối với Pfhrr2 và MAL475 và MAL485 (đối với Pfhrr3) cho thấy có 1/22 (4,5%) mất gen Pfhrr2 (phân lập VNDNPF06) và không có phân lập *P. falciparum* nào mất gen Pfhrr3.

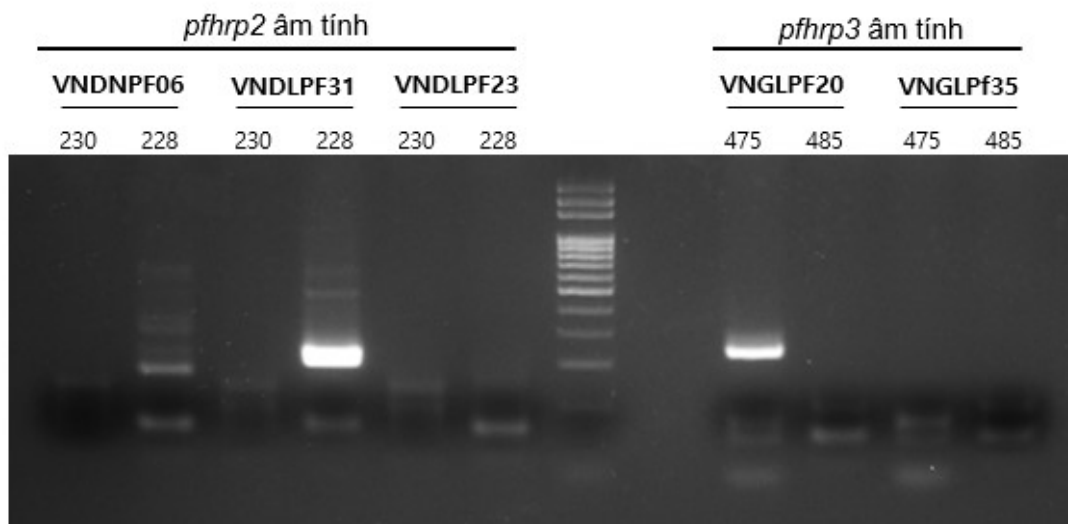
Bảng 7. Đột biến mất gen PfHRP2/HRP3 trên các phân lập *P. falciparum* ở Gia Lai

TT	Gia Lai (n = 46)	Kết quả PfHRP2/3 Exon2		Pfhrr2 Vùng bảo tồn cao		Pfhrr3 Vùng bảo tồn cao	
		<i>pfhrp2</i>	<i>pfhrp3</i>	MAL230	MAL228	MAL475	MAL485
1	VNGLPF01	+	+				
2	VNGLPF02	+	+				
3	VNGLPF03	+	-	+	+	-	-
4	VNDLPF04	+	+				
5	VNGLPF05	+	+				
6	VNGLPF06	+	+				
7	VNGLPF07	+	+				
8	VNGLPF08	+	+				
9	VNGLPF09	+	+				
10	VNGLPF10	+	+				
11	VNGLPF11	+	+				
12	VNGLPF12	+	+				
13	VNGLPF13	+	+				
14	VNGLPF14	+	+				
15	VNGLPF15	+	+				
16	VNGLPF16	+	+				
17	VNGLPF17	+	+				
18	VNGLPF18	+	+				
19	VNGLPF19	+	+				
20	VNGLPF20	+	-	+	+	-	-
21	VNGLPF21	+	+				
22	VNGLPF22	+	+				
23	VNGLPF23	+	+				

24	VNGLPF24	+	+				
25	VNGLPF25	+	+				
26	VNGLPF26	+	+				
27	VNGLPF27	+	+				
28	VNGLPF28	+	+				
29	VNGLPF29	+	+				
30	VNGLPF30	+	+				
31	VNGLPF31	+	+				
32	VNGLPF32	+	+				
33	VNGLPF33	+	+				
34	VNGLPF34	+	+				
35	VNGLPF35	+	-	+	+	-	-
36	VNGLPF36	+	+				
37	VNGLPF37	+	+				
38	VNGLPF38	+	+				
39	VNGLPF39	+	+				
40	VNGLPF40	+	+				
41	VNGLPF41	+	-	+	+	-	-
42	VNGLPF42	+	+				
43	VNGLPF43	+	+				
44	VNGLPF44	+	+				
45	VNGLPF45	+	+				
46	VNGLPF46	+	+				

+ Không mất gen; - Mất gen

Nhận xét: Phân tích tình trạng đột biến mất gen *Pfhrp2/Pfhrp3* của *P. falciparum* tại Gia Lai trên cả *PfHRP2/3 Exon2* và các vùng bảo tồn cao *Pfhrp2/Pfhrp3* với các chỉ điểm MAL230 và MAL228 (đối với *Pfhrp2* và MAL475 và MAL485 (đối với *Pfhrp3*) cho thấy, không có mẫu nào mất gen *Pfhrp2* và 4/46 (8,7%) mất gen *Pfhrp3* (VNGLPF03, VNGLPF20, VNGLPF35 và VNGLPF41) thông qua kết quả không khuếch đại PCR.



Hình 2. Kết quả điện di phát hiện các phân lập *P. falciparum* mất đoạn gen *Pfhrp2* và *Pfhrp3*



Bảng 8. Đột biến mất gen PfHRP2/HRP3 trên các phân lập *P. falciparum* ở 3 tỉnh

TT	Các tỉnh (n = 108)	Kết quả PfHRP2/3 Exon2		Pfhrp2 Vùng bảo tồn cao		Pfhrp3 Vùng bảo tồn cao	
		<i>pfhrp2</i>	<i>pfhrp3</i>	MAL230	MAL228	MAL475	MAL485
1	Đắk Lắk (n = 40)	2 (5,0%)	1 (2,5%)	2 (5,0%)	2 (5,0%)	1 (2,5%)	1 (2,5%)
2	Đắk Nông (n = 22)	1 (4,5%)	0	1 (4,5%)	1 (4,5%)	0	0
3	Gia Lai (n = 46)	0	4 (8,7%)	0	0	4 (8,7%)	4 (8,7%)
	Trung bình	3 (2,7%)	5 (4,6%)	3 (2,7%)	3 (2,7%)	5 (4,6%)	5 (4,6%)

Nhận xét: Qua phân tích 108 phân lập *P. falciparum* tại 3 tỉnh Tây Nguyên qua hai bước *PfHRP2/3 Exon2* và các vùng bảo tồn cao *Pfhrp2/Pfhrp3* với các chỉ điểm MAL230 và MAL228 (đối với *Pfhrp2*) và MAL475 và MAL485 (đối với *Pfhrp3*) xác định có 3 phân lập mất gen *Pfhrp2* (2,7%) và 5 mẫu mất gen *Pfhrp3* (4,6%) và kết quả này tương ứng với số liệu trên test nhanh.

BÀN LUẬN

Đặc điểm chung của mẫu phân lập thu được tại 3 tỉnh Gia Lai, Đắk Nông và Đắk Lắk

Tổng số 108 mẫu phân lập *P. falciparum* thu thập được tại thực địa và các cơ sở y tế (Trung tâm Y tế huyện, trạm y tế xã) của 3 tỉnh Đắk Nông, Đắk Lắk và Gia Lai thông qua xét nghiệm máu đồng thời test nhanh và chuẩn vàng giemsa và lấy máu vào giấy thấm đê khô (DBS) trong điều kiện nhiệt độ phòng. Kết quả xác định chẩn đoán bằng lam máu nhuộm giemsa soi dưới kính hiển vi (KHV) dương tính với *P. falciparum* là 100%, song so sánh với kết quả của test chẩn đoán nhanh SD - Bioline Ag Pf/Pv thì chỉ có 97,3% (105/108) mẫu có kết quả dương tính tương ứng và 3/108 mẫu (2,7%) lại âm tính với test nhanh.

Trong số đó, 40 phân lập *P. falciparum* thu thập tại Đắk Lắk, 100% số mẫu dương tính trên lam máu và so sánh với kết quả test nhanh SD - Bioline thấy có 5% (2/40) mẫu âm tính. Tại Đắk Nông, trong 22 phân lập *P. falciparum* thì 100% (22/22) số mẫu dương tính trên lam máu và có 4,5% (1/22) âm tính với test nhanh SD - Bioline. Trong khi đó, 46 phân lập *P. falciparum* tại Gia Lai cho kết quả 100% (46/46) số mẫu dương tính trên lam máu, phù hợp với kết quả test nhanh SD - Bioline.

Để xác định có hay không tình trạng đột biến mất gen mã hóa cho các protein *PfHRP2/3* liên quan đến tình trạng cho kết quả khác nhau giữa hai xét nghiệm, thì các mẫu lam đều được kiểm tra soi lại bởi hai xét nghiệm viên đạt chứng chỉ cấp độ 1 và 2 của Tổ chức Y tế thế giới định loài và

đếm mật độ KSTSR, đồng thời tất cả mẫu phân lập được lấy giấy thấm đạt chất lượng giọt máu để tiếp tục phân tích sinh học phân tử để xem kết quả mất gen này gây nên tình trạng âm tính giả của test nhanh hay không đối với các phân lập *P. falciparum* thu được.

Xác định sự đa dạng gen *PfHRP2* và *PfHRP3* của các phân lập *P. falciparum*

Trình tự protein của PfHRP2 có số acid amin là 228, kết quả này có sự tương đồng với kết quả nghiên cứu của nhóm Li và cộng sự (2015) cho thấy trình tự protein của PfHRP2 có số acid amin từ 104 đến 286 acid amin. Phân tích các motif lặp lại thu được tương tự với các tác giả khác nghiên cứu tại châu Mỹ Latinh và châu Phi, châu Á. Trình tự loại 2 (AHHAHHAAD) và 7 (AHHAAD), được coi là tương quan với độ nhạy của test nhanh dựa trên *PfHRP2*, nổi bật nhất trong các chuỗi *PfHRP2* của nghiên cứu này với tỷ lệ phổ biến lần lượt 100% và 92,5%. Đặc biệt, motif loại 2 có mặt trong nhiều bản sao ở hầu hết các phân lập, motif loại 6 (AHHATD) cũng phổ biến và được quan sát trong 95,5% mẫu. So sánh, các motif loại 3 (AHHAHHAAY), 5 (AHHAHHAASD), 8 (AHHAAY) và 10 (AHHAAHHAATD) tương đối đa dạng và tìm thấy trong hơn 50% mẫu phân lập. Trình tự acid amin loại 9 và loại 11 không quan sát được trong gen *PfHRP2* (Li và cộng sự 2015; Funwei và cộng sự, 2019).

Motif loại 13 lặp lại được quan sát thấy ở 1 chủng phân lập từ mẫu thu nhận tại Gia Lai. Kết quả này tương tự nghiên cứu của Li và cộng sự, 2015, loại 13 lặp lại được quan sát thấy ở 4 chủng

phân lập chiếm tỷ lệ 6%, 3 trong số đó là từ Thái Lan. Motif loại 13 này không được phát hiện trong các nghiên cứu thực hiện tại Nigeria và châu Mỹ Latinh (Funwei và cộng sự, 2019)^[6]. Ở đoạn giữa các trình tự, các loại lặp lại thường được sắp xếp là 2 - 8 - 5 và 7 - 2 - 7 - 6. Trước khi kết thúc bằng motif 12, đã có đoạn lặp lại loại 2, loại 6 hoặc loại 10 trong hầu hết các trường hợp. Các nghiên cứu trước đây tại các vùng địa lý khác nhau cũng có các đoạn lặp lại motif 2, 6 (Li và cs, 2015; Funwei và cộng sự, 2019).

Các chuỗi trình tự gen *PfHRP3* được kiểm tra, so sánh với các mẫu chuẩn trên ngân hàng gen, cụ thể ở đây là trình tự gen *PfHRP3* có mã số AY821805. Kết quả kiểm tra bằng chương trình BLAST trên ngân hàng gen cho thấy các trình tự nucleotide thu nhận đúng là chuỗi nucleotide của gen *PfHRP3*. Các chuỗi nucleotide được phân tích, so sánh với nhau và so sánh với các mẫu trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy vùng gen *PfHRP3* là vùng gen ít có tính biến thiên dưới dạng trình tự nucleotide. Các nghiên cứu tương tự cũng chỉ ra rằng về mặt cấu trúc gen, *PfHRP3* được bảo tồn nhiều hơn *PfHRP2*.

Các trình tự nucleotide được dịch mã dưới dạng acid amin và phân tích trình tự sắp xếp các acid amin. Qua kết quả phân tích dạng acid amin các trình tự gen thu được của các mẫu *P. falciparum* cho thấy vùng gen mã hóa cho protein *PfHRP3* là vùng giàu histidin (H) và alanin (A). Qua tổng hợp các motif acid amin xuất hiện cho thấy các mẫu gen *PfHRP3* tại Gia Lai và Đắk Nông đều có sự xuất hiện giống nhau các motif loại 1, 4, 7, 15, 16, 17, 18, 20. Kết quả này cũng tương tự với Baker và cộng sự (2010); các nghiên cứu này cho thấy gen *PfHRP3* có các motif loại 1, 2, 4, 7, 15, 16, 17, 18, 20. Trình tự protein của gen *PfHRP3* có số acid amin là 185. Nhóm nghiên cứu của David Ndenu và cộng sự (2019)^[6] đã nghiên cứu trên tổng số 124 trình tự acid amin *PfHRP3* khác nhau thu được tại Kenya cho thấy kích thước gen *PfHRP3* dao động từ 160 đến 247 acid amin. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước. Trình tự acid amin của các phân lập tại 2 điểm nghiên cứu đều bắt đầu motif loại 1 (AHHAHVAD). Trong cấu trúc các trình tự lặp lại các motif, so với gen *PfHRP2* thì gen *PfHRP3* có sự đa dạng thấp hơn so với gen *PfHRP2*.

Giải trình tự phát hiện đột biến mất gen *PfHRP2/HRP3* của phân lập *P. falciparum*

Qua phân tích 108 phân lập *P. falciparum* tại 3 tỉnh Tây Nguyên qua hai bước *PfHRP2/3* Exon2 và các vùng bảo tồn cao *Pfhrp2/Pfhrp3* với các chỉ điểm MAL230 và MAL228 (đối với *Pfhrp2*) và MAL475 và MAL485 (đối với *Pfhrp3*) xác định có 3 phân lập mất gen *Pfhrp2* (2,7%) và 5 mẫu mất gen *Pfhrp3* (4,6%) và kết quả này tương ứng với số liệu trên test nhanh SD - Bioline Ag Pf/Pv. Các chuỗi trình tự gen *PfHRP2* được kiểm tra, so sánh với các mẫu chuẩn trên ngân hàng gen <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> với trình tự gen *PfHRP2* có mã số AY816237. Kết quả kiểm tra bằng chương trình BLAST trên ngân hàng gen cho thấy các trình tự nucleotide thu nhận đúng là chuỗi nucleotide của gen *PfHRP2*.

Tỷ lệ mất gen này thấp hơn so với một số nghiên cứu của Bosco B. Agaba (2019) tại đa trung tâm tại 12 nước châu Phi cho tỷ lệ mất gen chung cả *PfHRP2/3* là từ 0,4% - 62%^[2] nhưng theo các phương pháp kỹ thuật khác nhau. Nghiên cứu tiền hành tại 3 nước Trung Mỹ (Honduras, Guatemala và Nicaragua) do Fontecha G và cộng sự (2018) phát hiện các gen *Pfhrp2*, *Pfhrp3* và vùng bảo tồn cao “flanking regions” trên 128 mẫu máu của bệnh nhân sốt rét *P. falciparum*, phân tích PCR và nested - PCR, dữ liệu cho thấy có 25,8 và 91,4% số phân lập thiếu vùng ở giữa exon 1 và exon 2 của lần lượt gen *Pfhrp2* và *Pfhrp3* *ivaf* ký sinh trùng *P. falciparum* ở các nước này biểu hiện mất một hay cả hai gen. Tỷ lệ mất gen *Pfhrp2* cao nhất là ở Nicaragua, thấp nhất ở Guatemala và đặc biệt ở Honduras thấy tỷ lệ mất gen *Pfhrp3* cao nhất (96,2%), có 21% phân lập có cả hai đột biến trên đoạn exon 1 - 2 và 6,1% phân lập thiếu vùng mã hóa dài cho cả hai gen và các bằng chứng này cần được xem xét để thực hiện việc đánh giá chẩn đoán thấu đáo hơn^[3]. Nghiên cứu tại Odisha, Ấn Độ khi so sánh hai phương pháp KHV và test nhanh tại 25/30 quận (Pallabi Pati, 2018) và sau đó xác định PCR cho thấy tỷ lệ âm tính giả trên test nhanh phát hiện kháng nguyên *PfHRP2/3* và vùng bảo tồn cao của chúng trên các mẫu nhiễm đơn thuần *P. falciparum*. Trong số 384 phân lập được khẳng định nhiễm đơn loài *P. falciparum* bằng KHV thì có 58 mẫu lại âm tính với test nhanh với tỷ lệ khác nhau tùy theo quận và khi phân tích PCR genotyping cho *Pfhrp2* và *Pfhrp3* trên các phân lập này thấy 65,5% (38/58) âm tính



với gen *Pfhrp2* và 41,4% (24/58) mẫu âm tính với *Pfhrp3* và 29,3% (17/58) mẫu âm tính với cả hai gen này và dữ liệu này không liên quan đến mật độ KSTSR với tình trạng âm hay dương tính của các gen. Tỷ lệ ký sinh trùng mất gen cao như thế là một vấn đề y tế cần quan tâm vì dễ dàng bỏ sót nhiều ca bệnh tại cộng đồng, chẩn đoán và điều trị không còn chính xác và tin cậy, nên cần bổ sung hoặc thay thế bằng loại test khác phù hợp hơn^[4].

Nồng độ của sản phẩm PCR sau khi tinh sạch tương đối đạt với kết quả đo nồng độ DNA dao động chủ yếu trong khoảng từ 50ng/μl đến 200ng/μl và kết quả độ tinh sạch A260/280 nằm trong khoảng 1,8 - 2. Sau khi tinh sạch, sản phẩm PCR của đoạn gen này sẽ được giải trình tự. Các chuỗi nucleotide này sau đó sẽ được xử lý bằng chương trình Geneious R8 trên máy tính để xác nhận, so sánh và phân tích trình tự gen thu được với các trình tự gen chuẩn trên ngân hàng gen. Sau khi phân tích dạng nucleotide, các trình tự này được dịch mã dưới dạng acid amin và phân tích trình tự sắp xếp các acid amin.

Các chuỗi nucleotide được phân tích, so sánh với nhau và so với các mẫu trên ngân hàng gen. Kết quả cho thấy vùng gen *PfHRP2* có tính biến thiên cao, đa dạng về mặt di truyền các trình tự nucleotide. Qua kết quả phân tích dạng acid amin các trình tự gen thu được của các mẫu *P. falciparum* cho thấy vùng gen mã hóa cho protein *PfHRP2/PfHRP3* là vùng giàu histidin (H) và alanin (A). Số liệu này tương tự với nghiên cứu Li và cộng sự (2015) đã chỉ ra gen *PfHRP2* ở ký sinh trùng *P. falciparum* tại các nước trong khu vực Tiểu vùng sông Mê Kông (GMS) thể hiện mức độ đa dạng di truyền cao, hay nghiên cứu của Funwei và cộng sự (2019) cũng chỉ ra sự đa dạng về mặt di truyền của vùng gen *PfHRP2* của *P. falciparum*. Theo Baker và cộng sự (2005), phần lớn biến thể này là do các số lần lặp khác nhau và khi được dịch thành các chuỗi acid amin khác nhau.

Phân tích PCR chạy điện di và giải trình tự phát hiện đột biến mất gen *PfHRP2/PfHRP3* của *P. falciparum* trên cả đoạn *PfHRP2* Exon2 và *PfHRP3* Exon2 và phân tích tại các vùng bảo tồn cao của *PfHRP2/PfHRP3* (highly conserved regions flanking) với các chi điểm MAL230 và MAL228 (đối với *PfHRP2*) và MAL475 và MAL485 (đối với *PfHRP3*) để làm rõ mất gen trên cả *PfHRP2/3*. Kết quả cho thấy lần lượt tại tỉnh Đắk Lắk có đột biến mất gen *Pfhrp2/Pfhrp3* của

P. falciparum trên cả *PfHRP2* Exon2 và các vùng bảo tồn cao *Pfhrp2* là 2/40 mẫu (5%) ở các phân lập số VNDLPF23 và VNDLPF31 mất gen *Pfhrp2* và 1/40 (2,5%) là VNDLPF10 mất gen *Pfhrp3* qua kết quả biểu hiện không có sản phẩm khuếch đại PCR, tức là trong cấu trúc gen của mẫu *P. falciparum* này bị mất đoạn gen *PfHRP2*.

Tại Đắk Nông, đột biến mất gen *Pfhrp2* của *P. falciparum* trên cả *PfHRP2* Exon2 và vùng bảo tồn cao *Pfhrp2* với các chi điểm MAL230 và MAL228 là 1/22 (4,5%) mất gen *Pfhrp2* (phân lập VNDNPF06) và không có phân lập *P. falciparum* nào mất gen *Pfhrp3*. Đặc biệt, tại Gia Lai thì không có mẫu nào mất gen *Pfhrp2* nhưng có đến 4/46 mẫu phân lập (8,7%) mất gen *Pfhrp3* (VNGLPF03, VNGLPF20, VNGLPF35 và VNGLPF41) thông qua kết quả không có sản phẩm khuếch đại PCR hay trong cấu trúc gen của các mẫu *P. falciparum* này bị mất đoạn gen *PfHRP3*.

Kết quả này tương tự như nghiên cứu của Gamboa và cộng sự (2010), thiếu *PfHRP2* là do xóa nhiễm sắc thể số 8 đã loại bỏ gen *PfHRP2* và đoạn gen ngược dòng, trong khi việc thiếu *PfHRP3* đã bị loại bỏ trên nhiễm sắc thể số 13^[6,7]. Nhóm nghiên cứu đã tiến hành thực hiện phản ứng PCR 148 mẫu *P. falciparum* đã được thu thập từ năm 2003 - 2007 từ nhiều vùng khác nhau, kết quả thu được 41% và 70% trong số các mẫu này thiếu gen *PfHRP2* và *PfHRP3* và khoảng 22% KSTSR *P. falciparum* thiếu cả gen *PfHRP2* và *PfHRP3* (Gamboa D và cs., 2010). Ở Iquitos, Peru một nghiên cứu khác đã xác định 13% phân lập *P. falciparum* thu thập từ năm 1998 - 2001 đã phát hiện mất gen *PfHRP2* (Akinyi và cộng sự, 2013). Nghiên cứu của Solano (2015) tại Colombia đã xác định trong 100 mẫu *P. falciparum* (18%) có mất đoạn gen *PfHRP2/PfHRP3* trên phân lập không thu nhận được gen *PfHRP2* và 52% không thu nhận được gen *PfHRP3*.

Số liệu nghiên cứu này cho thấy bằng chứng có đột biến mất đoạn gen mã hóa cho *PfHRP2* trên các phân lập *P. falciparum* thu được tại Đắk Lắk và Đắk Nông, chưa thấy ở Gia Lai, điều này dẫn đến một số ca cho kết quả “âm tính giả” trên test nhanh loại SD - Bioline Ag *Pf/Pv* khi so sánh với số liệu chuẩn vàng giemsa. Nếu tình huống đặt ra rằng tại một vùng sốt rét lưu hành, một số điểm kính hiển vi hoạt động không hiệu quả, không chất lượng hoặc không hoạt động do không có KHV,

hay KHV hồng, hoặc chưa có nhân lực xét nghiệm hoặc nhân lực nghỉ hưu, luân chuyển chưa có cán bộ thay thế thì chỉ còn duy nhất công cụ xét nghiệm sàng lọc chẩn đoán sốt rét là test nhanh SD - Bioline Ag Pf/Pv này, khi đó có thể một số ca bệnh sốt rét thật sự sẽ bị chẩn đoán bỏ sót hoặc chẩn đoán nhầm sang bệnh nhiễm trùng khác và hậu quả là chăm sóc và quản lý ca bệnh không hiệu quả.

Nghiên cứu tại 3 nước châu Phi (Rebecca Thomson, 2019) trên 911 mẫu phân lập mẫu máu khô trên giấy thấm tại Ghana (n = 165), Tanzania (n = 176) và Uganda (n = 570). Nhiễm *P. falciparum* được xác định PCR 18S rDNA và phân tích gen *Pfhrp2/3*. Kết quả cho thấy không có hiện tượng mất gen *Pfhrp2/3* thật sự được xác định trên các mẫu ở Ghana, nhưng có mất gen ở các mẫu Tanzania (3 mẫu với *Pfhrp2*; 2 mẫu *Pfhrp3*) và tại Uganda (7 mẫu *Pfhrp2*; 2 mẫu *Pfhrp3*). Tình trạng mất gen *Pfhrp2/3* tại Tanzania và Uganda cùng với một số báo cáo ở các nước láng giềng, cần phải giám sát độ tin cậy của các test chẩn đoán sốt rét một cách hệ thống tại các vùng lưu hành bệnh^[5].

Riêng đối với đột biến mất gen *PfHRP3*, qua phân tích 108 mẫu thì có đến 5 mẫu (4,6%) phân lập *P. falciparum* tại ba tỉnh Gia Lai, Đắk Lắk và Đắk Nông vẫn dương tính với test nhanh loại SD - Bioline Ag Pf/Pv với kháng nguyên đích là *PfHRP2* nhưng phân tích không cho sản phẩm khuếch đại gen *PfHRP3*; chưa phát hiện mẫu phân lập nào có đột biến mất gen đồng thời cả *PfHRP2* và *PfHRP3*. Dù hiện tại ở các vùng sốt rét lưu hành ở Việt Nam đang dùng loại test nhanh phát hiện kháng nguyên protein giàu histidine 2 (*PfHRP2*) chứ không có loại để phát hiện loại protein giàu histidine 3 (*PfHRP3*), nhưng số liệu cho thấy có 5/108 mẫu (4,6%) số phân lập *P. falciparum* mất gen *PfHRP3* sẽ giúp các nhà chính sách trong việc thay đổi loại test với các đích kháng nguyên nhằm tới khác nhau cần lưu ý và những

kiếm khuyết di truyền mất gen như thế sẽ làm giảm đi tính nhạy và độ đặc hiệu của test nhanh.

Tác giả Gmaboa và cộng sự (2019) cho biết 9 phân lập *P. falciparum* thu thập được ở Iquitos, Peru năm 2007 có 8 mẫu phát hiện thiếu *PfHRP2* và 6 mẫu thiếu cả gen *PfHRP2* và *PfHRP3*, ký sinh trùng *P. falciparum* thiếu cả 2 gen này cho kết quả âm tính giả trên cả ba mẫu test nhanh hiện có tại Peru. Tương tự, nghiên cứu của Maltha (2012) xác định 25,7% phân lập *P. Falciparum* thiếu gen *PfHRP2* và các phân lập này đều được thử với 10 loại test nhanh phát hiện kháng nguyên đích *PfHRP2* khác nhau, độ nhạy khoảng 70% - 72%, nhóm nghiên cứu cho rằng độ nhạy các test phát hiện *PfHRP2* đã bị ảnh hưởng ở khu vực này và cần xem xét thay đổi loại test khác thích hợp để chẩn đoán *P. falciparum* như test phát hiện loại kháng nguyên *Plasmodium lactate dehydrogenase* (pLDH), (pan - pLDH) phát hiện tất cả loài) và loại test đặc hiệu loài *P. falciparum* (*P. falciparum* - specific pLDH).

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Phân tích 108 phân lập *P. falciparum* tại 3 tỉnh Tây Nguyên trên các vùng *PfHRP2/3 Exon2* và vùng bảo tồn cao flanking *Pfhrp2/Pfhrp3* với các chỉ điểm MAL230 và MAL228 (đối với *Pfhrp2*) và MAL475 và MAL485 (đối với *Pfhrp3*) xác định có 3 phân lập mất gen *Pfhrp2* (2,7%) và 5 mẫu mất gen *Pfhrp3* (4,6%).

Kết quả này đã được kiểm chứng bằng PCR, nested - PCR và kết quả trên test nhanh SD - Bioline.

Thời gian đến cần mở rộng điều tra một cách hệ thống, đa trung tâm, cỡ mẫu lớn hơn để xác định tình trạng thiếu gen *PfHRP2/PfHRP3* trên quần thể *P. falciparum* để có kế hoạch thay đổi hay bổ sung loại test phù hợp, giúp chẩn đoán và quản lý ca bệnh tốt nhất.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Baker J, Ho MF, Pelecanos A, Gatton M, Cheng Q et al., (2010). Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of *Plasmodium falciparum*: Implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. *Malar J.* 2010 (9):129.
2. Bosco B, Agaba, Adoke Yeka, Sam Nsohya, et al., (2019). Systematic review of the status of *PfHRP2* and *PfHRP3* gene deletion: Approaches and methods used for its estimation and reporting in *Plasmodium falciparum* populations in Africa: Review of published studies (2010-2019). *Malar J* (2019) 18:355.

3. Fontecha G, Mejía RE, Banegas E, Ade MP, Mendoza Let al., (2018). Deletions of *pfhrp2* and *pfhrp3* genes of *Plasmodium falciparum* from Honduras, Guatemala and Nicaragua. *Malar J*. 2018 Aug 31;17(1):320.
4. Pallabi Pati, Gunanidhi Dhangadamajhi, Madhusmita Bal (2018). High proportions of PfHRP2 gene deletion and performance of HRP2-based rapid diagnostic test in *Plasmodium falciparum* field isolates of Odisha. *Malar J*, 17:394.
5. Rebecca Thomson, Khalid B Beshir, Jane Cunningham et al., (2019). PfHRP2 and PfHRP3 gene deletions that affect malaria rapid diagnostic tests for *P. falciparum*: Analysis of archived blood samples from 3 African countries. *The Journal of Infectious Diseases*, Vol.220(9):1444-52.
6. WHO (2017). False-negative RDT results and implications of new reports of *P. falciparum* histidine-rich protein 2/3 gene deletions.
7. WHO (2018). Protocol for estimating the prevalence of *Pfhrp2/Pfhrp3* gene deletions among symptomatic *falciparum* patients with false-negative RDT results.
8. WHO (2020). Master protocol for surveillance of *Pfhrp2/3* deletions and biobanking to support future research.

HISTIDINE RICH PROTEIN-2/3 (PfHRP2/3) DIVERSITY AND GENE DELETION OF *Plasmodium falciparum* ISOLATES IN HIGHLANDS OF VIETNAM

Summary

The objectives: To identify the prevalence of *pfhrp2/3* deletant *P. falciparum* isolates circulating within different Highlands provinces.

Subjects and methods: Total of 108 *P. falciparum* isolates' DNA was extracted from the dried blood spots (DBS) on filter papers using Chelex - 100. Exon 2 of *pfhrp2* and *pfhrp3* genes were amplified by PCR and detecting the gene deletion by amplifying the highly conserved regions flanking each gene, resolved by agarose gel electrophoresis and visualized under UV documentation light.

Results: In the microscopic analysis of 108 *P. falciparum* - confirmed samples, but just positive SD - Bioline test of 97.3% (105/108). General molecular analysis revealed the exon 2 of the *pfhrp2* gene and amplifying the highly conserved regions was deleted in 3/108 (2.7%) and *pfhrp3* gene was deleted in 5/108 (4.6%) in *P. falciparum* isolates. In which, *Pfhrp2* gene deletion proportions were 5.0% (2/40), 4.5% (1/22), and 0% in Daklak, Daknong, and Gialai, respectively. None of *P. falciparum* isolate with double *Pfhrp2/Pfhrp3* gene deletion.

Conclusions: This study provides molecular evidence of the existence of *P. falciparum* isolates lacking the *pfhrp2* (2.7%) and *pfhrp3* genes (4.6%), and their flanking regions. Continuous evaluation of RDTs and molecular surveillance would be recommended to enhance the diagnosis and keep RDT role is one of the most useful tools to malaria diagnosis assistance in remote areas, and where unenough quality microscopy activity.

Key words: *Rapid diagnostic test (RDT), P. falciparum histidine rich protein - 2/3 (PfHRP - 2/3).*