

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH TỈ LỆ NHIỄM KÍ SINH TRÙNG SỐT RÉT BẰNG KỸ THUẬT MULTIPLEX PCR Ở MỘT SỐ ĐƠN VỊ QUÂN ĐỘI, TẠI TỈNH GIA LAI

ThS. NGUYỄN VĂN THANH, BSCKII. NGUYỄN ĐỨC MẠNH
ThS. PHAN TÂN DẦN, BSCKII. PHẠM XUÂN VINH
BS. TRỊNH XUÂN PHÚ, BS. NGUYỄN XUÂN TIẾN
KTV. NGUYỄN THỊ HỒNG VÂN
Viện Y học dự phòng Quân đội

Phản biện khoa học: TS. NGUYỄN CHÍNH PHONG
Trường Phòng Vệ sinh phòng dịch, Cục Quân y

TÓM TẮT: Nghiên cứu cắt ngang tình hình sốt rét ở 1.218 cán bộ, chiến sĩ các đơn vị đóng quân trên địa bàn các huyện Chư Pưh, Chư Sê, Chư Prông, Đức Cơ và Ia Grai, tỉnh Gia Lai, từ tháng 12/2016-1/2017 (trong đó có 1.000 người thuộc Đơn vị bộ binh E. và 218 người thuộc các đơn vị bộ đội biên phòng tỉnh). **Kết quả:** Bằng kỹ thuật Multiplex PCR, đã xác định tỉ lệ nhiễm kí sinh trùng sốt rét là 0,99% (12/1.218 người), trong đó chỉ có 1 trường hợp biểu hiện lâm sàng nghi ngờ sốt rét, song test chẩn đoán nhanh âm tính. Tỉ lệ bộ đội Đơn vị E. và bộ đội biên phòng nhiễm kí sinh trùng sốt rét lần lượt là 0,80% (8/1.000 người) và 1,83% (4/218 người). Trong số 12 mẫu dương tính với kí sinh trùng sốt rét, tỉ lệ nhiễm *P. falciparum* là 50% (6/12 người), nhiễm *P. vivax* là 41,70% (5/12 người), nhiễm phối hợp *P. falciparum* + *P. vivax* là 8,33% (1/12 người). Nhóm bộ đội hoạt động dã ngoại (vào rừng) có tỉ lệ nhiễm kí sinh trùng sốt rét cao hơn nhóm không vào rừng, tương ứng là 2,03% so với 0,78%.

Từ khóa: Sốt rét, nghiên cứu cắt ngang, multiplex PCR, tỉnh Gia Lai.

ABSTRACT: A cross-sectional study was carried on 1,218 subjects (1,000 army soldiers of infantry E. unit and 218 border guardsmen) who were working in Chu-Puh, Chu-Se, Chu-Prong, Duc-Co and Ia-Grai districts, Gia Lai province, from December 2016 to January 2017, in order to identify the prevalence of malarial plasmodium infection. **Results:** Multiplex PCR tests showed a low prevalence of plasmodium spp infection, at 0.99% (12/1,218). However, there was only 01 suspected clinical case with RDTs(-). Prevalences of plasmodium spp infection among E. unit and border guardsmen were 0.8% (8/1,000) and 1.83% (4/218), respectively. Of those 12 PCR(+) samples, *P. falciparum* accounted for 50% (6/12), *P. vivax* accounted for 41.70% (5/12), and 8.33% (1/12) was mixed infection with *P. falciparum* and *P. vivax*. Prevalences of plasmodium infection among soldiers who worked in the forest (2.03%) was significantly higher than those who did not work in the forest (0.78%).

Keywords: Cross-sectional study, Malaria, Multiplex PCR, Gia Lai province.

Chịu trách nhiệm nội dung: ThS. Nguyễn Văn Thanh, Email: drthanh1981@gmail.com

Ngày nhận bài: 20/9/2019; mời phản biện khoa học: 30/9/2019; chấp nhận đăng: 15/12/2019.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Ở Việt Nam, bệnh sốt rét hiện phân bố chủ yếu ở các tỉnh Tây Nguyên, ven biển miền Trung và Đông Nam Bộ. Bệnh xảy ra chủ yếu ở những người thuộc dân tộc ít người, người dân di - biến động và những người đi rừng, ngủ rẫy [5]. *Plasmodium falciparum* và *Plasmodium vivax* là hai loài kí sinh trùng sốt rét (KSTSR) phổ biến.

Gia Lai là một trong 5 tỉnh miền Trung - Tây Nguyên có tỉ lệ sốt rét lưu hành cao nhất trên cả nước. Theo báo của Trung tâm Phòng chống sốt rét - kí sinh trùng - côn trùng Gia Lai, năm 2015, toàn tỉnh có 2.215 trường hợp mắc KSTSR, trong đó có 941 trường hợp nhiễm *P. falciparum* (chiếm 42,5%) và 1.237 trường hợp nhiễm *P. vivax* (chiếm 55,8%).

Trước đây, việc phát hiện KSTSR chủ yếu dựa vào hai kĩ thuật là kính hiển vi và test chẩn đoán nhanh (RDTs - Rapid diagnostic tests). Tuy nhiên, những kĩ thuật này chỉ có thể phát hiện KSTSR với mật độ trên 50 KSTSR/ μ L máu [3]. Hiện nay, các phương pháp chẩn đoán sinh học phân tử ngày càng được áp dụng rộng rãi, đặc biệt ở những khu vực tiến tới loại trừ sốt rét. Theo nghiên cứu của Padley và cộng sự (2003), kĩ thuật Multiplex PCR có thể phát hiện KSTSR ở mật độ rất thấp (0,02-0,05 KSTSR/ μ L máu đối với *P. falciparum*; 0,004 KSTSR/ μ L máu đối với *P. ovale* [8]). Các đơn vị quân đội đóng quân trên địa bàn tỉnh Gia Lai thường có các hoạt động dài ngày tại vùng có nguy cơ mắc sốt rét cao, đặc biệt lực lượng bộ đội biên phòng (BĐBP) tỉnh thường xuyên tuần tra dọc biên giới Việt Nam - Campuchia (thuộc dãy Tây Trường Sơn).

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm xác định tỉ lệ nhiễm KSTSR bằng PCR tại một số đơn vị quân đội đóng quân trên địa bàn tỉnh Gia Lai.

2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

1.218 cán bộ, chiến sĩ (sau đây gọi tắt là đối tượng nghiên cứu - ĐTNC) đang công tác tại Đơn vị bộ binh E., Sư đoàn 10, Quân đoàn 3 (1.000 người) và các đơn vị Bộ đội biên phòng tỉnh (218 người), đóng quân trên địa bàn các huyện Chư Pưh, Chư Sê, Chư Prông, Đức Cơ, Ia Grai, tỉnh Gia Lai, từ tháng 12/2016 đến tháng 01/2017.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu cắt ngang.
- Cỡ mẫu: toàn bộ cán bộ, chiến sĩ có mặt tại các đơn vị ở thời điểm nghiên cứu.
- Kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu:
 - + Thu thập số liệu và mẫu máu xét nghiệm: thu thập thông tin về một số đặc điểm của ĐTNC. Lấy 1 giọt máu từ đầu ngón tay làm test chẩn đoán nhanh phát hiện nhiễm KSTSR. Lấy 2 giọt máu lên giấy thấm Whatman 3 MM để phân tích PCR.
 - + Test chẩn đoán nhanh (RDTs) phát hiện nhiễm KSTSR: sử dụng test SD Bioline Malaria Ag Pf/Pv chứa kháng thể kháng lại kháng nguyên HRP2 (histidine-rich protein type 2) đặc hiệu với *P. falciparum* và kháng lại men pLDH (lactate dehydrogenase) đặc hiệu với *P. vivax*. Test có độ nhạy 95% với *P. falciparum* là 50 KSTSR/ μ L, *P. vivax* là 200 KSTSR/ μ L.
 - + Phương pháp sinh học phân tử: DNA KSTSR được tách chiết từ 6 mm giấy thấm máu khô bằng bộ sinh phẩm của hãng QIAGEN (Hoa Kỳ). Kỹ thuật Multiplex PCR thực hiện trên máy PCR Mastercycler (Eppendorf, Hoa Kỳ), với độ nhạy chứng dương PCR của *P. falciparum* nuôi cấy D6 và K1 là 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} (25; 2,5; 0,25 KSTSR/ μ L).

- Xử lý số liệu: bằng thuật toán thống kê y học.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.

3.1. Đặc điểm ĐTNC (n = 1.218):

Bảng 1. Đặc điểm chung của ĐTNC

Đặc điểm		Số ĐTNC	Tỉ lệ
Giới tính	Nam	1.210	99,3%
	Nữ	8	0,7%
Tuổi	18-25	1.023	84,0%
	26-57	195	16,0%
Dân tộc	Kinh	671	55,1%
	ít người	547	44,9%
Đi dã ngoại (vào rừng)	Có	197	16,2%
	Không	1021	83,8%

ĐTNC là các cán bộ, chiến sĩ ở đơn vị, do đó chủ yếu là nam giới (chiếm 99,3%) và phần lớn là

chiến sĩ (từ 18-25 tuổi, chiếm 84%). Tỉ lệ ĐTNC thuộc các dân tộc ít người chiếm đa số (44,9%) và có đến 197/218 ĐTNC là BDBP thường xuyên hoạt động trong rừng.

3.2. Kết quả xét nghiệm KSTSR:

Bảng 2. Kết quả phát hiện KSTSR bằng 2 phương pháp

Nhóm ĐTNC	Multiplex PCR		RDTs		p
	Số mẫu	Số mẫu (+)	Số mẫu	Số mẫu (+)	
Đơn vị E	1.000	8 (0,80%)	1.000	0	> 0,05
BDBP	218	4 (1,83%)	218	0	
Tổng	1.218	12 (0,99%)	1.218	0	

Xét nghiệm 1.218 người bằng RDTs cho kết quả 100% âm tính. Tuy nhiên, sử dụng kỹ thuật Multiplex PCR phát hiện 12 trường hợp nhiễm KSTSR chiếm tỉ lệ 0,99%. Tỉ lệ BDBP nhiễm KSTSR là 1,83%, cao hơn so với Đơn vị E. (tỉ lệ nhiễm KSTSR là 0,80%), sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

Bảng 3. Phân bố tỉ lệ nhiễm KSTSR theo vị trí đóng quân.

Vị trí đóng quân		Multiplex PCR		p
		Số mẫu	Số mẫu (+)	
Đơn vị E.	Chư Pưh	600	8 (1,33%)	> 0,05
	Chư Sê	400	0	
BDBP	Chư Prông	96	1 (1,04%)	
	Đức Cơ	104	3 (2,88%)	
	Ia Grai	18	0	

Tỉ lệ nhiễm KSTSR cao nhất ở BDBP đóng quân trên địa bàn huyện Đức Cơ (2,88%) và thấp nhất là ĐTNC thuộc Đơn vị E đóng quân trên địa bàn huyện Chư Sê (0%); sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

- Cơ cấu nhiễm KSTSR (trên Multiplex PCR):

Bảng 4. Cơ cấu nhiễm KSTSR (n = 12).

Loài KSTSR	Đơn vị E.	BDBP	Tổng
<i>P. falciparum</i>	5 (62,5%)	1 (25,0%)	6 (50,0%)
<i>P. vivax</i>	2 (25,0%)	3 (75,0%)	5 (41,7%)
<i>P. falciparum</i> + <i>P. vivax</i>	1 (12,5%)	0	1 (8,3%)
Tổng	8 (100%)	4 (100%)	12 (100%)

Trong 12 mẫu dương tính với KSTSR, thấy 50% nhiễm *P. falciparum*, 41,7% nhiễm *P. vivax*, chỉ 1 trường hợp (8,3%) nhiễm phối hợp *P. vivax* và *P. falciparum*.

Các trường hợp nhiễm KSTSR ở Đơn vị E. chủ yếu là *P. falciparum* (62,5%) trong khi ở BDBP chủ yếu là nhiễm *P. vivax* (75%).

3.3. Mối liên quan giữa nhiễm KSTSR với một số đặc điểm của ĐTNC:

Bảng 5. Mối liên quan giữa tỉ lệ nhiễm KSTSR với một số đặc điểm của ĐTNC.

Yếu tố liên quan		ĐTNC (n = 1.218)	KSTSR		p
			(+)	(-)	
Tuổi	18-25	1.023	8 (0,78%)	1.015 (99,22%)	> 0,05
	26-57	195	4 (2,05%)	191 (97,95%)	
Dân tộc	Kinh	671	7 (1,04%)	664 (98,96%)	> 0,05
	ít người	547	5 (0,91%)	542 (99,09%)	
Vào rừng	Có	197	4 (2,03%)	193 (97,97%)	> 0,05
	Không	1021	8 (0,78%)	1.013 (99,22%)	

Tỉ lệ nhiễm KSTSR phát hiện bằng Multiplex PCR ở nhóm từ 26-57 tuổi là 2,05%, cao hơn ở nhóm từ 18-25 tuổi (0,78%). Tỉ lệ nhiễm KSTSR ở nhóm dân tộc Kinh là 1,04%, cao hơn ở nhóm dân tộc ít người (0,91%). Tuy nhiên, không có mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa tỉ lệ nhiễm KSTSR với đặc điểm nhóm ĐTNC, $p > 0,05$.

Tỉ lệ nhiễm KSTSR ở những ĐTNC từng vào rừng trong vòng 14 ngày tại thời điểm khảo sát là 2,03% (4/197 người), cao hơn so với những người không vào rừng (0,78%). Tuy nhiên, không có mối liên quan có ý nghĩa thống kê giữa vào rừng và nhiễm KSTSR, với $p > 0,05$. Trong số 12 trường hợp nhiễm KSTSR phát hiện bằng Multiplex PCR, chỉ có 1 trường hợp có các triệu chứng sốt, rét run, vã mồ hôi trong vòng 14 ngày trước thời điểm điều tra.

4. BÀN LUẬN.

Trong số 1.218 mẫu nghiên cứu bằng kỹ thuật Multiplex PCR, phát hiện 12 mẫu dương tính với KSTSR (0,99%) và không trường hợp nào phát hiện dương tính bằng RDTs. Điều này cho thấy tỉ lệ nhiễm KSTSR không triệu chứng tiềm ẩn trong cộng đồng chỉ được phát hiện bằng kỹ thuật xét nghiệm có độ nhạy và độ đặc hiệu cao (như PCR). Tỉ lệ BDBP nhiễm KSTSR là 1,83%, cao hơn so với Đơn vị E. (tỉ lệ nhiễm là 0,80%). Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy tỉ lệ nhiễm KSTSR đã giảm nhiều so với những nghiên cứu trước đây, như nghiên cứu của Nguyễn Hồng Vân (2004) tại miền Trung - Tây Nguyên, phát hiện 29,1% (671/2.303 người) [12], hay Phạm Vinh Thanh (2015) phát hiện 22,6% [10]. Đồng thời, kết quả của chúng tôi cũng thấp hơn các nghiên cứu tại Thái Lan năm 2012 (1,9% nhiễm

[4]), Campuchia năm 2017 (9,1% trường hợp nhiễm, phát hiện bằng PCR [11]). Chúng tôi cho rằng, ở Việt Nam, Chương trình phòng chống sốt rét đã đạt được những thành tựu đáng kể, với số người mắc và tử vong do sốt rét giảm liên tục qua các năm, vùng sốt rét lưu hành thu hẹp lại. Ngoài ra, chương trình phòng chống sốt rét trong quân đội cũng được tăng cường, như công tác tuyên truyền, tập huấn các biện pháp dự phòng và điều trị bệnh sốt rét, uống thuốc dự phòng bằng Doxycyclin, dùng chất xua muỗi cho bộ đội khi vào rừng, ngủ màn phòng muỗi đốt là bắt buộc đối với mỗi quân nhân, đặc biệt sử dụng màn tẩm hóa chất ở những vùng có sốt rét lưu hành.

Từ năm 2013-2015, cơ cấu KSTSR giữa *P. falciparum* và *P. vivax* cho thấy có xu hướng thay đổi và “đảo cực”, rõ nhất tại Thái Lan, Bhutan, Myanmar, Campuchia [14]. Tại Việt Nam, cơ cấu KSTSR cũng đi theo chiều hướng đó từ năm 2010-2015, tỉ lệ *P. vivax* có xu hướng “đảo cực”, tiến gần đến tương đương, thậm chí cao hơn *P. falciparum* tại một số vùng sốt rét lưu hành, tùy theo từng năm [13]. Trong số những trường hợp dương tính KSTSR của chúng tôi, có 6 trường hợp nhiễm *P. falciparum* (50%), 5 trường hợp nhiễm *P. vivax* (41,7%) và 1 trường hợp nhiễm phối hợp *P. falciparum* + *P. vivax* (8,3%). Tỉ lệ này phù hợp với cơ cấu loài KSTSR của cả nước được báo cáo năm 2016 (*P. falciparum* 55,83% và *P. vivax* 42,06% [7]).

So sánh về cơ cấu loài KSTSR trên 2 nhóm ĐTNC, thấy BDBP đóng quân trên địa bàn các huyện Chư Prông, Đức Cơ, Ia Grai giáp biên giới Campuchia, chạy dọc theo dãy Tây Trường Sơn có tỉ lệ nhiễm *P. vivax* cao (75%). Trong khi đó, Đơn vị E. hoạt động chủ yếu ở khu vực thuộc huyện Chư Sê và Chư Pưh, nằm giữa 2 dãy Đông Trường Sơn và Tây Trường Sơn, có tỉ lệ *P. falciparum* (62,5%) cao hơn *P. vivax* (25%). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu gần đây (thấy sự thay đổi về cơ cấu loài KSTSR những vùng dọc biên giới Việt Nam - Campuchia, có tỉ lệ *P. vivax* cao [11], [14]). Điều này có thể do một dòng sốt rét ngoại lai từ Campuchia sang Việt Nam cần được nghiên cứu thêm.

Tỉ lệ nhiễm KSTSR trong nhóm từ 26-57 tuổi là 2,05%, cao hơn nhóm từ 18-25 tuổi (nhiễm 0,78%); sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Có thể do sự phân bố của các nhóm tuổi không được tương đồng nên kết quả chưa phản ánh đúng tình trạng nhiễm KSTSR theo tuổi. Phân nhóm tuổi 18-25 tuổi là độ tuổi được gọi đi nghĩa vụ quân sự, có thể hoạt động trong vùng sốt rét lưu hành ít hơn, 26-57 tuổi là bộ đội đã sống lâu năm trong vùng sốt rét lưu hành. Tỉ lệ nhiễm KSTSR ở nhóm dân tộc Kinh (1,04%) cao hơn ở nhóm dân tộc ít người (tỉ lệ nhiễm 0,91%). Trong

12 trường hợp phát hiện nhiễm KSTSR, chỉ duy nhất 1 trường hợp có biểu hiện lâm sàng nghi đến bệnh sốt rét, tuy nhiên RDTs âm tính với sốt rét. Nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với các nghiên cứu trước đây đã chứng tỏ rằng tỉ lệ nhiễm KSTSR không triệu chứng tăng lên theo lứa tuổi. Điều này cho thấy miễn dịch thu được ở những người đã sống lâu năm trong vùng sốt rét lưu hành có vai trò làm giảm các triệu chứng bệnh sốt rét khi bị nhiễm KSTSR [6], [9], [12].

Tỉ lệ nhiễm KSTSR của ĐTNK đã từng vào rừng trong vòng 14 ngày tại thời điểm khảo sát là 2,03% (4/197 người), cao hơn so với những người không vào rừng (0,78%). Điều này cũng đã được chứng minh ở nhiều nghiên cứu trước đây [1], [10]. BĐBP thường xuyên vào rừng, tuần tra dọc biên giới Việt Nam - Campuchia (tỉ lệ nhiễm KSTSR nhóm này là 1,83%). Trong khi tại Đơn vị E. được điều tra nằm trên địa bàn huyện Chư Pưh và Chư Sê hoạt động ở những vùng đồi núi ít nguy cơ mắc sốt rét hơn, do đó tỉ lệ nhiễm KSTSR cũng thấp (0,80%).

5. KẾT LUẬN.

Sử dụng kĩ thuật Multiplex PCR để phát hiện KSTSR trên 1.218 người (1.000 cán bộ, chiến sĩ thuộc Đơn vị bộ binh E., Quân đoàn 3 và 218 cán bộ, chiến sĩ Bộ đội biên phòng tỉnh, đóng quân trên địa bàn các huyện Chư Pưh, Chư Sê, Chư Prông, Đức Cơ và Ia Grai, tỉnh Gia Lai), từ tháng 12/2016 đến tháng 01/2017, chúng tôi thấy:

- Kĩ thuật Multiplex PCR giúp phát hiện KSTSR ở những trường hợp không triệu chứng và không được phát hiện bằng RDTs: tỉ lệ nhiễm KSTSR trên 1.218 người âm tính với RDTs là 0,99%. Trong đó, chỉ có 1 người có triệu chứng lâm sàng bệnh sốt rét.

- Tỉ lệ nhiễm KSTSR ở BĐBP là 1,83%, cao hơn so với ở Đơn vị E. (tỉ lệ nhiễm 0,80%). Cơ cấu KSTSR là: *P. falciparum* chiếm 50% (6/12), *P. vivax* chiếm 41,7% (5/12) và nhiễm phối hợp *P. falciparum* + *P. vivax* chiếm 8,3% (1/12).

- Nhóm bộ đội hoạt động dã ngoại (vào rừng) có tỉ lệ nhiễm KSTSR cao hơn nhóm ở tại đơn vị, tương ứng là 2,03% so với 0,78 %.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoàng Hà (2014), *Nghiên cứu thực trạng sốt rét và đánh giá kết quả can thiệp phòng chống sốt rét tại một số xã biên giới Hướng Hóa, tỉnh Quảng Trị*, Luận án tiến sĩ y học, Đại Học Y dược Huế.

2. Nguyễn Xuân Xã và CS (2012), "Thực trạng sốt rét và các hành vi liên quan đến phòng chống sốt rét trong cộng đồng dân tộc Gia Rai tại 3 thôn biên giới Việt Nam - Campuchia của huyện Đức cơ, Gia Lai", *Tạp chí Phòng chống sốt rét*, số 01 năm 2012.

3. Bisoffi Z, Gobbi F, Buonfrate D et al (2012), "Diagnosis of Malaria Infection with or without Disease", *Mediterranean Journal of hematology and infectious diseases*, 4(1).

4. Congpuong K, SaeJeng A, Sug-aram R et al (2012), "Mass blood survey for malaria: pooling and real-time PCR combined with expert microscopy in north-west Thailand", *Malaria journal*, 2012 Dec; 11(1):288.

5. Erhart A, Thang ND, Van Ky P et al (2005), "Epidemiology of forest malaria in central Vietnam: a large scale cross-sectional survey", *Malaria Journal*, 2005 Dec; 4(1): 58.

6. Mayor A, Aponte J.J, Fogg C et al (2007), "The epidemiology of malaria in adults in a rural area of southern Mozambique", *Malaria journal*, 2007 Dec; 6(1): 3.

7. National Institute of Malariology Parasitology and Entomology (2018), *National malaria programme review - Viet Nam*, World Health Organization Regional Office for the Western Pacific, 2018.

8. Padley D, Moody A.H, Chiodini P.L et al (2003), "Use of a rapid, single-round, multiplex PCR to detect malarial parasites and identify the species present", *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 2003 Mar 1; 97(2): 131-7.

9. Playfair J.H, Taverne J, Bate C.A et al (1990), "The malaria vaccine: anti-parasite or anti-disease?", *Immunology today*, 1990 Jan 1; 11: 25-7.

10. Thanh P.V, Van Hong N, Van Van N et al. Epidemiology of forest malaria in Central Vietnam: the hidden parasite reservoir. *Malaria journal*. 2015 Dec;14(1):86.

11. Tripura R, Peto T.J, Veugen C.C et al (2017), "Submicroscopic Plasmodium prevalence in relation to malaria incidence in 20 villages in western Cambodia", *Malaria journal*, 2017 Dec; 16(1): 56.

12. Van Nguyen H, Van den Eede P, van Overmeir C et al (2012), "Marked age-dependent prevalence of symptomatic and patent infections and complexity of distribution of human Plasmodium species in central Vietnam", *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2012 Dec 5; 87(6): 989-95.

13. Van den Eede P, Van H.N, Van Overmeir C et al (2009), "Human Plasmodium knowlesi infections in young children in central Vietnam", *Malaria journal*, 2009 Dec; 8(1): 249.

14. World Health Organization (2015), *World malaria report 2015*, 2016 Jan 30. □