

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**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI – 2023

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 học

Mã số: 9 42 01 07

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Nguyễn Thị Lan Anh

2. TS. Nguyễn Thuỳ Linh

HÀ NỘI – 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là **Trần Thị Minh Tâm**, nghiên cứu sinh khoá 38 Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, chuyên ngành Vi sinh vật, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Nguyễn Thị Lan Anh và TS. Nguyễn Thùy Linh.

2. Các số liệu và thông tin trong nghiên cứu là hoàn toàn chính xác, trung thực và khách quan, đã được xác nhận và chấp thuận của cơ sở nơi nghiên cứu.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật về những cam kết này.

Hà Nội, ngày tháng năm 2023

Người viết cam đoan

Trần Thị Minh Tâm

LỜI CẢM ƠN

Trong suốt quá trình thực hiện đề tài này tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ của Lãnh đạo cơ quan, các đơn vị, Thầy Cô, đồng nghiệp, bạn bè và gia đình thân yêu của mình.

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng tri ân sâu sắc tới người thầy trân trọng **PGS.TS. Nguyễn Thị Lan Anh** và **TS. Nguyễn Thuỳ Linh**, là những người thầy, người hướng dẫn khoa học, đã tận tình giúp đỡ, động viên tôi trong suốt quá trình học tập, trực tiếp hướng dẫn tôi thực hiện nghiên cứu, góp ý và sửa chữa luận án.

Tôi xin bày tỏ lời cảm ơn tới **GS.TS. Đặng Đức Anh**, Viện trưởng Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, Trưởng bộ môn Vi sinh vật – Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình thực hiện đề tài và hoàn thành luận án này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến các cá nhân, tổ chức hợp tác, đã tạo mọi điều kiện, giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án:

- **GS.TS. William Walmsley Hall**, Giám đốc Tổ chức Atlantic Philanthropies (AP), Giám đốc Trung tâm Nghiên cứu Bệnh truyền nhiễm, Đại học Dublin, Ailen (Center for Research in Infectious Diseases, University College of Dublin)
- **GS.TS. Tetsuro Matano**, Phó Viện trưởng, Giám đốc Trung tâm nghiên cứu AIDS, Viện quốc gia các bệnh truyền nhiễm Nhật Bản (National Institute of Infectious Disease -NIID, Japan)
- **TS.BS. Ai Kawana Tachikawa** và các bạn thành viên Trung tâm nghiên cứu AIDS, NIID, đã luôn hỗ trợ tôi trong suốt quá trình nghiên cứu
- Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học tiên tiến, Trung tâm Nghiên cứu y sinh học, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương
- Ban Lãnh đạo Viện, Phòng Đào tạo Sau đại học, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

- Dự án “*Duy trì hợp tác nghiên cứu giữa Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương - Trung tâm Virus chuẩn thức Quốc gia, Đại học Dublin trong lĩnh vực bệnh truyền nhiễm*” và “*Phát triển và áp dụng các kỹ thuật chẩn đoán chuyên sâu một số bệnh truyền nhiễm tại Việt Nam*” đã tài trợ kinh phí thực hiện đề tài.

Xin được gửi lời cảm ơn đến các bệnh nhân cùng gia đình đã giúp tôi có được số liệu trong luận án.

Xin cảm ơn các bạn bè, đồng nghiệp đã giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu và thực hiện luận án.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời yêu thương và trân trọng tới gia đình, chỗ dựa vững chắc để tôi yên tâm học tập và hoàn thành luận án.

Hà Nội, ngày tháng năm 2023

MỤC LỤC

DANH SÁCH HÌNH.....	4
DANH SÁCH BẢNG	6
DANH SÁCH TỪ VIẾT TẮT, THUẬT NGỮ.....	8
ĐẶT VẤN ĐỀ	10
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN.....	11
1.1. Vi rút HIV-1 và hội chứng suy giảm miễn dịch ở người.....	11
1.1.1. Giới thiệu vi rút HIV.....	11
1.1.2. Đáp ứng miễn dịch đối với nhiễm HIV-1.....	20
1.1.3. Hội chứng suy giảm miễn dịch do nhiễm HIV.....	25
1.2. Vai trò của kháng nguyên bạch cầu người (HLA lớp I) trong đáp ứng miễn dịch tế bào với nhiễm HIV-1.....	28
1.2.1. Đặc điểm cấu trúc HLA lớp I.....	28
1.2.2. Đa dạng kiểu gen HLA alen.....	30
1.2.3. Vai trò của HLA lớp I trong đáp ứng miễn dịch với nhiễm HIV-1 và kiểm soát lây truyền.....	34
1.2.4. Tác động của HLA lớp I tới tiến triển nhiễm HIV.....	36
1.3. Khả năng trốn thoát đáp ứng miễn dịch của vi rút HIV-1 trong mối liên kết với HLA lớp I.....	39
1.3.1. Đặc điểm kháng nguyên của vi rút HIV-1.....	39
1.3.2. Đột biến trốn thoát đáp ứng miễn dịch.....	43
1.3.3. Sự thích nghi của vi rút mang đột biến trốn thoát miễn dịch.....	46
1.3.4. Khả năng lây truyền biến thể vi rút mang đột biến trốn thoát miễn dịch liên kết với kiểu gen HLA.....	47
1.3.5. Cơ sở dữ liệu đột biến liên kết với HLA.....	50
CHƯƠNG II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	52
2.1. Thiết kế nghiên cứu.....	52
2.2. Địa điểm, thời gian nghiên cứu.....	52
2.3. Đối tượng nghiên cứu.....	53

2.4. Cỡ mẫu nghiên cứu và cách chọn mẫu.....	54
2.5. Biến số nghiên cứu.....	55
2.6. Phương pháp và công cụ thu thập thông tin.....	56
2.7. Kỹ thuật lấy mẫu.....	56
2.8. Kỹ thuật xét nghiệm.....	57
2.9. Quản lý và phân tích dữ liệu.....	65
2.10. Hạn chế sai số.....	67
2.11. Đạo đức trong nghiên cứu.....	68
CHƯƠNG III. KẾT QUẢ.....	69
3.1. Đặc điểm quần thể nghiên cứu.....	69
3.2. Tần suất một số kiểu gen HLA lớp I.....	71
3.3. Đột biến vi rút HIV-1 phân típ CRF01_AE liên kết với HLA lớp I.....	75
3.3.1. Phân tích trình tự gen <i>gag</i> , <i>nef</i> , <i>vif</i> , <i>vpr</i> và <i>vpu</i> của vi rút HIV-1 phân típ CRF01_AE.....	75
3.3.2. Xác định đột biến Gag, Nef, Vif, Vpr và Vpu của phân típ CRF01_AE liên kết với HLA lớp I.....	79
3.3.3. Định vị đột biến liên kết với HLA lớp I theo bản đồ epitope ứng viên của phân típ CRF01_AE.....	92
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.....	96
3.4.1. Ảnh hưởng của kiểu gen/alen HLA tới tải lượng vi rút và số lượng tế bào CD4.....	96
3.4.2. Ảnh hưởng của liên kết alen HLA tới tải lượng vi rút và số lượng tế bào CD4.....	99
3.4.3. Ảnh hưởng đột biến liên kết HLA tới tải lượng vi rút và số lượng tế bào CD4.....	102
3.4.4. Ảnh hưởng liên kết alen B*57:01/58:01 và đột biến T242N với tiến triển nhiễm HIV-1 phân típ CRF01_AE.....	106
CHƯƠNG IV. BÀN LUẬN.....	111
4.1. Vai trò một số kiểu gen HLA lớp I trong nhiễm HIV-1 phân típ CRF01_AE....	111

4.1.1. Tần suất một số alen HLA lớp I ở Việt Nam	111
4.1.2. Tác động bảo vệ B*51:01 với nhiễm HIV-1 phân típ CRF01_AE	114
4.1.3. Giảm tác động bảo vệ của B*57:01/58:01 trong nhiễm HIV-1 phân típ CRF01_AE	115
4.1.4. Ảnh hưởng của kiểu gen HLA lớp I trong điều trị thuốc ARV	119
4.2. Dữ liệu đột biến vi rút HIV-1 liên kết với HLA lớp I ở Việt Nam.....	121
4.2.1. Các đột biến trên protein Gag.....	121
4.2.2. Đột biến Nef, Vif, Vpr và Vpu.....	124
4.3. Xem xét đột biến HIV-1 liên kết với HLA trong thiết kế vắc xin peptide.....	126
4.4. Hạn chế của đề tài	128
KẾT LUẬN.....	129
KHUYẾN NGHỊ.....	130
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ.....	131
TÀI LIỆU THAM KHẢO	132

DANH SÁCH HÌNH

Hình 1. 1. Phân loại HIV-1 theo nhóm và phân tít [192].....	11
Hình 1. 2. Cấu trúc hạt vi rút HIV [206].....	13
Hình 1. 3. Chu trình nhân lên của vi rút HIV [88].....	14
Hình 1. 4. Bộ gen và các protein vi rút HIV-1 [164].....	16
Hình 1.5. Đáp ứng miễn dịch tự nhiên với nhiễm HIV ở trường hợp ECs/LTNPs [190]	21
Hình 1. 6. Kiểm soát nhiễm HIV mạn tính của tế bào NK [64].....	22
Hình 1. 7. Kiểm soát quá trình nhân lên của HIV/SIV bởi tế bào T CD8 [140].....	24
Hình 1. 8. Vị trí locus HLA lớp I trên nhiễm sắc thể số 6 [79].....	29
Hình 1. 9. Cấu trúc phân tử của HLA lớp I (A) và lớp II (B)	30
Hình 1. 10. Danh pháp HLA alen [167].....	31
Hình 1. 11. Số loại HLA alen trên cơ sở dữ liệu IMGT-HLA [183].....	32
Hình 1. 12. Phân bố alen HLA lớp I trên toàn cầu [183].....	33
Hình 1. 13. Khả năng nhận diện của tế bào T CD8 đối với epitope.....	40
Hình 1. 14. Các dạng đột biến trốn thoát CTL [32].....	44
Hình 1. 15. Thích ứng của biến thể mang đột biến trốn thoát CTL theo HLA [99].....	46
Hình 1. 16. Đột biến Gag T242N khôi phục khi lây truyền vật chủ B*57/58:01 [121].....	48
Hình 1. 17. Thay đổi sinh lực của biến thể vi rút mang đột biến trốn thoát CTL theo HLA [108]	49
Hình 2. 1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu.....	52
Hình 2. 2. Địa điểm thu thập mẫu nghiên cứu.....	53
Hình 2. 3. Sơ đồ xử lý mẫu bệnh phẩm.....	56
Hình 2. 4. Điện di sản phẩm nested PCR khuếch đại gen <i>gag</i> vi rút HIV-1.....	59
Hình 2. 5. Xác định nucleotide hỗn hợp (mixture) và trình tự axit amin	60
Hình 2. 6. Điện di sản phẩm nested PCR khuếch đại đoạn gen HLA lớp I.....	63
Hình 2. 7. Xác định kiểu gen/alen HLA.....	64
Hình 2. 8. Cơ sở dữ liệu NetMHCpan đánh giá khả năng gắn peptide và HLA lớp I .	66
Hình 2. 9. Cơ sở dữ liệu NetCTLpan dự đoán vai trò kháng nguyên.....	67

Hình 3. 1. Cây phát sinh chủng loại HIV-1	76
Hình 3. 2. Tỷ lệ biến thể mang đột biến theo vị trí axit amin protein Gag và Nef.....	77
Hình 3. 3. Tỷ lệ biến thể mang đột biến theo vị trí axit amin protein Vif, Vpr và Vpu	78
Hình 3. 4. Số lượng đột biến liên kết theo alen HLA lớp I.....	79
Hình 3. 5. Định vị đột biến liên kết theo epitope ứng viên của phân típ CRF01_AE..	95
Hình 3. 6. Ảnh hưởng của liên kết alen B*57:01/58:01 đối với pVL và CD4	101
Hình 3. 7. Đột biến liên kết với HLA làm tăng tải lượng vi rút.....	104
Hình 3. 8. Đột biến liên kết với HLA làm giảm tải lượng vi rút.....	105
Hình 3. 9. Đột biến liên kết với HLA liên quan đến CD4	105
Hình 3. 10. Tần suất đột biến GagT242N theo B*57:01/58:01	106
Hình 3. 11. pVL và CD4 ở bệnh nhân không mang B*57:01/58:01	107
Hình 4. 1. Tần suất alen HLA lớp I ở Việt Nam	112
Hình 4. 2. Tác động của đột biến Gag T242N đối với sinh lực của vi rút <i>in vitro</i> [147]	118
Hình 4. 3. Trình tự đồng thuận Gag275-285 vi rút HIV-1 phân típ B và CRF01_AE122	

DANH SÁCH BẢNG

Bảng 1. 1. Tổng hợp chức năng của các protein vi rút HIV-1	17
Bảng 1. 2. Tử vong do AIDS trên toàn cầu [192].....	25
Bảng 1. 3. Tổng hợp kiểu gen HLA và tác động đối với tiến triển bệnh AIDS.....	37
Bảng 1. 4. Trình tự axit amin của một số epitope ưu tiên liên kết với HLA [79].....	42
Bảng 1. 5. Một số đột biến trốn thoát CTL của vi rút HIV-1 phân típ CRF01_AE.....	45
Bảng 1. 6. Đột biến gen vi rút HIV-1 liên kết HLA trên quần thể nhiễm HIV tại Việt Nam	50
Bảng 2. 1. Số mẫu đã thu thập theo địa điểm nghiên cứu.....	54
Bảng 2. 2. Biến số và chỉ số nghiên cứu	55
Bảng 2. 3. Trình tự môi sử dụng cho giải trình tự gen HIV-1.....	58
Bảng 2. 4. Trình tự môi xác định kiểu gen HLA	62
Bảng 3. 1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu.....	70
Bảng 3. 2. Tần suất HLA alen (2n=606).....	72
Bảng 3. 3. Tỷ lệ đồng hợp tử alen HLA lớp I (n=303)	73
Bảng 3. 4. Phân bố HLA alen theo giới tính và dân tộc (n=303).....	74
Bảng 3. 5. Số lượng đột biến liên kết theo HLA alen của từng protein vi rút HIV-1 ..	81
Bảng 3. 6. Đột biến protein Gag liên kết với HLA lớp I ($p < 0,05$, $q < 0,2$)	83
Bảng 3. 7. Đột biến protein Nef liên kết với HLA lớp I ($p < 0,05$, $q < 0,2$).....	86
Bảng 3. 8. Đột biến protein Vif liên kết với HLA lớp I ($p < 0,05$, $q < 0,2$).....	89
Bảng 3. 9. Đột biến protein Vpu liên kết với HLA lớp I ($p < 0,05$, $q < 0,2$)	90
Bảng 3. 10. Đột biến protein Vpr liên kết với HLA lớp I ($p < 0,05$, $q < 0,2$).....	91
Bảng 3. 11. HLA alen liên kết với pVL và CD4 (n=280).....	97
Bảng 3. 12. Liên kết alen HLA-B và HLA-C.....	99
Bảng 3. 13. Đột biến liên kết với HLA liên quan đến tải lượng vi rút.....	102
Bảng 3. 14. Đột biến liên kết với HLA liên quan đến số lượng tế bào CD4	103
Bảng 3. 15. Khả năng gắn epitope có đột biến liên kết với B*57:01/58:01	108
Bảng 3. 16. Hiệu quả trình diện kháng nguyên của B*57:01/58:01 theo các phân típ HIV-1.....	110

Bảng 4. 1. Một số alen liên quan đến đáp ứng thuốc ở bệnh nhân điều trị ARV [129]

..... 120

DANH SÁCH TỪ VIẾT TẮT, THUẬT NGỮ

Từ viết tắt	Từ gốc tiếng Anh	Giải nghĩa
AF	Allele frequency	Tần suất alen
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome	Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải
APC	Antigen Presenting Cell	Tế bào trình diện kháng nguyên
	Compensatory mutation	Đột biến bù trừ
CF	Carrier frequency	Tần suất người mang
Cons	Consensus	Đồng thuận
CTL	Cytotoxic T Lympho	Tế bào lympho T gây độc tế bào
DC	Dendritic cells	Tế bào đuôi gai
EC	Elited control	Kiểm soát ưu việt
Gag	Group specific antigen	Protein Gag của vi rút HIV
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Virus gây suy giảm miễn dịch ở người
HLA	Human Leucocyte Antigen	Kháng nguyên bạch cầu người
KIR	Killer Ig-like receptors	Thụ thể giống immunoglobulin của tế bào NK
LTNP	Long Term Non Progression	Không tiến triển lâu dài
MHC	Major Histocompatibility Complex	Phức hợp phù hợp tổ chức chính
Mut	Mutation	Dạng đột biến
Nef	Negative Factor	Protein Nef của vi rút HIV
NK	Natural killer (cell)	Tế bào tiêu diệt tự nhiên
NKT	Natural killer T cell	Tế bào T tiêu diệt tự nhiên
NST		Nhiễm sắc thể

PKNT		Phòng khám ngoại trú
pVL	Plasma viral load	Tải lượng vi rút trong huyết tương
	Reversion	Khôi phục
SU	Surface Glycoprotein	Glycoprotein bề mặt
TCR	T cell receptor	Thụ thể tế bào T
TM	Transmembrane Glycoprotein	Glycoprotein xuyên màng
	Viral fitness	Sinh lực vi rút
Vif	Viral Infectivity Factor	Protein Vif của vi rút HIV
Vpr	Viral protein R	Protein Vpr của vi rút HIV
Vpu	Viral protein U	Protein Vpu của vi rút HIV
VRC	Viral Replication Capacity	Khả năng sao chép của vi rút
WT	Wild type	Dạng hoang dã

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.

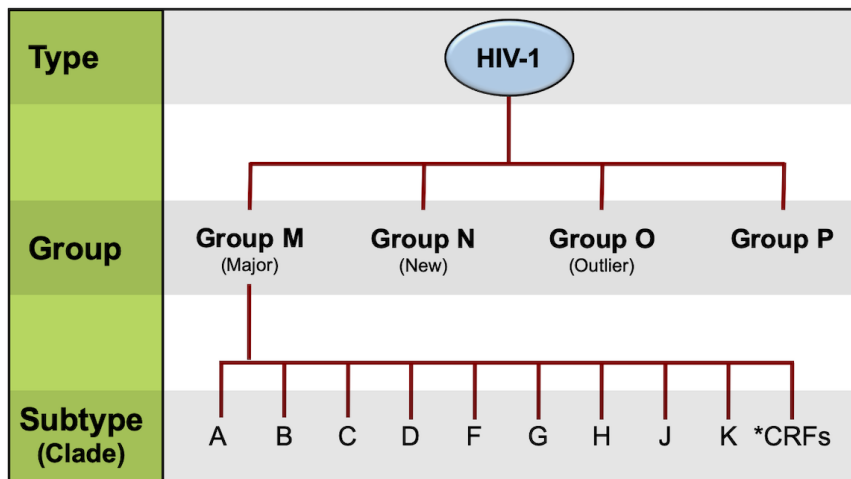
Vai trò của phân tử HLA với tiến triển nhiễm HIV-1 phân típ CRF01_AE, lưu hành phổ biến ở khu vực Đông Nam Á trong đó có Việt Nam, cũng như các đột biến trốn thoát miễn dịch liên kết với HLA còn ít được nghiên cứu và còn nghiên cứu hạn chế ở một số gen cấu trúc. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm: (1) 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.

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, gồm HIV-1 và HIV-2 gây hội chứng suy giảm miễn dịch ở người (Acquired immunodeficiency syndrome - AIDS). HIV-1 lưu hành toàn cầu trong khi HIV-2 ít phổ biến hơn, lưu hành chủ yếu ở Châu Phi và độc lực thấp hơn, nhưng cũng gây ra những triệu chứng lâm sàng tương tự như HIV-1. Phương cách lây truyền của HIV-2 tương tự HIV-1, tuy nhiên ít lây truyền từ mẹ sang con. So với HIV-1, người nhiễm HIV-2 có thời kỳ nhiễm bệnh tiềm tàng trước khi chuyển sang giai đoạn AIDS dài hơn, giai đoạn AIDS có các biểu hiện triệu chứng nhẹ hơn, tải lượng vi rút thấp hơn và số lượng tế bào T CD4 cao hơn cho đến cuối thời kỳ nhiễm bệnh tiềm tàng chuyển sang giai đoạn AIDS. Tỷ lệ tử vong do nhiễm HIV-2 chỉ bằng khoảng 2/3 so với tỷ lệ tử vong do nhiễm HIV-1.



*CRFs = Circulating Recombinant Forms

Hình 1. 1. Phân loại HIV-1 theo nhóm và phân típ [192]

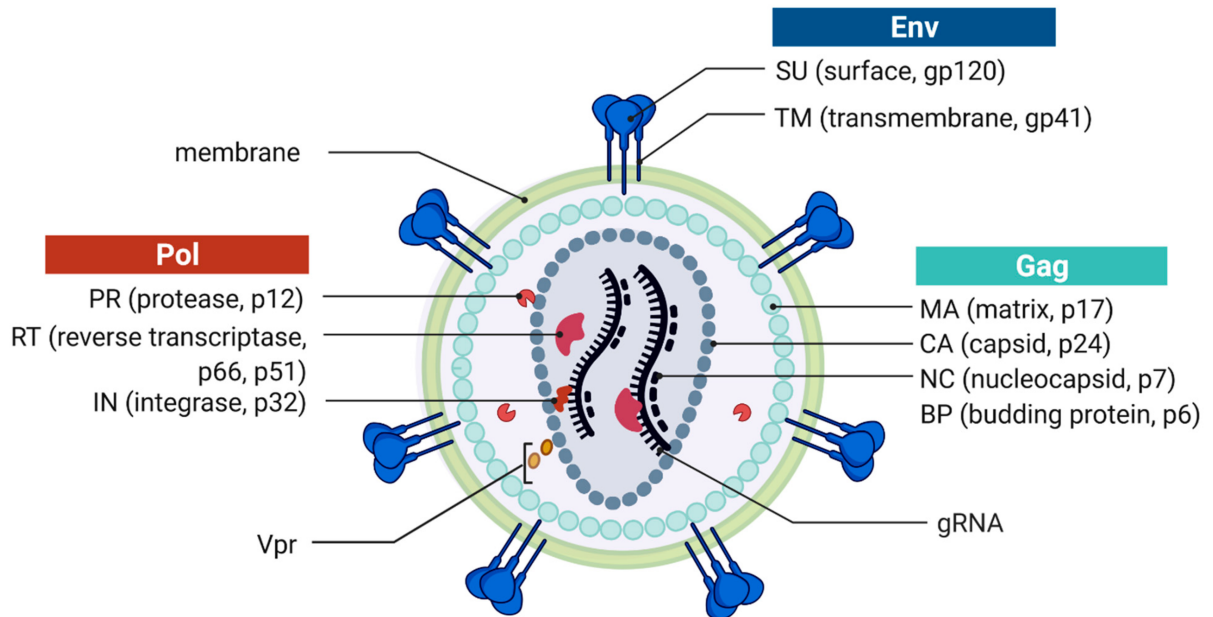
Vi rút HIV-1 lưu hành 4 nhóm chính (group): M, N, O và P. Nhóm M chiếm đa số, phân loại theo phân típ (subtype) gồm 9 phân típ ký hiệu từ A-K. Các phân típ tái tổ hợp bắt đầu bằng ký hiệu CRF.

Theo phân loại mới nhất năm 2021, HIV-1 có 4 nhóm lớn (M, N, O và P) đại diện cho 4 sự thâm nhập riêng rẽ của vi rút vào con người. Nhóm O xuất hiện giới hạn ở Tây – Trung Phi và nhóm N được phát hiện vào năm 1998 ở Cameroon, là hai nhóm cực kỳ hiếm. Năm 2009 một nhóm mới liên quan gần gũi với vi rút HIV ở khi đột được phát hiện ở một phụ nữ người Cameroon, được phân loại nhóm P của HIV-1.

Trên 90% những trường hợp nhiễm HIV thuộc nhóm M [192]. Dựa vào trình tự gen HIV-1 nhóm M có 9 phân típ được ký hiệu từ A đến K. Các phân típ HIV-1 lưu hành khác nhau tùy từng châu lục và có sự tái tổ hợp giữa các phân típ. HIV-1 phân típ C phổ biến nhất, chiếm 48% tổng số ca lây nhiễm, tiếp theo là phân típ A và B lần lượt gây ra 13% và 11% số ca nhiễm trùng trong đại dịch hiện nay. Đặc điểm phân típ có liên quan đến tiến triển HIV/AIDS đã thu hút nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học. Một nghiên cứu trên mẫu hồi cứu được thực hiện trong năm 1996 và 2007 cho thấy những người Châu Phi bị nhiễm HIV-1 phân típ B có tốc độ tiến triển HIV/AIDS nhanh hơn so với những người bị nhiễm không thuộc phân típ B [103]. Hơn nữa, các phân tích tổng hợp đã chứng minh rằng xu hướng tiến triển của HIV/AIDS khác nhau giữa các phân típ, theo thứ tự giảm dần C > D > AE > G > A [170]. Tại Việt Nam chủ yếu lưu hành phân típ tái tổ hợp CRF01_AE, một số ít phân típ B [87].

1.1.1.1. Cấu trúc vi rút HIV-1

Hạt vi rút HIV-1 hình cầu, có đường kính ~100nm và được bao quanh bởi màng lipoprotein (membrane). Mỗi hạt vi rút chứa 72 phức hợp glycoprotein được gắn vào màng lipid, và mỗi phức hợp gồm một glycoprotein ngoại bào gp120 và một glycoprotein xuyên màng gp41 [87]. Glycoprotein gp120 có thể được phát hiện trong máu cũng như mô bạch huyết của bệnh nhân nhiễm HIV. Trong quá trình nảy chồi, vi rút có thể gắn thêm các protein của vật chủ từ màng của tế bào vật chủ vào lớp lipoprotein của vi rút, như các protein HLA lớp I và II. Các phân tử glycoprotein này có tính ái lực cao với các phân tử CD4, qua đó vi rút có thể bám và xâm nhập vào tế bào đích có thụ thể CD4 [3].



Hình 1. 2. Cấu trúc hạt vi rút HIV [206]

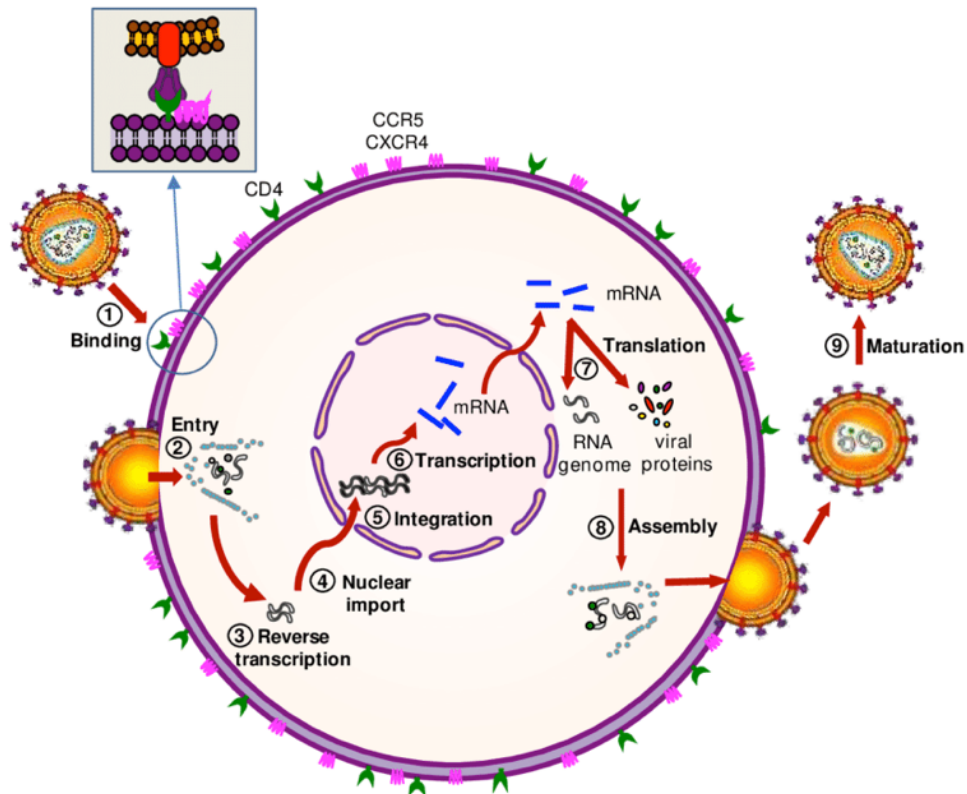
Hạt vi rút HIV-1 có dạng hình cầu và được bao bọc bởi màng lipoprotein (membrane) có nguồn gốc từ vật chủ, chứa 72 phức hợp glycoprotein. Mỗi phức hợp gồm một glycoprotein ngoại bào (SU-surface, gp120) và một glycoprotein xuyên màng gp41 (TM-transmembrane, gp41). Mặt trong của màng neo các protein MA (matrix) có nguồn gốc từ Gag. Capsid nằm ở trung tâm của virion và chứa hai bản sao RNA, RT (reverse transcriptase) và IN (integrase). RNA được ổn định bởi các NC (nucleocapsid).

Mặt trong của màng neo các protein MA (matrix) hình cầu, cấu tạo bởi phân tử protein có trọng lượng phân tử là 17kDa (p17), có nguồn gốc từ Gag. Capsid hình trụ, nằm ở trung tâm của virion, cấu tạo bởi phân tử protein có trọng lượng 24 kDa (p24) và chứa hai bản sao RNA của HIV-1. Một virion hoàn chỉnh chứa các thành phần enzyme cần thiết cho nhân bản, gồm: enzyme sao chép ngược (RT), integrase p32 và một protease p11 [87, 206].

1.1.1.2. Chu trình nhân lên của vi rút HIV-1

Tế bào đích của HIV-1 chủ yếu là tế bào T [75]. Các tế bào bị nhiễm vi rút sẽ di chuyển đến tổ chức lympho ngoại vi, tại đây vi rút nhân lên nhanh chóng theo các giai đoạn [3]:

Giai đoạn bám và gắn kết vào mặt tế bào (hình 1.3, bước 1): Vòng đời của vi rút HIV bắt đầu khi phân tử gp120 của vi rút bám vào thụ thể bề mặt tế bào lympho T CD4 nhờ các đồng thụ thể CCR5 với đại thực bào và CXCR4 với tế bào lympho T (hình 1.3) [3]. HIV cũng có thể lây nhiễm tế bào bằng một con đường khác là qua mannose receptor (CD206), là một thụ thể bề mặt của đại thực bào và tế bào DC chưa trưởng thành [59].



Hình 1. 3. Chu trình nhân lên của vi rút HIV [88]

Các bước của chu trình nhân lên vi rút HIV-1: (1) HIV-1 gắn với màng tế bào vật chủ; (2) HIV-1 xâm nhập vào tế bào; (3) phiên mã ngược; (4) vận chuyển bộ gen tiền vi rút vào nhân; (5) tích hợp bộ gen của vi rút vào DNA của tế bào vật chủ; (6) phiên mã bộ gen; (7) dịch mã RNA thông tin (mRNA) thành các protein; (8) tập hợp các thành phần virion bên trong tế bào và nảy chồi; (9) virion trưởng thành và có khả năng lây nhiễm hoàn toàn.

Giai đoạn xâm nhập (hình 1.3, bước 2-5): vi rút hòa màng với màng tế bào chủ, giải phóng RNA và xâm nhập vào tế bào. Ngay sau khi xâm nhập vào tế bào, enzyme phiên mã ngược (Reverse transcriptase – RT) sao chép RNA bộ gen thành DNA bổ sung (cDNA). Quá trình sao chép này dễ phát sinh đột biến, có thể gây kháng thuốc hoặc cho

phép vi rút trốn tránh hệ thống miễn dịch của cơ thể. cDNA và mạch bổ sung tạo thành DNA sợi đôi, được vận chuyển vào nhân tế bào. Việc tích hợp DNA vi rút vào bộ gen của tế bào chủ được thực hiện bởi enzyme integrase.

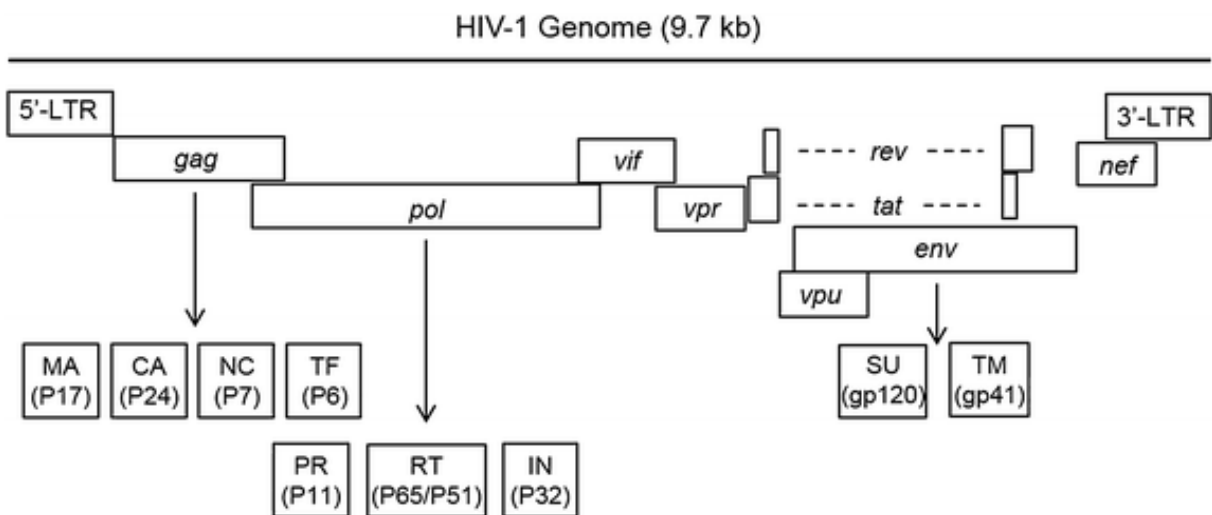
Giai đoạn phiên mã (hình 1.3, bước 6-7) xảy ra tại nhân tế bào, DNA tích hợp được phiên mã thành bản sao RNA bộ gen của vi rút, mRNA và các protein cần thiết cho cấu trúc của vi rút. Các mRNA được vận chuyển vào tế bào chất, nơi chúng được dịch mã thành protein Tat và Rev. Khi protein Rev mới tạo ra, nó di chuyển đến nhân, gắn với RNA bộ gen và thúc đẩy chúng rời khỏi nhân tế bào [175]. Một mRNA 9kb được hình thành và sử dụng cho ba chức năng: (i) tổng hợp các polyprotein Gag (p55), (ii) tổng hợp polyprotein Gag-Pol (p160) và trở thành RNA bộ gen của virion HIV mới. mRNA 9kb có thể cắt thành mRNA 4kb và 2kb. Trong đó mRNA 4kb tổng hợp các glycoprotein Env (gp160) và tổng hợp 3 protein điều hòa là Vif, Vpr và Vpu. mRNA 2kb tổng hợp 3 protein là Tat, Rev và Nef. Các protein Gag kết hợp với RNA bộ gen vi rút, đóng gói thành các hạt vi rút mới [30].

Giai đoạn nảy chồi (hình 1.3, bước 8): các thành phần của virion mới tập hợp tại màng sinh chất của tế bào chủ. Env (gp160) đi qua mạng lưới nội chất và đến bộ máy Golgi, nơi nó bị phân cắt thành 2 glycoprotein vỏ là gp41 và gp120, sau đó di chuyển đến màng plasma của tế bào chủ, tại đây gp41 neo gp120 vào màng. Các polyprotein Gag (p55) và Gag-Pol (p160) cũng liên kết với mặt trong của màng plasma, cùng với RNA bộ gen, vi rút bắt đầu nảy chồi từ tế bào chủ.

Giai đoạn trưởng thành (hình 1.3, bước 9): virion mới nảy chồi trải qua giai đoạn phân cắt polyprotein thành protein để trở thành virion trưởng thành. Polyprotein Gag (p55) phân cắt thành matrix (MA - p17), capsid (CA - p24) và nucleocapsid protein (NC - p7). Glycoprotein Env (gp160) phân cắt trở thành glycoprotein bao bọc HIV gp120 và gp41. Sự phân cắt này được thực hiện bởi enzyme protease của vi rút và có thể bị ức chế bởi các thuốc kháng retrovirus thuộc nhóm thuốc ức chế protease. Các thành phần cấu trúc khác nhau sau đó được hoàn thiện để tạo virion HIV trưởng thành. Chỉ virion trưởng thành mới có thể lây nhiễm một tế bào khác [1].

1.1.1.3. Cấu trúc hệ gen

Vật liệu di truyền của HIV là RNA sợi đơn có kích thước 9.8kb, bao gồm 9 gen với cấu trúc cơ bản là: 5' LTR-*gag-pol-env*-LTR 3' (hình 1.4) [4]. Vùng lặp tận (LTR - long terminal repeat) ở hai đầu, gắn với DNA tế bào vật chủ sau khi tích hợp và không mã hóa cho bất cứ protein nào của vi rút [191]. Đoạn gen *gag* mã hoá cho sự tổng hợp cho các protein cấu trúc của lõi vi rút, gen *pol* mã hoá cho sự hình thành các protein enzyme của virus và đoạn gen *env* mã hoá cho sự hình thành các glycoprotein của vỏ virus. Biểu hiện gen được thực hiện bởi 3 cơ chế riêng biệt: (1) Gag được phiên mã trực tiếp từ RNA vi rút; (2) Env được mã hóa trong mRNA và (3) Pol được biểu hiện dưới dạng một sản phẩm tổ hợp Pol-Gag trên ribosome [191]. Sáu đoạn gen nhỏ khác mã hoá cho các protein có vai trò trong quá trình nhân lên và lây nhiễm của HIV-1.



Hình 1. 4. Bộ gen và các protein vi rút HIV-1 [164]

Bộ gen của HIV-1 bao gồm khung đọc mở mã hóa cho các protein cấu trúc (structural), điều hoà (regulatory) và chức năng (accessory). RNA sợi đơn có chiều dài ~9,7 kb và được bao quanh bởi vùng lặp tận (LTR) đầu 5' và 3'. RNA chứa trình tự khởi động và các trình tự cần thiết cho quá trình phiên mã ngược, tích hợp và biểu hiện gen. Gen *gag* mã hóa cho các protein cấu trúc matrix (MA), capsid (CA) và nucleocapsid (NC) tạo thành lõi virus. Gen *pol* mã hoá cho enzyme protease (PR), enzyme phiên mã ngược (RT) và enzyme integrase (IN). Tiếp sau gen *pol* là hai gen điều hòa (*rev*, *tat*) và ba gen chức năng (*vif*, *vpr* và *vpu*), cuối cùng là gen *nef*. Gen *env* mã hóa cho glycoprotein bề mặt (SU) gp120 và xuyên màng (TU) gp41.

1.1.1.4. Vai trò của các protein vi rút

Các protein của vi rút HIV-1 có vai trò là thành phần cấu tạo hạt virion gồm Gag, Pol và Env. 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). Chức năng chính của các protein được trình bày trong bảng 1.1.

Bảng 1. 1. Tổng hợp chức năng của các protein vi rút HIV-1

Protein	Các dạng isoform theo kích thước phân tử	Chức năng
Gag	p17, p24, p7, p6	Tạo capsid, kết hợp với RNA giúp vi rút nảy chồi
Pol	p66/p51 p10 p32	Enzyme phiên mã ngược RNA của vi rút thành cDNA Enzyme protease xử lý protein sau dịch mã Enzyme integrase gắn cDNA của vi rút vào bộ gen tế bào chủ
Nef	p27	Hỗ trợ quá trình nhân lên của vi rút
Vif	p23	Thúc đẩy sự nhân lên của vi rút
Vpr	p14	Tăng cường sự nhân lên của vi rút, thúc đẩy nhiễm HIV đại thực bào Ức chế tế bào miễn dịch
Vpu	p16	Tăng cường phóng thích vi rút ra ngoài
Env	gp120 gp41	Tạo cấu trúc bề mặt Tạo cấu trúc xuyên màng
Tat	p14	Kích hoạt phiên mã và thúc đẩy sự nhân lên của vi rút
Rev	p13	Điều hoà biểu hiện mRNA của vi rút

Gag đặc biệt quan trọng cho việc lắp ráp của vi rút bằng cách tập hợp tất cả các nguyên liệu cần thiết cho sự hình thành virion. Trong hoặc ngay sau khi vi rút phát triển từ tế bào chủ, protease HIV-1 phân cắt p55Gag thành các protein Gag trưởng thành,

gồm: p17 matrix (MA), p24 capsid (CA), p7 nucleocapsid (NC) và p6. Quá trình định dạng protein của Gag tạo ra sự biến đổi chính trong cấu trúc virion: MA liên kết với mặt trong của màng vi rút, trong khi CA hình thành lớp vỏ bao quanh phức hợp RNA/NC của vi rút. Nhờ đó virion có cấu trúc lõi hoàn chỉnh [197].

Pol mã hóa các enzym đóng vai trò quan trọng cho sự nhân lên của vi rút, đồng thời cũng là đích tác động của thuốc kháng vi rút. Các đột biến kháng thuốc ở vùng gen *pol* làm giảm độ nhạy cảm với thuốc kháng vi rút, nhưng những đột biến này cũng làm giảm hoạt tính xúc tác và khả năng sao chép của vi rút (viral replication capacity – VRC) [137]. Liệu sự lây truyền và lây nhiễm của HIV-1 kháng thuốc bị suy giảm sinh lực dẫn đến kết cục lâm sàng và hiệu quả điều trị như thế nào vẫn là một chủ đề gây tranh cãi. Tải lượng vi rút thấp hơn đáng kể đã được ghi nhận ở những bệnh nhân nhiễm vi rút dạng đột biến M184V/I, so với những người nhiễm vi rút hoang dã [86]. Về mặt lý thuyết, việc lây nhiễm vi rút có sinh lực suy giảm có thể ít ảnh hưởng nghiêm trọng hơn đến vật chủ.

Nef là một protein 27kD đa chức năng được mã hoá bởi khung đọc mở (ORF – open reading frame) nằm ở đầu 3'. Nef chủ yếu nằm ở tế bào chất và liên kết với màng sinh chất [20]. Nef được biểu hiện sớm trong vòng đời của vi rút, là trung gian cho quá trình hoạt hóa tế bào T bằng cách gắn vào các protein tham gia truyền tín hiệu nội bào [4]. Nef được xem như bộ điều khiển tạo ra một số chức năng báo hiệu cụ thể thông qua việc lắp ráp nhiều phức hợp protein. Trong chức năng này, Nef dường như hỗ trợ nhưng không khởi động sao chép vi rút và đóng vai trò giữ cho tế bào sống sót cho đến khi thể hệ vi rút tiếp theo sẵn sàng tấn công. Nef có thể gây áp lực đối với thụ thể tế bào CD4, CD28 và CD3 (chỉ ở khi) và HLA lớp I (A và B) trên bề mặt của tế bào nhiễm HIV-1 [20, 184]. Bằng cách liên kết với CD4 nội bào và chuyển đến lysosome để phân huỷ, Nef làm giảm sự biểu hiện của CD4 ở tế bào vật chủ. Đây có lẽ là một cơ chế giúp vi rút trốn tránh sự tấn công của T CD8 gây độc tế bào và tránh được sự nhận diện của các T CD4 [40]. HIV-1 không có Nef đã được tìm thấy ở một nhóm các bệnh nhân người Úc không tiến triển kéo dài (LTNP). Tuy nhiên, sau đó một vài bệnh nhân trong số này đã bắt đầu có các dấu hiệu bệnh tiến triển cùng với giảm CD4. Vì thế, cho dù mất gen

nef có thể làm chậm sự nhân lên của vi rút, không phải lúc nào cũng ngăn được sự xuất hiện của AIDS [20].

Vif có chiều dài 23kD, là protein có vai trò thúc đẩy khả năng lây nhiễm của vi rút HIV-1 bằng cách tăng cường sự nhân lên của vi rút. Vif tương tác với protein APOBEC3G của vật chủ. APOBEC3G đóng vai trò quan trọng trong miễn dịch tự nhiên, gây phá hủy quá trình sao chép của vi rút HIV và từ đó phá vỡ sự nhân lên của vi rút trong tế bào [51]. Một số ít người nhiễm HIV có khả năng ức chế vi rút một cách tự nhiên mà không cần điều trị cho thấy có mang lượng lớn APOBEC3G. Nghiên cứu năm 2003 đã phát hiện ra rằng Vif tương tác và làm thoái hoá APOBEC3G, ngăn chặn hoạt động của protein này [13, 76]. Với các hạt virion lỗi không có Vif, khả năng lây nhiễm không bị ảnh hưởng đáng kể.

Vpr có chiều dài 14kD, cần thiết cho quá trình nhân bản của vi rút ở các tế bào không phân chia ví dụ đại thực bào. Gần đây, các nghiên cứu cho thấy Vpr có vai trò quan trọng trong vận chuyển các phức hợp vào nhân và có thể làm ngừng chu kỳ tế bào ở G2 [158]. Đối với đáp ứng miễn dịch, Vpr có khả năng cô lập chất kích hoạt phiên mã trong tế bào chất, góp phần đáng kể vào sự suy giảm miễn dịch bằng cách thay đổi cả chức năng của tế bào miễn dịch tự nhiên và thích ứng [146]. Vpr ngăn chặn các cytokine Th1 [159]. Vpr kích hoạt apoptosis của tế bào T CD4, điều chỉnh giảm biểu hiện của CD28 là phân tử kích thích chính trong tế bào T tương tác với CD80 và CD86 trên các tế bào trình diện kháng nguyên để khởi động tăng sinh, biệt hóa [4]. Cuối cùng, Vpr có thể ức chế hoạt động của tế bào NK [92].

Vpu là một protein xuyên màng có chiều dài 16kDa, với chức năng chính trong việc gây giáng hóa thụ thể CD4 trong mạng lưới nội chất, tăng cường giải phóng virion mới hình thành từ bề mặt tế bào và điều chỉnh giảm MHC I và II [165]. Vpu có vai trò quan trọng trong quá trình nảy chồi của vi rút. Các đột biến của Vpu có thể khiến các hạt vi rút không tách khỏi màng tế bào vật chủ, vi rút không biểu hiện Vpu có thể là nguyên nhân khiến bệnh tiến triển chậm hơn và mức độ nghiêm trọng thấp hơn [120].

Env (gp160) bao gồm gp120 và gp41, đóng vai trò quan trọng trong quá trình lây nhiễm vi rút bằng cách gắn với CD4 và thụ thể chemokine biểu hiện trên bề mặt của các tế bào cảm nhiễm (susceptible cells). Vi rút gắn với thụ thể hoặc đồng thụ thể (CCR5 hoặc CXCR4) phụ thuộc vào trình tự axit amin của vòng lặp biến đổi 3 (variable loop 3 - V3) của gp120. Ngoài vòng lặp V3, các thay đổi trình tự trong V1 và V2 cũng ảnh hưởng đến phạm vi tế bào vật chủ. So với HIV-1 gp120, các đột biến trong gp41 ít được báo cáo hơn về mức độ ảnh hưởng đối với tốc độ tiến triển của bệnh.

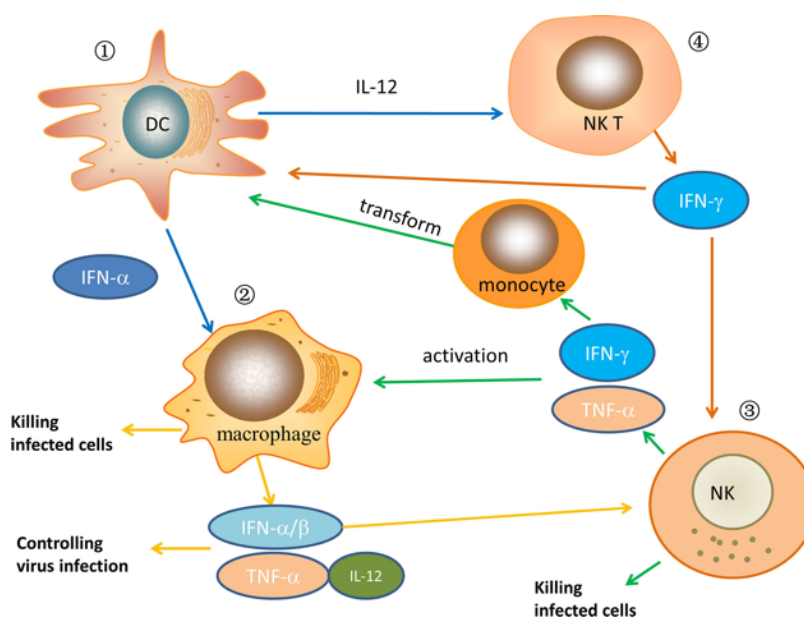
Tat là yếu tố điều hòa thiết yếu để thúc đẩy mức độ biểu hiện gen của vi rút. Tat liên kết với các yếu tố tế bào, làm tăng quá trình phosphoryl hoá, dẫn đến tăng cường phiên mã các gen của HIV. Đây là một công cụ hữu ích giúp vi rút đánh bại phản ứng của cơ thể. Hầu hết các đột biến ở Tat làm suy giảm quá trình sao chép của vi rút [47].

Rev điều hoà cho quá trình biểu hiện protein HIV-1. Một tín hiệu định vị được mã hóa trong gen *rev*, cho phép protein Rev có thể định vị và di chuyển vào nhân, nơi nó tham gia vào quá trình xuất các mARN. Rev điều chỉnh tăng sự biểu hiện của các protein cấu trúc. Khi không có Rev, mARN của các gen cấu trúc bị giữ lại trong nhân và không thể dịch mã. Một số đột biến (Q74P, V104L, S106P) làm thay đổi chức năng của Rev [209]. Trong khi tính đa hình của Rev tại vị trí codon 78 có thể góp phần giảm tiến triển bệnh.

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

Miễn dịch tự nhiên giữ vai trò quan trọng đối với tiến triển nhiễm HIV [209, 221]. Các đáp ứng miễn dịch tự nhiên chủ yếu xảy ra trong giai đoạn nhiễm HIV-1 cấp tính giúp ngăn chặn sự lây truyền HIV-1 ở niêm mạc. Sự kiểm soát tiến triển bệnh được thực hiện bằng cách kích hoạt nhiều loại tế bào miễn dịch tự nhiên thông qua các cytokine và các con đường truyền tín hiệu ở các mức độ khác nhau.

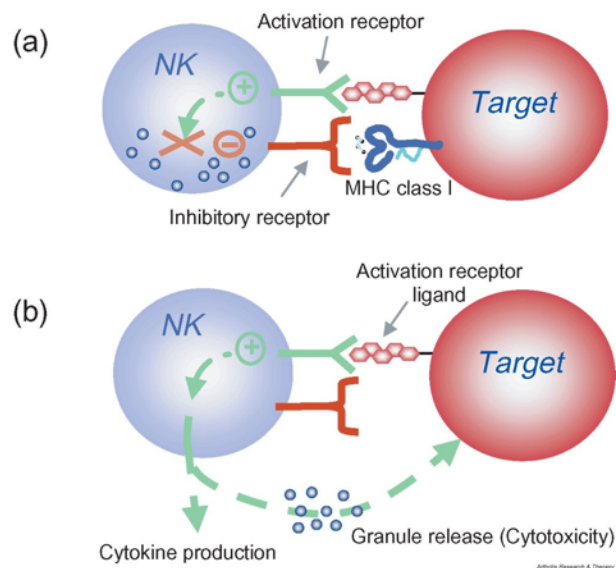


Hình 1.5. Đáp ứng miễn dịch tự nhiên với nhiễm HIV ở trường hợp ECs/LTNPs [190]

(1) Trong EC/LTNP, tế bào DC được kích hoạt, tiết ra các cytokine (IFN- α và IL-12) có vai trò kháng vi rút. Đồng thời, các cytokine này có thể kích hoạt các đại thực bào và tế bào NKT. (2) Khi các đại thực bào được kích hoạt, chúng có khả năng tiêu diệt mạnh mẽ đối với các tế bào bị nhiễm vi rút, tiết ra các cytokine (IFN- α , IFN- β , TNF- α và IL-12), kiểm soát sự nhân lên của vi rút và kích hoạt các tế bào NK. (3) Khi các tế bào NK được kích hoạt, chúng có thể trực tiếp tiêu diệt các tế bào bị nhiễm, tiết ra IFN- γ , TNF- α , tiếp tục kích hoạt đại thực bào và khiến bạch cầu đơn nhân biến đổi thành DC. (4) Sau khi các tế bào NKT được kích hoạt, sản sinh IL-2, IFN- γ và các cytokine khác tăng lên, điều này sẽ tiếp tục kích hoạt các tế bào DC và NK.

Nghiên cứu trên nhóm bệnh nhân không tiến triển lâu dài (long-term non progression – LTNP, hay còn gọi là những người kiểm soát ưu việt – Elited control), sự kiểm soát bằng các tế bào trong hệ thống miễn dịch tự nhiên (tế bào DC, NK, đại thực bào và NKT) đóng vai trò quan trọng và không thể thay thế [190]. Tế bào DC có khả năng trình diện kháng nguyên mạnh mẽ, điều chỉnh phản ứng ban đầu của vật chủ đối với vi rút, kích thích khả năng miễn dịch thích ứng. Các tế bào NK được kích hoạt một phần bởi các cytokine được tiết ra bởi các tế bào DC và bạch cầu đơn nhân. Đại thực bào tác động chính đến phản ứng miễn dịch tự nhiên muộn, trong khi các tế bào NKT có tác dụng điều hòa miễn dịch mạnh mẽ. Mối tương quan của một số tế bào đáp ứng miễn dịch tự nhiên được mô tả trong hình 1.5.

Tế bào NK có vai trò chính trong việc kiểm soát nhiễm HIV mạn tính, thông qua nhận biết các tế bào bị nhiễm vi rút qua các thụ thể [34, 190]. Các tế bào NK có hai nhóm thụ thể: thụ thể hoạt hóa tiêu diệt và thụ thể ức chế tiêu diệt. Các thụ thể này liên kết với phối tử phù hợp trên tế bào đích sẽ thực hiện các chức năng tương ứng [64]. Phân tử MHC lớp I là phối tử liên kết với thụ thể ức chế tiêu diệt. Các tế bào bị nhiễm vi rút giảm biểu hiện phân tử MHC lớp I, khi đó các thụ thể hoạt hoá tiêu diệt được kích hoạt, tế bào NK nhận biết tiêu diệt các tế bào đích (hình 1.6).



Hình 1. 6. Kiểm soát nhiễm HIV mạn tính của tế bào NK [64]

(a) Các thụ thể ức chế của tế bào NK nhận diện MHC lớp I và hạn chế hoạt hóa tế bào NK.
 (b) Khi không có phối tử, các tế bào NK bị kích hoạt. Trong trường hợp không có hoặc sự biểu hiện của MHC lớp I trên các tế bào đích giảm, các tín hiệu kích thích không còn bị ức chế, tế bào NK sản xuất cytokine và giải phóng hạt gây độc tế bào.

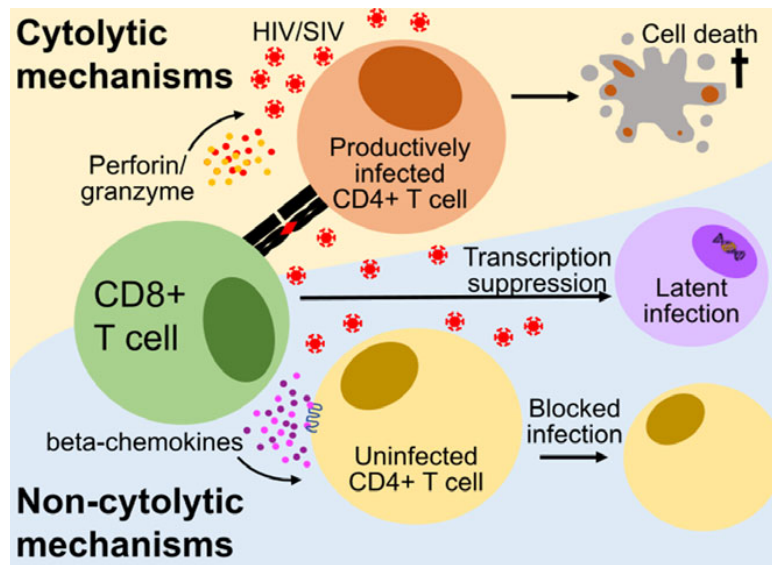
Các thụ thể giống như immunoglobulin của tế bào NK (KIR - Killer cell immunoglobulin-like receptors) đại diện cho một họ thụ thể có tính đa hình cao, điều chỉnh hoạt động của tế bào NK và xác định khả năng nhận biết các tế bào đích [152]. Các phân tử kháng nguyên bạch cầu người (HLA) lớp I đóng vai trò là phối tử chính cho KIR. Liên kết alen với tế bào NK qua KIR ít biến đổi, do đó HIV tăng cường biểu hiện với HLA-C để tránh được phản ứng hiệu quả của tế bào NK. 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 [135, 136]. Hiện nay, cơ chế điều hoà tiến triển bệnh và khả năng miễn dịch tự nhiên ở những người LTNP/EC vẫn chưa thực sự rõ ràng, do tỷ lệ bệnh nhân này là rất thấp và sự phức tạp của hệ thống miễn dịch của cơ thể.

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

Tế bào T CD8 giữ vai trò quan trọng kiểm soát quá trình vi rút HIV nhân lên trong giai đoạn nhiễm cấp. Nồng độ vi rút trong máu giảm sau khi đạt mức đỉnh chỉ xảy ra sau khi xuất hiện tế bào T CD8 thích ứng, cho thấy tế bào T CD8 tham gia ngay từ các bước kiểm soát nhiễm vi rút. Thử nghiệm đầu tiên làm triệt tiêu tế bào T CD8 trước khi gây nhiễm SIV ở khỉ rhesus macaques, dẫn tới mất khả năng kiểm soát vi rút nhân lên [185, 228]. Hơn nữa, ngay trong những tuần đầu sau nhiễm vi rút, đã xuất hiện các dạng vi rút đột biến có khả năng trốn thoát đáp ứng tế bào T CD8 và nhanh chóng có mặt cố định trong quần thể vi rút, cho thấy áp lực chọn lọc lên vi rút để trốn thoát sự nhận diện của tế bào T CD8 [208].

Sự phát triển của tế bào T CD8 là rất quan trọng để kiểm soát quá trình nhân lên của HIV sau giai đoạn nhiễm cấp tính, như đã được chứng minh ở các nghiên cứu loại bỏ tế bào T CD8 khi nhiễm SIV mạn tính làm tăng sinh vi rút [2, 41, 96]. Hơn nữa, các đột biến trốn thoát đáp ứng tế bào T CD8 tiếp tục xuất hiện trong giai đoạn nhiễm vi rút mạn tính [78]. Tuy nhiên, hiện tượng vi rút trốn thoát miễn dịch làm suy giảm chức năng, cạn kiệt tế bào T và làm mất khả năng kiểm soát vi rút tăng sinh [14, 37, 171]. Mất kiểm soát tế bào T CD8 liên quan với tiến triển bệnh ở những người nhiễm HIV mạn tính.



Hình 1. 7. Kiểm soát quá trình nhân lên của HIV/SIV bởi tế bào T CD8 [140]

Cơ chế gây độc tế bào (cytolytic mechanisms): Tương tác giữa tế bào T CD8 với tế bào T CD4 nhiễm vi rút, qua TCR và các phân tử cùng được kích hoạt khác, làm cho các tế bào T CD8 giải phóng perforin và granzyme dẫn tới làm chết tế bào nhiễm vi rút. Cơ chế không gây độc tế bào (non-cytolytic mechanisms): Tế bào T CD8 giải phóng beta-chemokines bảo vệ tế bào T CD4 không bị nhiễm vi rút HIV.

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. Các nghiên cứu dịch tễ học đã chứng minh mối liên hệ giữa mang alen HLA bảo vệ như HLA-B*57 và HLA-B*27 với chậm tiến triển AIDS [36]. Tác động nhắm đích tới các epitope (đặc biệt là các epitope bảo tồn), một số protein p24 Gag có hiệu quả kiểm soát vi rút HIV-1 [154, 225, 226]. Đáp ứng miễn dịch tế bào T CD8 giới hạn theo HLA tạo áp lực gia tăng lên vi rút HIV-1, dẫn tới xu hướng vi rút trốn thoát đáp ứng miễn dịch bằng tạo ra các đột biến.

Đáp ứng miễn dịch dịch thể xuất hiện muộn sau nhiễm vi rút HIV và không hiệu quả trong việc loại bỏ vi rút. Trong giai đoạn nhiễm cấp các đáp ứng kháng thể trung hoà (Neutralizing Antibodies - NAbs) xuất hiện muộn, đạt nồng độ rất thấp khi mật độ vi rút đạt đỉnh cao nhất [203]. Đáp ứng kháng thể trung hoà phổ rộng được hình thành sau 2 đến 4 năm nhiễm HIV ở 10-20% người nhiễm. Phổ đáp ứng kháng thể trung hoà

với HIV liên quan với tải lượng vi rút mức cao, số tế bào T CD4 giảm thấp, vi rút phân típ C, kiểu gen HLA. Glycoprotein envelope (Env), gp120 và gp41, có chức năng gắn kết với thụ thể CD4, CCR5 và CXCR4 trên bề mặt tế bào đích. Env là đích tác động chính của đáp ứng miễn dịch thể kháng lại HIV-1 [15]. Protein Envelope (Env) của vi rút HIV có khả năng tránh khỏi sự nhận biết của các kháng thể trung hoà bằng cơ chế hạn chế tiếp xúc với các vị trí quyết định kháng nguyên (epitope) [114]. Chính vì vậy trong suốt thời kỳ nhiễm mạn tính, NAbs vẫn được tạo ra nhưng có hiệu giá rất thấp và không có hiệu quả để thải loại vi rút [145]. Hơn nữa, các NAbs được tạo ra nhưng không thể chống lại các vi rút mang đột biến trốn thoát đáp ứng miễn dịch [179, 213].

1.1.3. Hội chứng suy giảm miễn dịch do nhiễm HIV

Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải ở người (AIDS) được phát hiện đầu tiên vào tháng 6/1981, kể từ đó đến nay, nhiễm HIV/AIDS vẫn được coi là đại dịch và là thảm họa của nhân loại bởi tốc độ lây truyền rất nhanh, rộng khắp và chưa có vắc xin để dự phòng nhiễm HIV và cũng chưa có thuốc điều trị khỏi AIDS. Dựa trên dữ liệu của UNAIDS, ước tính có khoảng 1,5 triệu ca nhiễm HIV mới trên toàn cầu vào năm 2020, giảm 47% so với mức đỉnh năm 1998 và giảm 30% so với năm 2010.

Bảng 1. 2. Tử vong do AIDS trên toàn cầu [192]

Khu vực	Số người tử vong do AIDS (năm 2020)
Đông và Nam Phi	310.000
Tây và Trung Phi	150.000
Trung Đông và Bắc Phi	7.900
Châu Á và Thái Bình Dương	140.000
Mỹ Latinh	32.000
Caribbean	6.000
Đông Âu và Trung Á	35.000
Tây và Trung Âu và Nam Mỹ	13.000
Tổng	690.000

Tỷ lệ tử vong do AIDS là rất cao. Vào năm 2020, ước tính có khoảng 690.000 ca tử vong liên quan đến AIDS trên toàn cầu (bảng 1.2) [192]. Số ca tử vong liên quan đến AIDS đạt đỉnh 1,9 triệu ca tử vong vào năm 2004 và giảm ~42% kể từ năm 2010, do sự mở rộng sử dụng liệu pháp điều trị ARV ở nhiều khu vực trên thế giới. Tại Việt Nam, theo báo cáo của Cục phòng chống HIV/AIDS năm 2020 cả nước có > 210.000 người nhiễm, số ca nhiễm mới ước tính khoảng 14.000 người. Số bệnh nhân tử vong tính đến năm 2020 là >109.000 người, riêng năm 2020 có >2.000 người chết do AIDS.

Sự suy giảm của hệ thống miễn dịch cơ thể trong việc kiểm soát nhiễm HIV được giải thích bằng nhiều lý do khác nhau. Trên hết, bằng cách nhiễm tế bào T CD4, HIV có thể sao chép chủ yếu trong các tế bào T hoạt hoá và làm tê liệt một trong những thành phần chính của hệ thống miễn dịch thích ứng. Nhiễm HIV làm giảm tế bào T CD4 thông qua các cơ chế: tự huỷ của tế bào T (apoptosis); tiêu diệt trực tiếp tế bào T CD4 bị nhiễm bằng T CD8 gây độc tế bào [45, 54]. HIV cũng có thể gây nhiễm tiềm ẩn trong các tế bào T CD4 và không thể phát hiện đối với T CD8, do đó sự sao chép có thể xảy ra muộn trong quá trình nhiễm. Khi tế bào T CD4 giảm đến mức tới hạn, khả năng miễn dịch qua trung gian tế bào mất đi, cơ thể ngày càng dễ bị nhiễm trùng cơ hội dẫn đến AIDS.

Khả năng phát sinh đột biến mạnh mẽ của vi rút HIV-1 là cơ chế chính dẫn đến thất bại của hệ thống miễn dịch trong kiểm soát vi rút. Quá trình đột biến tạo ra sự đa dạng kháng nguyên khiến tế bào B nhớ trở nên không đặc hiệu, kháng thể sinh ra một cách yếu ớt, các tế bào T CD8 không được hoạt hoá hoặc hoạt hoá một cách không đầy đủ nên không tiêu diệt được vi rút. Đột biến kháng nguyên trong các tế bào T có thể ảnh hưởng đến khả năng liên kết của các phân tử HLA với peptide của vi rút, dẫn đến việc TCR không thể nhận ra phức hợp HLA-peptide. Cuối cùng, HIV có thể trốn thoát hoàn toàn bằng cách biểu hiện epitope mang đột biến không gây miễn dịch.

Tốc độ tiến triển AIDS khác nhau ở những người nhiễm bệnh [112]. Nhiễm HIV có thể được chia thành ba loại chính: (i) tiến triển nhanh, trong đó bệnh nhân tiến triển thành AIDS trong vòng 3 năm sau khi nhiễm; (ii) tiến triển trung bình, AIDS phát triển

trong khoảng thời gian từ 3 đến 10 năm sau khi chuyển đổi huyết thanh; và (iii) không tiến triển lâu dài (long-term non progression - LTNP) khi người nhiễm HIV duy trì số lượng tế bào T CD4 và CD8 cao mà không cần trị liệu [222]. Nhóm người nhiễm HIV LTNP chiếm dưới 5% tổng số người nhiễm HIV. Một số nghiên cứu đã sử dụng khoảng thời gian > 8 năm để xác định người LTNP, một số khác đã sử dụng khoảng thời gian > 10 năm [83]. Kết hợp với tải lượng vi rút HIV, những người LTNP duy trì tải lượng vi rút <5.000 copies/ml cho thấy tình trạng nhiễm trùng máu thấp, những người duy trì được tải lượng vi rút liên tục <50 copies/ml được cho là có khả năng kiểm soát tự nhiên, được gọi là “elite” hoặc “natural controllers”, hay còn gọi là những người kiểm soát ưu việt [83, 112].

Các đặc điểm di truyền của vật chủ mang lại sức đề kháng cao hơn hoặc đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ hơn với HIV đã lý giải tại sao bệnh nhân LTNP có thể sống lâu hơn với HIV [22, 168]. Các yếu tố vật chủ ảnh hưởng đến tốc độ tiến triển từ HIV sang AIDS được xác định gồm ba loại: (i) các gen mã hóa thụ thể bề mặt tế bào; (ii) cytokine hoặc gen đáp ứng miễn dịch; và (iii) các gen kháng nguyên bạch cầu người (HLA). Đối với yếu tố thứ nhất, một tỷ lệ thấp bệnh nhân LTNP đã được chứng minh là có đột biến di truyền của thụ thể CCR5 của tế bào lympho T. Biến thể $\Delta 32$ (delta 32) của CCR5 làm suy giảm khả năng nhiễm tế bào và gây bệnh của HIV [116]. Tuy nhiên, sự hiện diện của đột biến này không thống nhất giữa các LTNP và được quan sát thấy ở một số lượng cực kỳ nhỏ những bệnh nhân này. Ở một khía cạnh khác, số ít người bị nhiễm HIV có khả năng ức chế vi rút một cách tự nhiên mà không cần điều trị. Những người này mang một lượng lớn protein gọi là APOBEC3G. APOBEC3G phá hủy quá trình sao chép ngược của vi rút HIV từ đó phá vỡ sự nhân lên của vi rút trong tế bào [51]. Cuối cùng, HLA là yếu tố vật chủ ảnh hưởng đến tiến triển bệnh AIDS được nghiên cứu khá đầy đủ với khả năng điều chỉnh phản ứng miễn dịch của vật chủ đối với nhiễm trùng. Trong khoảng một nửa LTNP của người da trắng, hai kiểu gen HLA-B*57 và HLA-B*27 có liên quan đến việc kiểm soát vi rút [221]. Mặc dù tỷ lệ bệnh nhân LTNP là thấp trong quần thể người nhiễm HIV, nhưng vẫn cho thấy hệ thống miễn dịch có thể có hiệu quả trong việc kiểm soát vi rút HIV.

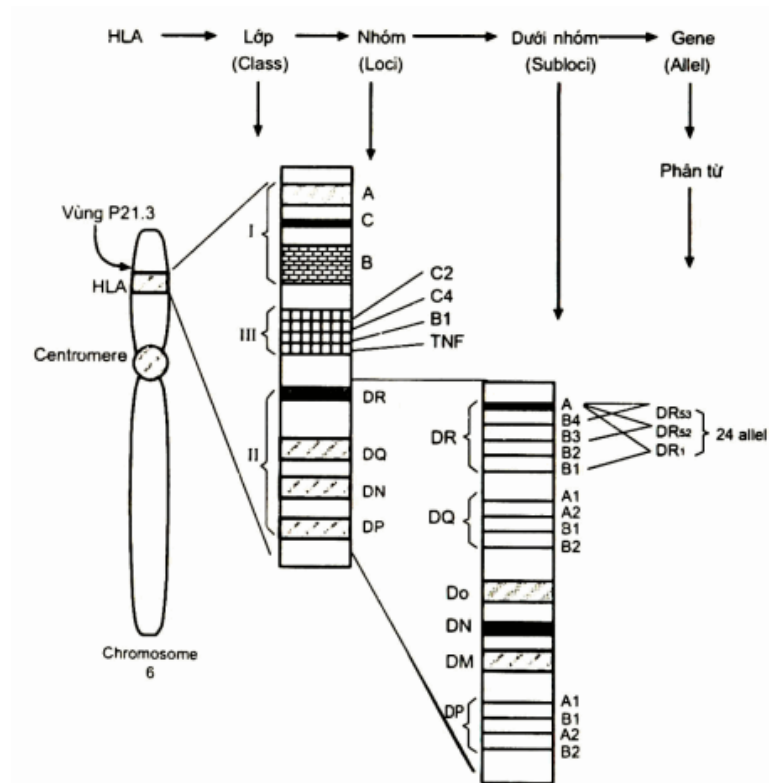
Nhiều bằng chứng cho thấy ở một số cá nhân LTNP/EC, việc nhiễm vi rút HIV-1 có sinh lực thấp khiến VRC suy giảm, giúp kiểm soát vi rút. Tuy nhiên, cũng có thể là trong LTNP/EC các yếu tố miễn dịch khác, như áp lực do CTL dẫn đến phát sinh các đột biến làm giảm khả năng nhân lên và gây bệnh của vi rút [80]. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng các đột biến trốn thoát CTL xảy ra rất sớm sau khi nhiễm bệnh [209]. Và bởi LTNP/EC được xác định sau nhiều năm nhiễm vi rút, rất khó để xác định trường hợp nào xảy ra trước, nhiễm HIV-1 có sinh lực thấp hay áp lực miễn dịch dẫn đến các đột biến trốn thoát không phù hợp.

1.2. Vai trò của kháng nguyên bạch cầu người (HLA lớp I) trong đáp ứng miễn dịch tế bào với nhiễm HIV-1

1.2.1. Đặc điểm cấu trúc HLA lớp I

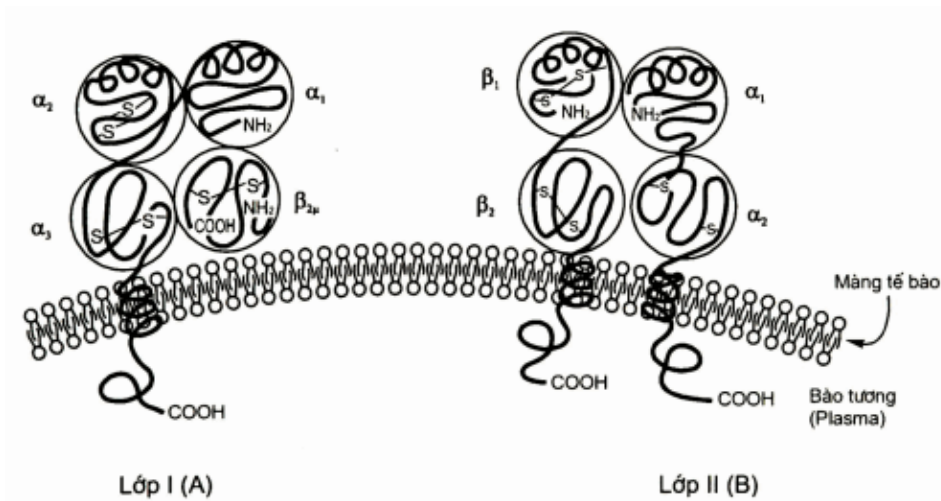
Phức hợp phù hợp tổ chức chính (Major Histocompatibility Complex - MHC) được mã hoá bởi nhiều gen nằm trên nhánh ngắn của NST số 6 ở người. MHC ở người là kháng nguyên bạch cầu người (human leukocyte antigen – HLA). Phân tử HLA là các glycoprotein được tìm thấy ở hầu hết các tế bào có nhân trong cơ thể, song chúng được tìm thấy nhiều nhất trên bề mặt bạch cầu.

HLA chia thành 3 lớp: lớp I, lớp II và lớp III [79]. HLA lớp I gồm các loci (nhóm) ký hiệu A, B, C. HLA lớp II có các nhóm DR, DQ, DN, DM và DP. Mỗi nhóm có các subloci (dưới nhóm) và mỗi subloci có các cấu trúc gen (alen) (hình 1.8).



Hình 1. 8. Vị trí locus HLA lớp I trên nhiễm sắc thể số 6 [79]

Phân tử HLA lớp I gồm hai chuỗi polypeptide, một chuỗi dài α và một chuỗi ngắn β gọi là β 2- microglobulin (hình 1.9) [79]. Chuỗi α có bốn vùng: (i) một vùng bào tương có chứa các vị trí phosphoryl hóa và liên kết với các thành phần khung của tế bào; (ii) một vùng xuyên màng có chứa các axit amin kỵ nước mà phân tử được gắn vào màng tế bào; (iii) một vùng giống kháng thể α 3 được bảo tồn để cho CD8 gắn vào; (iv) một vùng gắn peptide có tính đa hình cao được hình thành từ các vùng α 1 và α 2. β 2- microglobulin liên kết với chuỗi α và giúp duy trì cấu hình thích hợp của phân tử. Cả 2 chuỗi α và β có trọng lượng phân tử là 34.000 dalton, gồm 85-88 axit amin, 2 gen A và B mã hoá cho chuỗi α , β . Vùng gắn peptide có cấu trúc rãnh liên kết (khe hở) cạnh bề mặt tương tác với thụ thể tế bào T hoặc thụ thể kháng thể tế bào NK (KIR – Killer cell Immunoglobulin Receptors).

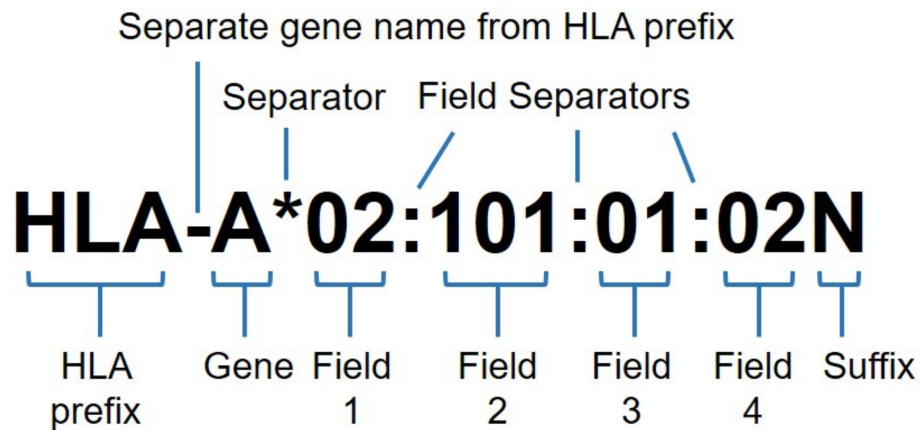


Hình 1. 9. Cấu trúc phân tử của HLA lớp I (A) và lớp II (B)

Phân tích phân tử HLA lớp I thấy rằng vùng liên kết gắn peptide là vùng biến đổi nhiều nhất. HLA lớp I liên kết với peptide dài khoảng 8-10 axit amin, trong khi HLA lớp II liên kết với peptide dài khoảng 12-13 axit amin. Vùng liên kết peptide quyết định các motif liên kết trên peptide với nhiều kiểu alen HLA có cùng một motif liên kết gọi là supertype và một protein vi rút có nhiều peptide tương thích với một HLA supertype là superantigen.

1.2.2. Đa dạng kiểu gen HLA alen

Công ước đặt tên của HLA đã trải qua một số lần thay đổi để phù hợp và danh pháp năm 2010 hiện đang được áp dụng để định danh HLA alen. Dấu hai chấm (:) được sử dụng trong tên alen để phân cách các trường riêng biệt. Mỗi tên HLA alen có một số duy nhất tương ứng với tối đa bốn bộ chữ số được phân tách bằng dấu hai chấm. Bộ chữ số đầu tiên sau dấu hoa thị trong tên alen mô tả họ alen và thường tương ứng với nhóm huyết thanh. Kiểu gen HLA được xác định tại đây được coi là kiểu gen có độ phân giải thấp. Bộ chữ số thứ hai được gán liên tục khi các alen mới được xác định (hình 1.10). Kiểu gen HLA được xác định với hai bộ chữ số được coi là độ phân giải cao, chỉ ra một hoặc nhiều sự thay thế nucleotide làm thay đổi trình tự mã hóa protein HLA. Kiểu gen HLA ở độ phân giải cao là một tập hợp các alen mã hóa cùng một chuỗi protein quy định vị trí gắn kháng nguyên [167].

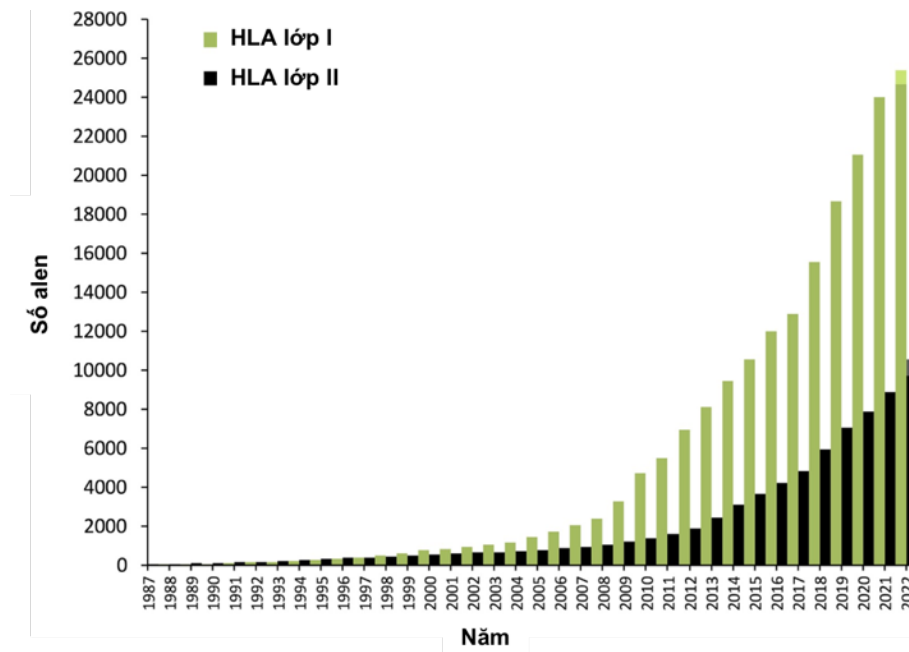


Hình 1. 10. Danh pháp HLA alen [167]

Tiền tố HLA (prefix) theo sau là tên gen và bốn trường (field) của alen, phân cách bằng dấu (:). Hậu tố (suffix) hiển thị trạng thái biểu hiện trên bề mặt tế bào (ví dụ: N = null, không được biểu hiện).

Kiểu gen alen HLA độ phân giải cao được coi là mục tiêu đối với các dự án nghiên cứu. Phương pháp xét nghiệm SSO, SSP Luminex là các cách tiếp cận đối với định danh HLA ở độ phân giải thấp và trung bình [166]. Một phương pháp tiếp cận khác là khuếch đại và giải trình tự trực tiếp exon liên quan (SBT – Sequence based typing). SBT với nền tảng giải trình tự Sanger sử dụng điện di mao quản đã kết hợp các phần mềm chuyên biệt để định danh HLA [60]. Mặc dù công nghệ giải trình tự phát triển với những kỹ thuật cao như giải trình tự gen thế hệ mới (NGS – Next Generation Sequencing) định danh được HLA ở độ phân giải cao và có thể cao hơn nữa, nhưng chi phí cao và tính phổ biến thấp đã hạn chế khả năng ứng dụng của phương pháp này. Cho đến nay SBT vẫn là phương pháp tiêu chuẩn để xác định kiểu gen HLA độ phân giải cao.

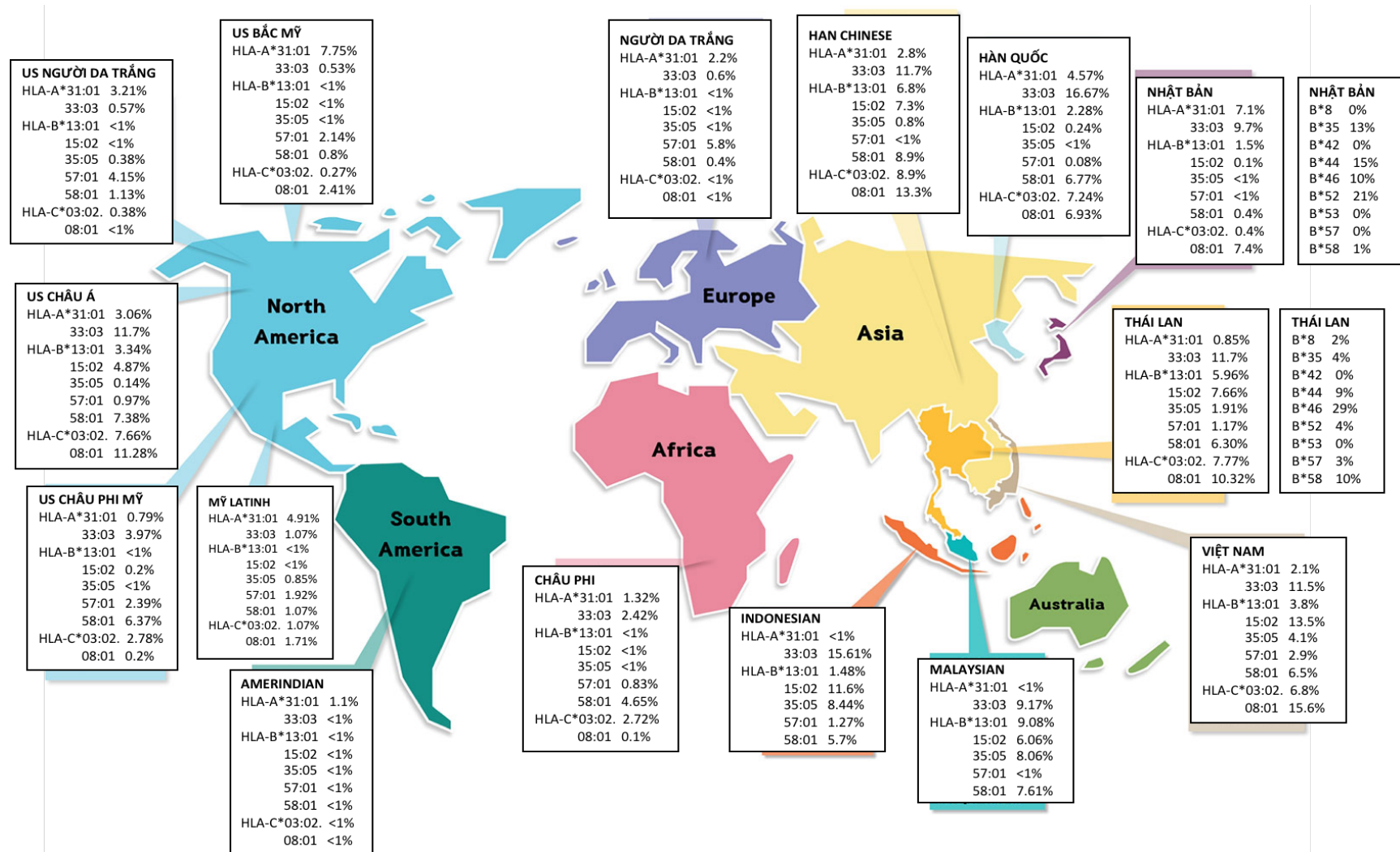
Năm 1998 cơ sở dữ liệu IMGT-HLA được hình thành với tổng số 964 alen từ 47 quốc gia. Tính đến năm 2022, cơ sở dữ liệu này ghi nhận >35.000 alen từ 191 quốc gia, theo danh pháp của Tổ chức Y tế thế giới (hình 1.11) [18]. HLA lớp I ~24.000 alen (chiếm ~68%). HLA-B chiếm ưu thế trong nhóm HLA lớp I nhiều hơn HLA-A/C.



Hình 1. 11. Số loại HLA alen trên cơ sở dữ liệu IMGT-HLA [183]

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. Hình 1.13 mô tả phân bố một số alen HLA lớp I ở một số quốc gia và châu lục, theo công bố năm 2020 [183]. 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% [81]. A*33:03 và B*15:02 lưu hành với tỷ lệ cao ở khu vực Châu Á, trong đó có Việt Nam.

Các alen như HLA-A*23, B*35, B*58:02 và C*07 liên kết với nhiều phân típ HIV-1. Một số alen HLA khác dường như có liên kết với một phân típ HIV-1 duy nhất. Ví dụ, B*15:16 và B*15:17 liên quan đến giảm tải lượng vi rút HIV-1 phân típ B, nhưng không liên kết ở những bệnh nhân bị nhiễm HIV-1 phân típ A và C [123]. Tương tự, B*15:03 liên kết với HIV-1 phân típ B nhưng không liên kết với phân típ C. Ngược lại, B*18 được chứng minh là có liên kết trong nhiễm HIV-1 phân típ C nhưng không liên kết với phân típ A hoặc B. Hơn nữa, sự phân bố của các nhóm HIV-1 kiểu gen tái tổ hợp trong quần thể đa dạng về dân tộc (như Đông Nam Á) có mối tương quan rộng rãi với các kiểu gen alen tần số cao [193, 194]. Như vậy, sự lưu hành của kiểu gen HIV-1 và các kiểu gen tái tổ hợp ở các vùng địa lý khác nhau có liên quan đến sự biến đổi cấu trúc di truyền HLA ở các nhóm dân tộc khác nhau.



Hình 1. 12. Phân bố alen HLA lớp I trên toàn cầu [183]

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

HLA lớp I giữ nhiều vai trò quan trọng khác nhau trong cả đáp ứng miễn dịch tự nhiên và miễn dịch thích ứng. Trong đáp ứng miễn dịch tự nhiên, HLA lớp I đóng vai trò là phối tử liên kết với thụ thể giống immunoglobulin của tế bào NK (KIR), nhận dạng mục tiêu cho tế bào NK [99]. Khác với HLA-A và HLA-B, hầu như tất cả các kiểu gen HLA-C đều được KIR chấp nhận [89]. Kiểu gen HLA và KIR đều có tính đa hình cao, dẫn đến một số lượng lớn tổ hợp kiểu gen trong quần thể [89, 151].

Trong đáp ứng miễn dịch thích ứng, HLA lớp I đặc biệt quan trọng với vai trò trình diện kháng nguyên. Các kháng nguyên kích thước lớn không thể trình diện được cho tế bào miễn dịch, đặc biệt là cho tế bào T, phải được tế bào trình diện kháng nguyên APC xử lý, chuyển thành dạng peptide đủ nhỏ, phù hợp với kích thước các rãnh liên kết của phân tử HLA trên bề mặt tế bào APC. Các kháng nguyên ngoại bào, được APC thực bào và trình diện lên bề mặt ở dạng gắn với phân tử HLA lớp II. Phức hợp này được các tế bào T CD4 có cùng phân tử HLA lớp II nhận biết. Các kháng nguyên nội bào gắn với HLA lớp I, trình diện trên bề mặt tế bào APC và được tế bào T CD8 có cùng HLA lớp I nhận biết. Như vậy HLA định hướng cho khả năng đáp ứng miễn dịch thích ứng của quần thể với kháng nguyên [118].

Phức hợp peptide – HLA – TCR gây ra phản ứng CTL là mắt xích quan trọng cho thấy vai trò điều khiển của HLA đối với tế bào T CD8. Tương tác peptide trong rãnh liên kết của phân tử HLA với thụ thể tế bào T tạo tín hiệu để kích hoạt hoặc dừng phản ứng đáp ứng. Tế bào T CD8 tăng sinh ở những người nhiễm HIV mang B*27:05 [10]. Mức độ tăng sinh mạnh nhất có liên quan đến các HLA có tác động làm chậm tiến triển bệnh, như B*57 và B*27, duy trì T CD8 ở mức độ nào đó ngay cả với nhiễm trùng tiến triển [10, 93].

HLA là yếu tố di truyền có vai trò chính trong kiểm soát lây nhiễm HIV [79]. 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 [56]. Các công bố hiện nay cho thấy sự đồng dạng HLA-B giữa

mẹ và con làm tăng nguy cơ nhiễm HIV trong thời kỳ mang thai [16, 130, 163]. Ngoài ra còn làm tăng tiến triển bệnh ở trẻ do giảm đáp ứng CTL, vì các phân tử bề mặt tế bào không nhận diện được chính chúng [130, 143]. Các bà mẹ mang HLA đồng hợp tử bất kể loại alen nào có tải lượng vi rút cao hơn, là nguy cơ lây nhiễm cao sang con.

Tương ứng với ưu thế đa dạng của HLA-B trong HLA lớp I, các alen B thể hiện mối liên hệ chặt chẽ với lây truyền HIV-1. Người mang alen B*57 có tiến triển AIDS chậm hơn và số lượng tế bào CD4 bị tác động ít hơn. B*81 cùng nhóm với B*57, chống lại lây truyền HIV từ mẹ sang con [7, 111, 188, 201]. B*53:01 cho thấy có liên quan đáng kể với giảm tỷ lệ lây truyền HIV-1 ở những bà mẹ có tải lượng vi rút HIV-1 cao [216]. Tuy nhiên, một nghiên cứu khác đã chứng minh rằng những bệnh nhân trưởng thành có alen B*53:01 tiến triển thành AIDS nhanh hơn những bệnh nhân không mang alen [70]. Như vậy, mặc dù B*53:01 có khả năng chống lại sự lây truyền HIV từ mẹ sang con, nhưng lại liên quan đến tiến triển thành AIDS nhanh chóng.

Nhóm B*35-Px đã được chứng minh có liên quan đến tiến triển AIDS nhanh hơn và giảm số lượng tế bào CD4. Trong lây truyền, các alen B*35:01 hoặc B*35:03 thuộc nhóm B*35-Px đã cho thấy có liên quan tới tăng nguy cơ nhiễm HIV-1 từ mẹ sang con và tiến triển bệnh nhanh hơn ở trẻ em [16]. Có thể lý giải do alen này không thể liên kết với các peptide HIV-1 và không tạo được phản ứng miễn dịch bảo vệ.

Một số alen liên quan đến lây truyền từ mẹ sang con không đồng nhất ở các vùng địa lý riêng biệt, bởi sự liên kết giữa các alen có thể khác nhau ở các quần thể. Nghiên cứu trên 156 cặp mẹ con nhiễm HIV-1 ở Cameroon, B*44 và B*53 có liên quan đến giảm tỷ lệ nhiễm HIV ở trẻ em, có khả năng bảo vệ chống lại lây truyền mẹ con nhưng không bảo vệ khỏi phương thức lây truyền khác [142]. B*44:02 còn tăng nguy cơ lây truyền từ mẹ sang con ở các bà mẹ gốc Phi và Tây Ban Nha ở Puerto Rico và Hoa Kỳ [163, 216].

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

1.2.4.1. Ưu thế dị hợp tử của HLA

Chọn lọc tự nhiên làm phong phú, đa dạng hoá các phân tử alen, giúp con người có khả năng chống lại nhiều loại mầm bệnh [94]. Giả thuyết về chọn lọc ưu thế (ưu thế dị hợp tử) cho rằng kiểu gen dị hợp tử của locus 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 [36].

Năm 1999, nghiên cứu trên 498 mẫu HIV-1 chuyển đổi huyết thanh, người mang HLA lớp I dạng đồng hợp tử tiến triển nhanh đến AIDS ở cả người da trắng và người Mỹ gốc Phi [35]. Cả ba HLA lớp I (A, B và C) đều có vai trò độc lập, rõ nhất ở những người đồng hợp tử hai hoặc ba locus [35]. Kết quả tương tự cũng được chỉ ra trong nghiên cứu trên 140 người đồng tính nam Hà Lan và 202 phụ nữ Rwandan nhiễm HIV-1 [199]. Nghiên cứu này còn cho thấy bệnh nhân mang kiểu gen đồng hợp tử HLA-B tiến triển nhanh hơn so với HLA-A trên nhóm bệnh nhân nam tại Amsterdam [199].

Kiểu gen HLA đồng hợp tử làm gia tăng tiến triển AIDS cũng được giải thích dựa trên hiện tượng vi rút HIV-1 đột biến nhanh dưới áp lực của các loại HLA lưu hành phổ biến trong quần thể. Người có kiểu HLA đồng hợp tử thường mang alen HLA có tần suất cao trong quần thể [82, 141]. Tổng hợp kiểu gen HLA và tác động đối với tiến triển bệnh AIDS trình bày bảng 1.3.

Bảng 1. 3. Tổng hợp kiểu gen HLA và tác động đối với tiến triển bệnh AIDS

HLA genotype	Tác động	Giải thích
Đồng hợp tử [35, 199]	Tiến triển nhanh	Phạm vi hẹp các HIV-1 peptide được trình diện đến CTL, trốn thoát miễn dịch xảy ra nhanh chóng
B*27 [36, 77, 78]	Tiến triển chậm	Trình diện epitope có cấu trúc ít biến đổi
B*57 [77]	Tiến triển chậm	Phản ứng chéo chống lại các biến thể HIV peptide
B*35 [35]	Tiến triển nhanh	Gắn peptide đặc hiệu và tương tác dẫn đến rối loạn chức năng tế bào đuôi gai
Bw4 [63]	Tiến triển chậm	Đáp ứng hiệu quả với phân tử HIV-1 cụ thể
B*51 [224]	Tiến triển chậm	Đáp ứng CTL mạnh đối với Gag và Pol epitope
B*58:01 [104]	Tiến triển chậm	Đáp ứng CTL mạnh đối với Gag và Pol epitope
B*58:02 [161]	Tiến triển nhanh	Đáp ứng CTL không hiệu quả đối với Env epitope
B*13 [85, 91]	Tiến triển chậm	Đáp ứng CTL đặc hiệu đối với Gag
B*81:01 [217]	Tiến triển chậm	Sinh lực vi rút giảm, khả năng sao chép thấp ở các biến thể trốn thoát CTL

1.2.4.2. Ưu thế của HLA-B

HLA-B có 1.898 trong số 4.269 alen lớp I (chiếm 44,5%), theo dữ liệu IMGT-HLA năm 2011 [181]. Ưu thế của alen B còn thể hiện trong mối liên quan đến tiến triển AIDS. Trong đó, các alen nổi trội có tác động làm chậm tiến triển bệnh gồm B*27 và B*57 [63]. Gia tăng tiến triển AIDS được ghi nhận với vai trò của B*35 và B*08 [217].

B*57 và B*27 làm chậm tiến triển AIDS

Mối liên kết giữa kiểu gen HLA với tiến triển bệnh ở người nhiễm HIV được nghiên cứu dựa trên tải lượng vi rút và số lượng tế bào CD4 [200, 229]. Người mang B*57 và B*27 có tải lượng vi rút thấp trong giai đoạn mãn tính và có tiến triển bệnh chậm hơn [61, 144]. HLA-B*57 có tác động mạnh nhất đến tải lượng vi rút thấp và tiến

triển bệnh AIDS [115]. Đáp ứng CTL bị hạn chế bởi các phân tử B*57 nhắm vào nhiều peptide HIV-1 với các phản ứng chủ yếu làm ảnh hưởng chức năng của Gag [107].

Ở quần thể người Châu Phi cận Sahara, nơi dịch HIV tập trung, B*57:03 là kiểu gen alen phổ biến nhất với tần suất 4-5%. B*57:02 là loại alen phổ biến thứ hai, khác với B*57:03 chỉ một axit amin (Leucine156 ở B*57:03, Arginine 156 ở B*57:02). Các alen B*57 có liên kết chặt chẽ với B*58:01, đều làm chậm tiến triển bệnh và có thể cùng liên kết với một epitope. Mức độ bảo vệ theo thứ tự tăng dần: B*58:01, B*57:02, và B*57:03 [109]. Các alen này liên kết với đáp ứng tế bào T CD8 đặc hiệu p24 Gag, làm gia tăng áp lực chọn lọc đối với vi rút.

Dự án Nghiên cứu HIV của Zambia-UAB (ZUHRP) trên tổng số 259 người nhiễm HIV phân típ C (137 nữ và 122 nam) cho thấy sự khác biệt về tải lượng vi rút có liên quan đến kiểu gen HLA alen. Bằng phân tích mô hình tuyến tính các tác giả đã chỉ ra những người mang alen B*57 có tải lượng vi rút thấp ngay cả ở dạng dị hợp liên kết với B*39. Tác động của alen này vẫn mạnh mẽ khi điều chỉnh mô hình theo tuổi, giới tính và thời gian nhiễm [200].

B*27 khá phổ biến ở người da trắng với tần suất ~ 8% [108]. Người mang HLA-B*27 có tiến triển AIDS tương đối chậm và kiểm soát tải lượng vi rút ở mức thấp [108]. B*27 nhận diện epitope KK10 có độ bảo tồn cao và được chọn lọc muộn ở những người nhiễm [78]. Hiện nay trên quần thể người da trắng nhiễm vi rút HIV chủng B, bất kỳ đột biến nào xảy ra trên KK10 đều có thể được coi là kết quả của chọn lọc tự nhiên dưới áp lực của B*27.

B*35 làm nhanh tiến triển AIDS

Nghiên cứu ở Trung Quốc năm 1999, ghi nhận tần suất cao của B*35 có liên quan đến tiến triển AIDS nhanh hơn [35]. Các phương pháp phân tích HLA ở cấp độ phiên giải cao đã xác định B*35:02, B*35:03, B*35:04 liên quan đến tiến triển bệnh nhanh chóng, trong khi B*35:01, B*35:08 có liên quan đến tiến triển bệnh tương đối chậm hơn.

Năm 2001, nghiên cứu trên 559 người da trắng và 210 người Mỹ gốc Phi đã cung cấp bằng chứng cho thấy B*35 có ảnh hưởng khác nhau theo cấu trúc [70]. Hai nhóm B*35 đã được phân chia theo tính đặc hiệu liên kết với peptide: (1) nhóm HLA-B*35-PY (bao gồm cả alen phổ biến nhất là B*35:01) chỉ gắn các epitopes có proline ở vị trí 2 và tyrosine ở vị trí 9; và (2) nhóm HLA-B*35-Px phản ứng rộng hơn, cũng liên kết epitopes có proline ở vị trí 2 nhưng chấp nhận thêm một số axit amin khác với tyrosine ở vị trí 9. Kết quả cho thấy tiến triển AIDS xảy ra hoàn toàn ở những người mang B*35-Px. Như vậy khả năng miễn cảm của B*35 được phân vùng cụ thể theo nhận dạng peptide (tức là x hoặc Y ở vị trí 9 của peptide vi rút). Sự phân chia 2 nhóm nhận biết peptide B35-Px, B35-PY và kết quả nghiên cứu cũng giải thích vì sao cùng là B*35 nhưng không có tác động với sự tiến triển nhanh chóng ở người Mỹ gốc Phi, do B*35:01 là alen chính trong nhóm quần thể này thuộc nhóm B*35-PY. Nghiên cứu tại Thái Lan thực hiện trên 557 người bị nhiễm HIV-1 A/E vào năm 2000-2002, đã xác định B*35:05 là một alen bảo vệ cơ thể, tác động trực tiếp làm giảm tải lượng vi rút [153].

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

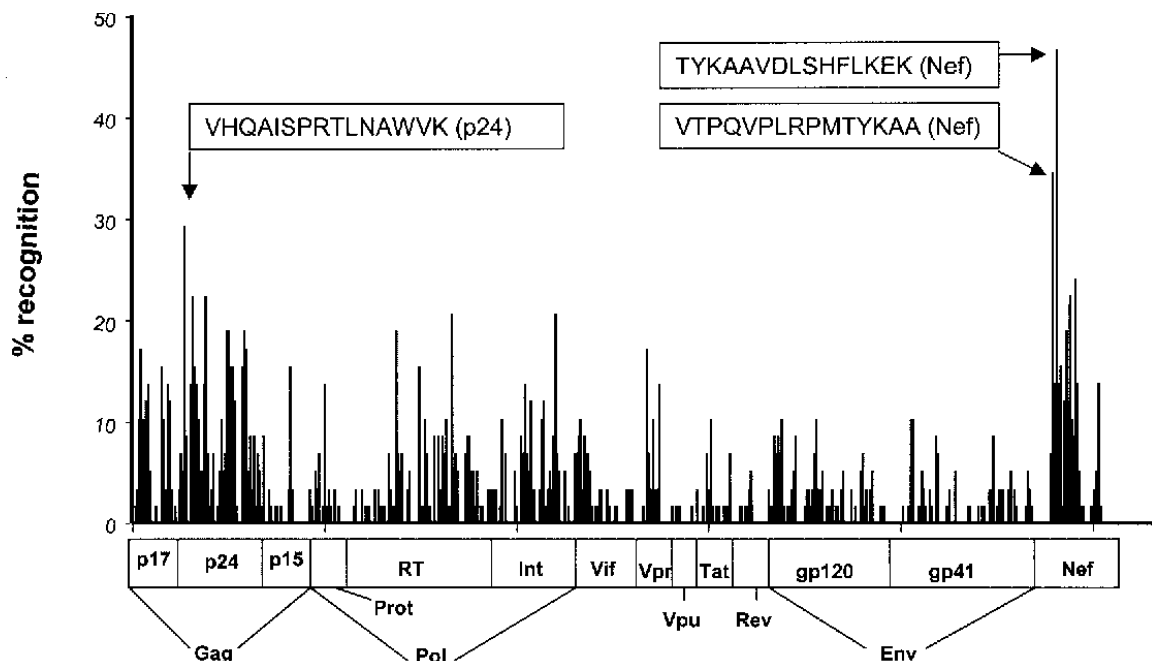
1.3.1. Đặc điểm kháng nguyên của vi rút HIV-1

Kháng nguyên của vi rút HIV-1 rất đa dạng và được hệ thống miễn dịch nhận diện thông qua các phân tử HLA. Khi mới nhiễm HIV-1, các kháng nguyên ngoại sinh bị thực bào bởi tế bào APC và bị xử lý thành các mảnh kháng nguyên. Sau đó các APC trình diện các kháng nguyên này cho tế bào T CD4 qua phức hợp với HLA lớp II, tạo tế bào T CD 4 hoạt hoá. Kháng nguyên nội sinh tạo ra trong tế bào T CD4 nhiễm vi rút, được trình diện trên bề mặt tế bào trong phức hợp với HLA lớp I.

Nef cho thấy được T CD8 nhận diện mạnh mẽ nhất, có thể lý giải do có mật độ liên kết với HLA cao nhất, với gần 40% codon trong motif liên kết với HLA [219]. Nhưng Gag lại là mục tiêu chính của đáp ứng tế bào T CD8 có thể do thực tế trình tự protein được bảo tồn, ít biến đổi hơn so với các protein khác. Các đột biến ở epitope có nguồn gốc từ protein Gag có thể làm suy giảm khả năng sao chép của vi rút, đồng thời

các epitope Gag được trình diện rất sớm sau khi nhiễm tế bào [180]. Các phản ứng của tế bào T không đặc hiệu với Gag không góp phần kiểm soát miễn dịch [71].

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 [139]. Đánh giá phản ứng của tế bào T CD8 trên toàn bộ bộ gen HIV-1 ở cấp độ peptide cho thấy phần lớn các peptide của HIV-1 đều là mục tiêu (hình 1.13). Trong số 57 bệnh nhân được khảo sát khả năng đáp ứng T CD8 với 504 peptide của vi rút HIV-1, 320/504 (63%) peptide được nhắm mục tiêu bởi các tế bào T, cho thấy rằng ít nhất hai phần ba bộ gen HIV-1 biểu hiện có thể tham gia tạo đáp ứng miễn dịch. 40/44 (91%) peptide p24-Gag được nhận diện ít nhất một lần, trong khi chỉ có 3/14 (21%) peptide Vpu là mục tiêu cho HIV-1 tế bào T CD8.



Hình 1. 13. Khả năng nhận diện của tế bào T CD8 đối với epitope trên các protein của vi rút HIV-1 [6]

Tổng số 504 peptit được biểu diễn trên trục X và tỷ lệ phần trăm các đối tượng nghiên cứu (n=57) có phản ứng với từng peptide trên trục Y. Trình tự của ba peptide được nhắm mục tiêu thường xuyên nhất nằm ở Nef và p24Gag được hiển thị.

Sau khi nhiễm cấp tính, các đáp ứng của tế bào T CD8 đặc hiệu với HIV làm giảm sự nhân lên của vi rút đến mức nhất định (set-point) khác nhau giữa các cá thể nhưng là

yếu tố dự báo về tốc độ tiến triển của bệnh. Có nghiên cứu đã cho thấy rằng, cùng mức số lượng tế bào CD4 và mức độ phản ứng của tế bào T CD8 với HIV, các cá thể có phản ứng của tế bào T CD8 chiếm ưu thế với kháng nguyên có nguồn gốc protein Gag có tải lượng vi rút trong huyết tương thấp hơn các cá thể có phản ứng T CD8 ưu thế với các protein khác [97].

Các kháng nguyên đặc hiệu protein Env có vai trò quan trọng kích thích tế bào B tạo kháng thể trung hoà. Kháng thể ban đầu tồn tại dưới dạng phức hợp kháng nguyên-kháng thể, phát triển trong vòng 8 ngày kể từ khi phát hiện được vi rút trong máu [203]. Tiếp theo là các kháng nguyên đặc hiệu gp41 kích hoạt tạo kháng thể kháng gp41 và phát triển trong vòng 2 tuần kể từ khi nhiễm trùng. Các phản ứng với kháng nguyên gp120 đầu tiên xuất hiện sau đó khoảng 2 tuần [48]. Các kháng thể trung hoà với vi rút HIV-1 chỉ xuất hiện từ 12–20 tuần sau khi nhiễm bệnh, là kết quả của đáp ứng tế bào B đặc hiệu với kháng nguyên Env [65, 84]. Các kháng thể trung hoà sớm có hiệu quả thấp, vi rút sớm xuất hiện đột biến trên Env.

Một kháng nguyên có thể có một hoặc nhiều epitope, phân tử kháng nguyên càng lớn thì càng có nhiều epitope. Một epitope được đặt tên theo đầu N- và C- theo chiều dài của chúng. Ví dụ, epitope TSTLQEQIGW (Gag codons 240 - 249) được gọi là Gag TW10. Một epitope có thể được nhận diện bởi HLA khi có trình tự axit amin phù hợp với các vị trí liên kết. Bảng 1.4 liệt kê một số epitope và trình tự axit amin tại các vị trí liên kết với HLA. Thông thường có 5 vị trí trên epitope có khả năng liên kết, tính từ trái qua phải của epitope gồm: P1 (position 1 – vị trí 1), 2, 3, 5-7 và PC (C terminal position – vị trí đầu tận C), liên kết tương ứng với các túi A, B, D, C và F trong cấu trúc của HLA lớp I. Dạng liên kết epitope-HLA tại P2-túi B và PC- túi F là phổ biến [79]. Ví dụ, B*81:01 trình diện hiệu quả các epitope có trình tự axit amin Proline (P) ở P2 và một trong các axit amin Leucine/Methionine/Phenylalanine (L/M/I/F) tại PC. Đa dạng peptide tại một vị trí liên kết phụ thuộc vào đặc điểm trình tự chuỗi bên của HLA.

Bảng 1. 4. Trình tự axit amin của một số epitope ưu tiên liên kết với HLA [79]

Vị trí liên kết	P1	P2	P3	P5-7	PC	Epitope	
B*81:01		P			L/M/I/F	TPQDLNTML	Gag 180-189
B*08	R	R			L	RRHRILDIYL	Nef 137-146
						RRDNRRGL	Vif 172-179
						RRAIRGEQL	Vif 123-131
B*14:02	D/E	R/K	Y/F/L	R/H	L	DRFFKTLRA	Gag 298-306
B*27:05	R/K	R	Y/F/W/I	I/L/P/W	R/K/H/Y/ F/M/L/I	KRWILGLNK	Gag 262-270
B*42:01		P/I			L/M/I/F	TPQDLNTML	Gag 180-189
B*44:03	D/A	E	M	V	Y/F	AEQATQDVKNW	Gag 306-316
B*52:01		Q	F/Y/W	L/I/V	I/V	RMYSPTSI	Gag 275-282
B*57:01	K	A/T/S	K/R/L/F/Y		F/W	TSTLQEQUIAW	Gag 240-249
						KAFSPEVIPMF	Gag 162-172
B*57:02	K	A/T/S	D/V/P/I/M		F/W	TSTLQEQUIAW	Gag 240-249
						ISPRTLNAW	Gag 147-155
B*57:03	K	A/T/S	F/Y		F/W	TSTLQEQUIAW	Gag 240-249
						KAFSPEVIPMF	Gag 162-172
B*58:01		A/T/S	N/L/F/Y		F/W	TSTLQEQUIAW	Gag 240-249
A*25:01	D/E	T/V/I/L/F			W	ETINEEAAEW	Gag 203-212
A*32:01		I/Q			W	PIQKETWETW	RT 559-568
A*74:01		I/Q			R	GQMVHQAI SPR	p24 Gag 140-150
A*01		S/T	P		F/L/I/V/M	CTPYDINQM	p24 Gag 181-189
B*17		R/H/L			W	IRYPKTFGW	Nef 165-173
						MHPAQTSQW	Nef 195-203
						HLEVQGYW	Vif 66-73

1.3.2. Đột biến trốn thoát đáp ứng miễn dịch

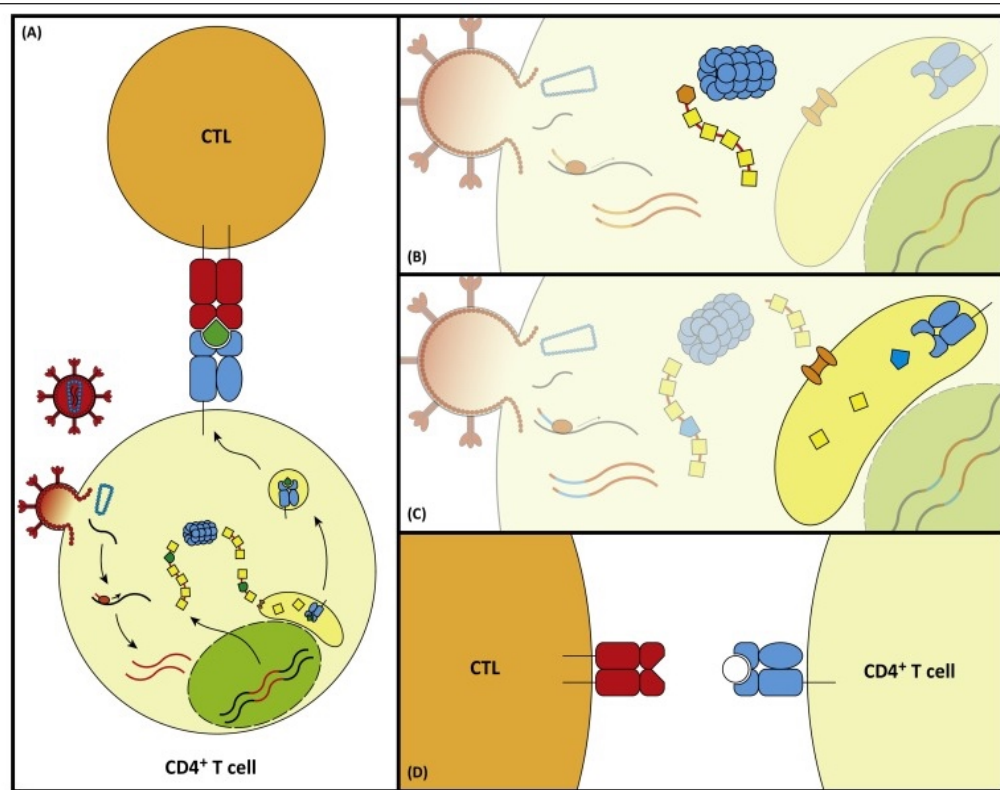
HIV-1 có tỷ lệ đột biến cao, ước tính khoảng 2×10^5 đột biến điểm sau mỗi chu kỳ sao chép [44]. Các đột biến xuất hiện ở hầu hết protein vi rút. Dữ liệu trên 410 peptide có chiều dài 18 axit amin trong một nghiên cứu trên bộ gen HIV-1 kiểu gen C cho thấy Vpu là protein biến đổi nhất, tiếp đó theo thứ tự là Env, Nef, Vif, Vpr và p24 Gag [226]. Cơ chế phổ biến nhất giúp vi rút HIV-1 thoát khỏi đáp ứng miễn dịch là tạo ra đột biến gây loại bỏ phản ứng CTL, được gọi là đột biến trốn thoát miễn dịch, thường xảy ra tại các motif liên kết với HLA [27, 108]. Có 3 dạng đột biến có thể ảnh hưởng đến phản ứng CTL [32]:

(1) *Trốn thoát quá trình xử lý kháng nguyên (antigen-processing escape)*: Quá trình trốn thoát miễn dịch xảy ra ngay ở bước gắn epitope-HLA (hình 1.14-B). Đột biến HIV-1 phát sinh trong quá trình phiên mã ngược, dẫn đến cản trở quá trình chế tạo epitope nội bào [218]. Một ví dụ điển hình cho quá trình này được mô tả trong nghiên cứu của Draenert R. và cộng sự vào năm 2004 [57]. Trong kháng nguyên bạch cầu của người nhiễm HIV mang kiểu gen B*57:03, đột biến xảy ra trên gen Gag tại vị trí codon 146 biến đổi từ alanine thành proline (Gag A146P) trên epitope ISPRTLNAW (Gag IW9). Đột biến này đã ngăn cản việc hoàn thiện epitope bằng quá trình cắt đầu NH₂.

(2) *Trốn thoát quá trình gắn với HLA (HLA-binding escape)*: đột biến xuất hiện gây tổn thương phức hợp epitope-HLA. Dạng đột biến này xuất hiện ở vị trí cố định (thường thấy ở vị trí P2 của epitope và/hoặc PC) (hình 1.14-C). Điển hình là nghiên cứu của Goulder PJ. và cộng sự, đột biến Gag R264K ở vị trí P2 của Gag KK10 epitope loại bỏ liên kết epitope-B*27 [78].

(3) *Trốn thoát TCR (TCR escape)*: đột biến phát sinh ảnh hưởng đến sự nhận diện phức hợp epitope-HLA bởi thụ thể tế bào T (hình 1.14-D). Dạng đột biến này thường xảy ra ở vị trí trung tâm của epitope. Ví dụ, đột biến Gag L268M liên kết với B*27 trên epitope Gag KK10. Đột biến này không làm ảnh hưởng tới phức hợp epitope-B*27 nhưng ngăn cản sự nhận biết epitope bằng nhiều dòng tế bào TCR khác nhau [95].

Đột biến trốn thoát CTL trong nhiễm HIV đã được ghi nhận ở cả 3 dạng [77, 150]. Ba dạng đột biến này không loại trừ lẫn nhau mà còn bổ trợ lẫn nhau, đột biến làm thay đổi cấu trúc epitope vẫn có thể ảnh hưởng đến cả gắn kết HLA và nhận diện của TCR.



Hình 1. 14. Các dạng đột biến trốn thoát CTL [32]

(A) Chu trình đáp ứng miễn dịch tế bào đối với vi rút HIV-1. (B) Đột biến trốn thoát quá trình xử lý kháng nguyên. (C) Đột biến trốn thoát quá trình gắn với HLA. (D) Đột biến trốn thoát TCR.

Đột biến trốn thoát CTL xuất hiện sớm và tích lũy theo thời gian nhiễm vi rút. Một nghiên cứu theo dõi đột biến xuất hiện ở đối tượng nhiễm HIV trong thời gian 4 năm, cho thấy 25/52 đột biến là đột biến trốn thoát CTL và gần một nửa xuất hiện trong năm đầu nhiễm vi rút [8]. Vi rút mang đột biến CTL có thể phát sinh đột biến trốn thoát mới hoặc đột biến bù trừ (compensatory mutation) mới, có thể làm tăng hoặc giảm khả năng trốn thoát miễn dịch của đột biến ban đầu. Điển hình, đột biến trốn thoát Gag T242N được chọn lọc trong 70–90% ở các cá thể mang alen B*57:01/57:02/58:03, loại bỏ hoàn toàn sự nhận diện của tế bào T CD8 [24, 121, 138]. Các đột biến bù trừ xuất hiện, như

H219Q, I223X và M228X kết hợp với T242N làm giảm đáng kể vai trò trốn thoát miễn dịch của T242N [23]. Ngược lại, đột biến Gag R264K có sự hỗ trợ của đột biến S173A loại bỏ hoàn toàn liên kết giữa epitope và B*27 [102, 162, 187]. Đa số các đột biến trốn thoát CTL biết đến thuộc phân típ B/C, một số đột biến phân típ CRF01_AE được liệt kê trong bảng 1.5 [108].

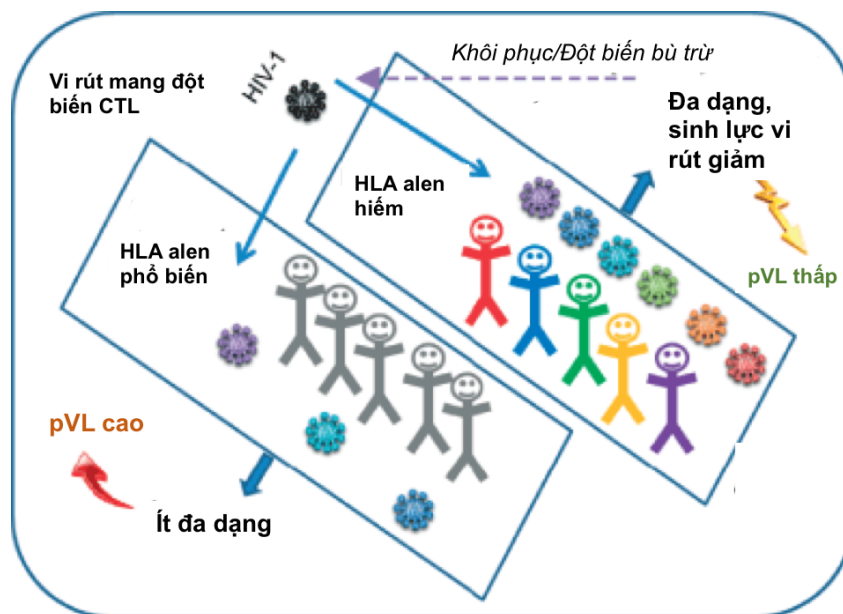
Bảng 1. 5. Một số đột biến trốn thoát CTL của vi rút HIV-1 phân típ CRF01_AE

Protein	Epitope	Đột biến trốn thoát CTL	HLA liên kết	Quần thể
Gag	LL11	M31L, L34I	A*02:06	Nhật Bản [212]
Gag	RV8	L46V	B*40:02	
Gag	TW10	T242N	B*57	Anh [25]
Gag	NY10	N252S, D260E	B*35:01, B*35:05	Thái Lan [153]
Gag	KK10	I266M, R264K	B*27	Thái Lan [46]
Gag	KK10	L268M/I/V, N271H	B*27	Anh [25]
Gag	RI8	V280T	B*52:01	Nhật Bản [212]
Gag	YI9	V280T/I/A S278K/R/C	C*01:02	Thái Lan [29]
Gag	YI9	V280T	C*01:02	Việt Nam [207]
Gag	YI9	V280T	C*01:02	Nhật Bản [212]
Pol	NY9	Y336I/V/C	B*35:01	Nhật Bản [113]
Pol	FR9	S602N	A*33:03	Nhật Bản [212]
Pol	GI8	I916V	B*40:02	
Vpr	VL9	L39I	B*27	Anh [25]
Nef	GL9	F85L, F89H	A*02:06	Nhật Bản [212]

Đột biến trốn thoát CTL cũng đã được ghi nhận ở phân típ CRF01_AE, chủ yếu ở quần thể Thái Lan và Nhật Bản (bảng 1.5). Trong đó, đột biến Gag 280 biến đổi từ axit amin (V) thành (T) trên epitope YI9 hạn chế bởi C*01:02 là đột biến trốn thoát CTL duy nhất ở Việt Nam được ghi nhận đến nay [207].

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 (viral fitness) như khả năng nhân lên, khả năng lây nhiễm [55, 211, 220]. Sinh lực của các biến thể mang đột biến trốn thoát miễn dịch sẽ bị ảnh hưởng ở các mức độ khác nhau và có thể được hồi phục bằng các đột biến bù trừ (compensatory mutation) xuất hiện thêm [211]. 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.



Hình 1. 15. Thích ứng của biến thể mang đột biến trốn thoát CTL theo HLA [99]

Các cá thể mang alen HLA phổ biến (bên trái) thường hạn chế vi rút phát sinh biến thể, dẫn đến tải lượng vi rút cao hơn. Mặt khác, ở những người mang alen HLA lớp I hiếm gặp (bên phải) vi rút phát sinh biến thể đa dạng hơn, mặc dù mức độ phù hợp thấp. Khi đó sinh lực của vi rút suy giảm dẫn đến tải lượng thấp, gợi ý rằng các alen HLA hiếm mang lại lợi thế chọn lọc chống lại vi rút.

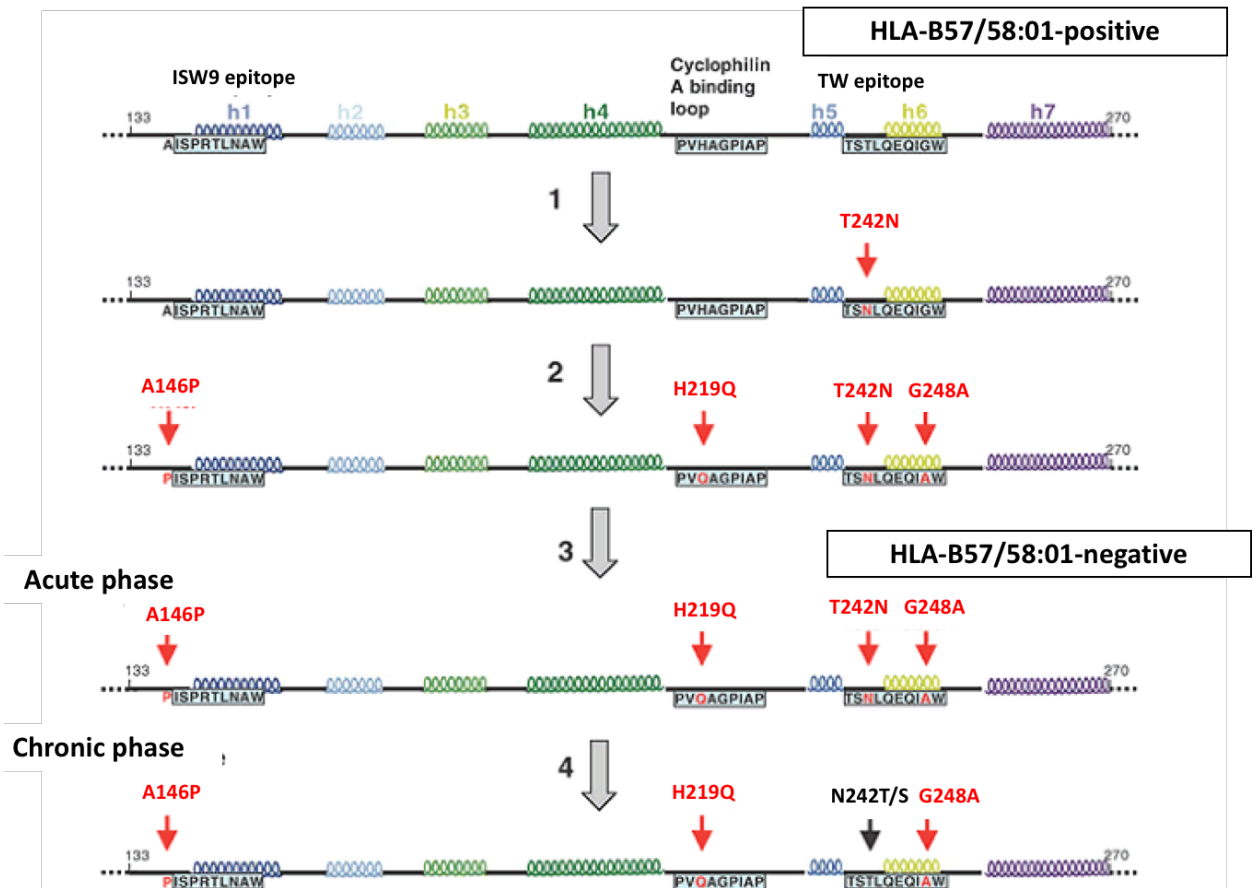
Vi rút mang đột biến trốn thoát CTL có khả năng thích nghi với alen HLA theo thời gian, đặc biệt là các alen liên kết với đột biến lưu hành trong quần thể với tần suất cao. Ví dụ, tần số của đột biến I135X [RT128-135] tương quan với sự hiện diện của HLA-B*51 rất phổ biến ở người Nhật Bản (~20%) và phần lớn vi rút (>50%) trong quần thể này đã dần thích nghi với đột biến I135X [100].

Khả năng bảo vệ mạnh mẽ của các alen HLA khác như B*27, B*57 có thể thực sự suy giảm theo thời gian. Trong một nghiên cứu năm 2009, các tác giả đã giải thích rằng áp lực miễn dịch quần thể từ alen HLA phổ biến và HIV sẽ phát sinh biến thể ở những cá thể mang HLA này, dần dần đạt đến điểm tiến hoá có lợi cho vi rút (hình 1.15). Trong khi các alen HLA hiếm thúc đẩy tiến hóa nhưng theo hướng bất lợi cho vi rút, đặc biệt liên quan đến các gen *env*, *nef* và *pol* của HIV-1 [99]. Cụ thể, khi vi rút mang đột biến trốn thoát CTL truyền cho vật chủ mang HLA hiếm, nó buộc phải tiến hoá thành nhiều dạng biến thể bổ sung mặc dù có độ nhạy thấp, khiến sinh lực của vi rút suy giảm. Các đột biến như vậy có xu hướng khôi phục về chủng hoang dã nhanh chóng và không có khả năng bảo vệ vi rút. Như vậy, trình tự epitope trong các biến thể khôi phục dưới sự xuất hiện của các alen HLA hiếm sẽ có lợi thế cao và có thể được tích hợp trong thiết kế vắc xin chống lại HIV-1.

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

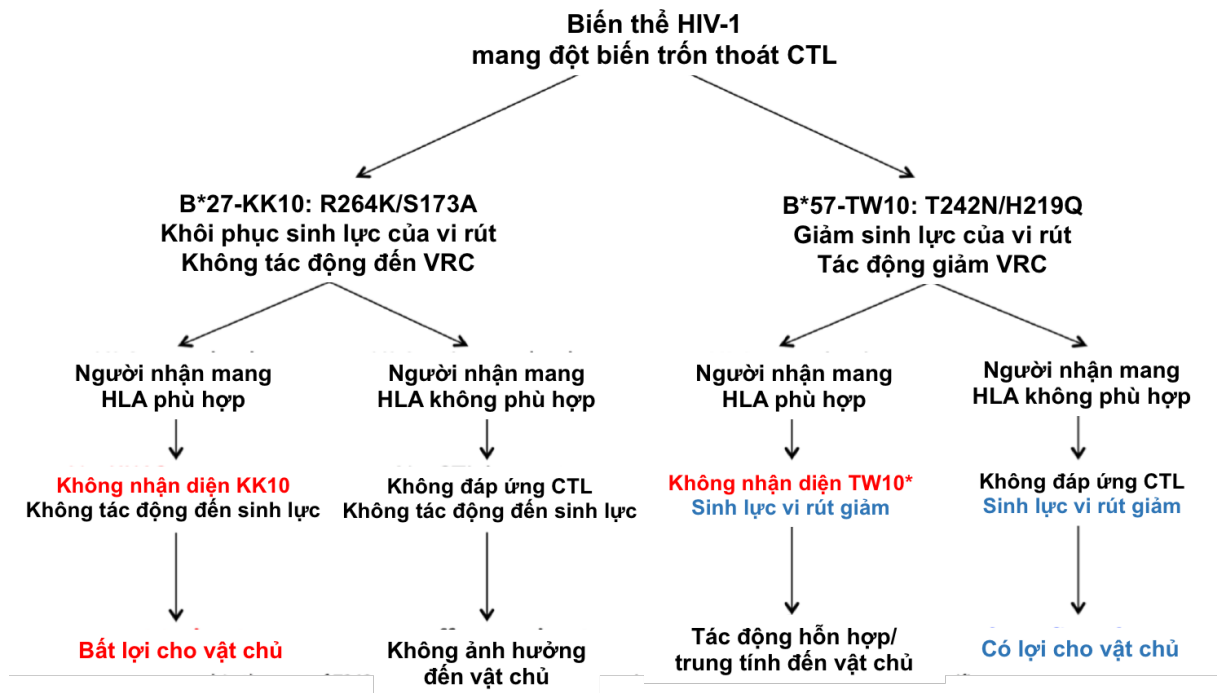
Khả năng lây nhiễm của biến thể mang đột biến trốn thoát miễn dịch phụ thuộc vào sự tương thích với kiểu gen/alen HLA của cá thể bị lây nhiễm. Biến thể mang đột biến trốn thoát CTL có sinh lực không bị suy giảm có thể duy trì đột biến này khi lây nhiễm vào cá thể mang kiểu gen HLA trùng khớp (phù hợp) hoặc sẽ khôi phục trở lại trình tự ban đầu khi cá thể nhiễm không có kiểu gen HLA kích hoạt CTL [77, 150, 173].

Một số nghiên cứu lây truyền từ mẹ sang con và các nghiên cứu cắt ngang ở người lớn đã chứng minh hầu hết các đột biến sẽ khôi phục khi được truyền cho con mang alen khác với mẹ [7, 33, 77, 201]. Sự khôi phục của Gag T242N sau khi được truyền cho cá thể khác không mang B*57 đã được quan sát thấy (hình 1.16) [121]. Sinh lực của vi rút mang đột biến này khác nhau giữa các cá thể, còn phụ thuộc vào thời điểm các đột biến bù trừ xuất hiện sau khi lây nhiễm [100, 127]. Ngoài ra, khi biến thể vi rút mang đột biến Gag R264K ở các bà mẹ mang B*27 truyền cho con mang alen giống mẹ, sự khôi phục đã không diễn ra và không ngăn chặn được sự nhân lên của vi rút [77].



Hình 1. 16. Đột biến Gag T242N khôi phục khi lây truyền vật chủ B*57/58:01 [121]

(1) Vi rút phát sinh đột biến T242N ở cá thể mang HLA-B*57/58:01. (2) Tích lũy các đột biến liên kết HLA-B*57/58:01. (3) Lây truyền biến thể vi rút mang đột biến liên kết với B*57/58:01 sang cá thể không mang B*57/58:01. (4) Đột biến T242N khôi phục, trong khi các đột biến liên kết khác ổn định.



Hình 1. 17. Thay đổi sinh lực của biến thể vi rút mang đột biến trốn thoát CTL theo HLA [108]

Hai ví dụ để minh họa sự khác biệt trong lây truyền biến thể vi rút. Bên trái: lây truyền biến thể vi rút mang đột biến trốn thoát R264K trong đó vi rút được khôi phục sinh lực bằng đột biến bù S173A. Bên phải: lây truyền biến thể vi rút mang đột biến trốn thoát T242N với đột biến bù H219Q không khôi phục hoàn toàn sinh lực của vi rút. (*) Trường hợp T242N, biến thể cũng có khả năng sinh miễn dịch và tạo phản ứng miễn dịch đặc hiệu.

Quá trình lây truyền biến thể vi rút mang đột biến trốn thoát CTL sẽ khác đi nếu vi rút có sinh lực kém được truyền vào vật chủ mới, tải lượng vi rút khi đó cũng có thể thấp hơn và có thể liên quan đến sự tiến triển của bệnh chậm hơn. Điều này có thể giảm xác suất lây truyền và tăng khả năng kiểm soát HIV-1 lâu dài ở vật chủ mới [39, 74]. Hình 1.17 minh họa tác động đến vật chủ khi quá trình lây truyền biến thể phụ thuộc vào sinh lực của vi rút [108]. Vi rút mang R264K được khôi phục hoàn toàn VRC bằng đột biến S173A, nhưng đột biến H219Q chỉ khôi phục phần lớn khả năng này ở vi rút mang đột biến T242N [186]. Điều này dẫn đến mức độ ảnh hưởng đối với vật chủ 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 trước tại các vị trí đột biến của vi rút HIV-1 liên kết với HLA. Điển hình như đột biến T242N liên kết với B*57 được xác định là đột biến trốn thoát CTL, được dự đoán xuất hiện vài tuần sau khi lây nhiễm [58, 121, 227]. Hay Gag R264K liên kết với B*27 có thể mất nhiều năm để phát sinh mặc dù áp lực miễn dịch liên tục ở những người mang B*27 [69, 102]. Ngoài ra, T242N và R264K đều được dự đoán có sự xuất hiện bổ sung của các đột biến bù, ảnh hưởng đến tác động của chúng trong đáp ứng CTL [26, 102, 187].

Cơ sở dữ liệu đột biến gen vi rút HIV-1 phân típ B liên kết với HLA ban đầu được xây dựng từ trình tự của 1.888 bệnh nhân nhiễm HIV, chưa điều trị ARV [31]. Một tập hợp dữ liệu tương tự cũng đã được xây dựng cho HIV-1 phân típ C [176]. Nhiều nghiên cứu trong nhiều năm đã liên tục bổ sung dữ liệu trên phân típ B và C phong phú, hoàn thiện trên toàn bộ bộ gen vi rút. Hiện nay dữ liệu đột biến liên kết công bố trên Los Alamos (<https://www.hiv.lanl.gov/>) là đầy đủ nhất. Đột biến đặc hiệu cho phân típ B, được coi là cơ sở tham chiếu cho các phân típ khác.

Bảng 1. 6. Đột biến gen vi rút HIV-1 liên kết HLA trên quần thể nhiễm HIV tại Việt Nam

Địa điểm, cỡ mẫu	Thời gian thu thập mẫu	Protein vi rút	Đột biến liên kết
Mekong (n=125) [117]	Tháng 6- 10/2008	Gag, PR, RT	46 đột biến liên kết (6 Gag, 14 PR, 26 RT)
Hà Nội (n=388) [207]	2012-2014	Pol, Gag, Nef	303 đột biến liên kết (79 Gag, 114 Pol, 110 Nef)
Hà Nội (n=179) [198]	2012-2013	Gag, Nef	19 đột biến liên kết (10 Gag, 9 Nef)

Tại Việt Nam, các nghiên cứu liên kết giữa đột biến gen vi rút và HLA còn hạn chế, tổng hợp với 3 công bố cho đến nay (bảng 1.6) [117, 198, 207]. Nghiên cứu ban đầu được thực hiện tại khu vực sông Mê Kông. Gần đây, một nhóm nghiên cứu khác đã khảo sát trên một nhóm bệnh nhân nhiễm HIV tại Hà Nội, dữ liệu đột biến gen liên kết với HLA lớp I bước đầu được xây dựng trên các gen chức năng chính như Gag, Pol và

Nef. Trên cơ sở đó cũng đã xác định đột biến Gag V280T liên kết với C*01:02 là đột biến trốn thoát CTL [207].

Phần lớn nghiên cứu trong lĩnh vực này tập trung vào các protein cấu trúc Gag của HIV-1. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu trên toàn bộ bộ gen của HIV-1 phân tích khác nhau đã quan sát thấy một số protein phụ như Nef, Vif có tỷ lệ axit amin liên kết với HLA cao hơn so với Gag [182]. Một số nghiên cứu cũng ghi nhận các đột biến ở Vpr và Gag có liên quan đến sinh lực vi rút cao hơn. Do đó, cần mở rộng cơ sở dữ liệu đột biến liên kết không chỉ trên protein cấu trúc mà còn trên cả các protein phụ và điều hoà.

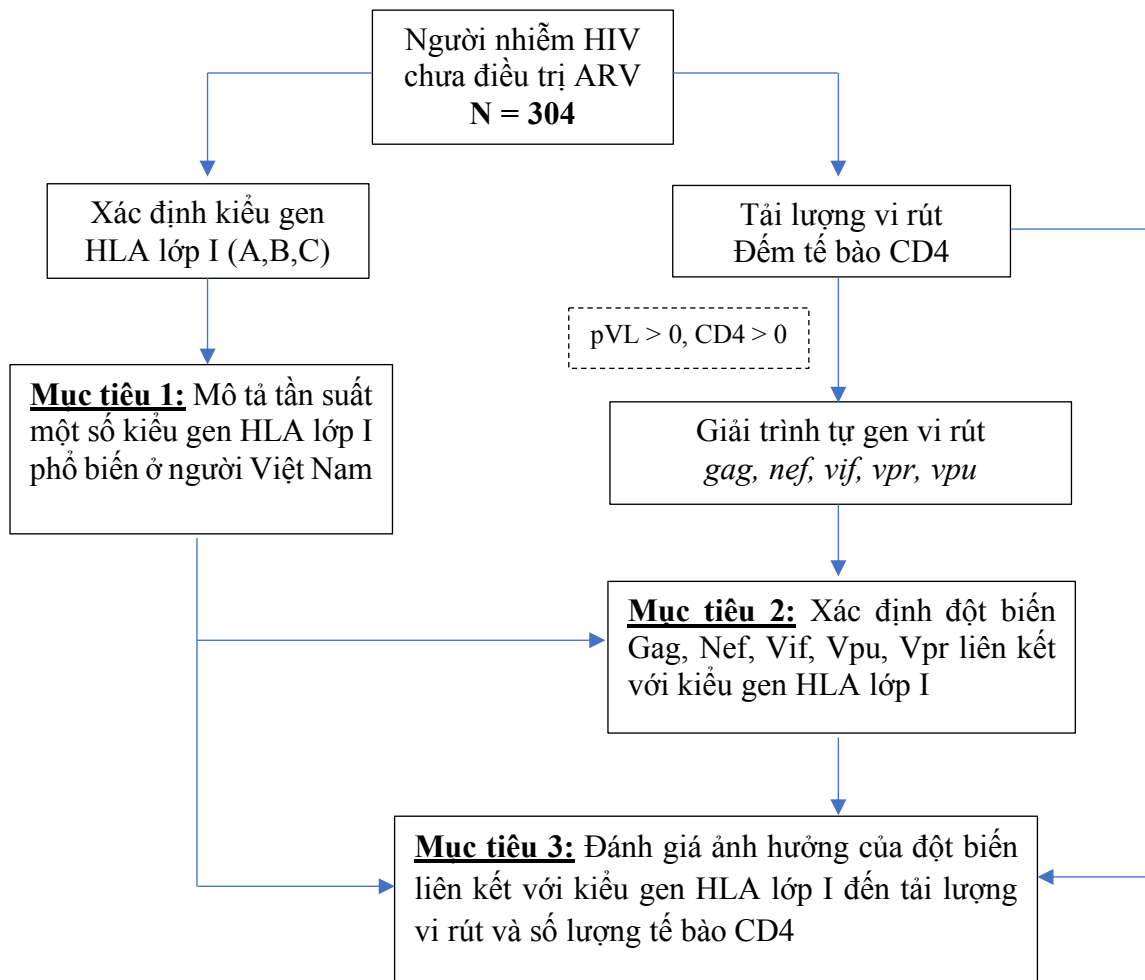
Cơ sở dữ liệu đột biến liên kết với HLA cung cấp (1) thông tin trình tự HIV-1 ở các vùng được bảo tồn nhằm tập trung phản ứng CTL, (2) các biến thể trốn thoát phổ biến với mục tiêu tạo ra phản ứng miễn dịch chống lại các chủng lây nhiễm đa dạng nhất có thể và (3) dữ liệu đáp ứng miễn dịch của các epitope hoặc vùng lân cận. Hiện nay đã có vắc xin tHIVconsvX sử dụng thông tin dữ liệu này làm nền tảng thiết kế, cho kết quả thử nghiệm khả quan và đang được đưa vào thử nghiệm lâm sàng [169].

Vẫn còn những khoảng trống kiến thức về các epitope hoặc vùng protein nào của HIV có tính sinh miễn dịch, các đột biến trốn thoát và alen HLA nào làm trung gian cho các đáp ứng miễn dịch chính tại các khu vực/quần thể và các phân tích HIV khác nhau. Thông tin này là rất cần thiết nếu muốn đạt được các phản ứng kháng vi rút hiện quả từ vắc xin phổ rộng. Các nghiên cứu về sự thích nghi của HIV với HLA có thể bổ sung phần kiến thức này. Đặc biệt, kết hợp dữ liệu thực nghiệm và phân tích tin sinh học bằng các mô hình thích ứng dựa trên kiểu gen HLA và phân tích HIV, có thể cung cấp thông tin cho việc lựa chọn chất tạo miễn dịch CTL theo HIV phổ biến hoặc theo vùng địa lý [17, 38, 106]. Sự đa dạng của kiểu gen HLA đánh dấu các vị trí gen vi rút chịu áp lực miễn dịch mạnh mẽ. Việc xác định các vị trí này có thể tiết lộ các vùng gen vi rút sinh miễn dịch mới, bao gồm cả các epitope được trình diện bởi các alen chưa được nghiên cứu. Sự thích nghi của HIV với HLA vẫn là một thách thức lớn đối với việc ngăn ngừa và loại trừ HIV, do đó các nghiên cứu của nó vẫn tiếp tục phù hợp và mang lại những hiểu biết mới.

CHƯƠNG II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thiết kế nghiên cứu

Đề tài nghiên cứu sinh thuộc giai đoạn 2 của hợp tác nghiên cứu giữa Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương và Viện Quốc gia các bệnh truyền nhiễm Nhật Bản. Nghiên cứu thực hiện theo phương pháp mô tả kết hợp phân tích, thực nghiệm, thiết kế nghiên cứu tương ứng với 3 mục tiêu đề ra, được trình bày theo sơ đồ hình 2.1.

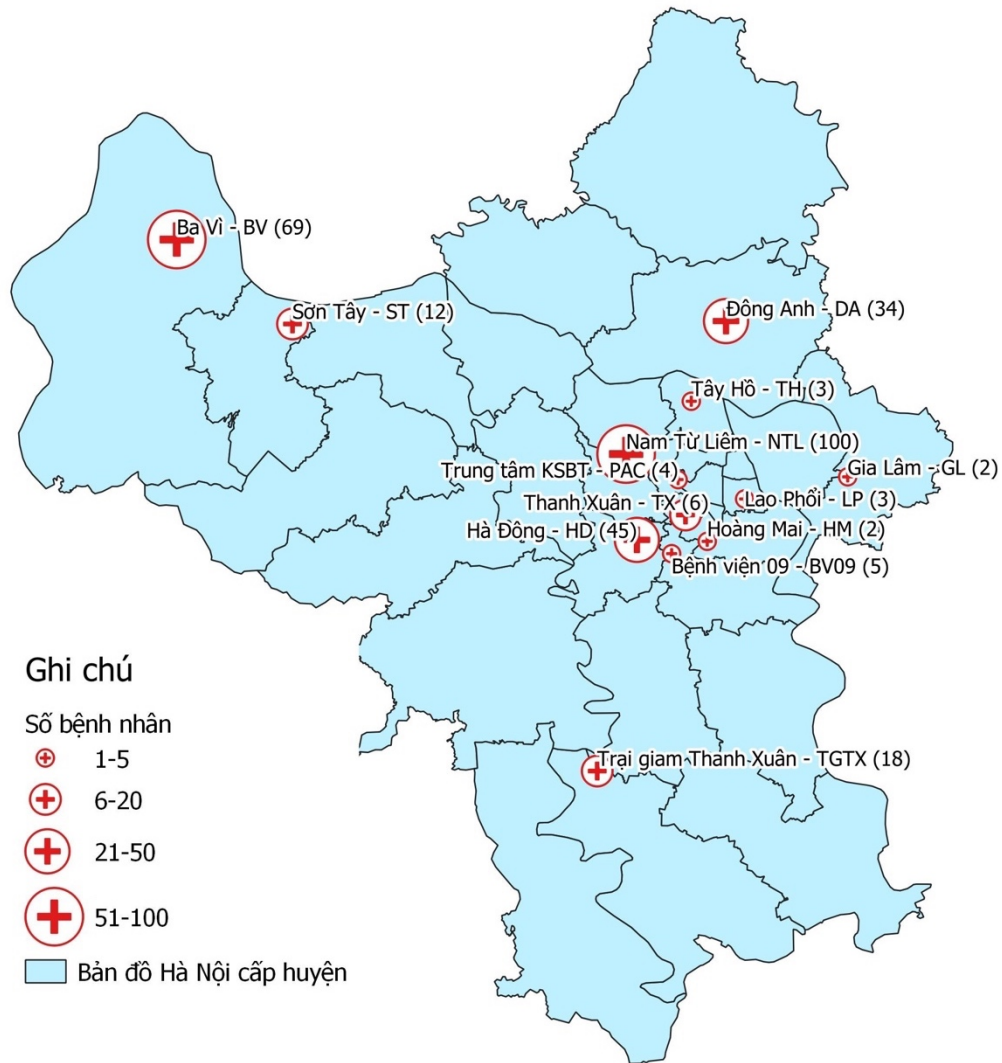


Hình 2. 1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

2.2. Địa điểm, thời gian nghiên cứu

Mẫu bệnh nhân đã được thu thập trong giai đoạn từ 2014 – 2016 tại các phòng khám ngoại trú (PKNT) ARV trên địa bàn Hà Nội, sau đó được xử lý và lưu giữ ở điều kiện thích hợp tại phòng thí nghiệm (PTN) Sinh học phân tử (nay là PTN Công nghệ

sinh học tiên tiến), Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, cho đến khi thực hiện nghiên cứu. Phân tích được thực hiện từ năm 2018 – 2023, tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Vị trí các điểm thu mẫu được mô tả theo hình 2.2.



Hình 2. 2. Địa điểm thu thập mẫu nghiên cứu

Bản đồ đánh dấu vị trí các điểm (phòng khám ngoại trú) thu thập mẫu, ký hiệu (+). Số lượng mẫu thu thập tỷ lệ với kích thước ký hiệu (+) và chú thích số lượng cụ thể bên cạnh tên mỗi điểm thu mẫu.

2.3. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành trên bệnh nhân người lớn nhiễm HIV. Bệnh nhân được lựa chọn vào nghiên cứu đáp ứng các tiêu chuẩn sau: (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 hoặc dự phòng phơi nhiễm.

2.4. Cỡ mẫu nghiên cứu và cách chọn mẫu

Cỡ mẫu đã được xác định ban đầu trong hợp tác nghiên cứu là 310 mẫu, áp dụng phương pháp chọn mẫu liên tục cho đến khi đạt được cỡ mẫu. Cơ sở xác định cỡ mẫu dựa trên tham khảo các công bố có đặc điểm lưu hành vi rút HIV-1 phân típ CRF01_AE tương tự với Việt Nam (như Nhật Bản, Thái Lan). 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. Đề tài nghiên cứu sinh sử dụng tối đa số mẫu đã thu thập để thực hiện xét nghiệm và phân tích số liệu.

Mẫu bệnh phẩm được lưu giữ có đầy đủ phiếu thu thập thông tin bệnh nhân, đã được xét nghiệm tải lượng vi rút và tế bào CD4. Số lượng mẫu theo các địa điểm thu thập như sau:

Bảng 2. 1. Số mẫu đã thu thập theo địa điểm nghiên cứu

STT	Địa điểm thu mẫu	Ký hiệu	Số mẫu
1.	Bệnh viện Hà Đông	HD	45
2.	Bệnh viện 09	BV09	05
3.	Bệnh viện lao phổi	LP	03
4.	PKNT Ba Vì	BV	69
5.	PKNT Đông Anh	DA	35
6.	PKNT Nam Từ Liêm	NTL	100
7.	PKNT Tây Hồ	TH	03
8.	PKNT Thanh Xuân	TX	06
9.	PKNT trại giam Thanh Xuân	TGTX	18
10.	PKNT Gia Lâm	GL	02
11.	PKNT Hoàng Mai	HM	02
12.	PKNT Sơn Tây	ST	12
13.	Trung tâm phòng chống HIV/AIDS Hà Nội	PAC	04
	Tổng		304

2.5. Biến số nghiên cứu

Các biến số trong nghiên cứu được xác định tương ứng với mục tiêu và theo cách thu thập dữ liệu. Nhóm biến số dựa trên phiếu điều tra gồm tuổi, giới tính, dân tộc. Các biến số dựa trên kết quả xét nghiệm gồm số lượng tế bào CD4, tải lượng vi rút, xét nghiệm kiểu gen HLA và giải trình tự gen vi rút.

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

	Biến số	Chỉ số
Mô tả đặc điểm quần thể nghiên cứu	Tuổi	Tuổi trung bình Tuổi trung vị
	Giới tính	Định tính giới Số lượng nam và nữ
	Dân tộc	Số lượng Tỷ lệ các dân tộc
	Số lượng tế bào CD4	tế bào/ μ L Chỉ số trung bình Chỉ số trung vị
	Tải lượng vi rút trong huyết tương	Copies/ml Trung bình Trung vị
Mục tiêu 1	- Mô tả kiểu gen HLA alen, haplotype - Tương quan kiểu gen HLA alen và pVL, CD4	Kiểu gen alen Tần suất alen (AF - allele frequency) Tần suất người mang (CF - carrier frequency) Giá trị p (Welch's t test)
Mục tiêu 2	- Mô tả trình tự gen vi rút HIV-1 - Mô tả đột biến liên kết với HLA alen	% 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)

Một số chỉ số di truyền thống kê được áp dụng tính toán như sau:

$$AF = \frac{\text{Số bản sao alen}}{\text{Tổng số alen (2n)}}$$

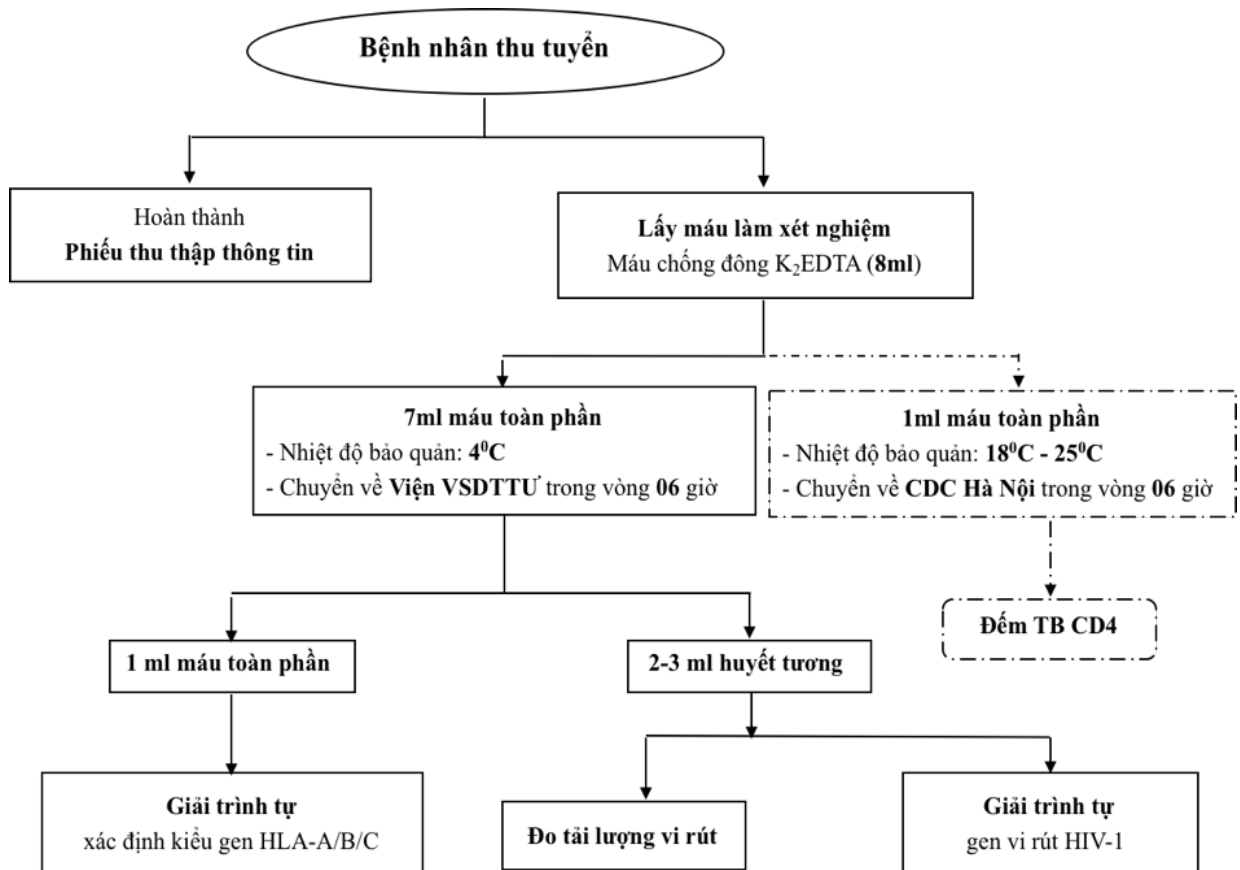
$$\%CF = \frac{\text{Số bệnh nhân mang alen}}{\text{Tổng số bệnh nhân}} \%$$

2.6. Phương pháp và công cụ thu thập thông tin

Thông tin cá nhân của bệnh nhân, tình trạng sức khỏe và chẩn đoán nhiễm HIV được thu thập bằng hình thức phỏng vấn và tra cứu theo bệnh án tại cơ sở. Phiếu thu thập thông tin được thiết kế thuận tiện cho việc phỏng vấn và tra cứu bệnh án. Các thông tin trong mẫu phiếu sử dụng cho đề tài gồm: họ tên bệnh nhân, giới tính, năm sinh, dân tộc.

2.7. Kỹ thuật lấy mẫu

Mỗi bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu được ban hành mã nghiên cứu duy nhất và thu thập 7-8ml mẫu máu toàn phần đựng trong ống có chống đông EDTA. Mẫu bệnh phẩm được xử lý theo sơ đồ hình 2.3.



Hình 2. 3. Sơ đồ xử lý mẫu bệnh phẩm

Mẫu máu thu thập được chia vào các ống cryogenic như sau:

- 01 ống đựng 1ml máu toàn phần, bảo quản ở nhiệt độ thường, thực hiện đếm tế

bào CD4 trong vòng 24 giờ

- 01 ống đựng 1ml máu toàn phần để thực hiện xét nghiệm kiểu gen HLA
- Lượng máu toàn phần còn lại (4-5 ml) bảo quản mát, xử lý tách huyết tương trong vòng 6 giờ sau khi lấy. Huyết tương thu được chia vào 2-3 ống (2-3ml), trong đó 01 ống huyết tương (1ml) cố định, sử dụng để thực hiện xét nghiệm tải lượng vi rút ngay sau khi thu thập; các ống huyết tương còn lại sử dụng cho các xét nghiệm sinh học phân tử khác.

Mẫu huyết tương và máu toàn phần lưu trữ ở -80°C tại PTN Công nghệ sinh học tiên tiến, Trung tâm nghiên cứu Y sinh học, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Phòng thí nghiệm đạt điều kiện bảo quản tốt, hệ thống tủ lưu hoạt động liên tục, hệ thống quản lý theo tiêu chuẩn ISO 15189:2012

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 dựa trên kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy (flow cytometry) trên máy FacsCount, được thực hiện tại Trung tâm phòng chống HIV/AIDS Hà Nội.

Kỹ thuật đo tải lượng vi rút thực hiện trên hệ thống máy Abbott Realtime. Nguyên lý cơ bản của phương pháp sử dụng phản ứng Realtime RT-PCR tạo ra các sản phẩm khuếch đại từ bộ gen của HIV-1 có trong mẫu bệnh phẩm. Lượng sản phẩm của gen HIV-1 đích tạo ra sau mỗi chu kỳ khuếch đại được xác định bởi đoạn Oligonucleotide đánh dấu huỳnh quang bám đặc hiệu. Chu kỳ khuếch đại mà tại đó tín hiệu huỳnh quang được phát hiện thấy bởi máy Realtime Abbott m2000rt tỷ lệ nghịch với nồng độ RNA HIV-1 có trong mẫu ban đầu. Phương pháp được hiệu chuẩn theo mẫu chuẩn tham chiếu của Tổ chức y tế thế giới cho RNA HIV-1 (mã 97/658). Ngưỡng phát hiện của phương pháp là 150 Copies/ml. Đo tải lượng vi rút được thực hiện tại PTN Công nghệ sinh học tiên tiến, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.

2.8.2. Giải trình tự gen vi rút HIV-1

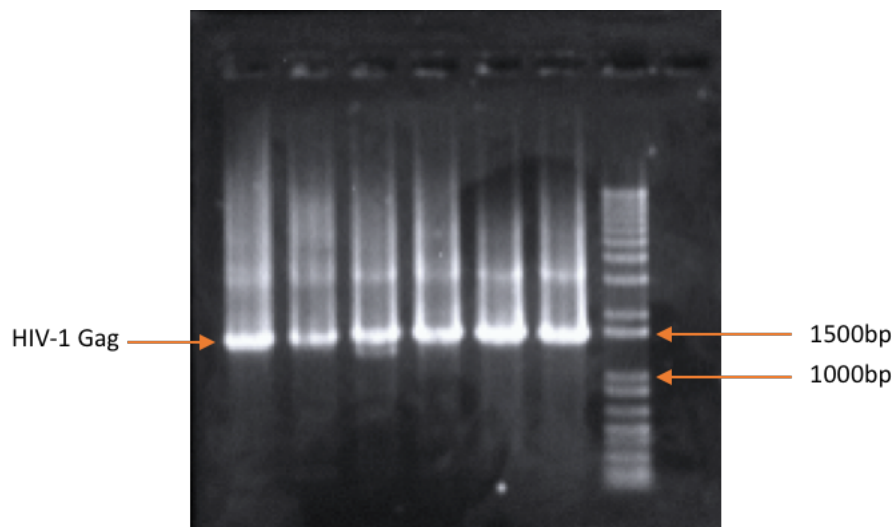
Giải trình tự gen *gag* được thực hiện tại PTN Công nghệ sinh học tiên tiến, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Giải trình tự gen *nef*, *vif/vpr/vpu* được thực hiện tại Viện quốc gia các bệnh truyền nhiễm Nhật Bản. Quy trình xét nghiệm áp dụng có chỉnh sửa, theo công bố của cùng nhóm tác giả năm 2019 [198].

RNA vi rút được tách chiết từ mẫu huyết tương, sử dụng kit sinh phẩm QIAamp viral RNA mini kit (QIAGEN) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Từ RNA của vi rút thực hiện phản ứng phiên mã ngược tạo cDNA và nhân bản các vùng gen (RT-PCR) Gag, Nef, Vif/Vpr/Vpu đặc hiệu, với độ dài tương ứng 1,5kb, 700bp, 1,3kp. Phản ứng nested PCR được thực hiện sau đó để tăng độ đặc hiệu của các vùng gen được khuếch đại. Trình tự mỗi sử dụng được liệt kê trong bảng 2.3.

Bảng 2. 3. Trình tự mỗi sử dụng cho giải trình tự gen HIV-1

Tên mỗi	Vị trí (theo HXB2)	Trình tự
Gag-PCR-F1	738-757	CGACTGGTGAGTACGCCAAA
Gag-PCR-F2	764-783	GACTAGCGGAGGCTAGAAGG
Gag-PCR-R1	2385-2362	TGCTCCTGTTACTAATAGAGCTTC
Gag-PCR-R2	2365-2344	AGAGCTTCTTTCAGCTGTCCTC
Gag-SEQ-F1	1181-1201	CAGCAGCAAAGTCAGCCAAA
Gag-SEQ-F2	1694-1713	CTCTCAGAGCRGAACAAGC
Gag-SEQ-R1	1756-1737	AGCAAGGTTTCTGTCATCCA
Gag-SEQ-R2	1318-1299	GGCTCCCTCTGATAATGCTG
AE-VVVa	4783-4807	TTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGG
AE-VVVb	6976-6954	ATTCCATGTGTGCATTGTACTGA
AE-VVVc	4985-5017	AGACAATAGTGATATAAAAAGTAGTACCAAGAAG
AE-VVVd	6346-6324	CCATAATAGACTGTAACCCACAA
AE-Nef OF	8688-8714	GTAGCGGGGTGGACAGATAGGGTTAT
AE-Nef OR	9629-9603	GCACTCAAGGCCAAGCTTTATTGAGGC
AE-Nef IF	8749-8772	ACATACCTASAAGAATCAGACAGG
AE-Nef IR	9450-9427	GTCCCAGCGGAAAGTCCTATTA

Dựa vào độ sáng của băng điện di gen *gag* (trương ứng với băng 1.500bp của thang chuẩn) để xác định tỷ lệ pha loãng DNA cho phản ứng cycle sequencing (hình 2.4). Sản phẩm cycle sequencing được tinh sạch bằng phương pháp rửa với EDTA, sodium acetate và ethanol 100%, biến tính trong Hidi (Thermo Fisher) trước khi điện di mao quản trên hệ thống máy giải trình tự ABI 3130/3500.



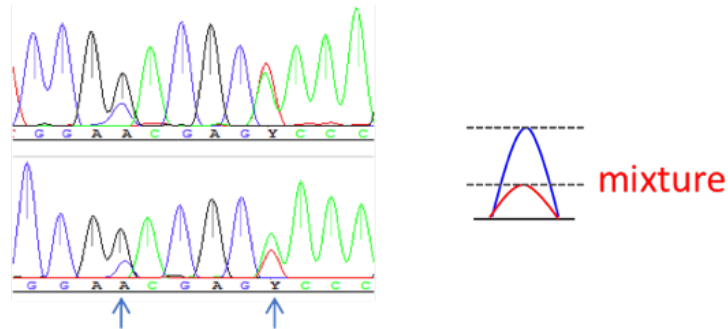
Hình 2. 4. Điện di sản phẩm nested PCR khuếch đại gen *gag* vi rút HIV-1

Sản phẩm nested PCR khuếch đại gen gag điện di trên gel 1% agarose thang chuẩn 1kb DNA ladder. Kích thước đoạn gen gag ~1,5kb

Phân tích trình tự gen vi rút nhằm biên soạn trình tự thu được, ghép nối tạo trình tự contig của mẫu đó, sử dụng phần mềm DNA Star Lasergene – Seqman. Seqman cho phép hiển thị trình tự dạng sóng với 4 loại nucleotide A, T, G, C phân biệt bởi màu sắc khác nhau. Một vị trí nucleotide được xác định là mix base (hay nucleotide hỗn hợp) khi xuất hiện tín hiệu sóng trình tự thứ 2 (hoặc 3) có chiều cao bằng 30% so với chiều cao sóng trình tự chính (hình 2.5).

Trình tự ghép nối (contig) của một mẫu lưu định dạng fas/fast. Toàn bộ trình tự ghép nối (theo gen) sắp hàng và căn chỉnh với trình tự tham chiếu HIV-1 phân típ B sử dụng phần mềm MEGA v10. Áp dụng quy tắc mã bộ ba, trình tự axit amin được xác

định dựa trên trình tự nucleotide. Khi quan sát thấy > 2 nucleotide hỗn hợp trong một codon, trình tự axit amin được ký hiệu X.



	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Consensus	H	Q	R	I	E	I	K	D	T	K	E	A
MS1-14M0897	H	Q	R	I	E	V	K	D	T	K	E	A
MS1-14M0899	H	X	R	I	E	I	K	D	T	K	E	A
MS1-14M0900	H	Q	G	I	R	V	N	D	T	K	E	A
MS1-14M0902	H	Q	X	X	E/G	I/V	K	D	T	K	E	A
MS1-14M0903	H	Q	K	I	E	V	K	N	T	R	E	A
MS1-14M0904	H	Q	R	I	E	V	K	D	T	K	E	A
MS1-14M0905	H	Q	R	I	E	V	K	D	T	K	E	A
MS1-14M0907	H	Q	R	I	E	V	K	D	T	K	E	A

GRA = E/G AAR = K

Hình 2. 5. Xác định nucleotide hỗn hợp (mixture) và trình tự axit amin

Các axit amin tạo thành từ nucleotide hỗn hợp được bôi màu. Nucleotide hỗn hợp nằm ở vị trí thứ 3 trong bộ 3 codon thường phiên giải cùng một loại axit amin (màu cam), hai axit amin (màu xanh) và hỗn hợp >3 axit amin (màu vàng, ký hiệu X)

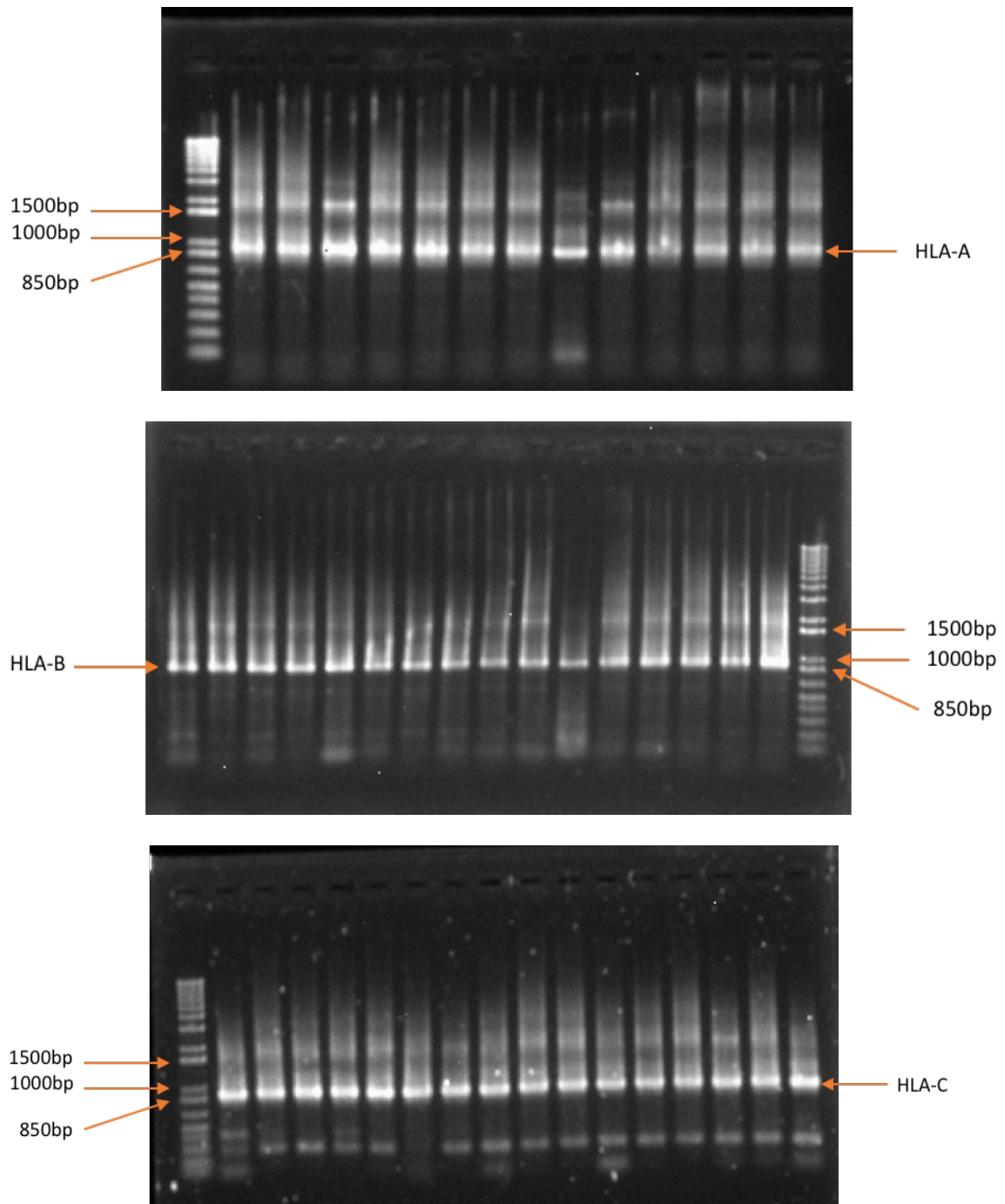
2.8.3. Xác định kiểu gen/alen HLA lớp I

Kiểu gen HLA lớp I được xác định bằng phương pháp giải trình tự (SBT - sequence based typing), thực hiện tại Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học tiên tiến, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, tham khảo có chỉnh sửa từ nghiên cứu đã công bố [43].

DNA tổng số được tách chiết từ mẫu máu toàn phần, sử dụng kit sinh phẩm QIAamp DNA mini kit (QIAGEN) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Bộ mồi đặc hiệu khuếch đại vùng gen locus A, B và C trên exon 2 và 3 bằng phản ứng PCR. Chi tiết trình tự mồi theo bảng 2.4. Phản ứng PCR khuếch đại gen HLA-A/B/C sử dụng bộ kit Expand™ High Fidelity (Roche, 11732650001). Phản ứng nested PCR sau đó sử dụng sản phẩm PCR vòng 1 làm khuôn. Sản phẩm sau nested PCR được kiểm tra điện di trên gel agrose 1% (Invitrogen), thang chuẩn 1kb DNA ladder (Thermo Fisher), tỷ lệ pha mỗi giếng là 1µl 6X Loading Dye : 5µl khuôn mẫu. Dựa vào độ sáng của băng điện di xác định tỷ lệ pha loãng mẫu (1:5) để sử dụng cho phản ứng cycle sequencing (hình 2.6). Mỗi locus A/B/C sử dụng 6 mồi giải trình tự, điện di mao quản trên hệ thống máy giải trình tự ABI 3130/3500.

Bảng 2. 4. Trình tự mỗi xác định kiểu gen HLA

HLA	Vị trí	Tên mỗi	Trình tự
A	109-134	A_PCR_F1	5'- GAAACSGCCTCTGYGGGGAGAAGCAA - 3'
	1070-1093	A_PCR_R1	5'- TGTTGGTCCCAATTGTCTCCCCTC - 3'
	168-188	A_PCR_F2	5'- AGCCGCGCCKGGASGAGGGTC - 3'
	1046-1067	A_PCR_R2	5'- TGTGGGAGGCCAGCCCCGGGAGA - 3'
	525-545	A_SEQ_R1	5'- GGCCCGTCCGTGGGGGATGAG - 3'
	295-315	A_SEQ_F1	5'- CTACGTGGACGACACGCAGTT - 3'
	555-574	A_SEQ_F2	5'- ACAGTCTCCGGGTCCGAGAT - 3'
	638-661	A_SEQ_R2	5'- TTTGGCCTMAACYSAAAATGAAAC - 3'
	964-985	A_SEQ_R3	5'- TTCCCGTTCTCCAGGTRTCTGC - 3'
B	409-430	B_PCR_F1	5'- GGGAGGAGMRAGGGGACCSCAG - 3'
	1329-1351	B_PCR_R1	5'- GGAGGCCATCCCCGGCGACCTAT - 3'
	427-446	B_PCR_F2	5'- GCAGGCGGGGGCGCAGGACC - 3'
	1305-1327	B_PCR_R2	5'- GGAGATGGGGAAGGCTCCCCACT - 3'
	450-472	B_SEQ_F1	5'- GGAGCCGCGCCGGGAGGAGGGTC - 3'
	797-815	B_SEQ_R1	5'- GGATGGGGAGTCGTGACCT - 3'
	990-1007	B_SEQ_F2	5'- ACKGKGCTGACCGCGGGG - 3'
	766-785	B_SEQ_R2	5'- CGGGGTCACTCACCGKCCTC - 3'
	1006-1025	B_SEQ_F3	5'- GGSCKGGGCCAGGGTCTCAC - 3'
	1288-1307	B_SEQ_R3	5'- ACTGCCCTGGTACCMGCGC - 3'
C	398-418	C_PCR_F1	5'- ARCGAGGKGCCCKCCCCGGCGA - 3'
	1290-1312	C_PCR_R1	5'- GGAGATRGGGAAGGCTCCCCACT - 3'
	434-456	C_PCR_F2	5'- GGAGCCGCGCAGGGAGGWGGGTC - 3'
	1279-1300	C_PCR_R2	5'- GGCTCCCCACTGCCCCYTGGTAC - 3'
	460-478	C_SEQ_F1	5'- CGGGTCTCAGCCMCTCCTC - 3'
	828-848	C_SEQ_R1	5'- TGGATCTCAGACSGGGAGACT - 3'
	978-995	C_SEQ_F2	5'- GGGCTGACCRCGGGGGCG - 3'
	994-1013	C_SEQ_F3	5'- CGGGGCCAGGKTCTCACAYC - 3'



Hình 2. 6. Điện di sản phẩm nested PCR khuếch đại đoạn gen HLA lớp I

Sản phẩm khuếch đại gen HLA-A, B và C điện di trên gel agarose 1%, thang chuẩn 1kb DNA ladder. Kích thước đoạn gen HLA-A 900bp, HLA-B 900bp và HLA-C 867bp.



Pos	Alt	Ex	MM	Genotypes
463	M (A)	3	2	48:01:01,48:29
467	S (G)	3	2	48:01:01,48:32
527	W (A)	3	2	48:01:01,48:15
572	K (T)	3	2	48:01:01,48:11
226	R (G)	2	3	48:01:01,48:36

Genotypes for 226:	
Shown:	1 allele in CWD list: B*48:01:01,48:36
Allele Freq.	0 alleles in CWD list: B*48:01:03,48:36
Filters:	B*48:01:05,48:36
	<input type="checkbox"/> CwD B*48:01:06,48:36
	<input type="checkbox"/> Quality B*48:09,48:36
	B*48:34,48:36
	B*48:36,-
Allele assignme	B*48:36,48:37

No match

Approve

Hình 2. 7. Xác định kiểu gen/alen HLA

Trình tự mỗi mẫu được đưa vào phần mềm SBTengine và tự động ghép nối theo exon 2 và 3. Các vị trí axit amin quan trọng được phần mềm đánh dấu và yêu cầu kiểm tra xác nhận. Kiểu gen HLA được hiển thị bên phải sau khi xác nhận toàn bộ trình tự mẫu.

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 [119]. Trình tự đọc dạng thô trên locus A, B và C theo từng mẫu được đăng tải trực tiếp lên phần mềm SBTengine. Phần mềm đọc tự động và yêu cầu rà soát dọc theo chiều dài trình tự, đánh dấu các vị trí nucleotide hỗn hợp hoặc các vị trí thay đổi axit amin theo cơ sở dữ liệu. Sau khi rà soát các vị trí được đánh dấu, SBTengine sẽ báo cáo kết quả kiểu gen HLA theo trình tự được xác nhận (hình 2.7).

2.8.4. Hoá chất, sinh phẩm và trang thiết bị

Các hoá chất, sinh phẩm và trang thiết bị sử dụng trong nghiên cứu đã được tối ưu cho quy trình xét nghiệm giải trình tự gen, thực hiện tại PTN Công nghệ sinh học tiên tiến, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Chi tiết theo quy trình xét nghiệm trong Phụ lục 4 - 6.

2.9. Quản lý và phân tích dữ liệu

Dữ liệu dịch tễ được nhập bằng EpiData 3.1. EpiData data cho phép kiểm tra nhiều giá trị và tính logic giữa câu trả lời và câu hỏi có liên quan. Thông tin bệnh nhân được nhập hai lần bởi hai cá nhân khác nhau, nhằm đảm bảo tính hoàn thiện và tính chính xác của thông tin. Dữ liệu trình tự gen vi rút và kiểu gen HLA được lưu giữ và quản lý bằng excel.

Các phân tích về liên kết của HLA trên trình tự HIV nhằm chứng minh mối liên quan thống kê giữa sự hiện diện của một biến thể của HIV và sự biểu hiện của HLA [32]. Cụ thể, các phân tích này xác định các biến thể axit amin HIV-1 từ những người cùng mang một alen HLA khác biệt so với những người không mang alen [31]. Trong các phân tích thống kê thông thường, sự khác biệt liên kết có thể được suy luận từ Fisher's exact test với ngưỡng giá trị $p < 0,05$, hay tỷ lệ dương tính giả đối với phép thử $< 5\%$.

Đối với dữ liệu lớn như trình tự gen, việc thực hiện nhiều phép thử có thể dẫn đến số lượng lớn kết quả dương tính giả. Một cách tiếp cận bổ sung dựa trên khái niệm về tỷ lệ phát hiện sai (FDR – false discovery rate) đã được phát triển bởi Storey and Tibshirani [195]. Tỷ lệ FDR được tối ưu hoá bằng cách sử dụng đặc điểm phân phối của giá trị p để tạo ra một danh sách giá trị q cho mỗi thử nghiệm. Trong các phân tích xác định liên kết

gen vi rút và HLA, ngưỡng ý nghĩa của giá trị q là 0,2 trên từng giá trị p thường được sử dụng [38]. Phân tích thống kê được thực hiện trên phần mềm Prims7.

Trình tự epitope đại diện cho bộ mẫu nghiên cứu và kiểu gen HLA liên kết được đăng tải lên cơ sở dữ liệu NetMHCpan 4.1 để đánh giá khả năng gắn của epitope và HLA lớp I, dựa trên chỉ số rank EL (Eluted ligands) [178]. Rank EL là tỷ lệ % peptide được trình diện từ các tế bào trình diện kháng nguyên APC. Ngưỡng giá trị % rank EL $< 0,5$ thể hiện sự ràng buộc mạnh mẽ giữa epitope và HLA (SB = strong binding), $0,5 < \% \text{ rank EL} < 2,0$ liên kết yếu (WB = weak binding) (hình 2.8).

```
# NetMHCpan version 4.1b
# Input made /var/www/webface/tmp/server/netmhcpan/625920B8000054B6027C889E/netMHCpanVpJTs
# Input is in FSA format
# Peptide length 8,9,10,11
# Make EL predictions
HLA-B*58:01 : Distance to training data 0.000 (using nearest neighbor HLA-B*58:01)
# Rank Threshold for Strong binding peptides 0.500
# Rank Threshold for Weak binding peptides 2.000
-----
Pos      MHC      Peptide      Core Of Gp Gl Ip Il      Icore      Identity      Score_EL      %Rank_EL      BindLevel
-----
1 HLA-B*58:01      LSPRTLNAW LSPRTLNAW      0 0 0 0 0      LSPRTLNAW      Sequence 0.8154100      0.161 <= SB
1 HLA-B*58:01      LSPRTLNA LS-PRTLNA      0 0 0 2 1      LSPRTLNA      Sequence 0.0004140      26.975
2 HLA-B*58:01      SPRTLNAW -SPRTLNAW      0 0 0 0 1      SPRTLNAW      Sequence 0.0434000      3.038
-----
Protein Sequence. Allele HLA-B*58:01. Number of high binders 1. Number of weak binders 0. Number of peptides 3
Link to Allele Frequencies in Worldwide Populations HLA-B\*58:01
-----
HLA-B*57:01 : Distance to training data 0.000 (using nearest neighbor HLA-B*57:01)
# Rank Threshold for Strong binding peptides 0.500
# Rank Threshold for Weak binding peptides 2.000
-----
Pos      MHC      Peptide      Core Of Gp Gl Ip Il      Icore      Identity      Score_EL      %Rank_EL      BindLevel
-----
1 HLA-B*57:01      LSPRTLNAW LSPRTLNAW      0 0 0 0 0      LSPRTLNAW      Sequence 0.9040090      0.172 <= SB
1 HLA-B*57:01      LSPRTLNA LS-PRTLNA      0 0 0 2 1      LSPRTLNA      Sequence 0.0009840      25.284
2 HLA-B*57:01      SPRTLNAW -SPRTLNAW      0 0 0 0 1      SPRTLNAW      Sequence 0.1017670      2.878
-----
Protein Sequence. Allele HLA-B*57:01. Number of high binders 1. Number of weak binders 0. Number of peptides 3
Link to Allele Frequencies in Worldwide Populations HLA-B\*57:01
-----
```

Hình 2. 8. Cơ sở dữ liệu NetMHCpan đánh giá khả năng gắn peptide và HLA lớp I

Trình tự peptide LSPRTLNAW được đăng tải trên cơ sở dữ liệu NetMHCpan 4.1 và đánh giá khả năng gắn với B*57:01 và B*58:01 trong các trường hợp độ dài peptide khác nhau. Dạng peptide có khả năng gắn mạnh mẽ với HLA, được ký hiệu SB (strong binding) và chữ màu đỏ.

Dự đoán vai trò kháng nguyên của peptide bằng cách sử dụng cơ sở dữ liệu IEDB (Immune Epitope), công cụ NetCTLpan với các thông số cơ bản [105, 196]. Các chỉ số

xem xét gồm (1) điểm tổng hợp (combine score) tỷ lệ với số lượng peptide được trình diện bởi MHC trên bề mặt tế bào T và (2) tỷ lệ %rank cho biết ngưỡng peptide cao nhất có vai trò kháng nguyên trong một tập hợp gồm 200.000 peptide (chiều dài 9 axit amin) tự nhiên ngẫu nhiên. Cơ sở dữ liệu báo cáo đánh giá nhiều trường hợp peptide với khung trình tự 9 axit amin và dịch khung 1 axit amin về 2 đầu trình tự. Các peptide có %rank <1 được xác định là các epitope tiềm năng và ký hiệu E (epitope) (hình 2.9).

```
# NetCTLpan version 1.1

# Peptide length 9
# NetCTLpan predictions for HLA-B*57:01 allele.
```

#	N	Sequence Name	Allele	Peptide	MHC	TAP	Cle	Comb	%Rank
0		Sequence	HLA-B*57:01	NLQGQMVHQ	0.00700	0.07000	0.39977	0.09870	50.00
1		Sequence	HLA-B*57:01	LQGQMVHQA	0.02400	-0.47800	0.06940	0.02767	50.00
2		Sequence	HLA-B*57:01	QGQMVHQAI	0.06700	0.29700	0.06758	0.08963	50.00
3		Sequence	HLA-B*57:01	QGMVHQAIS	0.01900	-2.33300	0.02841	-0.03293	50.00
4		Sequence	HLA-B*57:01	QMVHQAI SP	0.01800	0.28700	0.02619	0.03107	50.00
5		Sequence	HLA-B*57:01	MVHQAI SPR	0.05000	1.65100	0.31209	0.16150	50.00
6		Sequence	HLA-B*57:01	VHQAI SPRT	0.01300	-0.63200	0.03195	0.00439	50.00
7		Sequence	HLA-B*57:01	HQAI SPRTL	0.05200	1.00300	0.54773	0.20032	32.00
8		Sequence	HLA-B*57:01	QAI SPRTL N	0.02800	-1.20400	0.02515	0.00356	50.00
9		Sequence	HLA-B*57:01	AIS PRTL NA	0.02200	-0.31600	0.20958	0.06126	50.00
10		Sequence	HLA-B*57:01	ISPRTL NAW	0.43300	1.08700	0.67977	0.61312	0.80 <-E
11		Sequence	HLA-B*57:01	SPRTL NAWV	0.01300	0.12100	0.68703	0.17061	50.00
12		Sequence	HLA-B*57:01	PRTL NAWVK	0.00400	0.20900	0.79535	0.18818	32.00
13		Sequence	HLA-B*57:01	RTL NAWVKV	0.29100	0.41000	0.89682	0.50303	1.50
14		Sequence	HLA-B*57:01	TLNAWVKV V	0.02600	0.35100	0.93696	0.24559	32.00
15		Sequence	HLA-B*57:01	LNAWVKVVE	0.01400	-1.68700	0.03575	-0.02013	50.00
16		Sequence	HLA-B*57:01	NAWVKVVEE	0.01800	-1.25600	0.16691	0.02416	50.00
17		Sequence	HLA-B*57:01	AWVKVVEEK	0.03000	1.07400	0.93721	0.26772	16.00
18		Sequence	HLA-B*57:01	WVKVVEEKA	0.01800	-0.27200	0.42087	0.10590	50.00
19		Sequence	HLA-B*57:01	VKVVEEKAF	0.02200	2.66800	0.29326	0.15468	50.00
20		Sequence	HLA-B*57:01	KVVEEKAFS	0.04600	-1.87500	0.04034	0.00820	50.00
21		Sequence	HLA-B*57:01	VVEEKAFSP	0.01000	0.26200	0.19451	0.06032	50.00

Number of MHC ligands 1 identified. Number of peptides 22. Allele HLA-B*57:01. Protein name Sequence

Link to Allele Frequencies in Worldwide Populations [HLA-B*57:01](#)

Hình 2. 9. Cơ sở dữ liệu NetCTLpan dự đoán vai trò kháng nguyên

Trình tự peptide *ISPRTLNAW* và vùng 10 axit amin lân cận được đánh giá vai trò kháng nguyên trong liên kết với *B*57:01*. Các peptide có %rank <1 được xác định là epitope tiềm năng và đánh dấu chữ E (epitope) và tô màu chữ màu đỏ.

2.10. Hạn chế sai số

- Số liệu được làm sạch, loại bỏ sai số nhiễu và nhập kép trước khi phân tích.
- Hệ thống máy xét nghiệm phục vụ nghiên cứu được bảo dưỡng, hiệu chuẩn định kỳ

- Các xét nghiệm được thực hiện có sự giám sát chặt chẽ và kiểm soát chéo, tuân thủ các bước theo quy trình xét nghiệm đã được quản lý theo hệ thống quản lý chất lượng ISO 15189:2012
- Dữ liệu trình tự gen được phân tích bằng các bước đảm bảo chất lượng sau xét nghiệm, bao gồm: phần mềm Sequencing Scanner đánh giá chất lượng trình tự, phần mềm MEGA phân tích khoảng cách di truyền và phân loài, tuân thủ quy trình “Đảm bảo chất lượng giải trình tự” đã xây dựng tại PTN Công nghệ sinh học tiên tiến, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương.
- Số liệu phân tích được kiểm soát chéo 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 khuôn khổ hợp tác giữa Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương và Viện Quốc gia các bệnh truyền nhiễm Nhật Bản, theo quyết định phê duyệt của Bộ Y tế, số 5331/QĐ-BYT ngày 26/12/2014 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

Tổng số 304 bệnh nhân đã được tuyển chọn vào nghiên cứu, tuổi từ 19 – 69 tuổi, trung bình là 34. Nam giới chiếm đa số với tỷ lệ 75,7%. Dân tộc Kinh phổ biến nhất với tỷ lệ 90,1%, tiếp sau đó là dân tộc Thái, Mường chiếm 4,0% và 2,6% tương ứng. Nhóm các dân tộc khác (Tày, Nùng,...) chiếm tỷ lệ 3,3%.

Theo hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới, số lượng tế bào CD4 được sử dụng là một trong những tiêu chí phân giai đoạn lâm sàng (stage I-IV) [214, 215]. Theo đó, quần thể nghiên cứu có số bệnh nhân thuộc giai đoạn I ($CD4 > 500$ tế bào/ μL) chiếm tỷ lệ cao nhất (110 bệnh nhân, chiếm 36,2%); 73 bệnh nhân (24,0%) thuộc giai đoạn II ($350 \leq CD4 \leq 500$ tế bào/ μL); 67 bệnh nhân (22,0%) thuộc giai đoạn III ($200 \leq CD4 \leq 349$ tế bào/ μL) và 51 bệnh nhân (16,8%) thuộc giai đoạn IV ($CD4 < 200$ tế bào/ μL).

Nhóm bệnh nhân tải lượng ≥ 3 Log copies/ml (tương đương 1.000 copies/ml) chiếm đa số với 252/304 bệnh nhân (82,9%), phù hợp với đối tượng thu thập mẫu là nhóm bệnh nhân mới nhiễm HIV chưa điều trị ARV. Một tỷ lệ bệnh nhân có tải lượng vi rút phát hiện thấy (3/304 bệnh nhân) nhưng không định lượng được do nồng độ vi rút thấp hơn giới hạn định lượng dưới của phương pháp (150 copies/ml). Tương tự đối với kết quả CD4 có 3 trường hợp bệnh nhân có kết quả CD4 không xác định.

Quá trình phân tích đột biến gen liên kết đã loại theo thứ tự các trường hợp có tải lượng vi rút không phát hiện (19) hoặc phát hiện thấy (3), và kết quả CD4 không xác định (2), do không thể thực hiện xét nghiệm về đột biến gen HIV và ảnh hưởng tới phân tích tiến triển AIDS. Việc loại bỏ các mẫu này không làm ảnh hưởng tới phân bố tuổi, giới tính và dân tộc. Với mẫu phân tích ($n=280$), số lượng tế bào CD4 trong khoảng từ 14 – 1.074 tế bào/ μL , trung vị 402,5 tế bào/ μL , tải lượng vi rút trong khoảng 2,23 – 6,12 Log copies/ml (tương đương 170 – 1.318.257 copies/ml), trung vị 4,23 Log copies/ml tương đương 16.982 copies/ml.

Bảng 3. 1. Đặc điểm đối tượng nghiên cứu

	Mẫu tuyển chọn	Mẫu phân tích
Cỡ mẫu (bệnh nhân)	304	280
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)
pVL (Log copies/mL) (trung vị, khoảng)	-	4,23 (2,23-6,12)
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)
Số lượng tế bào CD4 (tế bào/μL)	-	402,5 (14 -1.074)
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

Kiểu gen HLA được xác định trên tổng số 304 bệnh nhân tham gia nghiên cứu. Phân tích tần suất kiểu gen alen được thực hiện từ kết quả của 303 bệnh nhân, loại 1 kết quả do không khuếch đại được đoạn gen alen C. 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. 14 alen lưu hành với tần suất AF > 0,05 (5 alen A, 3 alen B và 6 alen C) gồm: A*11:01 (AF=0,307), A*33:03 (AF=0,132), A*02:07 (AF=0,112), A*24:02 (AF=0,099), A*02:03 (AF=0,059); B*15:02 (AF=0,152), B*46:01 (AF=0,125), B*58:01 (AF=0,092); C*08:01 (AF=0,17), C*01:02 (AF=0,144), C*07:02 (AF=0,119), C*03:02 (AF=0,089), C*03:04 (AF=0,064), C*03:03 (AF=0,051). Bảng 3.2 trình bày 28 alen HLA lớp I có tần suất cao nhất mỗi loại.

Bảng 3. 2. Tần suất HLA alen (2n=606)

STT	Alen A	Số alen	AF	Alen B	Số alen	AF	Alen C	Số alen	AF
1	11:01	186	0,307	15:02	92	0,152	08:01	103	0,170
2	33:03	80	0,132	46:01	76	0,125	01:02	87	0,144
3	02:07	68	0,112	58:01	56	0,092	07:02	72	0,119
4	24:02	60	0,099	38:02	30	0,050	03:02	54	0,089
5	02:03	36	0,059	40:01	29	0,048	03:04	39	0,064
6	02:01	24	0,040	57:01	29	0,048	03:03	31	0,051
7	02:06	21	0,035	44:03	28	0,046	06:02	30	0,050
8	11:02	20	0,033	13:01	27	0,045	07:01	30	0,050
9	24:07	20	0,033	07:05	26	0,043	04:03	26	0,043
10	01:01	19	0,031	15:25	26	0,043	04:01	24	0,040
11	29:01	17	0,028	51:01	22	0,036	12:02	19	0,031
12	26:01	11	0,018	15:12	15	0,025	15:05	19	0,031
13	74:01	7	0,012	35:05	15	0,025	14:02	17	0,028
14	24:03	6	0,010	27:04	11	0,018	15:02	14	0,023
15	31:01	6	0,010	40:02	9	0,015	07:27	6	0,010
16	30:01	4	0,007	55:02	9	0,015	04:06	5	0,008
17	34:01	4	0,007	51:02	8	0,013	07:04	5	0,008
18	03:02	3	0,005	52:01	8	0,013	12:03	5	0,008
19	24:10	3	0,005	54:01	8	0,013	01:50	2	0,003
20	03:01	2	0,003	15:01	6	0,010	07:17	2	0,003
21	68:01	2	0,003	48:01	6	0,010	08:03	2	0,003
22	11:03	1	0,002	56:01	6	0,010	08:16	2	0,003
23	11:24	1	0,002	07:02	5	0,008	01:22	1	0,002
24	23:04	1	0,002	08:01	5	0,008	02:02	1	0,002
25	26:09	1	0,002	27:06	5	0,008	03:11	1	0,002
26	29:33	1	0,002	35:01	5	0,008	06:03	1	0,002
27	32:01	1	0,002	15:13	4	0,007	07:16	1	0,002
28	74:05	1	0,002	39:01	4	0,007	07:43	1	0,002
Tổng		606			570			600	

Phân tích đồng hợp tử HLA lớp I có 53 bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử alen A (17,5%), 20 bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử alen B (6,6%) và 21 bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử alen C (6,9%). Các alen A dạng đồng hợp > 3 bệnh nhân gồm: A*11:01, 24:02 và 02:07. Các alen B và C dạng đồng hợp > 3 bệnh nhân gồm B*15:02, C*08:01 và C*07:02. Tỷ lệ bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử với A*11:01 lên đến 11,6% (N=35), cao nhất so với các alen khác trong nhóm alen A cũng như trong số các alen HLA lớp I. Tỷ lệ đồng hợp tử các alen HLA lớp I được trình bày trong bảng 3.3. Phân tích ghi nhận 6 bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử với cả ba alen HLA lớp I, gồm: A*33:03 – B*58:01 – C*03:02 (N=1), A*11:01 – B*15:02 – C*08:01 (N=3), A*11:01 – B*51:01 – C*14:02 (N=1) và A*11:01 – B*38:02 – C*07:02 (N=1).

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			
Tổng		53	17,5		20	6,6		21	6,9

Phân tích tương quan giữa alen HLA với giới tính, dân tộc được tiến hành trên 14 alen có $AF > 0,05$ (5 alen A, 3 alen B và 6 alen C). Kết quả (bảng 3.4) cho thấy A*02:03 khác biệt theo giới tính ($p=0,023$). Theo dân tộc, tần suất alen B*46:01 khác biệt giữa dân tộc Kinh và nhóm các dân tộc khác ($p=0,02$).

Bảng 3. 4. Phân bố HLA alen theo giới tính và dân tộc (n=303)

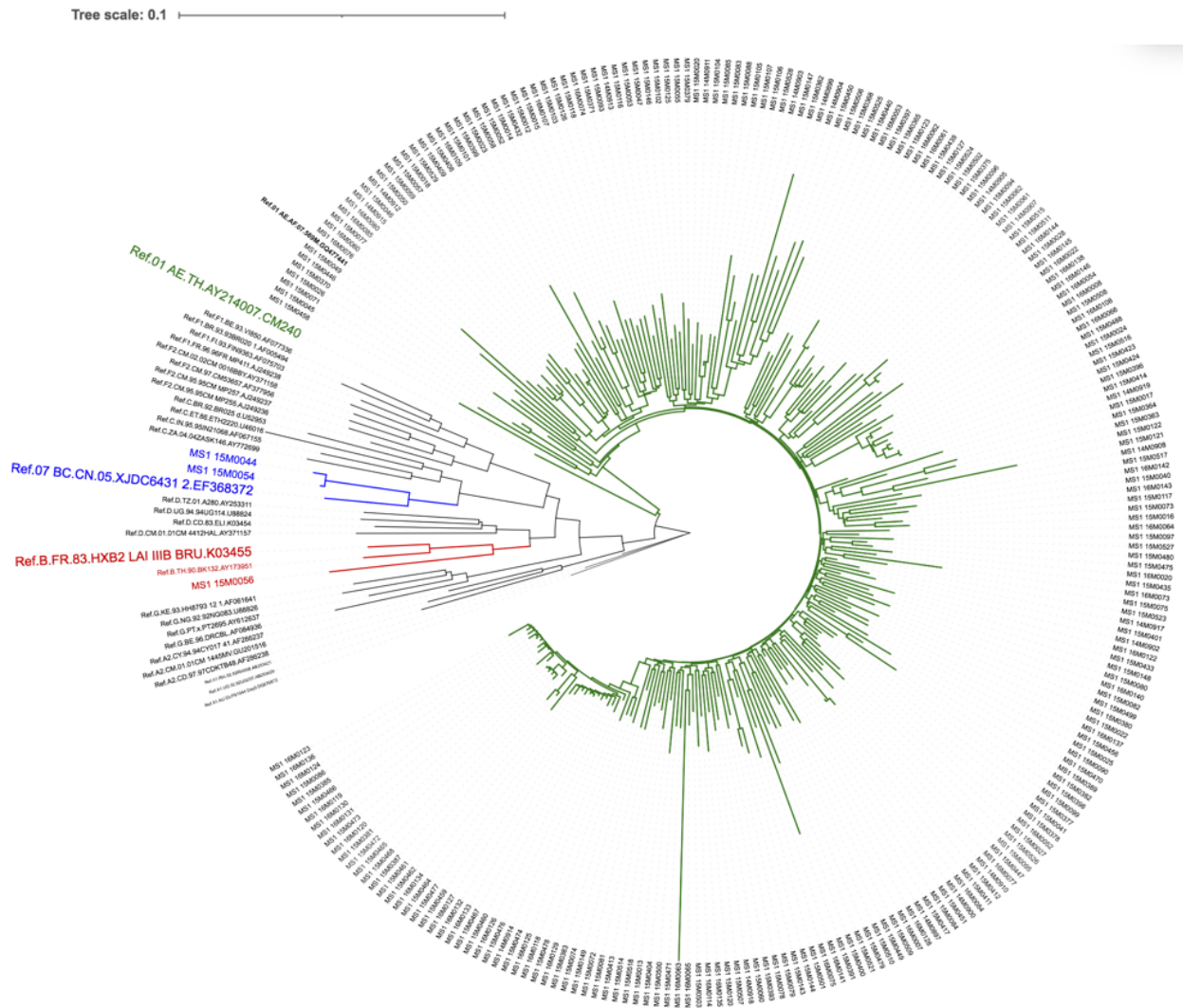
Alen	Số BN alen +		Số BN alen -		p	Số BN alen +		Số BN alen -		p
	Nam	Nữ	Nam	Nữ		Kinh	Khác	Kinh	Khác	
A*11:01	120	31	109	43	0,116	134	16	139	13	0,497
A*33:03	57	21	172	53	0,551	72	6	201	23	0,673
A*02:07	47	17	182	57	0,654	53	11	220	18	0,059
A*24:02	42	10	187	64	0,338	48	4	225	25	0,790
A*02:03	21	14	208	60	0,023	29	6	244	23	0,255
B*15:02	69	18	160	56	0,337	83	4	190	25	0,140
B*46:01	57	16	172	58	0,568	60	13	213	16	0,020
B*58:01	36	18	193	56	0,093	49	5	224	24	0,893
C*08:01	77	17	152	56	0,085	90	4	182	25	0,084
C*01:02	63	20	166	53	0,935	72	11	200	18	0,343
C*07:02	50	13	179	60	0,432	58	5	214	24	0,772
C*03:02	35	16	194	57	0,205	46	5	226	24	0,902
C*03:04	32	6	197	67	0,185	35	3	237	26	0,865
C*03:03	22	8	207	65	0,763	26	4	246	25	0,724

3.3. Đột biến vi rút HIV-1 phân típ 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 típ 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%). Tỷ lệ giải trình tự thất bại trên các gen vi rút được lý giải do tỷ lệ biến đổi di truyền cao của HIV và khả năng bắt cặp của bộ môi khuếch đại. Tỷ lệ này còn liên quan đến tải lượng vi rút của bệnh nhân, tải lượng vi rút càng thấp thì tỷ lệ khuếch đại thất bại càng cao. Nhóm bệnh nhân có pVL < 3 logcopies/ml chiếm 10,7% cỡ mẫu phân tích.

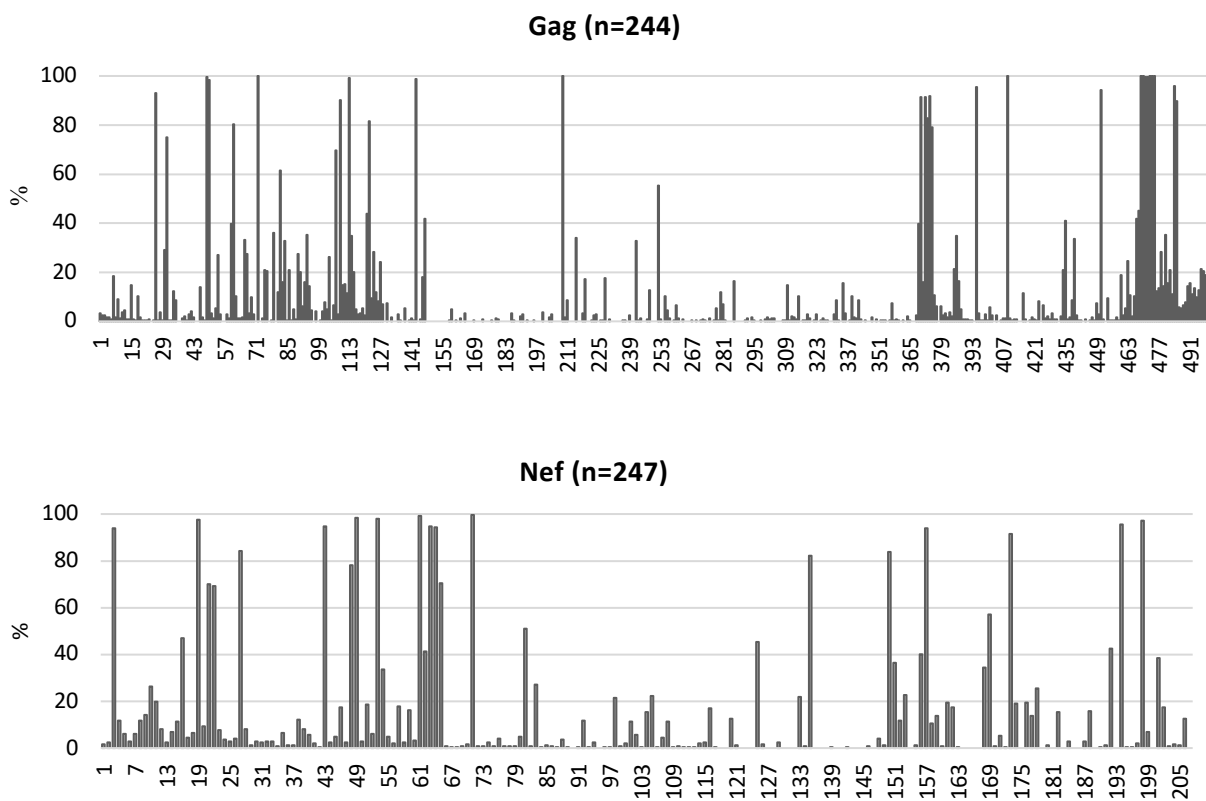
Kiểu gen HIV-1 được xác định dựa vào trình tự gen *gag*, sử dụng cơ sở dữ liệu Geno2pheno. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng trên trình tự gen *gag*, sử dụng Maximum Likelihood với các thông số cơ bản (hình 3.2). Trong số 244 mẫu giải trình tự gen *gag*, đa số vi rút thuộc phân típ CRF01_AE (98,8%, N=242) tương đồng với trình tự tham chiếu CM240. Một tỷ lệ nhỏ mẫu thuộc phân típ CRF07_BC (0,8%, N=2) và phân típ B (0,4%, N=1).



Hình 3. 1. Cây phát sinh chủng loại HIV-1

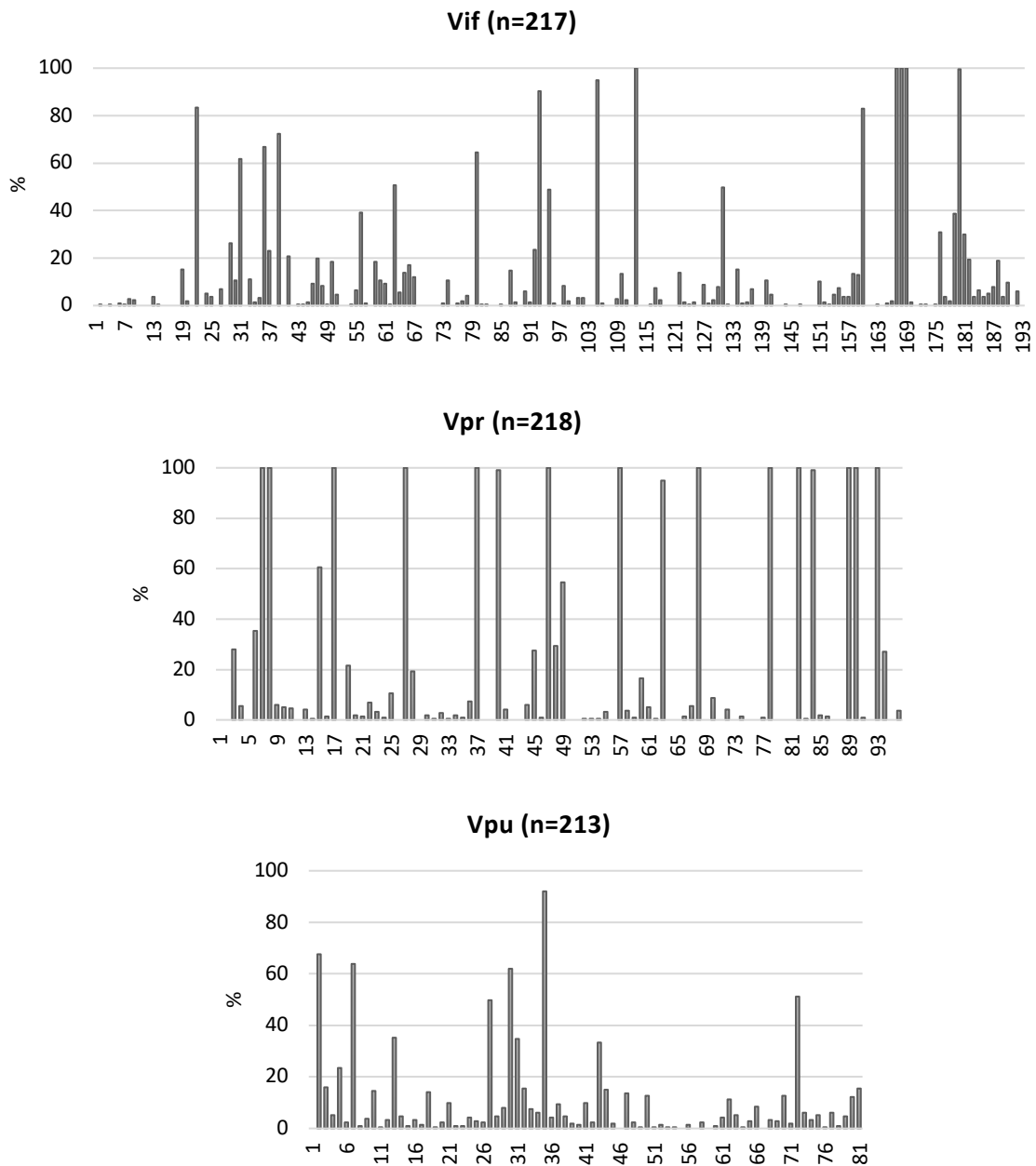
Cây phân tích được xây dựng dựa trên trình tự gen gag ($n=244$), áp dụng Maximum Likelihood trên MEGA v10. Trình tự gen gag trong bộ mẫu nghiên cứu được căn chỉnh với các phân típ HIV-1 tham chiếu. Độ dài nhánh chỉ sự khác biệt trình tự nucleotide.

Áp dụng quy tắc mã bộ ba, trình tự axit amin được phiên mã, biên tập và tham chiếu với CM240. Trình tự axit amin CM240 tại mỗi vị trí codon được coi là consensus (cons), biến thể khác với cons được coi là đột biến (mutation – mut). Trên protein Gag, có 366/504 vị trí codon phát sinh đột biến, chiếm 72,6%. 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). Tại mỗi vị trí codon, tỷ lệ % đột biến trên tổng số trình tự thu được theo protein vi rút, được mô tả hình 3.2 và 3.3.



Hình 3. 2. Tỷ lệ biến thể mang đột biến theo vị trí axit amin protein Gag và Nef

Trục Y: tỷ lệ % đột biến trên tổng số trình tự thu được. Trục X: Vị trí axit amin trên protein tính theo trình tự tham chiếu (CM240).

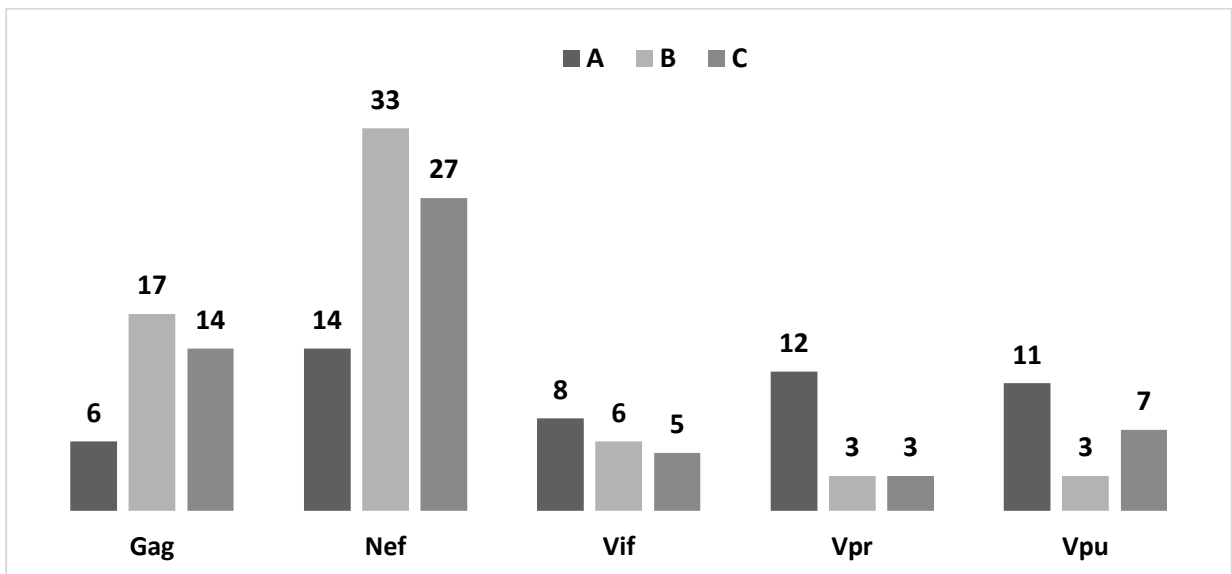


Hình 3. 3. Tỷ lệ biến thể mang đột biến theo vị trí axit amin protein Vif, Vpr và Vpu
Trục Y: tỷ lệ % đột biến trên tổng số trình tự thu được. Trục X: Vị trí axit amin trên protein tính theo trình tự tham chiếu (CM240).

3.3.2. Xác định đột biến Gag, Nef, Vif, Vpr và Vpu của phân típ CRF01_AE liên kết với HLA lớp I

Kiểm tra Fisher exact's test được sử dụng để kiểm tra mối liên kết giữa kiểu gen/alen HLA đối với sự xuất hiện của đột biến tại mỗi vị trí codon. Phân tích được thực hiện trên hai nhóm bệnh nhân độc lập mang hoặc không mang một kiểu gen alen, quan sát sự khác biệt đáng kể khi đột biến axit amin xảy ra tại một vị trí codon so với dạng hoang dã. Mối liên kết giữa codon đột biến và kiểu gen/alen HLA có ý nghĩa khi thoả mãn điều kiện giá trị $p < 0,05$ và $q < 0,2$.

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). Số đột biến liên kết với alen B chiếm phần lớn trong dữ liệu liên kết. Đặc điểm này phù hợp với ưu thế của alen B so với A và C. Các đột biến xuất hiện nhiều trên Gag và Nef, liên kết chủ yếu với alen B và C. Trong khi đột biến Vif, Vpr và Vpu liên kết nhiều hơn với alen A.



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 (bảng 3.5). Trong số 9 alen A, A*33:03 lưu hành với tần suất cao (AF=0,132) và

cũng là alen liên kết với nhiều codon nhất (22 codon), tiếp đến là A*01:01 (AF=0,031) liên kết với 10 codon, rải rác ở tất cả protein Gag, Nef, Vif, Vpr, Vpu. Ở nhóm alen B, B*57:01 (AF=0,048) liên kết với nhiều đột biến nhất, lên đến 15 đột biến, đa số thuộc protein Nef. Tiếp đến là B*44:03 (AF=0,046) liên kết với 13 đột biến. C*06:02 (AF=0,05) và C*07:01 (AF=0,05) là alen nhóm C có số đột biến liên kết cao nhất, với 13 và 12 đột biến liên kết tương ứng. Một số alen liên kết với duy nhất một đột biến, gồm A*02:07, A*24:02, A*11:02, B*15:25, B*35:05, B*27:04, C*03:04, C*04:03, C*04:01, C*15:05, C*14:02, C*15:02.

Bảng 3. 5. Số lượng đột biến liên kết theo HLA alen của từng protein vi rút HIV-1

STT	HLA alen	Gag	Nef	Vif	Vpr	Vpu	Tổng
1	A*11:01	1	2	-	-	-	3
2	A*33:03	4	3	6	3	6	22
3	A*02:07	-	1	-	-	-	1
4	A*24:02	-	1	-	-	-	1
5	A*02:06	-	-	-	8	-	8
6	A*11:02	-	-	-	-	1	1
7	A*01:01	1	4	2	1	2	10
8	A*29:01	-	-	-	-	2	2
9	A*30:01	-	3	-	-	-	3
10	B*15:02	2	1	1	-	-	4
11	B*46:01	2	1	-	-	-	3
12	B*58:01	3	3	-	-	-	6
13	B*38:02	-	-	1	1	-	2
14	B*40:01	2	2	-	1	-	5
15	B*57:01	3	8	2	-	2	15
16	B*44:03	3	9	1	-	-	13
17	B*13:01	1	-	1	-	-	2
18	B*15:25	1	-	-	-	-	1
19	B*07:05	-	1	-	1	-	2
20	B*51:01	-	3	-	-	-	3
21	B*15:12	-	3	-	-	1	4
22	B*35:05	-	1	-	-	-	1
23	B*27:04	-	1	-	-	-	1
24	C*08:01	2	4	2	-	1	9
25	C*01:02	1	1	-	-	-	2
26	C*07:02	-	2	-	1	2	5
27	C*03:02	3	3	-	-	1	7
28	C*03:04	-	-	-	1	-	1
29	C*03:03	1	1	-	-	-	2
30	C*07:01	2	9	1	-	-	12
31	C*06:02	4	5	2	-	2	13
32	C*04:03	-	-	-	-	1	1
33	C*04:01	1	-	-	-	-	1
34	C*15:05	-	1	-	-	-	1
35	C*14:02	-	1	-	-	-	1
36	C*15:02	-	-	-	1	-	1
	Tổng	37	74	19	18	21	169

Chú thích: “-” bằng 0

Chi tiết 169 đột biến liên kết với HLA lớp I được trình bày trong bảng 3.6 – 3.8. Một số đột biến có liên kết với nhiều alen tại cùng một vị trí. Ví dụ đột biến Gag-T242 liên kết với A*33:03, B*58:01, B*57:01, C*03:02 và C*06:02.

Phân tích xác định 37 đột biến protein Gag liên kết với HLA lớp I, trong đó 10 đột biến liên kết đã được công bố trước đây, gồm R26-B*15:25, W86-C*03:02, E93-B*40:01, P146-B*57:01, P146-C*06:02, T242-B*58:01, T242-B*57:01, V280-C*01:02, T310-B*58:01 và I435-C*08:01. 5/10 đột biến Gag đã được ghi nhận là đột biến liên kết phân típ CRF01_AE, gồm: R26-B*15:25, W86-C*03:02, E93-B*40:01, P146-C*06:02 và I435-C*08:01.

10 đột biến Gag liên kết thuộc epitope đã công bố gồm W86 thuộc RY11 (RSLYNTVATLY); E93 và K98 thuộc IL10 (IEIKDTKEAL); P146 thuộc IW9 (ISPRTLNAW); T242 liên kết với hai alen B*57:01 và B*58:01 thuộc epitope TW10 (TSTLQEQIGW); V280 thuộc YI9 (YSPVSILDI); T310 liên kết với B*58:01 thuộc epitope QW9 (QASQEVKNW); T310 và T315 cùng liên kết với B*44:03 đã được biết đến thuộc epitope AW11 (AEQASQDVKNW).

Bảng 3. 6. Đột biến protein Gag liên kết với HLA lớp I ($p < 0,05$, $q < 0,2$)

HLA lớp I	Trình tự HIV-1			Số BN mang alen		Số BN không mang alen		OR	p	q	Ghi chú
	Vị trí	cons	mut	mut	cons	mut	cons				
B*13:01	9	S	C/I/R/T	8	10	12	212	13,78	1,32.E-05	4,84.E-03	
A*33:03	18	K	R	0	64	24	155	0	8,94.E-04	8,18.E-02	
B*15:25	26	R	H/K	13	8	214	9	0,07	1,13.E-05	4,13.E-03	a [#]
B*58:01	86	W	X/F/L/Y/R	20	25	31	168	4,3	6,52.E-05	7,95.E-03	b
C*03:02	86	W	X/F/L/Y/R	18	24	33	169	3,81	3,20.E-04	3,91.E-02	a [#]
B*40:01	93	E	X/A/D/G/ K/Q/R/P	13	10	26	195	9,6	2,40.E-06	8,79.E-04	a [#] b
B*57:01	94	V	E/I	15	6	71	152	5,31	5,31.E-04	6,48.E-02	
C*06:02	94	V	E/I	17	6	69	152	6,19	1,09.E-04	1,34.E-02	
B*40:01	98	K	Q/R	6	17	4	217	18,6	5,97.E-05	1,09.E-02	b
A*01:01	146	P	A/S	8	5	36	195	8,55	3,96.E-04	1,45.E-01	
B*57:01	146	P	A/S	16	5	28	195	21,79	1,00.E-09	1,83.E-07	a b
C*06:02	146	P	A/S	18	5	26	195	26,34	2,51.E-11	9,18.E-09	a [#]
A*33:03	242	T	N/S/I	40	25	40	139	5,51	2,61.E-08	9,55.E-06	
B*58:01	242	T	N/S/I	21	0	59	164	194,14	4,00.E-25	1,46.E-22	a b
C*03:02	242	T	N/S/I	44	1	36	163	167,31	5,53.E-23	2,02.E-20	
C*06:02	242	T	N/S/I	41	1	39	163	28,43	1,29.E-09	2,37.E-07	
B*57:01	242	T	N/S/I	21	2	59	162	Inf	9,17.E-12	3,36.E-09	a b
A*11:01	255	P	A/S	21	100	4	119	6,21	2,48.E-04	9,09.E-02	
B*44:03	256	I	V	6	19	5	214	13,21	2,08.E-04	7,61.E-02	
C*07:01	256	I	V	6	18	5	215	13,99	1,61.E-04	5,90.E-02	
B*46:01	280	V	X/I/T/A	18	44	11	171	6,3	8,42.E-06	3,08.E-03	
C*01:02	280	V	X/I/T/A	22	49	7	166	10,52	3,24.E-08	1,18.E-05	a b
B*46:01	281	S	G/C	11	51	6	176	6,27	4,48.E-04	8,19.E-02	

HLA lớp I	Trình tự HIV-1			Số BN mang alen		Số BN không mang alen		OR	p	q	Ghi chú
	Vị trí	cons	mut	mut	cons	mut	cons				
C*06:02	286	R	K	10	13	30	191	4,85	1,10.E-03	1,01.E-01	
A*33:03	310	T	H/P/S	21	44	15	164	5,17	1,72.E-05	3,14.E-03	
B*58:01	310	T	H/P/S	10	15	26	193	7,72	2,95.E-07	5,41.E-05	a b
C*03:02	310	T	H/P/S	19	26	17	182	6,47	4,10.E-06	7,51.E-04	
B*44:03	310	T	H/P/S	17	25	19	183	4,9	9,50.E-04	1,22.E-01	b
B*44:03	315	N	X/A/H// Q/S/T	8	17	16	202	5,87	9,99.E-04	1,22.E-01	b
C*07:01	315	N	X/A/H// Q/S/T	8	16	16	203	6,26	7,25.E-04	1,33.E-01	
B*15:02	435	I	X/F/G/L/T/ A/M/N/V/Y	42	25	58	119	3,43	3,63.E-05	6,64.E-03	
C*08:01	435	I	X/F/G/L/T/ A/M/N/V/Y	43	31	57	113	2,74	4,02.E-04	7,36.E-02	a [#]
B*15:02	438	S	A/L/P/T	16	51	5	172	10,66	1,52.E-06	5,58.E-04	
C*08:01	438	S	A/L/P/T	16	58	5	165	9	7,56.E-06	2,77.E-03	
C*03:03	449	S	G/N/R/T	8	17	10	209	9,66	8,72.E-05	3,19.E-02	
C*04:01	482	P	F/H/L/Q/ S/Y	5	14	5	203	14,1	4,65.E-04	1,70.E-01	
A*33:03	484	V	F/I/L/N/ S/T	64	0	149	25	Inf	4,71.E-04	5,74.E-02	

Chú thích:

Cons = consensus: trình tự đồng thuận; Mut = mutation: đột biến; Inf = infinite: vô cùng; E = 10[^]

a. Đột biến liên kết đã công bố, # thuộc CRF01_AE; b. Đột biến liên kết thuộc epitope đã biết (phân típ B);

Đột biến liên kết trên Nef nhiều nhất trong số các protein phân tích (74 đột biến liên kết) được trình bày trong bảng 3.7, trong đó 18 đột biến liên kết đã được công bố trước đây. 9/18 đột biến liên kết đã báo cáo thuộc phân tít CRF01_AE, cụ thể: V11-B*57:01, Y81-C*07:02, I101-A*02:07, Y102-B*44:03, K105-C*07:01, E108-B*44:03, G159-B*40:01, E174-B*40:01 và E176-B*44:03.

14 đột biến protein Nef liên kết với HLA lớp I thuộc các epitope đã công bố. Trong đó Y81 liên kết với 2 alen B:07:05 và B*35:05 thuộc RL9 (RPMTYKAAL) và VY8 (VPLRPMTY) tương ứng. G83, E108 và Y115 cũng liên kết với 2 alen khác nhau tại cùng một vị trí codon. Cụ thể, G83 liên kết với B*58:01 và C*03:02 thuộc KF9 (KAAFDLSFF) và AL9 (AALDLSHFL) tương ứng. NefE108 liên kết với C*07:01 thuộc epitope KY11 (KRQEILDLWVY) và liên kết với B*44:03 thuộc epitope QY9 (QEILDLWVY). Nef V114-B*44:03 và Y115-B*44:03 cùng thuộc epitope QY9 như NefE108, trong khi Y115 liên kết với C*07:01 thuộc epitope KY11 (KRQEILDLWVY) có trình tự dài hơn 2 axit amin so với QY9.

Các đột biến liên kết khác thuộc epitope đã công bố gồm NefK92-A*11:01 thuộc AK9 (AVDLSHFLK), Y102-B*44:03 thuộc KY11 (KEKGGLEGLIY), K105-C*07:01 thuộc KY11 (KRQEILDLWVY), N116-B*58:01 thuộc HW9 (HTQGYFPDW) và F135-A*24:02 thuộc epitope RW8 (RYPLTFGW).

Bảng 3. 7. Độ biến protein Nef liên kết với HLA lớp I ($p < 0,05$, $q < 0,2$)

HLA lớp I	Trình tự HIV-1			Số BN mang alen		Số BN không mang alen		OR	p	q	Ghi chú
	Vị trí	cons	mut	mut	cons	mut	cons				
C*08:01	3	S	A/C/G/N	67	11	164	4	0,15	7,91.E-04	1,00.E-01	
B*57:01	7	K	Q/R	9	14	6	218	22,6	3,62.E-07	2,30.E-05	
C*06:02	7	K	Q/R	9	16	6	216	19,67	8,61.E-07	5,47.E-05	
A*01:01	9	S	M/N/R/W/Y	5	8	11	204	11,31	8,15.E-04	5,18.E-02	
B*57:01	9	S	M/N/R/W/Y	6	14	10	198	8,33	9,68.E-04	3,07.E-02	
C*06:02	9	S	M/N/R/W/Y	6	16	10	196	7,23	1,72.E-03	4,36.E-02	
A*01:01	10	I	X/A/G/K/L/ M/Q/R/T/V	9	5	34	177	9,23	1,51.E-04	1,92.E-02	
B*57:01	10	I	X/A/G/K/L/ M/Q/R/T/V	15	5	28	177	18,55	1,32.E-08	1,67.E-06	
C*06:02	10	I	X/A/G/K/L/ M/Q/R/T/V	15	7	28	175	13,14	1,10.E-07	1,40.E-05	
A*01:01	11	V	A/E/G/M/ Q/R/I	6	8	21	190	6,69	2,64.E-03	1,12.E-01	
B*57:01	11	V	A/E/G/M/ Q/R/I	11	9	16	189	14,1	7,83.E-07	3,31.E-05	a[#]
C*06:02	11	V	A/E/G/M/ Q/R/I	11	11	16	187	11,45	2,84.E-06	1,20.E-04	
B*51:01	13	W	L/R	3	13	3	228	16,98	3,99.E-03	1,89.E-01	
B*51:01	15	Q	X/E/H/K/ R/P/L/Q	6	10	22	209	5,63	4,47.E-03	1,89.E-01	
B*27:04	23	T	A	5	5	14	223	15,48	3,11.E-04	3,95.E-02	
A*30:01	24	P	H/Q/S	2	0	6	238	Inf	9,29.E-04	5,90.E-02	
A*11:01	27	T	A/E/G/P	94	29	111	10	0,29	1,44.E-03	9,17.E-02	
A*30:01	28	E	A/G/K/P/ R/Q	2	0	12	227	Inf	3,15.E-03	1,33.E-01	
C*07:02	39	K	Q/R/T	11	40	9	187	5,66	4,13.E-04	5,24.E-02	
B*44:03	48	I	M/T/V/E/ L/K	12	13	180	41	0,21	4,64.E-04	1,18.E-02	
C*07:01	48	I	M/T/V/E/ L/K	13	12	179	42	0,26	3,49.E-03	6,33.E-02	
B*15:12	65	E	X/G	3	9	166	64	0,13	1,35.E-03	5,71.E-02	
B*15:12	80	T	N	5	7	6	228	25,97	4,38.E-05	5,56.E-03	
C*03:03	80	T	N	6	18	5	217	14,12	1,54.E-04	1,95.E-02	

HLA lớp I	Trình tự HIV-1			Số BN mang alen		Số BN không mang alen		OR	p	q	Ghi chú
	Vị trí	cons	mut	mut	cons	mut	cons				
B*07:05	81	Y	F/H	3	17	122	104	0,15	8,18.E-04	1,04.E-01	a b
C*15:05	81	Y	F/H	1	12	124	109	0,06	1,48.E-04	1,88.E-02	
B*35:05	81	Y	F/H	36	15	89	106	0,07	1,22.E-03	1,55.E-01	a b
C*07:02	81	Y	F/H	1	15	124	106	2,85	1,63.E-03	1,03.E-01	a [#]
B*58:01	83	G	A/E/S	3	42	64	138	0,15	3,35.E-04	3,67.E-02	a b
C*03:02	83	G	A/E/S	3	39	64	141	0,17	9,64.E-04	6,12.E-02	b
A*11:01	92	K	R	28	95	1	123	35,9	1,02.E-08	1,29.E-06	a b
C*07:01	100	L	I	4	21	1	221	40,65	3,89.E-04	9,88.E-03	
A*02:07	101	I	M/V	19	31	9	188	12,59	5,07.E-09	6,44.E-07	a [#]
B*46:01	101	I	M/V	18	41	10	178	7,72	1,32.E-06	1,68.E-04	
C*01:02	101	I	M/V	18	51	10	168	5,88	2,09.E-05	2,66.E-03	
A*33:03	102	Y	H/W	9	59	5	174	5,26	3,42.E-03	1,48.E-01	
B*44:03	102	Y	H/W	10	15	4	218	34,96	1,33.E-08	8,45.E-07	a [#] b
C*07:01	102	Y	H/W	9	16	5	217	23,65	3,67.E-07	1,55.E-05	
C*08:01	102	Y	H/W	0	78	14	155	0	6,06.E-03	1,92.E-01	
B*57:01	104	K	Q/R/T	9	14	29	195	4,29	3,13.E-03	7,96.E-02	
C*06:02	104	K	Q/R/T	10	15	28	194	4,58	1,40.E-03	4,36.E-02	
B*44:03	105	K	Q/R/G	15	10	39	182	6,92	1,36.E-05	4,31.E-04	
C*07:01	105	K	Q/R/G	15	10	39	182	6,92	1,36.E-05	4,31.E-04	a [#] b
A*33:03	108	E	D/K	17	51	11	168	5,05	1,56.E-04	1,98.E-02	
B*44:03	108	E	D/K	1	70	27	149	14,62	6,19.E-08	2,62.E-06	a [#] b
C*07:01	108	E	D/K	13	12	15	207	14,62	6,19.E-08	3,93.E-06	a b
B*15:02	108	E	D/K	13	12	15	207	0,08	7,27.E-04	9,24.E-02	
C*08:01	108	E	D/K	2	76	26	143	0,15	2,13.E-03	1,36.E-01	
B*44:03	114	V	I	3	22	2	220	14,64	8,06.E-03	1,28.E-01	b
B*44:03	115	Y	H	4	21	2	220	20,38	1,09.E-03	2,30.E-02	b
C*07:01	115	Y	H	4	21	2	220	20,38	1,09.E-03	2,30.E-02	b

HLA lớp I	Trình tự HIV-1			Số BN mang alen		Số BN không mang alen		OR	p	q	Ghi chú
	Vị trí	cons	mut	mut	cons	mut	cons				
B*58:01	116	N	H	1	44	41	161	0,09	1,75.E-03	7,39.E-02	a b
C*03:02	116	N	H	1	41	41	164	0,1	3,02.E-03	1,28.E-01	
B*44:03	120	F	I/L/Y/N	8	17	24	198	3,85	7,34.E-03	1,28.E-01	
C*07:01	120	F	I/L/Y/N	8	17	24	198	3,85	7,34.E-03	1,16.E-01	
B*51:01	125	Q	D/H	15	1	97	134	20,54	3,97.E-05	5,04.E-03	a
C*14:02	125	Q	D/H	14	0	98	135	Inf	9,69.E-06	1,23.E-03	
A*30:01	129	P	S	2	0	4	241	Inf	4,94.E-04	5,90.E-02	
A*24:02	135	F	Y/L	21	17	182	27	0,19	2,00.E-05	2,53.E-03	a b
B*15:12	156	D	A/E/G/K/ L/N/V/S/T	10	1	87	147	16,73	5,15.E-04	3,27.E-02	
B*57:01	157	N	A/I/S/T	18	5	212	10	0,17	7,47.E-03	1,36.E-01	
B*40:01	159	G	A/E/R	8	12	24	201	5,52	1,47.E-03	9,31.E-02	a [#]
B*57:01	162	N	S/T	9	14	33	190	3,67	6,93.E-03	1,36.E-01	
B*40:01	174	E	D/G	12	8	35	192	8,12	2,42.E-05	3,08.E-03	a [#]
A*33:03	176	E	A/D/G/K/ Q/S/T	22	46	26	153	2,8	3,50.E-03	1,48.E-01	
B*44:03	176	E	A/D/G/K/ Q/S/T	19	6	29	193	20,63	8,01.E-11	1,02.E-08	a [#]
C*07:01	176	E	A/D/G/K/ Q/S/T	19	6	29	193	20,63	8,01.E-11	1,02.E-08	
C*08:01	176	E	A/D/G/K/ Q/S/T	7	71	41	128	0,31	5,22.E-03	1,92.E-01	
B*44:03	177	E	D/H	8	17	26	196	3,52	1,10.E-02	1,55.E-01	
C*07:01	177	E	D/H	8	17	26	196	3,52	1,10.E-02	1,55.E-01	
A*01:01	187	S	T	3	12	4	228	13,85	5,52.E-03	1,75.E-01	a
B*57:01	194	V	I/K/L/M/ R/T	19	4	217	7	0,16	1,23.E-02	1,95.E-01	
B*58:01	201	E	D	28	17	67	135	3,3	5,77.E-04	3,67.E-02	
C*03:02	201	E	D	27	15	68	137	3,61	2,28.E-04	2,90.E-02	

Chú thích:

Cons = consensus: trình tự đồng thuận; Mut = mutation: đột biến; Inf = infinite: vô cùng; E = 10[^]

a. Đột biến liên kết đã công bố, [#] thuộc CRF01_AE; b. Đột biến liên kết thuộc epitope đã biết (phânтип B);

Đột biến protein Vif, Vpr và Vpu liên kết với HLA lớp I được trình bày trong bảng 3.8 – 3.10. Trong số 19 đột biến Vif, 18 đột biến Vpr và 21 đột biến Vpu, chưa có đột biến liên kết nào đã được công bố trước đây, đặc biệt ở phân típ CRF01_AE. 3 đột biến Vif, 3 đột biến Vpr và 3 đột biến Vpu thuộc các epitope đã công bố. Cụ thể: VifK33 và K37 cùng liên kết với B*57:01 và cùng thuộc epitope IF9 (ISKKAKGWF). VifH80-B*38:02 thuộc epitope WI9 (WHLGQGVSI). 3/18 vị trí đột biến liên kết trên Vpr gần nhau (codon 60, 61 và 63) cùng liên kết với A*02:06 và cùng thuộc một epitope AL9 (AIIRILQQL).

Bảng 3. 8. Đột biến protein Vif liên kết với HLA lớp I ($p < 0,05$, $q < 0,2$)

HLA lớp I	Trình tự HIV-1			Số BN mang alen		Số BN không mang alen		OR	p	q	Ghi chú
	Vị trí	cons	mut	mut	cons	mut	cons				
A*01:01	33	K	R	8	5	16	188	18,24	6,20.E-06	7,07.E-04	
B*57:01	33	K	R	16	3	8	190	117,01	9,69.E-16	1,10.E-13	b
C*06:02	33	K	R	16	5	8	188	70,52	1,88.E-14	2,15.E-12	
A*01:01	37	K	D/E/G/N/ Q/R	9	4	40	164	9,1	2,76.E-04	1,57.E-02	
B*57:01	37	K	D/E/G/N/ Q/R	22	38	27	130	17,74	5,89.E-08	3,36.E-06	b
C*06:02	37	K	D/E/G/N/ Q/R	15	4	34	164	11,71	5,81.E-07	3,31.E-05	
A*33:03	37	K	D/E/G/N/ Q/R	15	6	34	162	2,77	3,43.E-03	7,83.E-02	
A*33:03	59	L	I/V/M	18	42	22	135	2,62	1,03.E-02	1,96.E-01	
C*08:01	60	G	D/E/K/R/Q	1	62	22	132	0,1	3,44.E-03	1,96.E-01	
B*44:03	61	E	D/G/K	10	14	10	183	12,76	3,67.E-06	4,19.E-04	
C*07:01	61	E	D/G/K	10	14	10	183	12,76	3,67.E-06	4,19.E-04	
B*38:02	80	H	X/Q	22	1	118	76	14,07	4,17.E-04	4,75.E-02	b
A*33:03	93	K	A/D/E/G/ N/Q/R/S/T	48	12	148	9	0,25	3,43.E-03	7,83.E-02	
B*13:01	95	S	I/K/N/R/ T/C	18	3	88	108	7,3	3,75.E-04	4,28.E-02	
A*33:03	117	D	E/G	11	49	5	152	6,75	4,47.E-04	5,10.E-02	
A*33:03	131	R	H/P/S/Y/C	40	20	68	89	2,61	2,39.E-03	7,83.E-02	
B*15:02	131	R	H/P/S/Y/C	15	45	93	64	0,23	7,99.E-06	9,11.E-04	
C*08:01	131	R	H/P/S/Y/C	18	45	90	64	0,29	8,63.E-05	9,83.E-03	
A*33:03	176	K	E/G/N/R	9	51	58	99	0,3	1,69.E-03	7,83.E-02	

Chú thích:

Cons = consensus: trình tự đồng thuận; Mut = mutation: đột biến; Inf = infinite: vô cùng; E = 10ⁿ

a. Đột biến liên kết đã công bố, # thuộc CRF01_AE; b. Đột biến liên kết thuộc epitope đã biết (phân típ B);

Bảng 3. 9. Đột biến protein Vpu liên kết với HLA lớp I ($p < 0,05$, $q < 0,2$)

HLA lớp I	Trình tự HIV-1			Số BN mang alen		Số BN không mang alen		OR	p	q	Ghi chú
	Vị trí	cons	mut	mut	cons	mut	cons				
A*33:03	2	S	F/L/Q/T/ V/W/Y/I/P	7	53	54	104	2,47	1,36.E-02	1,59.E-01	
B*15:12	5	E	A/G/I/Q/ S/V/H	26	34	105	52	8,57	1,83.E-03	1,28.E-01	
C*07:02	5	E	A/G/I/Q/ S/V/H	2	12	1	203	3,24	1,93.E-03	1,30.E-01	
A*11:02	7	S	X/A/C/G/ L/W/Y/R	11	9	36	162	0,15	2,51.E-03	1,76.E-01	
C*08:01	10	V	A/I/T/L	18	27	29	144	0,14	2,19.E-03	1,53.E-01	
C*07:02	12	L	X/F/I/M/V	2	12	1	203	11,23	3,72.E-03	1,30.E-01	
A*29:01	22	V	M/G	4	10	3	201	Inf	3,45.E-03	1,56.E-01	
A*33:03	24	T	A/I/S	5	9	18	186	10,63	1,65.E-03	5,40.E-02	
A*33:03	30	F	X/A/C/I/ L/V/Y	7	24	8	178	2,96	2,31.E-03	5,40.E-02	b
A*33:03	31	K	L/N/R/S/ W/Q	11	7	48	152	3,11	5,54.E-04	3,88.E-02	b
A*33:03	37	R	K	0	23	59	136	3,88	6,05.E-03	1,06.E-01	b
A*01:01	58	E	D/G	42	18	77	81	28,22	1,67.E-03	5,86.E-02	
B*57:01	58	E	D/G	9	5	27	177	48,97	2,19.E-04	1,53.E-02	
C*06:02	58	E	D/G	3	11	8	196	42,99	3,36.E-04	2,35.E-02	
A*33:03	62	D	E	11	3	196	8	3,18	1,23.E-02	1,59.E-01	
C*03:02	62	D	E	5	9	14	190	4,25	2,53.E-03	1,77.E-01	
A*01:01	63	E	D/K	5	6	14	193	19,42	1,40.E-04	9,81.E-03	
B*57:01	63	E	D/K	2	11	0	205	10,92	1,09.E-03	3,81.E-02	
C*06:02	63	E	D/K	46	11	98	58	9,48	1,81.E-03	6,33.E-02	
C*04:03	66	K	I/N/Q/R/ T/E	7	3	43	160	6,89	2,12.E-03	1,49.E-01	
A*29:01	74	F	L/W/I	18	24	32	139	9,22	4,46.E-03	1,56.E-01	

Chú thích:

Cons = consensus: trình tự đồng thuận; Mut = mutation: đột biến; Inf = infinite: vô cùng; $E = 10^{\wedge}$

a. Đột biến liên kết đã công bố, # thuộc CRF01_AE; b. Đột biến liên kết thuộc epitope đã biết (phân típ B);

Bảng 3. 10. Đột biến protein Vpr liên kết với HLA lớp I ($p < 0,05$, $q < 0,2$)

HLA lớp I	Trình tự HIV-1			Số BN mang alen		Số BN không mang alen		OR	p	q	Ghi chú
	Vị trí	cons	mut	mut	cons	mut	cons				
A*33:03	3	Q	R	3	10	133	67	0,26	6,98.E-04	4,19.E-02	
A*33:03	15	Y	X/D/F/H/ L/N/Q/R/S	2	60	29	122	0,38	1,91.E-03	5,72.E-02	
A*02:06	16	N	H/I/D	5	37	2	169	32,17	1,11.E-02	1,11.E-01	
B*40:01	19	T	A/M/I	2	11	0	200	5,44	5,86.E-04	3,52.E-02	
C*07:02	19	T	A/M/I	7	50	2	154	3,29	1,81.E-03	1,09.E-01	
A*02:06	21	E	A	45	12	87	69	32,17	1,11.E-02	1,11.E-01	
A*02:06	23	L	X/M/V/I	31	26	43	113	25,58	3,41.E-04	1,02.E-02	
A*02:06	25	E	D/G	11	46	9	147	5,66	8,87.E-03	1,11.E-01	
C*03:04	36	R	G/Q/S/W/ E/D/M	3	10	2	198	6,4	1,77.E-03	1,06.E-01	
B*07:05	45	Y	F/H/L/Q	4	15	1	193	4,93	1,61.E-03	9,66.E-02	
B*38:02	45	Y	F/H/L/Q	4	17	1	191	0	7,63.E-04	4,58.E-02	
A*33:03	49	N	H/I/Q/S/ T/P	12	45	12	144	2,45	5,97.E-03	1,19.E-01	
A*02:06	60	I	L/M	10	27	14	162	11,58	3,90.E-05	2,34.E-03	b
A*02:06	61	I	T/V	5	8	6	194	6,57	2,58.E-02	1,93.E-01	b
A*02:06	63	M	A/F/I/L/ T/V/S	5	14	6	188	0,15	2,58.E-02	1,93.E-01	b
A*02:06	70	V	A/I	5	16	6	186	7,41	3,56.E-03	7,12.E-02	
C*15:02	70	V	A/I	6	13	12	182	11,21	9,76.E-04	5,86.E-02	
A*01:01	77	Q	R/H	4	9	9	191	Inf	3,30.E-03	1,98.E-01	

Chú thích:

Cons = consensus: trình tự đồng thuận; Mut = mutation: đột biến; Inf = infinite: vô cùng; E = 10[^]

a. Đột biến liên kết đã công bố, # thuộc CRF01_AE; b. Đột biến liên kết thuộc epitope đã biết (phân típ B);

3.3.3. Định vị đột biến liên kết với HLA lớp I theo bản đồ epitope ứng viên của phân típ CRF01_AE

Để dự đoán về ảnh hưởng của các đột biến đã xác định được, nghiên cứu tiến hành định vị các đột biến theo bản đồ epitope cho từng protein Gag, Nef, Vif, Vpr và Vpu. 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 (244 – 247 – 217 – 218 – 213 trình tự Gag – Nef – Vif – Vpr – Vpu). Bản đồ epitope đánh dấu các vị trí có liên kết với HLA lớp I tìm được cho phân típ CRF01_AE và vị trí epitope đã biết trên phân típ B. Trình tự mỗi epitope được đăng tải trên cơ sở dữ liệu IEDB (Immune Epitope), sử dụng công cụ NetCTLpan và xem xét chỉ số %rank (như đã mô tả mục 2.9). Các peptide có %rank <1 là các epitope tiềm năng.

Trên protein Gag, đa số (5/6) epitope đã biết cho thấy vẫn phù hợp với phân típ CRF01_AE (%rank<1) mặc dù có sự khác biệt về trình tự axit amin (hình 3.5-A). Epitope KW11 giới hạn bởi B*58:01 nổi trội với đột biến liên kết tại vị trí codon 86. Epitope IL10 giới hạn bởi B*40:01 liên kết với codon đột biến vị trí 93 và 98. Ngoài ra đột biến liên kết V94-B*57:01/C*06:02 được định vị, không làm thay đổi vai trò kháng nguyên của IL10 giới hạn bởi B*40:01. Epitope TW10 giới hạn bởi B*57:01/58:01 vẫn giữ vai trò kháng nguyên phù hợp cho phân típ CRF01_AE với đột biến liên kết điển hình tại vị trí codon 242. Epitope AW11 giới hạn bởi B*44:03 liên kết với đột biến tại vị trí codon 310. Duy nhất YI9 trên Gag giới hạn bởi C*01:02 không phù hợp với phân típ CRF01_AE với các đột biến liên kết tại codon 280 và 281.

Trên protein Nef, các epitope tập trung chủ yếu ở đoạn codon 80 – 150 và có sự đan xen trình tự giữa các epitope (hình 3.5-B). 7/9 epitope vẫn phù hợp với phân típ CRF01_AE bao phủ các vị trí đột biến liên kết với HLA tìm được trong nghiên cứu. Epitope KF9 giới hạn bởi B*58:01 và KY11 giới hạn bởi C*07:01 không phù hợp với CRF01_AE. Các đột biến liên kết định vị theo epitope gồm G83-B*58:01/C*03:02 trên KF9; đột biến liên kết tại các codon 105, 108, 114 và 115 trên KY11.

Trong số 19, 18 và 21 đột biến liên kết trên Vif, Vpr và Vpu tương ứng, một số ít đột biến liên kết thuộc epitope (hình 3.5-C,D,E). Epitope WI9 trên Vif và ER9 trên Vpu

phù hợp với phân típ CRF01_AE, bao phủ lên các đột biến VifH80-B*38:02, VpuF30/K31/R37-A*33:03. Epitope Vif IF9 – B*57:01 và Vpr AL9 – A*02:06 cho thấy không phù hợp với CRF01_AE (%rank >1).

A. Gag

Gag (n=244)	1	MGARASVLSGGKLD AW EKIRLRPGGK KK YRMKHLVWASRELERFALNPGLLETAEGCQQI	60
HXB2	1E..R.....KL..I.....V.....S...R..	60
Gag (n=244)	61	LEQLQSTLKTGSEEL KSLFNTVATLW CVHQRI EV KDT KEAL DKIEEAQKKSQQKTQAAAA	120
HXB2	61	.G...PS.Q.....R..Y.....Y.....I.....E.N..KK.A.....	120
Gag (n=244)	121	GPGSSSKVSQNYPIVQNAOQOMAHQ P LSPRTLNAW V KVVEEKGFNPEVIMPFSALSEGAT	180
HXB2	121	DT.H.NQ.....I...V..A IA.S.....	180
Gag (n=244)	181	PQDLNMLNIVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWD RVHPVHAGFIPPGQMREPRGSDIAGT T	240
HXB2	181T...T.....A.....	240
Gag (n=244)	241	S T LQEQIGW MTNNP PI VPVGDYKRWIILGLNKIVRMYS PVS ILDIRQGPKEPFRDYVDRF	300
HXB2	241E.....T.....	300
Gag (n=244)	301	YKTLR AEQATQ EV K N W MTETLLVQANPDC S ILKALGTGATLEEMTACQGVGGPSHKA	360
HXB2	301S.....T.....PA.....G...	360
Gag (n=244)	361	RVLAEAMSHVQQT-NVMMQRGNFKGQKRIKCFNCGKEGHLARNCRAPRKKGCWKC Q EGHQ	420
HXB2	361Q.TNSATI.....RN.RK.V.....T.....	420
Gag (n=244)	421	MKDCTERQANFLGKI W PSNKG R PGNF P QSRTEPTAPPAENWGMGEEITGSFLKQEQKQEQ	480
HXB2	421Y.....L..P.....E.SFRS.V.T.TP----P....P	480
Gag (n=244)	481	kP k VHPPPSISL K SLFGNDPLSQ*	504
HXB2	481	iD.E L Y.LT--R.....S...*	504

B. Nef

Nef (n=217)	1	MGGkwsKsSIVGWPQVRERIRRTPPAE G VGVAVSQDLDK H GAVTSSNMNNADSVWLRAQE	60
HXB2	1R.V....T...M..AE...D.....R..E...I...T....CA..E...	60
Nef (n=217)	61	EEDE G VGFVPRPQ V PLRPM T F k GAFDLSFFL K EKGGLDGLI Y S K K R Q E ILDLW V Y N TQGF	120
HXB2	61	...--.....Y...L...H.....E.....Q...D.....H...Y	120
Nef (n=217)	121	F PDW Q NYTPGPGTR Y PLCFGW C FKLVDPREV E DT k GEN N CLLHPMNQHGLE D EE E REV	180
HXB2	121T.....E.EK...ANE...S....SL..MD.P....	180
Nef (n=217)	181	LMWKFDSALARKH I ARELHP E YYKDC*	207
HXB2	181	.V.....R..FH.M.....*	207

C. Vif

					IF9 (%rank=10,0)	
Vif (n=217)	1	MENRWQVMIVWQVDRMRIRTWHSLVKHHMYVS	K	K	K	60
HBX2	1I.R..	K	GT..RI.....	60
					WI9 (%rank=0,15)	
Vif (n=217)	61	EARLVIRTYWGLQTGEKDW	Q	L	G	120
HXB2	61	D.....T.....H...R..	H	QKKR...V.....Q....Y.....E...	120
Vif (n=217)	121	RKAILGQVVR	R	R	C	180
HXB2	121	.N....HI.sP....QA.....	A	I	...K.....T.....T	180
Vif (n=217)	181	RGHRENPTMNGH*			193	
HXB2	181	K...GSH.....*			193	

D. Vpr

Vpr (n=218)	1	MEQAPEDQGPQREP	Y	N	E	50
HXB2	1E-.....---Q.....-N.	50
					AL9 (%rank=3,0)	
Vpr (n=218)	51	GDTWEGVEA	I	R	T	97
HXB2	51-.....	M-M....R-.....*	97

E. Vpu

					ER9 (%rank=0,2)	
Vpu (n=213)	1	MSPLEI	S	A	I	60
HXB2	1	.QS.Q.L...A.V..A.....	S	F	Y	60
Vpu (n=213)	61	TDELA	K	L	V	82
HXB2	61	QE...SA.....H.A..DV.D.*				82

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

Phân tích tương quan giữa kiểu gen HLA đến tải lượng vi rút và số lượng tế bào CD4 được thực hiện trên cỡ mẫu phân tích ($n=280$), tập trung vào các alen xuất hiện ở > 10 bệnh nhân. Tổng số 41 alen (13 alen A, 14 alen B và 14 alen C) được đưa vào phân tích (bảng 3.11).

B*51:01 là alen duy nhất trong số này có tác động đồng thời đến tải lượng vi rút. Tải lượng vi rút giảm ở nhóm bệnh nhân mang alen B*51:01 so với nhóm không mang alen, $p=0,018$. B*57:01 được biết đến là alen bảo vệ, trong nghiên cứu này B*57:01 làm tăng số lượng tế bào CD4, nhưng không ảnh hưởng đối với tải lượng vi rút.

B*57:01, B*51:01, C*06:02 và C*14:02 làm tăng số lượng tế bào CD4, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm bệnh nhân mang alen (alen +) và không mang alen (alen -) ($p<0,05$). Sự có mặt của alen B*57:01 làm tăng CD4 trung bình từ 406,39 đến 533,42 tế bào/ μL . Chỉ số này dao động nhiều nhất ở nhóm bệnh nhân mang alen C*14:02, CD4 trung bình từ 562,44 đến 409,71 tế bào/ μL .

Bảng 3. 11. HLA alen liên kết với pVL và CD4 (n=280)

STT	Alen	%CF	pVL trung bình (Logcopies/ml)		<i>p</i>	CD4 trung bình (tế bào/uL)		<i>p</i>
			Alen +	Alen -		Alen +	Alen -	
1	A*11:01	48,9	4,21	4,21	0,989	401,72	433,96	0,228
2	A*33:03	26,1	4,26	4,19	0,56	418,49	418,08	0,989
3	A*02:07	21,1	4,33	4,18	0,236	374,12	429,95	0,085
4	A*24:02	16,1	4,17	4,22	0,729	423,22	417,22	0,868
5	A*02:03	11,4	4,23	4,21	0,887	431,09	416,52	0,712
6	A*02:01	8,2	4,21	4,21	0,983	433,83	416,79	0,727
7	A*24:07	7,1	4,53	4,19	0,136	368,2	422,03	0,4
8	A*02:06	6,8	4,15	4,21	0,71	483,84	413,41	0,265
9	A*01:01	6,1	3,94	4,23	0,28	432,12	417,29	0,791
10	A*11:02	6,1	4,24	4,21	0,894	413,82	418,47	0,93
11	A*29:01	5,7	4,23	4,21	0,926	436,69	417,06	0,668
12	A*26:01	3,6	3,77	4,23	0,175	392,9	419,12	0,746
13	A*30:01	1,1	5,01	4,2	0,352	222,33	420,31	0,224
14	B*15:02	28,6	4,11	4,25	0,241	422,29	416,55	0,843
15	B*46:01	24,6	4,23	4,2	0,825	409,65	420,98	0,711
16	B*58:01	18,2	4,2	4,21	0,915	418,61	418,09	0,988
17	B*44:03	10	4,25	4,21	0,809	443,68	415,35	0,578
18	B*57:01	9,3	3,86	4,25	0,065	533,42	406,39	0,012
19	B*40:01	9,3	4,16	4,22	0,772	347,12	425,46	0,075
20	B*13:01	8,2	4,29	4,2	0,609	345,83	424,66	0,064
21	B*38:02	8,9	4,4	4,19	0,269	368,24	423,08	0,114
22	B*15:25	7,9	4,28	4,2	0,692	478,05	413,08	0,256
23	B*07:05	7,5	4,25	4,21	0,794	426,67	417,5	0,849
24	B*51:01	6,4	3,82	4,24	0,018	527,06	410,71	0,02
25	B*15:12	5,4	3,87	4,23	0,125	416,8	418,26	0,98

STT	Alen	%CF	pVL trung bình (Logcopies/ml)		<i>p</i>	CD4 trung bình (tế bào/uL)		<i>p</i>
			Alen +	Alen -		Alen +	Alen -	
26	B*35:05	5	4,52	4,19	0,263	408,64	418,69	0,902
27	B*27:04	3,2	4,57	4,2	0,346	308,89	421,82	0,103
28	C*08:01	31,1	4,13	4,25	0,296	415,78	419,69	0,889
29	C*01:02	28,6	4,23	4,2	0,805	424,66	415,98	0,774
30	C*07:02	20	4,37	4,17	0,156	377,29	428,82	0,128
31	C*03:02	17,1	4,17	4,22	0,743	427,88	416,52	0,759
32	C*03:04	12,9	4,14	4,22	0,608	367,31	426,05	0,08
33	C*03:03	10	4,14	4,22	0,638	395,21	421,07	0,512
34	C*06:02	10,4	3,98	4,23	0,198	508	408,09	0,04
35	C*07:01	10,4	4,17	4,21	0,823	446,14	415,26	0,53
36	C*04:01	7,9	4,42	4,19	0,259	395,18	420,47	0,674
37	C*04:03	7,9	4,13	4,21	0,613	478,55	413,33	0,265
38	C*12:02	6,1	4,56	4,19	0,115	327,41	424,38	0,06
39	C*14:02	5,7	3,9	4,23	0,107	562,44	409,71	0,007
40	C*15:05	6,1	4,2	4,21	0,982	467,59	415,29	0,36
41	C*15:02	4,6	4,22	4,21	0,933	367,46	420,97	0,45

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 tải lượng vi rút và tế bào CD4 có thể do tác động độc lập của từng alen, cũng có thể do tác động từ liên kết alen. Các alen B và C thường có sự liên kết với nhau. Sự liên kết của B*51:01, B*57:01 và C*06:01, C*14:02 được kiểm tra, áp dụng Welch's t test. Kết quả phân tích liên kết alen 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). Các liên kết alen này có thể tác động cộng hưởng tới số lượng tế bào CD4, không chỉ do tác động độc lập của từng alen.

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

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

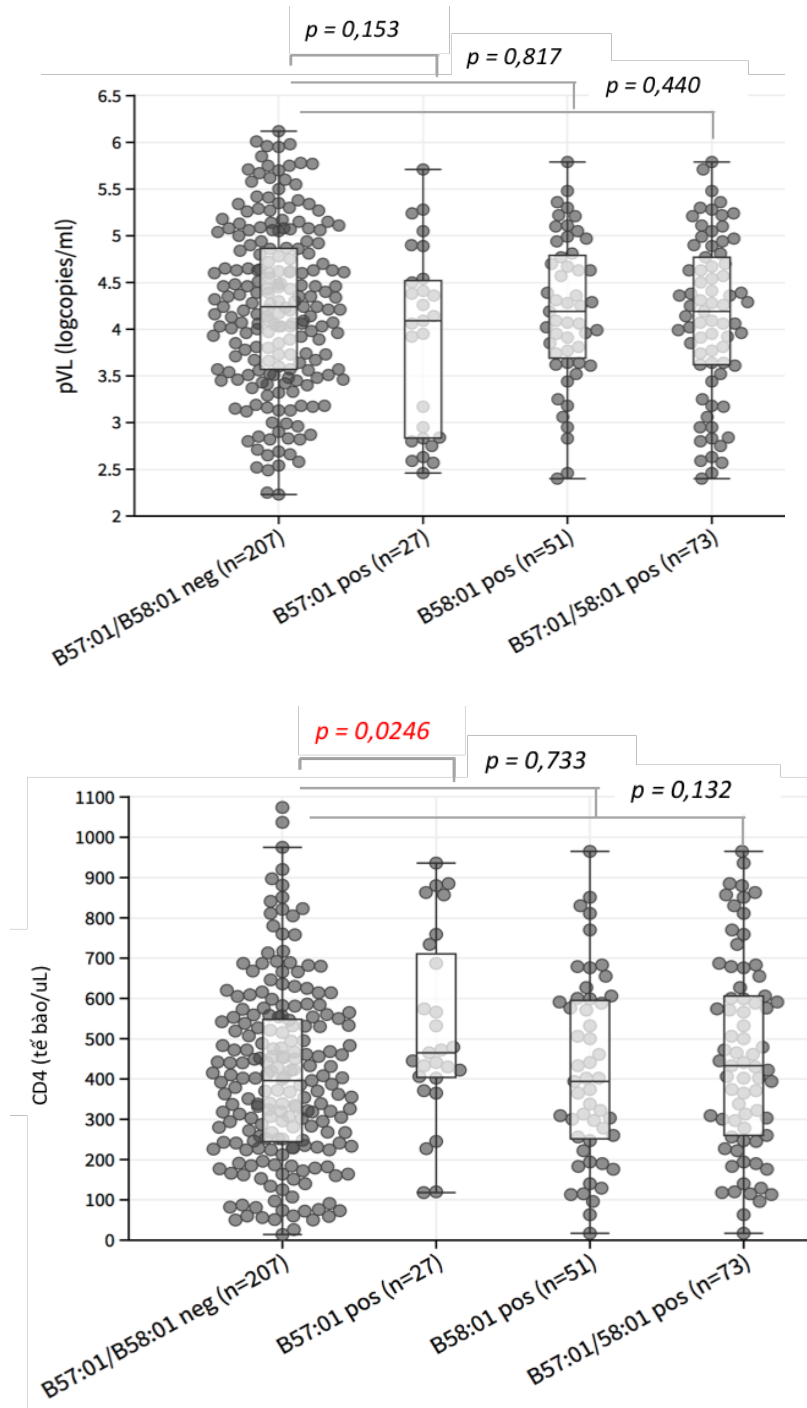
Các alen B*57 có liên quan chặt chẽ với B*58:01, bảo vệ chống lại tiến triển bệnh và cùng biểu hiện một epitope. Vì tần suất alen B*57:01 (AF=0,048) và B*58:01 (AF=0,092) tương đối cao, mối liên hệ của một trong hai alen với các thông số lâm sàng có thể bị che lấp bởi alen kia trong phân tích thống kê. Do đó, chúng tôi phân tích pVL và CD4 ở 4 nhóm bệnh nhân mang và không mang một trong hai alen này.

Nhóm bệnh nhân không mang cả hai alen (B57:01/58:01 neg, n=207) có pVL trung vị 4,24 logcopies/ml, cao nhất 6,12 logcopies/ml và thấp nhất 2,23 logcopies/ml. Số lượng tế bào CD4 của nhóm bệnh nhân này cao nhất là 1074 tế bào/ μ L, thấp nhất 14 tế bào/ μ L, trung vị 396 tế bào/ μ L. Các chỉ số này ở nhóm bệnh nhân mang cả hai alen (n=73) như sau: pVL trung vị 4,19 logcopies/ml (khoảng 2,4-5,79 logcopies/ml) và CD4 trung vị 433 tế bào/ μ L (khoảng 17-965 tế bào/ μ L).

Nhóm bệnh nhân mang alen B*57:01 (B57:01 pos, n=27) và B*58:01 (B58 pos, n=51) có tải lượng vi rút trong khoảng 2,46 - 5,71 logcopies/ml (trung vị 4,09

logcopies/ml) và 2,4 - 5,79 logcopies/ml (trung vị 4,19 logcopies/ml); CD4 trong khoảng 118 - 936 tế bào/ μ L (trung vị 465 tế bào/ μ L) và 17 - 965 tế bào/ μ L (trung vị 364 tế bào/ μ L), tương ứng.

Áp dụng kiểm định Mann-U Whitney, tải lượng vi rút 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 ($p=0,153$). Kết quả tương tự khi so sánh với nhóm bệnh nhân mang alen B*58:01 ($p=0,817$) và mang cả 2 alen B*57:01/58:01 ($p=0,440$). Như vậy, cả B*57:01 và B*58:01 đều không có tác động đối với pVL trong nhóm bệnh nhân tham gia nghiên cứu. Tuy nhiên, 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, vẫn cho thấy vai trò bảo vệ của B*57:01 đối với miễn dịch chống lại tiến triển nhiễm HIV.



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

169 đột biến liên kết tìm được trong nghiên cứu được đánh giá tương quan với tải lượng vi rút và số lượng tế bào CD4. Áp dụng kiểm định Mann-U Whitney trên nhóm bệnh nhân mang alen, so sánh pVL và CD4 ở những người mang vi rút dạng đột biến (mut) và dạng đồng thuận (cons). Kết quả phân tích ghi nhận 13 đột biến liên kết ảnh hưởng đến pVL và 6 đột biến liên kết có ảnh hưởng đến CD4 ($p < 0,05$). Kết quả trình bày trong bảng 3.13 và 3.14.

Bảng 3. 13. Đột biến liên kết với HLA liên quan đến tải lượng vi rút

HLA	Vị trí	Cons	Số BN alen +		pVL trung vị (Log copies/ml)		p
			Cons	Mut	Cons	Mut	
Gag							
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
Nef							
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
Vif							
A*33:03	131	R	20	40	4,27	4,63	0,037
Vpr							
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

Chú thích:

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

4 đột biến trên Gag, 6 đột biến trên Nef, 1 đột biến trên Vif và 2 đột biến Vpr liên quan đến pVL. Ba trong bốn đột biến Gag có tác động làm tăng pVL (hình 3.7), trong khi phần lớn các đột biến Nef làm giảm pVL (4/6 đột biến). Vif và Vpr đóng góp 3 đột biến liên kết và đều làm tăng pVL. Các đột biến liên kết gây bất lợi cho vi rút, làm giảm tải lượng gồm: GagT242-A*33:03, NefV11-C*06:02, NefT80-B*15:12/C*03:03 và NefE176-C*08:01. Phân tích trên nhóm bệnh nhân không mang alen không ghi nhận sự khác biệt đáng kể (hình 3.8).

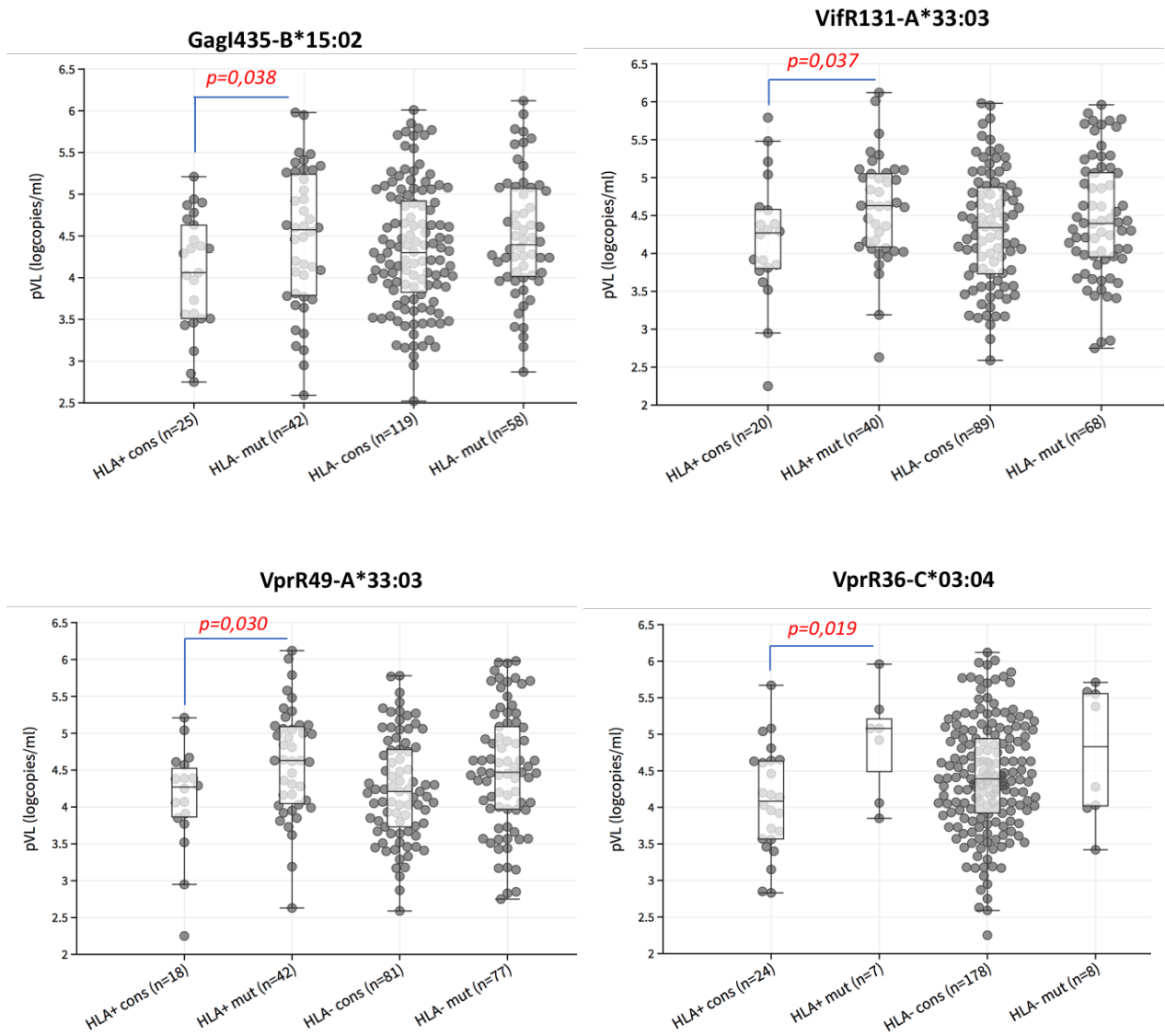
6 đột biến liên kết tìm được có liên quan đến giảm CD4, phân tích trên nhóm bệnh nhân mang alen ($p < 0,05$). Đột biến tại NefE108 làm giảm CD4 khi đồng thời liên kết với cả hai alen B*44:03 và C*07:01, thống kê có ý nghĩa với $p = 0,041$ và $p = 0,037$ tương ứng. Các phân tích trên nhóm người không mang hai alen này ($n = 222$) không ghi nhận sự khác biệt. Số lượng tế bào CD4 giảm tương tự ở nhóm bệnh nhân mang alen B*13:01 ($n = 18$), C*04:01 ($n = 19$), C*08:01 ($n = 78$) và A*01:01 ($n = 13$) khi xuất hiện đột biến liên kết tại GagS9, GagP482, NefS3 và NefS9 tương ứng. Duy nhất đột biến liên kết tại vị trí NefS9-A*01:01 cho thấy có tác động tăng pVL và giảm CD4 đồng thời.

Bảng 3. 14. Đột biến liên kết với HLA liên quan đến số lượng tế bào CD4

HLA	Vị trí	Cons	Số BN alen +		CD4 trung vị (tế bào/uL)		<i>p</i>
			Cons	Mut	Cons	Mut	
Gag							
B*13:01	9	S	10	8	412	187	0,029
C*04:01	482	P	14	5	430,5	134	0,018
Nef							
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

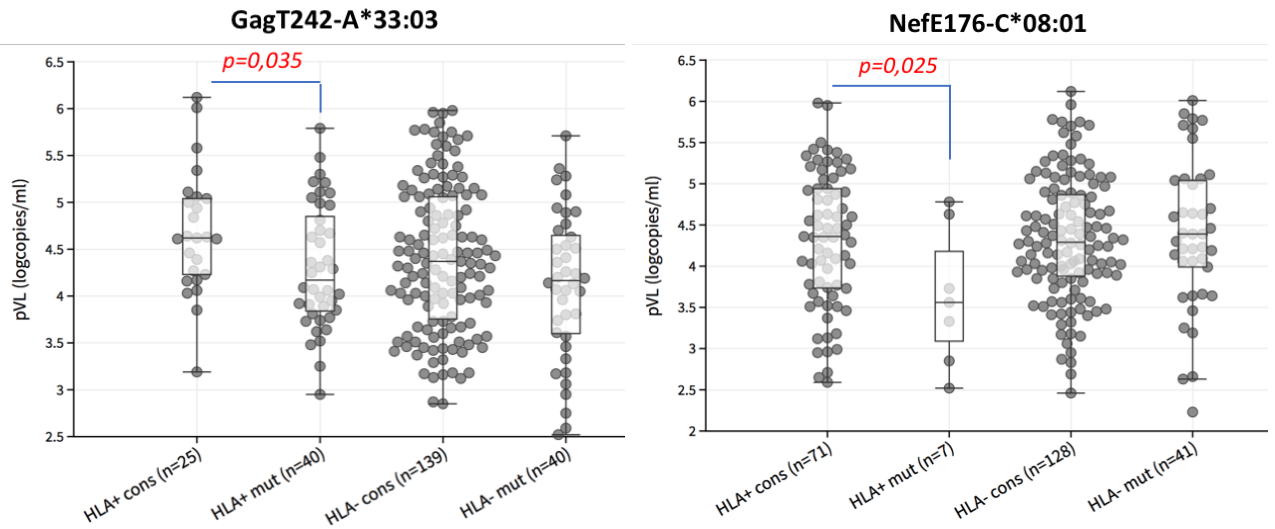
Chú thích:

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



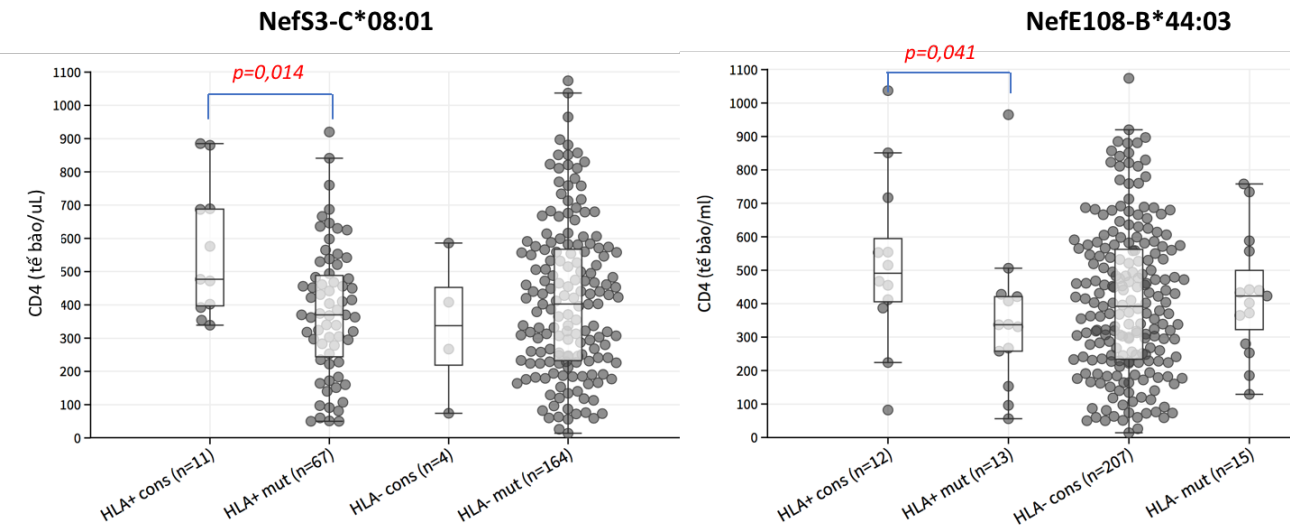
Hình 3. 7. Độ biến liên kết với HLA làm tăng tải lượng vi rút

Tải lượng vi rút được đánh giá trên nhóm bệnh nhân mang alen (HLA+) và không mang alen (HLA-) trong liên kết với vi rút dạng đồng thuận (cons) và dạng đột biến (mut). Mann Whitney được áp dụng với ngưỡng ý nghĩa thống kê $p < 0,05$



Hình 3. 8. Độ biến liên kết với HLA làm giảm tải lượng vi rút

Tải lượng vi rút được đánh giá trên nhóm bệnh nhân mang alen (HLA+) và không mang alen (HLA-) trong liên kết với vi rút dạng đồng thuận (cons) và dạng đột biến (mut). Mann Whitney được áp dụng với ngưỡng ý nghĩa thống kê $p < 0,05$

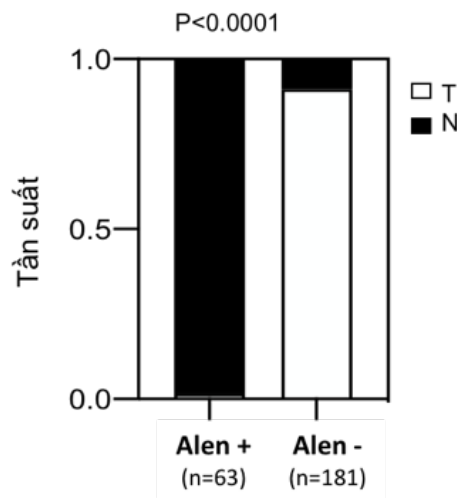


Hình 3. 9. Độ biến liên kết với HLA liên quan đến CD4

Số lượng tế bào CD4 được đánh giá trên nhóm bệnh nhân mang alen (HLA+) và không mang alen (HLA-) trong liên kết với vi rút dạng đồng thuận (cons) và dạng đột biến (mut). Mann Whitney được áp dụng với ngưỡng ý nghĩa thống kê $p < 0,05$

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

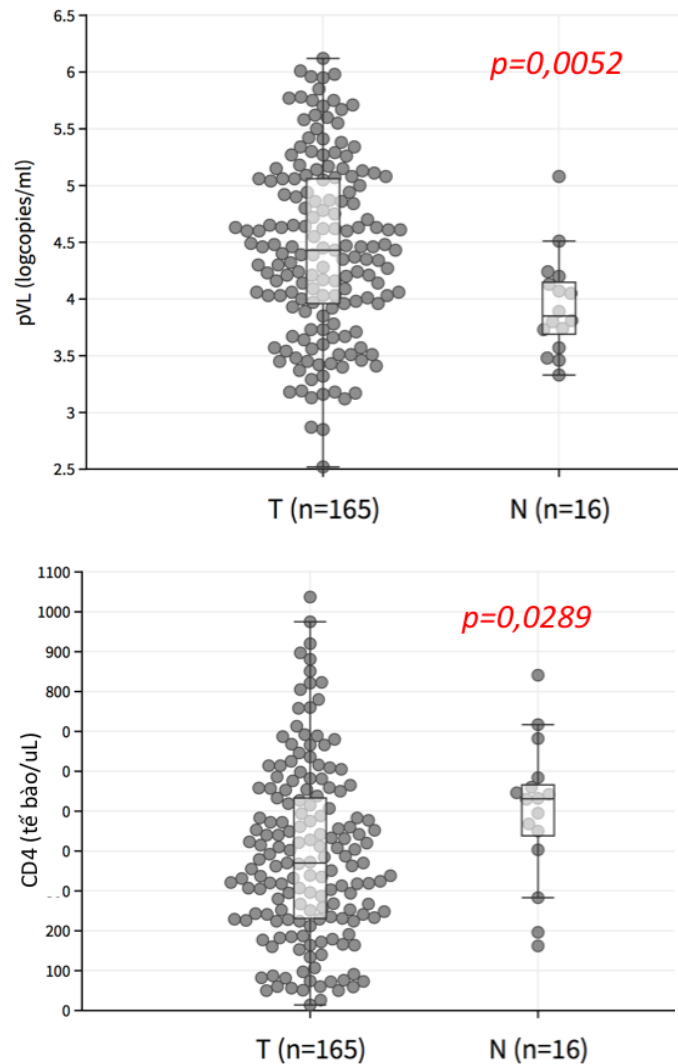
Trong nghiên cứu này, tần số đột biến của GagT242N trong nhóm bệnh nhân mang một trong hai alen B*57:01 và B*58:01 khá cao. Trong số 63 bệnh nhân mang alen B*57:01/58:01 duy nhất một cá thể tồn tại vi rút dạng đồng thuận T, 62/63 cá thể mang vi rút dạng đột biến N. Trong khi ở nhóm bệnh nhân không mang B*57:01/58:01 (n=181) số bệnh nhân mang đột biến N chiếm 8,84% (16/181). Sự khác biệt giữa hai nhóm có ý nghĩa thống kê, áp dụng Fisher's exact test ($p < 0,0001$) (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 $p < 0,05$*

Chúng tôi phân tích trên nhóm bệnh nhân không mang alen B*57:01/58:01 để đánh giá tác động độc lập của đột biến. Phân tích được thực hiện bằng kiểm định Mann-U Whitney, 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. 11. 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, riêng vị trí Gag T242N liên kết với cả hai alen được xác định trong nghiên cứu. 10 đột biến trong đó thuộc 8 epitope đã biết, số còn lại chưa có dữ liệu. Chúng tôi khảo sát khả năng gắn của 8 epitope này khi có sự khác biệt về trình tự giữa các phân típ CRF01_AE, B và C. Trình tự đồng thuận epitope mỗi phân típ được đăng tải lên sở dữ liệu NetMHCpan 4.1 và xem xét chỉ

số rank EL (như đã mô tả mục 2.9). 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 (bảng 3.15).

Bảng 3. 15. Khả năng gắn epitope có đột biến liên kết với B*57:01/58:01 theo các phân típ HIV-1

Protein	HLA lớp I	Vị trí	cons	B C CRF01_AE	%Rank EL	Mức độ gắn kết
Gag	B*58:01	86	W	KSLYNTVATLY	0,447	SB
				R-----	0,494	SB
				---F-----W	0,031	SB
Gag	B*57:01	146	P	ISPRTLNAW	0,144	SB
				-----	-	-
Gag	B*58:01	242	T	L-----	0,172	SB
				TSTLQEQIGW	0,094	SB
Gag	B*58:01	242	T	-----A-	0,081	SB
				-----	-	-
Gag	B*57:01	242	T	TSTLQEQIGW	0,105	SB
				-----A-	0,096	SB
Gag	B*58:01	310	T	-----	-	-
				QASQEVKNW	0,055	SB
Gag	B*58:01	310	T	--T-D----	0,088	SB
				--T-----	0,09	SB
Nef	B*58:01	83	G	KGALDLSHF	1,111	WB
				-A-F---F-	0,256	SB
				---F---F-	1,194	WB
Nef	B*58:01	116	N	HTQGYFPDW	0,099	SB
				----F----	0,072	SB
				N---F----	0,333	SB
Vif	B*57:01	33	K	ISKKAKGWF	0,953	WB
				---R-N---	0,973	WB
Vif	B*57:01	37	K	V-----K--	0,688	WB

Chú thích:

%rank EL (eluted ligand): tỷ lệ % peptide được trình diện từ các tế bào trình diện kháng nguyên APC

SB = strong binding: mức độ gắn chặt chẽ, WB = weak binding: mức độ gắn yếu

Để khảo sát hiệu quả trình diện kháng nguyên của các epitope liên kết với B*57:01 và B*58:01 khi có sự sai khác về trình tự giữa các phân típ B, C và CRF01_AE, chúng

tôi sử dụng công cụ NetCTLpan trong cơ sở dữ liệu IEDB (Immune Epitope) [105]. Điểm tổng hợp (combine score) tỷ lệ với số lượng peptide được trình diện bởi MHC trên bề mặt tế bào T. Tỷ lệ %rank cho biết % số peptide cao nhất có vai trò kháng nguyên trong một tập hợp peptide (chiều dài 9 axit amin) tự nhiên ngẫu nhiên. Các peptide có %rank <1 là các epitope tiềm năng. Tổng số 10 epitope giới hạn bởi B*57:01/58:01 bao phủ các vị trí đột biến liên kết tìm được trong nghiên cứu đã được khảo sát và trình bày trong bảng 3.16. Kết quả cho thấy 7/10 epitope phân típ CRF01_AE giảm hiệu quả trình diện kháng nguyên so với phân típ B và C.

Bảng 3. 16. Hiệu quả trình diện kháng nguyên của B*57:01/58:01 theo các phân típ HIV-1

Protein	CONS B	CONS C	CONS AE	HLA giới hạn	Dự đoán epitope			
					B*57:01		B*58:01	
					combined	% rank	combined	% rank
Gag 147-155	NLQGQMVHQA	<u>ISPRTLNAW</u>	VKVVEEKAFSP	B*57:01	0,613	0,8	0,765	0,8
	-----	-----	---I-----		0,614	-	0,766	-
	-A-----P	L-----	-----G-N-		0,544	1	0,698	-
Gag 162-172	LNAWVKVVEE	<u>KAFSPEVIPMF</u>	SALSEGATPQ	B*57:01,	0,895	0,05	0,966	0,1
	-----I--	-----	T-----		B*57:03	0,892	-	0,963
	-----	-G-N-----	-----	0,598	0,8	0,653	1,5	
Gag 240-249	EPRGSDIAGT	<u>TSTLQEQIGW</u>	MTNNPPIPVEE	B*57:01,	0,599	0,8	0,836	0,3
	-----	-----A-	--S-----D		B*58:01	0,645	-	0,865
	-----	-----	--S-----D	0,609	-	0,846	-	
Nef 82-90	PQVPLRPMTY	<u>KGALDLSHF</u>	LKEKGGLEGL	B*57:03,	0,373	10	0,364	7
	-----	-A-F---F-	-----		B*58:01	0,541	1,5	0,359
	-----	---F---F-	-----D--	0,313	-	0,33	10	
Nef 83-91	QVPLRPMTYK	<u>GALDLSHFL</u>	KEKGGLEGLI	B*58	0,373	10	0,467	4
	-----	A-F---F--	-----		0,541	1,5	0,73	0,8
	-----	--F---F--	-----D--		0,313	-	0,428	5
Nef 116-124	RQDILDWVY	<u>HTQGYFPDW</u>	QNYTPGPGIR	B*57:03,	0,828	0,1	0,913	0,2
	--E-----	----F----	-----V-		B*58:01,	0,851	-	0,921
	--E-----	N---F----	-----	B57	0,669	0,4	0,747	0,8
Nef 119-127	ILDWVYHTQ	<u>GYFPDWQNY</u>	TPGPGIRYPL	B*58	0,366	10	0,384	7
	-----	-F-----	-----V----		0,386	-	0,417	5
	-----N--	-F-----	-----		0,387	-	0,418	5
Vif 31-39	WKSLVKHHMY	<u>ISKKAKGWF</u>	YRHHYESTHP	B*57:01	0,381	10	0,339	9
	-N-----	---R-N---	-----R--		0,492	1,5	0,472	4
	-H-----	V----K--	-----Q--		0,29	16	0,241	32
Vif 81-89	GLHTGERDWH	<u>LGQGVSI EW</u>	RKRRYSTQVD	B*57:03	0,673	0,4	0,887	0,2
	--Q-----	--H-----	-L-----		0,683	-	0,881	0,3
	--Q---K--Q	--H-----	-Q-K---I-		0,681	-	0,879	0,3
Vpr 30-38	LELLEELKSE	<u>AVRHFPRPW</u>	LHGLGQYIYET	B*57:01	0,565	1	0,519	3
	-----Q-	-----	--S-----		0,586	0,8	0,54	-
	-----N-	-----	-----N-		-	-	-	-

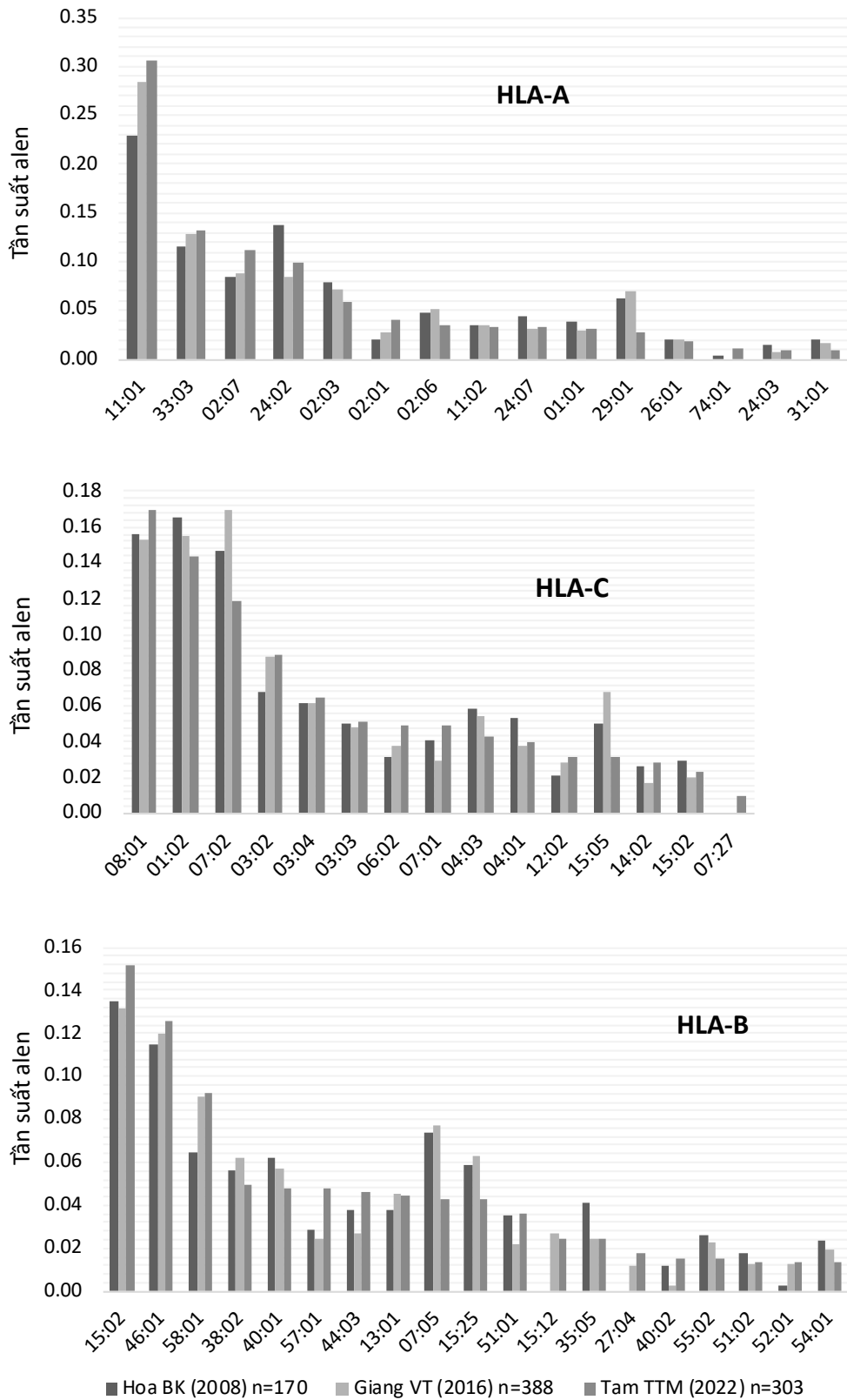
CHƯƠNG IV. BÀN LUẬN

4.1. Vai trò một số kiểu gen HLA lớp I trong nhiễm HIV-1 phân típ CRF01_AE

4.1.1. Tần suất một số alen HLA lớp I ở Việt Nam

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.

A*11 là một trong những alen phổ biến nhất trong các quần thể trên toàn thế giới, tần suất dao động từ 4 đến 33% và rất phổ biến ở Đông Nam Á cũng như Việt Nam [125]. Kết quả A*11 tương tự được tìm thấy trong nghiên cứu với AF=0,307 và cao hơn so với cơ sở dữ liệu năm 2008 và 2016. B*15:02 vẫn là alen B có tần suất cao nhất (AF=0,152). Tần suất alen này cao hơn khá nhiều khi so sánh với dữ liệu năm 2008 (AF=0,135) và 2016 (AF=0,131). Trong khi đó ở alen C có sự thay đổi thứ tự ở 3 alen tần số cao nhất. C*08:01 có tần suất cao hơn so với năm 2008 và 2016. Ngược lại C*01:02 tần suất thấp hơn. Riêng C*07:02 có tần suất cao trong nghiên cứu năm 2016 (AF=0,170) so với năm 2008 (AF=0,147), nhưng lại có tần suất thấp hơn trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi (AF=0,119).



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.

Liên kết của alen **B*57:01**, **B*57:03** và **B*58:01** với tải lượng vi rút thấp đã được tìm thấy trong các nghiên cứu thực hiện với bệnh nhân nhiễm HIV-1 nhóm A, B và C, trong khi mỗi liên kết này ít thấy ở các quần thể Đông Nam Á lưu hành chủ yếu HIV-1 kiểu gen CRF01_AE [72]. Tần suất B*57:01 (AF=0,024) và B*58:01 (AF=0,090) đã được ghi nhận ở Việt Nam trong nghiên cứu năm 2016 (n=388) [207]. Trong nghiên cứu này B*57:01 có tần suất cao hơn (AF=0,048) và B*58:01 có tần suất tương đồng (AF=0,092), không tác động đến tải lượng vi rút. Mặc dù B*57:01 có liên kết với số lượng tế bào CD4 cao hơn ($p=0,012$), nhưng không loại trừ được liên kết alen với C*06:02, do đó chưa xác định được tác động đối với CD4 là do B*57:01 độc lập hay do cộng hưởng trong liên kết với alen khác.

B*27 cũng là một alen bảo vệ đại diện cho quần thể người da trắng nhưng không đặc trưng ở Việt Nam. Các alen B*27 lưu hành với tần suất thấp, gồm B*27:04 (AF=0,018), B*27:06 (AF=0,008) và B*27:04 (AF=0,003). Thậm chí B*27:04 có tần suất thấp hơn so với nghiên cứu trước đây (AF=0,021) [207].

B*35:05 đã được báo cáo có liên kết với tải lượng vi rút thấp ở những người mang alen (N=17) so với những người không mang alen ở Thái Lan (n=557), gợi ý rằng B*35:05 bảo vệ cơ thể [153]. Tuy nhiên, B*35:05 không có tính bảo vệ trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi, mặc dù tần số của alen này (AF=0,025) tương đương so với nhóm Thái Lan (AF=0,029).

C*12:02 có liên quan đáng kể đến tải lượng vi rút thấp và số lượng tế bào CD4 cao trong nghiên cứu công bố năm 2018 ở Việt Nam (n=536, AF=0,056) [207]. Kết quả của chúng tôi ghi nhận C*12:02 có tần suất thấp hơn (AF=0,031) và không ghi nhận tác động đối với tải lượng vi rút và số lượng tế bào CD4.

C*04 có tác động loại bỏ chu trình miễn dịch ở quần thể Thái Lan. Mặc dù C*04:03 (AF=0,043) có tần suất tương đương nhưng không tìm thấy có tác động nào đối với pVL và CD4 trong nhóm bệnh nhân được tuyển chọn.

Tỷ lệ bệnh nhân tuyển chọn vào nghiên cứu mang kiểu gen HLA đồng hợp tử là HLA-A (17,5%), HLA-B (6,6%) và HLA-C (6,9%). Trong tổng số 100 bệnh nhân mang kiểu gen đồng hợp tử một trong các alen HLA lớp I, 35 bệnh nhân là nữ, 5/6 bệnh nhân

nữ mang kiểu gen đồng hợp tử với cả ba alen HLA-A, B và C. Độ tuổi của những bệnh nhân này từ 19 – 41. Nguy cơ lây truyền HIV cao từ các bà mẹ mang HLA đồng hợp tử bất kể loại alen nào đã được xác định [56]. Do đó, những bệnh nhân này nên được tư vấn về nguy cơ lây truyền nhiễm HIV và sử dụng biện pháp dự phòng lây truyền nếu sinh con.

4.1.2. Tác động bảo vệ B*51:01 với nhiễm HIV-1 phân típ CRF01_AE

B*51 là một alen phổ biến ở Trung Quốc và phần lớn Châu Á. Nghiên cứu năm 2016 đã xác định B*51:01 là alen có tác động bảo vệ, làm chậm tiến triển AIDS ở Thái Lan [67]. 99 trường hợp nhiễm HIV-1 đã được theo dõi trong thời gian trung bình là 3.7 năm sau khi xác định kiểu gen HLA. Trong thời gian này, 58 người tham gia đã chết. Tỷ lệ sống sau 3 năm ở người mang alen B*51 là 75%, so với người không mang alen là 52%.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận vai trò bảo vệ tương tự của B*51:01 trên nhóm bệnh nhân nhiễm HIV-1 phân típ CRF01_AE ở Việt Nam. B*51:01 là alen duy nhất trong nghiên cứu cho thấy có sự khác biệt pVL và CD4. Số bệnh nhân mang alen B*51:01 chiếm 6,4% (bảng 3.8). Tải lượng vi rút thấp ở nhóm bệnh nhân mang alen so với nhóm không mang alen ($p=0,018$), trung bình từ 4,24 – 3,82 LogCopies/ml và số lượng tế bào CD4 tăng trung bình từ 410,71 – 527,06 tế bào/ μ L ($p=0,02$).

Phân tích các đột biến trốn thoát CTL chịu áp lực chọn lọc bởi B*51 có thể giúp tiết lộ lý do tại sao B*51 hiệu quả hơn trong việc kiểm soát HIV-1 so với các alen khác. Thông thường các alen HLA bảo vệ có xu hướng gây áp lực chọn lọc mạnh mẽ lên các vị trí ở Gag và mức độ thấp hơn là Pol [31, 210]. Theo đó, các epitope ưu thế nhất ở những cá thể mang B*51 đã được chỉ ra gồm Gag 327-345 (NI9) NANPDCKTI, Pol 743-751(LI9) LPPVVAKEI và RT 128-135 (TI8) TAFTIPSI [224]. Sự tiến triển của bệnh có liên quan đến thứ tự nhận diện các epitope và hình thành nhiều lớp đáp ứng miễn dịch, mang lại sự bảo vệ hiệu quả cho bệnh nhân mang alen B*51. Thứ tự nhận diện epitope bắt đầu từ đáp ứng với LI9, sau đó là TV8 và NI9 [224].

Các vị trí đột biến có liên kết với HLA có sự đa dạng ở mức độ lớn hơn so với các vị trí không liên kết với HLA. Áp lực miễn dịch tại các vị trí này xảy ra liên tục và mạnh mẽ, là cơ sở cho các hậu quả miễn dịch tiềm tàng. Nghiên cứu đột biến liên kết với HLA có ý nghĩa sâu sắc trong việc dự đoán sự thích ứng của HIV-1 ở cấp độ quần thể và cá thể. Như trường hợp của alen B*51, nghiên cứu gần đây ở Nhật Bản đã chỉ ra rằng alen này đã không còn vai trò bảo vệ nữa, vì HIV-1 lưu hành đã có đột biến trốn thoát ở một trong những epitope giới hạn bởi B*51 [100]. Đột biến trốn thoát được ghi nhận xảy ra ở đầu tận C của epitope, RT I135X trên epitope TI8, đã không khôi phục trở về dạng hoang dã khi truyền cho các cá thể không mang B*51 sau đó [28]. I135X xuất hiện ở 203/213 (96%) cá thể mang alen B*51. Các biến thể I135X không ảnh hưởng đến khả năng nhân lên của vi rút *in vitro*, ngoại trừ đột biến I135V hiếm gặp, và ảnh hưởng đáng kể đến liên kết của epitope – HLA. Các cá thể mang alen B*51 lây truyền biến thể vi rút mang đột biến I135X sẽ không thể tạo ra đáp ứng CTL dành riêng cho epitope TI8. Đột biến trốn thoát I135X ở quần thể người Nhật Bản là minh chứng điển hình cho sự thích nghi của vi rút ở những alen có tác động bảo vệ.

Trong nghiên cứu của chúng tôi không ghi nhận đột biến liên kết với B*51 trên gen *gag*. Mặc dù xuất hiện 2 đột biến liên kết với B*51:01 tại vị trí codon Nef 13 và Nef 15 nhưng không ghi nhận tác động đến pVL và CD4. Các đột biến trốn thoát CTL tương tự như ở quần thể Nhật Bản gợi ý sự xuất hiện tương tự ở quần thể người Việt Nam, hay Thái Lan, mục tiêu nhắm đến các epitope giới hạn bởi alen B*51. Các nghiên cứu tiếp nối là cần thiết để giám sát khả năng phát sinh đột biến này và khả năng thích nghi của vi rút HIV-1 phân típ CRF01_AE.

4.1.3. Giảm tác động bảo vệ của B*57:01/58:01 trong nhiễm HIV-1 phân típ CRF01_AE

B*57:01/58:01 được xác định là alen bảo vệ kiểm soát nhiễm vi rút HIV-1 ở phân típ B. B*57 có tác động mạnh nhất đến tải lượng vi rút và tiến triển bệnh [115]. Đáp ứng CTL hạn chế bởi các phân tử B*57 nhắm vào nhiều peptide HIV-1 chủ yếu trên protein Gag [107]. Dự án Nghiên cứu HIV của Zambia-UAB (ZUHRP) trên tổng số 259 người nhiễm HIV chủng C (137 nữ và 122 nam), bằng phân tích mô hình tuyến tính các tác

giả đã chỉ ra những người mang alen B*57 có tải lượng vi rút thấp ngay cả ở dạng dị hợp liên kết với B*39. Tác động của alen này vẫn mạnh mẽ khi điều chỉnh mô hình theo tuổi, giới tính và thời gian nhiễm [200].

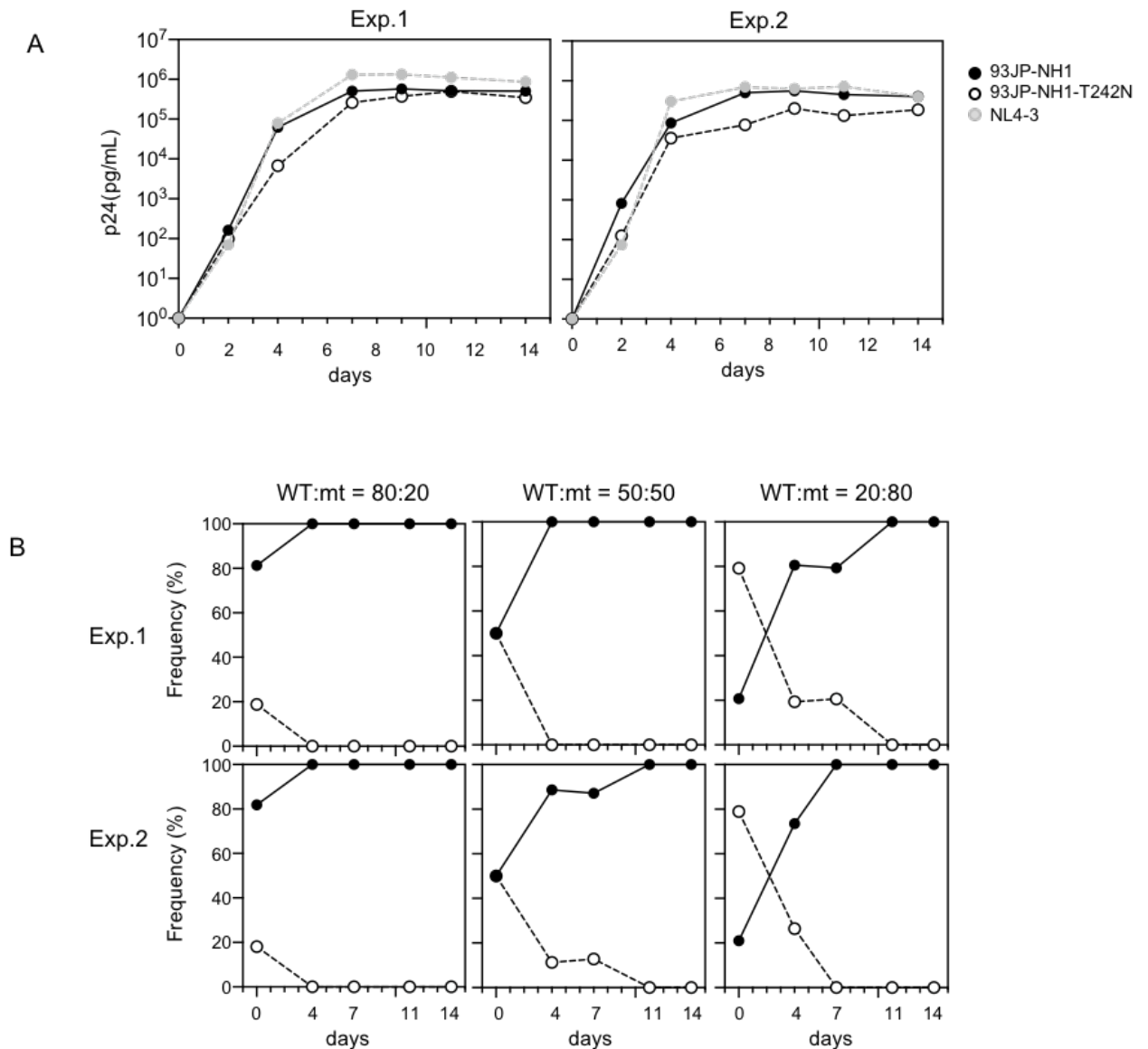
Ở quần thể người Châu Phi cận Sahara, nơi dịch HIV tập trung, B*57:03 là kiểu gen alen phổ biến nhất với tỷ lệ xuất hiện 4-5%. B*57:02 là loại alen phổ biến thứ hai. Các alen B*57 có liên quan chặt chẽ với B*58:01, đều bảo vệ chống lại tiến triển bệnh của vi rút HIV và có sự chia sẻ biểu hiện của cùng một epitope. Mức độ bảo vệ theo thứ tự tăng dần: B*58:01, B*57:02, và B*57:03 [109].

Trong nghiên cứu này, vai trò của HLA-B*57:01/58:01 với nhiễm HIV-1 CRF01_AE được khảo sát ở 280 người bệnh, không ghi nhận vai trò bảo vệ của HLA-B*57:01/58:01, pVL và CD4 không khác biệt giữa hai nhóm bệnh nhân mang và không mang một trong hai alen này. B*57:01/58:01 nhận biết và trình diện epitope HIV-1 Gag TW10 tạo đáp ứng đặc hiệu với tế bào T CD8 giữ vai trò quan trọng trong kiểm soát nhiễm HIV-1. Phát hiện này đã được báo cáo từ nghiên cứu trên quần thể nhiễm HIV-1 phân típ B hoặc C chiếm ưu thế. Trên epitope này, đột biến trốn thoát thường xảy ra tại vị trí Gag 242, Threonine (T) thành Asparagine (N), được chọn lọc dưới áp lực alen B*57:01/58:01. Khi có đột biến Gag T242N, epitope HIV-1 Gag TW10 hoàn toàn không bị nhận diện [121, 148].

Hầu hết bệnh nhân mang alen B*57:01/58:01 có biến thể HIV-1 mang đột biến Gag T242N (62/63 bệnh nhân), bệnh nhân không mang alen có tỷ lệ biến thể đột biến chỉ là 8,84% (16/181 bệnh nhân). Ảnh hưởng của đột biến GagT242N được phân tích trên bệnh nhân không mang alen B*57:01/58:01, nhóm có biến thể đột biến T242N có tải lượng vi rút thấp hơn ($p=0,0052$) và số lượng CD4 cao hơn ($p=0,0289$) so với nhóm không mang đột biến. Kết quả này gợi ý rằng biến thể đột biến T242N đã bị giảm khả năng nhân lên so với dạng hoang dã.

Trong công bố gần nhất chúng tôi đã đánh giá tác động của đột biến Gag T242N đối với sinh lực của vi rút trên mô hình *in vitro* [147]. Khả năng nhân lên của biến thể CRF01_AE mang đột biến T242N (93JP-NH1- T242N) được so sánh với vi rút HIV-1 phân típ B (NL4-3) và CRF01_AE (93JP-NH), không có sự khác biệt. Tuy nhiên trong

thử nghiệm cạnh tranh, vi rút dạng hoang dã trở nên chiếm ưu thế trong vòng 4 ngày, ngay cả khi tỷ lệ gây nhiễm ban đầu thấp (WT:mt=20:80). Như vậy, đột biến T242N thực sự làm giảm khả năng nhân lên của phân típ CRF01_AE, như đã được chứng minh với HIV-1 phân típ B. Kết quả thí nghiệm đánh giá khả năng nhân lên của biến thể đột biến T242N trên mô hình *in vitro* đã khẳng định thêm vai trò của T242N với sự thích ứng của HIV-1 phân típ CRF01_AE. Một số đột biến khác trên protein Gag như H219Q, I223V, M228I, G248A có khả năng khôi phục lại sinh lực cho biến thể đột biến T242N ở phân típ B, nhưng phần lớn bệnh nhân trong nghiên cứu của chúng tôi không xuất hiện các đột biến này.



Hình 4. 2. Tác động của đột biến Gag T242N đối với sinh lực của vi rút *in vitro* [147]

(A) Khả năng sao chép của vi rút HIV-1 93JP-NH1 (phân típ CRF01_AE) và biến thể T242N trong các tế bào PM1. (B) Thử nghiệm cạnh tranh giữa 93JP-NH1 (WT) và biến thể T242N (mt) trong các tế bào PM1, kết quả từ hai thí nghiệm (Exp.) độc lập.

Các đột biến của phân típ CRF01_AE xuất hiện nhiều nhất xung quanh các epitope giới hạn bởi B*57/58:01, nhưng không ảnh hưởng đến khả năng gắn kháng nguyên với B*57/58:01 (bảng 3.13). Đồng thời, khả năng trình diện kháng nguyên của B*57/58:01 giảm xuống ở phân típ CRF01_AE so với phân típ B, C (bảng 3.14). Điều này có thể giúp giải thích hiện tượng giảm vai trò bảo vệ của alen B*57:01/58:01 đối với phân típ CRF01_AE.

Phân típ CRF01_AE có nguồn gốc ở Trung Phi và đã được tìm thấy vào giữa những năm 1980 từ Cộng hòa Dân chủ Congo [98]. Trình tự đầy đủ lâu đời nhất của CRF01_AE Gag ở Trung Phi đã được báo cáo vào năm 1990 trong cơ sở dữ liệu trình tự HIV của Los Alamos (ID: AF197340, AF197341, HIVU51188) và tương đồng với trình tự đồng thuận năm 2021 [12, 68]. Các đột biến đặc trưng cho CRF01_AE trong epitope Gag147-155 và Gag165-172 đã được báo cáo là các đột biến trốn thoát CTL [57, 122, 204]. Đáng chú ý, một trong những trình tự Gag lâu đời nhất (AF197340) sở hữu đột biến T242N, phát sinh dưới áp lực CTL đối với epitope TW10. Điều này gợi ý rằng phân típ CRF01_AE có thể bắt nguồn từ vi rút đã thích nghi trong các cá thể mang B*57 hoặc B*58:01.

4.1.4. Ảnh hưởng của kiểu gen HLA lớp I trong điều trị thuốc ARV

Một số bệnh nhân nhiễm HIV-1 sử dụng thuốc điều trị ARV gặp phải các phản ứng quá mẫn với thuốc, được xác định là do yếu tố di truyền vật chủ kiểu gen HLA. Abacavir là một loại thuốc kháng retrovirus thuộc nhóm thuốc NRTI thường được sử dụng để điều trị HIV-1. Sự hiện diện của B*57:01 có thể gây ra hội chứng quá mẫn với thuốc (abacavir hypersensitivity syndrome – AHS) [132]. AHS xảy ra ở 2-8% bệnh nhân người da trắng nhiễm HIV, trong vòng 10-40 ngày đầu sau khi bắt đầu điều trị và có thể gây tử vong [177]. Ở Hoa Kỳ và Châu Âu trước khi kê đơn điều trị bằng abacavir, tất cả bệnh nhân nhiễm HIV-1 được khuyến nghị sàng lọc B*57:01.

Ở Việt Nam chưa có khuyến nghị nào liên quan đến việc điều trị thuốc tương tự, có thể do không ghi nhận các trường hợp quá mẫn hoặc liên quan đến độc lực của các thuốc. Sự khác nhau trong liên kết HLA gây ra phản ứng thuốc có thể được giải thích bằng việc lưu hành vi rút HIV khác nhau, hoặc các yếu tố liên kết chưa được biết đến.

Tuy vậy, tần suất lưu hành của alen này ở Việt Nam tương đương hoặc cao hơn so với các quần thể khác [129]. B*57:01 lưu hành ở quần thể người da trắng AF=0,042 (n=265) và Thái Lan AF=0,012 (n=470). Trong khi tần suất B*57:01 ở Việt Nam là AF=0,048. Tương tự, B*35:05 đã cho thấy mối liên hệ với độc tính của thuốc Nevirapine. B*35:05 lưu hành ở người da trắng và Thái Lan tương ứng AF=0,004 (n=265) và AF=0,019 (n=470) [131]. Trong khi tần suất của alen này ở Việt Nam lên đến AF=0,025. Từ đó cho thấy cần thiết phải có những đánh giá hoặc nghiên cứu về phản ứng của thuốc liên kết với các alen lưu hành trong mỗi quần thể.

Bảng 4. 1. Một số alen liên quan đến đáp ứng thuốc ở bệnh nhân điều trị ARV [129]

Thuốc	HLA	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	0,048
Nevirapine	B*35:05	Hội chứng Stevens-Johnson, hoại tử	0,004	0,019	0,025

Đã có những câu hỏi đặt ra rằng liệu yếu tố di truyền vật chủ có ảnh hưởng đến cơ chế kiểm soát vi rút ngay cả sau khi bệnh nhân điều trị thuốc ARV hay không? Một vài nghiên cứu rải rác đã được triển khai để xem xét mối tương quan giữa kiểu gen HLA và sự tiến triển của bệnh ở những bệnh nhân đang sử dụng thuốc [5, 19]. Sự không đồng nhất trong tiến triển bệnh giữa các cá nhân đã được ghi nhận. Mặc dù các kết quả đến nay chưa thực sự rõ ràng, nhưng đã cho thấy yếu tố di truyền vật chủ có thể tiếp tục ảnh hưởng đến tiến triển của bệnh sau khi điều trị thuốc ARV [172].

Trạng thái tiềm ẩn của vi rút HIV-1 (proviral) đang là thách thức đối với các liệu pháp điều trị cho bệnh nhân nhiễm HIV. Vật liệu di truyền của vi rút tích hợp vào bộ gen của tế bào vật chủ, tồn tại dạng proviral DNA và không chuyển hoá. Proviral DNA được mang theo thụ động trong DNA của tế bào vật chủ khi nó sao chép từ thể hệ này sang thể hệ khác, gọi là nhiễm trùng tiềm ẩn (latent infection), tế bào chủ bị nhiễm vi rút được gọi là ổ chứa tiềm ẩn (latent reservoirs). Một nhiễm trùng tiềm ẩn có thể đột

ngột trở nên hiệu quả để đáp ứng với những thay đổi trong môi trường vật chủ hoặc sức khỏe của cá nhân bị nhiễm bệnh. Trong nhiễm HIV, điều này thường xảy ra khi điều trị ARV không thành công hoặc khi hệ thống miễn dịch cạn kiệt do nhiễm trùng.

HLA-B*27 và B*57 đã được tìm thấy trong các EC/LTNP có lượng proviral DNA thấp, cho thấy rằng các phân tử HLA lớp I có thể có tác động đến kích thước của ổ chứa HIV-1 tiềm ẩn [53, 155]. Dữ liệu từ các phân tích thử nghiệm đã cho thấy mối liên quan giữa các alen B*27 và B*57 đối với khả năng hồi phục của vi rút giảm [172]. Ngoài ra, ở những người nhiễm HIV-1 mãn tính, điều trị ARV ức chế kéo dài, sự hiện diện của B*39 và B*55 có thể liên quan đến proviral DNA thấp, nhấn mạnh sự cần thiết phải đánh giá sâu vai trò của các kiểu gen HLA lớp I trong việc ảnh hưởng đến kích thước của ổ chứa tiềm ẩn trong các nghiên cứu lớn hơn.

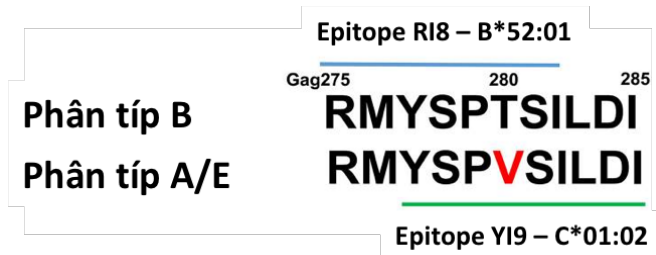
Hầu hết mối liên kết kiểu gen HLA với tiến triển bệnh ở những bệnh nhân không điều trị ARV lại không quan sát thấy ở những bệnh nhân được điều trị, một số có thể đối nghịch nhau. Giả thuyết được đặt ra để lý giải cho việc này, là do các thuốc ARV có tác động kháng vi rút mạnh, bất kể kiểu gen HLA của bệnh nhân và gây áp lực chọn lọc mạnh mẽ lên các vùng gen liên quan đến kháng thuốc, phần lớn ở gen *pol* và *env* [90, 227]. Trong khi đáp ứng CTL chủ yếu nhận diện các epitope trong gen *gag*, *nef* và *pol*. Áp lực chọn lọc đối với gen *pol* có thể thay đổi sự phân bố của các kháng nguyên HIV trình diện cho tế bào T, do đó làm thay đổi các liên kết HLA đã thiết lập. Tuy nhiên, ngay cả khi giả thuyết này đúng, vẫn chưa rõ tại sao một số ít kiểu gen HLA có khả năng bảo vệ ở bệnh nhân chưa từng điều trị ARV nhưng lại có nguy cơ cao tiến triển bệnh ở bệnh nhân được điều trị.

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

4.2.1. Các đột biến trên protein Gag

Gag V280T liên kết với C*01:02 đã được xác định là đột biến trốn thoát CTL trong công bố năm 2016, đến nay đây vẫn là đột biến trốn thoát CTL duy nhất được ghi nhận ở quần thể người Việt Nam [207]. Cơ chế trốn thoát của đột biến này đã được tìm hiểu bằng các thử nghiệm *in vitro*. Theo đó, các tế bào T đặc hiệu GagYI9-4V (dạng đồng thuận) trong nhiễm vi rút phân tít CRF01_AE nhận diện yếu ớt hoặc không có khả

năng nhận ra tế bào nhiễm vi rút mang đột biến GagV280T [223]. 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. Bản đồ epitope cho thấy kết quả phù hợp khi epitope YI9 giới hạn bởi C*01:02 bao phủ vị trí Gag280 giảm hiệu quả trình diện kháng nguyên.



Hình 4. 3. Trình tự đồng thuận Gag275-285 vi rút HIV-1 phân tí B và CRF01_AE

*Trình tự đồng thuận của protein Gag từ codon 275–285. Epitope YI9 phân tí CRF01_AE giới hạn bởi C*01:02 (màu xanh lá) và epitope RI8 phân tí B giới hạn bởi B*52:01 (màu xanh da trời). Vị trí codon 280 khác nhau giữa hai phân tí (màu đỏ).*

Trình tự đồng thuận của phân tí B và CRF01_AE tại epitope RI8 (Gag275-282) và YI9 (Gag277-285) khác nhau duy nhất codon Gag280, với Threonine (T) và Valine (V) tương ứng. Gag280 được chọn lọc bởi các tế bào T đặc hiệu epitope GagRI8 hạn chế bởi alen B*52:01 trong các trường hợp nhiễm phân tí B, nhưng đột biến này lại chỉ liên kết với alen C*01:02 thay vì B*52:01 trong các trường hợp nhiễm phân tí CRF01_AE [223]. Các tế bào T đặc hiệu với RI8-6T/6V giới hạn bởi B*52:01 được tạo ra một cách hiệu quả ở cả nhiễm phân tí B và CRF01_AE. Chúng nhận diện hiệu quả các tế bào bị nhiễm vi rút dạng đồng thuận, nhưng không nhận ra được trong trường hợp RI8-6A/S nhiễm phân tí CRF01_AE [38, 156]. Điều này ngụ ý rằng các tế bào T đặc hiệu với dạng đồng thuận RI8-6V có thể chọn lọc các đột biến GagV280A/S, và nhiều khả năng đột biến GagV280A/S không tích lũy trong quần thể do tần suất B*52:01 ở Việt Nam thấp.

Gag A146P liên kết với B*57 có khả năng là đột biến trốn thoát CTL và đáp ứng CTL đối với epitope Gag147-155 (ISPRTLNAW - ISW9) giới hạn bởi B*57 đã được biết đến. Phân tích trên 52 người nhiễm HIV-1 mãn tính ở Nhật Bản cho thấy 38% cá

thể mang B*57 liên kết với A146P, đồng thời có một mối liên kết mạnh mẽ giữa A146P và B*48:01 [100]. Bằng cách phân tích số lượng lớn bệnh nhân nhiễm HIV mãn tính mang alen B*48:01 ở Nhật Bản, đột biến A146P cho thấy được chọn lọc bởi các tế bào T đặc hiệu với GI8. Điều này cho thấy cùng một đột biến có thể được chọn lọc bởi các alen HLA khác nhau [160].

Gag K436R là đột biến bù lại sinh lực đã mất cho vi rút khi phát sinh đột biến Gag I437L, theo công bố năm 2015 thử nghiệm trên mô hình *in vitro* [189]. Nghiên cứu cũng đã xác định Gag I147L là đột biến trốn thoát CTL của epitope giới hạn bởi B*13. Đáng chú ý, các đột biến NefE24Q và NefQ107R liên kết với B*13 khi xuất hiện cùng nhau làm suy giảm đáng kể khả năng điều hoà giảm HLA lớp I. Điều này cho thấy các đột biến trốn thoát CTL liên quan đến B*13 làm suy yếu khả năng sao chép của HIV-1 theo hai cơ chế riêng biệt, đó là bằng cách làm giảm sinh lực của vi rút qua đột biến trên Gag và làm giảm chức năng trốn tránh miễn dịch của Nef. Mặc dù dữ liệu của chúng tôi không ghi nhận đột biến liên kết tại vị trí Gag 436 và 437, B*13:01 cho thấy có liên kết với đột biến Gag tại vị trí S9, và Vif tại vị trí S95. B*13:01 lưu hành trong quần thể nghiên cứu này với tần suất ở mức trung bình (AF=0,045) và có sự khác biệt giảm CD4 ở những người mang đột biến liên kết tại vị trí NefS9. Các vị trí đột biến có liên kết với B*13:01 có thể đáng quan tâm và nghiên cứu.

Phần lớn dữ liệu đột biến liên kết khác nhau giữa các năm nghiên cứu cho thấy sự đa dạng biến đổi của vi rút. Nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận 37 đột biến Gag, 74 đột biến Nef liên kết với kiểu gen HLA, trong đó chỉ có 8 đột biến Gag và 13 đột biến Nef tương đồng với dữ liệu công bố năm 2016 (n=388) ở Việt Nam, cụ thể:

S9-B*13:01	W86-C*03:02	P146-C*06:02	V280-C*01:02
R26-B*15:25	E93-B*40:01	T242-B*57:01/58:01	

Chúng tôi không ghi nhận đột biến liên kết ảnh hưởng đến pVL và CD4 tương đồng với công bố năm 2016. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra 4 đột biến liên kết khác gồm GagP146-C*06:02, GagT242-A*33:03, GagR286-C*06:02 và GagI435-B*15:02.

4.2.2. Đột biến Nef, Vif, Vpr và Vpu

Trong số 110 đột biến Nef công bố năm 2016 đều không ảnh hưởng đến pVL và CD4, tuy nhiên kết quả của chúng tôi đánh dấu các 6 vị trí Nef S9-A*01:01, V11-C*06:02, I48-B*44:03, T80-C*03:03/B*15:02 và E176-C*08:01 có ảnh hưởng đến CD4. Các đột biến đơn lẻ có khả năng phá vỡ chức năng của Nef thông qua việc làm giảm sinh lực và VRC của vi rút. Tỷ lệ biến thể tại vị trí codon Nef 138 tăng cao đã được tìm thấy trong nhóm bệnh nhân LTNP [202]. 40% trẻ nhiễm HIV chậm tiến triển khi mang axit amin thay thế tại các vị trí codon AWLEAQ (56-61) [42]. Nef 138 trong nghiên cứu của chúng tôi rất ít biến thể và không ghi nhận có liên kết với HLA.

Nef A83G liên kết với B*58:01 trước đây được xác định là đột biến giúp vi rút trốn thoát khỏi đáp ứng CTL với epitope KF9 (Nef82–90; KAAVDLSHF) ở phân típ B và C [122]. Đột biến này thường không khôi phục trở lại kiểu hoang dã sau khi truyền cho các cá thể không mang B*58:01. Điều này có thể giải thích rằng biến thể G đại diện cho axit amin chiếm đa số trong HIV-1 phân típ B và C. Trong quan sát của chúng tôi NefG83A/E/S liên kết với B*58:01 và C*03:02, tuy nhiên không ghi nhận mối tương quan giữa đột biến liên kết tại vị trí này với các chỉ số lâm sàng pVL và CD4. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu khác trên phân típ CRF01_AE tại Việt Nam [207], lý giải sự đáp ứng miễn dịch khác nhau ở các phân típ HIV-1.

Đột biến Nef tại vị trí codon 102, 105, 108 và 199 có liên quan thống kê làm giảm nhận diện HLA lớp I trong một nhóm 298 bệnh nhân nhiễm HIV-1 phân típ C [133]. Nef Y102H-B*44, K105R-C*07:01, E108D-B*44/B*18 và H199Y-C*16 cho thấy gia tăng áp lực đối với đáp ứng CTL [110, 189, 205]. Mức độ đáp ứng CTL đối với đột biến Nef 199Y thấp hơn so với các đột biến còn lại [134]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận đột biến liên kết tại các vị trí Nef 102, 105 và 108 tương đồng. Duy nhất vị trí Nef 108 liên kết với B*44:03 và C*07:01 có liên quan đến giảm CD4 ở người mang biến thể vi rút dạng đột biến (kết quả bảng 3.13). Mặc dù số bệnh nhân mang alen B*44:03 và C*07:01 (n=25) còn ít và CD4 trải rộng, kết quả này có thể có sai số lớn. Tuy vậy, tương đồng kết quả với các nghiên cứu trước đây đã gợi ý đánh dấu vị trí đột biến liên kết NefE108 cho các nghiên cứu kế cận.

Một số ít đột biến Vif liên quan đến chậm tiến triển thành AIDS. Nghiên cứu trên nhóm 11 trẻ em có tiến triển bệnh chậm, phát hiện các đột biến Vif V13I, V55T và L81M, đồng thời tỷ lệ các đột biến này gia tăng ở nhóm EC [50]. Đột biến R132S đã được mô tả có mặt trong nhóm LTNP với tác động giảm sự nhân lên của vi rút *in vitro*. Ngược lại, đột biến chèn axit amin tại vị trí 61, đột biến thay thế A62D/N/S và Q136P được chỉ ra là có liên quan đến tiến triển AIDS nhanh hơn [49]. Trong nhóm bệnh nhân tham gia nghiên cứu, tỷ lệ đột biến tại các codon này chiếm tỷ lệ thấp, cụ thể: V13I 3,69%, V55T 6,45%, L81M 0,46% và R132S 0,46%. Không có đột biến chèn và thay thế ở vị trí codon Vif 61 và 62 tương ứng. Hầu hết trình tự Vif tại vị trí codon 136 là P (214/217) chiếm 98,61%. Các đột biến kể trên không ghi nhận liên kết với HLA lớp I. Nghiên cứu đánh dấu vị trí đột biến VifR131 liên kết với A*33:03 tác động tăng tải lượng vi rút.

Vai trò của Vpr được biết đến có thể ức chế hoạt động của tế bào NK [92]. Các đột biến làm thay đổi chức năng của Vpr gồm F72L làm giảm sự tích hợp của Vpr vào các virion mới, trong khi đột biến R77Q làm giảm tính lây nhiễm tế bào và thường thấy ở LTNP [128, 149]. Trong quan sát của chúng tôi vị trí codon Vpr 72 có trình tự axit amin F chiếm đa số, tỷ lệ axit amin Y chiếm 3,67% (n=8) và không xuất hiện axit amin L. Tương tự tại vị trí Vpr 77, axit amin Q chiếm đa số, duy nhất có một axit amin R. Mặc dù Vpr 77 liên kết với A*01:01 nhưng không ghi nhận liên quan đến pVL hay CD4. Nghiên cứu lần đầu ghi nhận VprR36-C*03:04 và VprN49-A*33:03 tác động tăng tải lượng vi rút ở nhóm bệnh nhân được tuyển chọn.

Có rất ít dữ liệu về đột biến liên kết trong gen *vpu* và mối liên hệ đến tiến triển bệnh. Hầu hết các nghiên cứu trên LTNP không ghi nhận hiện tượng xóa hoặc chèn trong trình tự *Vpu*. Năm 2016, một khảo sát trên các mô hình thử nghiệm *in vitro* xác định nhiều vị trí đột biến của *Vpu* liên quan đến giảm biểu hiện HLA-C, có thể kể đến như đột biến L4E5 thành I4del5, L16I và L18I ở phân tít B. Đột biến F2S3 thành I2E3 và F5D6 thành L5A6 ở phân tít C có vai trò tương tự. Dữ liệu nghiên cứu phân tít CRF01_AE của chúng tôi ghi nhận *Vpu* S2 liên kết với A*33:03, *Vpu* E5 liên kết với

B*15:12 và C*07:02. Tuy vậy các codon Vpu liên kết không tìm thấy có ảnh hưởng đến pVL và CD4.

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

Ý tưởng cơ bản cho vắc xin AIDS là kích hoạt hệ thống miễn dịch của người nhiễm HIV, do đó các loại vắc xin có thể tạo ra một hoặc nhiều hiệu quả sau: (1) tạo kháng thể trung hoà chống lại một loạt các chủng HIV nguyên phát; (2) kích hoạt đáp ứng tế bào T gây độc tế bào ở đại đa số người nhận; (3) gây đáp ứng miễn dịch [174]. Vắc xin HIV-1 có thể được thiết kế với mục tiêu ngăn chặn sự xâm nhập của vi rút hoặc kiểm soát sự nhân lên của vi rút. Để ngăn chặn sự xâm nhập của vi rút, vắc xin HIV-1 cần tạo ra kháng thể trung hoà chống lại glycoprotein bề mặt vỏ vi rút, như gp120 và gp41, là trung gian gắn kết và xâm nhập vào tế bào chủ. Cho đến nay, việc tạo ra các loại vắc xin có khả năng trung hoà kháng thể là khó khăn, do khả năng gắn kết kém với các thụ thể tế bào và biến thể đa dạng của kháng nguyên gp120 [73]. Để kiểm soát sự nhân lên của vi rút, vắc xin HIV-1 nên tạo ra các phản ứng miễn dịch qua trung gian tế bào đối với các epitope có nguồn gốc từ các thành phần cấu trúc của vi rút như matrix, capsid, nucleocapsid, enzyme của vi rút (RT, protease, và integrase) hay các protein khác (Vpr, Vpu, Nef, p7, SU, TM). Hiện tại, hầu hết các vắc xin HIV-1 ngăn chặn vi rút sau khi bị nhiễm bằng cách tạo ra các phản ứng CTL [73].

Peptide được sử dụng trong các loại vắc xin này là 20–30 chuỗi axit amin được tổng hợp để tạo ra các epitope, do đó còn được gọi là vắc xin epitope hay vắc xin peptide [21]. Vắc xin này nhắm đến các vùng gen tạo phản ứng đặc hiệu cao và được nhận diện bởi các tế bào B và tế bào T đối với epitope [52, 126]. Trong phát triển vắc xin peptide, 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 [126]. Việc dự đoán khả năng liên kết của epitope và các alen HLA loại I (hoặc loại II), giảm tải rất nhiều các thử nghiệm vô ích.

Năm 2002, một nghiên cứu được thiết kế để đánh giá tác động của Env trong vắc xin DNA-rMVA trên mô hình chuột, cho thấy đáp ứng miễn dịch với Gag-Pol-Env vượt trội hơn nhiều so với đáp ứng chỉ với Gag-Pol [11]. Một nghiên cứu khác với mô hình khỉ gây bệnh SIV đã sử dụng vắc xin DNA đa dòng bao gồm Gag-Pol/Env-Rev. Nghiên

cứu chứng minh khả năng bảo vệ tế bào CD4, cũng như giảm tải lượng vi rút ở khi được tiêm chủng so với đối chứng [157]. Nghiên cứu này nhấn mạnh thêm tầm quan trọng của việc sử dụng nhiều kháng nguyên của HIV-1 để tăng cường khả năng bảo vệ.

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. Sự khác biệt trong trình tự đồng thuận đại diện cho mỗi phân típ ảnh hưởng đến việc chọn lọc đột biến trốn thoát CTL. Như trường hợp đột biến Gag280, sự khác biệt trong trình tự đồng thuận giữa vi rút phân típ B và CRF01_AE đã ảnh hưởng đến việc tạo ra các tế bào T đặc hiệu với epitope GagYI9 và sự nhận biết vi rút mang đột biến, dẫn đến sự khác biệt trong tích lũy các đột biến Gag280 liên quan đến HLA. Vắc xin HIV-1 sử dụng các kháng nguyên có trình tự đồng thuận khác nhau có thể ảnh hưởng đến việc tạo ra các tế bào T hiệu quả để bảo vệ chống lại nhiễm HIV-1. 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*.

Khả năng phát sinh và lây truyền của đột biến trốn thoát CTL trong quần thể là một thách thức lớn đối với việc phát triển vắc xin hiệu quả. Các đột biến trốn thoát CTL có thể được tạo ra ở cá thể được tiêm chủng, được truyền giữa các cá thể và tích lũy ở cấp độ quần thể [9, 66, 77, 150]. Một đột biến có lợi cho vi rút ở một cá thể không nhất thiết có lợi khi truyền sang cá thể khác. Sự lây lan của các đột biến này ở cấp độ quần thể cũng có khả năng bị ảnh hưởng bởi tần suất của các loại HLA [121, 124]. Trên thực tế, không phải toàn bộ vi rút mang đột biến được lây truyền, mà hạt vi rút lây truyền đơn lẻ hoặc với lượng rất ít, do đó không chắc chắn rằng chủng vi rút ưu thế sẽ được truyền cho người nhận [62, 101]. Điều này cũng gợi ý rằng 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.

4.4. Hạn chế của đề tài

Alen HLA lớp I nằm trên 3 locus và có tính liên kết di truyền, cũng như các đột biến của vi rút HIV-1 có vai trò cộng hưởng. Các kỹ thuật phân tích dữ liệu trong nghiên cứu được thực hiện cho từng alen HLA và đột biến riêng rẽ, nhưng chưa bao phủ được ảnh hưởng của tính liên kết alen HLA và cộng hưởng của tổ hợp các đột biến HIV-1. Nghiên cứu sẽ tiếp tục tìm hiểu thêm các mô hình phân tích dữ liệu phù hợp bổ sung, tiếp nối các phân tích đã thực hiện.

KẾT LUẬN

Kết quả đề tài “*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*” cho thấy:

(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 số lượng tế bào CD4 thấp (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.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ

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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tham khảo tiếng Việt

1. BYT (2011), "Sinh lý bệnh và miễn dịch", *Nhà xuất bản Y học*.
2. ĐHYHN (2014), "Miễn dịch học", *Nhà xuất bản Y học*.
3. Viện VSDTTU (2020), "Vi rút y học", *NXB Y học*.

Tài liệu tham khảo tiếng Anh

4. Abbas, W. and Herbein, G. (2013), "T-Cell Signaling in HIV-1 Infection", *Open Virol J.* 7, pp. 57-71.
5. Abdel-Mohsen, M., et al. (2015), "Select host restriction factors are associated with HIV persistence during antiretroviral therapy", *AIDS.* 29(4), pp. 411-20.
6. Addo, M. M., et al. (2003), "Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load", *J Virol.* 77(3), pp. 2081-92.
7. Adland, E., et al. (2015), "Discordant Impact of HLA on Viral Replicative Capacity and Disease Progression in Pediatric and Adult HIV Infection", *PLoS Pathog.* 11(6), p. e1004954.
8. Allen, T. M., et al. (2005), "Selective escape from CD8+ T-cell responses represents a major driving force of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) sequence diversity and reveals constraints on HIV-1 evolution", *J Virol.* 79(21), pp. 13239-49.
9. Allen, T. M., et al. (2004), "Selection, transmission, and reversion of an antigen-processing cytotoxic T-lymphocyte escape mutation in human immunodeficiency virus type 1 infection", *J Virol.* 78(13), pp. 7069-78.
10. Almeida, J. R., et al. (2007), "Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover", *J Exp Med.* 204(10), pp. 2473-85.
11. Amara, R. R., et al. (2002), "Critical role for Env as well as Gag-Pol in control of a simian-human immunodeficiency virus 89.6P challenge by a DNA

- prime/recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine", *J Virol.* 76(12), pp. 6138-46.
12. Anderson, J. P., et al. (2000), "Testing the hypothesis of a recombinant origin of human immunodeficiency virus type 1 subtype E", *J Virol.* 74(22), pp. 10752-65.
 13. Andreas Meyerhans, et al. (2004), "Vif and the Role of Antiviral Cytidine Deaminases in HIV-1 Replication", *John W Mellors*. Review.
 14. Appay, V., et al. (2002), "Dynamics of T cell responses in HIV infection", *J Immunol.* 168(7), pp. 3660-6.
 15. Araujo, L. A. and Almeida, S. E. (2013), "HIV-1 diversity in the envelope glycoproteins: implications for viral entry inhibition", *Viruses.* 5(2), pp. 595-604.
 16. Arnaiz-Villena, A., et al. (2009), "Risk of vertical HIV transmission combines the 'B35-Cw4 disadvantage' and the 'pattern of inheritance' theories of progression", *Curr HIV Res.* 7(3), pp. 314-9.
 17. Avila-Rios, S., et al. (2019), "Clinical and evolutionary consequences of HIV adaptation to HLA: implications for vaccine and cure", *Curr Opin HIV AIDS.* 14(3), pp. 194-204.
 18. Barker, D. J., et al. (2023), "The IPD-IMGT/HLA Database", *Nucleic Acids Res.* 51(D1), pp. D1053-D1060.
 19. Bashirova, A. A., et al. (2014), "LILRB2 interaction with HLA class I correlates with control of HIV-1 infection", *PLoS Genet.* 10(3), p. e1004196.
 20. Baur, Oliver T. Fackler and Andreas S. (2002), "Live and Let Die: Nef Functions beyond HIV Replication", *Immunity.* 16, pp. 493-497.
 21. Bijker, M. S., et al. (2007), "Design and development of synthetic peptide vaccines: past, present and future", *Expert Rev Vaccines.* 6(4), pp. 591-603.
 22. Blankson, J. N. (2010), "Effector mechanisms in HIV-1 infected elite controllers: highly active immune responses?", *Antiviral Res.* 85(1), pp. 295-302.

23. Boutwell, C. L., et al. (2013), "Frequent and variable cytotoxic-T-lymphocyte escape-associated fitness costs in the human immunodeficiency virus type 1 subtype B Gag proteins", *J Virol.* 87(7), pp. 3952-65.
24. Brackenridge, S., et al. (2011), "An early HIV mutation within an HLA-B*57-restricted T cell epitope abrogates binding to the killer inhibitory receptor 3DL1", *J Virol.* 85(11), pp. 5415-22.
25. Brener, J., et al. (2015), "Disease progression despite protective HLA expression in an HIV-infected transmission pair", *Retrovirology.* 12, p. 55.
26. Brockman, M. A., et al. (2007), "Escape and compensation from early HLA-B57-mediated cytotoxic T-lymphocyte pressure on human immunodeficiency virus type 1 Gag alter capsid interactions with cyclophilin A", *J Virol.* 81(22), pp. 12608-18.
27. Bronke, C., et al. (2013), "HIV escape mutations occur preferentially at HLA-binding sites of CD8 T-cell epitopes", *AIDS.* 27(6), pp. 899-905.
28. Brumme, Z. L., et al. (2008), "Human leukocyte antigen-specific polymorphisms in HIV-1 Gag and their association with viral load in chronic untreated infection", *AIDS.* 22(11), pp. 1277-86.
29. Buranapraditkun, S., et al. (2011), "A novel immunodominant CD8+ T cell response restricted by a common HLA-C allele targets a conserved region of Gag HIV-1 clade CRF01_AE infected Thais", *PLoS One.* 6(8), p. e23603.
30. Butsch, M. and Boris-Lawrie, K. (2002), "Destiny of unspliced retroviral RNA: ribosome and/or virion?", *J Virol.* 76(7), pp. 3089-94.
31. Carlson, J. M., et al. (2012), "Correlates of protective cellular immunity revealed by analysis of population-level immune escape pathways in HIV-1", *J Virol.* 86(24), pp. 13202-16.
32. Carlson, J. M., et al. (2015), "HIV-1 adaptation to HLA: a window into virus-host immune interactions", *Trends Microbiol.* 23(4), pp. 212-24.
33. Carlson, J. M., et al. (2014), "HIV transmission. Selection bias at the heterosexual HIV-1 transmission bottleneck", *Science.* 345(6193), p. 1254031.

34. Carrington, M. and Alter, G. (2012), "Innate immune control of HIV", *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2(7), p. a007070.
35. Carrington, M., et al. (1999), "HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage", *Science.* 283(5408), pp. 1748-52.
36. Carrington, M. and O'Brien, S. J. (2003), "The influence of HLA genotype on AIDS", *Annu Rev Med.* 54, pp. 535-51.
37. Champagne, P., et al. (2001), "Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes", *Nature.* 410(6824), pp. 106-11.
38. Chikata, T., et al. (2014), "Host-specific adaptation of HIV-1 subtype B in the Japanese population", *J Virol.* 88(9), pp. 4764-75.
39. Chopera, D. R., et al. (2008), "Transmission of HIV-1 CTL escape variants provides HLA-mismatched recipients with a survival advantage", *PLoS Pathog.* 4(3), p. e1000033.
40. Choppin, J., et al. (2001), "Characteristics of HIV-1 Nef regions containing multiple CD8+ T cell epitopes: wealth of HLA-binding motifs and sensitivity to proteasome degradation", *J Immunol.* 166(10), pp. 6164-9.
41. Chowdhury, A., et al. (2015), "Differential Impact of In Vivo CD8+ T Lymphocyte Depletion in Controller versus Progressor Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques", *J Virol.* 89(17), pp. 8677-86.
42. Corro, G., et al. (2012), "Genetic and functional analysis of HIV type 1 nef gene derived from long-term nonprogressor children: association of attenuated variants with slow progression to pediatric AIDS", *AIDS Res Hum Retroviruses.* 28(12), pp. 1617-26.
43. Cotton, L. A., et al. (2012), "HLA class I sequence-based typing using DNA recovered from frozen plasma", *J Immunol Methods.* 382(1-2), pp. 40-7.
44. Cuevas, J. M., et al. (2015), "Extremely High Mutation Rate of HIV-1 In Vivo", *PLoS Biol.* 13(9), p. e1002251.
45. Cunningham, A. L., et al. (2010), "Manipulation of dendritic cell function by viruses", *Curr Opin Microbiol.* 13(4), pp. 524-9.

46. Currier, J. R., et al. (2002), "Comprehensive screening for human immunodeficiency virus type 1 subtype-specific CD8 cytotoxic T lymphocytes and definition of degenerate epitopes restricted by HLA-A0207 and -C(W)0304 alleles", *J Virol.* 76(10), pp. 4971-86.
47. Das, A. T., Harwig, A., and Berkhout, B. (2011), "The HIV-1 Tat protein has a versatile role in activating viral transcription", *J Virol.* 85(18), pp. 9506-16.
48. Davis, K. L., et al. (2009), "High titer HIV-1 V3-specific antibodies with broad reactivity but low neutralizing potency in acute infection and following vaccination", *Virology.* 387(2), pp. 414-26.
49. De Maio, F. A., et al. (2011), "Effect of HIV-1 Vif variability on progression to pediatric AIDS and its association with APOBEC3G and CUL5 polymorphisms", *Infect Genet Evol.* 11(6), pp. 1256-62.
50. De Maio, F. A., et al. (2012), "Unusual substitutions in HIV-1 vif from children infected perinatally without progression to AIDS for more than 8 years without therapy", *J Med Virol.* 84(12), pp. 1844-52.
51. De Pasquale, M., et al. (2013), "Lower HIV provirus levels are associated with more APOBEC3G protein in blood resting memory CD4+ T lymphocytes of controllers in vivo", *PLoS One.* 8(10), p. e76002.
52. Dermime, S., et al. (2004), "Vaccine and antibody-directed T cell tumour immunotherapy", *Biochim Biophys Acta.* 1704(1), pp. 11-35.
53. Descours, B., et al. (2012), "Immune responses driven by protective human leukocyte antigen alleles from long-term nonprogressors are associated with low HIV reservoir in central memory CD4 T cells", *Clin Infect Dis.* 54(10), pp. 1495-503.
54. Doitsh, G., et al. (2014), "Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection", *Nature.* 505(7484), pp. 509-14.
55. Domingo, E. and Holland, J. J. (1997), "RNA virus mutations and fitness for survival", *Annu Rev Microbiol.* 51, pp. 151-78.

56. Dorak, M. T., et al. (2004), "Transmission of HIV-1 and HLA-B allele-sharing within serodiscordant heterosexual Zambian couples", *Lancet*. 363(9427), pp. 2137-9.
57. Draenert, R., et al. (2004), "Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection", *J Exp Med*. 199(7), pp. 905-15.
58. Duda, A., et al. (2009), "HLA-associated clinical progression correlates with epitope reversion rates in early human immunodeficiency virus infection", *J Virol*. 83(3), pp. 1228-39.
59. East, L. and Isacke, C. M. (2002), "The mannose receptor family", *Biochim Biophys Acta*. 1572(2-3), pp. 364-86.
60. Erlich, H. (2012), "HLA DNA typing: past, present, and future", *Tissue Antigens*. 80(1), pp. 1-11.
61. Feeney, M. E., et al. (2004), "Immune escape precedes breakthrough human immunodeficiency virus type 1 viremia and broadening of the cytotoxic T-lymphocyte response in an HLA-B27-positive long-term-nonprogressing child", *J Virol*. 78(16), pp. 8927-30.
62. Fischer, W., et al. (2010), "Transmission of single HIV-1 genomes and dynamics of early immune escape revealed by ultra-deep sequencing", *PLoS One*. 5(8), p. e12303.
63. Flores-Villanueva, P. O., et al. (2001), "Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(9), pp. 5140-5.
64. French, A. R. and Yokoyama, W. M. (2004), "Natural killer cells and autoimmunity", *Arthritis Res Ther*. 6(1), pp. 8-14.
65. Frost, S. D., et al. (2005), "Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(51), pp. 18514-9.
66. Fryer, H. R., et al. (2010), "Modelling the evolution and spread of HIV immune escape mutants", *PLoS Pathog*. 6(11), p. e1001196.

67. Gandhi, R. T., et al. (2016), "HLA Class I Alleles Associated with Mortality in Thai Military Recruits with HIV-1 CRF01_AE Infection", *AIDS Res Hum Retroviruses*. 32(1), pp. 44-9.
68. Gao, F., et al. (1996), "The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin", *J Virol*. 70(10), pp. 7013-29.
69. Gao, X., et al. (2005), "AIDS restriction HLA allotypes target distinct intervals of HIV-1 pathogenesis", *Nat Med*. 11(12), pp. 1290-2.
70. Gao, X., et al. (2001), "Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS", *N Engl J Med*. 344(22), pp. 1668-75.
71. Geldmacher, C., et al. (2007), "CD8 T-cell recognition of multiple epitopes within specific Gag regions is associated with maintenance of a low steady-state viremia in human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients", *J Virol*. 81(5), pp. 2440-8.
72. Gesprasert, G., et al. (2010), "HLA-associated immune pressure on Gag protein in CRF01_AE-infected individuals and its association with plasma viral load", *PLoS One*. 5(6), p. e11179.
73. Giri, M., Ugen, K. E., and Weiner, D. B. (2004), "DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1 in the past decade", *Clin Microbiol Rev*. 17(2), pp. 370-89.
74. Goepfert, P. A., et al. (2008), "Transmission of HIV-1 Gag immune escape mutations is associated with reduced viral load in linked recipients", *J Exp Med*. 205(5), pp. 1009-17.
75. Goff, Stephen (2007), "Retroviridae: the retroviruses and their replication", *Fields virology*.
76. Goila-Gaur, R. and Strebel, K. (2008), "HIV-1 Vif, APOBEC, and intrinsic immunity", *Retrovirology*. 5, p. 51.
77. Goulder, P. J., et al. (2001), "Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection", *Nature*. 412(6844), pp. 334-8.

78. Goulder, P. J., et al. (1997), "Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS", *Nat Med.* 3(2), pp. 212-7.
79. Goulder, P. J. and Walker, B. D. (2012), "HIV and HLA class I: an evolving relationship", *Immunity.* 37(3), pp. 426-40.
80. Goulder, P. J. and Watkins, D. I. (2004), "HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design", *Nat Rev Immunol.* 4(8), pp. 630-40.
81. Goulder, P. J. and Watkins, D. I. (2008), "Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication", *Nat Rev Immunol.* 8(8), pp. 619-30.
82. Goulder, P., et al. (1997), "Co-evolution of human immunodeficiency virus and cytotoxic T-lymphocyte responses", *Immunol Rev.* 159, pp. 17-29.
83. Grabar, S., et al. (2009), "Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV", *AIDS.* 23(9), pp. 1163-9.
84. Gray, E. S., et al. (2007), "Neutralizing antibody responses in acute human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection", *J Virol.* 81(12), pp. 6187-96.
85. Harrer, E. G., et al. (2005), "A conserved HLA B13-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope in Nef is a dominant epitope in HLA B13-positive HIV-1-infected patients", *AIDS.* 19(7), pp. 734-5.
86. Harrison, L., et al. (2010), "The effect of transmitted HIV-1 drug resistance on pre-therapy viral load", *AIDS.* 24(12), pp. 1917-22.
87. Hemelaar, J. (2012), "The origin and diversity of the HIV-1 pandemic", *Trends Mol Med.* 18(3), pp. 182-92.
88. Herrera-Carrillo, E. and Berkhout, B. (2015), "Bone Marrow Gene Therapy for HIV/AIDS", *Viruses.* 7(7), pp. 3910-36.
89. Hilton, H. G., et al. (2015), "Polymorphic HLA-C Receptors Balance the Functional Characteristics of KIR Haplotypes", *J Immunol.* 195(7), pp. 3160-70.

90. Hirsch, M. S., et al. (2008), "Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel", *Clin Infect Dis.* 47(2), pp. 266-85.
91. Honeyborne, I., et al. (2007), "Control of human immunodeficiency virus type 1 is associated with HLA-B*13 and targeting of multiple gag-specific CD8+ T-cell epitopes", *J Virol.* 81(7), pp. 3667-72.
92. Hong, H. S., et al. (2009), "Exogenous HIV-1 Vpr disrupts IFN-alpha response by plasmacytoid dendritic cells (pDCs) and subsequent pDC/NK interplay", *Immunol Lett.* 125(2), pp. 100-4.
93. Horton, H., et al. (2006), "Preservation of T cell proliferation restricted by protective HLA alleles is critical for immune control of HIV-1 infection", *J Immunol.* 177(10), pp. 7406-15.
94. Hughes, A. L. and Yeager, M. (1998), "Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates", *Annu Rev Genet.* 32, pp. 415-35.
95. Iglesias, M. C., et al. (2011), "Escape from highly effective public CD8+ T-cell clonotypes by HIV", *Blood.* 118(8), pp. 2138-49.
96. Joshi, N. S. and Kaech, S. M. (2008), "Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation", *J Immunol.* 180(3), pp. 1309-15.
97. Julg, B., et al. (2010), "Enhanced anti-HIV functional activity associated with Gag-specific CD8 T-cell responses", *J Virol.* 84(11), pp. 5540-9.
98. Kalish, M. L., et al. (2004), "Recombinant viruses and early global HIV-1 epidemic", *Emerg Infect Dis.* 10(7), pp. 1227-34.
99. Kaur, G. and Mehra, N. (2009), "Genetic determinants of HIV-1 infection and progression to AIDS: immune response genes", *Tissue Antigens.* 74(5), pp. 373-85.
100. Kawashima, Y., et al. (2009), "Adaptation of HIV-1 to human leukocyte antigen class I", *Nature.* 458(7238), pp. 641-5.

101. Keele, B. F., et al. (2008), "Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(21), pp. 7552-7.
102. Kelleher, A. D., et al. (2001), "Clustered mutations in HIV-1 gag are consistently required for escape from HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses", *J Exp Med.* 193(3), pp. 375-86.
103. Keller, M., et al. (2009), "Impact of HIV-1 viral subtype on CD4+ T-cell decline and clinical outcomes in antiretroviral naive patients receiving universal healthcare", *AIDS.* 23(6), pp. 731-7.
104. Kiepiela, P., et al. (2004), "Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA", *Nature.* 432(7018), pp. 769-75.
105. Kim, Y., et al. (2012), "Immune epitope database analysis resource", *Nucleic Acids Res.* 40(Web Server issue), pp. W525-30.
106. Kinloch, N. N., et al. (2019), "Genotypic and Mechanistic Characterization of Subtype-Specific HIV Adaptation to Host Cellular Immunity", *J Virol.* 93(1).
107. Klein, M. R., et al. (1998), "Characterization of HLA-B57-restricted human immunodeficiency virus type 1 Gag- and RT-specific cytotoxic T lymphocyte responses", *J Gen Virol.* 79 (Pt 9), pp. 2191-201.
108. Kloverpris, H. N., Leslie, A., and Goulder, P. (2015), "Role of HLA Adaptation in HIV Evolution", *Front Immunol.* 6, p. 665.
109. Kloverpris HN, Stryhn A, Harndahl M, van der Stok M, Payne RP, Matthews PC, Chen F, Riddell L, Walker BD, Ndung'u T, Buus S, Goulder P. (2012), "HLA-B*57 Micropolymorphism shapes HLA allele-specific epitope immunogenicity, selection pressure, and HIV immune control", *J Virol.* 86(2), pp. 919-29.
110. Kuang, X. T., et al. (2014), "Impaired Nef function is associated with early control of HIV-1 viremia", *J Virol.* 88(17), pp. 10200-13.
111. Kuhn, L., et al. (2004), "Maternal versus paternal inheritance of HLA class I alleles among HIV-infected children: consequences for clinical disease progression", *AIDS.* 18(9), pp. 1281-9.

112. Kumar, P. (2013), "Long term non-progressor (LTNP) HIV infection", *Indian J Med Res.* 138(3), pp. 291-3.
113. Kuse, N., et al. (2015), "Different Effects of Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Resistance Mutations on Cytotoxic T Lymphocyte Recognition between HIV-1 Subtype B and Subtype A/E Infections", *J Virol.* 89(14), pp. 7363-72.
114. Kwong, P. D., et al. (1998), "Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody", *Nature.* 393(6686), pp. 648-59.
115. Ladell, K., et al. (2013), "A molecular basis for the control of preimmune escape variants by HIV-specific CD8+ T cells", *Immunity.* 38(3), pp. 425-36.
116. Lambotte, O., et al. (2005), "HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication", *Clin Infect Dis.* 41(7), pp. 1053-6.
117. Lazaro, E., et al. (2011), "Molecular characterization of HIV-1 CRF01_AE in Mekong Delta, Vietnam, and impact of T-cell epitope mutations on HLA recognition (ANRS 12159)", *PLoS One.* 6(10), p. e26244.
118. Lazaryan, A., et al. (2011), "The influence of human leukocyte antigen class I alleles and their population frequencies on human immunodeficiency virus type 1 control among African Americans", *Hum Immunol.* 72(4), pp. 312-8.
119. Lefranc, M. P., et al. (2015), "IMGT(R), the international ImmunoGeneTics information system(R) 25 years on", *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue), pp. D413-22.
120. Leligdowicz, A. and Rowland-Jones, S. (2008), "Tenets of protection from progression to AIDS: lessons from the immune responses to HIV-2 infection", *Expert Rev Vaccines.* 7(3), pp. 319-31.
121. Leslie, A. J., et al. (2004), "HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission", *Nat Med.* 10(3), pp. 282-9.

122. Leslie, A., et al. (2005), "Transmission and accumulation of CTL escape variants drive negative associations between HIV polymorphisms and HLA", *J Exp Med.* 201(6), pp. 891-902.
123. Leslie, A., et al. (2010), "Additive contribution of HLA class I alleles in the immune control of HIV-1 infection", *J Virol.* 84(19), pp. 9879-88.
124. Li, B., et al. (2007), "Rapid reversion of sequence polymorphisms dominates early human immunodeficiency virus type 1 evolution", *J Virol.* 81(1), pp. 193-201.
125. Li, L. and Bouvier, M. (2004), "Structures of HLA-A*1101 complexed with immunodominant nonamer and decamer HIV-1 epitopes clearly reveal the presence of a middle, secondary anchor residue", *J Immunol.* 172(10), pp. 6175-84.
126. Li, W., et al. (2014), "Peptide Vaccine: Progress and Challenges", *Vaccines (Basel).* 2(3), pp. 515-36.
127. Liu, D., et al. (2014), "Preexisting compensatory amino acids compromise fitness costs of a HIV-1 T cell escape mutation", *Retrovirology.* 11, p. 101.
128. Lum, J. J., et al. (2003), "Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis", *J Clin Invest.* 111(10), pp. 1547-54.
129. Ma, J. D., Lee, K. C., and Kuo, G. M. (2010), "HLA-B*5701 testing to predict abacavir hypersensitivity", *PLoS Curr.* 2, p. RRN1203.
130. Mackelprang, R. D., et al. (2008), "Maternal HLA homozygosity and mother-child HLA concordance increase the risk of vertical transmission of HIV-1", *J Infect Dis.* 197(8), pp. 1156-61.
131. Mahungu, T. W., et al. (2009), "The impact of pharmacogenetics on HIV therapy", *Int J STD AIDS.* 20(3), pp. 145-51.
132. Mallal, S., et al. (2002), "Association between presence of HLA-B*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir", *Lancet.* 359(9308), pp. 727-32.

133. Mann, J. K., et al. (2014), "Nef-mediated down-regulation of CD4 and HLA class I in HIV-1 subtype C infection: association with disease progression and influence of immune pressure", *Virology*. 468-470, pp. 214-225.
134. Mann, J. K., et al. (2020), "Consequences of HLA-associated mutations in HIV-1 subtype C Nef on HLA-I downregulation ability", *J Med Virol*. 92(8), pp. 1182-1190.
135. Martin, M. P., et al. (2002), "Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS", *Nat Genet*. 31(4), pp. 429-34.
136. Martin, M. P., et al. (2007), "Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1", *Nat Genet*. 39(6), pp. 733-40.
137. Martinez-Picado, J. and Martinez, M. A. (2008), "HIV-1 reverse transcriptase inhibitor resistance mutations and fitness: a view from the clinic and ex vivo", *Virus Res*. 134(1-2), pp. 104-23.
138. Martinez-Picado, J., et al. (2006), "Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1", *J Virol*. 80(7), pp. 3617-23.
139. Masemola, A., et al. (2004), "Hierarchical targeting of subtype C human immunodeficiency virus type 1 proteins by CD8+ T cells: correlation with viral load", *J Virol*. 78(7), pp. 3233-43.
140. McBrien, J. B., Kumar, N. A., and Silvestri, G. (2018), "Mechanisms of CD8(+) T cell-mediated suppression of HIV/SIV replication", *Eur J Immunol*. 48(6), pp. 898-914.
141. McMichael, A. and Klenerman, P. (2002), "HIV/AIDS. HLA leaves its footprints on HIV", *Science*. 296(5572), pp. 1410-1.
142. Mekue, L. M., et al. (2019), "HLA A*32 is associated to HIV acquisition while B*44 and B*53 are associated with protection against HIV acquisition in perinatally exposed infants", *BMC Pediatr*. 19(1), p. 249.
143. Meuleman, T., et al. (2015), "HLA associations and HLA sharing in recurrent miscarriage: A systematic review and meta-analysis", *Hum Immunol*. 76(5), pp. 362-73.

144. Migueles, S. A., et al. (2000), "HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(6), pp. 2709-14.
145. Mikell, I., et al. (2011), "Characteristics of the earliest cross-neutralizing antibody response to HIV-1", *PLoS Pathog*. 7(1), p. e1001251.
146. Miller, C. M., et al. (2017), "Virion-Associated Vpr Alleviates a Postintegration Block to HIV-1 Infection of Dendritic Cells", *J Virol*. 91(13).
147. Minh, T. T. T., et al. (2022), "Impaired protective role of HLA-B*57:01/58:01 in HIV-1 CRF01_AE infection: a cohort study in Vietnam", *Int J Infect Dis*. 128, pp. 20-31.
148. Miura, T., et al. (2009), "HLA-B57/B*5801 human immunodeficiency virus type 1 elite controllers select for rare gag variants associated with reduced viral replication capacity and strong cytotoxic T-lymphocyte [corrected] recognition", *J Virol*. 83(6), pp. 2743-55.
149. Mologni, D., et al. (2006), "Vpr and HIV-1 disease progression: R77Q mutation is associated with long-term control of HIV-1 infection in different groups of patients", *AIDS*. 20(4), pp. 567-74.
150. Moore, C. B., et al. (2002), "Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level", *Science*. 296(5572), pp. 1439-43.
151. Moradi, S., et al. (2021), "Structural plasticity of KIR2DL2 and KIR2DL3 enables altered docking geometries atop HLA-C", *Nat Commun*. 12(1), p. 2173.
152. Moretta, L. and Moretta, A. (2004), "Killer immunoglobulin-like receptors", *Curr Opin Immunol*. 16(5), pp. 626-33.
153. Mori, M., et al. (2014), "HLA-B*35: 05 is a protective allele with a unique structure among HIV-1 CRF01_AE-infected Thais, in whom the B*57 frequency is low", *AIDS*. 28(7), pp. 959-67.
154. Mothe, B., et al. (2011), "Definition of the viral targets of protective HIV-1-specific T cell responses", *J Transl Med*. 9, p. 208.

155. Muccini, C., et al. (2022), "Association between low levels of HIV-1 DNA and HLA class I molecules in chronic HIV-1 infection", *PLoS One*. 17(3), p. e0265348.
156. Murakoshi, H., et al. (2015), "Clinical Control of HIV-1 by Cytotoxic T Cells Specific for Multiple Conserved Epitopes", *J Virol*. 89(10), pp. 5330-9.
157. Muthumani, K., et al. (2003), "A Gag-Pol/Env-Rev SIV239 DNA vaccine improves CD4 counts, and reduce viral loads after pathogenic intrarectal SIV(mac)251 challenge in rhesus Macaques", *Vaccine*. 21(7-8), pp. 629-37.
158. Muthumani, K., et al. (2006), "The HIV-1 Vpr and glucocorticoid receptor complex is a gain-of-function interaction that prevents the nuclear localization of PARP-1", *Nat Cell Biol*. 8(2), pp. 170-9.
159. Muthumani, K., et al. (2004), "HIV-1 Vpr and anti-inflammatory activity", *DNA Cell Biol*. 23(4), pp. 239-47.
160. Naruto, T., et al. (2011), "Selection of HLA-B57-associated Gag A146P mutant by HLA-B *48:01-restricted Gag140-147-specific CTLs in chronically HIV-1-infected Japanese", *Microbes Infect*. 13(8-9), pp. 766-70.
161. Ngumbela, K. C., et al. (2008), "Targeting of a CD8 T cell env epitope presented by HLA-B*5802 is associated with markers of HIV disease progression and lack of selection pressure", *AIDS Res Hum Retroviruses*. 24(1), pp. 72-82.
162. Nietfield, W., et al. (1995), "Sequence constraints and recognition by CTL of an HLA-B27-restricted HIV-1 gag epitope", *J Immunol*. 154(5), pp. 2189-97.
163. Nkenfou et al. (2015), "Human Leucocyte Antigen Class I Diversity among Human Immunodeficiency Virus Exposed Negative and Positive Children in Cameroon", *J AIDS Clin Res*. 6(4).
164. Nkeze, J., et al. (2015), "Molecular characterization of HIV-1 genome in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*", *Cell Biosci*. 5, p. 47.
165. Nomaguchi, M., Fujita, M., and Adachi, A. (2008), "Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis", *Microbes Infect*. 10(9), pp. 960-7.
166. Nunes, E., et al. (2011), "Definitions of histocompatibility typing terms", *Blood*. 118(23), pp. e180-3.

167. Nunes, E., et al. (2011), "Definitions of histocompatibility typing terms: Harmonization of Histocompatibility Typing Terms Working Group", *Hum Immunol.* 72(12), pp. 1214-6.
168. O'Connell, K. A., Bailey, J. R., and Blankson, J. N. (2009), "Elucidating the elite: mechanisms of control in HIV-1 infection", *Trends Pharmacol Sci.* 30(12), pp. 631-7.
169. Ondondo, B., et al. (2016), "Novel Conserved-region T-cell Mosaic Vaccine With High Global HIV-1 Coverage Is Recognized by Protective Responses in Untreated Infection", *Mol Ther.* 24(4), pp. 832-42.
170. Pant Pai, N., Shivkumar, S., and Cajas, J. M. (2012), "Does genetic diversity of HIV-1 non-B subtypes differentially impact disease progression in treatment-naive HIV-1-infected individuals? A systematic review of evidence: 1996-2010", *J Acquir Immune Defic Syndr.* 59(4), pp. 382-8.
171. Papagno, L., et al. (2004), "Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection", *PLoS Biol.* 2(2), p. E20.
172. Park, Y. J., et al. (2017), "Impact of HLA Class I Alleles on Timing of HIV Rebound After Antiretroviral Treatment Interruption", *Pathog Immun.* 2(3), pp. 431-445.
173. Paul Klenerman, Ying Wu and Rodney Phillips (2002), "HIV: current opinion in escapology", *Elsevier Science.* 5(4), pp. 408-413.
174. Pavot, V., et al. (2014), "Recent progress in HIV vaccines inducing mucosal immune responses", *AIDS.* 28(12), pp. 1701-18.
175. Pollard, V. W. and Malim, M. H. (1998), "The HIV-1 Rev protein", *Annu Rev Microbiol.* 52, pp. 491-532.
176. Prince, J. L., et al. (2012), "Role of transmitted Gag CTL polymorphisms in defining replicative capacity and early HIV-1 pathogenesis", *PLoS Pathog.* 8(11), p. e1003041.
177. Rauch, A., et al. (2008), "Refining abacavir hypersensitivity diagnoses using a structured clinical assessment and genetic testing in the Swiss HIV Cohort Study", *Antivir Ther.* 13(8), pp. 1019-28.

178. Reynisson, B., et al. (2020), "NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data", *Nucleic Acids Res.* 48(W1), pp. W449-W454.
179. Richman, D. D., et al. (2003), "Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(7), pp. 4144-9.
180. RIVIÉRE, YVES, et al. (2009), "Gag-Specific Cytotoxic Responses to HIV Type 1 Are Associated with a Decreased Risk of Progression to AIDS-Related Complex or AIDS", *AIDS Research and Human Retroviruses.* 11(8), pp. 903-907.
181. Robinson, J., et al. (2011), "The IMGT/HLA database", *Nucleic Acids Res.* 39(Database issue), pp. D1171-6.
182. Rousseau, C. M., et al. (2008), "HLA class I-driven evolution of human immunodeficiency virus type 1 subtype c proteome: immune escape and viral load", *J Virol.* 82(13), pp. 6434-46.
183. Satapornpong, P., et al. (2020), "Genetic Diversity of HLA Class I and Class II Alleles in Thai Populations: Contribution to Genotype-Guided Therapeutics", *Front Pharmacol.* 11, p. 78.
184. Schindler, M., et al. (2006), "Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1", *Cell.* 125(6), pp. 1055-67.
185. Schmitz, J. E., et al. (1999), "A nonhuman primate model for the selective elimination of CD8+ lymphocytes using a mouse-human chimeric monoclonal antibody", *Am J Pathol.* 154(6), pp. 1923-32.
186. Schneidewind, A., et al. (2008), "Structural and functional constraints limit options for cytotoxic T-lymphocyte escape in the immunodominant HLA-B27-restricted epitope in human immunodeficiency virus type 1 capsid", *J Virol.* 82(11), pp. 5594-605.
187. Schneidewind, A., et al. (2007), "Escape from the dominant HLA-B27-restricted cytotoxic T-lymphocyte response in Gag is associated with a dramatic reduction

- in human immunodeficiency virus type 1 replication", *J Virol.* 81(22), pp. 12382-93.
188. Schneidewind, A., et al. (2009), "Maternal transmission of human immunodeficiency virus escape mutations subverts HLA-B57 immunodominance but facilitates viral control in the haploidentical infant", *J Virol.* 83(17), pp. 8616-27.
 189. Shahid, A., et al. (2015), "Consequences of HLA-B*13-Associated Escape Mutations on HIV-1 Replication and Nef Function", *J Virol.* 89(22), pp. 11557-71.
 190. Shi, Y., et al. (2022), "The Role of Innate Immunity in Natural Elite Controllers of HIV-1 Infection", *Front Immunol.* 13, p. 780922.
 191. Singh, P., et al. (2008), "Immunogenetic basis of HIV-1 infection, transmission and disease progression", *Vaccine.* 26(24), pp. 2966-80.
 192. Spach, David H. (2021), "Epidemiology of HIV", *National HIV Curriculum*, pp. 1-53.
 193. Stephens, H. A. (2005), "HIV-1 diversity versus HLA class I polymorphism", *Trends Immunol.* 26(1), pp. 41-7.
 194. Stephens, H. A. (2012), "Immunogenetic surveillance of HIV/AIDS", *Infect Genet Evol.* 12(7), pp. 1481-91.
 195. Storey, J. D. and Tibshirani, R. (2003), "Statistical significance for genomewide studies", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(16), pp. 9440-5.
 196. Stranzl, T., et al. (2010), "NetCTLpan: pan-specific MHC class I pathway epitope predictions", *Immunogenetics.* 62(6), pp. 357-68.
 197. Suzanne Scarlata, et. al (2003), "Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1614(1), pp. 62-72.
 198. Takahashi, N., et al. (2019), "Human leukocyte antigen-associated gag and nef polymorphisms in HIV-1 subtype A/E-infected individuals in Vietnam", *Microbes Infect.* 21(2), pp. 113-118.

199. Tang, J., et al. (1999), "HLA class I homozygosity accelerates disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection", *AIDS Res Hum Retroviruses*. 15(4), pp. 317-24.
200. Tang, J., et al. (2002), "Favorable and unfavorable HLA class I alleles and haplotypes in Zambians predominantly infected with clade C human immunodeficiency virus type 1", *J Virol*. 76(16), pp. 8276-84.
201. Thobakgale, C. F., et al. (2009), "Impact of HLA in mother and child on disease progression of pediatric human immunodeficiency virus type 1 infection", *J Virol*. 83(19), pp. 10234-44.
202. Tolstrup, M., et al. (2006), "Cysteine 138 mutation in HIV-1 Nef from patients with delayed disease progression", *Sex Health*. 3(4), pp. 281-6.
203. Tomaras, G. D., et al. (2008), "Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia", *J Virol*. 82(24), pp. 12449-63.
204. Turnbull, E. L., et al. (2006), "HIV-1 epitope-specific CD8+ T cell responses strongly associated with delayed disease progression cross-recognize epitope variants efficiently", *J Immunol*. 176(10), pp. 6130-46.
205. Ueno, T., et al. (2008), "CTL-mediated selective pressure influences dynamic evolution and pathogenic functions of HIV-1 Nef", *J Immunol*. 180(2), pp. 1107-16.
206. van Heuvel, Y., et al. (2022), "Infectious RNA: Human Immunodeficiency Virus (HIV) Biology, Therapeutic Intervention, and the Quest for a Vaccine", *Toxins (Basel)*. 14(2).
207. Van Tran, G., et al. (2016), "A strong association of human leukocyte antigen-associated Pol and Gag mutations with clinical parameters in HIV-1 subtype A/E infection", *AIDS*. 30(5), pp. 681-9.
208. Vanderford, T. H., et al. (2011), "Viral CTL escape mutants are generated in lymph nodes and subsequently become fixed in plasma and rectal mucosa during acute SIV infection of macaques", *PLoS Pathog*. 7(5), p. e1002048.

209. Wang, B. (2013), "Viral factors in non-progression", *Front Immunol.* 4, p. 355.
210. Wang, Y. E., et al. (2009), "Protective HLA class I alleles that restrict acute-phase CD8⁺ T-cell responses are associated with viral escape mutations located in highly conserved regions of human immunodeficiency virus type 1", *J Virol.* 83(4), pp. 1845-55.
211. Wargo, A. R. and Kurath, G. (2012), "Viral fitness: definitions, measurement, and current insights", *Curr Opin Virol.* 2(5), pp. 538-45.
212. Watanabe, K., et al. (2013), "Identification of cross-clade CTL epitopes in HIV-1 clade A/E-infected individuals by using the clade B overlapping peptides", *Microbes Infect.* 15(13), pp. 874-86.
213. Wei, X., et al. (2003), "Antibody neutralization and escape by HIV-1", *Nature.* 422(6929), pp. 307-12.
214. Weinberg, J. L. and Kovarik, C. L. (2010), "The WHO Clinical Staging System for HIV/AIDS", *Virtual Mentor.* 12(3), pp. 202-6.
215. WHO (2016), "Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection, 2nd edition".
216. Winchester, R., et al. (2004), "Mother-to-child transmission of HIV-1: strong association with certain maternal HLA-B alleles independent of viral load implicates innate immune mechanisms", *J Acquir Immune Defic Syndr.* 36(2), pp. 659-70.
217. Wright, J. K., et al. (2010), "Gag-protease-mediated replication capacity in HIV-1 subtype C chronic infection: associations with HLA type and clinical parameters", *J Virol.* 84(20), pp. 10820-31.
218. Yokomaku, Y., et al. (2004), "Impaired processing and presentation of cytotoxic-T-lymphocyte (CTL) epitopes are major escape mechanisms from CTL immune pressure in human immunodeficiency virus type 1 infection", *J Virol.* 78(3), pp. 1324-32.
219. Yusim, K., et al. (2002), "Clustering patterns of cytotoxic T-lymphocyte epitopes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proteins reveal imprints of immune evasion on HIV-1 global variation", *J Virol.* 76(17), pp. 8757-68.

220. Zanini, F., et al. (2017), "In vivo mutation rates and the landscape of fitness costs of HIV-1", *Virus Evol.* 3(1), p. vex003.
221. Zaunders, J. and van Bockel, D. (2013), "Innate and Adaptive Immunity in Long-Term Non-Progression in HIV Disease", *Front Immunol.* 4, p. 95.
222. Zeller, J. M., McCain, N. L., and Swanson, B. (1996), "Immunological and virological markers of HIV-disease progression", *J Assoc Nurses AIDS Care.* 7(1), pp. 15-27.
223. Zhang, Y., et al. (2021), "Effect of Difference in Consensus Sequence between HIV-1 Subtype A/E and Subtype B Viruses on Elicitation of Gag-Specific CD8(+) T Cells and Accumulation of HLA-Associated Escape Mutations", *J Virol.* 95(6).
224. Zhang, Y., et al. (2011), "Multilayered defense in HLA-B51-associated HIV viral control", *J Immunol.* 187(2), pp. 684-91.
225. Pereyra, Florencia and al, et (2014), "HIV Control Is Mediated in Part by CD8+ T-Cell Targeting of Specific Epitopes", *Journal of Virology.* 88(22), pp. 12937-12948.
226. K., Photini, et al. (2007), "CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load", *Nat Med.* 13, pp. 46-53.
227. L.B., Zabrina, et al. (2008), "Marked Epitope- and Allele-Specific Differences in Rates of Mutation in Human Immunodeficiency Type 1 (HIV-1) Gag, Pol, and Nef Cytotoxic T-Lymphocyte Epitopes in Acute/Early HIV-1 Infection", *Journal of Virology.* 82(18), pp. 9216–9227.
228. Matano, T. and al, et (1998), "Administration of an Anti-CD8 Monoclonal Antibody Interferes with the Clearance of Chimeric Simian/Human Immunodeficiency Virus during Primary Infections of Rhesus Macaques", *Journal of Virology.* 72(1), pp. 164-169.
229. Yaoyu E. Wang, Bin Li, et al. (2009), "Protective HLA Class I Alleles That Restrict Acute-Phase CD8 T-Cell Responses Are Associated with Viral Escape Mutations Located in Highly Conserved Regions of Human Immunodeficiency Virus Type 1", *Journal of Virology.*

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG
Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học
IRB - VN01057/ IORG 0008555

No: HĐĐĐ - 32/2020

Hà Nội, ngày 31 tháng 12 năm 2020

GIẤY CHỨNG NHẬN
Chấp thuận của Hội đồng đạo đức cơ sở

Hồ sơ mới [x]

Hồ sơ chỉnh sửa []


Hồ sơ gia hạn []

Đề cương sau đây đã được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương xem xét và chấp thuận theo Quy tắc chung và các quy định của pháp luật hiện hành về đạo đức trong nghiên cứu y sinh học.

- Tên nghiên cứu: 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 thuộc Dự án “Nghiên cứu đột biến gen virus HIV liên kết với kiểu gen HLA trên người nhiễm HIV/AIDS ở Việt Nam”
- Chủ nhiệm đề tài:
- Tổ chức chủ trì: Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương
- Nhà tài trợ: Viện quốc gia các bệnh truyền nhiễm Nhật Bản
Tổ chức Atlantic Philanthropies
- Địa điểm triển khai: Mẫu thu thập tại 13 phòng khám ngoại trú HIV/AIDS trên địa bàn Hà Nội
- Đối tượng và cỡ mẫu: Bệnh nhân nhiễm HIV chưa điều trị ARV
Cỡ mẫu: 304 mẫu đã thu thập từ tháng 12/2014 – 04/2016
- Thời gian nghiên cứu: 2018 - 2021
- Các tài liệu sau đây đã được chấp thuận để sử dụng trong nghiên cứu:

TT	Tên tài liệu	Phiên bản	Ngày
1.	Đề cương nghiên cứu	01	31/12/2020
2.	Thông tin nghiên cứu và phiếu chấp thuận tham gia nghiên cứu	01	18/03/2015

Giấy chứng nhận có giá trị từ ngày ký đến ngày 31 tháng 12 năm 2021. *ly*

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG *ly*

GS. TS. Vũ Sinh Nam



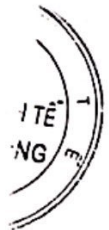
VIỆN TRƯỞNG
Dặng Đức Anh

Danh sách các phòng khám thu thập mẫu

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

STT	Địa điểm thu mẫu	Ký hiệu	Số mẫu thu thập
1.	Bệnh viện Hà Đông	HD	45
2.	Bệnh viện 09	BV09	05
3.	Bệnh viện Lao phổi	LP	03
4.	PKNT Ba Vì	BV	69
5.	PKNT Đông Anh	DA	35
6.	PKNT Nam Từ Liêm	NTL	100
7.	PKNT Tây Hồ	TH	03
8.	PKNT Thanh Xuân	TX	06
9.	PKNT trại giam Thanh Xuân	TGTX	18
10.	PKNT Gia Lâm	GL	02
11.	PKNT Hoàng Mai	HM	02
12.	PKNT Sơn Tây	ST	12
13.	Trung tâm phòng chống HIV/AIDS Hà Nội	PAC	04
	Tổng		304

ĐUY



**CHỨNG NHẬN CHẤP THUẬN CỦA HỘI ĐỒNG ĐẠO ĐỨC
TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH**

Căn cứ vào Quyết định số: 1755/QĐ-VSDTTU, ngày 20 tháng 12 năm 2013 của Viện trưởng Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương về việc thành lập Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học để xét duyệt các vấn đề đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học của đề tài/dự án.

Căn cứ Bản chấp thuận số 06/HĐĐĐ của Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học ngày 12/4/2012 của Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương cho nghiên cứu: *Nghiên cứu đột biến gen virus HIV liên kết với kiểu gen HLA trên người nhiễm HIV/AIDS ở Việt Nam.*

Chủ nhiệm đề tài:

Căn cứ biên bản họp Hội đồng ngày 16/3/2015 xem xét chỉnh sửa về thời gian kéo dài đến tháng 12/2016, trên cơ sở các điểm nghiên cứu của giai đoạn I, nhưng có tăng số lượng cỡ mẫu 330 bệnh nhân để đảm bảo tính khoa học của kết quả nghiên cứu, nhưng không thay đổi phương pháp, quy trình nghiên cứu.

Hội đồng Đạo Đức trong nghiên cứu Y-sinh học đã xem xét và chấp thuận điều chỉnh nghiên cứu trên.

Ngày chấp nhận (cho phép): Ngày 18 tháng 3 năm 2015

CHỦ TỊCH HỘI ĐỒNG

ỦY VIÊN THƯ KÝ HỘI ĐỒNG



GS. TS. PHẠM NGỌC ĐỈNH

PGS. TS. PHAN THỊ NGÀ

K. VIÊN TRƯỞNG



PHỤ LỤC 3. DANH SÁCH ĐỐI TƯỢNG THAM GIA NGHIÊN CỨU

STT	Mã nghiên cứu	Mã mẫu PTN	pVL (Logcopies/ml)	CD4 (tế bào/ul)	Giới tính	Ngày sinh	Ngày phỏng vấn
1	01-NTL	MS1-14M0896	3,13	399	Nữ	8/16/1986	12/31/2014
2	02-NTL	MS1-14M0897	5,28	759	Nam	9/10/1977	12/31/2014
3	03-NTL	MS1-14M0898	2,23	455	Nam	5/8/1987	12/31/2014
4	04-NTL	MS1-14M0899	4,45	582	Nữ	6/16/1973	12/31/2014
5	05-NTL	MS1-14M0900	5,05	636	Nam	1/6/1985	12/31/2014
6	06-NTL	MS1-14M0901	4,28	676	Nữ	5/3/1984	12/31/2014
7	07-NTL	MS1-14M0902	4,03	821	Nam	12/5/1967	12/31/2014
8	08-NTL	MS1-14M0903	4,62	515	Nam	11/8/1976	12/31/2014
9	09-NTL	MS1-14M0904	3,97	598	Nam	6/24/1977	12/31/2014
10	10-NTL	MS1-14M0905	4,78	646	Nam	9/19/1979	12/31/2014
11	11-NTL	MS1-14M0906	5,35	811	Nam	6/11/1967	12/31/2014
12	12-NTL	MS1-14M0907	4,31	599	Nữ	1/1/1990	12/31/2014
13	13-NTL	MS1-14M0908	3,77	374	Nữ	6/30/1979	12/31/2014
14	14-NTL	MS1-14M0909	3,64	851	Nam	4/20/1981	12/31/2014
15	15-NTL	MS1-14M0910	3,6	851	Nam	4/5/1984	12/31/2014
16	16-NTL	MS1-14M0911	4,39	428	Nam	7/31/1976	12/31/2014
17	17-NTL	MS1-14M0912	4,17	421	Nam	1/6/1989	12/31/2014
18	18-NTL	MS1-14M0913	3,18	600	Nam	2/9/1980	12/31/2014
19	19-NTL	MS1-14M0914	3,85	1037	Nam	6/24/1980	12/31/2014
20	20-NTL	MS1-14M0915	4,43	581	Nữ	7/21/1980	12/31/2014
21	21-NTL	MS1-14M0916	KPH	781	Nam	3/12/1975	12/31/2014
22	22-NTL	MS1-14M0917	5,3	222	Nữ	6/18/1983	12/31/2014
23	23-NTL	MS1-14M0918	5,14	14	Nam	8/28/1981	12/31/2014
24	24-NTL	MS1-14M0919	2,59	880	Nữ	11/20/1984	12/31/2014
25	25-NTL	MS1-15M0010	2,57	936	Nam	5/29/1984	1/7/2015
26	26-NTL	MS1-15M0011	4,35	630	Nam	6/1/1990	1/7/2015
27	27-NTL	MS1-15M0012	6,12	296	Nam	1/19/1985	1/7/2015
28	28-NTL	MS1-15M0013	5,7	74	Nam	2/12/1977	1/7/2015
29	29-NTL	MS1-15M0014	4,26	465	Nam	10/22/1984	1/7/2015
30	30-NTL	MS1-15M0015	4,72	616	Nam	11/1/1981	1/7/2015
31	31-NTL	MS1-15M0016	5,62	212	Nam	10/28/1981	1/7/2015
32	32-NTL	MS1-15M0017	4,39	372	Nữ	8/24/1984	1/7/2015
33	33-NTL	MS1-15M0018	5,27	51	Nam	6/6/1984	1/7/2015
34	34-NTL	MS1-15M0019	KPH	713	Nam	8/23/1981	1/7/2015
35	35-NTL	MS1-15M0020	4,47	307	Nam	5/8/1969	1/7/2015
36	36-NTL	MS1-15M0021	3,52	521	Nam	4/30/1975	1/7/2015
37	37-NTL	MS1-15M0022	4,09	666	Nam	12/13/1983	1/7/2015
38	38-NTL	MS1-15M0023	4,46	368	Nam	12/22/1981	1/7/2015
39	39-NTL	MS1-15M0024	5,07	164	Nam	1/18/1986	1/7/2015
40	40-NTL	MS1-15M0025	4,03	920	Nam	8/15/1978	1/7/2015
41	41-NTL	MS1-15M0026	5,41	576	Nam	11/27/1981	1/7/2015
42	42-NTL	MS1-15M0027	4,21	412	Nam	6/5/1985	1/7/2015
43	43-NTL	MS1-15M0028	5,17	385	Nam	11/27/1987	1/7/2015

STT	Mã nghiên cứu	Mã mẫu PTN	pVL (Logcopies/ml)	CD4 (tế bào/ul)	Giới tính	Ngày sinh	Ngày phỏng vấn
44	001-HD	MS1-15M0040	4,35	625	Nam	4/22/1956	1/20/2015
45	002-HD	MS1-15M0041	4,37	692	Nữ	10/4/1974	1/20/2015
46	003-HD	MS1-15M0042	2,8	406	Nữ	11/15/1984	1/20/2015
47	44-NTL	MS1-15M0044	5,6	609	Nam	11/26/1985	1/22/2015
48	45-NTL	MS1-15M0045	5,75	187	Nam	8/29/1990	1/22/2015
49	46-NTL	MS1-15M0046	3,44	679	Nữ	9/3/1977	1/22/2015
50	47-NTL	MS1-15M0047	4,89	245	Nam	11/10/1988	1/22/2015
51	48-NTL	MS1-15M0048	2,69	184	Nam	10/4/1985	1/22/2015
52	49-NTL	MS1-15M0049	3,74	683	Nam	5/25/1987	1/22/2015
53	50-NTL	MS1-15M0050	4,62	689	Nữ	7/25/1990	1/22/2015
54	004-HD	MS1-15M0051	2,83	532	Nữ	6/19/1979	1/28/2015
55	005-HD	MS1-15M0052	5,95	60	Nam	1/1/1984	1/28/2015
56	006-HD	MS1-15M0053	3,32	475	Nữ	9/16/1976	1/28/2015
57	007-HD	MS1-15M0054	4,2	196	Nam	11/1/1992	1/28/2015
58	008-HD	MS1-15M0055	3,57	450	Nữ	1/1/1984	1/28/2015
59	009-HD	MS1-15M0056	3,89	532	Nam	7/15/1988	1/28/2015
60	010-HD	MS1-15M0057	3,73	442	Nữ	8/20/1988	1/28/2015
61	011-HD	MS1-15M0058	3,56	494	Nữ	2/15/1989	1/28/2015
62	012-HD	MS1-15M0059	4,64	56	Nam	1/8/1987	1/28/2015
63	013-HD	MS1-15M0060	3,16	614	Nữ	7/26/1984	1/28/2015
64	014-HD	MS1-15M0061	4,99	338	Nữ	9/2/1982	1/28/2015
65	015-HD	MS1-15M0062	3,62	256	Nữ	5/20/1955	1/28/2015
66	016-HD	MS1-15M0063	2,9	281	Nam	5/28/1974	1/28/2015
67	017-HD	MS1-15M0070	2,46	441	Nữ	3/18/1983	1/28/2015
68	018-HD	MS1-15M0071	4,46	339	Nam	7/31/1981	1/28/2015
69	019-HD	MS1-15M0072	3,29	713	Nữ	5/24/1981	1/28/2015
70	020-HD	MS1-15M0073	4,36	313	Nam	12/28/1986	1/28/2015
71	021-HD	MS1-15M0074	3,13	461	Nam	12/5/1977	1/28/2015
72	022-HD	MS1-15M0075	4,94	297	Nữ	5/23/1976	1/28/2015
73	023-HD	MS1-15M0076	3	302	Nữ	2/6/1983	1/28/2015
74	024-HD	MS1-15M0077	3,18	605	Nữ	1/1/1985	1/28/2015
75	025-HD	MS1-15M0078	3,42	224	Nữ	11/7/1984	1/28/2015
76	026-HD	MS1-15M0079	3,43	805	Nam	1/1/1977	1/28/2015
77	027-HD	MS1-15M0080	4	449	Nữ	8/17/1996	1/28/2015
78	028-HD	MS1-15M0081	3,19	554	Nữ	8/16/1986	1/28/2015
79	029-HD	MS1-15M0082	3,66	433	Nữ	8/18/1991	1/28/2015
80	030-HD	MS1-15M0083	3,92	586	Nữ	11/4/1993	1/28/2015
81	031-HD	MS1-15M0084	4,54	371	Nam	4/4/1981	1/28/2015
82	032-HD	MS1-15M0085	4,41	227	Nam	11/20/1988	1/28/2015
83	033-HD	MS1-15M0086	4,28	559	Nam	7/27/1985	1/28/2015
84	001-ST	MS1-15M0088	4,6	97	Nam	10/28/1976	1/29/2015
85	002-ST	MS1-15M0089	2,65	340	Nam	6/13/1969	1/29/2015
86	003-ST	MS1-15M0090	3,96	488	Nữ	11/29/1989	1/29/2015
87	004-ST	MS1-15M0091	2,82	402	Nam	10/20/1976	1/29/2015
88	005-ST	MS1-15M0092	2,66	1074	Nữ	12/10/1982	1/29/2015
89	006-ST	MS1-15M0093	3,25	588	Nam	10/7/1981	1/29/2015

STT	Mã nghiên cứu	Mã mẫu PTN	pVL (Logcopies/ml)	CD4 (tế bào/ul)	Giới tính	Ngày sinh	Ngày phỏng vấn
90	007-ST	MS1-15M0094	5,05	433	Nam	9/24/1979	1/29/2015
91	008-ST	MS1-15M0095	3,64	456	Nam	6/26/1986	1/29/2015
92	009-ST	MS1-15M0096	3,8	584	Nữ	4/17/1984	1/29/2015
93	010-ST	MS1-15M0097	4,38	687	Nam	11/3/1982	1/29/2015
94	011-ST	MS1-15M0098	3,56	396	Nữ	10/12/1985	1/29/2015
95	012-ST	MS1-15M0099	5,3	251	Nam	1/1/1968	1/29/2015
96	51-NTL	MS1-15M0100	KPH	809	Nam	2/1/1981	1/30/2015
97	52-NTL	MS1-15M0101	4,16	172	Nam	2/18/1958	1/30/2015
98	53-NTL	MS1-15M0102	5,29	402	Nữ	2/10/1994	1/30/2015
99	54-NTL	MS1-15M0103	5,96	229	Nữ	8/29/1991	1/30/2015
100	55-NTL	MS1-15M0104	3,98	472	Nữ	11/3/1983	1/30/2015
101	56-NTL	MS1-15M0105	4,4	440	Nam	10/25/1979	1/30/2015
102	57-NTL	MS1-15M0106	3,45	335	Nữ	2/1/1984	1/30/2015
103	58-NTL	MS1-15M0107	4,65	185	Nam	8/17/1983	1/30/2015
104	001-DA	MS1-15M0116	4,07	811	Nam	4/14/1968	2/5/2015
105	002-DA	MS1-15M0117	3,67	370	Nam	2/12/1979	2/5/2015
106	003-DA	MS1-15M0118	4,06	408	Nữ	11/17/1985	2/5/2015
107	004-DA	MS1-15M0119	KPH	841	Nam	1/1/1969	2/5/2015
108	005-DA	MS1-15M0120	4,14	823	Nam	2/10/1966	2/5/2015
109	006-DA	MS1-15M0121	4,35	431	Nữ	10/8/1984	2/5/2015
110	007-DA	MS1-15M0122	3,91	63	Nam	8/1/1971	2/5/2015
111	008-DA	MS1-15M0123	4,06	566	Nữ	4/3/1984	2/5/2015
112	009-DA	MS1-15M0124	2,83	531	Nam	10/10/1977	2/5/2015
113	010-DA	MS1-15M0125	3,12	666	Nữ	1/31/1988	2/5/2015
114	001-TX	MS1-15M0126	3,64	965	Nam	4/15/1992	2/5/2015
115	002-TX	MS1-15M0127	4,63	72	Nam	10/15/1988	2/5/2015
116	003-TX	MS1-15M0128	2,54	125	Nam	5/26/1981	2/5/2015
117	004-TX	MS1-15M0129	2,71	354	Nam	10/23/1979	2/5/2015
118	59-NTL	MS1-15M0143	5,09	134	Nữ	8/1/1980	2/27/2015
119	60-NTL	MS1-15M0144	5,5	50	Nam	2/18/1974	2/27/2015
120	61-NTL	MS1-15M0145	KPH	370	Nam	11/1/1981	2/27/2015
121	62-NTL	MS1-15M0146	3,51	235	Nam	4/10/1981	2/27/2015
122	63-NTL	MS1-15M0147	5,15	228	Nam	5/12/1964	2/27/2015
123	64-NTL	MS1-15M0148	3,73	410	Nam	4/20/1981	2/27/2015
124	65-NTL	MS1-15M0149	5,08	231	Nam	5/8/1980	2/27/2015
125	011-DA	MS1-15M0362	3,81	770	Nữ	10/24/1984	10/23/2015
126	012-DA	MS1-15M0363	5,38	81	Nam	8/21/1988	10/23/2015
127	013-DA	MS1-15M0364	4,48	267	Nữ	7/21/1994	10/23/2015
128	014-DA	MS1-15M0365	3,48	614	Nữ	2/3/1991	10/23/2015
129	015-DA	MS1-15M0366	2,82	620	Nam	3/2/1983	10/23/2015
130	016-DA	MS1-15M0367	2,58	554	Nam	6/8/1976	10/23/2015
131	017-DA	MS1-15M0368	5,75	224	Nam	4/19/1973	10/23/2015
132	018-DA	MS1-15M0369	5,47	KXĐ	Nam	6/8/1977	10/23/2015
133	001-HM	MS1-15M0370	4,86	527	Nam	11/19/1984	10/26/2015
134	002-HM	MS1-15M0371	3,95	402	Nam	10/6/1991	10/26/2015
135	001-BV	MS1-15M0375	2,75	863	Nam	5/10/1976	10/26/2015

STT	Mã nghiên cứu	Mã mẫu PTN	pVL (Logcopies/ml)	CD4 (tế bào/ul)	Giới tính	Ngày sinh	Ngày phỏng vấn
136	002-BV	MS1-15M0376	2,25	687	Nam	10/28/1976	10/26/2015
137	003-BV	MS1-15M0377	5,06	153	Nam	1/1/1971	10/26/2015
138	004-BV	MS1-15M0378	5,06	332	Nam	1/1/1983	10/26/2015
139	005-BV	MS1-15M0379	5,67	387	Nam	7/9/1993	10/26/2015
140	006-BV	MS1-15M0380	5,11	571	Nam	1/12/1977	10/26/2015
141	008-BV	MS1-15M0381	4,77	576	Nam	2/5/1988	10/26/2015
142	009-BV	MS1-15M0382	4,87	107	Nam	11/3/1983	10/26/2015
143	010-BV	MS1-15M0383	4,86	287	Nam	5/5/1975	10/26/2015
144	011-BV	MS1-15M0384	KPH	886	Nam	10/17/1987	10/26/2015
145	012-BV	MS1-15M0385	4,94	538	Nam	11/24/1979	10/26/2015
146	013-BV	MS1-15M0386	KPH	616	Nam	10/31/1966	10/26/2015
147	014-BV	MS1-15M0387	4,80	303	Nam	9/9/1959	10/26/2015
148	015-BV	MS1-15M0388	KPH	793	Nam	10/7/1962	10/26/2015
149	016-BV	MS1-15M0389	5,55	76	Nam	12/16/1989	10/26/2015
150	017-BV	MS1-15M0390	KPH	642	Nam	8/16/1984	10/26/2015
151	018-BV	MS1-15M0391	5,34	241	Nam	1/1/1983	10/26/2015
152	019-BV	MS1-15M0392	4,39	402	Nam	5/13/1982	10/26/2015
153	066-NTL	MS1-15M0393	4,46	258	Nữ	3/26/1989	10/27/2015
154	070-NTL	MS1-15M0396	3,74	283	Nam	2/25/1974	10/27/2015
155	001-LP	MS1-15M0397	5,98	392	Nữ	9/14/1982	10/27/2015
156	002-LP	MS1-15M0398	4,20	60	Nam	10/24/1976	10/27/2015
157	003-LP	MS1-15M0399	3,33	468	Nam	10/9/1993	10/27/2015
158	034-HD	MS1-15M0400	5,78	59	Nữ	4/20/1974	10/27/2015
159	035-HD	MS1-15M0401	4,50	422	Nam	4/14/1959	10/27/2015
160	037-HD	MS1-15M0403	2,49	573	Nữ	12/20/1992	10/27/2015
161	038-HD	MS1-15M0404	4,55	295	Nam	8/8/1982	10/27/2015
162	001-TH	MS1-15M0408	3,46	560	Nam	1/28/1983	10/30/2015
163	002-TH	MS1-15M0409	5,79	194	Nam	8/22/1981	10/30/2015
164	003-TH	MS1-15M0410	4,23	KXĐ	Nam	3/17/1980	10/30/2015
165	019-DA	MS1-15M0411	6,01	224	Nam	9/19/1977	10/23/2015
166	020-DA	MS1-15M0412	4,63	553	Nam	7/31/1996	10/30/2015
167	021-DA	MS1-15M0413	4,94	440	Nam	1/1/1975	10/30/2015
168	022-DA	MS1-15M0414	5,22	461	Nữ	8/10/1988	10/30/2015
169	002-PAC	MS1-15M0417	4,36	472	Nữ	6/10/1983	11/2/2015
170	071-NTL	MS1-15M0423	4,07	530	Nam	3/21/1973	11/4/2015
171	072-NTL	MS1-15M0424	3,81	841	Nam	6/2/1983	11/4/2015
172	073-NTL	MS1-15M0428	KPH	598	Nam	8/27/1980	11/9/2015
173	001-TX	MS1-15M0432	5,00	881	Nam	12/18/1981	11/10/2015
174	002-TX	MS1-15M0433	5,26	760	Nam	3/10/1983	11/10/2015
175	003-PAC	MS1-15M0435	4,81	140	Nam	1/1/1980	11/12/2015
176	004-PAC	MS1-15M0438	3,61	322	Nam	9/7/1963	11/17/2015
177	001-GL	MS1-15M0440	4,46	550	Nam	11/17/1985	11/18/2015
178	002-GL	MS1-15M0441	Dưới ngưỡng định lượng	402	Nam	4/13/1979	11/18/2015
179	023-DA	MS1-15M0446	5,24	120	Nữ	8/5/1988	11/25/2015
180	024-DA	MS1-15M0447	5,71	241	Nữ	10/30/1980	11/25/2015

STT	Mã nghiên cứu	Mã mẫu PTN	pVL (Logcopies/ml)	CD4 (tế bào/ul)	Giới tính	Ngày sinh	Ngày phỏng vấn
181	025-DA	MS1-15M0448	KPH	964	Nam	1/13/1975	11/25/2015
182	026-DA	MS1-15M0449	3,51	318	Nam	4/15/1980	11/25/2015
183	074-NTL	MS1-15M0450	4,51	495	Nam	1/2/1979	11/25/2015
184	075-NTL	MS1-15M0451	4,90	479	Nam	9/9/1978	11/25/2015
185	076-NTL	MS1-15M0456	3,54	975	Nam	4/30/1976	12/2/2015
186	078-NTL	MS1-15M0457	KPH	307	Nam	10/23/1977	12/2/2015
187	005-PAC	MS1-15M0458	4,48	507	Nam	9/15/1989	12/2/2015
188	020-BV	MS1-15M0459	4,25	606	Nam	1/1/1970	12/2/2015
189	021-BV	MS1-15M0460	4,24	460	Nam	1/1/1960	12/2/2015
190	022-BV	MS1-15M0461	4,03	472	Nam	1/1/1976	12/2/2015
191	023-BV	MS1-15M0462	4,01	351	Nam	1/1/1981	12/2/2015
192	024-BV	MS1-15M0463	4,07	272	Nam	1/1/1982	12/2/2015
193	025-BV	MS1-15M0464	4,24	243	Nam	1/1/1975	12/2/2015
194	026-BV	MS1-15M0465	4,13	542	Nam	1/1/1988	12/2/2015
195	027-BV	MS1-15M0466	5,13	313	Nam	1/1/1979	12/2/2015
196	028-BV	MS1-15M0467	4,75	780	Nam	1/1/1977	12/2/2015
197	029-BV	MS1-15M0468	5,08	403	Nam	1/1/1976	12/2/2015
198	030-BV	MS1-15M0469	4,81	339	Nam	1/1/1985	12/2/2015
199	031-BV	MS1-15M0470	4,21	565	Nam	1/1/1979	12/2/2015
200	032-BV	MS1-15M0471	3,92	574	Nam	1/1/1976	12/2/2015
201	033-BV	MS1-15M0472	4,24	682	Nam	1/1/1971	12/2/2015
202	034-BV	MS1-15M0473	4,57	655	Nam	1/1/1989	12/2/2015
203	035-BV	MS1-15M0474	3,78	320	Nam	1/1/1983	12/2/2015
204	036-BV	MS1-15M0475	4,30	233	Nam	1/1/1990	12/2/2015
205	037-BV	MS1-15M0476	3,40	533	Nam	1/1/1994	12/2/2015
206	038-BV	MS1-15M0477	4,49	404	Nam	1/1/1982	12/2/2015
207	039-BV	MS1-15M0478	4,34	668	Nam	1/1/1985	12/2/2015
208	040-BV	MS1-15M0479	4,03	294	Nam	1/1/1986	12/2/2015
209	041-BV	MS1-15M0480	3,57	226	Nam	1/1/1987	12/2/2015
210	080-NTL	MS1-15M0488	5,21	183	Nữ	3/8/1983	12/8/2015
211	001-BV09	MS1-15M0499	2,95	885	Nam	1/1/1977	12/25/2015
212	002-BV09	MS1-15M0500	3,37	305	Nữ	7/11/1991	12/25/2015
213	003-BV09	MS1-15M0501	3,96	379	Nam	9/20/1989	12/25/2015
214	004-BV09	MS1-15M0502	3,67	442	Nam	2/26/1971	12/25/2015
215	005-BV09	MS1-15M0503	4,21	179	Nam	12/24/1978	12/25/2015
216	005-TGTX	MS1-15M0505	KPH	364	Nam	12/12/1973	12/15/2015
217	006-TGTX	MS1-15M0506	2,85	415	Nam	12/3/1982	12/15/2015
218	007-TGTX	MS1-15M0507	4,03	483	Nam	4/25/1988	12/15/2015
219	008-TGTX	MS1-15M0508	4,05	162	Nam	11/20/1981	12/15/2015
220	009-TGTX	MS1-15M0509	4,29	278	Nam	12/3/1978	12/15/2015
221	010-TGTX	MS1-15M0510	2,95	190	Nam	6/28/1979	12/15/2015
222	012-TGTX	MS1-15M0511	4,06	300	Nam	2/23/1975	12/15/2015
223	014-TGTX	MS1-15M0512	KPH	KXĐ	Nam	5/25/1974	12/15/2015
224	015-TGTX	MS1-15M0513	KPH	858	Nam	12/23/1984	12/15/2015
225	016-TGTX	MS1-15M0514	4,70	362	Nam	8/19/1983	12/15/2015
226	017-TGTX	MS1-15M0515	3,85	591	Nam	12/20/1986	12/15/2015

STT	Mã nghiên cứu	Mã mẫu PTN	pVL (Logcopies/ml)	CD4 (tế bào/ul)	Giới tính	Ngày sinh	Ngày phỏng vấn
227	018-TGTX	MS1-15M0516	3,57	268	Nam	1/1/1977	12/15/2015
228	019-TGTX	MS1-15M0517	4,63	260	Nam	5/9/1989	12/15/2015
229	020-TGTX	MS1-15M0518	3,17	252	Nữ	8/12/1983	12/15/2015
230	021-TGTX	MS1-15M0519	Dưới ngưỡng định lượng	706	Nữ	1/1/1996	12/15/2015
231	022-TGTX	MS1-15M0520	KPH	723	Nữ	6/1/1964	12/15/2015
232	023-TGTX	MS1-15M0521	3,06	500	Nam	1/10/1976	12/15/2015
233	024-TGTX	MS1-15M0522	KPH	592	Nam	10/9/1986	12/15/2015
234	077-NTL	MS1-15M0523	5,15	26	Nam	2/10/1979	12/15/2015
235	079-NTL	MS1-15M0524	4,16	87	Nam	3/20/1962	12/15/2015
236	081-NTL	MS1-15M0525	4,09	365	Nam	8/29/1975	12/15/2015
237	082-NTL	MS1-15M0526	4,65	453	Nam	10/21/1985	12/15/2015
238	083-NTL	MS1-15M0527	5,11	557	Nữ	9/6/1991	12/15/2015
239	084-NTL	MS1-15M0528	3,46	477	Nam	6/3/1966	12/15/2015
240	085-NTL	MS1-15M0529	4,90	519	Nam	11/1/1979	12/15/2015
241	089-NTL	MS1-16M0007	4,63	182	Nữ	1/11/1947	1/6/2016
242	090-NTL	MS1-16M0008	5,36	17	Nam	11/9/1986	1/6/2016
243	091-NTL	MS1-16M0009	2,63	430	Nam	1/1/1983	1/6/2016
244	092-NTL	MS1-16M0020	4,02	303	Nữ	11/26/1981	1/21/2016
245	093-NTL	MS1-16M0021	2,99	151	Nam	1/1/1970	1/26/2016
246	094-NTL	MS1-16M0022	3,51	229	Nam	1/18/1971	1/20/2016
247	096-NTL	MS1-16M0052	5,10	115	Nam	2/7/1981	3/9/2016
248	097-NTL	MS1-16M0053	3,45	318	Nam	9/13/1980	3/9/2016
249	098-NTL	MS1-16M0054	5,48	129	Nữ	10/8/1996	3/9/2016
250	099-NTL	MS1-16M0058	2,84	445	Nữ	3/14/1997	3/16/2016
251	100-NTL	MS1-16M0059	2,80	326	Nam	9/8/1991	3/16/2016
252	101-NTL	MS1-16M0060	4,14	734	Nam	2/26/1987	3/16/2016
253	102-NTL	MS1-16M0061	5,71	118	Nam	1/1/1979	3/23/2016
254	103-NTL	MS1-16M0062	5,77	319	Nữ	8/10/1981	3/23/2016
255	027-DA	MS1-16M0063	5,85	82	Nam	1/30/1981	3/18/2016
256	028-DA	MS1-16M0064	3,48	546	Nam	6/17/1978	3/18/2016
257	029-DA	MS1-16M0065	4,70	309	Nữ	9/10/1982	3/18/2016
258	030-DA	MS1-16M0066	5,27	73	Nam	10/7/1987	3/18/2016
259	040-HD	MS1-16M0073	2,52	253	Nam	3/23/1989	3/22/2016
260	041-HD	MS1-16M0074	4,60	758	Nữ	7/1/1997	3/22/2016
261	042-HD	MS1-16M0075	4,63	627	Nữ	10/29/1988	3/22/2016
262	043-HD	MS1-16M0076	3,71	558	Nữ	1/30/1982	3/22/2016
263	044-HD	MS1-16M0077	3,52	830	Nữ	1/19/1983	3/22/2016
264	046-HD	MS1-16M0079	KPH	560	Nữ	11/29/1981	3/22/2016
265	047-HD	MS1-16M0080	4,06	363	Nữ	4/16/1990	3/22/2016
266	048-HD	MS1-16M0081	Dưới ngưỡng định lượng	822	Nam	8/10/1977	3/22/2016
267	031-DA	MS1-16M0084	4,23	267	Nam	8/4/1980	3/24/2016
268	032-DA	MS1-16M0085	5,58	166	Nam	1/20/1986	3/24/2016
269	104-NTL	MS1-16M0105	2,96	456	Nam	6/26/1993	4/13/2016
270	105-NTL	MS1-16M0106	3,15	467	Nam	5/7/1991	4/13/2016
271	106-NTL	MS1-16M0107	4,97	113	Nam	11/21/1983	4/13/2016

STT	Mã nghiên cứu	Mã mẫu PTN	pVL (Logcopies/ml)	CD4 (tế bào/ul)	Giới tính	Ngày sinh	Ngày phỏng vấn
272	033-DA	MS1-16M0108	4,61	337	Nữ	8/24/1988	4/19/2016
273	034-DA	MS1-16M0109	4,92	50	Nam	1/1/1978	4/19/2016
274	035-DA	MS1-16M0110	KPH	935	Nam	11/25/1978	4/19/2016
275	107-NTL	MS1-16M0114	3,93	191	Nam	1/1/1980	4/21/2016
276	042-BV	MS1-16M0118	5,42	140	Nam	1/1/1980	4/21/2016
277	043-BV	MS1-16M0119	4,67	247	Nam	1/1/1980	4/21/2016
278	044-BV	MS1-16M0120	3,17	857	Nam	1/1/1978	4/21/2016
279	045-BV	MS1-16M0121	2,40	394	Nam	1/1/1992	4/21/2016
280	046-BV	MS1-16M0122	4,32	280	Nam	1/1/1974	4/21/2016
281	047-BV	MS1-16M0123	2,87	680	Nam	1/1/1983	4/21/2016
282	048-BV	MS1-16M0124	4,14	248	Nam	1/1/1978	4/21/2016
283	049-BV	MS1-16M0125	5,18	160	Nam	1/1/1977	4/21/2016
284	050-BV	MS1-16M0126	3,18	687	Nam	1/1/1984	4/21/2016
285	051-BV	MS1-16M0127	4,06	307	Nam	1/1/1978	4/21/2016
286	052-BV	MS1-16M0128	4,09	452	Nam	1/1/1989	4/21/2016
287	053-BV	MS1-16M0129	4,60	370	Nam	1/1/1977	4/21/2016
288	054-BV	MS1-16M0130	3,96	176	Nam	1/1/1973	4/21/2016
289	055-BV	MS1-16M0131	4,19	506	Nam	1/1/1978	4/21/2016
290	056-BV	MS1-16M0132	5,34	324	Nam	1/1/1977	4/21/2016
291	057-BV	MS1-16M0133	5,04	331	Nam	1/1/1982	4/21/2016
292	058-BV	MS1-16M0134	4,61	420	Nam	1/1/1971	4/21/2016
293	059-BV	MS1-16M0135	3,89	355	Nam	1/1/1988	4/21/2016
294	060-BV	MS1-16M0136	4,43	483	Nam	1/1/1992	4/21/2016
295	061-BV	MS1-16M0137	4,27	321	Nam	1/1/1979	4/21/2016
296	062-BV	MS1-16M0138	5,08	177	Nam	1/1/1977	4/21/2016
297	063-BV	MS1-16M0139	3,85	246	Nam	1/1/1979	4/21/2016
298	064-BV	MS1-16M0140	3,41	897	Nam	1/1/1980	4/21/2016
299	065-BV	MS1-16M0141	3,73	717	Nam	1/1/1976	4/21/2016
300	066-BV	MS1-16M0142	5,06	164	Nam	1/1/1981	4/21/2016
301	067-BV	MS1-16M0143	4,63	91	Nam	1/1/1977	4/21/2016
302	068-BV	MS1-16M0144	4,84	338	Nam	1/1/1986	4/21/2016
303	069-BV	MS1-16M0145	3,99	96	Nam	1/1/1973	4/21/2016
304	070-BV	MS1-16M0146	4,30	423	Nam	1/1/1972	4/21/2016