

ĐỘ NHẠY CẢM IN VIVO CỦA *P. FALCIPARUM* VỚI ARTESUNAT Ở TỈNH BÌNH PHƯỚC, VIỆT NAM

Trần Tịnh Hiền^{1,6}, Nguyễn Thanh Thùy Nhiên¹, Nguyễn Hoan Phú², Maciej F Boni^{1,6}, Ngô Việt Thanh¹, Nguyễn Thụy Nhã Ca¹, Lê Hồng Thái¹, Cao Quang Thái¹, Phạm Văn Tới¹, Phùng Đức Thuận³, Lê Thành Long⁴, Laura Merson^{1,6}, Christiane Dolecek^{1,6}, Kasia Stepniewska^{6,8}, Pascal Ringwald⁷, Nicholas J White^{5,6}, Jeremy Farrar^{1,6}, Marcel Wolbers^{1,6}

Tóm tắt

Một nghiên cứu đối chứng trên sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* đã được thực hiện từ tháng 8/2010 đến tháng 5/2011 để so sánh hai liều artesunat (AS) với dihydroartemisinin-piperaquin (DHA-PQP) nhằm xác định hiệu quả hiện nay của artesunat ở các vùng sốt rét lưu hành các tỉnh phía nam Việt Nam dọc biên giới Campuchia. Nghiên cứu thu nhận 166 bệnh nhân. Bán thời gian sạch ký sinh trùng (KST) trong 3 nhánh điều trị là 3,54 (AS 2mg/kg), 2,72 (AS 4mg/kg), và 2,98 giờ (DHA-PQP), cho thấy không có sự khác biệt thống kê ($p=0,19$). Tỷ số giảm KST trung vị sau 24 giờ ở nhóm AS 2mg/kg là 48, so với 212 và 113, theo thứ tự, ở hai nhóm kia ($p=0,02$). Tỷ lệ bệnh nhân có thời gian sạch KST >72 giờ ở các nhóm AS 2mg/kg, AS 4mg/kg và DHA-PQP, theo thứ tự, là 27%, 27%, và 22%. Thất bại điều trị sớm xảy ra ở 2 bệnh nhân (4%) và thất bại lâm sàng muộn xảy ra ở 1 bệnh nhân (2%) trong số 55 bệnh nhân nhóm AS 2mg/kg, so với không có trường hợp nào ở hai nhánh nghiên cứu kia. Tỷ lệ đáp ứng lâm sàng và ký sinh trùng học thỏa đáng (APCR) hiệu chỉnh với PCR ở ba nhóm lần lượt là 94%, 100%, và 100% ($p=0,04$). Nghiên cứu này cho thấy thời gian sạch KST *P. falciparum* ở phía nam Việt Nam nhanh hơn phía tây Campuchia nhưng chậm hơn so với dữ liệu trước đây ở Việt Nam. Cần có thêm các nghiên cứu để xác định xem đây có phải là sự trỗi dậy của kháng artemisinin tại khu vực này hay không. Hiện nay, ở các tỉnh phía nam Việt Nam, sự đáp ứng trị liệu với DHA-PQP vẫn tỏ ra thỏa đáng.

Abstract

IN-VIVO SUSCEPTIBILITY OF *P. FALCIPARUM* TO ARTESUNATE IN BINH PHUOC PROVINCE, VIETNAM.

From August 2010 to May 2011 a controlled trial in uncomplicated falciparum malaria was conducted to compare two doses of artesunate (AS) with dihydroartemisinin - piperaquine (DHA-PQP) to characterize the current efficacy of artesunate in a malaria endemic area of southern Viet Nam along the Cambodian border. 166 patients were recruited into the study. The median parasite clearance half-lives in the three treatment arms were 3.54

(AS 2mg/kg), 2.72 (AS 4mg/kg), and 2.98 hours (DHA-PQP), showing no statistical difference ($p=0.19$). The median parasite-reduction ratio at 24 hours was 48 in the AS 2mg/kg group compared with 212 and 113 in the other two groups, respectively ($p=0.02$). The proportions of patients with a parasite clearance time of >72 hours for AS 2mg/kg, AS 4mg/kg and DHA-PQP were 27%, 27%, and 22%, respectively. Early treatment failure occurred in two (4%) and late clinical failure occurred in one (2%) of the 55 patients in the AS 2mg/kg group, as compared with none in the other two study arms. The PCR-corrected adequate clinical and parasitological response (APCR) rates in the three groups were 94%, 100%, and 100% ($p=0.04$). This study indicates faster *P. falciparum* parasite clearance in southern Vietnam than in western Cambodia but slower clearance in comparison with historical data from Vietnam. Further studies to determine whether this represents the emergence of artemisinin resistance in this area are needed. Currently, the therapeutic response to DHA-PQP remains satisfactory in southern Vietnam.

Đặt vấn đề

Bệnh sốt rét vẫn là một thách thức y tế công cộng tại Việt Nam tuy tỉ lệ mới mắc đã giảm đáng kể trong 20 năm qua. Năm 2011 có 45.588 trường hợp được báo cáo cho Chương trình Phòng chống Sốt rét Quốc gia (Báo cáo của CTPCSR năm 2011) và 14 trường hợp tử vong được qui cho sốt rét. Việt Nam là một trong những nước đầu tiên sử dụng các dẫn chất của artemisinin trong việc phòng chống sốt rét cách đây hơn 20 năm. Ngành y tế Việt Nam đã quyết định sử dụng những thuốc này vì tỉ lệ mắc và chết do sốt rét gia tăng và mức độ kháng thuốc cao với chloroquin, sulphadoxin-pyrimethamin, và mefloquin. Từ năm 2005, Việt Nam đã sử dụng dihydroartemisinin-piperaquin (DHA-PQP) như điều trị đầu tay trong sốt rét do *P. falciparum*. Đến năm 2009, có những dấu hiệu đáng ngại từ phía tây Campuchia cho thấy đáp ứng ký sinh trùng (KST) học với các phác đồ điều trị có artesunat trong sốt rét không biến chứng do *P. falciparum* tỏ ra chậm hơn những nơi khác và tỉ lệ thất bại điều trị với artesunat-mefloquin cao một cách khác thường^[1-3]; những tín hiệu này gợi ý sự trỗi dậy của kháng artemisinin. Ngoài ra, sự kéo dài của thời gian sạch

¹ Đơn vị Nghiên cứu Lâm sàng Đại học Oxford (OUCRU), Chương trình nghiên cứu hải ngoại (MOP), Việt Nam

² Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam;

³ Viện Sốt rét-Ký sinh trùng-Côn trùng, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴ Bệnh viện Phước Long, tỉnh Bình Phước, Việt Nam

⁵ Khoa Y học Nhiệt đới, Đại học Mahidol, Bangkok, Thái Lan;

⁶ Trung tâm Y học Nhiệt đới, Khoa Y Nuffield, Đại học Oxford, Oxford, Vương quốc Anh

⁷ Chương trình Sốt rét Toàn cầu, Tổ chức Y tế Thế giới, Geneva, Thụy Sĩ

⁸ Mạng lưới kháng thuốc sốt rét toàn cầu (WWARN)

NGHIÊN CỨU

KST đã được báo cáo ở biên giới Thái Lan-Myanmar^[4] và bằng chứng về kháng artemisinin ở khu vực này gần đây đã được báo cáo^[5], chứng tỏ kháng artemisinin có thể lan rộng ra ngoài lãnh thổ Campuchia. Việt Nam có chung đường biên giới trên đất liền với Campuchia, với một số lượng lớn người lao động và dân cư qua lại hàng ngày. Vì vậy, việc khảo sát xem có bằng chứng nào về sự thay đổi đáp ứng KST-học với các dẫn chất artemisinin ở Việt Nam hay không là một nhu cầu cấp bách. Chúng tôi đã thực hiện một nghiên cứu ngẫu nhiên đối chứng về sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*, để so sánh hai liệu artesunat (AS) với dihydroartemisinin-piperaquin (DHA-PQP) nhằm xác định hiệu quả hiện nay của artesunat trong vùng sốt rét lưu hành ở phía nam Việt Nam dọc theo biên giới Campuchia.

Phương pháp

Địa điểm nghiên cứu và bệnh nhân

Nghiên cứu được thực hiện trong mùa truyền bệnh sốt rét, từ tháng 5/2010 đến tháng 3/2011 tại bệnh viện huyện Phước Long (150 giường), tỉnh Bình Phước. Huyện Phước Long cách TP. Hồ Chí Minh 170 km về phía đông bắc, thuộc vùng rừng núi của tỉnh Bình Phước. Huyện có diện tích 1857 km², có 197.897 dân, trong đó có 31.918 người dân tộc thiểu số. Phước Long được xem là vùng trọng điểm sốt rét của tỉnh Bình Phước và phía nam Việt Nam. Năm 2009, có 251 trường hợp sốt rét nhập viện vào bệnh viện huyện Phước Long, bao gồm 138 trường hợp sốt rét do *P. falciparum*.

Quần thể nghiên cứu là bệnh nhân sốt rét không biến chứng do *P. falciparum*. Tất cả bệnh nhân người lớn (≥ 15 tuổi) đều ký giấy tự nguyện tham gia trước khi nhận vào nghiên cứu. Đối với trẻ em, cha mẹ hoặc người giám hộ sẽ đại diện ký thay, riêng trẻ em ≥ 12 tuổi còn có thêm giấy đồng ý tham gia do các cháu ký tên.

Tiêu chí thu nhận

Bệnh nhân đến khám tại bệnh viện huyện Phước Long hoặc một trạm y tế xã gần đó được thu nhận vào nghiên cứu nếu hội đủ các tiêu chí sau đây: (1) nam giới > 10 tuổi hoặc nữ giới từ ≥ 10 đến < 12 tuổi, chưa có kinh nguyệt; (2) nhiễm *P. falciparum* đơn độc; (3) mật độ ký sinh trùng trong máu (thể vô tính) từ 10.000 – 100.000/ μ L; (4) nhiệt độ nách hoặc miệng $\geq 37,5^\circ\text{C}$ hoặc có sốt trong 24 giờ qua; (5) có thể dùng thuốc bằng đường uống; (6) đủ khả năng và thiện chí tuân thủ đề cương nghiên cứu trong thời gian nghiên cứu và đến khám theo lịch

hẹn; và (7) có giấy tự nguyện tham gia.

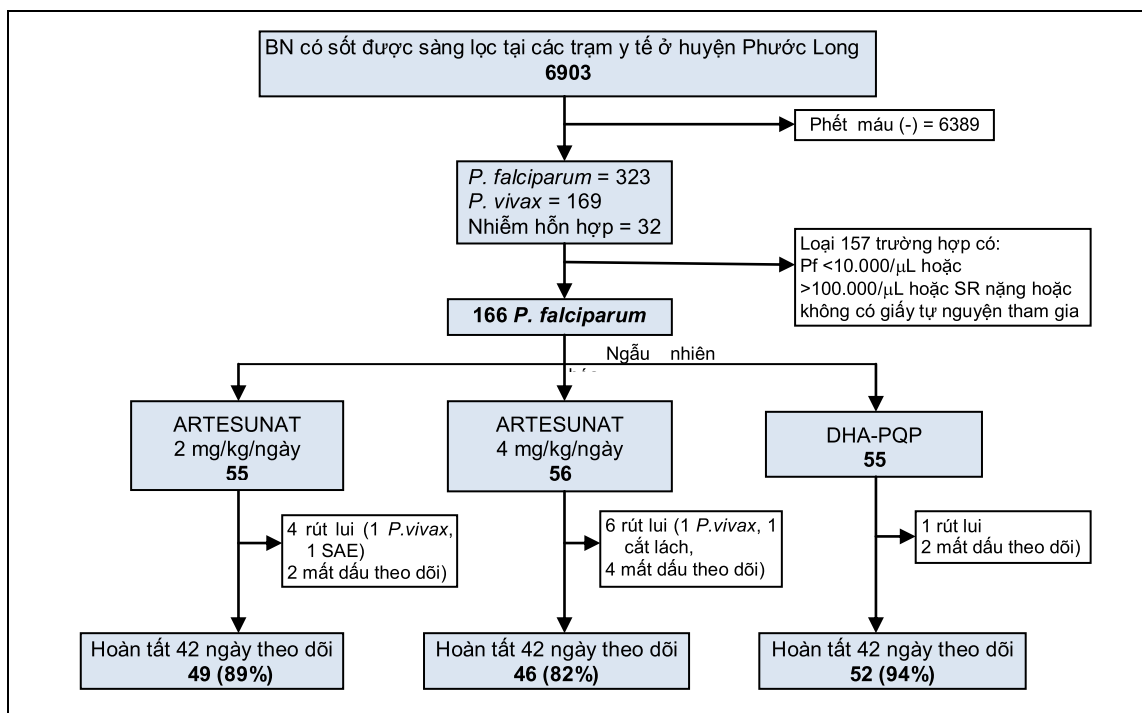
Tiêu chí loại trừ

Bệnh nhân được loại ra khỏi nghiên cứu nếu có một hay nhiều tình trạng sau (a) có dấu hiệu nguy hiểm toàn thân hoặc sốt rét nặng do *P. falciparum* theo định nghĩa năm 2009 của WHO; (b) nhiễm Plasmodium loài khác – đơn độc hoặc hỗn hợp; (c) suy dinh dưỡng nặng (được định nghĩa là trẻ có chuẩn tăng trưởng dưới -3 chỉ số z, có phù đối xứng xảy ra chỉ ít là ở bàn chân, hoặc chu vi đoạn giữa cánh tay < 110 mm); (d) có bệnh kèm sốt không phải sốt rét (ví dụ sỏi, nhiễm khuẩn đường hô hấp dưới cấp tính, tiêu chảy nặng kèm mất nước) hoặc đã biết có các bệnh tiềm ẩn nặng hoặc mạn tính (ví dụ bệnh tim, thận và gan, HIV/AIDS); (e) thường xuyên dùng những thuốc có thể cản trở được động học của thuốc sốt rét; (f) đã dùng thuốc sốt rét trong vòng 48 giờ trước; (g) tiền sử phản ứng quá mẫn hoặc chống chỉ định với bất kỳ thuốc nào được thử hoặc được dùng làm thuốc điều trị thay thế; hoặc (h) đã cắt bỏ lách.

Can thiệp

Đây là một nghiên cứu ngẫu nhiên, đối chứng, mở nhãn, về hiệu quả của artesunat (AS) và dihydroartemisinin-piperaquin (DHA-PQP) trong sốt rét cấp tính không biến chứng do *P. falciparum* với ba nhánh điều trị: i/ AS 2mg/kg/ngày trong 3 ngày, ii/ AS 4mg/kg/ngày trong 3 ngày hoặc iii/ DHA-PQP (DHA 2,4 mg/kg/ngày + PQP 19,2 mg/kg/ngày) trong 3 ngày. Sau khi ngẫu nhiên hóa, các nghiên cứu viên được cho biết kết quả phân lô điều trị. Tuy nhiên, cha mẹ và nhân viên không tham gia điều trị (y tá, xét nghiệm viên, kỹ thuật viên và dược sĩ) vẫn không biết kết quả phân lô. Nghiên cứu này không có mục đích so sánh hiệu quả của thuốc nghiên cứu mà là xác định xem có bằng chứng nào của sự kéo dài thời gian sạch KST sau khi bệnh nhân sốt rét uống artesunat hay không. Hai nhánh AS được điều trị tiếp với một liệu trình DHA-PQP đầy đủ (DHA 1,6 mg/kg/liều + PQP 12,8 mg/kg/liều): uống hai liều vào ngày 1 và một liều duy nhất mỗi ngày vào ngày 2 và ngày 3 (tổng cộng 3 ngày điều trị với DHA-PQP) theo phác đồ điều trị của Việt Nam. Artesunat do Công ty Dược phẩm Quế Lâm (Trung Quốc) hoặc Công ty Dược phẩm Mekophar (Việt Nam) cung cấp. DHA-PQP là biệt dược Artecan[®] của OPC. Tất cả các liều thuốc đều được uống dưới sự giám sát của nhân viên y tế được Chủ nhiệm đề tài phân công.

Hình 1. Lưu đồ bệnh nhân nghiên cứu



Ngẫu nhiên hóa

Ngẫu nhiên hóa khối được thực hiện theo tỉ số 1:1:1 và cỡ khối thay đổi từ 6 đến 9 đối tượng. Các phong bì niêm kín chứa mã số phân lô ngẫu nhiên được cất trong một ngăn kéo có khóa, và do được sĩ nghiên cứu mở ra khi có một bệnh nhân được nhận vào nghiên cứu sau khi đã kiểm tra các tiêu chí thu nhận/loại trừ. Bệnh nhân được thu nhận theo thứ tự vào viện và các phong bì niêm kín được mở đúng theo số thứ tự của chúng. Ngoài việc phân vào các nhánh điều trị, bệnh nhân còn được phân ngẫu nhiên vào một trong hai quy trình lấy mẫu máu để phân tích được động học quần thể.

Các quy trình lâm sàng và cận lâm sàng

Khi vào viện, bệnh nhân được cân, thăm khám đầy đủ và lấy các mẫu máu ban đầu để xét nghiệm công thức máu và sinh hóa. Lấy máu đầu ngón tay để đo hematocrit và làm các phết máu mỗi 6 giờ cho đến khi không tìm thấy *P. falciparum* thể vô tính. Xét nghiệm phết máu dày (giọt đặc) và phết máu mỏng (giọt đàn) vào các ngày 2, 3, 7, 14, 21, 28, 35 và 42 và vào bất kỳ ngày nào mà bệnh nhân tự dung quay trở lại. Số lượng KST trong máu được xác định từ số hồng cầu bị ký sinh trên mỗi 1.000 hồng cầu (phết mỏng) hoặc số KST trên mỗi 400 bạch cầu (phết dày). Đối với mỗi bệnh nhân, tất cả các phết máu lúc ban đầu (100%), tất cả các phết máu âm tính (100%), khoảng 10% số phết máu

dương tính (chọn ngẫu nhiên) và khoảng 70% số phết máu có 1 KST/400 bạch cầu được đọc hai lần bởi hai xét nghiệm viên độc lập. Mật độ KST được tính bằng cách lấy số trung bình của hai kết quả đếm. Các phết máu có kết quả xét nghiệm không đồng thuận (khác nhau về chẩn đoán loài, mật độ KST sai biệt > 50%, hoặc ý kiến khác nhau về sự có mặt/không có mặt KST) được một xét nghiệm viên thứ ba xem lại, và mật độ KST được tính bằng cách lấy trung bình của hai kết quả gần nhau nhất.

Bệnh nhân nghiên cứu được quan sát 30 phút sau khi uống thuốc xem có bị ói mửa hoặc tác dụng phụ hay không. Bệnh nhân bị ói trong khoảng thời gian này được cho uống thuốc lại cùng liều và theo dõi thêm 30 phút nữa. Nếu bệnh nhân lại ói, họ sẽ được rút ra khỏi nghiên cứu và điều trị thích hợp. Bệnh nhân trong cả ba nhánh được theo dõi trong 42 ngày. Kế hoạch theo dõi gồm các lần khám kiểm tra theo lịch hẹn cố định vào các ngày 7, 14, 21, 28, 35 và 42, bao gồm thăm khám lâm sàng và xét nghiệm cận lâm sàng tương ứng.

Xét nghiệm khuếch đại chuỗi gen (PCR) được dùng để phân biệt giữa tái phát sớm (recrudescence) thật sự do thất bại điều trị và tái nhiễm. Việc xác định gen được thực hiện trên các mẫu máu của tất cả các trường hợp có KST/máu tái diễn. DNA của KST được ly trích bằng phương pháp Chelex từ các vệt máu khô^[6]. Thực hiện PCR lồng bằng các đoạn

NGHIÊN CỨU

Bảng 1: Các đặc trưng ban đầu ở từng nhóm điều trị.

Đặc trưng	Nhóm điều trị					
		Artesunat 2mg/kg		Artesunat 4mg/kg		DHA-Piperaquin
	n	(N=55)	n	(N=56)	n	(N=55)
Tuổi (năm)	55	25 (20;38)	56	27 (21;35)	55	27 (21;33)
Trẻ em (< 15 tuổi)	55	4 (7%)	56	4 (7%)	55	3 (5%)
Giới tính	55		56		55	
Nữ		2 (4%)		2 (4%)		2 (4%)
Nam		53 (96%)		54 (96%)		53 (96%)
Dân tộc	55		56		55	
- Kinh (Việt)		26 (47%)		21 (38%)		19 (35%)
- S'tiêng		25 (45%)		25 (45%)		26 (47%)
- Dân tộc khác		4 (7%)		10 (18%)		10 (18%)
Tiền sử sốt rét cơn	55	24 (44%)	55	25 (45%)	55	26 (47%)
Sốt khi nhập viện	55	55 (100%)	56	51 (91%)	55	47 (85%)
Nhiệt độ (°C)	52	39,3(38,5;40,0)	56	38,6 (38,0;39,7)	55	39,0(37,9;39,5)
Chiều cao (cm)	55	164(160;169)	56	161(158;167)	55	163(158;167)
Cân nặng (kg)	55	55(49;60)	56	53(50;58)	55	54(48;59)
Mật độ KST (KST/ μ L)	55	27129 (12282;50868)	56	29192 (19415;55892)	55	29390 (16620;55578)
Hematocrit (%)	54	39,4(36,2;43,7)	55	40,0(37,4;42,9)	54	41,6(37,9;44,9)
Hemoglobin (g/dL)	53	13,8(12,6;15,4)	53	14,3(13,3;15,8)	51	14,2(12,9;16,0)
Bạch cầu ($\times 10^9$ /L)	53	5,9(4,6;7,7)	54	5,6(4,4;7,2)	53	6,3(5,1;8,3)
Bạch cầu trung tính (%)	50	78,7(66,5;82,9)	50	77,2(67,6;83,4)	48	74,9(67,2;80,6)
Bạch cầu lymphô (%)	54	15,8(11,7;26,6)	55	15,4(11,3;26,5)	54	19,1(13,6;24,6)
Tiểu cầu ($\times 10^9$ /L)	50	93 (69;140)	49	119 (79;139)	49	111 (70;154)
BUN (mmol/L)	52	17,1 (14,5;18,2)	55	16,4 (14,6;18,4)	54	16,6 (14,3;19,1)
Creatinin huyết thanh (μ mol/L)	53	79,6 (61,9;88,4)	55	79,6 (70,7;88,4)	54	79,6 (70,7;88,4)
Bilirubin toàn phần (μ mol/L)	52	18,0 (15,4;23,9)	50	20,5 (13,4;27,0)	54	20,5 (15,4;28,6)
Đường huyết (mmol/L)	52	4,9 (4,3;6,4)	55	5,2 (4,7;6,4)	54	5,2 (4,4;6,1)
AST (IU/L)	53	35 (27;49)	55	40 (27;50)	54	40 (30;58)
ALT (IU/L)	53	37 (29;54)	55	39 (29;64)	54	42 (30;65)

Số liệu thống kê tóm tắt là số lượng tuyệt đối (%) đối với các biến định tính và số trung vị (IQR) đối với biến liên tục

mỗi đặc hiệu đối với ba dấu ấn phân tử thường gặp nhất là *msp1*, *msp2* và *glurp* [7]. Phân tích kết quả dựa trên các định nghĩa của WHO về tái phát sớm và nhiễm mới. [8]

Đề cương nghiên cứu, các tài liệu về sự tự nguyện tham gia, thông tin hỗ trợ, và tất cả các loại thông tin quảng cáo hoặc tuyển mộ bệnh nhân đều được trình cho Hội đồng Đạo đức (HĐĐĐ) của Viện Sốt rét-KST-CT Tp. HCM và, HĐĐĐ Nghiên cứu bệnh nhiệt đới của Đại học Oxford và Hội đồng Phê duyệt Đạo đức Nghiên cứu của WHO. Nghiên cứu được đăng ký tại www.clinicaltrials.gov (NCT01165372).

Kết cục đánh giá

Kết cục đánh giá chính của nghiên cứu này là hằng số K của tốc độ thanh thải KST, tức là độ dốc của quan hệ tuyến tính giữa $\log_e$ của mật độ KST/máu với thời gian. Một số đo tương đương và dễ lý giải hơn – thời gian bán thanh thải KST (ký hiệu là $T_{1/2}$) – cũng được báo cáo, với $T_{1/2} =$

0,693/K. Hằng số tốc độ thanh thải KST dựa trên số KST đếm được qua thời gian được xác lập bằng công cụ điện toán Parasite Clearance Estimator của Mạng lưới Kháng thuốc Sốt rét Thế giới (WWARN). [9]

Các kết cục đánh giá phụ gồm có i) hiệu quả KST-học không hiệu chỉnh và hiệu chỉnh với PCR của ba nhánh điều trị qua 72 giờ và trong giai đoạn theo dõi 42 ngày theo hướng dẫn của WHO [10], bệnh nhân sẽ được phân loại là thất bại điều trị sớm, thất bại lâm sàng muộn, thất bại KST-học muộn, hoặc đáp ứng lâm sàng và KST-học thỏa đáng (ACPR); ii) Thời gian sạch KST (PCT100), được định nghĩa là số giờ từ liều điều trị đầu tiên đến khi có kết quả thứ nhất trong hai kết quả liên tiếp cho thấy số KST/máu = 0 (bệnh nhân không sạch KST được lấy số liệu ở thời điểm có KST đếm được lần cuối); iii) Tỷ lệ bệnh nhân có thời gian sạch KST >72 giờ sau khi bắt đầu điều trị; iv) Tỷ số giảm KST lúc 24 và 48 giờ, được định nghĩa là trị số KST/máu

lúc ban đầu chia cho trị số lúc 24 hoặc 48 giờ; v) Thời gian cắt sốt, được định nghĩa là số giờ từ liều điều trị đầu tiên đến khi bắt đầu giai đoạn 24 giờ không sốt (tức là nhiệt độ $<37,5^{\circ}\text{C}$); vi) Các biến cố bất lợi và bất lợi nghiêm trọng.

Tính cỡ mẫu

Độ dốc của $\log_e$ KST/máu theo thời gian (hằng số K) trên 196 bệnh nhân sốt rét người Việt được thu nhận vào một thử nghiệm lâm sàng trong khoảng thời gian 1996-2003^[11] có phân phối xấp xỉ log-chuẩn với độ dốc trung vị là 0,195/giờ và hệ số biến thiên là 0,55. Dựa trên những giả định này, 50 bệnh nhân trong mỗi nhóm điều trị sẽ tạo được độ mạnh thống kê 80% (i) để phát hiện một sự khác biệt 0,75 lần trong độ dốc trung bình nhân giữa hai nhóm điều trị bất kỳ, và (ii) cho thấy độ dốc ở một nhóm điều trị bất kỳ sẽ khác biệt có ý nghĩa với 0,195 nếu độ dốc thật sự ở nhóm ấy bằng hoặc nhỏ hơn 0,158. Để điều tiết tỉ lệ mất dấu theo dõi cực đại là 10%, cỡ mẫu được xác định là 165 bệnh nhân

để đạt được yêu cầu đánh giá kết cục chung cuộc trên 150 bệnh nhân.

Phân tích thống kê

Các số đo đáp ứng KST-học liên tục được tóm tắt bằng số trung vị (khoảng liên tứ phân, IQR) và được so sánh giữa các nhóm bằng test Kruskal-Wallis. Thời gian sạch KST và cắt sốt được tóm tắt bằng ước lượng Kaplan-Meier của trung vị và khoảng liên tứ phân, và được so sánh giữa các nhóm bằng test thứ hạng log. Nếu so sánh tổng thể giữa các nhóm có ý nghĩa, chúng tôi cũng thực hiện các so sánh từng cặp.

Theo hướng dẫn của WHO^[10], nguy cơ thất bại điều trị được tính theo phương pháp Kaplan-Meier trên tất cả bệnh nhân được ngẫu nhiên hóa, ngoài ra còn tính theo tỉ lệ trên nhóm bệnh nhân có bằng chứng thất bại hoặc đáp ứng KST và lâm sàng thỏa đáng (ACPR) hay phân nhóm tuân thủ đề cương. So sánh giữa các nhóm được thực hiện theo thứ tự, bằng test thứ hạng log và test Fisher chính xác.

Bảng 2: Tóm tắt các kết cục đánh giá chính và phụ theo nhóm điều trị (quần thể ITT).

Đặc trưng	Artesunat 2mg/kg (N=55)	Artesunat 4mg/kg (N=56)	DHA- Piperaquin (N=55)	So sánh chung (trị số p)
Hằng số thanh thải ("độ dốc") K [- $\log_e$ KST-máu/giờ] [§] - trung vị (IQR)	0,20(0,12; 0,27)	0,25(0,11; 0,39)	0,23(0,12; 0,33)	0,19
Thời gian bán thanh thải $T_{1/2}$ [giờ] - trung vị (IQR)	3,54(2,61; 5,88)	2,72(1,80,6,31)	2,98(2,10; 5,82)	0,19
Kết cục điều trị [chưa hiệu chỉnh PCR]				
- Thất bại điều trị sớm	2 (4%)	0 (0%)	0 (0%)	
- Thất bại lâm sàng muộn	1(2%) *	0 (0%)	0 (0%)	
- Thất bại KST-học muộn	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%) [£]	
- Rút lui hoặc mất dấu theo dõi	6 (11%)	10 (18%)	3 (5%)	
- Đáp ứng KST-học và lâm sàng thỏa đáng	46 (84%)	46 (82%)	51 (93%)	
Nguy cơ thất bại [chưa hiệu chỉnh PCR]				
- Phân tích Kaplan-Meier (ITT) [#]	6%	0%	2%	0,16
- Tỉ lệ ("tuân thủ đề cương")	3/49 (6%)	0/46 (0%)	1/52 (2%)	0,21
Nguy cơ thất bại [hiệu chỉnh PCR]				
- Phân tích Kaplan-Meier (ITT) [#]	6%	0%	0%	0,04 [*]
- Tỉ lệ ("tuân thủ đề cương")	3/49 (6%)	0/46 (0%)	0/51 (0%)	0,07
Thời gian sạch KST (PCT100)				
- trung vị (IQR) [giờ] [#]	60 (36; 78)	42 (30; 78)	48 (36; 72)	0,49
- Tỉ lệ có PCT>72 giờ [#]	0,27	0,27	0,22	-
Tỉ số giảm KST (%) [£]				
- ở 24 giờ – trung vị (IQR)	48 (5.282)	212 (11.2931)	113 (12.561)	0,02 [£]
- ở 48 giờ – trung vị (IQR)	3430 (151; ∞)	∞ (217; ∞)	∞ (435; ∞)	-
Thời gian cắt sốt [#]				
- trung vị (IQR) [giờ]	30 (18, 42)	24 (12,42)	24 (18,36)	0,86

Các số đo tóm tắt trong mỗi nhóm là số trung vị (khoảng liên tứ phân [IQR]) hoặc n (%).

^(§) Không thể ước lượng độ dốc cho 1 bệnh nhân dùng artesunat 4mg/kg, ^(*) PCR: tái phát sớm, ^(£) PCR: nhiễm mới, ^(#) ước lượng Kaplan-Meier,

^(£) Số liệu theo dõi KST trong máu ở 24 và 48 giờ bị thiếu được thay bằng 0 nếu bệnh nhân có bằng chứng sạch KST trước đó; sau phép gán này không còn số liệu khuyết. Các trị số vô cực (∞) tương ứng với bệnh nhân không có KST/máu ở 24 và 48 giờ.

^{*} So sánh từng cặp: artesunat 2mg/kg và artesunat 4mg/kg ($p=0,08$), artesunat 2mg/kg và DHA-Piperaquin ($p=0,07$).

[£] So sánh từng cặp: artesunat 2mg/kg và artesunat 4mg/kg ($p=0,01$), artesunat 2mg/kg và DHA-Piperaquin ($p=0,048$), artesunat 4mg/kg và DHA-Piperaquin ($p=0,27$).

NGHIÊN CỨU

Tất cả các kết cục đánh giá đều được báo cáo và so sánh trên quần thể có ý định điều trị (ITT) bao gồm tất cả những bệnh nhân được ngẫu nhiên hóa và trên quần thể tuân thủ đề cương đã loại những bệnh nhân rút lui hoặc mất dấu theo dõi trong 3 ngày đầu điều trị. Tất cả các phân tích đều được thực hiện với phần mềm thống kê R-2.14.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áo).

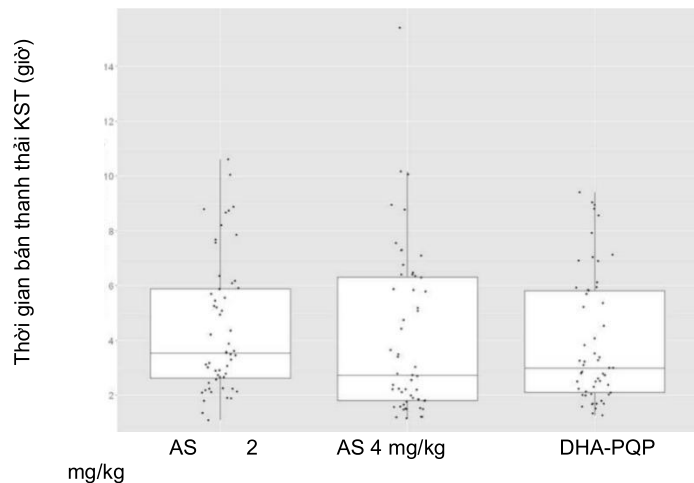
Kết quả

Việc sàng lọc và thu tuyển bệnh nhân sốt rét được mô tả trong Hình 1. Tỷ lệ bệnh nhân có phết máu dương tính trên tổng số đến khám tại trạm y tế là 514/6903 (7%). Đa số bệnh nhân được nhận vào nghiên cứu (155/166 = 93%) là người lớn. Lúc vào viện, 153/166 (92%) bệnh nhân đang sốt và nhiều bệnh nhân khác có triệu chứng đau đầu hoặc mệt, với bệnh sử có sốt. Mỗi nhóm điều trị có một bệnh nhân từ chối dùng thuốc sốt rét. Một bệnh nhân có *P.vivax* trên phết máu ngày 2 (nhánh AS 2mg/kg), một bệnh nhân đã cắt lách (nhánh AS 4mg/kg), và một đã điều trị với artesunat tĩnh mạch (nhánh AS 2mg/kg); cả 6 bệnh nhân này đều được loại ra khỏi quần thể tuân thủ đề cương. Có 3, 8 và 2 bệnh nhân khác, theo thứ tự ở các nhánh AS 2mg/kg, AS 4 mg/kg và DHA-PQP, rút lui khỏi nghiên cứu. Mất dấu theo dõi hoặc có *P.vivax* trên phết máu sau khi hoàn tất điều trị nhưng trước ngày 42. Do đó, số bệnh nhân hoàn thành kế hoạch theo dõi nghiên cứu trong ba nhánh điều trị nói trên lần lượt là 49, 46 và 52 người. Các đặc trưng của ba nhánh điều trị khi nhận vào nghiên cứu đều tương tự nhau (Bảng 1).

Các kết cục đánh giá về KST/máu và thời gian cắt sốt

Các kết cục được tóm tắt trong Bảng 2 (quần thể ITT). Thời gian bán thanh thải KST và thời gian sạch KST (PCT100) tương tự nhau giữa các nhóm điều trị (Hình 2 và 3). Đáng lưu ý là hơn 20% số bệnh nhân có PCT100 > 72 giờ ở cả ba nhóm. Trong phân tích hiệu chỉnh với PCR, không thấy thất bại điều trị ở các nhóm AS 4mg/kg và DHA-PQP so với 3 trường hợp (6%) thất bại điều trị ở bệnh nhân dùng AS 2mg/kg ($p=0,04$, so sánh tổng thể). Tương tự, tỉ số giảm KST sau 24 giờ tỏ ra thấp hơn một cách có ý nghĩa ở bệnh nhân dùng AS 2mg/kg ($p=0,02$).

Có 18 trên 166 (11%) bệnh nhân được phát hiện có giao bào trong máu ở một số thời điểm trong thời



Hình 2: Biểu đồ hộp thời gian bán thanh thải KST ở từng nhóm điều trị. Các chấm là trị số của từng bệnh nhân.

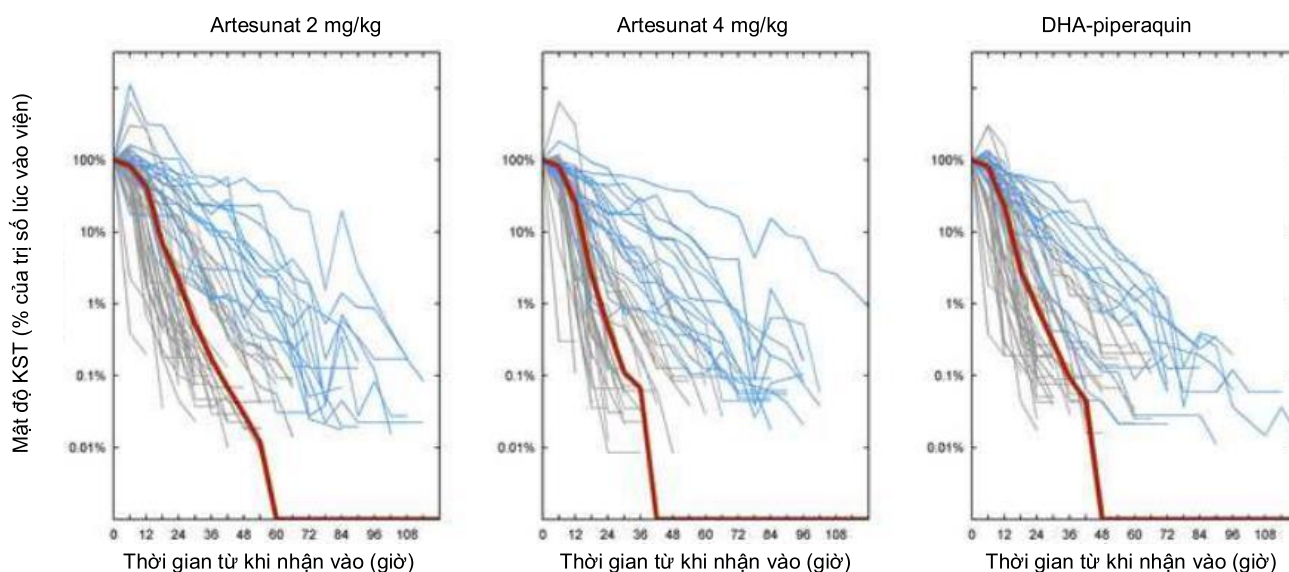
gian nghiên cứu: khi vào viện: 5 (9%) ở nhóm AS 2mg/kg, 6 (11%) ở nhóm AS 4mg/kg và 4 (7%) ở nhóm DHA-PQP, ở ngày 1 có 2 bệnh nhân (mỗi nhóm AS có 1 người), và ở ngày 7 có 1 bệnh nhân ở nhóm DHA-PQP. Thời gian sạch giao bào thay đổi từ 6 giờ đến 42 ngày. Thời gian cắt sốt tương tự nhau ở cả ba nhóm ($p=0,86$).

Biến cố bất lợi và biến cố bất lợi nghiêm trọng

Có 39 biến cố bất lợi được ghi nhận: 14 (25%) ở nhóm AS 2mg/kg, 12 (21%) ở nhóm AS 4mg/kg, và 13 (24%) ở nhóm DHA-PQP. Trong số biến cố này có 33 trường hợp bạch cầu thấp ($<5000/\mu\text{L}$). Tất cả bệnh nhân đều hồi phục một cách yên ổn sau 2 tuần.

Chỉ có 2 biến cố bất lợi nghiêm trọng được báo cáo: một bệnh nhân nam ở nhóm AS 4mg/kg được nhập viện vào ngày 21 vì sốt xuất huyết. Trường hợp thứ hai (AS 2mg/kg) là một thanh niên 24 tuổi có mật độ KST/máu khi nhận vào là $90.800/\mu\text{L}$; 6 giờ sau điểm số trên thang điểm hôn mê Glasgow (GCS) giảm còn 14/15 và KST/máu tăng lên $116.008/\mu\text{L}$. Bệnh nhân này được điều trị artesunat tĩnh mạch vì rối loạn tri giác. Thời gian sạch KST hoàn toàn (100%) của bệnh nhân là 60 giờ và trường hợp này coi như được rút ra khỏi nghiên cứu. Bệnh nhân hồi phục hoàn toàn và ra viện vào ngày 6 và được theo dõi đến ngày 42 mà không thấy biến chứng nào.

Có hai trường hợp thất bại điều trị sớm (ở nhóm AS 2m/kg). Cả hai bệnh nhân đều có phết máu dương tính vào ngày 3 (+72 giờ) và vẫn sốt. Khi kết thúc liệu trình, một bệnh nhân hồi phục hoàn toàn và bệnh nhân kia có thất bại KST-học muộn ở ngày 28 do tái phát sớm.



Hình 3: Đường cong thanh thải KST của tất cả 166 bệnh nhân nghiên cứu. Đường màu đỏ là thời gian thanh thải trung vị. Đường màu xanh là của bệnh nhân có thanh thải $<4 \log_{10}$ ở thời điểm 72 giờ

Bàn luận

Nghiên cứu này được thiết kế để nhận diện các trường hợp sốt rét do *P. falciparum* kháng-artemisinin ở các tỉnh phía nam Việt Nam vì có sự lo ngại rằng kháng artemisinin đã lan rộng ra ngoài miền tây Campuchia^[12]. Để đánh giá hiệu quả thật sự của artesunat – tách biệt tác dụng của những thuốc trong các phác đồ phối hợp artemisinin – các điều trị nghiên cứu trong thử nghiệm này trong 3 ngày đầu là artesunat đơn độc 2 mg/kg/ngày hoặc 4 mg/kg/ngày, tiếp theo là một liều DHA-PPQ để bảo đảm điều trị chống sốt rét tốt nhất cho bệnh nhân và phù hợp với các khuyến nghị của Chương trình Phòng chống Sốt rét Quốc gia của Việt Nam.

Kháng artemisinin thường được nhận diện bởi sự kéo dài thời gian sạch KST^[2] nhưng trong các nghiên cứu thực địa, việc xét nghiệm KST trong máu thường chỉ thực hiện khi nhận vào và ở ngày 2 và/hoặc ngày 3 và ngày 7, để đánh giá độ nhạy cảm in vivo đối với thuốc sốt rét. Xét nghiệm đếm KST/máu mỗi ngày một lần không cho phép đánh giá đúng thời gian sạch KST. Để mô tả chính xác hơn, trong nghiên cứu này các phết máu được lấy mỗi 6 giờ cho đến khi quan sát thấy hai phết máu âm tính liên tiếp. Thời gian sạch KST trung vị là 60 giờ (IQR: 36-78) với phác đồ AS 2mg/kg, 42 giờ (IQR: 30-78) với phác đồ 4 mg/kg, và 48 giờ (IQR: 36-72) với phác đồ DHA-PPQ ($p = 0,29$). Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu năm 2009 tại Wang Pha, tây Thái Lan, nơi thời gian sạch KST trung vị được báo cáo là 54 và 48 giờ, nhưng ngắn

hơn đáng kể so với kết quả ở Pailin, Campuchia, nơi thời gian sạch KST trung vị là 84 giờ (IQR: 54-96) với liều 2 mg/kg và 72 giờ (IQR: 60-96) với liều 4 mg/kg.^[1]

Một số đo khác được dùng để đánh giá sạch KST là tỉ số giảm KST (parasite reduction ratio, PRR). Trong nghiên cứu của chúng tôi, những số đo cho thấy sau 24 giờ 97,93% (AS 2mg/kg), 99,51% (AS 4mg/kg), và 99,12% (DHA-PQP) số KST được thanh thải khỏi máu. Kết quả này tương ứng với mức giảm 10^2 lần sau 24 giờ và giảm $>10^4$ lần sau 48 giờ (Bảng 2). Các trị số PRR này tương tự như đã thấy ở Wang Pha, tây Thái Lan, và gợi ý một tốc độ thanh thải KST nhanh hơn khoảng một bậc số mũ so với kết quả được báo cáo từ Pailin, Campuchia.^[1]

Gần đây, độ dốc của mức giảm log KST/máu qua thời gian (hoặc một khái niệm tương đương là thời gian bán thanh thải KST hay $T_{1/2}$) đã được đề nghị như là một số đo thiết thực và nhạy nhất để nghiên cứu tác dụng của thuốc sốt rét^[9] và vì vậy nó được dùng làm kết cục đánh giá chính trong nghiên cứu này. $T_{1/2}$ trung vị ở ba nhóm nghiên cứu là 3,54, 2,74, và 2,98 giờ và không có sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nhóm. So với kết quả của Dondorp và cs. (2009)^[1], $T_{1/2}$ trong nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tác như kết quả đã thấy tại Wang Pha, tây Thái Lan (4 và 3 giờ) và thấp hơn nhiều so với kết quả tại Pailin (11 và 9 giờ) năm 2009. Vì điều trị artemisinin làm sạch KST nhanh, phần lớn bệnh nhân dự kiến sẽ sạch KST trong máu

NGHIÊN CỨU

Bảng 3: Thời gian sạch KST (PCT100) trong các nghiên cứu năm 2000-2009 ở Việt Nam

Thanh NV và cs, 2010)	1998 (Artemisinin 5 ngày) N=65	2001 (Artemisinin 7 ngày) N=69	2004/2005 (Artesunat 7 ngày) N=82	2008/2009 (Artesunat 7 ngày) N=54
Thời gian sạch KST				
- Trung vị (ĐLC) [ngày]	1,8 ± 0,9	2,3 ± 0,9	2,1 ± 0,7	1,6 ± 0,7
KST/máu dương tính				
- Ngày 3 – n (%)	4 (6%)	6 (9%)	3 (4%)	1 (2%)
- Ngày 4 – n (%)	0	0	0	0

(Hien TT, 2004)	Artesunat 1 ngày (4mg/kg) + mefloquin ở ngày 3 (N=70)	Artesunat 3 ngày (4, 2, 2 mg/kg) + mefloquin ở ngày 3 (N=73)
Thời gian sạch KST		
- Trung vị (giới hạn) [giờ]	48,2 (40,6-55,9)	44,5 (37,7-51,4)

ngoại biên vào ngày 3 (72 giờ) sau khi bắt đầu điều trị. Vì thế, tỉ lệ phết máu dương tính vào ngày 3 được đề nghị dùng làm công cụ đánh giá mức đề kháng artemisinin trong quần thể. Số liệu từ hơn 19.000 trường hợp sốt rét cấp tính do *P. falciparum* gợi ý rằng kháng artemisinin rất ít khả năng xảy ra nếu tỉ lệ bệnh nhân có phết máu dương tính vào ngày 3 (72 giờ) <3% trong số bệnh nhân có mật độ KST <100.000/μL khi nhận vào^[13]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỉ lệ bệnh nhân có thời gian sạch KST >72 giờ là >20% ở cả ba nhánh nghiên cứu, cho thấy một nhu cầu cấp bách cần có thêm thông tin. Ngoài mật độ KST/máu khi vào viện, còn có những yếu tố khác ảnh hưởng đến sự thanh thải KST như tuổi, tình trạng miễn dịch cá nhân, loại thuốc sốt rét được dùng (tính chất dược động học và dược lực học), và độc lực KST. Những yếu tố này khó có thể khảo sát trong nghiên cứu thực địa. Trong nghiên cứu này, bệnh nhân cũng được lấy các mẫu máu để khảo sát dược động học và di truyền học KST, những kết quả ấy sẽ được báo cáo riêng.

Dữ liệu thanh thải KST trước đây từ hai nghiên cứu tương tự ở các tỉnh phía nam Việt Nam được tóm tắt trong Bảng 3. Một thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên đối chứng được thực hiện năm 2001-2002 tại Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam, cho thấy bệnh nhân có các tiêu chí thu nhận tương tự như nghiên cứu này (KST/máu >10.000/μL và <100.000/μL) và được điều trị với artesunat (liều duy nhất 4 mg/kg) so với artesunat (4 mg/kg ở ngày 1, 2 mg/kg ở ngày 2 và 3), cả hai đều phối hợp với mefloquin 15 mg/kg ở ngày 3 so với mefloquin liều duy nhất 15 mg/kg. Trong nghiên cứu ấy, thời gian sạch KST trung bình (khoảng dao động) là 48,2 (40,6-55,9) giờ ở nhóm AS 2 mg/kg

và 44,5 (37,7-51,4) giờ ở nhóm AS 4 mg/kg, và không có bệnh nhân nào có phết máu dương tính ở thời điểm 72 giờ^[14]. Một tổng quan dữ liệu nghiên cứu ở Việt Nam từ 1998 đến 2009 cũng báo cáo một tỉ lệ dương tính rất thấp của phết máu ngày 3 trên bệnh nhân dùng artemisinin (6% năm 1998 và 9% năm 2001) hoặc artesunat (4% năm 2004/2005 và 2% năm 2008/2009)^[15]. Do đó, nghiên cứu hiện tại của chúng tôi gợi ý một sự gia tăng gần đây trong tỉ lệ phết máu dương tính ngày 3 trên bệnh nhân sốt rét do *P. falciparum* được điều trị artesunat dạng uống ở phía nam Việt Nam.

Nghiên cứu này không được thiết kế để so sánh hiệu quả tổng thể của ba nhóm điều trị. Chúng tôi nhận thấy thời gian bán thanh thải dài hơn ở nhóm AS 2mg/kg nhưng so sánh kết cục chính giữa các nhóm điều trị không đạt mức ý nghĩa thống kê. Tuy vậy, nhóm AS 2mg/kg có nguy cơ thất bại điều trị (sau hiệu chỉnh PCR) cao hơn một cách có ý nghĩa và tỉ số giảm KST 24 giờ thấp hơn. Có thể giải thích điều này bằng tác dụng diệt KST thấp hơn của liều AS thấp, có khả năng làm tăng tỉ lệ KST chuyển sang “thể ngủ”.^[16]

Ý nghĩa của nghiên cứu này đối với công tác phòng chống sốt rét ở Việt Nam là chúng ta phải bắt đầu xem xét phải chăng phối hợp đầu tay (DHA-PQP) là lựa chọn tối ưu để điều trị sốt rét do *P. falciparum* ở Việt Nam. Ở biên giới Thái Lan-Myanmar, 10–20% số bệnh nhân được điều trị với các phác đồ artemisinin phối hợp vẫn còn KST trong máu sau 3 ngày điều trị^[17], khi đối chiếu với tỉ lệ >20% số bệnh nhân có phết máu dương tính ở ngày 3 trong nghiên cứu này, buộc chúng ta phải lo ngại về sự lan rộng của kháng artemisinin về mặt địa lý. Việc đánh giá mức thanh thải KST bằng cách thường xuyên xét nghiệm đếm KST trong nghiên

cứu này cho phép mô tả chi tiết các đáp ứng điều trị và cho thấy rằng có lẽ liều artesunate 2mg/kg không đạt được tác dụng diệt KST cực đại. Tuy nhiên, nhìn chung đáp ứng với phác đồ artemisinin phối hợp đang được khuyến dùng vẫn thỏa đáng. Rõ ràng cần có sự theo dõi sát hơn nữa^[12] để đánh giá xem đây có phải là sự trỗi dậy của kháng artemisinin hay không. Tuy vậy, hiện tại Chương trình Phòng chống Sốt rét ở Việt Nam vẫn sử dụng phối hợp dihydroartemisinin-piperaquin vì không có thuốc sốt rét thay thế nào tỏ ra tốt, khả dụng với chi phí phải chăng như thế.

Kết luận

Vì nghiên cứu sốt rét hiện nay có tầm quan trọng trong việc cung cấp thông tin cho các chiến lược thanh toán sốt rét toàn cầu, chúng ta phải tiếp tục theo dõi nhiều khu vực trên thế giới về tiềm năng kháng artemisinin xuất hiện và lan rộng, vì các phác đồ phối hợp có artemisinin nhiều khả năng là công cụ chủ chốt giúp đạt được và duy trì kết quả giảm số ca bệnh trên toàn cầu^[18]. Nếu kháng artemisinin lan rộng ở khu vực này, đòi hỏi phải có những chiến lược mới và kỹ thuật mới để quản lý và ngăn chặn kháng thuốc^[19, 20] nhằm giữ vững những thành tựu đã đạt được trong 10 năm qua.^[21, 22]

Cảm tạ: Nghiên cứu này được thực hiện trong nỗ lực hợp tác giữa Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới và Trung tâm Y học Nhiệt đới của Đại học Oxford, được Wellcome Trust hỗ trợ. Chúng tôi xin cảm ơn các ban giám đốc và nhân viên của Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới, Bệnh viện Phước Long, Trạm Y tế Bù Gia Mập, Trung tâm Phòng chống Sốt rét tỉnh Bình Phước, và Viện SR-KST-CT TP. Hồ Chí Minh, đặc biệt là các bác sĩ Lê Thanh Đồng, Trần Văn Chung, Vũ Ngọc Tâm, và Tổ chức Y tế Thế giới, Geneva, Thụy Sĩ, đã tài trợ cho nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

1. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med*. 2009 Jul 30;361(5):455-67.
2. Noedl H, Socheat D, Satimai W. Artemisinin-resistant malaria in Asia. *N Engl J Med*. 2009 Jul 30;361(5):540-1.
3. Rogers WO, Sem R, Tero T, Chim P, Lim P, Muth S, et al. Failure of artesunate-mefloquine combination therapy for uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in southern Cambodia. *Malar J*. 2009;8:10.
4. Carrara VI, Zwang J, Ashley EA, Price RN, Stepniewska K, Barends M, et al. Changes in the treatment responses to artesunate-mefloquine on the northwestern border of Thailand during 13 years of continuous deployment. *PLoS One*. 2009; 4(2):e4551.
5. Phyo APN, Standwell J, Stepniewska K, Ashley, Elizabeth

- A; Nair, Shalini; McGready, Rose; Moo, Carit ler; Al-Saai, Salma; Dondorp AML, Khin Maung; Singhasivanon, Pratap; Day, Nicholas P J; White, Nicholas J; Anderson, Tim J C; Nosten, François. Emergence of artemisinin-resistant malaria on the western border of Thailand: a longitudinal study. *The Lancet*. 2012 April 5, 2012(April 5, 2012).
6. Berczky S, Martensson A, Gil JP, Farnert A. Short report: Rapid DNA extraction from archive blood spots on filter paper for genotyping of *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg*. 2005 Mar;72(3):249-51.
7. Moll K, Ljungström I, Perlmann H, Scherf A, Wahlgren M. Methods in malaria research.: MR4/ATCC (Manassas, Virginia and Bio Mal Par (Paris, France); 2008.
8. WHO. Methods and techniques for clinical trials on antimalarial drug efficacy: genotyping to identify parasite populations: informal consultation organized by the Medicines for Malaria Venture and cosponsored by the World Health Organization, 29-31 May 2007, Amsterdam, The Netherlands. http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596305_eng.pdf; 2007.
9. Flegg JA, Guerin PJ, White NJ, Stepniewska K. Standardizing the measurement of parasite clearance in falciparum malaria: the parasite clearance estimator. *Malar J*. 2011;10:339.
10. WHO. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241597531_eng.pdf. 2009.
11. Phu NH, Tuan PQ, Day N, Mai NT, Chau TT, Chuong LV, et al. Randomized controlled trial of artesunate or artemether in Vietnamese adults with severe falciparum malaria. *Malar J*. 2010;9:97.
12. WHO. Global plan for artemisinin resistance containment (GPARC). http://www.who.int/malaria/publications/atoz/artemisinin_resistance_containment_2011.pdf. 2010b
13. Stepniewska K, Ashley E, Lee SJ, Anstey N, Barnes KI, Binh TQ, et al. In vivo parasitological measures of artemisinin susceptibility. *J Infect Dis*. 2010 Feb 15;201(4):570-9.
14. Hien T. Anti-malarial drug treatment in Vietnam: Open University UK; 2004.
15. Thanh NV, Toan TQ, Cowman AF, Casey GJ, Phuc BQ, Tien NT, et al. Monitoring for *Plasmodium falciparum* drug resistance to artemisinin and artesunate in Binh Phuoc Province, Vietnam: 1998-2009. *Malar J*. 2010;9:181.
16. Teuscher F, Gatton ML, Chen N, Peters J, Kyle DE, Cheng Q. Artemisinin-induced dormancy in *Plasmodium falciparum*: duration, recovery rates, and implications in treatment failure. *J Infect Dis*. 2010 Nov 1;202(9):1362-8.
17. WHO. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241500470_eng.pdf. 2010 ed; 2010a
18. WHO. World malaria report 2011. http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/9789241564403_eng.pdf. 2011
19. Boni MF, Smith DL, Laxminarayan R. Benefits of using multiple first-line therapies against malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 16;105(37):14216-21.
20. Hastings I. How artemisinin-containing combination therapies slow the spread of antimalarial drug resistance. *Trends Parasitol*. 2011 Feb;27(2):67-72.
21. Editorial. New estimates of malaria deaths: concern and opportunity. *Lancet*. 2012 Feb 4;379(9814):385.
22. Murray CJ, Rosenfeld LC, Lim SS, Andrews KG, Foreman KJ, Haring D, et al. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet*. 2012 Feb 4; 379(9814): 413-31.