

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự xuất hiện của artemisinin (ART) và dẫn chất vào đầu thập kỉ 70 đã làm thay đổi hẳn tình hình bệnh sốt rét (SR) ở Việt nam. Tuy nhiên những nghiên cứu gần đây cho thấy đã có sự giảm hiệu lực điều trị của artesunat, một dẫn chất của ART tại biên giới Thái Lan-Campuchia. Vì thế chương trình PCSR đã đưa vào sử dụng các thuốc phối hợp trong đó có Arterakin. Việc giám sát hiệu lực của Arterakin đồng thời đánh giá tình trạng kháng CQ của *P. falciparum* là cần thiết. Vì vậy mục tiêu của nghiên cứu này là:

- 1. Đánh giá hiệu lực điều trị của Arterakin trên bệnh nhân sốt rét do *P. falciparum* chưa biến chứng tại Quảng Trị và Đăk Nông.**
- 2. Xác định tỷ lệ kháng chloroquin trên của các phân lập *P. falciparum* tại điểm nghiên cứu bằng kỹ thuật PCR.**

## Ý NGHĨA CỦA ĐỀ TÀI

1/Lần đầu tiên đánh giá hiệu lực của Arterakin trên quần thể bệnh nhân được xác định nhạy/kháng với CQ bằng kỹ thuật PCR và cho thấy sự kháng CQ của *P. falciparum* không ảnh hưởng tới hiệu lực của thuốc

2/Kết quả nghiên cứu cho thấy Arterakin vẫn có hiệu lực điều trị cao trong nhưng cũng bắt đầu cho thấy sự giảm hiệu lực của thuốc.

3/Khẳng định tỷ lệ kháng CQ ở hai điểm nghiên cứu vẫn cao trong khi các báo cáo gần đây cho thấy CQ có xu hướng nhạy cảm trở lại.

## CẤU TRÚC CỦA LUẬN ÁN

Luận án gồm 120 trang không kể tài liệu tham khảo và phụ lục trong đó: Đặt vấn đề 2tr. Tổng quan 33tr. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 25tr. Kết quả 31tr. Bàn luận 23tr. Kết luận 2tr. Kiến nghị 1tr và các công trình đã công bố. Tài liệu tham khảo. Phụ lục. Hình ảnh của luận án.

# CHƯƠNG I

## TỔNG QUAN

### 1.1. Ký sinh trùng sốt rét và sốt rét kháng thuốc

#### 1.1.1. Đại cương về ký sinh trùng sốt rét.

##### *Các loài KSTSR:*

Có 4 loài ký sinh trùng sốt rét cổ điển gây bệnh cho người

*P. malariae* (Laveran, 1881)

*P. vivax* (Grassi & Feletti, 1890)

*P. falciparum* (Welch, 1897)

*P. ovale* (Stephen, 1922) *P. knowlesi* được phát hiện năm 1931 ở khỉ, năm 2004 thấy ở người.

#### 1.1.2- các khái niệm liên quan tới kháng thuốc.

Sự đề kháng của một chủng KSTSR với một loại thuốc mà trước đó vẫn có tác dụng được định nghĩa như sau:

*"Khả năng một chủng KST có thể sống sót và nhân lên mặc dù người bệnh đã được điều trị và hấp thụ một liều lượng thuốc bằng hoặc cao hơn liều quy định trong giới hạn chịu đựng của cơ thể"* (WHO 1976)

Mức độ nhạy cảm của một thuốc được xác định theo nghiệm pháp in vivo 28 ngày trước đây “ Là mật độ KST giảm 75% sau 48 giờ điều trị so với ngày đầu, sau đó sạch hẳn vào ngày thứ 6 và 7 không xuất hiện lại KST trong vòng 28 ngày sau điều trị “. Sau này Bruce-Chwatt và cs đã bổ sung thêm như sau:

- Một thuốc có tác dụng chống lại KST là thuốc phải có khả năng thâm nhập vào KST và HC bị nhiễm trong một khoảng thời gian.

” Thất bại điều trị ” là một khái niệm sử dụng nhiều trong nghiên cứu hiệu lực thuốc SR và được định nghĩa như sau:

- Thất bại điều trị là tình trạng một thuốc mất khả năng làm sạch KST trong máu hoặc xuất hiện các triệu chứng nặng lên mặc dù đã được điều trị đủ liều theo qui định.

### **1.1.3- Ký sinh trùng sốt rét kháng thuốc và các yếu tố ảnh hưởng tới kháng thuốc.**

#### **1.1.3.1.P. falciparum kháng thuốc.**

- **Kháng chloroquin và các thuốc cùng nhóm (amodiaquin, PQP):**

Đột biến ở gen *Pfcr* quy định hoạt động của quá trình bơm thuốc từ đó làm giảm nồng độ thuốc trong KST trong đó đột biến ở điểm 76 chuyển Lysin thành Threonin mang ý nghĩa quyết định.

- **Kháng các thuốc nhóm antifolat:**

Những nghiên cứu về di truyền ở Trung Mỹ và Thái Lan cho thấy sự đột biến trên gen *Pdhfr* tại bộ mã *Ser108Asn*. Đột biến ở vị trí này quyết định tính kháng pyrimethamin.

Với sulfadoxin. đột biến trên gen *Pfdhps* ở điểm 437 và 540 được xác định là quyết định tính kháng các sulfamides của KST.

- **Kháng thuốc kết hợp pyrimethamin-sulfadoxin.**

Cơ chế kháng pyrimethamin-sulfadoxin là ức chế quá trình sinh tổng hợp acid folic do đột biến trên gen *Pfdhfr* và *Pfdhps*.

- **Kháng amino- alcohol**

Kháng MEF và LUM liên quan mật thiết của gen *Pfmdr1* do đột biến điểm tại *Asn86Tyr* trên gen này

- **Kháng atovaquon và các thuốc tương tự.**

Kháng lại atovaquon có liên quan đến một đột biến đơn độc trên gen cytochrom b (*cytB*) gồm các điểm *Tyr268Asn*, *Tyr268Ser* hoặc *Tyr268Cys*.

- **Kháng quinin.**

Cơ chế kháng quinin của *P. falciparum* khá phức tạp. Các nghiên cứu bằng kính hiển vi điện tử cho có một gen liên quan tới quá trình trao đổi các

cation  $H^+/Na^+$  gọi là gen *Pfnhe-1*. Đột biến tại điểm ms4760 của gen này liên quan tới ảnh hưởng của quinin với KST.

• **Kháng artemisinin và dẫn chất.**

Sự giảm nhạy với ART và dẫn chất đã được nói đến trong một số nghiên cứu gần đây bằng phương pháp đồng vị, kết quả cho thấy là đột biến ở gen kí hiệu là *Pfmdr1* có khả năng gây đa kháng.

**1.1.3.2. *P. vivax* kháng thuốc.**

• **Kháng chloroquin**

Báo cáo đầu tiên về *P. vivax* kháng CQ vào năm 1980 tại Indonesia và Papua Newguinea. Cơ chế kháng CQ của *P. vivax* là đột biến ở *Tyr976Phe* của gen *Pvmdr-1*. Mặc dù vậy, cho tới nay CQ vẫn được sử dụng trong điều trị SR do *P. vivax*

**1.1.3.3. *Malariae* và *P. ovale* kháng thuốc.**

Chỉ có một nghiên cứu đơn lẻ duy nhất của Maguire và cs năm 2002 báo cáo về tình trạng *P. malariae* và *P. ovale* kháng lại CQ tại Indonesia. **1.1.3.4.**

**Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình kháng thuốc**

Một số yếu tố thường được nhắc tới liên quan đến quá trình phát sinh, phát triển kháng thuốc là: Uống thuốc không đủ liều, thuốc không đảm bảo chất lượng, sử dụng có tác dụng đối kháng, đáp ứng tự nhiên của cơ thể.

**1.2- Tình hình Sốt rét kháng thuốc khu vực tiểu vùng sông Mekong và chiến lược phòng chống**

**1.2.1. Tình hình sốt rét kháng thuốc tại tiểu vùng sông Mekong ( GMS )**

**1.2.1.1. Kháng các phác đồ đơn trị liệu**

• **Kháng chloroquin.**

*P. falciparum* kháng CQ đầu tiên được ghi nhận tại Nha Trang năm 1961. Năm 1982 tỷ lệ kháng lên tới 100%. Từ 1996 trở lại đây CQ có xu hướng nhạy cảm trở lại ở một số tỉnh.

- **Kháng sulfadoxin - pyrimethamin** có tỷ lệ kháng cao tới 73,6%
- **Kháng quinin:** Tại Campuchia là 100%. Tại Việt Nam, là 27,7%
- **Kháng mefloquin:** Tỷ lệ kháng MEF tại Myanmar và Việt Nam là 40%
- **Kháng artemisinin và dẫn chất:** Khu vực biên giới Thái Lan-Campuchia là nơi đầu tiên ghi nhận bằng chứng của *P. falciparum* kháng lại ART

#### 1.2.1.2. Giảm nhạy cảm với các ACT<sub>s</sub>

- **Artesunat-amodiaquin:** Khu vực GMS có Việt Nam và Myanma
- **Artesunat-mefloquin:** Campuchia và Thái Lan có tỷ lệ thất bại điều trị cao  $\geq 10\%$
- **Artemether - lumefantrin:** Campuchia và Myanmar có tỷ lệ thất bại cao tới 26,1% (2001) và 28,9% (2002)
- **Dihydroartemisinin-piperaquin (Arterakin):** Ở Việt Nam hiệu lực của Arterakin vẫn cao, tuy nhiên bắt đầu giảm nhạy cảm với *P. falciparum*

### 1.3. Arterakin và hiệu quả của nó trong điều trị sốt rét do *P. falciparum* chưa biến chứng

#### 1.3.1. Thông tin về Piperaquin, một thành phần của Arterakin

PQ có xu hướng nhạy cảm trở lại trong thành phần của các kết hợp thuốc dạng ACT. piperaquin có trọng lượng phân tử  $M=535,5\text{g/mol}$ , có cấu trúc phân tử là 1,3-bis-{4-(7-chloroquinolyl-4)-piperazinyl-1}- propane Dạng base (PQ) có công thức hoá học là  $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_6$ . Dạng muối tetra photphat (PQP) có công thức  $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{Cl}_2\text{N}_6 \cdot 4\text{H}_3\text{PO}_4$

#### 1.3.2. Sự tương đồng giữa hai thuốc chloroquin và piperaquin

- Sự tương đồng về cấu trúc giữa piperaquin và chloroquin

Cùng có cấu trúc chung là nhóm chức 7-chloro-4 aminoquinolein,

- Sự tương đồng về cơ chế tác động giữa piperaquin và chloroquin
- Sự kháng chéo giữa piperaquin và chloroquin

### **1.3.3- Hiệu quả của thuốc kết hợp Arterakin trong điều trị sốt rét do *P. falciparum* chưa biến chứng.**

Viên nén Arterakin bao gồm DHA (40 mg) + PQ (320 mg) được thử nghiệm và đánh giá tính an toàn và hiệu lực điều trị từ năm 2001. Arterakin có tính an toàn, hiệu lực cao trên thế giới với tỷ lệ khỏi bệnh từ 90,4% đến 98,3%. Tuy nhiên sau một thời gian sử dụng, thuốc này bắt đầu bộc lộ những dấu hiệu cho thấy sự giảm hiệu lực điều trị với *P. falciparum*.

## **1.4. kỹ thuật sinh học phân tử trong nghiên cứu kháng thuốc**

### **1.4.1. Nguyên lý của kỹ thuật PCR**

Phương pháp Polymerase Chain Reaction (PCR) được Karry Mullis- nhà hoá sinh học người Mỹ đề xuất vào năm 1985. Đoạn AND cần nghiên cứu sẽ được nhân lên theo hàm số mũ  $2^n$ .

### **1.4.2. Ứng dụng kỹ thuật PCR trong nghiên cứu sốt rét**

- Kỹ thuật PCR trong phân biệt tái phát và tái nhiễm

Nhờ xác định kiểu gen ở 3 locus MSP1, MSP2, GLURP của KST, chúng ta có thể nhận biết được tái phát hay tái nhiễm.

- Kỹ thuật PCR trong phát hiện KST kháng thuốc

Nhờ sử dụng PCR người ta đã xác định được đột biến có tính quyết định đến kháng CQ là gen *Pfcr* trên nhiễm sắc thể số 7 của *P. falciparum*

## CHƯƠNG II

# ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng, tiêu chuẩn chọn bệnh nhân

#### 2.1.1. Đối tượng nghiên cứu:

Đối tượng nghiên cứu cho cả thử nghiệm lâm sàng và đánh giá kháng chloroquin là tất cả các bệnh nhân được chẩn đoán là Sốt rét do *P. falciparum* chưa có biến chứng.

#### 2.1.2. Tiêu chuẩn chọn bệnh nhân:

- Từ 6 tháng tuổi - 60 tuổi.
- Có sốt với nhiệt độ cặp nách  $> 37^{\circ}5$
- Mật độ *P. falciparum* thể vô tính trong máu  $\geq 1000$

#### 2.1.3. Tiêu chuẩn loại trừ :

- Trẻ dưới 6 tháng tuổi hoặc người lớn trên 60 tuổi.
- Có các dấu hiệu của SR nặng, biến chứng
- Nhiễm phối hợp hoặc nhiễm đơn các loài *Plasmodium* khác

#### 2.1.4 địa điểm, thời gian nghiên cứu

- Địa điểm thực hiện đề tài.

Đề tài được tiến hành tại 2 khu vực có SR lưu hành là Quảng Trị giáp với Lào và Đăk Nông giáp với Campuchia.

- Thời gian thực hiện đề tài: Từ 2008-2010

## 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**2.2.1- Thiết kế nghiên cứu.** Nghiên cứu là một thử nghiệm lâm sàng mở, không đối chứng (one arm). Một kiểu thiết kế nghiên cứu chủ yếu dùng trong giám sát hiệu lực điều trị của thuốc sốt rét (WHO 2005).

Giám sát hiệu lực điều trị của arterakin trên bệnh nhân SR do *P. falciparum* chưa biến chứng theo qui trình 28 ngày, sử dụng kỹ thuật PCR để xác định tái phát-tái nhiễm.

Đánh giá tình trạng kháng chloroquin của *P. falciparum* từ các phân lập trong phân giám sát hiệu lực thuốc bằng kỹ thuật PCR.

### 2.2.2- Phương pháp chọn mẫu.

các nghiên cứu cho thấy tỷ lệ thất bại với các phối hợp thuốc dihydroartemisinin - piperaquin khoảng < 5%. Với độ tin cậy là 95% chúng tôi chọn  $p = 0,1$  và độ chính xác  $d$  là 10% thì cỡ mẫu cho nghiên cứu được tính theo bảng qui định cỡ mẫu của WHO năm 1987 dưới đây 46

Tỷ lệ quần thể ( $P$ ) cho trước, mức độ tin cậy 95%										
$d$	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50
0.05	73	138	196	246	288	323	350	369	380	384
0.10	<b>18<sup>a</sup></b>	<b>35<sup>a</sup></b>	<b>49<sup>a</sup></b>	61	72	81	87	92	95	96

### 2.2.3. Thuốc và phác đồ dùng cho nghiên cứu

#### *Thuốc Arterakin:*

Viên Arterakin chứa 40 mg dihydroartemisinin (DHA) và 320 mg piperaquin (PIP) do xí nghiệp dược phẩm trung ương I sản xuất.

#### *Phác đồ điều trị:*

Nhóm tuổi	Số lượng viên (Arterakin) trong ngày			
	0 giờ	8 giờ	24 giờ	48 giờ
2 - 3 tuổi	0.5	0.5	0.5	0.5
3 - < 8 tuổi	1.0	1.0	1.0	1.0
8 - < 15 tuổi	1.5	1.5	1.5	1.5
$\geq 15$ tuổi	2.0	2.0	2.0	2.0

### 2.2.4. Quy trình tiến hành nghiên cứu và theo dõi.

#### 2.2.4.1. Quy trình đánh giá hiệu lực Arterakin trên lâm sàng



Nghiên cứu được tiến hành theo quy trình của Tổ chức y tế thế giới (WHO/MAL/96.1077).

Bệnh nhân có đủ tiêu chuẩn sẽ được lập danh sách nghiên cứu. KST và nhiệt độ được theo dõi ngày 1 lần cho đến khi hết sốt và sạch KST trong 2 ngày liên tiếp. Sau đó hàng tuần bệnh nhân được kiểm tra lại nhiệt độ, KSTSR vào các ngày  $D_7, D_{14}, D_{21}, D_{28}$

- Lam máu được soi tìm KST, Đếm số lượng từ 2 người độc lập sau đó được mã hoá theo địa điểm và ngày lấy lam từ  $D_0 - D_{28}$

- Làm PCR mẫu máu ngày  $D_0$  để loại trừ đồng nhiễm *P. vivax*

- Nếu ngày  $D_3$  chưa sạch ký sinh trùng phải lấy thêm mẫu máu vào các ngày  $D_{4,}, D_{5,}$ .( chỉ dừng khi 2 ngày liên tiếp âm tính).

- Nếu có sốt lại trong bất kỳ ngày nào từ  $D_7 - D_{28}$  thì người bệnh sẽ được lấy máu tìm KST, làm PCR để phân biệt tái phát, tái nhiễm theo quy trình.

#### **2.2.4.2. Quy trình phân biệt tái phát, tái nhiễm bằng PCR**

- So sánh kiểu gen của KST ngày  $D_0$  và ngày sốt lại (Từ 14-28)

- Giấy thấm được mã hoá giống mã của lam máu theo ngày và địa điểm nghiên cứu và bảo quản mẫu máu trong từng túi nilon riêng ở nhiệt độ  $-20^{\circ} C$

- Phân tích kiểu gen của *P. falciparum* trên 3 locus bằng kỹ thuật PCR. Nếu kiểu gen ở 3 locus trên có biểu hiện giống hệt nhau là tái phát. Nếu khác nhau chỉ ở một trong ba locus gen là nhiễm mới. Các đôi môi là:

- **Đối với locus *MSP1* sử dụng đôi môi có trình tự sau:**

M1-OF: 5'- CTA GAA GCT TTA GAA GAT GCA GTA TTG -3'

M1-OR: 5'- CTT AAA TAG TAT TCT AAT TCA AGT GGA TCA –

- **Đối với locus *MSP2* sử dụng đôi môi:**

M2-OF: 5'- ATG AGG GTA ATT AAA ACA TTA TCT ATT ATA -3'

M2-OR: 5'- CTT TGT TAC CAT AGG TAC ATT CTT -3'

- **Đối với locus *GLURP* sử dụng đôi môi:**

G-OF: 5'- TGA ATT TGA AGA TGT TCA CAC TGA AC -3'

G-OR: 5'- GTG GAA TTG CTT TTT CTT CAA CAC TAA -3'

### 2.2.4.3. Quy trình xác định đột biến kháng thuốc của *P. falciparum* tại điểm 76 bằng kỹ thuật PCR

- Lấy máu của tất cả bệnh nhân vào giấy thấm Whatman 3MM
- Bảo quản mẫu máu và xử lý trên máy PCR theo quy trình

Xác định điểm đột biến 76Lys→76Thr bằng cách sử dụng kỹ thuật nested PCR với đôi môi lồng ngoài để phát hiện sự kháng CQ của *P. falciparum* Phản ứng Nest1

TCRP1: 5'-CCG TTA ATA ATA AAT ACA CGC AG-3'

TCRP2: 5'-CGG ATG TTA CAA AAC TAT AGT ACC C-3'

#### Phản ứng Nest2:

- Xác định lysine tại điểm 76 bằng đôi môi

76Com: 5'-CGA GCG TTA TAC AGA ATT AG -3'

76W: 5'-TTA AAG TTC TTT TAC CAA AAA TTT-3'

- Xác định threonine tại điểm 76 bằng đôi môi

76Com: 5'-CGA GCG TTA TAC AGA ATT AG-3'

76M: 5'-TTA AAG TTC TTT TAC CAA AAA TGT-3'

Dựa vào các thang đo (ladders) chuẩn và phần mềm LabWorks 4.0 với hệ thống chụp ảnh kỹ thuật số *Imaging Systems SDS - 8000* để tính kích thước sản phẩm PCR thu được sau khi điện di.

## 2.3. Các kỹ thuật sử dụng trong nghiên cứu.

### 2.3.1 Kỹ thuật xét nghiệm tìm ký sinh trùng.

#### Lấy lam máu:

Lấy máu đầu ngón tay, làm lam máu giọt đặc và giọt đàn, nhuộm Giemsa soi kính hiển vi tìm KST. Lam máu giọt đặc chỉ được kết luận là âm tính khi soi đủ 100 vi trường. Lam máu giọt đàn chỉ lấy vào ngày D<sub>0</sub>, D<sub>26</sub> và ngày sốt lại

Mật độ KST/mm<sup>3</sup> được tính toán theo công thức như sau:

Số KST đếm được x 8000

$$\text{Mật độ KST/mm}^3 = \frac{\text{Số KST đếm được} \times 8000}{\text{Số bạch cầu đếm được}}$$

### 2.3.2. Kỹ thuật phân biệt tái phát, tái nhiễm và xác định đột biến kháng chloroquin tại điểm 76 bằng PCR

#### Tách chiết ADN:

Kỹ thuật của Plowe và cs năm 1995, kỹ thuật này được sử dụng nhiều

- Cắt mẫu máu bệnh nhân trên giấy thấm Whatman thành nhiều mảnh nhỏ rồi bỏ vào ống nhựa có dung tích 1,5ml
- Thêm vào ống chứa sinh phẩm 1ml hỗn dịch gồm Saponin 0,5% và PBS có pH 7,4.
- Ủ ở nhiệt độ 37°C trong 30ph rồi ly tâm tốc độ cao loại bỏ dịch nổi
- Rửa 3 lần với 1ml/ lần dung dịch PBS pH 7,4
- Thêm vào ống sinh phẩm 150µl 10% dung dịch Chelex- 100
- Đun sôi trong 8 phút rồi ly tâm lấy dịch nổi và bảo quản ở -20°C

#### Thực hiện phản ứng PCR trên máy:

Mẫu máu bệnh nhân trên giấy thấm được sử dụng để phân biệt tái phát hoặc tái nhiễm dựa vào phân tích kiểu gen trên 3 locus gen MSP1, MSP2, GLURP .xác định đột biến kháng thuốc của *P. falciparum* tại điểm 76 bằng.

máy luân nhiệt Eppendorf hoặc GenAmp PCR System 9700

### 2.3.3. Kỹ thuật điện di sản phẩm thu được từ phản ứng PCR

Các sản phẩm thu được sau khi nhân bản ADN sẽ được phân tích bằng kỹ thuật điện di agarose gel có chứa 25µg ethidium bromide. Đoạn ADN được nhân bản sẽ hiển thị trên thang đo bằng các vạch sáng tương ứng với trọng lượng đặc thù của chúng.

#### Đánh giá kết quả điện di.

- Đối với Locus MSP1, sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose gel 3% có chứa 25µg ethidium bromide gồm:

Kiểu gen K1 có trọng lượng	142-295 bp
Kiểu gen MAD20 có trọng lượng	100-250 bp
Kiểu gen RO33 có trọng lượng	160 bp

- Đối với Locus MSP2 sản phẩm được điện di trên thạch agarose 2,5%

Kiểu gen FC có trọng lượng	220-550 bp
Kiểu gen IC có trọng lượng	400-750 bp

- Đối với Locus GLURP sản phẩm được điện di trên thạch agarose 1,5%.  
có trọng lượng 470-1200bp.

## 2.4. Vật liệu, phương tiện sử dụng trong nghiên cứu

### 2.4.1. Vật liệu và phương tiện dùng đánh giá hiệu lực Aterakin

- Giemsa mẹ
- Potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Disodium hydrogen phosphate  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- Kính hiển vi với vật kính dầu, độ phóng đại 10 x 100,
- Bộ micro test thử thai ngén que thử HIV test nhanh

### 2.4.2- Vật liệu, phương tiện dùng cho kỹ thuật PCR

\***Mẫu vật:** 30-50  $\mu\text{l}$  máu bệnh nhân sốt rét vào giấy thấm Whatman 3MM .

\* **Hệ thống môi:**

- Hệ thống môi để xác định đột biến kháng CQ của *P. falciparum*.  
TCRP1, TCRP2, TCRP3, TCRP 4W, TCRP 4M
- Hệ thống môi xác định kiểu gene *P. falciparum*. M1-OF, M1-OR, M1-2MF, M1-2MR, M1-2KF, M1-2KR, M1-2RF, M1-2RR, M2-OF, M2-OR, M2-ICF, M2-ICR, M2-FCF, M2-FCR, G-OF, G-OR, G-FN.

\* **Các hoá chất sử dụng cho tách chiết, tinh khiết ADN và phản ứng PCR**

## 2.5. Các chỉ số cần thu thập:

- Các thông tin trước điều trị
- Thời gian cắt sốt, cắt ký sinh trùng

- Tỷ lệ KST kháng thuốc theo địa dư.
- Liên quan giữa kháng thuốc và tuổi, giới.
- Liên quan giữa số lượng KST và nhiệt độ ngày  $D_0$
- Diễn nhiệt độ từ  $D_0$ - $D_3$ . Diễn biến KST từ  $D_0$ - $D_3$
- So sánh diễn biến KST giữa 2 nhóm kháng và không kháng CQ
- Đáp ứng điều trị : Theo tiêu chuẩn của WHO.

## 2.6. Phân tích số liệu

Số liệu sẽ được nhập bởi 2 người độc lập. Xử lý số liệu bằng phần mềm Statar

## 2.7. vấn đề đạo đức trong nghiên cứu

### 2.7.1 Sự tự nguyện.

- Các bệnh nhân tham gia nghiên cứu đều được giải thích rõ, kí cam kết tự nguyện tham gia. Nếu là trẻ em dưới 16 tuổi cần có sự đồng ý của bố, mẹ hoặc người bảo trợ (Phụ lục 10)

### 2.7.2 Các dịch vụ chăm sóc sức khỏe.

- Các bệnh nhân tham gia nghiên cứu sẽ được cung cấp thuốc điều SR trị dịch truyền, các loại vitamin bổ trợ miễn phí.

- Trong trường hợp có phản ứng **không mong muốn**, người bệnh sẽ được cho thuốc hoặc đưa đi bệnh viện. Đối với các bệnh nhân không đủ tiêu chuẩn nhưng có KSTSR vẫn được điều trị miễn phí theo quy định.

- Các bệnh nhân được phát hiện những vấn đề về sức khoẻ mặc dù không liên quan đến SR sẽ được tư vấn đi khám, chữa bệnh.

### 2.7.3 Xử trí các trường hợp điều trị thất bại:

+ Được thay thuốc điều trị khác nếu cần như quinnin sulphat phối hợp doxycyclin clindamycin hoặc Artesunat theo hướng dẫn của Bộ Y tế.

## Chương III: KẾT QUẢ

### 3.1. Đánh giá hiệu lực điều trị của Arterakin

#### 3.1.1. Các thông tin về đối tượng nghiên cứu.

**Bảng 3.1. Các thông tin về bệnh nhân**

Địa điểm	Quảng Trị	Đăk Nông	Tổng số
Số bệnh nhân	65	59	124
Nam (%)	29 (45%)	49 (82%)	78
Nữ (%)	36 (55%)	10 (18%)	46
Tuổi TB (Min-Max)	16,9 (0,8-55)	25,1 (2 –60)	20,8 (0,8-70)
< 5 tuổi (n)	6	3	9
5 - 15 tuổi (n)	29	6	35
> 15 tuổi (n)	30	50	80

- Tổng số ca bệnh đủ tiêu chuẩn nghiên cứu ở 2 tỉnh Quảng Trị và Đăk Nông là 124 trường hợp trong đó Quảng Trị có 65 ca, Đăk Nông có 59 ca

#### 3.1.2. Các thông tin về bệnh sốt rét

**Bảng 3.2. Các thông tin về nhiệt độ và mật độ KST**

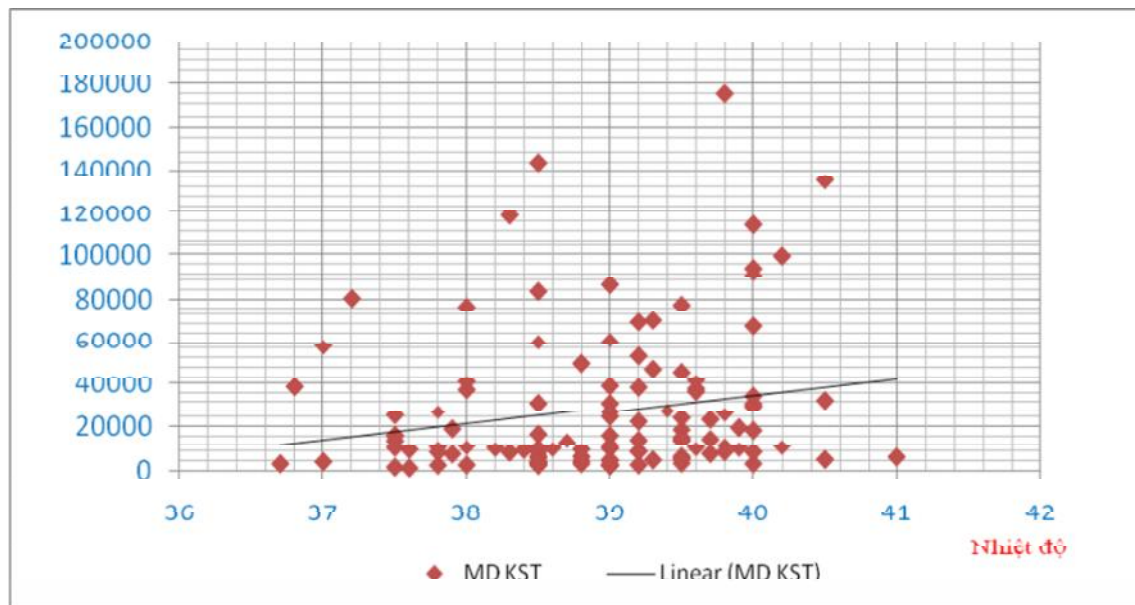
Địa điểm	Quảng Trị	Đăk Nông	Tổng số
Số bệnh nhân	65	59	124
Nhiệt độ TB ngàyD <sub>0</sub>	39,0± 0,9	38,8±0,9	38,9 ± 0,9
t, p	t = 1,79 p> 0.05		
Số ca sốt < 39 <sup>0</sup> (%)	23(35,4%)	29(49,1%)	52(42%)
Số ca sốt ≥ 39 <sup>0</sup> (%)	42 (64,6%)	30 (50,9%)	72(58%)
χ <sup>2</sup> , p	χ <sup>2</sup> = 2,4076; p > 0,05		
Mật độ TB KST D <sub>0</sub> (Geometric) 95%CI	12.230 (9.066- 16.513)	17.074 (13.02 -23..26)	14.470 (11.74- 17.82)
t, p	t = - 0,65; p > 0.05		

- Nhiệt độ trung bình chung cho 124 trường hợp nghiên cứu ngày  $D_0$  là  $38,9^{\circ}\text{C} \pm 0,9$ .

- Số sốt cao  $\geq 39^{\circ}\text{C}$  có 72/124 trường hợp, chiếm 58%

- Tỷ lệ có sốt  $\geq 39^{\circ}\text{C}$  ở Quảng Trị là 64,6% cao hơn ở Đăk Nông là 50,9% nhưng không khác biệt có ý nghĩa với  $p > 0,05$

- Mật độ KST trung bình/  $\text{mm}^3$  của ngày  $D_0$  là 14.470 trong đó tại Quảng trị là 12.230 , thấp hơn ở Đăk Nông là 17.074.



**Hình 3.6. Liên quan giữa mật độ KST ngày  $D_0$  và nhiệt độ**

Có mối tương quan tuyến tính giữa mật độ KST và nhiệt độ theo hàm số sau

$$\text{Nhiệt độ} = 38,8 + 4,7 \cdot 10^{-6} \cdot \text{KST}$$

- Ý nghĩa của hàm trên: mỗi khi KST tăng thêm 1 con thì nhiệt độ tăng bình quân  $4,7 \cdot 10^{-6}$  độ (hay khi KST tăng 1000 con thì nhiệt độ tăng bình quân 0.0047 độ).

- Tuy nhiên mô hình trên có hệ số tương quan rất nhỏ  $R = 0,178$  thể hiện mối liên hệ rất lỏng lẻo. Hệ số xác định  $R^2 = 0,032$  có nghĩa mô hình chỉ giải thích được 3,2% sự thay đổi của nhiệt độ do KST.

**Một cách khác:**

Dùng phương pháp kiểm định mối liên hệ giữa nhiệt độ và mật độ KST (giả thiết  $H_0$ ) cho kết quả  $P = 0,79$ . Điều này cũng có nghĩa mối liên hệ trên không có ý nghĩa.

### 3.1.3. Hiệu quả của Arterakin trên bệnh nhân SR do *P. falciparum* chưa biến chứng.

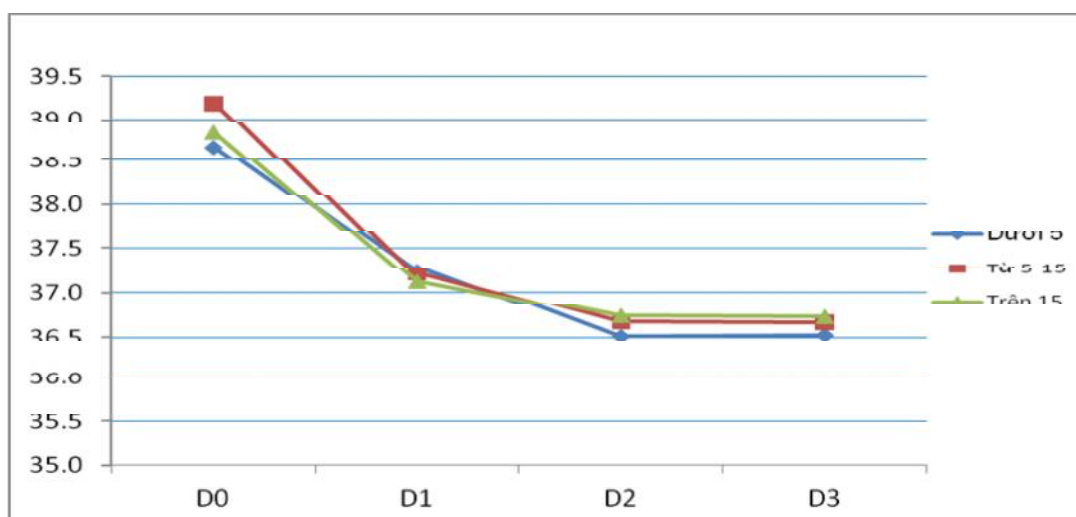
#### 3.1.3.1. Thời gian cắt sốt.

**Bảng 3.8. Thời gian cắt sốt của Arterakin**

Địa điểm	Quảng Trị		Đăk Nông		Tổng số	
Sốt ngày $D_0$	65/65 (100%)		59/59 (100%)		124/124 (100%)	
Sốt ngày $D_1$	22	34%	16	27%	38	31%
Sốt ngày $D_2$	0		0		0	100%
Sốt ngày $D_3$	0		0		0	100%
Thời gian cắt sốt TB (ngày)	1,33 ± 0,47		1,27±0,45		1,31 ± 0,46	
P	> 0.05					

Thời gian cắt sốt trung bình chung cho toàn bộ nghiên cứu là  $1,31 \pm 0,46$  ngày. Không có sự khác biệt về thời gian cắt sốt trung bình giữa 2 điểm nghiên cứu với  $p > 0,05$ .





**Hình 3.13. Phân bố nhiệt độ trung bình /ngày theo nhóm tuổi**

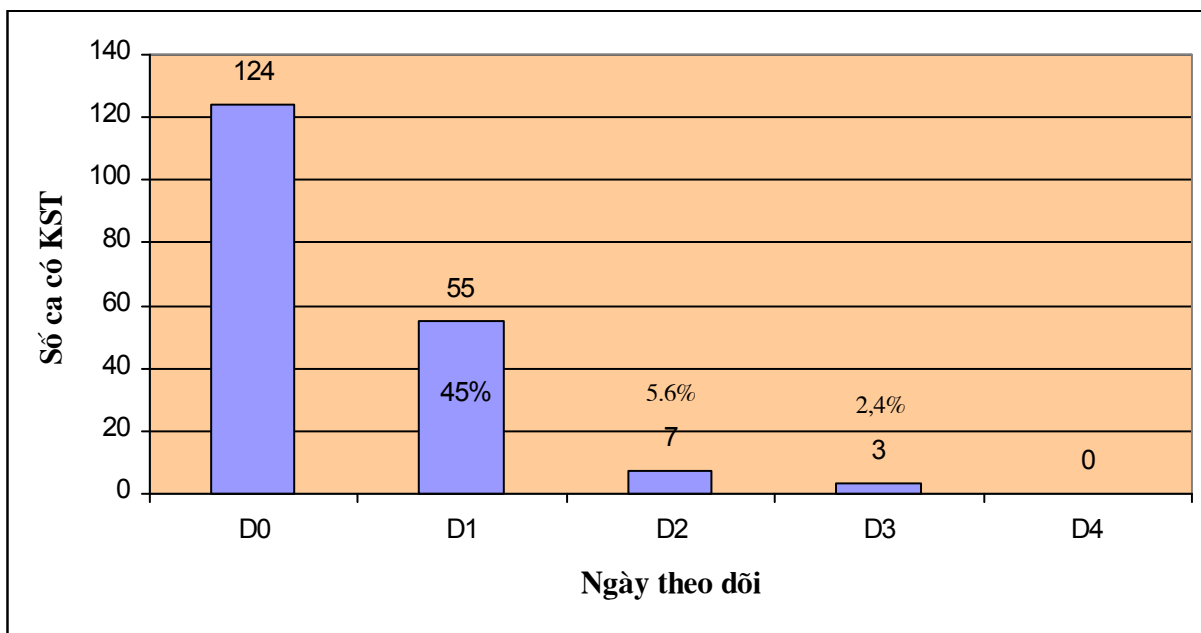
Không có trường hợp nào còn sốt từ ngày D<sub>2</sub> trở đi

### 3.1.3.2 Thời gian cắt ký sinh trùng

**Bảng 3.10. Thời gian cắt KST của Arterakin**

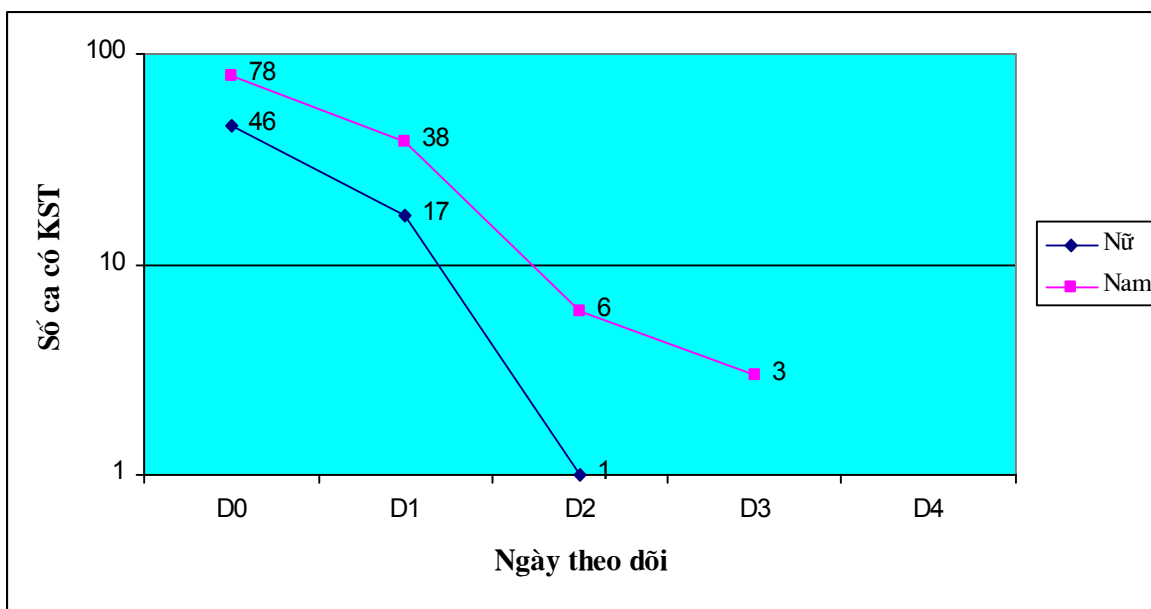
Địa điểm	Quảng Trị		Đăk Nông		Tổng số	
N	65		59		124	
D1	42	64,6%	27	45,8%	69	55,7%
D2	64	98,7%	53	89,9%	117	94,4%
D3	65	100%	56	94,2%	121	97,6%
Thời gian cắt KST TB (ngày)	1,37 ± 0,52		1,69 ± 0,79		1,52 ± 0,68	
P	< 0.05					

Thời gian cắt ký sinh trùng tại Đăk Nông dài hơn tại Quảng Trị với sự khác biệt rất rõ rệt ( $p < 0,05$ ).



**Hình 3.14. Diễn biến KST từ ngày D<sub>0</sub>- D<sub>4</sub>**

Thời gian cắt KST cho toàn bộ bệnh nhân nghiên cứu ở cả hai Tỉnh là 3 ngày từ D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> với số ca còn KST lần lượt là 55, 7, 3



**Hình 3.15. Diễn biến KST/ ngày theo giới nam/nữ**

### 3.1.3.3 Hiệu quả điều trị trên lâm sàng của Arterakin

**Bảng 3.12 Hiệu quả điều trị của Arterakin sau xác định PCR**

Phân loại đáp ứng điều trị	ACPR (%)	ETF (%)	LTF/LP (%)
Quảng Trị	64/64 (100%)	0	0
Đắk Nông	58/58(100%)	0	0
Tổng số	122/122(100%)	0	0

Tỷ lệ ACPR chung cho 2 điểm nghiên cứu là 100%

## 3.2. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ KHÁNG CHLOROQUIN BẰNG PCR

### 3.2.1. Tỷ lệ nhạy/kháng theo tổng số phân lập (kiểu gen)

**Bảng 3.14 Tỷ lệ % gen kháng, kháng + nhạy, nhạy với CQ**

Kiểu gen Điểm	Gen R		Gen R và S		Gen S	
	n	%	n	%	n	%
Chung cả 2 điểm	78	62,9	19	15,3	27	21,8
Tổng số	78 + 19 =97 97/143( 68%)		19		27+19 = 46 46/143 (32%)	

Tỷ lệ phân lập *P. falciparum* mang gen kháng, vừa kháng vừa nhạy và nhạy tại Quảng Trị và Đắk Nông tương đương nhau ( $p > 0,05$ ).

### 3.2.2. Kết quả theo tổng số mẫu máu

**Bảng 3.16 Phân bố nhạy và kháng theo địa dư**

Địa dư Số ca	Quảng Trị		Đắk Nông		Tổng số	
	n	%	n	%	n	%
Kháng	49/65	75	48/59	81	97/124	78

Nhạy	16/65	25	11/59	19	27/124	22
TS	65	100	59	100	124	100
	$\chi^2 = 0,65$ ( $p > 0,05$ )					

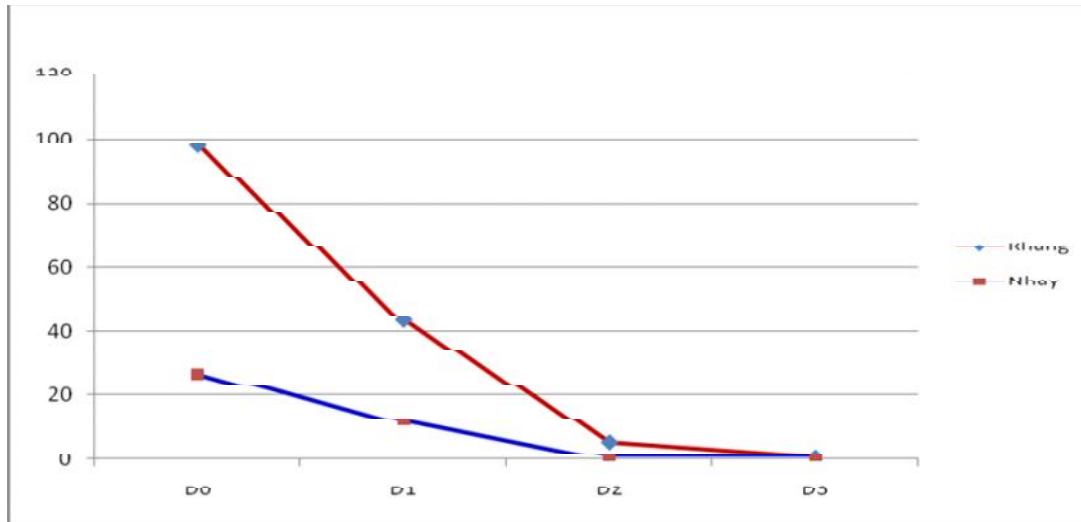
Không có sự khác biệt về tỷ lệ kháng CQ giữa hai điểm nghiên cứu với  $P > 0,05$ .

**Bảng 3.18. Tỷ lệ % kháng CQ theo nhóm tuổi**

Địa điểm Nhóm tuổi	Quảng Trị	Đăk Nông	Tổng số
	n 49/65	n 48/59	n 97/124
< 5 %	4/6 66,6	2/3 66,6	6/9 66,6
5 - 15 %	24/29 83	5/6 83,3	31/35 88,6
> 15 %	21/30 70	40/50 80	61/80 76,3
Tổng số%	75%	81%	78%

Nhóm 5-15 có tỷ lệ kháng là 88,6%, cao nhất trong ba nhóm trong đó ở Quảng Trị tỷ lệ này là 83%, Đăk Nông là 83,3%.

### 3.2.3. So sánh ảnh hưởng của Arterakin trên *P. falciparum* nhạy và kháng chloroquin



**Hình 3.20. Liên quan giữa nhảy/ kháng CQ với ngày sạch KST**

Ngày sạch KST ở nhóm nhảy với CQ là ngày D<sub>2</sub>, ngày sạch KST ở nhóm kháng CQ là ngày D<sub>3</sub>. Nói một cách khác nhóm kháng CQ có số ngày sạch KST dài hơn nhóm không kháng CQ.

**Bảng 3.20. Liên quan giữa hiệu lực điều trị, KST (+) ngày D<sub>3</sub> với kháng chloroquin**

KẾT QUẢ PCR	SỐ CA CÓ KST (+) NGÀY D <sub>3</sub>	TÁI NHIỄM	TỶ LỆ ACPR
NHẠY VỚI CQ	0	0	100%
KHÁNG VỚI CQ	3	2	100%

Cả 3 trường hợp còn KST ngày D<sub>3</sub> đều nằm trong nhóm có đột biến kháng CQ sau phân tích bằng PCR. Cả 2 trường hợp sốt lại trong vòng từ D<sub>21</sub>-D<sub>28</sub> cũng đều nằm trong nhóm kháng CQ.

## Chương IV: **BÀN LUẬN**

## **4.1. Hiệu lực của Arterakin trên bệnh nhân sốt rét do *P. falciparum* chưa biến chứng tại Quảng Trị và Đăk Nông**

### **4.1.1. Thời gian cắt sốt**

Thời gian cắt sốt trung bình của các bệnh nhân nghiên cứu là 1,3 ngày.

Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu dịch tễ học của một số tác giả như Hoàng Hà, Đình Việt Hà trong một nghiên cứu về bệnh SR giữa Tỉnh Quảng Trị (Việt Nam) và Savannakhet (Lào).

### **4.1.2. Thời gian cắt ký sinh trùng**

Thời gian cắt KST chung cho cả hai tỉnh là  $1,5 \pm 0,7$  ngày. Có sự khác biệt về thời gian sạch KST chung bình giữa hai tỉnh với  $p < 0,05$ . Chúng tôi cho rằng mật độ KST cũng góp phần tạo nên khác biệt này, có thể do tình trạng miễn dịch với SR thấp hơn ở những người dân vắng lai so với dân địa phương.

### **4.1.3. Hiệu quả điều trị của Arterakin (ACPR) theo dõi 28 ngày:**

Tỷ lệ ACPR chung là 98,4%. Tỷ lệ LTF/LPF chung là 1,6%, tương tự kết quả nghiên cứu của Looareesuwan S và Wilairatana P năm 1999 tại Thái Lan cũng cho kết quả 98,7% ACPR tương tự với kết quả của chúng tôi.

Kết quả điều trị của Arterakin trong nghiên cứu của chúng tôi sau khi phân tích 2 trường hợp sốt và xuất hiện KST lại vào ngày 28 là 100%. giống như kết quả nghiên cứu của Nông Thị Tiến ở Quảng Trị với CV Artekan.

## **4.2. TÌNH TRẠNG KHÁNG CHLOROQUIN TẠI HAI ĐIỂM NGHIÊN CỨU**

Có sự khác biệt về tỷ lệ kháng CQ trong nghiên cứu của chúng tôi (78%) với một số điểm nghiên cứu khác. Ngô Việt Thành tại Bình Phước nghiên cứu năm 2000 có sử dụng kỹ thuật PCR thấy tỷ lệ *P. falciparum* kháng CQ là 37,93%. Triệu Nguyên Trung 2001 trong một nghiên cứu tại Gia Lai thuộc Miền Trung-Tây Nguyên thấy tỷ lệ nhạy với CQ của *P. falciparum* là 87,5% chỉ có 12,5% kháng.

Lý giải sự khác biệt này chúng tôi cho rằng do khác nhau về địa điểm nghiên cứu nên dẫn tới khác biệt về chủng KST cũng như sự khác biệt về

đáp ứng miễn dịch của người dân địa phương từ đó ảnh hưởng tới tỷ lệ KST có đột biến kháng thuốc.

## KẾT LUẬN

### 1. Hiệu lực của Arterakin trên bệnh nhân sốt rét do *P.falciparum* chưa biến chứng tại Quảng Trị và Đăk Nông

1.1. Arterakin dạng viên do Xi nghiệp Dược phẩm Trung Ương 1 sản xuất vẫn có hiệu quả cao trong điều trị sốt rét do *P. falciparum* chưa biến chứng tại Quảng Trị và Đăk Nông với tỷ lệ ACPR đạt 100%.

1. 2. Ngày cắt sốt trung bình là 1,3. Ngày sạch kí sinh trùng trung bình là  $1,5 \pm 0,7$  ngày.

1. 3 Tỷ lệ KST còn dương tính ngày D<sub>3</sub> là 2,4%.

1. 4. Arterakin hầu như không có tác dụng phụ không mong muốn

1. 5. Hiệu lực của Arterakin không bị ảnh hưởng bởi tình trạng kháng chloroquin của *P. falciparum*.

### 2. Kết quả đánh giá kháng chloroquin bằng kỹ thuật PCR

2.1 Tỷ lệ xuất hiện đột biến tại điểm 76 trên gen *Pfprt* kháng chloroquin đơn thuần là 63%, tỷ lệ xuất hiện kết hợp nhạy-kháng là 15%, tỷ lệ xuất hiện nhạy với chloroquin đơn thuần là 22%.

2.2 Tỷ lệ mẫu máu mang gen đột biến kháng chloroquin chung tại 2 điểm nghiên cứu là 78%, trong đó ở Đăk Nông là 81%, ở Quảng Trị là 75%.

2.3 Nhóm tuổi 5-15 có tỷ lệ kháng chloroquin cao nhất là 81%, từ 15 tuổi trở lên có tỷ lệ là 76% nhóm < 5 tuổi có tỷ lệ kháng thấp nhất là 67%.

## KIẾN NGHỊ

1. Cần tiến hành đánh giá hiệu lực của các thuốc ACT nói chung và Arterakin nói riêng một cách thường quy để sớm phát hiện sự giảm nhạy cảm của thuốc và có biện pháp khắc phục

2. Tiếp tục giám sát diễn biến kháng thuốc của các thuốc sốt rét đã bị kháng như chloroquin v.v nhằm phát hiện sự nhạy cảm trở lại và đưa vào sử dụng trong thành phần thuốc kết hợp kiểu ACT.

3. Nghiên cứu về dược động học, cơ chế tác động của các ACT lên KSTSR