

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI



VŨ MINH ĐIỀN

**ĐẶC ĐIỂM LÂM SÀNG, CẬN LÂM SÀNG VÀ
KẾT QUẢ ĐIỀU TRỊ BỆNH DO *RICKETTSIACEAE*
TẠI BỆNH VIỆN BỆNH NHIỆT ĐỐI TRUNG ƯƠNG
(3/2015 – 3/2018)**

Chuyên ngành: Truyền nhiễm và các Bệnh Nhiệt đới

Mã số: 62720153

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

Hà Nội - 2019

**CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI**

Hướng dẫn khoa học:

GS.TS. Nguyễn Văn Mùi

PGS.TS. Bùi Vũ Huy

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được trình bày tại Hội đồng bảo vệ cấp trường
tại trường Đại học Y Hà Nội.

Hội giờ ngày tháng năm 2019.

Có thể tìm thấy luận án tại:

1. Thư viện quốc gia
2. Thư viện trường Đại học Y Hà Nội

**MỘT SỐ CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU
ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Vũ Minh Điền, Nguyễn Vũ Trung, Lê Thị Hối, Bùi Vũ Huy, Nguyễn Văn Mùi (2017). Nghiên cứu một số đặc điểm dịch tễ, lâm sàng và xét nghiệm ở bệnh nhân sốt mò điều trị tại Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương (3/2015 - 3/2017). *Tạp chí Truyền nhiễm Việt Nam*. Số 4(20), 11 - 16.
2. Vu Minh Dien, Nguyen Vu Trung, Le Thi Hoi, Bui Vu Huy, Nguyen Van Mui (2018). Clinical manifestations, paraclinical profiles and predictors of outcomes of Scrub Typhus at National Hospital for Tropical Diseases in northern Vietnam. *National Hospital for Tropical Diseases*. No. 3(23), 36 - 44.
3. Nguyen Vu Trung, Le Thi Hoi, Vu Minh Dien, et al. (2019). Clinical Manifestations and Molecular Diagnosis of Scrub Typhus and Murine Typhus, Vietnam, 2015 - 2017. *Journal of Emerging Infectious Diseases*. Vol. 25, No. 4, 633 – 641.

A. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh do *Rickettsiaceae* (Rickettsioses) là những bệnh lây truyền qua côn trùng, tiết túc (chấy, rận, ve, mò, mạt,...) do các vi khuẩn ký sinh nội bào thuộc họ *Rickettsiaceae* gây nên. Bệnh có đặc điểm dịch tễ học phức tạp, biểu hiện lâm sàng đa dạng từ nhẹ cho đến rất nặng, thậm chí có thể dẫn tới tử vong (từ 1,2 đến 9,0%) nếu không được chẩn đoán và điều trị đúng. Mặc dù bệnh do *Rickettsiaceae* đã được phát hiện từ đầu thế kỷ XIX, tuy nhiên đến nay bệnh vẫn lưu hành, đang có xu hướng lan rộng và là vấn đề sức khỏe mang tính toàn cầu nên được quan tâm nghiên cứu ở nhiều nước trên thế giới. Ở Việt Nam, nghiên cứu huyết thanh học trong cộng đồng cho thấy cũng có sự hiện diện cả ba nhóm bệnh do *Rickettsiaceae*. Tuy nhiên cho đến nay mới chỉ có một số nghiên cứu về đặc điểm của bệnh sốt mò mà chưa có nghiên cứu nào mô tả một cách đầy đủ và toàn diện về đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng cũng như các yếu tố tiên lượng mức độ nặng và tử vong của các bệnh do *Rickettsiaceae*. Do đó, để có thêm các tri thức khoa học giúp nâng cao năng lực cho các thầy thuốc lâm sàng trong việc chẩn đoán và điều trị các bệnh sốt do *Rickettsiaceae*, đặc biệt ở những nơi còn hạn chế về phương tiện và kỹ thuật chẩn đoán, chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu này nhằm 3 mục tiêu sau:

1. *Mô tả đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở bệnh nhân nhiễm Rickettsiaceae tại Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương (3/2015 – 3/2018).*

2. *Xác định các loài Rickettsiaceae gây bệnh sốt cấp tính ở bệnh nhân điều trị tại Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương.*
3. *Đánh giá kết quả điều trị và một số yếu tố tiên lượng nặng, tử vong ở bệnh nhân nhiễm Rickettsiaceae.*

TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Bệnh do *Rickettsiaceae* có đặc điểm phân bố đa dạng, biểu hiện lâm sàng không đặc hiệu, có những thể bệnh nặng dẫn đến suy đa tạng và tử vong nếu không được phát hiện sớm và điều trị kịp thời. Hiện nay, việc chẩn đoán bệnh chủ yếu dựa vào kinh nghiệm lâm sàng của thầy thuốc nên đôi khi bỏ sót chẩn đoán, điều trị không đúng, bệnh tiến triển nặng, xuất hiện các biến chứng và tử vong. Ở Việt Nam, mặc dù trước đây đã có một số báo cáo về sự lưu hành bệnh sốt mò và bệnh sốt chuột, tuy nhiên vẫn chưa có một nghiên cứu nào đề cập một cách hệ thống, toàn diện về các bệnh này. Vì vậy, để có thêm tri thức khoa học về đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng cũng như các yếu tố tiên lượng nặng và tử vong ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* giúp cho các bác sĩ lâm sàng tiếp cận chẩn đoán sớm, điều trị bệnh đúng, giảm các biến chứng và nguy cơ tử vong cho bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* là hết sức cần thiết.

CẤU TRÚC LUẬN ÁN

Luận án có độ dài 136 trang, trong đó Đặt vấn đề 2 trang; Tổng quan: 35 trang; Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 25 trang; Kết

quả: 37 trang; Bàn luận: 34 trang; Kết luận và kiến nghị 3 trang. Có 40 bảng; 16 biểu đồ; 2 sơ đồ, và 13 hình; 174 tài liệu tham khảo (cả Tiếng Anh và Tiếng Việt, trong đó có 76/174 (43,7%) tài liệu từ năm 2014 trở lại đây)

B. NỘI DUNG LUẬN ÁN

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Giới thiệu về bệnh do *Rickettsiaceae*

BỆNH DO *RICKETTSIACEAE* THƯỜNG CÚ NHIỀU TỒN GỌI, VỚI NHIỀU CÁCH PHÂN LOẠI KHÁC NHAU, THAY ĐỔI THEO TỪNG GIAI ĐOẠN. HIỆN NAY, ĐUA TRỒN SỰ KHÓC BIẾT VỀ DI TRUYỀN VÀ KHÔNG NGUYỄN CỦA CĂN NGUỖN GỖY BỆNH, BỆNH DO *RICKETTSIACEAE* Ở NGƯỜI ĐƯỢC PHÂN LÀM 5 NHÚM GỒM: NHÚM SỐT MŨ (SCRUB TYPHUS GROUP - STG) – THUỘC CHI *ORIENTIA*; NHÚM SỐT PHÁT BAN (TYPHUS GROUP - TG), NHÚM SỐT ĐỐM (SPOTTED FEVER GROUP – SFG), NHÚM CỔ ĐẾN (ANCESTRAL GROUP - AG) VÀ NHÚM CHUYỂN TIẾP (TRANSITIONAL GROUP - TRG), CỎC NHÚM NÀY THUỘC CHI *RICKETTSIA*.

Rickettsia Là CỎC VI KHUẨN GRAM ỒM, CỎC KÓCH THỨỚC NHỎ VỚI CHIỀU DÀI KHOẢNG 0,8 - 2,0 ẦM, CHIỀU RỘNG KHOẢNG 0,3 - 0,5 ẦM, KHỤNG CÚ LỤNG, KHỤNG DI ĐỘNG, ĐA HỖNH THỎI, HỖNH DẠNG THAY ĐỔI QUA CỎC GIAI ĐOẠN PHÁT TRIỂN: CỎC KHUẨN ĐỨNG RIỜNG RỄ HOẶC THÀNH TỪNG ĐỤI CÚ KHI XẾP THÀNH CHUỖI NGẮN HOẶC TỪNG ĐỒM TRONG HOẶC NGOÀI TẾ BÀO. BỘ GEN CỦA CỎC LOẠI THUỘC *Rickettsia* Là MỘT DNA ĐƠN DẠNG VỮNG, CỎC KÓCH THỨỚC LỚN ĐẾN 1,1-1,5 MB, BAO GỒM 877 - 1500 GEN TỰY THEO TỪNG LOẠI. CỎC TẠO VỎCH TẾ BÀO VÀ KHÔNG NGUYỄN CỦA *Orientia* KHỎC VỚI CỎC LOẠI *Rickettsia* KHỎC LÀ LỚP MÀNG NGOÀI DẦY HƠN MÀNG TRONG; THIẾU LỚP PEPTIDOGLYCAN VÀ LIPOPOLYSACCHARIDE VÀ KHỤNG CÚ PROTEIN MÀNG NGOÀI ROMPA VÀ ROMPB MÀ CỎC PROTEIN MÀNG NGOÀI ĐẶC TRƯNG LÀ 56 - KDA TSA.

BỘ GEN CỦA *O. tsutsugamushi* CÓ KÍCH THƯỚC LỚN NHẤT TRONG BỘ RICKETTSIALS, TỪ 2,0 ĐẾN 2,7 MB, BAO GỒM 1967 GEN MÔ HÓA CHO CỐC PROTEIN VÀ CÚ KHOẢNG 47% LÀ CỐC TRƠNH TỰ LẬP LẠI.

TẤT CẢ VI KHUẨN THUỘC HỌ *RICKETTSIACEAE* GÂY BỆNH ĐỀU DO TRUNG GIAN TRUYỀN BỆNH LÀ ĐỘNG VẬT CHỖN ĐỐT. ĐÓY LÀ Ổ CHỨA VÀ NHỒN LỒN CỦA VI KHUẨN, CHỖNG ĐỨNG VAI TRỮ QUAN TRỌNG TRONG VIỆC LỖY TRUYỀN BỆNH. TỤY NHIỄN, CỐC THỰC LỖY TRUYỀN VI KHUẨN TỪ ĐỘNG VẬT CHỖN ĐỐT SANG NGƯỜI LÀ KHỎE NHAU. CHỖNG CỨ THỂ LỖY QUA VẾT ĐỐT CỦA VE, BỘ CHỘT HỒC ẬU TRỤNG MŨ. NGOÀI RA CHỖNG CỨN LỖY TRUYỀN TỪ PHỒN CỦA CHẬY RẶN, BỘ CHỘT QUA VẾT XƯỚC Ở DA VẬT CHỦ.

1.2. Tình hình phân bố bệnh do *Rickettsiaceae*

Đặc điểm phân bố bệnh do *Rickettsiaceae* phụ thuộc vào căn nguyên gây bệnh, phân bố của ổ chứa và trung gian truyền bệnh. Bệnh sốt mò (Scrub Typhus) được phát hiện ở hầu hết các nước ở Khu vực châu Á Thái Bình Dương - khu vực “tam giác sốt mò” với hơn 1 tỷ người có nguy cơ mắc bệnh và hơn 1 triệu ca bệnh mỗi năm. Bệnh sốt chuột (Murin Typhus) gây bởi *R.typhi* qua trung gian truyền bệnh là bọ chét chuột *Xenopsylla cheopis*. Bệnh phân bố ở khắp nơi trên thế giới phụ thuộc sự phân bố của ổ chứa chính là chuột *Rattus norvegicus* và *Rattus rattus*. Nhóm sốt đốm (Spotted Fever Group - SFG) gồm ít nhất 32 loài *Rickettsia* khác nhau gây bệnh cho người do ve truyền, phân bố ở khắp nơi trên thế giới mang tính địa phương theo từng loài vi khuẩn như: *R. rickettsii* là các căn nguyên gây sốt đốm vùng núi (RMSF); *R. africae* gây sốt do ve truyền ở Châu Phi; *R. conorii* gây sốt phát ban ở Địa Trung Hải; *R. roija* và *R. sibirica* gây sốt do ve truyền ở Bắc Á.

1.3. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng bệnh do *Rickettsiaceae*

Biểu hiện lâm sàng của bệnh do *Rickettsiaceae* thường không đặc hiệu và giống với những bệnh sốt vi rút khác, với các biểu hiện như: sốt, đau đầu, đau cơ, có thể có kèm theo buồn nôn, nôn và ho. Ở giai đoạn tiến triển, có thể xuất hiện các biểu hiện lâm sàng như phát ban (dạng ban dát, ban dát sần hoặc ban phỏng), vết loét ở da, có thể có viêm phổi kẽ và viêm não màng não. Tỷ lệ gặp các triệu chứng trên thay đổi tùy theo từng căn nguyên gây bệnh. Biến đổi cận lâm sàng hay gặp như: hạ tiểu cầu, tăng enzyme gan, hạ albumin và hạ natri máu; số lượng bạch cầu có thể bình thường hoặc tăng nhẹ. Bệnh nhân thường đáp ứng tốt với kháng sinh điều trị đặc hiệu (doxycyclin và chloramphenicol). Nếu bệnh nhân không được điều trị hoặc điều trị muộn có thể xuất hiện các biến chứng như: viêm phổi, viêm não màng não, suy gan, suy thận, thậm chí suy đa phủ tạng và tử vong.

1.4. Xét nghiệm chẩn đoán nhiễm *Rickettsiaceae*

Hiện nay, việc chẩn đoán bệnh do *Rickettsiaceae* có 3 nhóm phương pháp chính là: phương pháp huyết thanh học (Weil - Felix, ELISA, IFA,...), phương pháp nuôi cấy phân lập trực tiếp trên tế bào và phương pháp sinh học phân tử (PCR, Realtime PCR, Sequencing, MLST,...). Trong những năm gần đây, kỹ thuật sinh học phân tử đã được ứng dụng ngày càng nhiều giúp nâng cao độ nhạy cũng như độ đặc hiệu của chẩn đoán; đồng thời có thể xác định nhanh chóng, chính xác các loài *Rickettsiaceae* và các kiểu gen gây bệnh trên lâm sàng.

1.5. Chẩn đoán bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*

Chẩn đoán lâm sàng bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* dựa vào tiền sử dịch tễ, biểu hiện lâm sàng và xét nghiệm. Chẩn đoán ca bệnh nghi ngờ dựa vào biểu hiện lâm sàng: Bệnh nhân sốt cấp tính chưa xác định được nguyên nhân có vết loét trên da hoặc các biểu hiện như: đau đầu, phát ban, sưng hạch, tổn thương đa cơ quan như gan, phổi, thận và suy hô hấp cấp. Chẩn đoán xác định ca bệnh dựa vào việc phát hiện DNA của *Rickettsiaceae* trong máu hoặc mô vết loét của bệnh nhân bằng kỹ thuật PCR; hoặc sự thay đổi hiệu giá kháng thể trong mẫu huyết thanh hồi phục so với mẫu huyết thanh cấp tính, bằng kỹ thuật miễn dịch huỳnh quang gián tiếp (IFA).

1.6. Điều trị bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*

Kháng sinh đặc hiệu được khuyến cáo điều trị cho bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* là doxycyclin 200 mg/ngày, dùng từ 7 – 10 ngày; chloramphenicol 2g/ngày, dùng từ 5 – 7 ngày hoặc sau khi hết sốt 2 – 3 ngày và azithromycin 500 mg/ngày, dùng từ 3 – 5 ngày. Ngoài ra bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* cần được điều trị hỗ trợ như hạ sốt, bồi phụ nước, điện giải và các biện pháp điều trị hỗ trợ khác như: truyền dịch, truyền máu, albumin, dùng thuốc vận mạch khi bệnh nhân có sốc; hỗ trợ hô hấp khi bệnh nhân có viêm phổi nặng,...

1.7. Tình hình nghiên cứu về bệnh do *Rickettsiaceae*

Bệnh do *Rickettsiaceae* đang có xu hướng lan rộng và là một trong những vấn đề sức khỏe toàn cầu nên đang được quan tâm nghiên cứu ở nhiều nước trên thế giới. Nghiên cứu dịch tễ về huyết thanh học cho thấy ở Miền Bắc Việt Nam có sự lưu hành của cả ba nhóm bệnh *Rickettsiaceae*. Tuy nhiên, một số nghiên cứu trước đây

mới chỉ mô tả về các đặc điểm của bệnh sốt mò. Chưa có nghiên cứu nào đề cập một cách đầy đủ, toàn diện về bệnh do *Rickettsiaceae* khác cũng như đặc điểm sinh học phân tử của các loài *Rickettsiaceae* gây bệnh và mối liên quan giữa đặc điểm kiểu gen với đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và mức độ nặng của bệnh cũng như các yếu tố tiên lượng bệnh nặng, tử vong cũng chưa được quan tâm nghiên cứu.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Bao gồm 142 bệnh nhân được chẩn đoán xác định nhiễm *Rickettsiaceae* vào điều trị tại Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương, từ 3/2015 - 3/2018.

2.1.1. Tiêu chuẩn lựa chọn bệnh nhân

Gồm các bệnh nhân (từ 15 tuổi trở lên) vào viện, thỏa mãn các tiêu chuẩn lựa chọn sau:

- Sốt cấp tính (≥ 3 ngày) chưa xác định được căn nguyên;
- Và có biểu hiện lâm sàng nghi ngờ nhiễm *Rickettsiaceae* như có vết loét ở da và/hoặc có ít nhất 1 biểu hiện: da/cùng mạc mắt xung huyết, phát ban, sưng hạch, gan/lách to;
- Và bệnh nhân hoặc người bảo hộ hợp pháp đồng ý tham gia nghiên cứu.

Bệnh nhân được chẩn đoán xác định nhiễm *Rickettsiaceae* khi thỏa mãn các tiêu chuẩn lựa chọn ở trên và có quả realtime PCR mẫu máu dương tính với *Rickettsiaceae*.

2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ bệnh nhân

- Bệnh nhân sốt có bằng chứng rõ ràng do căn nguyên nhiễm trùng khác hoặc không trùng như ung thư, bệnh hệ thống tự miễn.
- Bệnh nhân đang được chẩn đoán và điều trị suy gan, suy thận.

- Bệnh nhân có đồng nhiễm HIV.

- Bệnh nhân không đồng ý tiếp tục tham gia nghiên cứu tại bất kỳ thời điểm nào.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu tiến cứu, mô tả cắt ngang.

2.2.2. Cỡ mẫu: Chọn mẫu thuận tiện theo thời gian nghiên cứu.

2.2.3. Quy trình nghiên cứu

Bệnh nhân vào viện có các tiêu chuẩn theo mục 2.1.1 sẽ được sẽ được giải thích kỹ về tình trạng bệnh và các bước tiến hành nghiên cứu:

- Lấy phiếu chấp thuận tham gia vào nghiên cứu.

- Hỏi bệnh nhân (hoặc người nhà) về tiền sử và diễn biến của bệnh.

- Khám lâm sàng, phát hiện các triệu chứng xuất hiện ở bệnh nhân.

- Làm các xét nghiệm và thăm dò cơ bản như: Công thức máu; Sinh hóa máu; Đông máu cơ bản; XQ tim phổi; Siêu âm ổ bụng;

- Chỉ định các xét nghiệm để loại trừ căn nguyên gây bệnh phổ biến như: Sốt xuất huyết, Leptospirose, Cúm, Sởi, Ký sinh trùng sốt rét,...Nếu bệnh nhân có kết quả xét nghiệm dương tính với 1 trong các căn nguyên ở trên sẽ loại ra khỏi nghiên cứu.

- Lấy 4 ml máu cho vào ống có chất chống đông EDTA để gửi đi làm xét nghiệm realtime PCR với *Rickettsiaceae*.

- + Nếu kết quả realtime PCR âm tính, bệnh nhân sẽ được loại ra khỏi nghiên cứu.

+ Nếu kết quả RT PCR dương tính với *O. tsutsugamushi*, sẽ tiến hành giải trình tự gen 56 - kDa TSA để xác định kiểu gen của *O. tsutsugamushi*.

- Bệnh nhân sau khi đã lấy mẫu bệnh phẩm xét nghiệm sẽ được điều trị ngay bằng một trong những phác đồ kháng sinh sau:

- + Doxycycline liều 100 mg x 2 lần/ngày uống trong 5 – 7 ngày, hoặc
- + Azithromycin 500 mg/ngày x 3 – 5 ngày, hoặc
- + Chloramphenicol với liều 50 mg/kg/ngày chia 2 lần x 5 – 7 ngày

- Nếu bệnh nhân có biến chứng sẽ được điều trị hỗ trợ phù hợp.

- Theo dõi và đánh giá bệnh nhân tại các thời điểm: ngày vào nghiên cứu (N0), ngày 1 (N1), ngày 3 (N3) và ngày 7 (N7) sau khi vào viện hoặc ngày bệnh nhân ra viện (Nrv).

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

2.2.1. Thời gian nghiên cứu: Trong thời gian 3 năm, từ 3/2015 - 3/2018.

2.2.2. Địa điểm nghiên cứu: tại Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương

2.3. Nội dung nghiên cứu

2.3.1. Mục tiêu 1 - Mô tả đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của bệnh nhân

2.3.2.1. Đặc điểm dịch tễ học lâm sàng của bệnh nhân nhiễm

Rickettsiaceae

- Phân bố bệnh nhân theo lứa tuổi, giới, địa dư, theo nghề nghiệp
- Phân bố bệnh nhân theo địa dư vùng – miền, theo tỉnh thành
- Phân bố theo tháng, theo mùa trong năm
- Tiền sử bệnh mạn tính, chẩn đoán và điều trị trước khi vào viện
- Tiền sử phơi nhiễm với yếu tố nguy cơ truyền bệnh

2.3.2.2. Đặc điểm lâm sàng ở bệnh nhân nhiễm

Rickettsiaceae

- Thời gian khởi phát sốt đến khi nhập viện; đặc điểm, tính chất sốt
- Các triệu chứng cơ năng: đau đầu, đau cơ, ho, buồn nôn, nôn...
- Biểu hiện lâm sàng ở da, niêm mạc và hạch ngoại vi
- Biểu hiện lâm sàng: Mạch, huyết áp, nhiệt độ, nhịp thở, SpO₂
- Biểu hiện trên hệ cơ quan: tuần hoàn, hô hấp, tiêu hóa, thần kinh

2.3.2.3. Biến đổi cận lâm sàng ở bệnh nhân nhiễm

Rickettsiaceae

- Biến đổi trong xét nghiệm công thức máu, đông máu cơ bản
- Biến đổi trong sinh hóa máu: chức năng gan, thận, điện giải đồ,...
- Biến đổi trong xét nghiệm khí máu động mạch
- Đánh giá thay đổi trên XQ tim phổi, siêu âm ổ bụng và điện tâm đồ

2.3.2. Mục tiêu 2 - Xác định các loài Rickettsiaceae và kiểu gen gây bệnh

- Dựa vào realtime PCR, xác định các loài Rickettsiaceae gây bệnh
- Giải trình tự gen 56 - kDa TAS, xác định kiểu gen của *O. tsutsugamushi*
- So sánh sự khác biệt giữa các trình tự của gen 56kDa TAS trong nghiên cứu với các trình tự đã được công bố, xây dựng cây phát sinh

loài

- So sánh tìm ra đặc điểm dịch tễ, biểu hiện lâm sàng, biến đổi cận lâm sàng của các loài *Rickettsiaceae* được phát hiện trong nghiên cứu

- So sánh tìm ra đặc điểm lâm sàng, biến đổi cận lâm sàng đặc trưng của các kiểu gen của *O. tsutsugamushi* được xác định.

2.3.3. Mục tiêu 3 - Kết quả điều trị và một số yếu tố tiên lượng nặng, tử vong

2.3.3.1. Kết quả điều trị chung các bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*

- Tỷ lệ điều trị khỏi/ Tử vong của bệnh nhân
- Thời gian cắt sốt; Thời gian nằm viện của bệnh nhân sau điều trị
- Kết quả điều trị theo căn nguyên và theo kiểu gen *O. tsutsugamushi*.
- Kết quả điều trị theo phác đồ kháng sinh, biến chứng và mức độ

nặng.

2.3.3.2. Tìm các yếu tố tiên lượng bệnh nặng và kết quả điều trị bệnh

- Tìm hiểu các yếu tố có liên quan với mức độ nặng của bệnh
- Tìm hiểu một số yếu tố có giá trị tiên lượng tử vong của bệnh.

2.4. Các chỉ số và tiêu chuẩn đánh giá dùng trong nghiên cứu

2.4.1. Các chỉ số dịch tễ học lâm sàng và dịch tễ học phân tử

2.4.1.1. Các chỉ số dịch tễ học lâm sàng

- Tỷ lệ phân bố bệnh nhân theo các nhóm tuổi, theo giới tính
- Tỷ lệ phân bố bệnh nhân theo nghề nghiệp và nơi cư trú
- Tỷ lệ phân bố bệnh nhân theo địa dư tỉnh thành, vùng miền
- Tỷ lệ phân bố bệnh nhân theo tháng và theo mùa trong năm

2.4.1.2. Các chỉ số dịch tễ học phân tử

- Tỷ lệ các loài *Rickettsiaceae* phát hiện trong nghiên cứu

- Tỷ lệ các kiểu gen của *O. tsutsugamushi* được phát hiện
- Tỷ lệ phân bố các loài *Rickettsiaceae* theo khu vực và theo thời gian
- Tỷ lệ phân bố các kiểu gen *O. tsutsugamushi* theo thời gian
- Tỷ lệ tương đồng giữa các trình tự gen của *O. tsutsugamushi* trong nghiên cứu so với các chủng tham chiếu đã được công bố.

2.4.1.3. Các chỉ số lâm sàng ở bệnh nhân

Xác định tỷ lệ xuất hiện các triệu chứng lâm sàng gặp ở bệnh nhân.

2.4.1.4. Các chỉ số cận lâm sàng ở bệnh nhân

Các chỉ số xét nghiệm trong công thức máu, sinh hóa máu,... ở bệnh nhân được đánh giá và so sánh với hằng số sinh học của người Việt Nam.

2.5. Các tiêu chuẩn và bảng điểm sử dụng trong nghiên cứu

2.5.1. Tiêu chuẩn đánh giá mức độ nặng của bệnh

Bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* được xem là nặng khi có suy đa tạng (MODS) và/hoặc APACHE II ≥ 10 điểm hoặc qSOFA ≥ 2 .

2.5.2. Các bảng điểm sử dụng trong nghiên cứu

- Bảng điểm đánh giá tình trạng sức khỏe dài hạn và các thông số sinh lý trong giai đoạn cấp, phiên bản II (APACHE II)

- Bảng điểm đánh giá tình trạng suy tạng sử dụng bảng điểm qSOFA)

2.6. Các kỹ thuật xét nghiệm được sử dụng trong nghiên cứu

2.6.1. Kỹ thuật realtime PCR

- **Mục đích:** Xác định các đoạn gen đặc hiệu cho các loài *Rickettsiaceae* như: gen mã hóa protein màng ngoài của *O. tsutsugamushi* có trọng lượng phân tử 47 kDa; gen mã hóa protein

OmpB của *R. typhi* và gen có trọng lượng phân tử 17kDa mã hóa protein màng ngoài chung cho 2 nhóm *R. typhi* và *Rickettsia spp.*

- Vật liệu nghiên cứu:

+ Húa chất: Dung dịch Ficoll tách lớp buffy coat; Kit tách chiết DNA của Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit, Đức); Kit Kapa Biosystems (Mỹ) và MgCl2 50mM.

+ Máy sử dụng: 7500 Fast Real-Time PCR System, (của hãng Applied Biosystem □ Mỹ)

+ Cốc cặp mồi và probe cho gen 47 kDa, 17 kDa và OmpB như sau:

Tên	Trình tự (5'-3')
Primer 47 F	AACTGATTTTATTCAAACATAATGCTGCT
Primer 47 R	TATGCCTGAGTAAGATACRTGAATRGAATT
Probe 47	6FAM-TGGGTAGCTTTGGTGGACCGATGTTTAATCT-TAMRA
Primer 17 F	GGGCGGTATGAAYAAACAAG
Primer 17 R	CCTACACCTACTCCVACAAG
Probe 17	FAM-CCGAATTGAGAACCAAGTAATGC-TAMRA
Primer	TGGTATTACTGCTCAACAAGCT

OmpB F	
Primer OmpB R	CAGTAAAGTCTATTGATCCTACACC
Probe OmpB	FAM- CGCGATCGTTAATAGCAGCACCAGCATTATCGCG-BHQ1

- **Các bước tiến hành:** Theo quy trình tại khoa xét nghiệm bệnh viện BNĐTƯ.

2.6.2. Kỹ thuật giải trình tự gen xác định kiểu gen của *O. tsutsugamushi*

- **Mục đích:** Giải trình tự gen 56 kDa TAS mã hoá cho protein màng ngoài vi khuẩn *O. tsutsugamush* nhằm xác định các kiểu gen gây bệnh.

- Vật liệu nghiên cứu:

- + Mẫu DNA: từ mẫu bệnh phẩm dương tính với gen 47kDa.
- + Máy xét nghiệm: ABI 3130 Genetic Analyzer Fast (của hãng Applied BioSystems - Mỹ).
- + Môi: Sử dụng các cặp mồi đặc hiệu cho gen 56 kDa TAS như sau:

Tên	Trình tự (5'-3')
Otr56-573F (OtsuF)	5'-AATTGCTAGTGCAATGTCIG-3'
Otr56-980R (OtsuR)	5'-GGCATTATAGTAGGCTGAG-3'
Otr56-498F	5'-AATTAGTTAGAATGGTTACCAC-3'

Otr56-1459R	5'- TCTGTATCTGTTCGACAGATGCACTATTAG-3'
-------------	--

2.6.3. Xây dựng cây phát sinh loài

Kết quả giải trình tự gen 56 kDa TAS sẽ được phân tích bằng phần mềm ABI PRISM DNA Sequencing Analysis software version 3.0 (của hãng Applied BioSystems) và so sánh với các trình tự trong ngân hàng gen trên BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Xây dựng cây phát sinh loài qua trình tự gen 56-kDa TSA bằng phần mềm MEGA 7.0.26

2.7. Thu thập và xử lý số liệu

Các số liệu nghiên cứu được thu thập vào bệnh án nghiên cứu mẫu, sau đó được nhập và phân tích bằng phần mềm SPSS 16.0 với các thuật toán ứng dụng.

2.8. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu đã được hội đồng y đức của trường Đại học Y Hà Nội, và của Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới Trung ương thông qua.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Trong thời gian nghiên cứu, có 142 bệnh nhân được chẩn đoán xác định nhiễm *Rickettsiaceae* đưa vào phân tích. Kết quả nghiên cứu của các bệnh nhân như sau:

3.1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng của bệnh nhân nghiên cứu

3.1.1. Đặc điểm dịch tễ học lâm sàng của bệnh nhân

- Bệnh gặp ở 2 giới như nhau. Tuổi trung bình của bệnh nhân là 49,41 ± 16,28 tuổi, đa số ở độ tuổi từ 31 - 60 (65,49%), cao nhất là ở nhóm tuổi 51 - 60 (25,36%).
- Bệnh nhân mắc bệnh rải rác quanh năm, chủ yếu từ tháng 5 đến tháng 10 (71,13%).

- Phân bố ở 24 tỉnh, thành, đa số ở Hà Nội (34,51%) và các tỉnh lân cận như Phú Thọ (8,45%), Hưng Yên (7,00%), Nghệ An (7,00%), Hà Nam (4,23%), Nam Định (4,23%).

- Đa số bệnh nhân sống ở vùng nông thôn (71,12%) và làm nông nghiệp (50,70%).

3.1.2. Đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân

3.1.2.1. Các triệu chứng cơ năng gặp ở bệnh nhân

Bảng 3.1. Các triệu chứng cơ năng ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*

Đặc điểm	Số bệnh nhân (n = 142)	Tỷ lệ %
Sốt	142	100,00
Đau đầu	128	90,14
Đau cơ	105	73,94
Ho	64	45,07
Buồn nôn	43	30,28
Nôn	31	21,83
Tiêu chảy	30	21,13
Đau họng	22	15,49
Đau bụng	20	14,08
Khó thở	18	12,68

Triệu chứng cơ năng gặp ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* là sốt (100%), đau đầu (90, 14%), đau cơ (73,94%). Ngoài ra các triệu chứng khác gặp với tỷ lệ ít hơn như: ho, buồn nôn, nôn, tiêu chảy, đau họng, đau bụng và khó thở.

3.1.2.2. *Đặc điểm và tính chất sốt của bệnh nhân nhiễm Rickettsiaceae*

Thời gian sốt trung bình trước khi vào viện là $8,63 \pm 3,02$ ngày (từ 3 đến 18 ngày).

Bảng 3.2. Đặc điểm sốt của các bệnh nhân nhiễm Rickettsiaceae

Đặc điểm và tính chất sốt		Số bệnh nhân (n = 142)	Tỷ lệ %
Khởi phát sốt	Đột ngột	98	69,01
	Tăng dần	44	30,99
Kiểu sốt	Sốt liên tục	85	59,86
	Sốt giao động	57	40,14
Tính chất sốt	Sốt nóng	107	75,35
	Ồn lạnh, rét run	35	24,65
Mức độ	Sốt nhẹ (37,5 – 38,5	80	56,34

sốt	°C)		6,34
(Khi vào viện)	Trung bình (38,6 - 39,5 °C)	41	2 8,87
	Sốt cao (> 39,5 °C)	21	1 4,79

Bệnh nhân sốt do *Rickettsiaceae* thường khởi phát đột ngột (69,01%); sốt liên tục (59,86%) hoặc giao động (40,14%); đa số sốt nóng (75,35%) ít khi sốt rét run (24,65%); thường sốt ở mức độ nhẹ (56,34%) hoặc sốt trung bình (28,87%).

3.1.2.3. *Biểu hiện ở da và niêm mạc của bệnh nhân Rickettsiaceae*

Bảng 3.3. Biểu hiện trên da và niêm mạc ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*

Triệu chứng	Số bệnh nhân (n = 142)	Tỷ lệ %
Xung huyết da	115	80,99
Xung huyết kết mạc	99	69,71
Vết loét (Eschar)	64	45,07
Phát ban	54	38,02
Phù ngoại vi	34	23,94
Sung hạch	32	22,53

Vàng da/vàng mắt	19	13,38
Xuất huyết dưới da	15	10,56

Biểu hiện hay gặp trên da và niêm mạc ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* là: xung huyết da (80,99%), xung huyết kết mạc (69,71%), vết loét gặp 45,07%. Các triệu chứng khác gặp ít hơn là phát ban, phù ngoại vi, sung hạch, vàng da, vàng mắt và xuất huyết dưới da.

3.1.3. Biến đổi cận lâm sàng của bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*

3.1.3.1. Thay đổi các chỉ số trong công thức máu

Bảng 3.4. Thay đổi các chỉ số trong công thức máu

Công thức máu		Số bệnh nhân (n=142)	Tỷ lệ %
Hemoglobin (g/l)	Hb ≥ 120	83	58,45
	120 > Hb ≥ 90	52	36,62
	90 > Hb ≥ 60	7	4,93
Bạch cầu (G/l)	BC > 10	46	32,40
	10 ≥ BC ≥ 4	85	59,86

	BC < 4	11	7,7 4
Tiểu cầu (G/l)	TC ≥ 150	47	33, 10
	150 > TC ≥ 100	26	18, 31
	100 > TC ≥ 50	45	31, 69
	TC < 50	24	16, 90

36,62% bệnh nhân nghiên cứu có thiếu máu nhẹ ($90 \leq \text{Hb} < 120$ g/l); 32,40% có bạch cầu > 10 (G/L) và 66,90% bệnh nhân có giảm tiểu cầu < 150 G/l, trong đó có giảm tiểu cầu nặng (< 50 G/l) gặp 16,90%.

3.1.3.2. *Biến đổi trong xét nghiệm đông máu của bệnh nhân*

Bảng 3.5. Biến đổi trong xét nghiệm đông máu cơ bản (n = 116)

Xét nghiệm đông máu	Số bệnh nhân (n = 116)	Tỷ lệ %
PT < 70 (%)	36	31, 03
Fibrinogen < 2,5 (g/l)	41	35, 34

APTT > 40 (s)	57	49, 14
INR > 1,5	4	3,4 5
D-Dimer > 500 µg/L, (n= 41)	39	95, 12

Các rối loạn đông máu gặp ở bệnh nhân là: giảm tỷ lệ prothrombin <70% (31,03%); giảm fibrinogen < 2,5 g/l (35,34%); APTT kéo dài trên 40 giây (49,14%). Trong đó, chỉ có 3,45% bệnh nhân có rối loạn đông máu nặng với INR > 1,5.

3.1.3.3. *Biến đổi trong hóa sinh máu ở bệnh nhân nhiễm Rickettsiaceae*

Bảng 3.6. Biến đổi các xét nghiệm đánh giá chức năng gan

Các chỉ số xét nghiệm	Tổng số	Số bệnh nhân	Tỷ lệ %
AST ≥ 40 UI/L	142	134	94, 37
ALT ≥ 40 UI/L	142	127	89, 44
Albumin < 35 (g/L)	109	69	63, 30

Bilirubin TP > 17(μ mol/l)	94	36	38,30
---------------------------------	----	----	-------

Các rối loạn chức năng gan gặp ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* là tăng enzyme gan AST $\geq$ 40 UI/L (94,37%) và tăng ALT $\geq$ 40 UI/l (89,44%), giảm albumin máu < 35 g/l (63,30%) và tăng bilirubin toàn phần > 17 μ mol/l (38,30%).

Bảng 3.7. Rối loạn chức năng thận, điện giải đồ và yếu tố viêm

Các chỉ số xét nghiệm	Tổng số	Số bệnh nhân	Tỷ lệ %
Ure > 7,5 mmol/l	142	32	22,54
Creatinin > 120 μ mol/L	142	20	14,08
Na ⁺ < 135 mmol/L	142	108	76,06
K ⁺ < 3,5 mmol/L	142	53	37,32
CRP > 12 mg/dl	132	122	92,42
PCT > 0,05 ng/ml	121	117	96,69

Hầu hết bệnh nhân có tăng các yếu tố viêm CRP (92,42%) và procalcitonin (96,69%). Suy thận gặp 14,08% và hạ natri máu gặp 76,06%.

3.1.4.2. Các biến chứng ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*

Bảng 3.8. Các biến chứng ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*

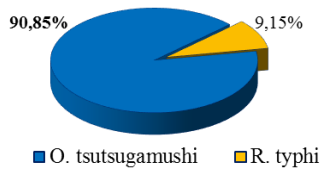
Biến chứng	Số bệnh nhân	Tỷ lệ %
------------	--------------	---------

Hạ huyết áp	50	35,21
Viêm phổi	48	33,80
Suy thận	20	14,08
Rối loạn chức năng gan	19	13,38
Rối loạn thần kinh trung ương	15	10,56
Xuất huyết tiêu hóa	4	2,82
Suy đa tạng (MODS)	37	26,06

Các biến chứng gặp ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* là: hạ huyết áp (35,21%), viêm phổi (33,80%), rối loạn chức năng gan (13,38%), rối loạn thần kinh trung ương (10,56%), suy thận (9,15%) và xuất huyết tiêu hóa (2,82%). Suy đa tạng gặp ở 26,06% bệnh nhân.

3.2. Xác định các loài *Rickettsiaceae* và kiểu gen gây bệnh

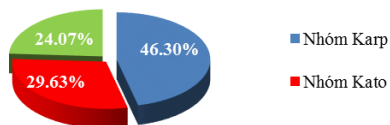
3.2.1. Các loài *Rickettsiaceae* gây bệnh



Biểu đồ 3.1. Các loài *Rickettsiaceae* gây bệnh

Trong thời gian nghiên cứu, chúng tôi đã xác định có 2 loài *Rickettsiaceae* là: *O. tsutsugamushi* (90,85%) và *Rickettsia typhi* (9,15%).

3.2.2. Các kiểu gen của *Orientia tsutsugamushi*

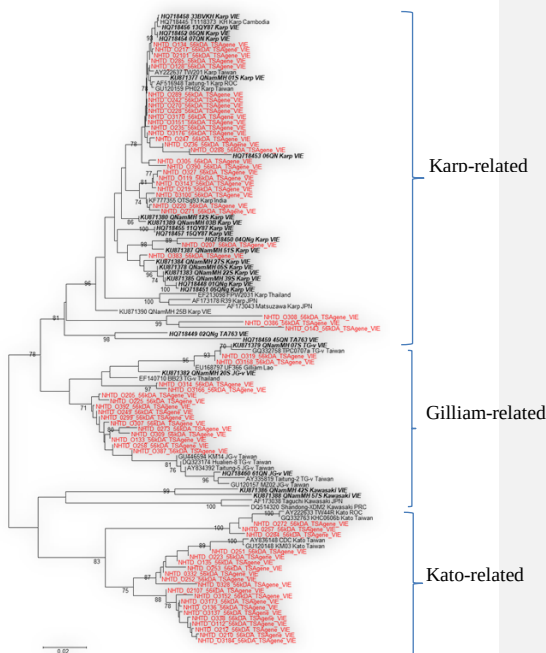


Biểu đồ 3.2. Các kiểu gen của O. tsutsugamushi

Nhận xét: Nghiên cứu đã xác định được 3 kiểu gen của *O. tsutsugamushi* là Karp (46,30%), Kato (29,63%) và Gilliam (24,07%).

3.2.3. Phân tích phát sinh loài của các chủng *Orientia tsutsugamushi*

3.1.3.1. Cây phát sinh loài *O. tsutsugamushi*, dựa trên trình tự gen 56kDa TSA



Hình 3.1. Sơ đồ cây phát sinh loài của *O. tsutsugamushi*

Cây phát sinh gen 56kDa TAS của *O. tsutsugamushi* trên cho thấy tất cả trình tự phát hiện trong nghiên cứu của chúng tôi đều hình

thành từ 3 nhánh chính có liên quan với 3 kiểu gen là Karp, Kato và Gilliam.

3.2.4.2. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng theo căn nguyên gây bệnh

- Khi so sánh đặc điểm lâm sàng giữa bệnh nhân sốt mò và bệnh nhân sốt chuột cho thấy, vết loét ở da và sưng hạch không gặp ở bệnh nhân sốt chuột. Bệnh nhân sốt mò có biến chứng nhiều hơn bệnh nhân sốt chuột.

- Khi so sánh đặc điểm lâm sàng giữa kiểu gen Karp, Kato và Gilliam của *O. tsutsugamushi* cho thấy, bệnh do kiểu gen Karp gặp biến chứng hơn so với bệnh do kiểu gen Gilliam và Kato.

3.1.4. Kết quả điều trị

- Tỷ lệ tử vong: Tỷ lệ tử vong của chúng là 6,34% (đều là bệnh nhân sốt mò). Tỷ lệ tử vong cao hơn ở nhóm bệnh nhân có biến chứng, có suy đa tạng và có APCHE II ≥ 10 điểm.

- Thời gian cắt sốt: trung bình là $4,19 \pm 2,43$ ngày (từ 1 - 18 ngày), trong đó 51,41% bệnh nhân cắt sốt trên 72 giờ sau điều trị.

- Bệnh nhân được điều trị bằng doxycyclin có thời gian cắt sốt và thời gian nằm viện điều trị ngắn hơn so với bằng azithromycin.

3.2. Các yếu tố tiên lượng bệnh nặng theo suy đa tạng

Bảng 3.9. Phân tích đơn biến các yếu tố có liên quan với suy đa tạng

Đặc điểm	Có MODS (n = 37) n (%)	Không MODS (n = 105) n (%)	p *	OR (95% CI)
Tuổi ≥ 65	11 (29,73)	14 (13,33)	< 0,05	2,75 (1,12 – 6,78)
Sốt ≥ 10 ngày	19 (51,35)	37 (35,24)	> 0,05	1,94 (0,91 – 4,14)

Xuất huyết dưới da	8 (21,62)	7 (6,67)	< 0,05	3,86 (1,29 - 11,55)
Phù ngoại vi	20 (54,05)	14 (13,33)	< 0,001	7,65 (3,25 - 18,02)
qSOFA ≥ 2	14 (37,84)	10 (9,52)	< 0,001	5,78 (2,28 - 14,67)
APACHE II ≥ 10	19 (51,35)	19 (18,10)	< 0,001	4,78 (2,12 - 10,78)
Tiêu cầu < 50 G/L	16 (43,24)	8 (7,62)	< 0,001	9,24 (3,50 - 24,39)
PCT $\geq 0,5$ ng/mL	29 (78,38)	61 (58,10)	< 0,05	3,24 (1,41 - 7,41)
Kiểu gen Karp	9/15 (60,00)	16/39 (41,03)	> 0,05	2,16 (0,64 - 7,26)

** Phân tích hồi quy logistic đơn biến*

Khi phân tích đơn biến cho thấy, các yếu tố như tuổi ≥ 65 , xuất huyết dưới da, phù ngoại vi, điểm qSOFA ≥ 2 và APACHE II ≥ 10 , tiêu cầu < 50 G/L, PCT $\geq 0,5$ ng/mL là các yếu tố có liên quan với suy đa tạng ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*.

Bảng 3.10. Phân tích đa biến, các yếu tố nguy cơ suy đa tạng

Đặc điểm	p**	OR	95% CI
Tuổi ≥ 65	$> 0,05$	0,44	0,08 - 2,52
Xuất huyết dưới da	$> 0,05$	3,03	0,30 - 30,53
Phù ngoại vi	$> 0,05$	0,84	0,15 - 4,77
Tiểu cầu < 50 G/L	$< 0,05$	4,16	1,21 - 14,37
PCT ≥ 2 ng/mL	$> 0,05$	1,04	0,37 - 2,91
qSOFA ≥ 2	$< 0,05$	1,99	1,25 - 2,62
APACHE II ≥ 10	$< 0,05$	10,27	1,51 - 69,79

**** Phân tích hồi quy logistic đa biến**

Phân tích hồi quy logistic đa biến cho thấy, tiểu cầu < 50 G/L, qSOFA ≥ 2 và APACHE II ≥ 10 điểm là các yếu tố liên quan độc lập với suy đa tạng (với $p < 0,05$).

3.3.3. Các yếu tố tiên lượng tử vong ở bệnh nhân nhiễm Rickettsiaceae

Bảng 3.11. Phân tích đơn biến, các yếu tố có liên quan đến tử vong

Đặc điểm	DT khỏi (n = 133) n (%)	Tử vong (n = 9) n (%)	p *	OR (95% CI)
Tuổi ≥ 65	24 (18,05)	1 (11,11)	> 0,05	0,56 (0,07 - 4,76)
Sốt ≥ 10 ngày	52 (39,10)	4 (44,44)	> 0,05	1,25 (0,32 - 4,86)
Phù ngoại vi	28 (21,05)	6 (66,67)	< 0,05	7,50 (1,76 - 31,89)
Xuất huyết dưới da	11 (8,27)	4 (44,44)	< 0,05	8,87 (2,08 - 37,92)
Giảm tiểu cầu < 50 G/L	20 (15,04)	4 (44,44)	< 0,05	4,52 (1,12 - 18,29)
Rối loạn ý thức (GCS ≤ 13)	10 (7,52)	5 (55,56)	< 0,05	15,38 (3,56 - 66,49)
Viêm phổi	41 (30,83)	7 (77,78)	< 0,05	7,85 (1,56 – 39,45)
Hạ huyết áp	46 (34,59)	4 (44,44)	> 0,05	1,51 (0,39 – 5,91)

Rối loạn chức năng gan	16 (12,03)	3 (33,33)	> 0,05	3,66 (0,83 - 16,08)
Suy thận	16 (12,31)	4 (44,44)	< 0,05	5,70 (1,39 - 23,47)
Suy đa tạng (MODS)	29 (21,81)	8 (88,89)	< 0,05	28,69 (3,45 - 238,8)
qSOFA ≥ 2	15 (11,28)	6 (66,67)	< 0,05	15,73 (3,56 - 69,56)
APACHE II ≥ 10	32 (24,06)	6 (66,67)	< 0,05	6,31 (1,49 - 26,69)

** Phân tích hồi quy logistic đơn biến*

Phân tích hồi quy logistic đơn biến cho thấy, phù ngoại vi, xuất huyết dưới da, tiểu cầu < 50 G/l, rối loạn ý thức (GCS ≤ 13), viêm phổi, suy thận, suy đa tạng, tổng số điểm qSOFA ≥ 2 và APACHE II ≥ 10 là các yếu tố tiên lượng tử vong ở bệnh nhân.

Bảng 3.12. Phân tích đa biến các yếu tố tiên lượng tử vong ở bệnh nhân

Đặc điểm	p**	OR	95% CI
Giảm tiểu cầu < 50 G/L	> 0,05	0,9 2	0,17 - 5,08
Viêm phổi	> 0,05	0,9 7	0,12 - 8,16
Suy đa tạng (MODS)	< 0,05	18, 92	1,57 - 228,61

qSOFA ≥ 2	< 0,05	5,6 3	1,05 - 30,25
APACHE II ≥ 10	> 0,05	2,1 8	0,41 - 11,45

**** Phân tích hồi quy logistic đa biến**

Phân tích hồi quy logistic đa biến cho thấy, điểm qSOFA ≥ 2 và suy đa tạng là các yếu tố tiên lượng độc lập tử vong ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*, (với $p < 0,05$).

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhân

4.1.1. Đặc điểm dịch tễ học lâm sàng của bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*

- *Đặc điểm về tuổi và giới:* Tỷ lệ bệnh nhân nam và nữ nhiễm *Rickettsiaceae* trong nghiên cứu của chúng tôi tương đương nhau, lần lượt là 49,30% và 50,07%. Tỷ lệ này tương tự như kết quả nghiên cứu của tác giả Phạm Thanh Thủy (nam 50,6% và nữ 49,4%). Theo chúng tôi, tỷ lệ nam nữ phản ánh sự khác biệt trong yếu tố phơi nhiễm cũng như quần thể bệnh nhân được điều trị tại cơ sở nghiên cứu. Bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* trong nghiên cứu gặp ở tất cả các lứa tuổi, trung vị là 50 tuổi, trong đó đa số gặp ở lứa tuổi từ 31 - 60 tuổi (65,49%), đây là lứa tuổi lao động chính; tuy nhiên người cao tuổi (> 60 tuổi) cũng mắc bệnh với tỷ lệ là 24,94%. Như vậy, mọi lứa tuổi đều có nguy cơ nhiễm *Rickettsiaceae*; tuy nhiên, người trong độ tuổi lao động có tỷ lệ mắc

bệnh cao hơn vì trong quá trình lao động họ có nguy cơ phơi nhiễm với mầm bệnh.

- *Phân bố bệnh nhân theo nghề nghiệp và nơi cư trú:* Bệnh nhân trong nghiên cứu của đa số sống ở vùng nông thôn (71,13%), ngoài ra khu vực thành thị cũng gặp 28,87%. Trong khi bệnh nhân sống ở vùng nông thôn chủ yếu làm nông nghiệp (60,40%), thì bệnh nhân sống ở khu vực thành thị đa số là lao động tự do (31,71%). Ngoài ra những người nghỉ hưu hoặc làm nội trợ cũng nhiễm bệnh với tỷ lệ 16,90%, học sinh - sinh viên và các nghề khác gặp với tỷ lệ ít hơn. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự với nghiên cứu của Phạm Thị Thanh Thủy với 56,2% làm ruộng và 72,9% bệnh nhân sống ở vùng nông thôn. Đặc điểm phân bố bệnh nhân như trên có thể giải thích là do, vùng nông thôn là nơi có nhiều đồng cỏ, sông suối – là điều kiện thuận lợi cho ổ chứa (chuột đồng) và trung gian truyền bệnh (ấu trùng mò, bọ chét) phát triển. Và những người làm nông nghiệp, khi lao động sẽ có nguy cơ phơi nhiễm và mắc bệnh nhiều hơn.

- *Phân bố theo địa dư:* Bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* trong nghiên cứu cư trú ở 24 tỉnh/thành của miền Bắc và Bắc Trung Bộ. Trong đó, đông nhất là ở Hà Nội (34,51%) và các tỉnh lân cận như Phú Thọ (8,45%), Hưng Yên (7,00%), Nghệ An (7,00%), Hà Nam (4,23%), Nam Định (4,23%). Điều này có thể giải thích là do nghiên cứu được tiến hành tại bệnh viện Trung ương đóng trên địa bàn Hà Nội, thường tiếp nhận điều trị chủ yếu cho các bệnh nhân sống ở Hà Nội và các tỉnh lân cận; chỉ một số ít bệnh nhân nặng từ các tỉnh

chuyển đến. Như vậy, số bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* được phát hiện trong nghiên cứu chỉ là một “phần nổi của tảng băng chìm”, vì không phải tất cả bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* ở các tỉnh đều được chuyển đến Bệnh viện Bệnh nhiệt đới Trung ương để điều trị.

- *Phân bố bệnh nhân theo thời gian trong năm*: Bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* nhập viện điều trị rải rác quanh năm, trong đó tập trung từ tháng 5 đến tháng 10 chiếm 71,13%, cao nhất vào tháng sáu là (20,42%). Đây là thời gian miền Bắc có lượng mưa, nhiệt độ và độ ẩm cao - là điều kiện thuận lợi để vector truyền bệnh phát triển. Theo các nghiên cứu, tỷ lệ nhiễm *Rickettsiaceae* liên quan mật thiết đến tính chất mùa hoạt động của vector truyền bệnh.

4.1.2. Đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*

4.1.2.1. Đặc điểm và tính chất khởi phát sốt ở bệnh nhân

Theo y văn, sốt là biểu hiện xuất hiện đầu tiên ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*. Đặc điểm sốt của bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* trong nghiên cứu của chúng tôi đa số khởi phát đột ngột (69,01%), sốt liên tục (59,86%) hoặc dao động (40,14%) và thường sốt nóng (75,35%), ít khi sốt rét run (24,65%). Tại thời điểm nhập viện, bệnh nhân thường sốt nhẹ (56,34%) hoặc trung bình (28,87%), ít khi sốt cao (14,79%), (Bảng 3.2). Đặc điểm và tính chất sốt của bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi tương tự như kết quả nghiên cứu của Nguyễn Trọng Chính, 70,7% bệnh nhân khởi phát sốt đột ngột và 73,1% sốt liên tục; Phạm Thị Thanh Thủy 64,9% khởi phát sốt đột ngột và 91,6% sốt liên tục. Như vậy, dựa vào đặc điểm khởi phát và

tính chất sốt ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* như ở trên có thể giúp thầy thuốc định hướng chẩn đoán phân biệt với sốt do các căn nguyên khác.

4.1.2.2. Triệu chứng cơ năng của bệnh nhân nhiễm Rickettsiaceae

Bên cạnh biểu hiện sốt, các triệu chứng cơ năng khác gặp trong nghiên cứu của chúng tôi là đau đầu (90,14%), đau cơ (73,94%) và các biểu hiện khác ít gặp hơn là ho (45,07%), buồn nôn (30,28%), nôn (21,83%), tiêu chảy (21,13%), đau họng (15,49%), đau bụng (14,08%) và khó thở gặp 12,68% - Bảng 3.1. Tỷ lệ gặp triệu chứng đau đầu, đau cơ trong nghiên cứu của chúng tôi tương tự như nghiên cứu của tác giả khác như: Phạm Thị Thanh Thủy 81,2% có biểu hiện đau đầu và 67,7% có biểu hiện đau cơ; Nguyễn Trọng Chính, 100% đau đầu, 78,4% đau cơ; Hamaguchi 69,6% có đau đầu và 73,4% có đau cơ. Như vậy, kết quả nghiên cứu của chúng tôi một lần nữa khẳng định tính phổ biến của các triệu chứng cơ năng trên trong bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*.

4.1.2.3. Biểu hiện ở da và niêm mạc của bệnh nhân nhiễm Rickettsiaceae

Xung huyết da và niêm mạc là biểu hiện thường gặp trong nhiễm *Rickettsiaceae*, có giá trị gợi ý chẩn đoán. Tỷ lệ gặp triệu chứng này trong nghiên cứu của một số tác giả như sau: Nguyễn Trọng Chính - 92,6%, Lê Đăng Hà và Cao Văn Viên - 86,2%, Đỗ Văn Thành - 76%, Phạm Thanh Thủy - 88,0%. Trong nghiên cứu của chúng tôi, xung huyết da gặp ở 80,96% bệnh nhân và xung huyết kết mạc mắt gặp ở 69,71% số bệnh nhân (Bảng 3.3). Như vậy, xung huyết da và niêm mạc là triệu chứng thường gặp ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* và

có thể sử dụng cho định hướng chẩn đoán bệnh trên lâm sàng.

Vết loét ở da là một dấu hiệu đặc hiệu của bệnh sốt mò và được đề cập đến trong hầu hết các nghiên cứu về lâm sàng của bệnh. Tần suất gặp vết loét ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* trong nghiên cứu của Hamaguchi là 27,8 % (trong đó 62,9% ở bệnh nhân sốt mò và 2,9% ở bệnh nhân sốt chuột). Tỷ lệ gặp vết loét ở bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi là 45,07%, trong đó 96,87% bệnh nhân chỉ có 1 vết loét và chỉ có 2 bệnh nhân là có 2 vết; kích thước vết loét 5 - 10 mm (53,13%); vết loét phân bố ở nhiều vị trí khác nhau trên cơ thể, hay gặp ở vùng kín, có da mỏng như ở vùng bụng (25,00%), vùng bẹn (18,75%), vùng nách (9,39%), vùng nền cổ và vùng ngực đều gặp 7,81%, các vị trí khác trên cơ thể cũng có thể gặp vết loét với tỷ lệ ít hơn.

Phát ban được giáo sư Bùi Đại coi là một trong ba triệu chứng cơ bản hay gặp ở bệnh nhân sốt mò (vết loét, phát ban và sưng hạch bạch huyết). Trong nghiên cứu, chúng tôi gặp 38,03% bệnh nhân có phát ban, ban xuất hiện trong tuần đầu tiên bệnh (31,58%) hoặc tuần bệnh thứ 2 (43,04%), không gặp phát ban ở bệnh nhân trong tuần bệnh thứ 3. Tỷ lệ gặp phát ban theo tác giả Bùi Đại là 72%, Hamaguchi là 31,2%, Phạm Thanh Thủy gặp 34,3%. Tỷ lệ phát ban dao động như vậy, có thể do chúng *Rickettsiaceae* gây bệnh khác nhau; thời gian bị bệnh và tình trạng miễn dịch của các quần thể bệnh nhân khác nhau giữa các nghiên cứu. Các dạng ban gặp trong nghiên cứu của chúng tôi là: ban dát (64,81%) hoặc ban dát sần (35,19%); vị trí hay gặp ở toàn thân (59,26%) hoặc chỉ ở thân mình (24,07%), chân tay và ở mặt gặp ít hơn.

4.1.3. Biến đổi cận lâm sàng của bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*

4.1.3.1. Biến đổi trong công thức máu của bệnh nhân

Giảm tiểu cầu là một biến đổi về huyết học trong sốt mò được nhiều tác giả báo cáo: Đỗ Văn Thành gặp hạ tiểu cầu < 100 G/L ở 24,3% số bệnh nhân; Phạm Thị Thanh Thủy gặp tiểu cầu < 100 G/L ở 28,6% số bệnh nhân; Hamaguchi gặp hạ tiểu cầu 45,0%. Trong nghiên cứu của chúng tôi tiểu cầu giảm < 100 G/L gặp ở 48,59% số bệnh nhân; trong đó tiểu cầu giảm nặng < 50 G/L gặp 18,31%. Nguyên nhân giảm

tiểu cầu có thể là do *Rickettsiaceae* xâm nhập và làm tổn thương tế bào nội mạc mạch máu và tăng tiêu thụ tiểu cầu; thậm chí có thể dẫn tới đông máu nội mạch rải rác và rối loạn đông máu; ngoài ra hiện tượng giảm tiểu cầu còn có thể là do hiện tượng thực bào quá mức hoặc do ức chế giảm sinh tủy. Nghiên cứu của chúng tôi một lần nữa khẳng định, giảm tiểu cầu là một biến đổi huyết học khá phổ biến trong bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*. Giảm tiểu cầu ở bệnh nhân sốt cấp tính tại vùng dịch tễ có thể là một gợi ý cho chẩn đoán Rickettsioses và cần chẩn đoán phân biệt với các bệnh sốt có giảm tiểu cầu khác như sốt xuất huyết dengue.

4.1.3.2. Biến đổi trong xét nghiệm đông máu của bệnh nhân

Hiện tượng rối loạn đông máu trong sốt mò cũng đã được tác giả Jim W.T, Thap L.C và Venkategowda báo cáo. Khoảng 1/3 bệnh nhân trong nghiên cứu có rối loạn đông máu, trong đó 31,03% bệnh nhân có tỷ lệ Prothrombin giảm < 70%; giảm fibrinogen < 2,5 g/l gấp 35,09%; APTT kéo dài trên 40 giây gấp 48,96% và tăng D - Dimer > 500 µg/L gấp 95,12% trong số các bệnh nhân được làm xét nghiệm (bảng 3.5). Các tác giả giải thích giảm tiểu cầu và các yếu tố đông máu là do vi khuẩn gây tổn thương tế bào nội mạc mạch máu từ đó kích hoạt hệ thống đông máu nội mạch rải rác (DIC), gây tăng tiêu thụ các yếu tố đông máu làm giảm fibrinogen và làm tăng các sản phẩm giáng hóa của fibrinogen. Hiện tượng DIC có thể gây tắc các vi mạch và giảm tưới máu các tạng dẫn tới suy đa tạng. Vì vậy, bên cạnh việc đánh giá mức độ giảm tiểu cầu, cần đánh giá mức độ rối

loạn đông máu ở bệnh nhân dễ phát hiện sớm các biến chứng của bệnh trên lâm sàng.

4.1.3.3. Biến đổi trong hóa sinh máu của bệnh nhân

- *Rối loạn chức năng gan:* thể hiện qua xét nghiệm sinh hoá máu như tăng bilirubin, tăng enzyme gan và hạ albumin máu. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hầu hết các bệnh nhân đều có tăng enzyme gan: AST ≥ 40 UI/l gặp 94,37%, ALT ≥ 40 UI/l gặp 89,44%; ngoài ra tăng bilirubin toàn phần $> 17\mu\text{mol/l}$ gặp 38,03% và giảm albumin máu < 35 g/l gặp 67,89% (Bảng 3.6). Nguyên nhân làm tăng enzyme gan theo Bùi Đại và Varghese là do tình trạng đáp ứng miễn dịch quá mức sau khi nhiễm vi khuẩn gây hủy hoại tế bào gan. Như vậy, tăng các enzyme gan có thể là một dấu hiệu gợi ý chẩn đoán bệnh trên lâm sàng. Mức độ tăng emzym gan và tăng bilirubin cũng đã được báo cáo là yếu tố tiên lượng suy đa tạng và tử vong ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*.

- *Rối loạn chức năng thận:* Trong nghiên cứu của chúng tôi, suy thận (creatinin $> 120 \mu\text{mol/l}$) gặp 14,08% trong số bệnh nhân được làm xét nghiệm (Bảng 3.7). Theo Bùi Đại, bản chất của tổn thương thận trong Rickettsioses là viêm mao mạch, dẫn đến viêm thận kẽ từng ổ, thoái hoá tế bào ống thận, thiếu máu cầu thận và xuất huyết tổ chức kẽ. Các biến loạn chức năng thận ở bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi phản ánh mức độ nặng của bệnh, giúp thầy thuốc lâm sàng có định hướng trong chẩn đoán và điều trị.

- *Tăng các yếu tố viêm:* Tăng CRP gặp 92,42% và tăng PCT gặp 96,69% trong số bệnh nhân được xét, trong đó hay gặp tăng CRP > 30 mg/dl (82,57%) và tăng PCT $\geq 0,5$ ng/ml (74,38%). Hiện tượng tăng các yếu tố viêm CRP đã được một số tác giả báo cáo: Jim W.T gặp 95% bệnh nhân có tăng CRP > 8 mg/dl; Mahdi Asmaa Sabr gặp 100% bệnh nhân tăng CRP. Nguyên nhân tăng CRP và PCT là do

Rickettsiaceae ký sinh trong đại thực bào và các bạch cầu mono, kích thích tế bào bạch cầu tiết ra các cytokin (TNF - α , IL 10, ...) làm hóa ứng động bạch cầu và hoạt hóa các đại thực bào đến tiêu diệt vi khuẩn. Sản phẩm quá trình này làm giãn mạch, phù nề tại mô viêm và làm tăng CRP và procalcitonin.

4.2. Xác định các loài *Rickettsiaceae* gây bệnh

4.2.1. Các loài *Rickettsiaceae* gây bệnh trong nghiên cứu

Bằng kỹ thuật realtime PCR, chúng tôi đã xác định hai loài *Rickettsiaceae* gây bệnh là *O. tsutsugamushi* gây bệnh sốt mò, chiếm tỷ lệ 90,85% và *R. typhi* gây bệnh sốt chuột chiếm 9,15% trong số 142 bệnh nhân được tuyển vào nghiên cứu (Biểu đồ 3.1) Tỷ lệ bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với báo cáo của Lê Viết Nhiệm (ở miền Trung, năm 2017) là 25,4%. Nhưng lại thấp hơn nghiên cứu của Hamaguchi sốt mò - 40,9%, sốt chuột - 33,3% trong số bệnh nhân sốt không rõ nguyên nhân, sự khác biệt này có thể là do các phương pháp chẩn đoán dùng trong các nghiên cứu là khác nhau. Phương pháp chẩn đoán trong nghiên cứu của Hamaguchi là phương pháp huyết thanh học (IFA), trong khi chúng tôi và Lê Viết Nhiệm dùng phương pháp realtime PCR để chẩn đoán với độ nhạy khoảng 70% và độ đặc hiệu 100%. Nghiên cứu của chúng tôi một lần nữa củng cố thêm dịch tễ học của các bệnh do *Rickettsiaceae* tại Việt Nam, bệnh sốt mò chiếm tỷ lệ cao nhất, tiếp đến là bệnh sốt chuột, bệnh do *Rickettsiaceae* khác cũng có thể gặp với tỷ lệ ít hơn.

4.2.2. Các kiểu gen của *O.tsutsugamushi* gây bệnh sốt mò

Trong số 129 mẫu bệnh phẩm dương tính với *O.tsutsugamushi*, chỉ có 54 mẫu có đủ nồng độ di truyền để giải trình tự gen 56kDa TAS

thành công. Kết quả giải trình tự gen, chúng tôi đã xác định được 3 kiểu gen gây bệnh là: Karp (46,29%), Kato (29,63%) và Gilliam (24,07%) (Biểu đồ 3.2). Kiểu gen Karp chiếm đa số cũng tương tự như báo cáo của Veasna Duong ở miền Trung (2011), Nguyễn Lê Khánh Hằng ở miền Bắc (2016) và Lê Viết Nhiệm ở miền Trung (2017), Như vậy, kiểu gen Karp là kiểu gen chính gây bệnh sốt mò ở Việt Nam.

4.2.3. Cây phát sinh loài của *O. tsutsugamushi*

Từ kết quả giải trình tự gen 56-kDa TSA đặc hiệu của *O. tsutsugamushi*, đối chiếu sự tương đồng các trình tự trong nghiên cứu với các trình tự đã được phát hiện và được công bố trong khu vực trên ngân hàng gen, từ đó xây dựng cây phát sinh loài (Hình 3.1). Phân tích và so sánh đặc điểm tương đồng di truyền giữa các chuỗi được phát hiện trong nghiên cứu với các chủng đã được công bố trên ngân hàng gen cho thấy các chủng phát hiện có liên quan gần gũi về mặt di truyền với các chủng *O. tsutsugamushi* được phát hiện trong nghiên cứu thuộc 3 nhóm kiểu gen Karp, Kato và Gilliam, đều có mối liên quan gần gũi về mặt di truyền với các chủng đã được phát hiện và công bố ở trong nước cũng như trong khu vực. Tuy nhiên vẫn có sự khác biệt trình tự gen từ 0% đến 6% so với các chủng tham chiếu, cho thấy sự đa dạng trong cấu trúc di truyền của vi khuẩn *O. tsutsugamushi*.

4.3. Kết quả điều trị và các yếu tố tiên lượng

4.3.1. Kết quả điều trị

Trong nghiên cứu, có 9 bệnh nhân tử vong (đều là bệnh nhân sốt mò), chiếm 6,34%. Trong đó 1 bệnh nhân do kiểu gen Karp, 2 bệnh nhân do kiểu gen Kato và 6 bệnh nhân chưa rõ kiểu gen. Thời gian

cất sốt trung bình và tỷ lệ cất sốt trong vòng 48 giờ sau khi điều trị là các chỉ số thường được các tác giả sử dụng để đánh giá hiệu quả điều trị. Thời gian cất sốt trung bình của bệnh nhân trong nghiên cứu là $4,19 \pm 2,43$ ngày, trong đó, 20,42% cất sốt trong vòng 48 giờ sau khi điều trị. Thời gian cất sốt trung bình không có sự khác biệt giữa bệnh nhân sốt mò và bệnh nhân sốt chuột, cũng như giữa ba nhóm kiểu gen Karp, Kato và Gilliam gây bệnh sốt mò. Theo chúng tôi, thời gian gian cất sốt của bệnh nhân phụ thuộc vào thời gian bệnh nhân được tiếp cận điều trị đặc hiệu, tình trạng đáp ứng miễn dịch của bệnh nhân, tỷ lệ xuất hiện các biến chứng và đáp ứng với kháng sinh điều trị của căn nguyên gây bệnh.

4.3.2. Các yếu tố tiên lượng bệnh nặng

Trong nghiên cứu, suy đa tạng gặp 26,06%, APACHE II ≥ 10 gặp 26,76% và qSOFA ≥ 2 điểm gặp 14,79%. Qua phân tích cho thấy, tỷ lệ tử vong và thời gian cất sốt, thời gian nằm viện điều trị trung bình ở bệnh nhân có biến chứng suy đa tạng cao hơn nhóm bệnh nhân không có suy đa tạng, sự khác biệt là có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Khi so sánh kết quả điều trị theo điểm APACHE II cho thấy: nhóm bệnh nhân có điểm APACHE II ≥ 10 có tỷ lệ tử vong cao hơn và thời gian nằm viện điều trị dài hơn so với nhóm có điểm APACHE II < 10 . Phân tích đơn biến cho thấy: tuổi ≥ 65 , xuất huyết dưới da, phù ngoại vi, điểm qSOFA ≥ 2 , APACHE II ≥ 10 điểm, giảm tiểu cầu < 50 G/L, tăng PCT $\geq 0,5$ ng/mL có liên quan với suy đa tạng, Bảng 3.9. Khi đưa các yếu tố ở trên vào phân tích hồi quy logistic đa biến cho thấy, tiểu cầu giảm < 50 G/L, qSOFA ≥ 2 điểm và APACHE ≥ 10 điểm là các yếu tố có liên quan độc lập với suy đa tạng (Bảng 3.10). Trong đó, điểm qSOFA tương quan với số tạng suy chặt chẽ hơn so với điểm APACHE II (với r là 0,62 và 0,43).

4.3.3. Các yếu tố tiên lượng tử vong ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*

Khi tiến hành phân tích đơn biến cho thấy, tỷ lệ xuất hiện các triệu chứng: phù ngoại vi, xuất huyết dưới da, giảm tiểu cầu < 50 G/L, Rối loạn ý thức (GCS ≤ 13), viêm phổi, suy thận, suy đa tạng, điểm qSOFA ≥ 2 và APACHE II ≥ 10 ở nhóm bệnh nhân tử vong cao hơn so với nhóm điều trị khỏi ($p < 0,05$), (Bảng 3.11). Khi đưa các yếu tố trên vào phân tích hồi đa biến cho thấy, điểm qSOFA ≥ 2 và suy đa tạng (MODS) là các yếu tố tiên lượng độc lập tử vong ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* (Bảng 3.12).

KẾT LUẬN

1. Đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*

- Bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* gặp ở mọi lứa tuổi, ở 2 giới như nhau, rải rác trong năm, cao điểm từ tháng 5 đến tháng 10 (71,13%), ở 24 tỉnh thành, đa số làm nông nghiệp (50,70%) và ở nông thôn (71,13%).

- Các biểu hiện lâm sàng hay gặp ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* là: sốt (100%), đau đầu (90,14%), đau cơ (73,94%), ho (45,07%), đa xung huyết (80,99%), xung huyết kết mạc (69,71%), vết loét (45,07%) và phát ban (38,03%), sưng hạch (22,54%) và gan to (12,68%).

- Các biến đổi cận lâm sàng hay gặp: tăng yếu tố viêm PCT > 0,05 ng/L (96,69%), CRP > 12 mg/dl (92,42%), tăng enzyme gan AST ≥ 40 UI/L (91,0 %), ALT ≥ 40 UI/L (89,44%), hạ natri máu (76,06%), giảm albumin máu (67,89%) và giảm tiểu cầu < 150 G/l (66,90%).

2. Các loài *Rickettsiaceae* và kiểu gen gây bệnh trong nghiên cứu

- Hai loài *Rickettsiaceae* được xác định trong nghiên cứu là *O. tsutsugamushi* (90,85%) và *R. typhi* (9,15%). Bệnh nhân sốt mò có biến chứng nhiều hơn ở bệnh nhân sốt chuột ($p < 0,05$). Vết loét và sưng hạch ngoại vi gặp ở bệnh nhân sốt mò, không gặp ở bệnh nhân sốt chuột.

- Ba kiểu gen của *Orientia tsutsugamushi* gây bệnh sốt mò được xác định là: Karp (46,29%), Kato (29,63%) và Gilliam (24,07%). Bệnh nhân do kiểu gen Karp có tỷ lệ gặp biến chứng nhiều hơn so với kiểu gen Kato và Gilliam ($p < 0,05$).

3. Kết quả điều trị và các yếu tố tiên lượng bệnh nặng, tử vong

- Thời gian cắt sốt trung bình là $4,19 \pm 2,43$ ngày; tỷ lệ tử vong là 6,34%. **Bệnh nhân được điều trị bằng doxycyclin có thời gian cắt sốt và nằm viện ngắn hơn so với bệnh nhân được điều trị bằng azithromycin.**

- Phân tích hồi quy logistic đa biến cho thấy, tiêu cầu giảm < 50 G/l, qSOFA ≥ 2 điểm và APACHE II ≥ 10 điểm là các yếu tố có liên quan độc lập với suy đa tạng ($p < 0,05$); qSOFA ≥ 2 điểm và suy đa tạng là các yếu tố tiên lượng độc lập tử vong ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae*.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Đây là công trình đầu tiên tại Việt Nam nghiên cứu về đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng ở bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* theo loài và theo kiểu gen của vi khuẩn gây bệnh bằng kỹ thuật sinh học phân tử (Realtime PCR). Nghiên cứu cũng đã đánh giá được kết quả của một số phác đồ kháng sinh điều trị và tìm ra được một số yếu tố có giá trị tiên lượng nặng và tiên lượng tử vong của bệnh. Kết quả nghiên cứu đóng vai trò quan trọng trong hướng dẫn thực hành lâm sàng chẩn đoán và điều trị bệnh nhân nhiễm *Rickettsiaceae* tại nước ta.

MINISTRY OF EDUCATION AND TRAINING MINISTRY OF
HEALTH

HANOI MEDICAL UNIVERSITY



VU MINH DIEN

**CLINICAL, SUBCLINICAL
CHARACTERISTICS AND TREATMENT RESULTS
OF RICKETTSIAL INFECTION AT NATIONAL
HOSPITAL FOR TROPICAL DISEASES (3/2015 –
3/2018)**

**THE STUDY IS COMPLETED AT
HA NOI MEDICAL UNIVERSITY**

Mentor:

Professor Nguyen Van Mui

Assoc. Professor Bui Vu Huy

Opponent 1:

Opponent 2:

Opponent 3:

The thesis will be presented committee of Ha Noi medical
university at o'clock day month year 2019.

The thesis could be found in:

1. National Library
2. Library of Hanoi Medical University

LIST OF PUBLICATION

1. Vu Minh Dien, Nguyen Vu Trung, Le Thi Hoi, Bui Vu Huy, Nguyen Van Mui (2017). Epidemiological characteristics, clinical manifestations and paraclinical profiles of Scrub Typhus at National Hospital for Tropical Diseases (3/2015 - 3/2017). *National Hospital for Tropical Diseases*. No. 4(20), 11 - 16.
2. Vu Minh Dien, Nguyen Vu Trung, Le Thi Hoi, Bui Vu Huy, Nguyen Van Mui (2018). Clinical manifestations, paraclinical profiles and predictors of outcomes of Scrub Typhus at National Hospital for Tropical Diseases in northern Vietnam. *National Hospital for Tropical Diseases*. No. 3(23), 36 - 44.
3. Nguyen Vu Trung, Le Thi Hoi, Vu Minh Dien, et al. (2019). Clinical Manifestations and Molecular Diagnosis of Scrub Typhus and Murine Typhus, Vietnam, 2015 - 2017. *Journal of Emerging Infectious Diseases*. Vol. 25, No. 4, 633 - 641

A. INTRODUCTION OF THE THESIS

BACKGROUND

Rickettsioses are diseases caused by intracellular Gram-negative bacteria of the Rickettsiaceae family transmitted by the bite of infected ticks or mites or by the feces of infected lice or fleas. The diseases manifest complex epidemiological and clinical characteristics that range from mild to very severe, and cause mortality (from 1.2 to 9.0%) if they are not diagnosed and treated correctly. Although the diseases caused by *Rickettsiaceae* were discovered in the early nineteenth century, the diseases are still a global health problem with their common circulation and ability to spread in the community; therefore they are a concern around the world. In Vietnam, serological studies in the community show that *Rickettsiaceae* cause all of the three disease groups including Scrub Typhus Group (STG) of *Orientia*; Typhus Group (TG), and Spotted Fever Group (SFG). However, to my knowledge, although a limited number of studies have described the characteristics of fever, no studies have described adequately and comprehensively the clinical and subclinical manifestations, as well as prognostic risks/factors regarding the severity and mortality level of diseases resulting from *Rickettsiaceae*. Thus, to improve the capacity and scientific knowledge of clinicians in the diagnosis and treatment of rickettsioses, especially in a place with limited facilities and diagnostic techniques, I have conducted this study with the following three main objectives:

Commented [d1]: Nếu phải trích dẫn tài liệu thì em bổ sung vào đây.

Commented [GB2]: OK as edited?

Commented [d3R2]: OK

Commented [d4]: Liệt kê ba nhóm bệnh...

1. Describe the clinical and subclinical characteristics of patients infected with *Rickettsiaceae* at the National Hospital for Tropical Diseases (March 2015–March 2018).
2. Identify the species of *Rickettsiaceae* causing acute fever in patients treated at the National Hospital for Tropical Diseases.
3. Assess the treatment results and a number of severe prognosis and prognostic death factors in patients with rickettsial infection.

AIMS OF THE THESIS

The rickettsioses are diverse in distribution characteristics, have nonspecific clinical manifestations, and are severe illnesses leading to multiple organ failure and death if they are not detected and treated suitably and promptly. Currently, diagnosis of rickettsioses is mainly based on the experience of clinicians in Vietnam; this may reduce the likelihood of a specific diagnosis, resulting in improper treatment, severe disease progression, complications and death. In Vietnam, although there have been previous reports on the prevalence of scrub typhus and murine typhus, there has been no systematic and comprehensive study of these diseases. Therefore, this thesis aims to improve scientific knowledge about clinical and subclinical features and severe prognostic factors in rickettsioses patients, to help clinicians make an early diagnosis and treat the disease correctly. This may reduce complications and risks of death for patients with *Rickettsiaceae*.

THE THESIS STRUCTURE

The thesis has a total length of 136 pages, comprising the following sections: Introduction: 2 pages; Overview: 35 pages; Research Subjects and Methods: 25 pages; Results: 37 pages; Discussion: 34 pages; and Conclusions and Recommendations: 3 pages. There are 40 tables, 16 charts, 2 diagrams, 13 pictures, and 174 references (both in English and Vietnamese, 33% published since 2014).

B. THE CONTENTS OF THE THESIS

Commented [GB5]: OK as edited?

Commented [d6R5]: I think it is different meaning

Commented [d7]: Cần trích dẫn bài báo cáo...

Commented [GB8]: Do you mean "Figures"?

Commented [d9R8]: It is ok

Chapter 1. LITERATURE OVERVIEW

1.4. Introduction of the diseases caused by *Rickettsiaceae*

Rickettsiaceae usually have many names, with many different classifications, which vary by stage. Currently, based on genetic and antigenic differences in human etiology, *Rickettsiaceae* in humans are classified into five groups, including Scrub Typhus Group (STG) of *Orientia*; Typhus Group (TG), Spotted Fever Group (SFG), classic group or Ancestral Group (AG) and Transitional Group (TRG); these groups belong to genus *Rickettsia*.

Rickettsia are gram-negative bacteria, small in size with a length of 0.8–2.0 µm and width of 0.3–0.5 µm, hairless, non-mobile, polymorphic, with a shape and form that changes through developmental stages; cocci stand alone or in pairs, sometimes in short chains or clusters, inside or outside the cell. The genome of the each species of *Rickettsia* is a ring-shaped single DNA, up to 1.1–1.5 Mb in size, including 877–1500 genes depending on the species. The cell wall and antigen structure of *Orientia* differs from other *Rickettsia* species in that the outer membrane is thicker than the inner membrane; it lacks peptidoglycan and lipopolysaccharide classes; and is without rOmpA and rOmpB outer membrane proteins, but has a typical outer membrane protein of 56 kDa TSA. The genome of *O. tsutsugamushi* is the largest in the rickettsials, from 2.0 to 2.7 Mb, including 1967 genes that code for proteins; about 47% are repeated sequences.

All bacteria of the *Rickettsiaceae* family that cause disease are transmitted by arthropods, which are the reservoir and the breeding ground for bacteria, and play an important role in spreading the disease.

However, the mode of transmission of bacteria from arthropods to humans is different. They can be spread by tick bites, flea bites or larvae. In addition, they also spread from the faeces of lice and fleas through a scratch in the host's skin.

1.5. The distribution of diseases caused by *Rickettsiaceae*

The distribution of *Rickettsiaceae* depends on the etiology of the disease pathogen, the distribution of the reservoir and the vector. Scrub typhus, which is caused by *O. tsutsugamushi*, is detected in most countries in the Asia Pacific region – the "Tsutsugamushi Triangle" area with over 1

Commented [GB10]: Where does murine typhus fit in?

Commented [d11R10]: Murin Typhus in Typhus Group

Commented [GB12]: OK as edited?

Commented [d13R12]: ok

Commented [GB14]: Do you mean 'the genus' or 'each species'?

Commented [d15R14]: it is ok "species"

billion people at risk and more than 1 million cases each year. Murine typhus is caused by *R. typhi* with vector *Xenopsylla cheopis*. Diseases distributed around the world depend on the distribution of the main reservoir, rats: *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*. Spotted Fever Group (SFG) consists of at least 32 different species of *Rickettsiaceae* that cause human diseases spread by ticks, distributed throughout the world locally according to each bacterial species: *R. rickettsii* causes mountainous spotted fever (RMSF); *R. africae* causes tick-borne fever in Africa; *R. conorii* causes typhus in the Mediterranean; *R. roija* and *R. sibirica* cause tick-borne fever in North Asia.

1.6. Clinical and subclinical characteristics of diseases caused by *Rickettsiaceae*

The clinical manifestations of *Rickettsiaceae* are usually nonspecific and similar to other viral fevers, with fever, headache, and myalgia, nausea, vomiting and cough. In advanced stages, clinical manifestations such as rash eschar, interstitial pneumonia and meningitis may occur. The incidence of these symptoms varies depending on the cause. Common subclinical changes include thrombocytopenia, elevated liver enzymes, hypoalbuminemia and hyponatremia. The number of white blood cells may be normal or slightly increased. Patients often respond well to specific treatment antibiotics (doxycycline and chloramphenicol). If untreated or late treated, complications include pneumonia, meningitis, liver failure, kidney failure, even multiple organ failure and death.

1.4. Diagnostic tests for rickettsial infection

Currently, the diagnosis of *Rickettsiaceae* is via three main groups of methods: serological methods (Weil-Felix, ELISA, IFA), direct culture isolation methods on cells, and molecular biology methods (PCR, real-

time PCR, sequencing, MLST). In recent years, molecular biology techniques have been increasingly applied in order to improve the sensitivity and specificity of the diagnosis; in addition, they can quickly and accurately identify species of *Rickettsiaceae* and clinical genotypes.

1.5. Diagnosis of patients infected with *Rickettsiaceae*

Clinical diagnosis of patients with rickettsial infection is based on epidemiological history, clinical manifestations and laboratory tests. Diagnosis of a suspected case is based on clinical manifestations: patients with acute fever with an unidentified cause, with eschar or manifestations such as headache, rash, swollen lymphadenopathy; multi-organ lesions such as liver, lung, kidney; and acute respiratory failure. The definitive diagnosis is based on the detection of *Rickettsiaceae* DNA in the patient's blood or eschar tissue by PCR technique, or the change in antibody titer in the recovered serum sample compared to the acute serum sample, using indirect immunofluorescence (IFA).

1.6. Treatment of patients infected with *Rickettsiaceae*

The specific antibiotic recommended for treatment of patients with *Rickettsiaceae* is doxycycline 200 mg/day for 7–10 days, chloramphenicol 2g/day, used for 5–7 days or after fever for 2–3 days, and azithromycin 500 mg/day for 3–5 days. In addition, patients infected with *Rickettsiaceae* need supportive treatment such as antipyretics, water rehydration, electrolytes; other supporting treatments such as albumin and vasopressor infusion, blood transfusion when patients are shocked; and respiratory support when patients have severe pneumonia.

1.7. Research situation on diseases caused by *Rickettsiaceae*

Currently, rickettsial diseases are still circulating and have a tendency

to spread; they are a global health problem that should be studied in many countries around the world. Epidemiological research on the serology of these diseases shows that in Northern Vietnam there is circulation of all three groups of *Rickettsiaceae*. However, a number of previous studies have only described the characteristics of scrub typhus. No studies have fully and comprehensively addressed the diseases caused by other *Rickettsiaceae* as well as the molecular biology of the *Rickettsiaceae* species causing disease and the relationship between genotypic characteristics and clinical and sub-clinical characteristics. The availability and severity of the disease, as well as prognostic factors for serious illness and death, have not been studied.

Chapter 2. RESEARCH SUBJECTS AND METHODS

– 2.1. Research subjects

The subjects were 142 patients diagnosed with rickettsial infection and admitted to the Central Tropical Hospital, from March 2015–March 2018.

2.1.1. Criteria for selecting patients

All of the patients (aged 15 years and over) admitted to the hospital met the following criteria:

1. Acute fever (≥ 3 days) that had not been identified.
2. Clinical manifestations of suspected rickettsial infection, such as eschar and/or at least one of the following: congestive skin, congestive conjunctiva, rash, lymphadenopathy, enlargement of the liver and/ or spleen.
3. The patient or legal guardian agreed to participate in the study.

The patient was diagnosed with rickettsial infection when he met the above selection criteria and had positive realtime PCR detection of *Rickettsiaceae*.

2.1.2. Criteria for exclusion of patients

1. Patients with fever that had clear evidence of other pathogens or non-infection, such as cancer, autoimmune system disease.
2. Patients being diagnosed and treated for liver and kidney failure.
3. Patients with HIV co-infection.
4. Patients that did not agree to continue participating in the study at any time.

– 2.2. Research Methods

2.2.1. Research design: prospective, descriptive cross-sectional studies.

2.2.2. Sample size: choosing a convenient sample according to the study time.

2.2.3. Research process

Patients admitted to the hospital, who satisfied the selection criteria detailed in Section 2.1.1, were given a detailed explanation of the conditions and the steps required to conduct the research study:

1. Collect the consent form to participate in the research.
2. Ask the patient (family members) about the history and course of the disease.
3. Physical examination, detection of symptoms that have appeared in patients.
4. Perform basic tests: blood counts, blood chemistry, coagulation, chest X-ray, abdominal ultrasound.
5. Assign tests to eliminate common pathogens such as Dengue, Leptospirose, Influenza, Measles, Malaria parasites. If the patient has a positive test with one of the above pathogens they will be excluded from the study.
6. Take 4 ml of blood into EDTA anticoagulant tube to send for realtime PCR test with *Rickettsiaceae*:
 - If the realtime PCR results are negative, the patient is excluded from the study

- If the RT PCR result is positive for *O. tsutsugamushi*, 56 kDa TSA gene is sequenced to determine the genotype of *O. tsutsugamushi*.
- 7. Patients who have sampled tested samples are immediately treated with one of the following antibiotic regimens:
 - Doxycycline 100 mg twice daily for 5 to 7 days, or
 - Azithromycin 500 mg/day for 3–5 days, or
 - Chloramphenicol 50 mg/kg/day in 2 divided doses for 5–7 days.
- 8. If the patient has complications, he/she will receive appropriate support treatment.
- 9. Monitor and evaluate the patients at the time of study entry date (N0), day 1 (N1), day 3 (N3) and day 7 (N7) after admission or day of patient discharge (Nrv).
- **2.2. Time and place of the research**

2.2.1. Research time: a period of 3 years, from March 2015 to March 2018.

2.2.2. Research location: National Hospital for Tropical Diseases

– **2.3. Research contents**

2.3.1. Objective 1 - Describe the clinical and subclinical characteristics of patients

2.3.2.1. Clinical epidemiological characteristics of patients infected with Rickettsiaceae:

- Distribution of patients by age, gender and occupation
- Distribution of patients by geographic region and by province
- Distribution by month, season in the year
- History of chronic illness, diagnosis and treatment before admission
- History of exposure to risk factors for disease transmission.

2.3.2.2. Clinical characteristics in patients infected with Rickettsiaceae:

- Time of onset of fever until admission, fever characteristics
- Symptoms: headache, myalgia, cough, nausea, vomiting
- Clinical manifestations in the skin, mucosa and peripheral lymph nodes
- Clinical manifestations: heart rate, blood pressure, breathing rate, SpO₂
- Expression on the organ system: circulatory, respiratory, digestive,

nervous.

2.3.2.3. Subclinical changes in patients with rickettsial

infection:

- Changes in blood formula tests, basic coagulation
- Changes in blood biochemistry: liver enzyme, kidney function, electrolytes
- Changes in arterial blood gas test
- Evaluation of changes on chest X-ray, abdominal ultrasound and ECG.

2.3.2. Objective 2 - Identify the species and genotypes of *Rickettsiaceae*

- Based on realtime PCR, identify the species of *Rickettsiaceae* that cause disease.
- Based on sequencing 56 kDa TAS gene, identify genotypes of *O. tsutsugamushi*.
- Compare the sequences of 56 kDa TAS gene in the study with the published sequences, building phylogenetic trees.
- Compare the epidemiological characteristics, clinical manifestations, subclinical changes of *Rickettsiaceae* species discovered in the study.
- Compare and identify the clinical features, characteristic subclinical changes of *O. tsutsugamushi* genotypes identified.

2.3.3. Objective 3 - Results of treatment and some prognostic mortality factors

2.3.3.1. Results of general treatment of patients infected with *Rickettsiaceae*:

- The rate of cure/mortality of patients
- The average time of defervescence, time of hospitalization of patients
- Treatment results according to species of *Rickettsiaceae* and genotypes of *O. tsutsugamushi*
- Treatment results according to antibiotic regimen, complications and severity of the disease.

2.3.3.2. Identify prognostic factors for serious illness and treatment outcome:

- Identify factors related to the severity of the disease
 - Identify factors that have a prognosis for mortality.
- 2.4. Indicators and evaluation criteria used in the research

2.4.1. Clinical and molecular epidemiological indicators

2.4.1.1. Clinical epidemiological indicators:

- The rate of patients distributed by age group, by sex
- Patient distribution rate by occupation and place of residence
- The rate of patients distributed by geographic province/region
- Patient distribution rate by month and by season

2.4.1.2. Molecular epidemiological indicators:

- The rate of species of *Rickettsiaceae* detected in the study
- The rate of genotypes of *O. tsutsugamushi* detected
- The rate of distribution of species of *Rickettsiaceae* by region and over time
- The rate of distribution of *O. tsutsugamushi* genotypes over time
- The rate of similarity between the gene sequences of *O. tsutsugamushi* in the study compared to the published reference strains.

2.4.1.3. Clinical indicators in patients

Determining the incidence of clinical symptoms encountered in patients.

2.4.1.4. Subclinical indicators in patients

Test parameters in blood counts, blood biochemistry, in patients are evaluated and compared with the biological control (Vietnamese people).

Commented [GB16]: OK as edited?

2.5. Criteria and scales used in the research

2.5.1. Criteria for assessing the severity of the disease

The patient's rickettsial infection is considered severe when there is multiple organ failure (MODS) and/or APACHE II ≥ 10 or qSOFA ≥ 2 points.

Commented [d17R16]: ok

2.5.2. Scales used in the study

- The APACHE II score: evaluating long-term health status and physiological parameters in the acute phase, version II.
- The qSOFA score: evaluating the status of organ failure.

2.6. Testing techniques used in the study

2.6.1. Realtime PCR technique

– **Objective:** identification of specific gene segments for *Rickettsiaceae* species, such as the gene coding for 47 kDa outer membrane protein of *O. tsutsugamushi*; *R. typhi*'s OmpB protein coding gene, and genes encoding the 17 kDa common outer membrane proteins of *R. typhi* and *Rickettsia* spp.

– **Research materials:**

+ **Chemicals:** Ficoll solution separates buffy coat layer; Qiagen DNA extraction kit (QIAamp DNA Mini Kit, Germany); Kit Kapa Biosystems (USA) and MgCl₂ 50 mM.

+ **Machine used:** 7500 Fast Real-Time PCR System (from Applied Biosystem USA)

+ *The primers and probes for genes 47 kDa, 17 kDa and OmpB were as follows:*

Name	Sequence (5'-3')
47 F Primer	AACTGATTTTATTCAAACATAATGCTGCT
47 R Primer	TATGCCTGAGTAAGATACRTGAATRGAATT
Probe 47	6FAM-TGGGTAGCTTTGGTGGACCGATGTTTAATCT-TAMRA
17 F Primer	GGGCGGTATGAAYAAACAAG
17 R Primer	CCTACACCTACTCCVACAAG
Probe 17	FAM-CCGAATTGAGAACCAAGTAATGC-TAMRA
OmpB F Primer	TGGTATTACTGCTCAACAAGCT

Primer <i>OmpB</i> R	CAGTAAAGTCTATTGATCCTACACC
Probe <i>OmpB</i>	FAM-CGCGATCGTTAATAGCAGCACCAGCATTATCGCG-BHQ1

- **Steps to proceed:** followed the procedure at laboratory department of National Hospital for Tropical Diseases.
- 2.6.2. *Genome sequencing techniques*
- **Objective:** Sequence gene encoding the 56 kDa outer membrane TAS protein of *O. tsutsugamush* to identify genotypes causing disease.
- **Research materials:**
 - + DNA sample: from a specimen positive for 47 kDa gene.
 - + Testing machine: ABI 3130 Genetic Analyzer Fast (of Applied BioSystems USA).
 - + Primer: use primers specific for 56 kDa TAS gene as follows:

Commented [GB18]: Give a reference?

Commented [d19R18]: Ok.

Name	Sequence (5'-3')
Otr56-573F (OtsuF)	5'-AATTGCTAGTGCAATGTCTG-3'
Otr56-980R (OtsuR)	5'-GGCATTATAGTAGGCTGAG-3'
Otr56-498F	5'-AATTAGTTTAGAATGGTTACCAC-3'
Otr56-1459R	5'-TCTGTATCTGTCGACAGATGCACTATTAG-3'

2.6.3. *Building the phylogenetic tree*

The results of the 56 kDa TAS gene sequencing were analyzed by ABI PRISM DNA Sequencing Analysis software version 3.0 (from Applied BioSystems) and compared with the gene bank sequences on

BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A phylogenetic tree was built for 56 kDa TSA gene sequence by the software MEGA 7.0.26.

– 2.7. Data collection and processing

The research data was collected into a sample research case, then entered and analyzed using SPSS 16.0 software with applied algorithms.

– 2.8. Research ethics

The study was approved by the medical ethics committee of Hanoi Medical University and National Hospital for Tropical Diseases.

Chapter 3. THE RESEARCH RESULTS

During the study, 142 patients diagnosed with rickettsial infection were included in the analysis. The research results of the patients are as follows.

3.2. Clinical and subclinical characteristics of the studied patients

3.1.5. Clinical epidemiological characteristics of patients

- The disease is found the same in both sexes. The average age of patients was 49.41 ± 16.28 ; most were aged from 31 to 60 years (65.49%).
- Patients were distributed throughout the year, mainly from May to October (71.13%).
- Distributed in 24 provinces and cities, most in Hanoi (34.51%) and neighboring provinces such as Phu Tho, Hung Yen, Nghe An, Hà Nam.
- The majority of patients live in rural areas (71.12%) and work in agriculture (50.70%).

3.1.6. Clinical characteristics of the patients

3.1.2.1. Symptoms seen in the patients

Table 3.1. Symptoms in patients with rickettsial infection

Characteristics	Number of patients (n = 142)	Rate %
-----------------	------------------------------	--------

Commented [GB20]: What about it was the same? Should this be 'The prevalence of the disease was the same in both sexes'?

Fever	142	100,00
Headache	128	90,14
Myalgia	105	73,94
Cough	64	45,07
Nausea	43	30,28
Vomiting	31	21,83
Diarrhea	30	21,13
Sore throat	22	15,49
Abdominal pain	20	14,08
Dyspnea	18	12,68

Commented [GB21]: Why use commas instead of decimal points?

Commented [d22R21]: it accodng to Vietnamese

The functional symptoms encountered in patients with rickettsial infection were fever (100%), headache (90, 14%), myalgia (73.94%).

Other symptoms were less common: cough, nausea, vomiting, diarrhea, sore throat, abdominal pain and dyspnea.

3.1.2.2.Characteristic fever of patients infected with Rickettsiaceae

The average duration of fever before admission was 8.63 ± 3.02 days.

Table 3.2. Characteristic fever of patients infected with Rickettsiaceae

Characteristics of fever		Num ber of patients (n = 142)	R ate %
Fever onset	Suddenly	98	6 9,01
	Ascending	44	3 0,99
Fever type	Continuous fever	85	5 9,86
	Fluttering fever	57	4 0,14
Nature of fever	Hot fever	107	7 5,35
	Chills, rigors	35	2 4,65
Fever level	Mild fever (37.5–38.5 °C)	80	5 6,34

(On admission)	Moderate fever (38.6–39.5 °C)	41	28,87
	High fever (> 39.5 °C)	21	14,79

Patients with fever caused by *Rickettsiaceae* often had sudden onset (69.01%), continuous (59.86%) or fluttering fever (40.14%); the majority had a hot fever (75.35%), rarely chills (24.65%); and usually their fever was mild (56.34%) or moderate (28.87%).

3.1.2.3. Manifestations of skin and mucous membranes in rickettsial patients

Table 3.3. Manifestations of skin and mucous membranes in rickettsial patients

Symptom	Number of patients (n = 142)	Rate %
Congestive skin	115	80,99
Congestive conjunctiva	99	69,71
Eschar	64	45,07
Rash	54	38,02
Edema	34	23,94
Lymphadenopathy	32	22,53
Jaundice/yellowing eyes	19	13,38
Hemorrhage skin	15	10,56

Common manifestations of *Rickettsiaceae* infection on the skin and mucous membranes of patients were: congestive skin (80.99%),

congestive conjunctiva (69.71%), and eschar 45.07%. Other less common symptoms were rash, edema, lymphadenopathy, jaundice and skin hemorrhage.

3.1.7. Subclinical characteristics of patients infected with Rickettsiaceae
3.1.3.1. Changes in blood count indicators

Table 3.4. Changes in blood count indicators

Complete blood count (CBC)		Number of patients (n = 142)	Rate %
Hemoglobin (g/l)	Hb ≥ 120	83	58,45
	120 > Hb ≥ 90	52	36,62
	90 > Hb ≥ 60	7	4,93
Leukocytes (G/l)	BC > 10	46	32,40
	10 ≥ BC ≥ 4	85	59,86
	BC < 4	11	7,74
Platelet (G/l)	TC ≥ 150	47	33,10
	150 > TC ≥ 100	26	18,31
	100 > TC ≥ 50	45	31,69
	TC < 50	24	16,90

Of the studied patients, 36.62% had mild anemia (90 ≤ Hb <120 g/l); 32.40% had leukemia (> 10 G/L) and 66.90% had thrombocytopenia <150 G/l), including 16.90% with severe thrombocytopenia (<50 G/l).

3.1.3.2. Changes in blood coagulation tests

Table 3.5. Changes in blood coagulation tests

Blood coagulation test	Number of patients (n = 116)	Rate %
PT < 70 (%)	36	31,03
Fibrinogen < 2.5 (g/l)	41	35,34
APTT > 40 (s)	57	49,14
INR > 1.5	4	3,45
D-Dimer > 500 µg/L, (n= 41)	39	95,12

The coagulation disorders seen in patients were as follows: decreased prothrombin rate < 70% (31.03%); decreased fibrinogen < 2.5 g/l (35.34%); and APTT lasting more than 40 seconds (49.14%). Of these, only 3.45% of patients had severe coagulation disorders with INR > 1.5.

3.1.3.3. Changes in blood biochemistry in patients with rickettsial infection

Table 3.6. Changes in liver function indicators

Liver function indicators	total	Number of patients	Rate %
AST ≥ 40 UI/L	42	134	94,37
ALT ≥ 40 UI/L	42	127	89,44
Albumin < 35 (g/L)	09	69	63,30

Bilirubin TP > 17(μ mol/l)	4	36	38,30
---------------------------------	---	----	-------

The liver dysfunctions seen in patients with rickettsial infection are elevated liver enzymes AST ≥ 40 UI/L (94.37%) and ALT ≥ 40 UI/L (89.44%); hypoalbuminemia < 35 g/l (63.30%); and increased total bilirubin > 17 μ mol/l (38.30%).

Table 3.7. Renal dysfunction, electrolytes and inflammatory factors

The test indicators	Total	Number of patients	Rate %
Urea > 7.5 mmol/l	1 42	32	22,5 4
Creatinine > 120 μ mol/L	1 42	20	14,0 8
Na ⁺ < 135 mmol/L	1 42	108	76,0 6
K ⁺ < 3.5 mmol/L	1 42	53	37,3 2
CRP > 12 mg/dl	1 32	122	92,4 2
PCT > 0.05 ng/ml	1 21	117	96,6 9

Most patients had increased inflammatory factors such as CRP (92.42%) and procalcitonin (96.69%). The rates of renal failure, hyponatremia and hypokaliemia were 14.08%, 76.06% and 37.32%, respectively.

3.1.4.2. Complications in patients with rickettsial infection

Table 3.8. Complications in patients with rickettsial infection

Complications	Number of patients	Rate %
Hypotension	50	35,21
Pneumonia	48	33,80
Renal failure	20	14,08
Hepatic dysfunction	19	13,38
Central nervous system disorders	15	10,56
Gastrointestinal bleeding	4	2,82
Multiple organ failure	37	26,06

Complications encountered in patients with rickettsial infection were hypotension (35.21%), pneumonia (33.80%), liver dysfunction (13.38%), central nervous disorder (10.56%), renal failure (9.15%) and gastrointestinal bleeding (2.82%). Multi organ failure was seen in 26.06% of patients.

3.2. Identifying the species and the genotype of *Rickettsiaceae* causing disease

3.2.1. *Rickettsiaceae* pathogenic species

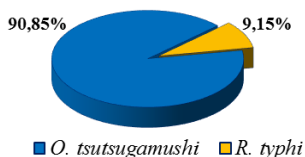


Chart 3.1. Rickettsiaceae pathogenic species

During the study, we identified two species of Rickettsiaceae: *O. tsutsugamushi* (90.85%) and *Rickettsia typhi* (9.15%).

3.2.2. The genotypes of *Orientia tsutsugamushi*

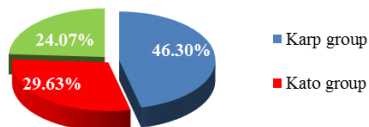


Chart 3.2. Genotypes of *O. tsutsugamushi*

The study identified three genotypes of *O. tsutsugamushi*: Karp (46.30%), Kato (29.63%) and Gilliam (24.07%).

3.2.3. Phylogenetic analysis of strains of *Orientia tsutsugamushi*

3.1.3.1. *O. tsutsugamushi* phylogenetic tree, based on the gene sequence of 56 kDa TSA protein

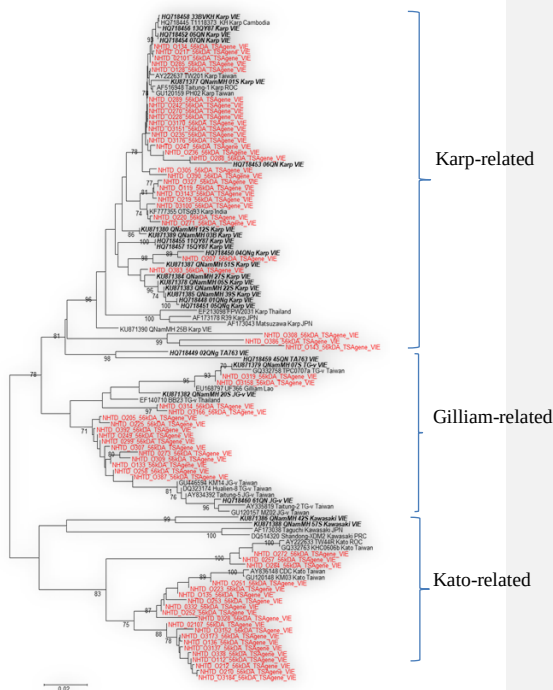


Figure 3.1 Phylogenetic tree of *O. tsutsugamushi*

Red: sequences of *O. tsutsugamushi* discovered in the study

Black: sequences in Vietnam (*italic*) and around the world (*non-italic*)

Commented [d23R22]: Ok

Commented [GB24]: Or 'roman'

Phylogenetic tree of *O. tsutsugamushi* 56 kDa TAS gene showed that all sequences found in our study were formed from the three main branches associated with genotype 3, which are Karp, Kato and Gilliam.

3.2.4.2. Clinical and subclinical characteristics according to the etiology

- When comparing clinical characteristics between scrub typhus patients and murine typhus patients, eschar and lymphadenopathy are not seen in murine typhus patients. Scrub typhus patients have more complications than murine typhus patients.
- When comparing the clinical characteristics of Karp, Kato and Gilliam genotypes of *O. tsutsugamushi*, the disease caused by the Karp genotype was more complicated than those of the Gilliam and Kato genotypes.

3.1.8. Treatment results

- Mortality rate: the death rate of the general is 6.34% (all scrub typhus patients). Mortality was higher in patients with complications, with multiple organ failure and with APCHE II ≥ 10 points.
- The average time of defervescence is 4.19 ± 2.43 days (from 1 to 18 days), of which 51.41% of patients cut fever more than 72 hours after treatment.
- Patients treated with doxycyclin had a shorter defervescence time and shorter hospital stay than those treated with azithromycin.

3.2. Prognosis factors of severe disease with multiple organ failure

Table 3.9. Univariate analysis of factors associated with multiple organ failure

Characteristics	MO DS (n = 37) n (%)	Non - MODS (n = 105) n (%)	p *	OR (95% CI)

Commented [GB25]: Do mean of the whole cohort?

Yes

Age $\geq$ 65	11 (29,73)	14 (13,33)	< 0,05	2,75 (1,12 – 6,78)
Fever $\geq$ 10 days	19 (51,35)	37 (35,24)	> 0,05	1,94 (0,91 – 4,14)
Skin hemorrhage	8 (21,62)	7 (6,67)	< 0,05	3,86 (1,29 - 11,55)
Edema	20 (54,05)	14 (13,33)	< 0,001	7,65 (3,25 - 18,02)
qSOFA $\geq$ 2	14 (37,84)	10 (9,52)	< 0,001	5,78 (2,28 - 14,67)
APACHE II $\geq$ 10	19 (51,35)	19 (18,10)	< 0,001	4,78 (2,12 - 10,78)
Platelet < 50 G/L	16 (43,24)	8 (7,62)	< 0,001	9,24 (3,50 - 24,39)
PCT $\geq$ 0,5 ng/mL	29 (78,38)	61 (58,10)	< 0,05	3,24 (1,41 - 7,41)
Karp genotype	9/15 (60,00)	16/39 (41,03)	> 0,05	2,16 (0,64 – 7,26)

** Univariate logistic regression analysis*

Univariate analysis showed that factors such as age $\geq$ 65, skin hemorrhage, peripheral edema, qSOFA score $\geq$ 2 and APACHE II $\geq$ 10, platelets < 50 G/L and PCT $\geq$ 0.5 ng/mL are associated with multiple organ failure in patients with rickettsial infection.

Table 3.10. Multivariate analysis of risk factors for multiple organ failure

Characteristics	p**	OR	95% CI
Age $\geq$ 65	> 0,05	0,44	0,08–2,52
Skin hemorrhage	> 0,05	3,03	0,30–30,53
Edema	> 0,05	0,84	0,15–4,77
Platelet < 50 G/L	< 0,05	4,16	1,21–14,37
PCT $\geq$ 2 ng/mL	> 0,05	1,04	0,37–2,91
qSOFA $\geq$ 2 points	< 0,05	1,99	1,25–2,62
APACHE II $\geq$ 10 points	< 0,05	10,27	1,51–69,79

** Multivariate logistic regression analysis

Multivariate logistic regression analysis showed that platelets < 50 G/L, qSOFA $\geq$ 2 points and APACHE II $\geq$ 10 points are independent factors associated with multiple organ failure ($p < 0.05$).

3.3.3. Predictive factors for mortality in patients with rickettsial infection

Table 3.11. Univariate analysis, factors related to mortality

Characteristics	Alive (n = 133) (%)	Deceased (n = 9) (%)	p *	OR (95% CI)
Age ≥ 65	24 (18,05)	1 (11,11)	> 0,05	0,56 (0,07– 4,76)
Fever ≥ 10 days	52 (39,10)	4 (44,44)	> 0,05	1,25 (0,32– 4,86)
Edema	28 (21,05)	6 (66,67)	< 0,05	7,50 (1,76– 31,89)
Skin hemorrhage	11 (8,27)	4 (44,44)	< 0,05	8,87 (2,08– 37,92)
Thrombocytopenia (<50 G/L)	20 (15,04)	4 (44,44)	< 0,05	4,52 (1,12– 18,29)
Altered sensorium (GCS ≤ 13)	10 (7,52)	5 (55,56)	< 0,05	15,38 (3,56– 66,49)
Pneumonia	41 (30,83)	7 (77,78)	< 0,05	7,85 (1,56– 39,45)
Hypotension	46 (34,59)	4 (44,44)	> 0,05	1,51 (0,39– 5,91)
Hepatic dysfunction	16 (12,03)	3 (33,33)	> 0,05	3,66 (0,83– 16,08)
Renal failure	16 (12,31)	4 (44,44)	< 0,05	5,70 (1,39– 23,47)

Multiple organ failure	29 (21,81)	8 (88,89)	< 0,05	28,69 (3,45– 238,8)
qSOFA ≥ 2 points	15 (11,28)	6 (66,67)	< 0,05	15,73 (3,56– 69,56)
APACHE II ≥ 10 points	32 (24,06)	6 (66,67)	< 0,05	6,31 (1,49– 26,69)

** Univariate logistic regression analysis*

Univariate logistic regression analysis showed that peripheral edema, skin hemorrhage, platelets < 50 G/L, altered sensorium (GCS ≤ 13), pneumonia, renal failure, multiple organ failure, qSOFA ≥ 2 points and APACHE II ≥ 10 are prognostic factors of mortality in patients.

Table 3.12. Multivariate analysis of prognostic factors for mortality in patients

Characteristics	p**	OR	95% CI
Thrombocytopenia < 50 G/L	$>$ 0,05	0, 92	0,17– 5,08
Pneumonia	$>$ 0,05	0, 97	0,12– 8,16
Multiple organ failure	$<$ 0,05	18 ,92	1,57– 228,61
qSOFA ≥ 2 points	$<$ 0,05	5, 63	1,05– 30,25
APACHE II ≥ 10 points	$>$ 0,05	2, 18	0,41– 11,45

**** Multivariate logistic regression analysis**

Multivariate logistic regression analysis showed that qSOFA score ≥ 2 points and multiple organ failure were independent prognostic factors of death in patients with rickettsial infection, ($p < 0.05$).

Chapter 4. DISCUSSIONS

4.1. Clinical and subclinical characteristics of patients with rickettsial infection

4.1.1. Clinical epidemiological characteristics of patients

- *Age and gender characteristics.* The proportion of male and female patients infected with *Rickettsiaceae* in our study was similar, respectively 49.30% and 50.07%. This rate is similar to the research results of the author Pham Thanh Thuy (male 50.6% and female 49.4%). In our opinion, the proportion of men and women reflects differences in exposure factors as well as the patient population treated at the research facility. Patients infected with *Rickettsiaceae* in the study were of all ages: the median was 50 years old, and the majority were 31–60 years old (65.49%), which is the main working age range. However, the elderly (> 60 years old) also contracted the disease with the rate of 24.94%. As such, people of all ages are at risk of being infected with *Rickettsiaceae*; however, people of working age have a higher incidence because of the risk of exposure to germs during the working process.

- *Distribution of patients by occupation and residence.* The majority of patients in the study live in rural areas (71.13%); the remainder live in urban areas (28.87%). While patients living in rural areas are mainly working in agriculture (60.40%), for patients living in urban areas the largest group was the self-employed (31.71%). In addition, 16.90% are retired or work as housewives, while students and other occupations make up a smaller proportion of urban patients. Our findings are similar to those of Pham Thi Thanh Thuy with 56.2% of patients being farmers working in the field and 72.9% of patients living in rural areas. The above characteristics can be explained by the fact that rural areas have many grasslands and rivers, which are favorable conditions for reservoirs and vectors of transmission (larvae, mites, fleas). They are at greater risk of exposure when they work in agriculture.

Commented [GB26]: OK as edited?

Commented [d27R26]: Ok

Commented [GB28]: OK as edited? It is not correct to say most of the urban patients were self-employed, because 31% is less than 50%.

Commented [d29R28]: Yes. Thank you

Commented [GB30]: OK as edited?

Commented [d31R30]: Ok

Commented [d32R30]:

Commented [GB33]: But how does this compare to the proportion of all Vietnamese people that live in rural areas?

Commented [d34R33]: Only compare with the result of Pham Thi Thanh Thuy

- *Geographical distribution.* Patients infected with *Rickettsiaceae* in the study reside in 24 provinces/cities of the North and North Central region. In particular, the largest group is in Hanoi (34.51%) and neighboring provinces such as Phu Tho (8.45%), Hung Yen (7.00%), Nghe An (7.00%), Ha Nam (4.23%) and Nam Dinh (4.23%). The low number of patients from the neighboring provinces can be explained by the fact that Central Hospital located in Hanoi, which provides treatment for these patients, only refers a small number of severely ill patients from the provinces to the National Hospital for Tropical Diseases for treatment.

- *Distribution of patients by time of year.* *Rickettsiaceae* infected patients are hospitalized throughout the year, but May to October accounted for 71.13% of patients; the highest proportion was in June (20.42%). This is the time when the North has high rainfall, temperature and humidity, which are favorable conditions for the vectors to spread. According to studies, the prevalence of *Rickettsiaceae* is closely related to the active season nature of the vector.

4.1.2. Clinical characteristics of patients infected with *Rickettsiaceae*

4.1.2.1. Characteristics and nature of fever onset in patients

According to the medical literature, fever is the first manifestation in patients infected with *Rickettsiaceae*. Fever characteristics of patients infected with *Rickettsiaceae* in our study were mostly sudden onset (69.01%), continuous fever (59.86%) or oscillation (40.14%), and often hot fever (75.35%), rarely chills (24.65%). At the time of admission, patients often had mild fever (56.34%) or moderate (28.87%), rarely high fever (14.79%) (Table 3.2). The characteristics and nature of fever in our patients are similar to those of Nguyen Trong Chinh, who found that 70.7% of patients had sudden onset of fever and 73.1% had continuous fever; and Pham Thi Thanh Thuy, who found that 64.9% had sudden onset of fever and 91.6% had continuous fever. Thus, the onset and fever characteristics of patients infected with *Rickettsiaceae* as above can help physicians guide the differential diagnosis of fever from other etiologies.

4.1.2.2. Symptoms of patients infected with *Rickettsiaceae*

Besides fever manifestations, other functional symptoms encountered in our study were headache (90.14%) and myalgia

Commented [GB35]: OK as edited?? I think I understood what you were saying, but check carefully.

(73.94%), and other less common symptoms were cough (45, 07%), nausea (30.28%), vomiting (21.83%), diarrhea (21.13%), sore throat (15.49%), abdominal pain (14.08%) and shortness of breath (12.68%) (Table 3.1). The prevalence of headache and myalgia in our study is similar to that of other studies: Pham Thi Thanh Thuy found 81.2% had headache and 67.7% myalgia; Nguyen Trong Chinh found 100% had headache and 78.4% myalgia; Hamaguchi found that 69.6% had headache and 73.4% had myalgia. Thus, our research results once again confirm the prevalence of these functional symptoms in patients with rickettsial infection.

3.1.2.3. Manifestations of rickettsial infection in skin of patients

Congestive skin and congestive conjunctiva are common manifestations of rickettsial infection, suggestive of diagnostic value. The prevalence of this symptom in other authors' studies is as follows: Nguyen Trong Chinh, 92.6%; Le Dang Ha and Cao Van Vien, 86.2%; Do Van Thanh, 76%; Pham Thanh Thuy, 88.0%. In our study, congestive skin was found in 80.96% of patients and congestive conjunctiva in 69.71% of patients (Table 3.3). Congestive skin and congestive conjunctiva are common symptoms in patients with rickettsial infection and can be used for clinical diagnosis.

Eschar are a specific sign of fever and are included in most clinical studies of the disease. The incidence of eschar in patients infected with *Rickettsiaceae* in Hamaguchi's study was 27.8% (of which 62.9% was in patients with fever and 2.9% in patients with rat fever). The incidence of eschar in our study is 45.07%, of which 96.87% of patients have only one ulcer and only two patients have two ulcers; ulcer size 5–10 mm (53.13%). Eschar are distributed in many different places on the body with thin skin, often in the private area, like the abdomen (25.00%), the groin (18.75%), the armpits (9.39%), the base of the neck and chest area (7.81%); other areas of the body also experience eschar with a smaller incidence.

The rash is considered by Professor Bui Dai to be one of the three most common symptoms in patients with fever (eschar, rash and swollen lymph nodes). In the study, 38.03% of patients had a rash. The rash appeared during the first week of the disease (31.58%) or the second week (43.04%); there was no rash in the patient in the third week of illness. Other authors also encountered rash at various rates: Bui Dai (72%), Hamaguchi (31.2%), P.T.T. Thuy (34.3%). The incidence of rash varies, probably due to different strains of *Rickettsiaceae*; the duration of illness and the immune status of patient populations vary between studies. The types of rash encountered in our study were maculopapular rash (64.81%) or maculopapular rash (35.19%); location is more commonly on the whole body (59.26%) or only in the body (24.07%), and less common in the face and limbs.

4.1.3. Subclinical transformation of patients infected with *Rickettsiaceae*

4.1.3.1. Changes in the patient's blood count

Thrombocytopenia is a hematological change in the rickettsial diseases, which has been reported by many authors: Do Van Thanh met with thrombocytopenia <100 G/L in 24.3% of patients; Pham Thi Thanh Thuy found platelets <100 G/l in 28.6%; Hamaguchi found thrombocytopenia in 45.0%. In our study, decreased platelets <100 G/L were found in 48.59% of patients; of which platelets <50 G/L accounted for 18.31%. Thrombocytopenia may be caused by *Rickettsiaceae* invading and injuring vascular endothelial cells and increasing platelet consumption; this can even lead to scattered intravascular coagulation and coagulation disorders. In addition, thrombocytopenia may be due to excessive phagocytosis or inhibition of myelogenesis. Our study once again confirms that thrombocytopenia is a fairly common haematological mutation in patients with rickettsial infection. Thrombocytopenia in an acute fever patient in an endemic area may be suggestive of a diagnosis of Rickettsioses, and need a differential diagnosis from other febrile thrombotic fevers, such as dengue hemorrhagic fever.

4.1.3.2. Changes in a patient's blood coagulation

About one third of patients in the current study had coagulopathy, of which 31.03% had prothrombin rate < 70%; 35.09% had decreased

Commented [GB36]: OK as edited?

Commented [d37R36]: It is different meaning

fibrinogen < 2.5 g/l; 48.96% had APTT lasting for more than 40 seconds, and 95.12% of the patients tested had increased D-Dimer > 500 µg/L (Table 3.5). [The phenomenon of coagulation disorder in febrile fever has also been reported by authors Jim W.T, Thap L.C and Venkategowda. [The authors explained that thrombocytopenia and coagulation factors are caused by bacteria that damage vascular endothelial cells, thereby activating the scattered intravascular coagulation system (DIC), causing increased consumption of factors. Coagulation reduces fibrinogen and increases breakdown products of fibrinogen. DIC can cause clogged arteries and reduce the perfusion of organs leading to multiple organ failure. Therefore, in addition to assessing the degree of thrombocytopenia, it is necessary to assess the degree of coagulation disorders in patients in order to detect clinical complications early.

4.1.3.3. Changes in a patient's blood biochemistry

- *Hepatic dysfunction*: expressed by biochemical blood tests such as increased bilirubin, increased liver enzymes and hypoalbuminemia. In our study, most patients had elevated liver enzymes: AST ≥ 40 UI/l was encountered at 94.37%, ALT ≥ 40 UI/l was encountered at 89.44%; in addition, total bilirubin > 17 µmol/l was found in 38.03% of patients and decreased serum albumin < 35 g/l in 67.89% (Table 3.6). The reason for the increase in liver enzymes, according to Bui Dai and Varghese, is the excessive immune response after bacterial infection that causes liver cell damage. Thus, an increase in liver enzymes may be a sign of clinical diagnosis. Increased levels of liver enzymes and bilirubin have also been reported as prognostic factors for multiple organ failure and death in patients with rickettsial infection.

- *Renal dysfunction*. In our study, renal failure (creatinine > 120 µmol/l) was encountered in 14.08% of the patients tested (Table 3.7). According to Bui Dai, the nature of kidney damage in rickettsioses is capillary inflammation, which leads to interstitial nephritis, renal tubular degeneration, glomerular anemia and interstitial hemorrhage. The renal dysfunction in our study reflects the severity of the disease, helping clinicians guide the diagnosis and treatment.

Commented [GB38]: I moved this to avoid confusion because you had your results in between two references to the other study

Ok

Commented [d39R38]: Ok

- *Increased inflammatory factors.* Increased CRP and PCT were found in 92.42% and 96.69% of the patients, respectively, of which the prevalence of CRP > 30 mg/dl was 82.57% and PCT increase $\geq$ 0.5 ng/ml was 74.38%. The increase in CRP inflammatory factors has been reported by some authors: Jim W.T encountered 95% of patients with an increase in CRP > 8 mg/dl; Mahdi Asmaa Sabr met 100% of patients with CRP. The cause of increased CRP and PCT is *Rickettsiaceae* parasites in macrophages and monocytes, stimulating white blood cells to secrete cytokines (TNF α , IL10, etc.) to attraction of leukocytes and activate macrophages to kill bacteria. This process causes vasodilation, edema in inflammatory tissue and increases CRP and procalcitonin.

– **4.2. Identifying pathogenic species *Rickettsiaceae***

4.2.1. *Rickettsiaceae* pathogenic species in the study

By realtime PCR, we have identified two species of pathogenic *Rickettsiaceae*, *O. Tsutsugamushi*, which causes scrub typhus, accounting for 90.85%, and *R. typhi*, which causes murine typhus, accounting for 9.15% of disease in 142 patients (Figure 3.1). The proportion of patients infected with *Rickettsiaceae* in our study is higher than found by Le Viet Nhiem (in Central, 2017) of 25.4%. However, it is lower than in Hamaguchi's research with scrub typhus accounting for 40.9% and murine typhus for 33.3% of patients with unexplained fever; this difference could be due to the difference in diagnostic methods used in the studies. Hamaguchi's diagnostic method was a serological method (IFA), while we and Le Viet Nhiem used the realtime PCR method to diagnose with sensitivity of about 70% and 100% specificity. Our research once again reinforces the epidemiology of *Rickettsiaceae* diseases in Vietnam: the highest proportion is scrub typhus, followed by murine typhus and other *Rickettsia* can also be encountered at a lower rate.

4.2.2. Genotypes of *O.tsutsugamushi* causing scrub typhus

Of the 129 samples that tested positive for *O. tsutsugamushi*, only 54 samples had sufficient DNA concentration to successfully sequence the 56 kDa TAS gene sequence. From the gene sequencing, we have identified three genotypes of disease: Karp (46.29%), Kato (29.63%) and Gilliam (24.07%) (Figure 3.2). The Karp genotype dominated, in agreement with Veasna Duong in the Central (2011), Nguyen Le Khanh Hang in the North (2016) and Le Viet Nhiem in

the Central (2017). It plays an extremely important role in causing scrub typhus in Vietnam.

Commented [GB40]: Do you mean *O. tsutsugamushi*?

Commented [d41R40]: No, it means Karp genotype

4.2.3. A phylogenetic tree of *O. tsutsugamushi*

Using the sequencing results for the 56 kDa TSA specific gene of *O. tsutsugamushi*, the similarity of the sequences in the current study with the sequences discovered and published in the gene bank was analyzed and used to construct phylogenetic trees (Figure 3.1). This analysis showed that the detected strains were genetically related to *O. tsutsugamushi*, in a study of three genotypes: Karp, Kato and Gilliam. These strains have a close genetic link to strains that have been detected and published in Vietnam as well as in the region. However, there were differences in the gene sequence, from 0% to 6%, compared to reference strains, showing the diversity in the genetic structure of *O. tsutsugamushi*.

Commented [GB42]: OK as edited?

Commented [d43R42]: OK

– 4.3. Treatment outcomes and prognostic factors

4.3.1. Treatment results

In the study, nine patients died (all were scrub typhus patients), accounting for 6.34%. Of these, one patient had genotype Karp, two patients had genotype Kato and six patients had an unknown genotype. The average duration of defervescence and the rate of fever reduction within 48 hours after treatment are indicators commonly used by researchers to evaluate the effectiveness of treatment. The average duration of defervescence in the study was 4.19 ± 2.43 days, of which 20.42% defervescence occurred within 48 hours after treatment. The average duration of fever reduction was not different between scrub typhus and murine typhus patients, as well as between the three genotypes Karp, Kato and Gilliam causing scrub typhus. In our opinion, the time required to cut the patients' fever depends on the length of time the patient has had access to specific treatment, the patient's immune response traits, the incidence of complications and the response to antibiotic treatment.

Commented [GB44]: OK as edited?

Commented [d45R44]: ok

4.3.2. Severe prognosis factors

In the study, multiple organ failure was found in 26.06% of patients, APACHE II ≥ 10 was encountered in 26.76% and qSOFA ≥ 2 points was encountered in 14.79%. The analysis showed that the mortality rate and duration of defervescence, and average hospital stay in patients with complications of multiple organ failure were higher than in patients without multiple organ failure, and the

difference was statistically significant, with $p < 0.05$. When comparing the results of treatment by APACHE II, it was found that patients with APACHE II score ≥ 10 had a higher mortality rate and longer hospital stay than those with APACHE II score < 10 . Univariate analysis showed: age ≥ 65 , subcutaneous skin hemorrhage, peripheral edema, qSOFA score ≥ 2 , APACHE II ≥ 10 points, thrombocytopenia < 50 G/L, increase PCT ≥ 0.5 ng/mL were associated with multiple organ failure (Table 3.9). When allocating the above factors into multivariate logistic regression analysis, platelets decreased < 50 G/L, qSOFA ≥ 2 points and APACHE ≥ 10 points are factors that are independently associated with multi-organ failure. (Table 3.10). In particular, qSOFA scores correlated with organ failure more closely than APACHE II scores (with r being 0.62 and 0.43).

4.3.3. The prognostic factors of death in patients with *Rickettsiaceae*

When conducting univariate analysis, the incidence of the following symptoms: peripheral edema, subcutaneous skin hemorrhage, thrombocytopenia < 50 G/L, altered sensorium (GCS ≤ 13), pneumonia, impairment renal, multiple organ failure, qSOFA score ≥ 2 and APACHE II ≥ 10 were higher in patients with mortality compared to the alive group ($p < 0.05$) (Table 3.11). When putting these factors into the multivariate analysis, qSOFA score ≥ 2 and multiple organ failure (MODS) are independent prognostic factors of death in patients with rickettsial infection (Table 3.12). Patients with qSOFA ≥ 2 points had mortality increased to 5.63 times and in patients with multi-organ failure, the death rate increased to 18.92 times. Some authors have also studied prognostic factors of mortality in patients with rickettsial infection: Varghese G.M. shows that jaundice, vasomotor shock, ARDS pneumonia, respiratory distress requiring mechanical ventilation and renal failure are factors related to mortality. According to Silpapojakul, age > 65 and renal failure are independent prognostic factors of death. Thus, patients admitted to the hospital with multiple organ failure and/or qSOFA ≥ 2 points or APACHE II ≥ 10 points, advanced age, with complications, should be monitored and treated as well as given early specific antibiotic treatment to minimize the risk of death for patients.

CONCLUSION

Commented [GB46]: OK as edited?

Commented [d47R46]: Ok

Commented [GB48]: OK as edited? This sentence was incomplete.

Commented [d49R48]: i rewrited. Is it ok?

1. Clinical and subclinical characteristics of rickettsioses patients

- Patients with rickettsial infection can occur at all ages, the same in two gender, scattered throughout the year, the peak from May to October (71.13%), in 24 provinces, most of them worked in agriculture (50.70%) and living in rural areas (71.13%).

- Clinically, rickettsioses usually manifests with fever, headache, myalgia, congestive skin, congestive conjunctival, eschar and rash.

- The common subclinical changes in rickettsioses patients are increase in liver enzymes AST, ALT, and inflammatory factors such as PCT, CRP, hyponatremia, hypoproteinemia and thrombocytopenia.

2. Species of *Rickettsiaceae* and genotypes causing acute fever

- The two species of *Rickettsiaceae* identified in the study were *O. tsutsugamushi* (90.85%) and *R. typhi* (9.15%). Scrub typhus patients have more complications than murine typhus patients; eschar and peripheral lymphadenitis are seen only in scrub typhus, not in murine typhus

- Three genotypes of *O. tsutsugamushi* were identified: Karp (46.29%), Kato (29.63%) and Gilliam (24.07%); they are genetically closely related to the reference strains that have been discovered and published in Central Vietnam and other countries in the region. Patients with the Karp genotype had complications, thrombocytopenia, and higher PCT than ones with the Kato and Gilliam genotypes.

3. Treatment outcome and prognostic factors of severe, fatal disease

- The average time of fever reduction was 4.19 ± 2.43 days; the death rate is 6.34%. Patients treated with doxycyclin had a shorter cut-off time fever and shorter hospital time than ones treated with azithromycin.

- Thrombocytopenia $< 50 \text{ G/l}$, qSOFA ≥ 2 points and

APACHE II $\geq$ 10 points are factors that are independently associated with multiple organ failure; QSOFA score $\geq$ 2 and multiple organ failure are independent prognostic factors of death in patients with rickettsial diseases.

NEW CONTRIBUTION OF THE THESIS

This is the first study about the clinical and subclinical characteristics of rickettsioses patients according to species and genotypes of pathogen by Realtime PCR in Vietnam. The study also evaluated the treated results of several antibiotic regimens and identified some risk factors that associated with severe diseases and death. The research results play an important role in guiding clinical practice such as diagnosis and treatment of patients with rickettsial infection in our country.