

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO                      BỘ Y TẾ**  
**VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

-----

**TRẦN THỊ MINH TÂM**

**NGHIÊN CỨU KIỂU GEN HLA LỚP I VÀ ĐỘT BIẾN  
GEN HIV-1 LIÊN QUAN ĐẾN TẢI LƯỢNG VI RÚT VÀ  
SỐ LƯỢNG TẾ BÀO CD4, HÀ NỘI 2014 - 2016**

**Chuyên ngành: Vi sinh vật**

**Mã số: 9 42 01 07**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC**

**Hà Nội – 2023**

**CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU NÀY ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI  
VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG**

**Người hướng dẫn khoa học:**

1. PGS.TS. Nguyễn Thị Lan Anh
2. TS. Nguyễn Thùy Linh

Phản biện 1: .....

.....

Phản biện 2: .....

.....

Phản biện 3: .....

.....

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng đánh giá luận án cấp Viện  
hợp tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

Vào hồi.. ...giờ ....., ngày .....tháng .....năm 2023.

*Có thể tìm hiểu luận án tại:*

1. Thư viện Quốc gia
2. Thư viện Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

**DANH SÁCH CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN  
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **Tam Tran Thi Minh**, Yuta Hikichi, Shoji Miki, Yuriko Imanari, Shigeru Kusagawa, Midori Okazaki, Thao Dang Thi Thu, Teiichiro Shiino, Saori Matsuoka, Hiroyuki Yamamoto, Jun Ohashi, William W. Hall, Tetsuro Matano, Lan Anh Nguyen Thi, Ai Kawana-Tachikawa. (2022), “Impaired protective role of HLA-B\*57:01/58:01 in HIV-1 CRF01\_AE infection: a cohort study in Vietnam”, *International Journal of Infectious Diseases*. 128, pp. 20–31.
  
2. **Tran Thi Minh Tam**, Nguyen Thuy Linh, Phan Ha My, Nguyen Thi Lan Anh. (2021), “Characteristics allelic of Human Leukocyte Antigen class I genotype and association with viral load and CD4 cell count in HIV-1 infected patients, Hanoi 2014 – 2016”, *Vietnam Journal of Preventive Medicine*. 31(4), pp. 43-50.
  
3. Naofumi Takahashi, Saori Matsuoka, **Tam Tran Thi Minh**, Hien Pham Ba, Taeko K. Naruse, Akinori Kimura, Teiichiro Shiino, Ai Kawana-Tachikawa, Koichi Ishikawa, Tetsuro Matano, Lan Anh Nguyen Thi. (2019), “Human leukocyte antigen-associated *gag* and *nef* polymorphisms in HIV-1 subtype A/E-infected individuals in Vietnam”, *Microbes and Infection*. 21(2), pp. 113-118.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi rút Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) là căn nguyên gây ra hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải ở người, chủ yếu nhân lên trong tế bào lympho T. Các kháng nguyên của vi rút sẽ bị phân cắt bởi phân tử kháng nguyên bạch cầu người (Human Leucocyte Antigen - HLA) lớp I và trình diện trên bề mặt tế bào ở dạng phức hợp HLA - kháng nguyên cho các tế bào T CD8 nhận diện. Tiếp theo quá trình nhận diện bởi tế bào T CD8, các phản ứng gây độc tế bào (cytotoxic T lympho - CTL) được kích hoạt làm cho tế bào đã nhiễm vi rút bị tiêu diệt, và tế bào chưa nhiễm được bảo vệ.

Vi rút HIV-1 có khả năng trốn thoát đáp ứng miễn dịch bằng cách biến đổi di truyền để các protein không bị phân cắt, không tạo phức với phân tử HLA và không bị nhận diện bởi tế bào T CD8. Đột biến trốn thoát miễn dịch của vi rút HIV có tính liên kết với phân tử HLA. Trốn thoát đáp ứng miễn dịch vật chủ của vi rút HIV-1 là thách thức đối với hiệu quả của vắc xin phòng chống AIDS.

Phân tử HLA đa hình và đa dạng kiểu gen, có phân bố khác nhau theo chủng tộc. Một số kiểu gen/alen HLA lớp I có ảnh hưởng khác nhau tới tiến triển AIDS ở người nhiễm HIV-1 phân típ B/C – phân típ lưu hành chủ yếu ở Châu Âu, Bắc Mỹ, Úc và Châu Phi, đã được xác định. Alen HLA có thể làm thúc đẩy tiến triển nhiễm HIV như B\*35, nhưng cũng có thể làm chậm tiến triển tới AIDS như B\*27 và B\*57. Đồng thời, nhiều đột biến trốn thoát đáp ứng miễn dịch theo HLA cũng đã được xác định, điển hình

như Gag R264K liên kết với B\*27 và Gag T242N liên kết với B\*57.

Vai trò của phân tử HLA với tiến triển nhiễm HIV-1 phân típ CRF01\_AE, lưu hành phổ biến ở khu vực Đông Nam Á trong đó có Việt Nam, cũng như các đột biến trốn thoát miễn dịch liên kết với HLA còn ít được nghiên cứu và còn nghiên cứu hạn chế ở một số gen cấu trúc. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm: (1) Mô tả tần suất một số kiểu gen HLA lớp I phổ biến ở người Việt Nam; (2) Xác định đột biến gen *gag*, *nef*, *vif*, *vpu*, *vpr* của HIV-1 có liên kết với kiểu gen HLA lớp I; (3) Đánh giá ảnh hưởng của đột biến HIV-1 liên kết với kiểu gen HLA lớp I đến tải lượng vi rút và số lượng tế bào CD4.

### ***Những điểm mới về khoa học và giá trị thực tiễn của đề tài***

Nghiên cứu bổ sung dữ liệu quần thể về đột biến của vi rút HIV-1 phân típ CRF01\_AE dưới áp lực chọn lọc HLA lớp I ở người nhiễm HIV tại Việt Nam. Nghiên cứu cung cấp thông tin hữu ích về những vị trí đích có khả năng chịu tác động hiệu quả của đáp ứng miễn dịch tế bào, cần thiết cho thiết kế vắc xin peptide phù hợp với phân típ CRF01\_AE.

## **CẤU TRÚC CỦA LUẬN ÁN**

Luận án gồm 130 trang không gồm tài liệu tham khảo và phụ lục, có 27 bảng và 40 hình. Đặt vấn đề 1 trang. Tổng quan 42 trang; phương pháp nghiên cứu 17 trang; kết quả nghiên cứu 41 trang; bàn luận 18 trang; kết luận 1 trang và khuyến nghị 1 trang.

## CHƯƠNG I. TỔNG QUAN

### 1.1. Vi rút HIV-1 và hội chứng suy giảm miễn dịch ở người

#### 1.1.1. Giới thiệu vi rút HIV

Vi rút HIV (Human Immunodeficiency Virus) thuộc chi Lentivirus, họ Retroviridae gây nhiễm trùng chậm. Tại Việt Nam chủ yếu lưu hành HIV-1 phân tít tái tổ hợp CRF01\_AE, một số ít phân tít B.

Vật liệu di truyền của HIV là RNA sợi đơn có kích thước 9,8kb. Các protein Gag-Pol và Env của vi rút HIV-1 có vai trò là thành phần cấu tạo hạt virion. Nhóm protein thực hiện các chức năng gồm Nef (negative factor), Vif (virion infectivity factor), Vpr (viral protein R), Vpu (viral protein U) và nhóm protein giữ vai trò điều hoà gồm Tat (Trans-Activator of Transcription) và Rev (Regulator of Virion protein expression).

#### 1.1.2. Đáp ứng miễn dịch đối với nhiễm HIV-1

##### 1.1.2.1. *Đáp ứng miễn dịch tự nhiên (natural immunity) đối với nhiễm HIV-1*

Các đáp ứng miễn dịch tự nhiên trong giai đoạn nhiễm HIV-1 cấp tính và mạn tính ghi nhận vai trò quan trọng của tế bào NK. Phân tử MHC lớp I là phối tử liên kết với thụ thể của tế bào NK. Các tế bào bị nhiễm vi rút giảm biểu hiện phân tử MHC lớp I, khi đó tế bào NK nhận biết tiêu diệt các tế bào đích. KIR kết hợp với HLA lớp I đã được chứng minh có liên quan đến tiến triển bệnh chậm hơn ở người nhiễm HIV-1 và kiểm soát vi rút trong máu (Martin và cs. 2002; Martin và cs. 2007).

##### 1.1.2.2. *Đáp ứng miễn dịch thích ứng (adapted immunity) đối với nhiễm HIV-1*

Trong đáp ứng miễn dịch thích ứng, tế bào T CD8 kiểm soát quá trình nhân lên của vi rút HIV. Các đột biến trốn thoát đáp ứng tế bào T CD8 liên tục xuất hiện trong giai đoạn nhiễm vi rút mạn tính, làm suy giảm chức năng, cạn kiệt tế bào T và làm mất khả năng kiểm soát vi rút tăng sinh (Appay và cs. 2002; Papagno và cs. 2004; Champagne và cs. 2001). Đáp ứng tế bào T CD8 phụ thuộc vào phân tử HLA lớp I. Tế bào T CD8 nhận diện kháng nguyên vi rút được trình diện trên bề mặt tế bào bị nhiễm bởi các phân tử HLA lớp I, bao gồm HLA-A, HLA-B và HLA-C. HLA tạo áp lực lên vi rút HIV-1, dẫn tới xu hướng vi rút trốn thoát đáp ứng miễn dịch bằng tạo ra các đột biến.

## **1.2. Vai trò của HLA lớp I trong đáp ứng miễn dịch tế bào với nhiễm HIV-1**

### **1.2.1. Đặc điểm cấu trúc HLA lớp I**

Phân tử MHC lớp I gồm hai chuỗi polypeptide, một chuỗi dài  $\alpha$  và một chuỗi ngắn  $\beta$  gọi là  $\beta 2$ -microglobulin (Goulder and Walker 2012). Vùng liên kết gắn peptide là vùng biến đổi nhiều nhất và quyết định các motif liên kết trên peptide.

### **1.2.2. Đa dạng kiểu gen HLA alen**

Phân bố kiểu gen/alen HLA khác nhau địa dư, trong đó ưu thế của HLA-B so với HLA-A/C duy trì trên toàn cầu. B\*52 là HLA-B lưu hành chính ở Nhật Bản với tỷ lệ 21%, trong khi ở Thái Lan lưu hành chủ yếu B\*46 với tỷ lệ 29% (Goulder and Watkins 2008). A\*33:03 và B\*15:02 lưu hành với tỷ lệ cao ở khu vực Châu Á, trong đó có Việt Nam.

### **1.2.3. Vai trò của HLA lớp I trong đáp ứng miễn dịch với nhiễm HIV-1 và kiểm soát lây truyền**

Trong đáp ứng miễn dịch thích ứng, HLA lớp I đặc biệt quan trọng với vai trò trình diện kháng nguyên và định hướng cho khả năng đáp ứng miễn dịch thích ứng của quần thể với kháng nguyên (Lazaryan và cs. 2011).

HLA là yếu tố di truyền có vai trò chính trong kiểm soát lây nhiễm HIV (Goulder and Walker 2012). Tính đồng dạng hoặc tương đồng của các phân tử HLA lớp I, đặc biệt là các alen HLA-B, gia tăng nguy cơ lây truyền (Dorak và cs. 2004).

#### **1.2.4. Tác động của HLA lớp I tới tiến triển nhiễm HIV**

Kiểu gen dị hợp tử của HLA có khả năng nhận diện và xử lý kháng nguyên đa dạng hơn so với kiểu gen đồng hợp tử, dẫn đến đáp ứng miễn dịch hiệu quả hơn với một loạt các mầm bệnh (Hughes and Yeager 1998). Người có kiểu gen HLA đồng hợp tử thường mang alen tần suất cao trong quần thể (Goulder, Price, và cs. 1997; McMichael and Klenerman 2002).

HLA-B có 1.898 trong số 4.269 alen lớp I (chiếm 44,5%), theo dữ liệu IMGT-HLA năm 2011 (Robinson và cs. 2011). Các alen nổi trội có tác động làm chậm tiến triển bệnh hầu hết là alen B, gồm B\*27 và B\*57 (Flores-Villanueva và cs. 2001), gia tăng tiến triển AIDS được ghi nhận với vai trò của B\*35 và B\*08 (Wright và cs. 2010).

### **1.3. Khả năng trốn thoát đáp ứng miễn dịch của vi rút HIV-1 trong môi liên kết với HLA lớp I**

#### **1.3.1. Đặc điểm kháng nguyên của vi rút HIV-1**

Kháng nguyên của vi rút HIV-1 rất đa dạng và được hệ thống miễn dịch nhận diện thông qua các phân tử HLA. Protein khác



nhau của vi rút thể hiện khả năng tạo đáp ứng miễn dịch và nhận diện bởi tế bào T CD8 khác nhau (Masemola và cs. 2004).

Một kháng nguyên có thể có một hoặc nhiều epitope, phân tử kháng nguyên càng lớn thì càng có nhiều epitope. Một epitope có thể được nhận diện bởi HLA khi có trình tự axit amin phù hợp với các vị trí liên kết.

### **1.3.2. Đột biến trốn thoát đáp ứng miễn dịch**

HIV-1 có tỷ lệ đột biến cao, ước tính khoảng  $2 \times 10^5$  đột biến điểm sau mỗi chu kỳ sao chép (Cuevas và cs. 2015). Các đột biến xuất hiện ở hầu hết protein vi rút. Có 3 dạng đột biến có thể ảnh hưởng đến phản ứng CTL (Carlson và cs. 2015): (1) Trốn thoát quá trình xử lý kháng nguyên (Draenert và cs. 2004); (2) Trốn thoát quá trình gắn với HLA (Goulder, Phillips, và cs. 1997); (3) Trốn thoát TCR (Iglesias và cs. 2011).

Đột biến trốn thoát CTL xuất hiện sớm và tích lũy theo thời gian nhiễm vi rút. Đa số các đột biến trốn thoát CTL biết đến thuộc phân típ B/C, một số đột biến thuộc phân típ CRF01\_AE (Kloverpris, Leslie, and Goulder 2015).

### **1.3.3. Sự thích nghi của vi rút mang đột biến trốn thoát miễn dịch**

Đột biến trốn thoát CTL của HIV-1 làm ảnh hưởng đến sinh lực của vi rút ở các mức độ khác nhau (Zanini và cs. 2017). Phần lớn các nghiên cứu đánh giá sinh lực của biến thể mang đột biến dựa vào đánh giá khả năng sao chép *in-vitro*, *in-vivo*, ít đánh giá về khả năng lây nhiễm.

### **1.3.4. Khả năng lây truyền biến thể vi rút mang đột biến trốn thoát miễn dịch liên kết với kiểu gen HLA**

Khả năng lây nhiễm của biến thể mang đột biến trốn thoát miễn dịch phụ thuộc vào sự tương thích với kiểu gen/alen HLA của cá thể bị lây nhiễm. Biến thể mang đột biến trốn thoát CTL có sinh lực không bị suy giảm có thể duy trì đột biến này khi lây nhiễm vào cá thể mang kiểu gen HLA trùng khớp (phù hợp) hoặc sẽ khôi phục trở lại trình tự ban đầu khi cá thể nhiễm không có kiểu gen HLA kích hoạt CTL (Paul Klenerman 2002; Moore và cs. 2002; Goulder và cs. 2001).

Trường hợp biến thể vi rút mang đột biến bị suy giảm sinh lực lây nhiễm vào vật chủ mới, tăng sinh vi rút có thể giảm đi và tiến triển nhiễm vi rút bị chậm lại, do đó có thể giảm xác suất lây truyền và tăng khả năng kiểm soát HIV-1 lâu dài ở vật chủ mới (Chopera và cs. 2008; Goepfert và cs. 2008). Mức độ ảnh hưởng đối với vật chủ khi đó sẽ giảm đi, từ gây bất lợi hoàn toàn đến tác động trung tính khi người nhận mang HLA phù hợp, hoặc từ không ảnh hưởng đến trở nên có lợi cho vật chủ khi người nhận mang HLA không phù hợp.

### **1.3.5. Cơ sở dữ liệu đột biến liên kết với HLA**

Đột biến trốn thoát CTL có thể được dự đoán tại các vị trí đột biến của vi rút HV-1 liên kết với HLA. Hiện nay dữ liệu đột biến liên kết công bố trên Los Alamos (<https://www.hiv.lanl.gov/>) là đầy đủ nhất. Đột biến của phân típ B được sử dụng tham chiếu cho HIV phân típ khác. Tại Việt Nam, các nghiên cứu liên kết giữa đột biến gen vi rút và HLA còn hạn chế, với 3 công bố quốc tế cho đến nay (Lazaro và cs. 2011; Van Tran và cs. 2016; Takahashi và cs. 2019).

## CHƯƠNG II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Thiết kế nghiên cứu

Mô tả kết hợp phân tích, thực nghiệm.

### 2.2. Địa điểm, thời gian nghiên cứu

Mẫu bệnh nhân được thu thập trong giai đoạn từ 2014 – 2016. Phân tích được thực hiện từ năm 2018 – 2023, tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

### 2.3. Đối tượng nghiên cứu

Tiêu chuẩn lựa chọn: (i) bệnh nhân > 18 tuổi, (ii) được chẩn đoán nhiễm HIV và (iii) đồng ý tham gia nghiên cứu. Tiêu chuẩn loại trừ: bệnh nhân đã/đang điều trị ARV.

### 2.4. Cỡ mẫu nghiên cứu và cách chọn mẫu

Đề tài nghiên cứu sinh sử dụng tối đa số mẫu đã thu thập để thực hiện xét nghiệm và phân tích số liệu. Từ tháng 12/2012 – 04/2016, nghiên cứu đã tuyển chọn và thu thập mẫu của 304 bệnh nhân, tại 13 phòng khám ngoại trú trên địa bàn Hà Nội.

### 2.5. Biến số nghiên cứu

**Bảng 2. 2. Biến số và chỉ số nghiên cứu**

	<b>Biến số</b>	<b>Chỉ số</b>
Mô tả đặc điểm quần thể nghiên cứu	Tuổi	Trung bình, trung vị
	Giới tính	Định tính giới, số lượng
	Dân tộc	Số lượng, tỷ lệ các dân tộc
	Số lượng tế bào CD4	Tế bào/ $\mu$ L, trung bình, trung vị
	Tải lượng vi rút trong huyết tương	Copies/ml, trung bình, trung vị
Mục tiêu 1	Mô tả kiểu gen, tương quan kiểu gen HLA alen và pVL, CD4	Kiểu gen alen; Tần suất alen; % bệnh nhân mang alen; Giá trị p (Welch's t test)

Mục tiêu 2	- Mô tả trình tự gen vi rút, đột biến liên kết với HLA	% tương đồng axit amin; số lượng đột biến; Giá trị p, giá trị q (Fisher exact test)
Mục tiêu 3	Phân tích đột biến liên kết với HLA ảnh hưởng đến pVL và CD4	Giá trị p (kiểm định Mann-U Whitney)

## 2.6. Phương pháp và công cụ thu thập thông tin

Phỏng vấn và tra cứu theo bệnh án tại cơ sở.

## 2.7. Kỹ thuật lấy mẫu

Mẫu máu toàn phần (7-8ml) đựng trong ống có chống đông EDTA, xử lý huyết tương và lưu trữ trong vòng 6 giờ.

## 2.8. Kỹ thuật xét nghiệm

### 2.8.1. Đếm tế bào CD4 và đo tải lượng vi rút

Đếm tế bào lympho T-CD4 trên máy FacsCount, được thực hiện tại Trung tâm phòng chống HIV/AIDS Hà Nội.

Đo tải lượng vi rút thực hiện trên hệ thống máy Abbott Realtime, mẫu chuẩn tham chiếu của Tổ chức y tế thế giới cho RNA HIV-1 (mã 97/658).

### 2.8.2. Giải trình tự gen vi rút HIV-1

RNA vi rút được tách chiết từ mẫu huyết tương, sử dụng kit sinh phẩm QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN). Phản ứng phiên mã ngược tạo cDNA (RT-PCR) và nested PCR nhân bản các vùng gen Gag, Nef, Vif/Vpr/Vpu đặc hiệu, điện di mao quản trên hệ thống máy giải trình tự ABI 3130/3500. Quy trình xét nghiệm áp dụng có chỉnh sửa, theo công bố của cùng nhóm tác giả năm 2019 (Takahashi và cs. 2019).

### 2.8.3. Xác định kiểu gen/alen HLA lớp I

Vùng gen locus A, B và C trên exon 2-3 được khuếch đại từ DNA tách chiết từ mẫu máu toàn phần, sử dụng bộ mồi đặc hiệu cho phản ứng PCR và nested PCR, điện di mao quản trên hệ thống máy giải trình tự ABI 3130/3500, tham khảo có chỉnh sửa từ nghiên cứu đã công bố (Cotton và cs. 2012). Kiểu gen alen 4 chữ số được xác định bằng cách sử dụng phần mềm GenDX SBTengine, tham chiếu từ cơ sở dữ liệu ImMunoGeneTics (IMGT)/HLA (Lefranc và cs. 2015).

### **2.9. Quản lý và phân tích dữ liệu**

Dữ liệu dịch tễ được nhập bằng EpiData 3.1. Các phân tích thống kê được thực hiện trên phần mềm Prim7.

### **2.10. Hạn chế sai số**

Nhập liệu, xét nghiệm có sự kiểm soát chéo. Hệ thống máy xét nghiệm được bảo dưỡng và hiệu chuẩn định kỳ.

Số liệu phân tích được thảo luận và đối chiếu giữa nhóm nghiên cứu tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương và Viện Quốc gia các bệnh truyền nhiễm Nhật Bản.

### **2.11. Đạo đức trong nghiên cứu**

Nghiên cứu nằm trong hợp tác giữa Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương và Viện Quốc gia các bệnh truyền nhiễm Nhật Bản và được chấp thuận Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, số IRB-VN01059-05/2015.

Nghiên cứu sinh được sự chấp thuận của chủ nhiệm đề tài cho phép sử dụng số liệu của nghiên cứu cho đề tài luận án. Đề tài nghiên cứu sinh được thông qua và chấp thuận Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh của Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, số IRB-VN01057-32/2020.

## CHƯƠNG III. KẾT QUẢ

### 3.1. Đặc điểm quần thể nghiên cứu

Đặc điểm đối tượng nghiên cứu trình bày trong bảng 3.1.

**Bảng 3. 1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu**

	<b>Mẫu tuyển chọn</b>	<b>Mẫu phân tích</b>
<b>Cỡ mẫu (bệnh nhân)</b>	<b>304</b>	<b>280</b>
Tuổi (trung vị, khoảng)	34 (19-69)	34 (19-69)
Nam (n,%)	230 (75,7)	209 (74,6)
Dân tộc (n, %)		
Kinh	274 (90,1)	254 (90,7)
Thái	12 (4,0)	9 (3,2)
Mường	8 (2,6)	8 (2,9)
Khác	10 (3,3)	9 (3,2)
<b>pVL (Log copies/mL)</b> <b>(trung vị, khoảng)</b>	-	<b>4,23</b> <b>(2,23-6,12)</b>
Không phát hiện thấy	19 (6,3)	-
Phát hiện thấy	3 (1,0)	-
0 < pVL < 3 (n,%)	30 (9,9)	30 (10,7)
pVL ≥ 3 (n,%)	252 (82,9)	250 (89,3)
<b>Số lượng tế bào CD4 (tế bào/μL)</b> <b>(trung vị, khoảng)</b>	-	<b>402,5</b> <b>(14 -1074)</b>
Không xác định	3 (1,0)	-
Phân nhóm theo giai đoạn lâm sàng (n,%)		
Giai đoạn I (CD4 > 500)	110 (36,2)	93 (33,2)
Giai đoạn II (350 ≤ CD4 ≤ 500)	73 (24,0)	70 (25,0)
Giai đoạn III (200 ≤ CD4 ≤ 349)	67 (22,0)	66 (23,6)
Giai đoạn IV (CD4 < 200)	51 (16,8)	51 (18,2)

### 3.2. Tần suất một số kiểu gen HLA lớp I

Tổng số có 28 kiểu gen alen A, 54 kiểu gen alen B và 35 kiểu gen alen C đã được xác định. A\*11:01 (AF=0,307), B\*15:02

(AF=0,152) và C\*08:01 (AF=0,17) lưu hành trong quần thể với tần suất cao nhất. Phân tích đồng hợp tử HLA lớp I trình bày bảng 3.3.

**Bảng 3.3. Tỷ lệ đồng hợp tử alen HLA lớp I (n=303)**

STT	alen A	Số BN	%CF	alen B	Số BN	%CF	alen C	Số BN	%CF
1	11:01	35	11,6	15:02	5	1,7	08:01	7	2,3
2	24:02	8	2,6	46:01	3	1,0	07:02	6	2,0
3	02:07	4	1,3	13:01	3	1,0	01:02	3	1,0
4	33:03	3	1,0	58:01	2	0,7	04:01	1	0,3
5	26:01	1	0,3	38:02	2	0,7	03:02	1	0,3
6	30:01	1	0,3	51:01	2	0,7	03:04	1	0,3
7	02:03	1	0,3	15:25	1	0,3	03:03	1	0,3
8				40:01	1	0,3	14:02	1	0,3
9				57:01	1	0,3			
<b>Tổng</b>		<b>53</b>	<b>17,5</b>		<b>20</b>	<b>6,6</b>		<b>21</b>	<b>6,9</b>

Phân tích tương quan A\*02:03 khác biệt theo giới tính ( $p=0,023$ ) và tần suất alen B\*46:01 khác biệt giữa dân tộc Kinh và nhóm các dân tộc khác ( $p=0,02$ ).

### 3.3. Đột biến vi rút HIV-1 phân tít CRF01\_AE liên kết với HLA lớp I

#### 3.3.1. Phân tích trình tự gen gag, nef, vif, vpr và vpu của vi rút HIV-1 phân tít CRF01\_AE

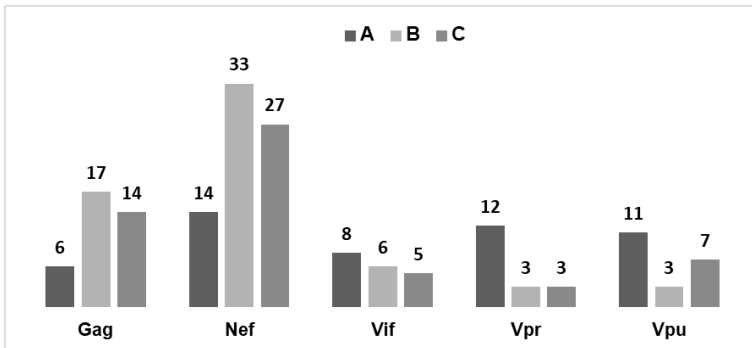
Tổng số 280 mẫu đo được tải lượng vi rút và được giải trình tự gen gag, nef, vif, vpr, vpu. Kết quả khuếch đại và giải trình tự thành công 244/280 mẫu gen gag, chiếm 87,1%. Kết quả này trên gen nef, vif, vpr và vpu tương ứng là 247/280 (88,2%), 217/280 (77,5%), 218/280 (77,9%) và 213/280 (76,1%).

Theo trình tự gen gag, vi rút thuộc phân tít CRF01\_AE (98,8%, N=242), CRF07\_BC (0,8%, N=2) và B (0,4%, N=1).

Trên protein Gag, có 366/504 vị trí codon phát sinh biến thể, chiếm 72,6%, tham chiếu với chủng CM240. Tỷ lệ này ở Nef là 82,6% (171/207 codon), Vif 67,4% (130/193 codon), Vpr 71,1% (69/97 codon) và Vpu 92,7% (76/82 codon).

### 3.1.1. Xác định đột biến Gag, Nef, Vif, Vpr và Vpu của phân típ CRF01\_AE liên kết với HLA lớp I

Kết quả phân tích đã xác định được 169 codon đột biến liên kết với HLA lớp I, gồm 37 codon trên Gag, 74 codon trên Nef và 19, 18, 21 codon trên Vif, Vpr, Vpu tương ứng (hình 3.4).



**Hình 3. 4. Số lượng đột biến liên kết theo alen HLA lớp I**

Phân tích đã xác định có 9 alen A, 14 alen B và 13 alen C là alen liên kết với đột biến gen vi rút, hầu hết là các alen lưu hành tần suất từ trung bình đến cao trong quần thể.

### 3.1.2. Định vị đột biến liên kết với HLA lớp I theo bản đồ epitope ứng viên của phân típ CRF01\_AE

Bản đồ epitope được lập dựa trên trình tự axit amin đồng thuận nhất cho toàn bộ trình tự của phân típ CRF01\_AE trong nghiên cứu này, đánh dấu các vị trí có liên kết với HLA lớp I tìm được và vị trí epitope đã biết trên phân típ B (hình 3.5).



Gag (n=244)	1	MGARASVLSGGKLDANEKIRLRPGGKKKYRMKHLVWASRELERFALNPGLETAEGCQQI	60
HXB2	1	.....E..R.....KL..I.....V.....S...R..	60
Gag (n=244)	61	LEQLQSTLKTGSEELKSLFNTVATLWCVHQRIEVKDTKEALDKIEEAQKKSQKKTQAAA	120
HXB2	61	.G...PS.Q.....R..Y.....Y.....I.....E.N..KK.A....	120
Gag (n=244)	121	GGSSSKVSNQYPIVQNAQGMHAHQPLSPRTLNAWVKVVEEKGFNPEVIMPFSALSEGAT	180
HXB2	121	DT.H.NQ.....I...V..AI.....A.S.....	180
Gag (n=244)	181	PQDLNMLNIVGGHQAAMQLKETINEEAAEWDVRVPHVHAGPIPPGQMRPRGSDIAGT <b>F</b>	240
HXB2	181	.....T...T.....A.....	240
Gag (n=244)	241	<b>S</b> T <b>L</b> QEQIGWMTNNP <b>P</b> I <b>P</b> VGDIYKRWIILGLNKIVRMYS <b>P</b> VS <b>I</b> L <b>D</b> I <b>R</b> QGPKEPFRDYVDR <b>F</b>	300
HXB2	241	.....E.....T.....	300
Gag (n=244)	301	YKTLRAEQATQEVK <b>N</b> WTETLLVQANPDCSILKALGTGATLEEMMTACQGVGGPSHKA	360
HXB2	301	.....S.....T.....PA.....G...	360
Gag (n=244)	361	RVLAEAMSHVQQT-NVMMQRGNFKGQKRIKCFNCGKEGLARNCRAPRKKGCWCKGEGHQ	420
HXB2	361	.....Q.TNSATI.....RN.RK.V.....T.....	420
Gag (n=244)	421	MKDCTERQANPLG <b>L</b> W <b>P</b> SNKGRPGNFPQ <b>S</b> RTEPTAPPAENWGMEITGSFLKQEQKQEQ	480
HXB2	421	.....Y.....L..P.....E.SFRS.V.T.TP---P...P	480
Gag (n=244)	481	K <b>P</b> K <b>V</b> HPPPSISLKS <b>L</b> FGNDPLSQ* 504	
HXB2	481	I <b>D</b> .E <b>L</b> Y.LT...R.....S..* 504	

**Hình 3. 5. Định vị đột biến liên kết theo epitope ứng viên của phân típ CRF01\_AE**

Trình tự đồng thuận của protein (A) Gag, (B) Nef, (C) Vif, (D) Vpr và (E) Vpu từ các mẫu thu thập trong nghiên cứu đại diện cho HIV-1 phân típ CRF01\_AE. Trình tự đồng thuận của các protein được xác định là axit amin xuất hiện nhiều nhất và so sánh với chủng HBX2 phân típ B. Các vị trí trên HBX2 tương đồng ký hiệu “.”. Vị trí đột biến liên kết với HLA lớp I tìm được trong nghiên cứu biểu diễn bằng cỡ chữ to. Trình tự epitope được giới hạn trong khoảng mũi tên, các epitope tiềm năng (%rank < 1) được định vị bằng tên epitope màu đỏ.

### 3.4. Đánh giá ảnh hưởng của kiểu gen HLA và đột biến HIV-1 liên kết với HLA đến tải lượng vi rút và số lượng tế bào CD4

#### 3.4.1. Ảnh hưởng của kiểu gen/alen HLA tới tải lượng vi rút và số lượng tế bào CD4

Tổng số 41 alen (13 alen A, 14 alen B và 14 alen C) xuất hiện ở > 10 bệnh nhân, được đưa vào phân tích. B\*51:01 là alen duy nhất có tác động đến pVL và CD4. B\*57:01 làm tăng CD4, nhưng không ảnh hưởng đối với pVL. B\*57:01, B\*51:01, C\*06:02 và C\*14:02 làm tăng CD4 ( $p < 0,05$ ).

#### 3.4.2. Ảnh hưởng của liên kết alen HLA tới tải lượng vi rút và số lượng tế bào CD4

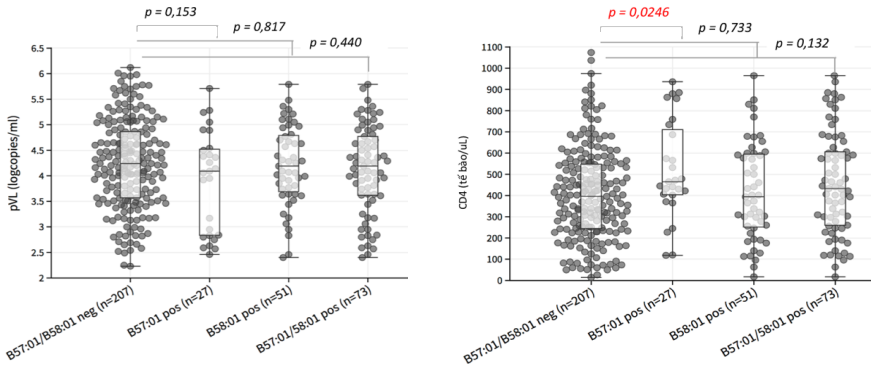
Ảnh hưởng của các alen HLA tới pVL và CD4 có thể do tác động từ liên kết alen. Kết quả cho thấy C\*14:02 liên kết với B\*51:01 và C\*06:02 liên kết mạnh mẽ với B\*57:01,  $p < 0,0001$  (bảng 3.12).

**Bảng 3. 12. Liên kết alen HLA-B và HLA-C**

		C*06:01			C*14:02		
		Alen-	Alen+		Alen-	Alen+	
<b>B*51:01</b>	Alen-	232	29	$p=0,2325$	260	1	$p < 0,0001$
	Alen+	18	0		3	15	
<b>B*57:01</b>	Alen-	250	3	$p < 0,0001$	237	16	$p=0,3772$
	Alen+	0	26		26	0	

Áp dụng kiểm định Mann-U Whitney, pVL không có sự khác biệt đáng kể ở nhóm bệnh nhân không mang cả hai alen B\*57:01/58:01 so với nhóm bệnh nhân mang B\*57:01 ( $p=0,153$ ).

Số lượng tế bào CD4 cao hơn ở nhóm bệnh nhân mang B\*57:01 so với nhóm không mang cả hai alen ( $p=0,0246$ ) hình 3.6.



**Hình 3. 6. Ảnh hưởng của liên kết alen B\*57:01/58:01 đối với pVL và CD4**  
*Tải lượng vi rút và CD4 được so sánh giữa nhóm bệnh nhân mang (pos) cả hai alen B\*57:01/B\*58:01 (n=73), nhóm bệnh nhân mang một trong hai alen B\*57:01 (n=27), B\*58:01 (n=51) và không mang (neg) cả hai alen (n=207). Mann Whitney được áp dụng với  $p<0,05$*

### 3.4.3. Ảnh hưởng đột biến liên kết HLA tới tải lượng vi rút và số lượng tế bào CD4

Kết quả phân tích (Mann-U Whitney) trên nhóm bệnh nhân mang alen xác định 13 đột biến liên kết ảnh hưởng đến pVL và 6 đột biến liên kết có ảnh hưởng đến CD4 ( $p<0,05$ ), bảng 3.13 và 3.14.

**Bảng 3. 12. Đột biến liên kết với HLA liên quan đến pVL**

HLA	Vị trí	Cons	Số BN alen +		pVL trung vị (Log copies/ml)		p
			Cons	Mut	Cons	Mut	
<b>Gag</b>							
C*06:02	146	P	5	18	3,17	4,40	0,040
A*33:03	242	T	25	40	4,62	4,17	0,035
C*06:02	286	R	13	10	4,14	4,72	0,043
B*15:02	435	I	25	42	4,06	4,58	0,038
<b>Nef</b>							
A*01:01	9	S	8	5	3,29	5,08	0,016
C*06:02	11	V	11	11	4,54	4,06	0,030
B*44:03	48	I	13	12	4,17	4,64	0,044
C*03:03	80	T	18	6	4,59	3,78	0,007
B*15:12	80	T	7	5	4,63	3,42	0,023
C*08:01	176	E	71	7	4,36	3,45	0,025
<b>Vif</b>							
A*33:03	131	R	20	40	4,27	4,63	0,037
<b>Vpr</b>							
C*03:04	36	R	24	7	4,08	5,08	0,019
A*33:03	49	N	18	42	4,27	4,63	0,030

*Cons = consensus: trình tự đồng thuận; Mut = mutation: đột biến*

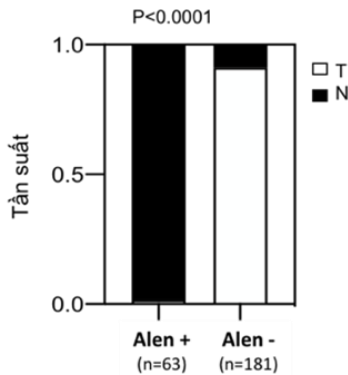
**Bảng 3. 13. Đột biến liên kết với HLA liên quan đến CD4**

HLA	Vị trí	Cons	Số BN alen +		CD4 trung vị (tế bào/uL)		p
			Cons	Mut	Cons	Mut	
<b>Gag</b>							
B*13:01	9	S	10	8	412	187	0,029
C*04:01	482	P	14	5	430,5	134	0,018
<b>Nef</b>							
C*08:01	3	S	11	67	477	370	0,014
A*01:01	9	S	8	5	494	177	0,004
B*44:03	108	E	12	13	491	337	0,041
C*07:01	108	E	12	13	491	337	0,037

*Cons = consensus: trình tự đồng thuận; Mut = mutation: đột biến*

### 3.4.4. Ảnh hưởng liên kết alen B\*57:01/58:01 và đột biến T242N với tiến triển nhiễm HIV-1 phân tít CRF01\_AE

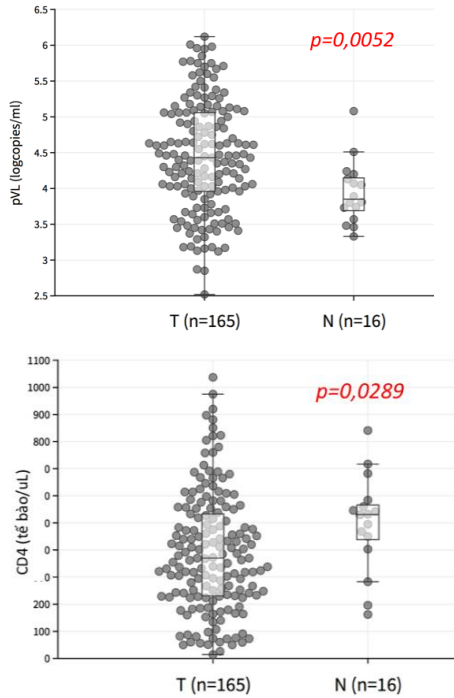
Tần số đột biến của GagT242N trong nhóm bệnh nhân mang một trong hai alen B\*57:01 và B\*58:01 khá cao, ở nhóm bệnh nhân không mang B\*57:01/58:01 (n=181) số bệnh nhân mang đột biến N chiếm 8,84% (16/181) ( $p < 0,0001$ ) (hình 3.10).



**Hình 3. 10. Tần suất đột biến GagT242N theo B\*57:01/58:01**

Tương quan giữa codon dạng đồng thuận (T) và đột biến (N) tại vị trí Gag242 ở những bệnh nhân mang alen B\*57:01 và B\*58:01 (alen+) và không mang cả hai alen (alen-). Áp dụng Fisher exact test với ngưỡng ý nghĩa  $p < 0,05$ .

Phân tích trên nhóm bệnh nhân không mang alen B\*57:01/58:01 ghi nhận kết quả pVL thấp hơn và CD4 cao hơn khi vi rút mang dạng đột biến N so với dạng đồng thuận T tại vị trí Gag 242 ( $p < 0,05$ ), hình 3.11.



### Hình 3. 1. pVL và CD4 ở bệnh nhân không mang B\*57:01/58:01

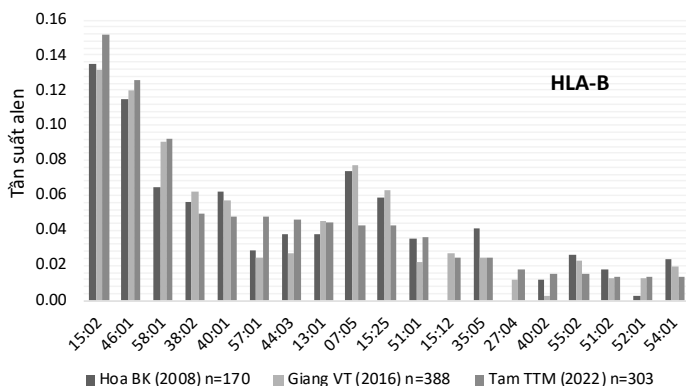
Tải lượng vi rút và CD4 được so sánh ở nhóm bệnh nhân không mang cả hai alen B\*57:01/B\*58:01 lưu hành vi rút dạng đồng thuận (T) và dạng đột biến (N) tại vị trí codon Gag242. Kiểm định Mann Whitney được áp dụng với ngưỡng ý nghĩa  $p < 0.05$ .

Có đến 21 đột biến liên kết với B\*57:01 hoặc B\*58:01, 10 đột biến trong đó thuộc 8 epitope đã biết. Khảo sát khả năng gắn của epitope CRF01\_AE với B\*57:01/58:01 đa số mạnh mẽ và không có sự khác biệt so với phân típ B.

## CHƯƠNG IV. BÀN LUẬN

### 4.1. Vai trò một số kiểu gen HLA lớp I trong nhiễm HIV-1 phân tít CRF01\_AE

So sánh tần suất alen của nghiên cứu này (n=303) với nghiên cứu công bố năm 2008 (n=170), năm 2016 (n=388) thấy rằng không có sự khác biệt đáng kể về tần suất của các alen phổ biến nhất trong quần thể trong khoảng thời gian 2008-2016 (hình 4.1). Ưu thế của alen B được thể hiện với số lượng alen B (54 alen) cao hơn với alen A (28 alen) và C (35 alen) trong quần thể nghiên cứu.



**Hình 4. 1. Tần suất alen HLA lớp I ở Việt Nam**

*Trục Y: tần suất alen HLA lớp I (AF) ở Việt Nam. Trục X: kiểu gen alen.*

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận vai trò bảo vệ của B\*51:01 ở Việt Nam, lưu HIV-1 phân tít CRF01\_AE, tương tự như ở Thái Lan và Nhật Bản. Các đột biến trốn thoát CTL đã biết gợi ý sự xuất hiện tương tự ở quần thể người Việt Nam, mục tiêu nhắm đến các epitope giới hạn bởi alen B\*51.

B\*57:01/58:01 được xác định là alen bảo vệ kiểm soát nhiễm vi rút HIV-1 ở phân típ B và có tác động mạnh mẽ đến tải lượng vi rút và tiến triển bệnh. Nghiên cứu này cho thấy B\*57:01/58:01 giảm vai trò bảo vệ đối với nhiễm phân típ CRF01\_AE so với phân típ B.

**Bảng 4. 1. Một số alen liên quan đến đáp ứng thuốc ở bệnh nhân điều trị ARV (Ma, Lee, and Kuo 2010)**

Thuốc	HLA alen	Dạng phản ứng với thuốc	Tần suất alen (AF)		
			Người da trắng (n=265)	Thái Lan (n=470)	Việt Nam (n=303)
Abacavir	B*57:01	Quá mẫn với Abacavir	0.042	0.012	<b>0.048</b>
Nevirapine	B*35:05	Hội chứng Stevens-Johnson, hoại tử	0.004	0.019	<b>0.025</b>

Một số alen có liên quan đến mẫn cảm với thuốc ARV B\*57:01, B\*35:05, có tần suất lưu hành tương đối cao ở Việt Nam. Liên kết kiểu gen HLA và sự tiến triển bệnh ở bệnh nhân đang sử dụng thuốc đang được quan tâm nghiên cứu.

#### **4.2. Dữ liệu đột biến vi rút HIV-1 liên kết với HLA lớp I ở Việt Nam**

Phân típ CRF01\_AE lưu hành chính ở Việt Nam với tỷ lệ 98,8%. Phần lớn đột biến liên kết khác nhau giữa các năm nghiên cứu cho thấy sự đa dạng biến đổi của vi rút. Gag V280T liên kết với C\*01:02 đã được xác định là đột biến trốn thoát CTL trong ở Việt Nam. Trong dữ liệu phân tích in vivo của chúng tôi Gag280 có liên kết với C\*01:02 và B\*46:01, nhưng không liên quan đến tải lượng vi rút hoặc số lượng tế bào CD4

Phần lớn các đột biến liên kết với HLA lớp I được xác định không nằm trong các epitope đã biết cho thấy nhu cầu liên tục biến đổi, thiết lập các epitope mới của vi rút. Hiện có rất ít dữ liệu



về đột biến liên kết với HLA trong gen *vif*, *vpr*, *vpu* và mối liên hệ đến tiến triển bệnh.

#### **4.3. Xem xét đột biến HIV-1 liên kết với HLA trong thiết kế vắc xin peptide**

Trong phát triển vắc xin peptide (hay vắc xin epitope), việc lựa chọn HLA đích chính xác là rất quan trọng, vì ứng cử viên vắc xin phải gắn kết với phần lớn HLA trong quần thể. Các dạng biến thể HIV thích nghi theo HLA ngày càng tăng, việc thiết kế các epitope đặc hiệu cho từng quần thể có thể khả thi hơn về mặt chiến lược cho vắc xin kích hoạt CTL. Dựa trên bản đồ epitope từ trình tự axit amin đồng thuận trong nghiên cứu, chúng tôi đánh dấu các vị trí epitope tiềm năng cho thiết kế vắc xin đặc hiệu cho phân típ CRF01\_AE. Các epitope tiềm năng gồm Gag-KW11, IL10, LW9, TW10, AW11, Nef- VF8, RF9, AK9, KY11, QY9, NW9, RW8; Vif-WI9 và Vpu-ER9. Trên cơ sở đó, cần thiết phải có những nghiên cứu đánh giá khả năng sinh miễn dịch của các epitope này trên mô hình *in vitro* và *in vivo*.

Một loại vắc xin sẽ mạnh mẽ hơn nếu epitope đa dạng trong liên kết với HLA, do khả năng bảo vệ một tỷ lệ lớn dân số và cũng sẽ bền vững hơn trước ảnh hưởng của việc trốn thoát CTL. Một epitope bị hạn chế bởi một HLA phổ biến sẽ chiếm phần lớn dân số, nhưng cũng sẽ tích lũy các đột biến trốn thoát nhanh hơn, do đó các epitope hạn chế bởi phần trung dân số có xu hướng tối ưu hóa tác động của vắc xin.

## KẾT LUẬN

(1) Quần thể người bệnh nhiễm HIV có đa dạng kiểu gen HLA lớp I. Sử dụng kỹ thuật xác định kiểu gen HLA với độ phân giải 4 chữ số, phát hiện được 28 alen HLA-A, 54 alen HLA-B và 35 HLA-C. Với từng locus, alen có tần suất cao nhất lần lượt là A\*11:01 (0,307), B\*15:02 (0,152) và C\*08:01 (0,170). Tỷ lệ mang HLA đồng hợp tử là HLA-A (17,5%), HLA-B (6,6%) và HLA-C (6,9%). B\*51:01 là alen duy nhất liên quan với tải lượng vi rút thấp và số lượng tế bào CD4 cao. Alen B\*57:01/58:01 không có vai trò bảo vệ đối với nhiễm phân típ CRF01\_AE như đã được phát hiện với nhiễm phân típ B.

(2) Phân típ HIV-1 CRF01\_AE lưu hành nổi trội (98,8%), có nhiều đột biến liên kết với HLA lớp I. Tổng số 169 đột biến liên kết với 36 alen HLA lớp I được xác định trên các protein Gag (37), Nef (74), Vif (19), Vpr (18) và Vpu (21). Có nhiều đột biến liên kết HLA lớp I lần đầu tiên được xác định: chưa được công bố trên Gag (10), Nef (18) và toàn bộ đột biến Vif (19), Vpr (18) và Vpu (21) trên phân típ CRF01\_AE.

(3) Các đột biến liên kết HLA lớp I có ảnh hưởng khác nhau tới tiến triển nhiễm HIV-1 phân típ CRF01\_AE. Có 6 đột biến liên kết với HLA lớp I liên quan với giảm số lượng tế bào CD4 (Gag S9-B\*13:01, Gag P482-C\*04:01, Nef S3-C\*08:01, Nef S9-A\*01:01, Nef E108-B\*44:03/C\*07:01) và 13 đột biến liên kết với HLA lớp I liên quan đến các mức tải lượng vi rút cao, thấp.

## KHUYẾN NGHỊ

1. Hoàn thiện cơ sở dữ liệu đột biến gen vi rút liên kết với kiểu gen HLA với toàn bộ các gen HIV-1. Dữ liệu đột biến của các protein điều hoà Tat và Rev, có thể được phân tích bổ sung bằng kỹ thuật xét nghiệm và phân tích tin sinh học đã được áp dụng trong phạm vi đề tài này.

2. Lựa chọn mô hình phân tích dữ liệu phù hợp để phân tích tính liên kết alen HLA và ảnh hưởng cộng hưởng của tổ hợp các đột biến HIV-1 trong liên kết với HLA.

3. Làm sáng tỏ vai trò sinh học đột biến của phân típ CRF01\_AE có liên kết chặt chẽ với các kiểu gen HLA có tác động tới tiến triển nhiễm HIV. Các đột biến liên kết tiềm năng sẽ được lựa chọn bằng các kỹ thuật phân tích tin sinh và chứng minh bằng mô hình thực nghiệm như đã bước đầu khảo sát cho đột biến Gag T242N liên kết với B\*57:01/58:01 trong phạm vi đề tài.