

SỰ BIẾN THIÊN CỦA GEN MÃ HÓA CÁC PHÂN TỬ DÍNH VÀ TRỢ VIÊM CÓ LIÊN QUAN VỚI SỐT RÉT NẶNG TRÊN BỆNH NHÂN NGƯỜI VIỆT

SJ Dunstan^{1,2}, KA Rockett³, NTN Quyên¹, YYTeo⁴, CQ Thái⁵, NT Hằng¹, A Jeffreys³, G Clark⁶, KS Small⁷, CP Simmons^{1,2}, N Day⁸, SE O’Riordan¹, DP Kwiatkowski^{3,9}, J Farrar^{1,2}, NH Phú^{1,5} và TT Hiền^{1,5}, cộng tác với MalariaGEN Consortium^{3,9}

Tóm tắt

Cơ sở di truyền của tính cảm nhiễm sốt rét đã được nghiên cứu rộng rãi trên các quần thể người châu Phi nhưng sự đóng góp của các biến thể di truyền chuyên biệt trong các quần thể người châu Á chưa được biết nhiều. Chúng tôi đã xác định kiểu gen của 67 thể đa hình đơn-nucleotid (SNP) trên 1030 trường hợp sốt rét nặng và 2840 trường hợp đối chứng ở Việt Nam. Sau khi kiểm tra chất lượng dữ liệu, dữ liệu kiểu gen của 956 ca bệnh và 2350 người đối chứng được phân tích đối với 65 SNP (3 SNP xác định giới tính, 62 nằm trên/gần 42 gen ứng viên sốt rét). Tổng cộng có 14 SNP đơn hình và 2 SNP (rs8078340 và rs33950507) không ở trạng thái cân bằng Hardy-Weinberg trên các đối tượng đối chứng ($P < 0,01$). Có 7/46 SNP trên 6 gen (*ICAM1*, *IL1A*, *IL17RC*, *IL13*, *LTA* và *TNF*) có liên quan với sốt rét nặng, với 3/7 SNP ở vùng *TNF/LTA*. Sự tương quan kiểu gen-kiểu hình giữa SNP và các thông số lâm sàng cho thấy kiểu gen rs708567 (*IL17RC*) tương quan với mật độ ký sinh trùng trong máu ($P = 0,028$, $r^2 = 0,0086$), đồng hợp tử GG có lượng ký sinh trùng thấp nhất. Ngoài ra, đồng hợp tử GG rs708567 có nguy cơ sốt rét nặng ($P = 0,007$, OR = 0,78 (KTC 95%: 0,65–0,93)) và chết ($P = 0,028$, OR = 0,58 (KTC 95%: 0,37–0,93)) thấp hơn các kiểu gen AA và AG. Tóm lại, các biến thể trong 6 gen mã hóa các phân tử dính và trợ viêm có liên quan với sốt rét nặng trên người Việt Nam. Cần có thêm các nghiên cứu tương tự trên các dân số độc lập để khẳng định những kết quả này.

Từ khóa: sốt rét nặng; SNP; kết hợp di truyền; *ICAM1*; *TNF*; *IL17RC*

Abstract

VARIATION IN HUMAN GENES ENCODING ADHESION AND PROINFLAMMATORY MOLECULES ARE ASSOCIATED WITH SEVERE MALARIA IN THE VIETNAMESE

The genetic basis for susceptibility to malaria has been studied widely in African populations but less is known of the contribution of specific genetic variants in Asian

populations. We genotyped 67 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in 1030 severe malaria cases and 2840 controls from Vietnam. After data quality control, genotyping data of 956 cases and 2350 controls were analysed for 65 SNPs (3 gender confirmation, 62 positioned in/near 42 malarial candidate genes). A total of 14 SNPs were monomorphic and 2 (rs8078340 and rs33950507) were not in Hardy-Weinberg equilibrium in controls ($P < 0,01$). In all, 7/46 SNPs in 6 genes (*ICAM1*, *IL1A*, *IL17RC*, *IL13*, *LTA* and *TNF*) were associated with severe malaria, with 3/7 SNPs in the *TNF/LTA* region. Genotype-phenotype correlations between SNPs and clinical parameters revealed that genotypes of rs708567 (*IL17RC*) correlate with parasitemia ($P = 0,028$, $r^2 = 0,0086$), with GG homozygotes having the lowest parasite burden. Additionally, rs708567 GG homozygotes had a decreased risk of severe malaria ($P = 0,007$, OR = 0,78 (95% CI: 0,65–0,93)) and death ($P = 0,028$, OR = 0,58 (95% CI: 0,37–0,93)) than those with AA and AG genotypes. In summary, variants in six genes encoding adhesion and proinflammatory molecules are associated with severe malaria in the Vietnamese. Further replicative studies in independent populations will be necessary to confirm these findings.

Keywords: severe malaria; SNP; genetic association; *ICAM1*; *TNF*; *IL17RC*

Đặt vấn đề

Khoảng phân nửa dân số thế giới có nguy cơ sốt rét, với 243 triệu người nhiễm ký sinh trùng (KST) và gần 1 triệu người chết trong năm 2008.⁽¹⁾ Trong thập niên vừa qua, Việt Nam đã đạt được những thành tựu to lớn trong việc phòng chống sốt rét với số mắc giảm từ 187.994 trường hợp năm 1991 xuống 54.297 năm 2010 và số chết giảm từ 4646 trường hợp năm 1991 xuống còn 21 năm 2010.⁽²⁾ Thành công này là do sự tập trung can thiệp ở những vùng có nguy cơ cao và cân bằng giữa điều trị và phòng bệnh, nghĩa là phối hợp biện pháp tắm màn, phun thuốc diệt muỗi và chẩn đoán sớm với sự khả dụng của thuốc điều trị hữu hiệu (các dẫn chất artemisinin).^(3,4) Tuy phòng chống thành công, nhưng bệnh sốt rét vẫn tồn tại ở Việt Nam. Ngoài ra, một nghiên cứu của Erhart và cộng sự⁽⁵⁾ cho thấy hệ thống thông tin y tế ở Việt Nam chưa đánh giá đúng mức về gánh nặng sốt rét. Các trường hợp sốt rét thường được tìm thấy ở các vùng dân tộc ít người ở miền Trung-Tây nguyên vốn còn nghèo, hệ thống y tế còn yếu và là những vùng rừng núi thuận

¹ Đơn vị Nghiên cứu Lâm sàng Đại học Oxford, TP.HCM Việt Nam;

² Khoa Y học Lâm sàng Nuffield, Trung tâm Y học Nhiệt đới, Đại học Oxford, Oxford, Vương quốc Anh;

³ Trung tâm Di truyền học Người Wellcome Trust, Đại học Oxford, Oxford, Vương quốc Anh,

⁴ Bộ môn Thống kê và Xác suất ứng dụng, Đại học Quốc gia Singapore, Singapore;

⁵ Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam;

⁶ Trường Vệ sinh và Y học Nhiệt đới London, Vương quốc Anh;

⁷ Bộ môn Nghiên cứu Song sinh và Dịch tễ học Di truyền, King's College London, London, Vương quốc Anh;

⁸ Đơn vị Nghiên cứu Mahidol-Oxford, Khoa Y học Nhiệt đới, Đại học Mahidol, Bangkok, Thái Lan và

⁹ Viện Wellcome Trust Sanger, Hinxton, Vương quốc Anh.

Bảng 1. Thu thập mẫu các trường hợp sốt rét nặng và đối chứng

Năm chọn mẫu	Mô tả nghiên cứu	Địa điểm	Số mẫu
Sốt rét nặng			
1991–1995	Thử nghiệm ngẫu nhiên đối chứng ⁽⁴⁰⁾	BVBNĐ, TP.HCM	420
1996–2001	Thử nghiệm ngẫu nhiên đối chứng ⁽³⁹⁾	BVBNĐ, TP.HCM	249
2000–2005	Nghiên cứu dịch tễ học	BVBNĐ, TP.HCM Bệnh viện huyện Đồng Xoài và Phước Long, tỉnh Bình Phước	300
2005–đến nay	Sưu tập MalariaGEN	BVBNĐ, TP.HCM	132
Đối chứng			
2000–2005	Nghiên cứu dịch tễ học	Đối chứng cộng đồng, Bệnh viện huyện Phước Long và Đồng Xoài	600
2000–2005	Nghiên cứu dịch tễ học	Đối chứng gia đình, Bệnh viện huyện Phước Long và Đồng Xoài	132 (66 Trios)
2003–2006	Thuần tập sinh	Đối chứng máu cuống rốn, Bệnh viện Hùng Vương, TP.HCM	1000
2006–2007	Thuần tập sinh	Đối chứng máu cuống rốn, Bệnh viện Hùng Vương, TP.HCM	1250

Chữ viết tắt: BVBNĐ: Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới; TP.HCM: Thành phố Hồ Chí Minh

lợi cho sự phát triển các trung gian truyền bệnh sốt rét thường gặp như *Anopheles dirus* và *A. minimus*.⁽⁶⁾ Những vùng này, với nhiều địa bàn giáp ranh với Campuchia, còn có nguy cơ sốt rét do *Plasmodium falciparum* kháng thuốc. Những báo cáo gần đây gợi ý rằng hiệu quả của liệu pháp phối hợp chứa artemisinin và đơn liệu pháp artesunat đã suy giảm ở miền tây Campuchia.⁽⁷⁾ Mặc dù Việt Nam có nhiều thành công trong công tác phòng chống sốt rét, nhưng sự trỗi dậy của *P. falciparum* giảm độ nhạy *in vivo* với các dẫn chất artemisinin nhắc cho chúng ta nhớ rằng thách thức vẫn còn đang ở phía trước.

Việc phòng chống sốt rét ở những nước có bệnh lưu hành sẽ được hưởng lợi rất lớn từ một vắc xin có hiệu quả. Gần đây, một số vắc xin giai đoạn tiền hồng cầu đã được phát triển và thử nghiệm lâm sàng.^(8–11) Cho dù những vắc xin này, hoặc một vắc xin tương tự, rất có thể sẽ được cấp phép lưu hành, nhưng chúng chưa thể đem lại sự vô nhiễm và bảo vệ trọn đời chống *P. falciparum*. Các vắc xin chống các giai đoạn trong hồng cầu có tiềm năng tạo miễn dịch bảo vệ lớn hơn, nhưng đáng tiếc là cho đến nay vẫn ít thành công trong thử nghiệm lâm sàng.⁽¹²⁾ Để phát triển một vắc xin sốt rét giúp chống lại nhiều giai đoạn của KST có thể bảo vệ hữu hiệu ở vùng có bệnh lưu hành, điều quan trọng nhất là phải hiểu biết đầy đủ về các cơ chế phân tử của miễn dịch bảo vệ. Những nghiên cứu về bộ gen người có thể cho chúng ta biết về sự đề kháng với sốt rét vì trong quần thể có sự tiến hóa của các biến thể di truyền khác nhau để bảo vệ chống sốt rét.

MalariaGEN Consortium là một mạng lưới nghiên cứu toàn cầu sử dụng phương pháp di truyền

để nhận diện các cơ chế mới của miễn dịch bảo vệ chống sốt rét, có thể dẫn đến sự phát triển vắc xin mới.⁽¹³⁾ MalariaGEN đã thu tuyển những trường hợp sốt rét nặng và đối tượng đối chứng ở 15 nước có bệnh sốt rét lưu hành để nghiên cứu di truyền. Là một bộ phận của MalariaGEN, báo cáo này trình bày dữ liệu kiểu gen từ 65 thể đơn hình đơn-nucleotid (SNP) trên 42 gen ứng viên sốt rét ở 956 trường hợp sốt rét nặng và 2350 đối tượng đối chứng tại Việt Nam. Các biến thể ở 6 gen (*ICAM1*, *IL1A*, *IL17RC*, *IL13*, *LTA* và *TNF*) đều liên quan với sốt rét nặng trong quần thể này.

Đối tượng và Phương pháp

Đối tượng và thiết kế nghiên cứu

Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới (BVBNĐ) TP. Hồ Chí Minh và Đơn vị Nghiên cứu Lâm sàng Đại học Oxford tại Việt Nam đã thu tuyển bệnh nhân sốt rét nặng để nghiên cứu trong khoảng thời gian từ 1991 đến 2009 (Bảng 1). Bệnh nhân sốt rét nặng được đưa vào các thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên đối chứng^(39,40) ở BVBNĐ, hoặc đưa vào một nghiên cứu dịch tễ học được thực hiện tại BVBNĐ và hai bệnh viện huyện Phước Long và Đồng Xoài của tỉnh Bình Phước. Tỉnh Bình Phước thuộc miền đông Nam Bộ có mức truyền bệnh thấp theo mùa, do *P. falciparum* và *P. vivax*, chủ yếu ở vùng nông thôn rừng núi, với chỉ số lan truyền côn trùng (EIR) rất thấp (< 1 ở đa số vùng). Việc thu tuyển bệnh nhân sốt rét nặng chủ yếu để nghiên cứu di truyền hiện đang tiếp diễn tại BVBNĐ.

Bệnh nhân sốt rét nặng được định nghĩa là người có *P. falciparum* thể vô tính trong phết máu ngoại biên và có ít nhất một trong những đặc điểm sau: suy giảm tri giác (GCS < 11 hoặc điểm số hôn mê

Blantyre < 5), phù phổi, suy thận cấp (thiếu niệu và creatinin huyết thanh >265 $\mu\text{mol/l}$), vàng da (bilirubin huyết thanh >51 $\mu\text{mol/l}$ với mật độ KST >100.000/ μl hoặc có creatinin huyết thanh >250 $\mu\text{mol/l}$), hạ đường huyết (glucose máu <2,2 mmol/l), thiếu máu (hematocrit <20% với mật độ KST >100.000/ μl), KST trong máu cao (>500.000/ μl), tăng lactat-máu (lactat huyết tương >4 mmol/l), nhiễm toan chuyển hóa (kiềm dư dịch ngoại bào > -5 mmol/l, kiềm thiếu <10 mmol/l), bạch cầu trung tính có sắc tố (>4%) và sốc (huyết áp tâm thu <80 mmHg kèm lạnh tay chân); hoặc có mật độ KST trong máu $\geq 5\%$ nhưng không có những đặc điểm trên. Bệnh nhân sốt rét thể não được định nghĩa là bệnh nhân có GCS <9.

Quần thể đối chứng ($N=2840$) là đối chứng máu cuống rốn hoặc đối chứng cộng đồng. Các mẫu máu cuống rốn ($N=2270$) được lấy từ các em bé sinh năm 2003 và trong khoảng từ 2006 đến 2007 ở Bệnh viện Hùng Vương, TP. Hồ Chí Minh, và từ các em bé sinh năm 2003 ở Bệnh viện tỉnh Đồng Tháp. Ngoài ra, đối chứng cộng đồng ($N=570$) được thu tuyển như một bộ phận của nghiên cứu dịch tễ học là những người có độ tuổi (0–73 tuổi), giới tính, chủng tộc và địa bàn cư trú khớp với bệnh nhân sốt rét nặng. Các đối chứng cộng đồng tiềm năng được hỏi về tiền sử sốt rét nặng hoặc thời gian đã nằm viện. Mọi ứng viên từng nằm viện >48 giờ không vì lý do phẫu thuật, thương tích hoặc một chẩn đoán không phải sốt rét đều được loại ra.

Các đối tượng là những người không có quan hệ gì với nhau và được xác định chủng tộc bằng một bộ câu hỏi. Bác sĩ điều trị chịu trách nhiệm thu tuyển những bệnh nhân tự nguyện tham gia vào nghiên cứu. Trước khi thu tuyển, bệnh nhân được cho biết về nguy cơ và lợi ích khi tham gia những nghiên cứu này và họ có thể từ chối tham gia. Mỗi đối tượng đều có giấy tự nguyện tham gia, tuy nhiên nếu bệnh nhân không thể ký giấy đồng ý (do mất tri giác) thì người nhà ký thay. Việc lấy mẫu đối chứng máu cuống rốn được sự đồng ý của người mẹ. Hội đồng khoa học và đạo đức của BVBNĐ, Bệnh viện Hùng Vương (TP. HCM), Bệnh viện tỉnh Đồng Tháp hoặc Sở Y tế TP. HCM là những đơn vị phê chuẩn về mặt đạo đức. Đề cương nghiên cứu cũng được Hội đồng Đạo đức Nghiên cứu Nhiệt đới Oxford (Vương quốc Anh) phê chuẩn.

Ly trích và lượng hóa DNA

DNA bộ gen (gDNA) của bệnh nhân sốt rét nặng và các đối chứng cộng đồng được ly trích từ 1 đến 5 ml máu tĩnh mạch được lấy trong ống nghiệm chứa

chất kháng đông EDTA. Việc ly trích DNA được thực hiện bằng midi kit hoặc maxi kit của Qiagen (Lewes, Anh). gDNA của đối tượng đối chứng được ly trích từ 10 ml máu cuống rốn bằng maxi kit Qiagen (Qiagen). DNA được vận chuyển ở nhiệt độ đông lạnh đến Đại học Oxford (Anh). Khi đến nơi, bản kê mẫu thử được xác nhận và tất cả các mẫu đều được làm nhãn lại và gán mã số mới theo một thể thức chuẩn hóa không liên quan gì với mã số cũ. Thể tích mẫu được đo và DNA được lượng hóa bằng thuốc thử PicoGreen (Invitrogen, Paisley, Anh) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Kỹ thuật tiền khuếch đại mở rộng đoạn mồi (primer extension preamplification - PEP)

gDNA được pha loãng đến 1 ng/ml trên phiên 96 giếng. Một hỗn hợp thuốc thử PCR (45 μl gồm 2,2 μl đoạn mồi N15 pha loãng 1:10 (Molecular Devices Ltd, Wokingham, Anh), 1,25 μl dNTPs 8mM, 2,5 μl MgCl_2 50mM, 5 μl đệm 10 $\times$, 0,5 μl polymerase Biotaq 5U/ μl (Bioline, London, Anh), 33,55 μl nước MilliQ) được cho vào mỗi giếng. gDNA (5 μl hoặc 1ng/ μl) được thêm vào hỗn hợp PEP PCR, các phiên được niêm kín và xử lý nhiệt theo chương trình sau: 94°C trong 3 phút; 50 chu kỳ 94°C trong 1 phút, 37°C trong 2 phút và tăng 0,1°C qua mỗi chu kỳ cho đến 55°C; 55°C trong 4 phút; và sau cùng là 72°C trong 5 phút. PEP DNA được bảo quản ở 20°C đến khi được dùng. Chất lượng và hiệu năng của phản ứng PEP và các sản phẩm được đánh giá bằng PCR với một cặp đoạn mồi được chọn từ các xét nghiệm xác định kiểu gen được mô tả dưới đây và chạy trên gel agarose 2% để kiểm tra cường độ dài và độ tin cậy.

Chọn các SNP

Việc chọn lựa SNP để xác định kiểu gen do MalariaGEN Consortium thực hiện. Những SNP này được chọn lọc qua dò tìm trong y văn và những thí nghiệm mà Consortium đang tiến hành để tìm bằng chứng sự liên quan với sốt rét nặng. Hai phản ứng Sequenom iPLEX cũng được đưa vào các SNP phân định giới tính. Có thể tìm xem chi tiết tại địa chỉ mạng www.malariagen.net.

Xác định kiểu gen

Việc xác định kiểu gen của các mẫu PEP DNA pha loãng 1:10 được thực hiện trên hệ thống SEQUENOM iPLEX Gold theo các tiêu chuẩn kỹ thuật của nhà sản xuất. Tất cả các đoạn mồi đông khô được mua của Metabion International AG (Martinsried, Đức).

Phân tích dữ liệu

Các sai lệch kiểu gen so với cân bằng Hardy–

Weinberg được đánh giá bằng test thống kê χ^2 . SNP được loại khỏi phân tích nếu có ít nhất 15% tổng số kiểu gen đối với SNP ấy bị thiếu hoặc có sự sai lệch cân bằng Hardy–Weinberg đáng kể ($P < 0,01$). Đối tượng được loại ra khỏi bộ dữ liệu nếu họ thiếu >10% tổng số dữ liệu kiểu gen, hoặc tự báo giới tính khác với các dấu ấn di truyền đặc hiệu của giới tính (gen amelogenin, ba SNP). Phân tích đơn biến được dùng cho các biến định tính với test χ^2 Pearson được dùng để đánh giá sự kết hợp giữa các kiểu hình của bệnh và tần suất của allen hoặc kiểu gen. Tất cả các phân tích về sự kết hợp của bệnh nhân và đối tượng đối chứng đều được hiệu chỉnh với nhóm chủng tộc, trong đó một biến định tính mã hóa yếu tố chủng tộc được đưa vào làm hiệp biến số trong hồi qui logistic. Hồi qui logistic còn cho phép ước lượng tỉ số odds đối với các kiểu gen. Trong kiểm định thống kê này, SNP đang xét được mô hình hóa bằng cách giả định một số cơ chế kiểu gen có liên quan (các mô hình cộng, trội, lặn, ưu thế dị hợp tử và mô hình khái quát) và báo cáo trị số P cực tiểu từ những test có tương quan này. Riêng mô hình khái quát được dùng để so sánh tần suất kiểu gen. Trị số F_{st} giữa đối chứng máu cuống rốn và đối chứng cộng đồng được tính bằng cách dùng tần suất allen và công thức: $(p_1 - p_2)^2 / [(p_1 + p_2)(2 - p_1 - p_2)]$. Các biến liên tục (ví dụ số KST/ μ l máu) được kiểm định sự kết hợp bằng một mô hình tuyến tính. Tất cả các phân tích đều sử dụng phần mềm thống kê R. Việc thực hiện nhiều test thống kê dẫn đến sự lạm phát dương tính giả, vì vậy chỉ nên xem nghiên cứu này là một nghiên cứu thăm dò. Để có thể sử dụng những biến thể kết hợp này trong một mục đích nào đó, cần phải tái hiện những kết hợp SNP này trong các thuần tập độc lập. Do đó, dữ liệu trình bày ở đây không được hiệu chỉnh, mà đưa ra con số SNP được thử ($N=65$), nhiều SNP sẽ không còn có ý nghĩa sau khi dùng một phương pháp hiệu chỉnh bảo thủ (chẳng hạn Bonferroni). Tuy nhiên, vì tất cả các test đều không độc lập (các kiểu hình có liên quan, các SNP không độc lập vì mất cân bằng liên kết, v.v...), nên hiệu chỉnh Bonferroni có thể sẽ không thích hợp.

Kết quả

Đặc điểm lâm sàng của thuần tập

Các đặc điểm lâm sàng và nhân khẩu học ban đầu của bệnh nhân sốt rét nặng và quần thể đối chứng được trình bày trong Bảng 2. Tổng cộng có 956 bệnh nhân người lớn thỏa mãn định nghĩa sốt rét nặng được thu nhận. Đa số bệnh nhân (87%) và đối tượng đối chứng (93%) là người dân tộc Kinh,

và tỉ lệ nam ở nhóm bệnh nhân (71%) cao hơn so với tỉ lệ ở nhóm đối chứng (54%). Tuổi trung vị (khoảng liên tứ phân) của bệnh nhân là 28 (20–40) tuổi và mật độ ký sinh trùng (KST) trung vị (khoảng liên tứ phân) là 61.860 (7756–254.200). Hiếm thấy bệnh nhân thiếu máu nặng (hematocrit >20%) và tỉ lệ tử vong là 10,4%.

Các SNP ứng viên sốt rét liên quan với sốt rét nặng tại Việt Nam

Tổng cộng chúng tôi đã xác định kiểu gen của 67 SNP trên 1030 trường hợp sốt rét nặng và 2840 người đối chứng. Đối tượng được loại khỏi bộ dữ liệu nếu họ thiếu >10% tổng số dữ liệu kiểu gen. SNP được loại ra khỏi bộ dữ liệu nếu >15% số đối tượng được xác định kiểu gen đối với SNP ấy thiếu dữ liệu kiểu gen. Sau khi loại bỏ những trường hợp trên, chúng tôi phân tích dữ liệu đối với 65 SNP đã xác định kiểu gen trên 956 trường hợp sốt rét nặng và 2350 người đối chứng. 65 SNP này nằm trong hoặc gần 42 gen. Dữ liệu của 3 SNP trong gen amelogenin (*AMELX*) được dùng để xác nhận giới tính. 62 SNP còn lại được tìm thấy gần hoặc trong 41 gen ứng viên sốt rét. Hai SNP (rs33950507, rs8078340) không ở trạng thái cân bằng Hardy–Weinberg (đối chứng; $P < 0,01$) và 14 SNP là đơn hình. Không có gì bất ngờ khi có 4 SNP trong nghiên cứu này có nguồn gốc đã biết từ châu Phi và chúng hiện diện như là allen từ tổ tiên truyền lại trong quần thể này (*HbS* (rs334), *G6PD*+376 (rs1050829), *G6PD*+202 (rs1050828) và Duffy (rs1803632)). Bảng 3 cho thấy 7/46 SNP trên 6 gen ứng viên sốt rét đều liên quan với sốt rét nặng ở thuần tập người Việt này; rs5498 (*ICAM1*), rs17561 (*IL1A*), rs708567 (*IL17RC*), rs20541 (*IL13*), rs909253 (*LTA*+252), rs1799964 (*TNF*-1031) và rs1800629 (*TNF*-308). Các trị số P về sự kết hợp allen và kiểu gen được trình bày trong Bảng 3. Tất cả phân tích sự kết hợp của các trường hợp bệnh và đối chứng đều được hiệu chỉnh theo nhóm chủng tộc. Phân tích trong nhóm dân tộc Kinh cho thấy chỉ có 5 trên 7 SNP nói trên liên quan với sốt rét nặng (rs909253 trong *LTA* và rs1799964 trong *TNF* không còn kết hợp có ý nghĩa). Vì các nhóm chủng tộc khác có cỡ mẫu nhỏ hơn nhiều so với nhóm dân tộc Kinh, chúng tôi không thể thực hiện một phân tích đủ độ mạnh phân tầng theo chủng tộc. Vì quần thể đối chứng bao gồm cả trẻ sơ sinh (đối chứng máu cuống rốn) và người lớn (đối chứng cộng đồng), chúng tôi đã sử dụng tần suất allen của 46 SNP để tính F_{st} của hai nhóm. Trị số F_{st} trung bình (0,000595) và trung vị (0,000479) là bằng chứng gợi ý hai nhóm khá giống nhau.

Bảng 2. Các đặc điểm ban đầu và kết cục của bệnh nhân sốt rét nặng và đối tượng đối chứng

Thông số	Cỡ mẫu	N (%) hoặc trung vị (IQR)	Cực trị
Bệnh nhân sốt rét nặng			
Giới tính (%) – nam/nữ	956	684 (71,5)/272 (28,5)	
Dân tộc (%)			
Kinh	956	828 (86,61)	
S'tiêng	956	48 (5,02)	
Khác	956	43 (4,50)	
Không rõ	956	37 (3,87)	
Tuổi (năm), trung vị (IQR)	942	28 (20–40)	0,66–79
Sốt trong 48 giờ qua (%)	475	473 (99,6)	
Dùng thuốc sốt rét trước khi vào viện (%)	248	43 (17,3)	
GCS, trung vị (IQR)	849	11 (8–15)	3–15
BCS, trung vị (IQR)	43	5 (3–5)	1–5
Co giật sau khi vào viện (%)	837	69 (8,2)	
Mật độ ký sinh trùng (μl^{-1}), trung vị (IQR)	828	61 860 (7756–254 200)	0–3534 000
Hematocrit (%), trung vị (IQR)	894	30,6 (24,5–36,0)	6–60
Hemoglobin (g/dl), trung vị (IQR)	121	10,2 (8,1–11,7)	2,5–14,9
Được truyền máu (%)	698	213 (30,5)	
Nhịp thở (phút^{-1}), trung vị (IQR)	832	28 (24–32)	14–68
Lactat (mmol/l), trung vị (IQR)	747	3,3 (2–5,05)	0,022–28
Glucose ($\mu\text{mol/l}$), trung vị (IQR)	711	5,5 (4,1–7,3)	0,5–31,3
Được dùng glucose (%)	941	214 (23)	
Tử vong (%)	914	96 (10,4)	
Đối tượng đối chứng			
Giới tính (%) – nam/nữ	2221	1195 (53,80)/1026 (46,20)	
Dân tộc (%)			
Kinh	2351	2194 (93,32)	
S'tiêng	2351	96 (4,08)	
Khác	2351	52 (2,21)	
Không rõ	2351	9 (0,38)	
Tuổi (năm), trung vị (IQR)			
Đối chứng máu cuống rốn	1811	0	0
Đối chứng cộng đồng	534	23 (10–34)	0,66–73

Chữ viết tắt: BCS: điểm số hôn mê Blantyre; GCS: điểm số hôn mê Glasgow; IQR: khoảng liên tứ phân

Bảng 3. Các SNP có liên quan với sốt rét nặng ở Việt Nam được hiệu chỉnh theo nhóm sắc tộc

Số rs	Gen	Chr	1	2	Tần suất allen ca bệnh 1	Tần suất allen đối chứng 1	P (add)	OR (KTC 95%)	P (tq)	P đối chứng HWE
rs5498 ^a	ICAM1	19	A	G	0,80	0,78	0,039	0,87 (0,76–0,99)	0,008	0,53
rs17561	IL1A	2	G	T	0,94	0,95	0,30	1,14 (0,90–1,44)	0,005	0,02
rs708567	IL17RC	3	A	G	0,14	0,11	0,004	0,79 (0,67–0,93)	0,016	0,37
rs20541 ^b	IL13	5	C	T	0,62	0,58	0,007	0,86 (0,77–0,96)	0,023	0,90
rs909253 ^c	LTA	6	C	T	0,46	0,49	0,035	1,12 (1,01–1,25)	0,079	0,36
rs1799964 ^d	TNF	6	C	T	0,25	0,23	0,023	0,86 (0,76–0,98)	0,072	0,87
rs1800629 ^e	TNF	6	A	G	0,06	0,07	0,054	1,24 (0,99–1,54)	0,027	0,58

Chữ viết tắt: Add: mô hình cộng; tq: tổng quát; HWE: cân bằng Hardy–Weinberg; OR (KTC 95%): tỉ số odds (khoảng tin cậy 95%).
aICAM1 codon469; bIL13 46457; cLTA Nco1; dTNFa-1031; eTNF-308

Bảng 4. Các SNP liên quan với chết do sốt rét nặng ở Việt Nam được hiệu chỉnh theo nhóm sắc tộc

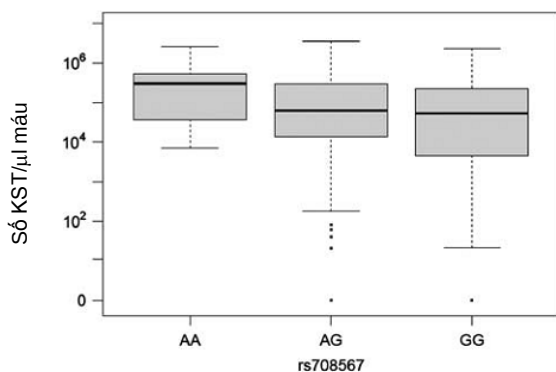
Số rs	Gen	Chr	1	2	Tần suất allen ca bệnh ¹	Tần suất allen đối chứng ¹	P (add)	OR (KTC 95%)	P (tq)	P đối chứng HWE
rs7935564	TRIM	11	A	G	0,125	0,188	0,049	1,55 (0,98–2,44)	0,138	0,25
rs708567	IL17RC	3	A	G	0,176	0,136	0,073	0,68 (0,45–1,02)	0,047	0,13

Chữ viết tắt: Add: mô hình cộng; tq: tổng quát; HWE: cân bằng Hardy–Weinberg; OR (KTC 95%): tỉ số odds (khoảng tin cậy 95%).

Các SNP ứng viên sốt rét liên quan với tử vong do sốt rét nặng tại Việt Nam

Hai SNP trong hai gen ứng viên sốt rét liên quan với

tử vong do sốt rét nặng (rs7935564 (*TRIM*) và rs708567 (*IL17RC*)) khi so sánh các trường hợp sốt rét nặng tử vong với các trường hợp khỏi bệnh (Bảng 4).



Hình 1. Mật độ ký sinh trùng theo kiểu gen rs708567. Mật độ KST của 832 bệnh nhân sốt rét nặng được phân nhóm theo kiểu gen của IL17RC SNP rs708567. Để kiểm định sự tương quan kiểu gen–kiểu hình, chúng tôi so sánh mật độ KST trung bình trên bệnh nhân có các kiểu gen AA, AG và GG của rs708567 bằng phương pháp ANOVA (mô hình tuyến tính; $P=0,028$, $r^2 = 0,0086$). Số liệu KST/μl máu được biểu diễn bằng số trung vị (thanh ngang) và khoảng liên tứ phân (hộp xám)

Kiểu gen *IL17RC* liên quan với mật độ KST trong máu của bệnh nhân sốt rét

Sự tương quan kiểu gen–kiểu hình giữa dữ liệu kiểu gen SNP và các thông số lâm sàng của bệnh nhân sốt rét nặng trong nghiên cứu này đã được kiểm định. Chúng tôi so sánh số lượng KST trung bình/μl máu trên 832 bệnh nhân mang các kiểu gen AA, AG và GG của rs708567 bằng phương pháp ANOVA (mô hình tuyến tính) và thấy rằng các kiểu gen của SNP này tương quan với mật độ KST trong máu ($P=0,028$, $r^2 = 0,0086$; Hình 1). rs708567 trong *IL17RC* liên quan với sốt rét nặng, và mô hình lặn (recessive model) cho thấy một tác dụng bảo vệ của đồng hợp tử GG (nghĩa là nguy cơ sốt rét nặng thấp hơn trên các đồng hợp tử GG; $P=0,007$, OR=0,78 (KTC 95%: 0,65–0,93)). Ngoài ra, rs708567 trong *IL17RC* còn liên quan với tử vong do sốt rét nặng (P kiểu hình = 0,047, Bảng 4), và mô hình lặn cũng cho thấy một tác dụng bảo vệ của đồng hợp tử GG (nghĩa là nguy cơ chết do sốt rét nặng thấp hơn trên các đồng hợp tử GG; $P=0,028$, OR=0,58 (KTC 95%: 0,37–0,93)). Đáng lưu ý là số lượng KST thấp nhất trên các đồng hợp tử GG (Hình 1).

Bàn luận

Vì sốt rét là một bệnh phức tạp, nên nguy cơ bệnh toàn bộ của một cá thể dự kiến sẽ được quyết định phần nào bởi sự góp phần của nhiều gen. Bằng cách xác định kiểu gen của các SNP trong một số gen ứng viên sốt rét đã biết, chúng tôi đã tìm thấy sự kết hợp của bệnh với các gen can dự vào nhiều biến cố quan trọng khác nhau trong cơ chế bệnh sinh sốt rét. Các gen mã hóa những phân tử dính tham gia vào hiện tượng dính tế bào (*ICAM1*) cũng như đáp ứng trợ viêm (*TNF*, *LTA*, *IL1A*) đều liên quan với sốt rét

nặng và, như đã dự kiến, tất cả các biến thể đều góp phần khiêm tốn vào nguy cơ bệnh toàn bộ.

Đính tế bào là một biến cố then chốt trong bệnh sinh sốt rét và được xem là một chiến lược lẩn tránh miễn dịch. Hồng cầu bị ký sinh ần náu trong các mạch máu nhỏ⁽¹⁴⁾ giúp cho KST vẫn nằm trong ngăn mạch máu và tránh tuần hoàn qua lách. Sự ần náu cách ly này xảy ra thông qua sự kết gắn hồng cầu bị ký sinh với một loạt thụ thể, một trong những thụ thể đó là phân tử dính liên bào 1 (*ICAM1*; *CD54*). *ICAM1*, một glycoprotein bề mặt tế bào, hoạt động như một thụ thể dính tế bào miễn dịch và nội mô đối với các bạch cầu biểu hiện integrin. Có nhiều ý kiến trái ngược nhau về những kết hợp di truyền của các biến thể *ICAM1* với sốt rét nặng. Những nghiên cứu ban đầu ở Kenya⁽¹⁵⁾ và Gabon¹⁶ đã tìm thấy sự kết hợp giữa rs5491 (*ICAM-1*Kilifi) và sốt rét; tuy vậy, những quan sát ban đầu này không được tái hiện lại,^(17–19) kể cả một nghiên cứu lớn gồm ba quần thể (Gambia, Kenya và Malawi) có phân tích sự kết hợp gia đình và bệnh-chứng.⁽²⁰⁾ Trên thuần tập người Việt, rs5491 bị loại vì tỉ lệ thất bại cao khi xác định kiểu gen; tuy vậy, chúng tôi đã tìm thấy một sự liên quan giữa rs5498 và sốt rét nặng. rs5498, một SNP không đồng nghĩa ở vùng exon 6 mã hóa domain giống Ig-5 của phần ngoại bào của *ICAM1*, cũng kết hợp với tăng nguy cơ sốt rét nặng ở Nigeria⁽²¹⁾ và Ấn Độ.⁽²²⁾

Có nhiều báo cáo về đáp ứng miễn dịch của người với sốt rét, tuy nhiên vẫn chưa rõ đáp ứng nào đem lại miễn dịch bảo vệ chống sốt rét, và cơ chế tiềm ẩn của chúng là gì. Nghiên cứu sự tương tác di truyền giữa sốt rét và hệ miễn dịch có thể mang lại thêm cơ hội để khám phá những cơ chế này, do đó những biến thể của các gen cytokin trợ viêm đã được đánh giá trên nhiều quần thể. Vùng gen *TNF* ứng viên cho sốt rét (*TNF-308*) lần đầu tiên được nhận thấy có sự liên quan với sốt rét thể não vào năm 1994;⁽²³⁾ tuy vậy phát hiện này không phải lúc nào cũng được tái hiện trong những nghiên cứu sau đó. Một nghiên cứu lớn gần đây trên 410.000 người từ các quần thể ở châu Phi đã làm sáng những mâu thuẫn này, và tìm thấy một số bằng chứng tỏ cho thấy các kiểu đơn (haplotype) *TNF* liên quan với sốt rét nặng ở Gambia, nhưng sự liên quan này không được nhận thấy các quần thể có quan hệ gần là người Kenya và Malawi.⁽²⁴⁾ Các SNP *TNF* liên quan với sốt rét nặng ở Gambia (*TNF-308*, *TNF-1031*) cũng được tìm thấy trên người Kinh ở Việt Nam, cùng với *LTA*÷252. Lý do giải thích cho những mâu thuẫn trong dữ liệu trên

hiều dân tộc khác nhau được nghiên cứu với cỡ mẫu đủ lớn là sự đa dạng kiểu đơn giữa các quần thể, cũng như sự khác biệt kiểu hình trên bệnh nhân. Vấn đề tính đa dạng kiểu đơn giữa các quần thể đặc biệt có ý nghĩa khi biến thể gây ra sự kết hợp với bệnh không được biết rõ nhưng lại xác định được kiểu gen của các dấu ấn đại diện. Đây có thể là trường hợp xảy ra với nghiên cứu của chúng tôi vì các biến thể nguyên nhân có thể nằm xuôi dòng cách phía dưới *TNF* và *LTA* một quãng.^(25,26)

Interleukin 1 (IL1) hiện hữu dưới hai dạng, IL1a và IL1b, và cả hai đều có vai trò vượt trội trong đáp ứng pha cấp bằng cách gây biểu hiện nhiều cytokin và phân tử trợ viêm, dẫn đến hoạt hóa tế bào T và bạch cầu đơn nhân và gia tăng các phân tử dính. Các biến thể ở vùng gen này còn liên quan với nhiều bệnh khác nhau⁽²⁷⁻³⁰⁾ và đặc biệt là sốt rét.^(31,32) Walley và cộng sự⁽³¹⁾ chỉ báo cáo sự liên quan giữa *IL1A*+4845 G-T (rs17561) và sốt rét nhẹ. Trên người Việt Nam, rs17561 liên quan với sốt rét nặng, một biến thể làm thay đổi acid amin không bảo toàn (Ala 114 Ser) của protein IL1 α . Những sự khác biệt trong định nghĩa ca bệnh và nhân khẩu học của các quần thể bệnh nhân sốt rét có thể giải thích vì sao rs17561 liên quan với sốt rét nhẹ ở Gambia và sốt rét nặng ở Việt Nam. Tại Việt Nam, một khu vực có mức truyền bệnh thấp, sốt rét thường là bệnh của người trưởng thành không có miễn dịch, trái ngược với những khu vực truyền bệnh cao ở châu Phi, nơi mà sốt rét thường là bệnh của trẻ em.

Để phân tích, chúng tôi đã xếp chung các kiểu hình lâm sàng khác nhau là sốt rét nặng, cho dù nguyên nhân di truyền tiềm ẩn đang sau mỗi kiểu hình có thể khác nhau. Cụ thể, sốt rét thể não có thể có một yếu tố quyết định di truyền khác với sốt rét thể xuất huyết. Khi giới hạn phân tích chỉ trên bệnh nhân sốt rét thể não (điểm hôn mê Glasgow [GCS] <9), chúng tôi nhận thấy một sự kết hợp kiểu gen giữa khởi phát sốt rét thể não với rs17561 (*IL1A*; $P=0,039$; không trình bày số liệu). Tính đa hình ở gen *TLR4*, rs4986790, cũng có sự liên quan với khởi phát sốt rét thể não (rs4986790, $P=0,044$, OR=2,85 (KTCC 95%: 1,4–7,17)); tuy nhiên, cả hai sự liên quan với sốt rét thể não đều không có ý nghĩa sau khi hiệu chỉnh Bonferroni.

IL17A và IL17F là các cytokin trợ viêm được tế bào Th17 biểu hiện, một loại tế bào T trợ thủ CD4+ độc đáo vốn thúc đẩy cơ chế phản ứng bẩm sinh của hiện tượng viêm.⁽³³⁾ Phức hợp thụ thể IL17 hợp bởi IL17RA và IL17RC là cốt lõi của hoạt tính sinh học

của IL17,⁽³⁴⁾ và phức hợp này gây hoạt hóa các đường phát tín hiệu NF- κ B và MAPK. Sự điều hòa thích hợp của trục phát tín hiệu IL17 giữ vai trò không thể thiếu trong sự tự vệ của vật chủ chống vi khuẩn ngoại bào và nấm; tuy vậy, có ít bằng chứng về vai trò của nó trong sự tự vệ chống sinh vật đơn bào.^(33,35) Trước đây, rs708567 trong *IL17RC* có sự liên quan với hai phân nhóm bệnh nhân sốt rét trong một thuần tập dịch tễ học đa dạng về mặt chủng tộc ở Sudan,⁽³⁶⁾ và dựa trên dữ liệu khả dụng về rs708567, Fumagalli và cộng sự⁽³⁷⁾ đã xác định rằng *IL17RC*, cùng với 44 gen IL khác, là đích của sự chọn lọc do tác nhân gây bệnh điều khiển. Đối với người Việt Nam, kiểu hình GG của rs708567 khiến bệnh nhân giảm được 22% khả năng bị sốt rét nặng và đem lại 42% sự bảo vệ tránh tử vong nếu bị sốt rét nặng. Đáng lưu ý là các đồng hợp tử GG (Ser 111 Leu), vốn phổ biến nhất trên người Việt Nam, có tải lượng KST thấp hơn bệnh nhân AA hoặc AG. Mang allele A của rs708567 là bất lợi về mặt sốt rét; tuy nhiên, chưa thể xác định liệu điều này là do sự can nhiễu trong trục phát tín hiệu IL17 hay là do một chức năng riêng của IL17RC.

Việc sử dụng cách tiếp cận cả bộ gen (genome-wide approach, GWA) để nhận diện các gen bệnh trên mô hình người với những điều kiện nhiễm khuẩn tự nhiên có thể có tiềm năng phát hiện các gen mã hóa những đáp ứng miễn dịch bảo vệ quan trọng hiện còn chưa biết. Vì vậy, các nghiên cứu GWA là bước quyết định trong việc xác định sự góp phần của tất cả các gen đã biết và chưa biết có dính líu một cách không thiên lệch. Chúng tôi đang chuẩn bị một nghiên cứu GWA về sốt rét nặng trên người Kinh bằng cách sử dụng những thuần tập bệnh nhân và người đối chứng được đưa vào MalariaGEN consortium, tổ chức đã công bố một nghiên cứu GWA về sốt rét nặng trên người Gambia.⁽³⁸⁾ Một tổng phân tích gồm nhiều nghiên cứu GWA từ những quần thể đa dạng về chủng tộc sẽ có khả năng nhận diện tất cả những cơ chế góp phần cần thiết cho miễn dịch bảo vệ chống sốt rét.

Cảm tạ

Chúng tôi xin cảm ơn tất cả những ai đã đồng ý cung cấp mẫu thử cho nghiên cứu này. Xin cảm ơn đội ngũ cán bộ lâm sàng của Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới TP. HCM, Bệnh viện huyện Phước Long và Đồng Xoài, tỉnh Bình Phước, những người đã chẩn đoán và khảo sát bệnh nhân nặng lúc ban đầu. Xin cảm ơn BS Nguyễn Thị Hiếu và cộng sự ở Bệnh viện Hùng Vương về việc thu thập mẫu công rốn đối chứng. Xin cảm ơn sự trợ giúp của Susana Campino, Rachel Craik, Kate Rowlands, Angie Green và Christina Hubbard của trung tâm nguồn lực MalariaGEN trong việc xử lý DNA và xác định kiểu gen. Chúng tôi chân thành cảm ơn sự đóng góp của HDBĐ MalariaGEN (Đại học Oxford, Vương quốc Anh), đặc biệt là Jantina de Vries.

Các hoạt động lâm sàng trong nghiên cứu này được tài trợ thông qua Wellcome Trust Major Overseas Program tại Việt Nam (089276/Z/09/Z). Dự án MalariaGEN được sự hỗ trợ của Wellcome Trust (WT077383/Z/05/Z) và Quỹ Bill & Melinda Gates thông qua Viện Y tế Quốc gia (trợ cấp số 566) như một của Chương trình Những Thách Thức Lớn trong Y tế Toàn cầu. Nghiên cứu này cũng được sự hỗ trợ của Hội đồng Nghiên cứu Y học (G0600718; G0600230). Dominic Kwiatkowski nhận sự hỗ trợ từ Hội đồng Nghiên cứu Y học (G19/9).

Tài liệu tham khảo

- World Health Organisation WH. World Malaria Report 2009. WHO: Geneva, 2009.
- National Institute of Malariology Prevention and Epidemiology. Annual Report of Malaria and Parasite Prevention in 2010. National Institute of Malariology Prevention and Epidemiology: Hanoi, Vietnam, 2010.
- Barat LM. Four malaria success stories: how malaria burden was successfully reduced in Brazil, Eritrea, India, and Vietnam. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74: 12–16.
- Hung Le Q, Vries PJ, Giao PT, Nam NV, Binh TQ, Chong MT và cs. Control of malaria: a successful experience from Viet Nam. *Bull World Health Organ* 2002; 80: 660–666.
- Erhart A, Thang ND, Xa NX, Thieu NQ, Hung LX, Hung NQ và cs. Accuracy of the health information system on malaria surveillance in Vietnam. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101: 216–225.
- Trung HD, Van Bortel W, Sochantha T, Keokenchanh K, Quang NT, Cong LD và cs. Malaria transmission and major malaria vectors in different geographical areas of Southeast Asia. *Trop Med Int Health* 2004; 9: 230–237.
- Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J và cs. Artemisinin resistance in Plasmodium falciparum malaria. *N Engl J Med* 2009; 361: 455–467.
- Bejon P, Lusingu J, Olotu A, Leach A, Lievens M, Vekemans J và cs. Efficacy of RTS,S/AS01E vaccine against malaria in children 5 to 17 months of age. *N Engl J Med* 2008; 359: 2521–2532.
- Abdulla S, Oberholzer R, Juma O, Kubhoja S, Machera F, Membi C và cs. Safety and immunogenicity of RTS,S/AS02D malaria vaccine in infants. *N Engl J Med* 2008; 359: 2533–2544.
- Webster DP, Dunachie S, Vuola JM, Berthoud T, Keating S, Laidlaw SM và cs. Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 4836–4841.
- Dunachie SJ, Walther M, Epstein JE, Keating S, Berthoud T, Andrews L và cs. A DNA prime-modified vaccinia virus ankara boost vaccine encoding thrombospondin-related adhesion protein but not circumsporozoite protein partially protects healthy malaria-naïve adults against Plasmodium falciparum sporozoite challenge. *Infect Immun* 2006; 74: 5933–5942.
- Goodman AL, Draper SJ. Blood-stage malaria vaccines—recent progress and future challenges. *Ann Trop Med Parasitol* 2010; 104: 189–211.
- MalariaGEN Network. A global network for investigating the genomic epidemiology of malaria. *Nature* 2008; 456: 732–737.
- Taylor TE, Fu WJ, Carr RA, Whitten RO, Mueller JS, Fosiko NG và cs. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat Med* 2004; 10: 143–145.
- Fernandez-Reyes D, Craig AG, Kyes SA, Peshu N, Snow RW, Berendt AR và cs. A high frequency African coding polymorphism in the N-terminal domain of ICAM-1 predisposing to cerebral malaria in Kenya. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1357–1360.
- Kun JF, Klabunde J, Lell B, Luckner D, Alpers M, May J và cs. Association of the ICAM-1Kilifi mutation with protection against severe malaria in Lambarene, Gabon. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 776–779.
- Bellamy R, Kwiatkowski D, Hill AV. Absence of an association between intercellular adhesion molecule 1, complement receptor 1 and interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphisms and severe malaria in a West African population. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92: 312–316.
- Ndiaye R, Sakuntabhai A, Casademont I, Rogier C, Tall A, Trape JF và cs. Genetic study of ICAM1 in clinical malaria in Senegal. *Tissue Antigens* 2005; 65: 474–480.
- Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Looareesuwan S, Tokunaga K. Absence of association between the allele coding methionine at position 29 in the N-terminal domain of ICAM-1 (ICAM-1(Kilifi)) and severe malaria in the northwest of Thailand. *Jpn J Infect Dis* 2001; 54: 114–116.
- Fry AE, Auburn S, Diakite M, Green A, Richardson A, Wilson J và cs. Variation in the ICAM1 gene is not associated with severe malaria phenotypes. *Genes Immun* 2008; 9: 462–469.
- Amodu OK, Gbadegesin RA, Ralph SA, Adeyemo AA, Brenchley PE, Ayoola OO và cs. Plasmodium falciparum malaria in south-west Nigerian children: is the polymorphism of ICAM-1 and E-selectin genes contributing to the clinical severity of malaria? *Acta Trop* 2005; 95: 248–255.
- Sinha S, Qidwai T, Kanchan K, Anand P, Jha GN, Pati SS và cs. Variations in host genes encoding adhesion molecules and susceptibility to falciparum malaria in India. *Malar J* 2008; 7: 250.
- McGuire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature* 1994; 371: 508–510.
- Clark TG, Diakite M, Auburn S, Campino S, Fry AE, Green A và cs. Tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha polymorphisms and severe malaria in African populations. *J Infect Dis* 2009; 199: 569–575.
- Ackerman HC, Ribas G, Jallow M, Mott R, Neville M, Sisay-Joof F và cs. Complex haplotypic structure of the central MHC region flanking TNF in a West African population. *Genes Immun* 2003; 4: 476–486.
- Newton JL, Harney SM, Timms AE, Sims AM, Rockett K, Darke C và cs. Dissection of class III major histocompatibility complex haplotypes associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2122–2129.
- Mfuna EL, Cormier C, Bosse Y, Filali-Mouhim A, Desrosiers M. Association of IL1A, IL1B, and TNF gene polymorphisms with chronic rhinosinusitis with and without nasal polyposis: a replication study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 136: 187–192.
- Karjalainen J, Hukkonen J, Pessi T, Huhtala H, Nieminen MM, Aromaa A và cs. The IL1A genotype associates with atopy in nonasthmatic adults. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110: 429–434.
- Sims AM, Timms AE, Bruges-Armas J, Burgos-Vargas R, Chou CT, Doan T và cs. Prospective meta-analysis of interleukin 1 gene complex polymorphisms confirms associations with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1305–1309.
- Han W, Kang SY, Kang D, Park SK, Lee JY, Kim H và cs. Multiplex genotyping of 1107 SNPs from 232 candidate genes identified an association between IL1A polymorphism and breast cancer risk. *Oncol Rep* 2013; 29: 763–769.
- Walley AJ, Aucan C, Kwiatkowski D, Hill AV. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms and susceptibility to clinical malaria in a Gambian case-control study. *Eur J Hum Genet* 2004; 12: 132–138.
- Gyan B, Goka B, Cvetkovic JT, Perlmann H, Lefvert AK, Akanmori B và cs. Polymorphisms in interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist genes and malaria in Ghanaian children. *Scand J Immunol* 2002; 56: 619–622.
- Ho AW, Gaffen SL. IL-17RC: a partner in IL-17 signaling and beyond. *Semin Immunopathol* 2010; 32: 33–42.
- Toy D, Kugler D, Wolfson M, Vanden Bos T, Gurgel J, Derry J và cs. Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J Immunol* 2006; 177: 36–39.
- van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Kullberg BJ, van der Meer JW, Joosten LA, Netea MG. Th17 responses and host defense against microorganisms: an overview. *BMB Rep* 2009; 42: 776–787.
- Eid NA, Hussein AA, Elzein AM, Mohamed HS, Rockett KA, Kwiatkowski DP và cs. Candidate malaria susceptibility/ protective SNPs in hospital and population-based studies: the effect of substructuring. *Malar J* 9:119.
- Fumagalli M, Pozzoli U, Cagliani R, Comi GP, Riva S, Clerici M và cs. Parasites represent a major selective force for interleukin genes and shape the genetic predisposition to autoimmune conditions. *J Exp Med* 2009; 206: 1395–1408.
- Jallow M, Teo YY, Small KS, Rockett KA, Deloukas P, Clark TG và cs. Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa. *Nat Genet* 2009; 41: 657–665.
- Phu NH, Tuan PQ, Day N, Mai NT, Chau TT, Chuong LV và cs. Randomized controlled trial of artesunate or artemether in Vietnamese adults with severe falciparum malaria. *Malar J* 9: 97.
- Tran TH, Day NP, Nguyen HP, Nguyen TH, Tran TH, Pham PL và cs. A controlled trial of artemether or quinine in Vietnamese adults with severe falciparum malaria. *N Engl J Med* 1996; 335: 76–83.