

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN VỆ SINH DỊCH TỄ TRUNG ƯƠNG

-----*

TRƯƠNG THÁI PHƯƠNG

**THEO DÕI TẢI LƯỢNG HIV
THƯỜNG QUY Ở BỆNH NHÂN ĐIỀU TRỊ
THUỐC KHÁNG VI RÚT BẬC MỘT
TẠI KHU VỰC MIỀN BẮC VIỆT NAM**

Chuyên ngành: Vi sinh y học
Mã số: 62 72 01 15

LUẬN ÁN TIẾN SỸ Y HỌC

**Người hướng dẫn khoa học 1: PGS. TS. Vũ Tường Vân
2: TS. Phạm Hồng Thắng**

HÀ NỘI - 2021

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, các bệnh nhân, bạn bè và gia đình thân yêu của mình.

Trước hết, tôi xin trân trọng bày tỏ lòng tri ân sâu sắc tới người thầy PGS. TS. Vũ Tường Vân và TS. Phạm Hồng Thắng, 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, PGS. TS. Lê Thị Quỳnh Mai, Phó viện trưởng Viện Vệ sinh Dịch tễ trung ương, Trưởng Bộ môn Vi sinh y học – Viện Vệ sinh Dịch tễ trung ương, 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 những thầy cô, đồng nghiệp, những người đã tạo mọi điều kiện, giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện luận án:

- Ban Lãnh đạo Viện, Phòng Đào tạo Sau Đại Học – viện Vệ sinh dịch tễ trung ương.

- PGS. TS. Nguyễn Quốc Anh, Giám đốc Bệnh viện Bạch Mai

- Tổ chức HAIVN đã hỗ trợ tôi hoàn thành luận án

- Phòng SHPT khoa Vi sinh và các bạn đồng nghiệp khoa Vi sinh bệnh viện Bạch Mai đã luôn ủng hộ và hỗ trợ tôi trong quá trình học tập nghiên cứu.

- PGS. TS. Đỗ Duy Cường, Giám đốc Trung tâm bệnh nhiệt đới – bệnh viện Bạch Mai cùng toàn thể các cán bộ các nghiên cứu viên của Trung tâm, các thầy cô và các bạn đồng nghiệp.

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

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 thương mến và yêu thương chân thành tới gia đình, chỗ dựa vững chắc để tôi yên tâm học tập và hoàn thành luận án.

Hà Nội, tháng 01 năm 2020

LỜI CAM ĐOAN

Tôi là Trương Thái Phương, nghiên cứu sinh khóa 35 Viện Vệ sinh Dịch tễ trung ương, chuyên ngành Vi Sinh Y Học, xin cam đoan:

1. Đây là luận án do bản thân tôi trực tiếp thực hiện dưới sự hướng dẫn của PGS. TS. Vũ Tường Vân và TS. Phạm Hồng Thắng.
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 06 tháng 01 năm 2020

Người viết cam đoan

Trương Thái Phương

MỤC LỤC

ĐẶT VẤN ĐỀ	1
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. ĐẠI CƯƠNG VỀ HIV/AIDS	3
1.1.1. Human Immunodeficiency Virus	3
1.1.2. Sự nhân lên của vi rút.....	11
1.2. Dịch tễ học nhiễm HIV/AIDS	14
1.2.1. Tình hình nhiễm HIV/AIDS trên thế giới	14
1.2.2. Tình hình nhiễm HIV/AIDS tại Việt Nam.....	17
1.3. Tình hình điều trị ARV tại Việt Nam	22
1.4. Xét nghiệm chẩn đoán nhiễm HIV tại Việt Nam.....	23
1.4.1. Mục đích của xét nghiệm	23
1.4.2 Nguyên tắc xét nghiệm.....	Error! Bookmark not defined.
1.4.3 Các chiến lược xét nghiệm.....	Error! Bookmark not defined.
1.4.4. Thực hiện xét nghiệm chẩn đoán nhiễm HIV	24
1.5. Xét nghiệm theo dõi điều trị HIV/AIDS	29
1.5.1. Xét nghiệm đo tải lượng HIV	29
1.5.2. Xét nghiệm HIV kháng thuốc ARV	31
1.5.3. Xét nghiệm đếm tế bào lympho T-CD4.....	36
1.6. THEO DÕI ĐIỀU TRỊ HIV/AIDS	39
1.6.1. Theo dõi lâm sàng	39
1.6.2. Theo dõi số lượng tế bào CD4	40
1.6.3. Theo dõi tải lượng HIV	41
1.7. HIV KHÁNG THUỐC	44
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	48

2.1. Đối tượng nghiên cứu	48
2.2. Phương pháp nghiên cứu	49
2.2.1. Cỡ mẫu	49
2.2.2. Thiết kế nghiên cứu.....	49
2.2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	50
2.2.4. Phân tích số liệu	50
2.3. Thực hiện kỹ thuật xét nghiệm trong nghiên cứu	53
2.3.1. Cách lấy mẫu và bảo quản mẫu xét nghiệm đo tải lượng vi rút, xét nghiệm DBS-PBS, lưu mẫu xét nghiệm gen kháng thuốc, xét nghiệm sinh hóa, huyết học.....	53
2.3.2. Sinh phẩm và hoá chất, kỹ thuật thiết bị thực hiện.....	54
2.3.3. Các bước tiến hành nội dung nghiên cứu theo sơ đồ tiến trình	54
2.3.4. Các xét nghiệm.....	55
2.3.5. Kỹ thuật được sử dụng trong nghiên cứu.....	55
2.4. Y Đức	59
Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	60
3.1. Đặc điểm bệnh nhân tại thời điểm được chọn vào nghiên cứu	60
3.1.1. Đặc điểm về tuổi, giới và tình trạng hôn nhân.....	60
3.1.2. Đặc điểm đường lây truyền nhiễm HIV.....	61
3.1.3. Đặc điểm lâm sàng, xét nghiệm về huyết học, hoá sinh, nhiễm trùng cơ hội và điều trị của bệnh nhân tại thời điểm trước khi bắt đầu điều trị ARV phác đồ bậc 1	62
3.2. Kết quả theo dõi điều trị của bệnh nhân	67
3.2.1. Xét nghiệm đếm tế bào lympho T-CD4, đo tải lượng HIV	67
3.2.2. Xét nghiệm tải lượng vi rút	69
3.2.3. Tiến triển giai đoạn lâm sàng và tuân thủ điều trị của bệnh nhân .	74
3.3. So sánh TLVR huyết tương và DBS-PBS.....	80

3.4. Đặc điểm kháng thuốc và gen kháng thuốc.....	84
3.5. Một số yếu tố liên quan đến kết quả theo dõi điều trị ức chế TLVR của bệnh nhân	87
Chương 4: BÀN LUẬN.....	91
4.1. Đặc điểm nhân khẩu học của nhóm bệnh nhân nhiễm HIV trong nghiên cứu	91
4.1.1. Tuổi và giới tính.....	91
4.1.2. Tình trạng hôn nhân và việc làm.....	92
4.2. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng trước điều trị ARV	93
4.2.1. Đặc điểm lâm sàng	93
4.2.2. Đặc điểm cận lâm sàng	94
4.2.3. Vai trò của xét nghiệm CD4 tại thời điểm trước điều trị	95
4.3. Xét nghiệm TLVR bằng kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS.....	97
4.4. Kết quả theo dõi điều trị và các yếu tố liên quan	103
4.4.1. Theo dõi tải lượng vi rút thường quy	103
4.4.2. Các yếu tố liên quan đến ức chế tải lượng vi rút.....	107
4.5. Gen kháng thuốc	109
4.5.1. Tỷ lệ kháng thuốc.....	109
4.5.2. Gen đột biến kháng thuốc	115
4.6. Hạn chế của đề tài.....	116
KẾT LUẬN	118
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Tình hình nhiễm HIV trên thế giới, 2018	15
Bảng 2.1. Danh sách các đột biến đề kháng thuốc ARV trong 3 nhóm NRTI, NNRTI và PI	57
Bảng 3.1. Đặc điểm nhân khẩu học	60
Bảng 3.2. Đặc điểm về nghề nghiệp và trình độ học vấn	61
Bảng 3.3. Đặc điểm lâm sàng tại thời điểm trước khi bắt đầu điều trị ARV phác đồ bậc 1	62
Bảng 3.4. Một số đặc điểm về điều trị HIV của bệnh nhân	64
Bảng 3.5. Đặc điểm về xét nghiệm CD4 và xét nghiệm TLVR	64
Bảng 3.6. Một số đặc điểm về tiền sử nghiện chất (thuốc lá, rượu/bia) của bệnh nhân	65
Bảng 3.7. Đặc điểm xét nghiệm máu của bệnh nhân	66
Bảng 3.8. Đặc điểm một số xét nghiệm huyết thanh học viêm gan, men gan	66
Bảng 3.9. Tỷ lệ phân bố bệnh nhân có $CD4 < 200$ TB/mm ³ tại các thời điểm	68
Bảng 3.10. Tỷ lệ duy trì điều trị cộng dồn tại từng thời điểm	76
Bảng 3.11. Đặc điểm TLVR huyết tương và DBS-PBS trước và sau điều trị ARV	80
Bảng 3.12. Độ nhạy và độ đặc hiệu của TLVR DBS-PBS so với TLVR huyết tương	81
Bảng 3.14. Số lượng gen kháng theo từng nhóm thuốc	86
Bảng 3.15: Phân bố TLVR, gen theo từng nhóm thuốc ca lâm sàng	85
Bảng 3.16. Liên quan giữa CD4, TLVR và giai đoạn lâm sàng tại thời điểm ban đầu	88
Bảng 3.17. Một số yếu tố liên quan đến ức chế TLVR ở người bệnh nhân ...	89

DANH MỤC CÁC BIỂU ĐỒ

Biểu đồ 1.1. Số liệu mới mắc HIV/AIDS 2017 so với cùng kỳ năm 2016	17
Biểu đồ 1.2. Phân bố ca nhiễm HIV theo nhóm tuổi trong năm 2018.....	19
Biểu đồ 1.3. Tỷ lệ nhiễm HIV theo giới tính từ 1993 – 9/2015.	19
Biểu đồ 1.4. Phân bố tỷ lệ nhiễm HIV theo đường lây qua các năm.....	20
Biểu đồ 1.5. Phân bố tỷ lệ nhiễm HIV theo đường lây trong năm 2018.....	20
Biểu đồ 1.6. Tỷ lệ nhiễm HIV trong các nhóm nguy cơ cao	21
Biểu đồ 1.7. Số lượng phòng khám HIV/AIDS từ 2012 – 2018.....	22
Biểu đồ 1.8. Số lượng điều trị ARV và số tử vong tương ứng từ 2004-2018	23
Biểu đồ 1.9. Phân bố triển khai theo dõi TLVR tại các quốc gia thu nhập thấp và trung bình tính đến tháng 7/2019.....	43
Biểu đồ 1.10. Số lượng theo dõi TLVR thường quy tại Việt Nam.....	44
Biểu đồ 3.1. Đặc điểm về đường lây truyền HIV	61
Biểu đồ 3.2. Các nhiễm trùng cơ hội thường gặp của bệnh nhân tại thời điểm thời điểm trước khi bắt đầu điều trị ARV phác đồ bậc 1`	63
Biểu đồ 3.3. Tiến triển về trung vị số lượng tế bào CD4.....	67
Biểu đồ 3.4. Tiến triển về trung vị tải lượng vi rút	69
Biểu đồ 3.5. Tỷ lệ bệnh nhân có TLVR<20 bản sao/ml tại các thời điểm	70
Biểu đồ 3.6. Tỷ lệ bệnh nhân có TLVR<20 bản sao/ml tại các thời điểm theo vùng địa lý	71
Biểu đồ 3.7. Tỷ lệ bệnh nhân có TLVR<20 bản sao/ml tại các thời điểm theo giới tính.....	72
Biểu đồ 3.8. Tỷ lệ bệnh nhân có TLVR<20 bản sao/ml tại các thời điểm theo nhóm tuổi.....	73
Biểu đồ 3.9. Tiến triển về giai đoạn lâm sàng 1 & 2 tại các thời điểm.....	74
Biểu đồ 3.10. Tỷ lệ tuân thủ tốt chế độ điều trị tại các thời điểm.....	75
Biểu đồ 3.11. Tỷ suất duy trì điều trị của bệnh nhân theo thời gian.....	76
Biểu đồ 3.12. Tỷ suất tử vong theo phân nhóm TLVR	77

Biểu đồ 3.13. Tỷ suất tử vong theo giới tính	77
Biểu đồ 3.14. Tỷ suất tử vong theo phân nhóm tuổi.....	78
Biểu đồ 3.15. Tỷ suất tử vong theo vùng địa lý	79
Biểu đồ 3.16. Đường cong ROC TLVR Plasma và TLVR DBS-PBS ở ngưỡng 1000 bản sao/ml	82
Biểu đồ 3.17. Đường cong ROC TLVR Plasma và TLVR PBS ở ngưỡng 5000 bản sao/ml.....	83
Biểu đồ 3.18. Tương quan giữa Log10 TLVR Plasma và Log10 TLVR PBS	83
Biểu đồ 3.19. Tỷ suất xuất hiện gen kháng thuốc theo thời gian.....	84
Biểu đồ 3.20. Số lượng kháng các thuốc ARV phổ biến	85
Biểu đồ 3.21. Các gen kháng thuốc phổ biến theo từng nhóm thuốc	87
Biểu đồ 3.22. Tỷ suất xuất hiện kháng thuốc theo phân nhóm CD4 ban đầu	88
Biểu đồ 3.23. Tỷ suất xuất hiện kháng thuốc theo phân nhóm TLVR ban đầu.....	88
Biểu đồ 3.24. Tương quan giữa chỉ số CD4 và chỉ số tải lượng vi rút tại thời điểm ban đầu.....	87

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1.1. Phân bố thứ tít (subtype) của HIV-1 trên thế giới	5
Hình 1.2. Cấu trúc HIV	8
Hình 1.3. HIV-1 genome.....	9
Hình 1.4. Tế bào lympho nhiễm HIV cho thấy có nhiều vi rút trên bề mặt tế bào, vi rút mới hình thành nảy chồi từ màng tế bào	11
Hình 1.5. Sự nhận diện tế bào ký chủ của HIV	12
Hình 1.6. Chu kỳ nhân lên của HIV gồm 7 bước	13
Hình 1.7. Tỷ lệ mắc HIV ở người lớn trong độ tuổi từ 15 - 49	15
Hình 1.8. Đột biến M184V, T215F đối với nhóm NRTIs và đột biến K101E, G190A đối với nhóm NNRTIs	34
Hình 2.1. Minh họa tính điểm đột biến kháng thuốc nhóm PI bằng chương trình MARVEL.....	58
Hình 2.2. Minh họa phiên giải kết quả đánh giá kháng thuốc nhóm NRTI và NNRTI bằng chương trình HIVdb	58

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Từ gốc tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
3TC	Lamivudine	Lamivudine
ABC	Abacavir	Abacavir
ADR	Acquired drug resistance	Kháng thuốc mắc phải
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome	Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải
ARN	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
ATV/r	Azatanavir/ritonavir	Thuốc ARV
AZT	Zidovudin	Thuốc ARV
CCR5	C-C chemokine receptor type 5	Hóa thụ thể C-C type 5
CRF	Circulating recombinant form	Dạng tái tổ hợp lưu hành
d4T	Stavudin	Thuốc ARV
DC-DR	Dual-class drug resistance	Kháng 2 nhóm thuốc
ddI	didanosin	Thuốc ARV
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit Deoxyribonucleic
DPS	Dried plasma spots	Giọt huyết tương khô
EFV	Efavirenz	Thuốc ARV
ETR	etravirin	Thuốc ARV
FI	Fusion inhibitors	Nhóm ức chế hòa màng
HAART	Highly active antiretroviral therapy	Điều trị kháng retrovirus hoạt tính cao
HBV	Hepatitis B virus	Vi rút viêm gan B
HCV	Hepatitis C virus	Vi rút viêm gan C
HIV	Human immunodeficiency virus	Vi rút gây suy giảm miễn dịch ở người
HIV-1		HIV type 1
HIVKT		HIV kháng thuốc
HIVResNet	The Global HIV Drug Resistance Network	Mạng lưới toàn cầu về kháng thuốc HIV

LPV/r	lopinavir/ritonavir	Thuốc ARV
MSM	Man have sex with man	Nam tình dục đồng giới
NNRTI	Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors	Thuốc ức chế men sao chép ngược non- nucleoside
NRTI	Nucleoside reverse transcriptase inhibitors	Thuốc ức chế men sao chép ngược nucleoside
NVP	Nevirapine	Thuốc ARV
NCMT		Nghiện chích ma túy
OPC	Out patient clinic	Phòng khám ngoại trú
OR	Odd Ratio	Tỷ suất chênh
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	Tế bào đơn nhân trong máu ngoại vi
PJP	Pneumocystis jiroveci pneumonia	Viêm phổi do Pneumocystis jiroveci
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi trùng hợp
PI	Protease inhibitors	Thuốc ức chế protease
PR	Protease	Protease
PNBD		Phụ nữ bán dâm
RT	Reverse transcriptase	Gen sao chép ngược
RVA	Recombinant vi rút assay	Thử nghiệm vi rút tái tổ hợp
TAM	Thymidine analogue mutations	Các đột biến tương tự thymidine
TC-DR	Triple-class drug resistance	Kháng 3 nhóm thuốc
TDF	Tenofovir	Thuốc ARV
TDR	Transmitted drug resistance	Kháng thuốc lây truyền
VL	Viral load	Tải lượng vi rút
TLVR		Tải lượng vi rút
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS	Chương trình phối hợp của Liên hợp Quốc về HIV/AIDS
VCT	Voluntary Counselling and Testing	Phòng tư vấn xét nghiệm tự nguyện
WHO	World Health Organization	Tổ chức Y tế Thế giới
TCMT		Tiêm chích ma túy

QHTD

Quan hệ tình dục

ĐẶT VẤN ĐỀ

Việt Nam là một trong những quốc gia có dịch HIV/AIDS phát triển mạnh ở khu vực châu Á - Thái Bình Dương. Theo số liệu Cục phòng, chống HIV/AIDS (VAAC) năm 2019, con số tích lũy người nhiễm HIV được phát hiện (còn sống) là 210.450 người, số bệnh nhân AIDS còn sống là 102.448 bệnh nhân, số nhiễm HIV đã tử vong lũy tích là 93.990 trường hợp [12]. Năm 2019, số nhiễm HIV được phát hiện là 10.453 trường hợp, số bệnh nhân được điều trị ARV là 135.055 (chiếm 64% tổng số người hiện nhiễm HIV) [12].

Vào những năm 2000, tại các quốc gia phát triển, theo dõi định kỳ tải lượng vi rút ở bệnh nhân HIV điều trị ARV được thực hiện thường quy, cùng với giám sát thường xuyên tế bào lympho T-CD4 để đánh giá hiệu quả điều trị và phát hiện sớm thất bại điều trị, ngăn ngừa sự tiến triển của bệnh và giảm bệnh tật, tử vong của người nhiễm. Trong những năm gần đây, Tổ chức Y tế thế giới đã đưa ra khuyến cáo việc giám sát điều trị dựa vào lâm sàng và miễn dịch học còn nhiều hạn chế [77, 84, 152, 161], làm chậm việc chẩn đoán việc thất bại điều trị, dẫn đến nguy cơ tăng sự kháng thuốc và giảm cơ hội thành công khi chuyển sang điều trị thuốc kháng vi rút bậc hai [27, 116]. Ngoài ra, một số báo cáo trên thế giới đã chứng minh sử dụng xét nghiệm vi rút học để đánh giá thất bại điều trị có hiệu quả kinh tế hơn so với việc chỉ dựa trên đánh giá các tiêu chí lâm sàng và miễn dịch học trước khi thay đổi phác đồ điều trị ở các nước đang phát triển [21, 147, 153]. Hiện nay, xét nghiệm đo tải lượng vi rút cho bệnh nhân HIV/AIDS đã được thực hiện thường quy ở Việt Nam [52, 78]. Theo số liệu Cục phòng chống HIV/AIDS (VAAC) năm 2019, số bệnh nhân được làm xét nghiệm tải lượng vi rút là 81337 (chiếm 61% tổng số bệnh nhân được điều trị ARV), trong đó số bệnh nhân có tải lượng HIV dưới 1000 bản sao/ml là 77776 chiếm tỷ lệ 95% (77776/81337) trong số bệnh nhân được xét nghiệm tải lượng HIV, số bệnh nhân có kết quả dưới 200 bản sao/ml là 76074 chiếm tỷ lệ 93% (76074/81337) [13].

Phương pháp xét nghiệm TLVR huyết tương được coi là chuẩn vàng trong theo dõi điều trị ARV ở người nhiễm HIV [38]. Tuy nhiên, triển khai TLVR huyết tương gặp phải nhiều khó khăn ở các quốc gia có nguồn lực hạn chế như Việt Nam, bao gồm việc thiếu kinh phí, cơ sở hạ tầng của các phòng xét nghiệm hạn chế, thiếu cán bộ xét nghiệm chuyên môn cao, đồng thời hệ thống vận chuyển bệnh phẩm yếu và phản hồi kết quả chậm [68], [106]. Trong bối cảnh này, xét nghiệm TLVR bằng phương pháp giọt máu khô (DBS) đang ngày càng được sử dụng phổ biến trong việc mở rộng xét nghiệm TLVR HIV. Ưu điểm của DBS là dễ thu thập, thuận tiện trong lưu trữ và vận chuyển hơn so với mẫu bệnh phẩm huyết tương [57]. Không đòi hỏi phải thực hiện quy trình ly tâm, vận chuyển bằng dây truyền lạnh hoặc nhân viên thực hiện được đào tạo chuyên sâu, kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS có thể đơn giản hóa rất nhiều việc lưu mẫu và vận chuyển đến phòng xét nghiệm tham chiếu từ các địa điểm ở xa hoặc không có điều kiện thực hiện tại chỗ. Do đó, DBS có thể khắc phục việc thiếu năng lực phòng thí nghiệm tại các cơ sở thiếu thôn trang thiết bị hoặc có điều kiện về nhân lực hạn chế.

Bệnh viện Bạch Mai là một trong những cơ sở điều trị người bệnh HIV lớn nhất trên cả nước với trên 2.000 người bệnh lũy tích và khoảng 1.800 hiện đang điều trị từ tất cả các tỉnh/thành phố tại khu vực phía Bắc và Bắc Trung Bộ. Bên cạnh đó, nhóm người bệnh tại đây thường là nhóm nặng, có suy giảm miễn dịch nặng với tỉ lệ có HIV tiến triển cao. Do đó, quản lý và theo dõi người bệnh hiệu quả là vấn đề rất được quan tâm chú trọng nhằm giảm tỉ lệ tử vong cho người bệnh điều trị. Câu hỏi nghiên cứu được đặt ra là tải lượng HIV huyết tương theo dõi thường quy trên bệnh nhân điều trị thuốc ARV bậc một được quản lý tại bệnh viện Bạch Mai có kết quả như thế nào? Tính khả thi của việc sử dụng mẫu DBS trong xét nghiệm tải lượng virus? Và cuối

cùng là trên bệnh nhân thất bại điều trị phác đồ bậc 1 có những thay đổi gì về mặt virus học?

Do đó chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài: “THEO DÕI TẢI LƯỢNG HIV THƯỜNG QUY Ở BỆNH NHÂN ĐIỀU TRỊ THUỐC KHÁNG VI RÚT BẬC MỘT TẠI KHU VỰC MIỀN BẮC VIỆT NAM” với hai mục tiêu sau:

1. *Đánh giá kết quả theo dõi tải lượng HIV-1 huyết tương thường quy và mức độ khả thi ban đầu của đo tải lượng vi rút bằng kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS trên bệnh nhân điều trị thuốc ARV bậc một ở miền Bắc Việt Nam.*
2. *Mô tả đặc điểm vi rút học của bệnh nhân thất bại điều trị phác đồ bậc một tại bệnh viện Bạch Mai.*

Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. ĐẠI CƯƠNG VỀ HIV/AIDS

1.1.1. Human Immunodeficiency Virus (HIV)

HIV là tác nhân của Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải ở người (Acquired Immuno Deficiency Syndrome-AIDS) [113], [20].

HIV được xếp vào phân nhóm Lentivirus thuộc họ Retroviridae. Các vi rút trong họ này có dạng hình cầu, kích thước khoảng 80 - 120 nm. Genom gồm 2 chuỗi ARN đơn giống nhau và có enzym sao chép ngược (RT: reverse transcriptase). Lentivirus có khả năng gây nhiễm trùng chậm, trong đó có HIV gây bệnh cho người [20].

1.1.1.1. Đặc điểm vi rút học HIV

HIV có 2 typ là HIV-1 và HIV-2, chúng khác nhau về kháng nguyên, trọng lượng phân tử của các thành phần cấu trúc, thời gian mang bệnh, tỷ lệ gây nhiễm và tiến triển của bệnh khác nhau. HIV-1 có mặt trên toàn thế giới

và là tác nhân gây dịch AIDS, trong khi HIV-2 tập trung chủ yếu ở Tây Phi, hiếm gặp ở nơi khác [20].

So với HIV-1, HIV-2 ít phổ biến hơn và độc lực thấp hơn, nhưng cũng gây ra những triệu chứng lâm sàng tương tự như HIV-1. Về di truyền: bộ gen của HIV-1 và HIV-2 có cấu trúc di truyền khác nhau hơn 50%, HIV-2 gần với SIV hơn. Trọng lượng phân tử của các thành phần cấu trúc cũng có khác biệt [37].

HIV-1 chia thành 4 nhóm: M, O, N và P; các nhóm có đặc điểm di truyền khác nhau 20%, các thứ týp có đặc điểm di truyền khác nhau khoảng 5%:

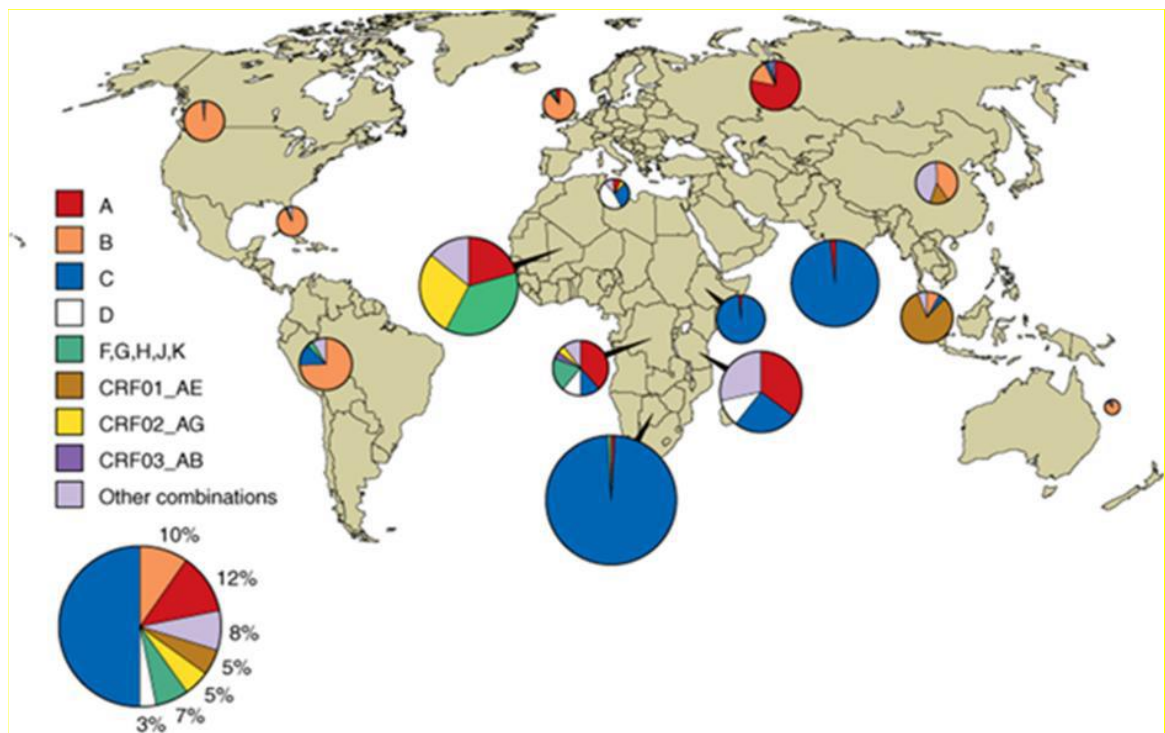
Nhóm M: có thứ týp (subtype) từ A-D, F-H, J, K: chiếm hơn 90% trường hợp nhiễm HIV-1.

Nhóm O: gặp khu trú ở Tây - Trung Phi.

Nhóm N: rất hiếm gặp, mới được biết đến từ 1998.

Nhóm P: mới phát hiện từ 2009 ở Cameroon, chủng vi rút gần với SIV ở loài khỉ gorilla.

Trong trường hợp người bệnh nhiễm hai vi rút khác thứ týp, sẽ có sự tái tổ hợp chất liệu di truyền trong tế bào nhiễm và tạo ra một “vi rút mới” dưới dạng “tái tổ hợp” (circulating recombinant forms) - CRFs. Ví dụ như CRF01_AE là vi rút tái tổ hợp từ hai thứ týp A và E.



Hình 1.1. Phân bố thứ tƣp (subtype) của HIV-1 trên thế giới [159]

1.1.1.1.1 *Các thứ type (subtype):* HIV-1 chia làm 3 nhóm:

- Nhóm M (main) là chủ yếu. Nhóm M bao gồm các subtype là A, B, C, D, F, G, H, J và K. Việc phân loại các subtype đã cung cấp các thông tin dịch tễ học phân tử hữu hiệu trong việc tìm kiếm dấu vết của nguyên nhân dịch HIV-1.

Các subtype của nhóm M là các dạng biến dị di truyền chủ yếu ở trình tự gen env, mã hóa cho gp20 tại lớp bao ngoài của vi rút. Các đoạn gen pol, gag và nif cũng được phân tích trình tự để phân biệt các subtype [122]

- Nhóm O (outlier) thiểu số, nhóm N dạng mới (Non-M, Non-O).

Nhóm HIV-1 M phát tán trên toàn thế giới gây đại dịch AIDS, sự lây nhiễm của nhóm O ít gặp hơn thường gây bệnh ở vùng Tây – Trung Phi như Cameroon, Nigeria. Các ca nhiễm HIV-1 nhóm N được xác định ở Tây – Trung Phi trong một số các thể từ Cameroon..

Xác định subtype đóng vai trò quan trọng trong theo dõi sự thay đổi về phân bố địa lý của dịch AIDS trên thế giới. Nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy về sự khác biệt kết quả thử nghiệm chẩn đoán và hiệu quả thuốc kháng Retrovirus ở các biến dị của HIV-1. Vì vậy, việc theo dõi dịch tễ học và vi rút học của HIV-1 đang lưu hành rất quan trọng [128].

Kết quả các nghiên cứu trình tự gen của nhóm M thì các subtype A tới K phân tán theo vùng: subtype A liên quan nhiều tới 80% các trường hợp nhiễm HIV ở Tây Phi, 30% ở Đông Phi. Subtype B, A, C và một số subtype khác chủ yếu gây dịch ở Tây Âu, châu Mỹ, châu Úc, châu Á như Hàn Quốc, Ấn Độ, Singapore.

Nhật Bản subtype B chiếm ưu thế. Mới đây trung tâm của subtype C được xác định ở Nam Phi như Zambia, Namibia, Nam Phi. Subtype D chiếm 5% - 40% tại các nước Đông Phi và Trung Phi.

Subtype E (nay được hiểu rõ là CRF01_AE) là dạng phổ biến ở Việt Nam và các nước xung quanh tại những người tiêm chích ma túy. Subtype F phổ biến ở Đông Âu, ngoài ra còn có ở nam Mỹ [25].

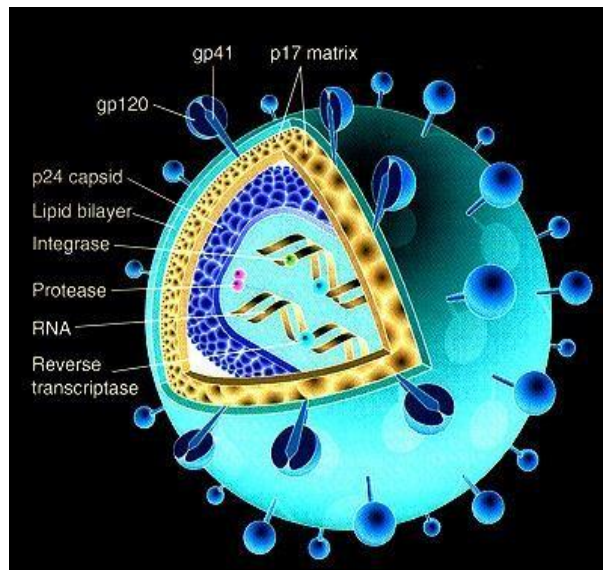
1.1.1.1.2 Các dạng tái tổ hợp lan truyền (CRF-circulating recombinant forms): Hai subtype HIV-1 riêng biệt, hai loài vi rút sẽ lai ghép với nhau trong một cá thể, tạo tái tổ hợp giữa hai subtype. Nếu một cá thể bị nhiễm bởi hai subtype HIV-1, có điều kiện thuận lợi cho việc kết hợp các nhân tố di truyền sẽ tạo dạng tái tổ hợp lan truyền.. hiện nay có khoảng 20 dạng tái tổ hợp lan truyền (CRF-circulating recombinant forms) [83]. Trong một khu vực địa lý, tỷ lệ xuất hiện vi rút tái tổ hợp phụ thuộc vào một số yếu tố sau:

- + Mức độ lưu hành của subtype
- + Khả năng nhiễm subtype của các cá thể trong quần thể, cơ hội lan truyền rộng rãi của các vi rút.
- + Sự sinh sản của các thể tái tổ hợp.

1.1.1.1.3 Sự tái tổ hợp giữa các nhóm HIV: Một nghiên cứu cho thấy sự nhiễm kép HIV -1 thuộc nhóm M và nhóm O được xác định ở Cameroon trong các bệnh nhân AIDS, nghiên cứu chi tiết về trình tự genom cho ra loại vi rút chứa cả các đoạn gen từ M và O trong bộ gen của chúng. Sự tái nhiễm được xác định là một cá thể sau khi đã nhiễm HIV – 1 bị nhiễm tiếp một chủng vi rút không tương đồng, chủng này có thể thuộc cùng subtype hay khác subtype so với chủng đầu tiên. Sự nhiễm kép và tái nhiễm được tìm thấy ở một số ít cá thể nhiễm HIV – 1 [90].

1.1.1.2 Cấu trúc vi rút HIV-1

Dưới kính hiển vi điện tử HIV là hạt vi rút hoàn chỉnh (virion) hình khối cầu, đường kính 80-100 nm. Cấu trúc gồm 3 lớp, từ ngoài vào trong.



Hình 1.2. Cấu trúc HIV [139]

Lớp bao ngoài (envelop)

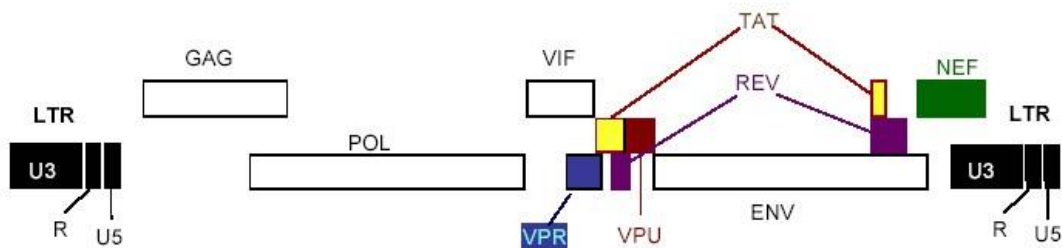
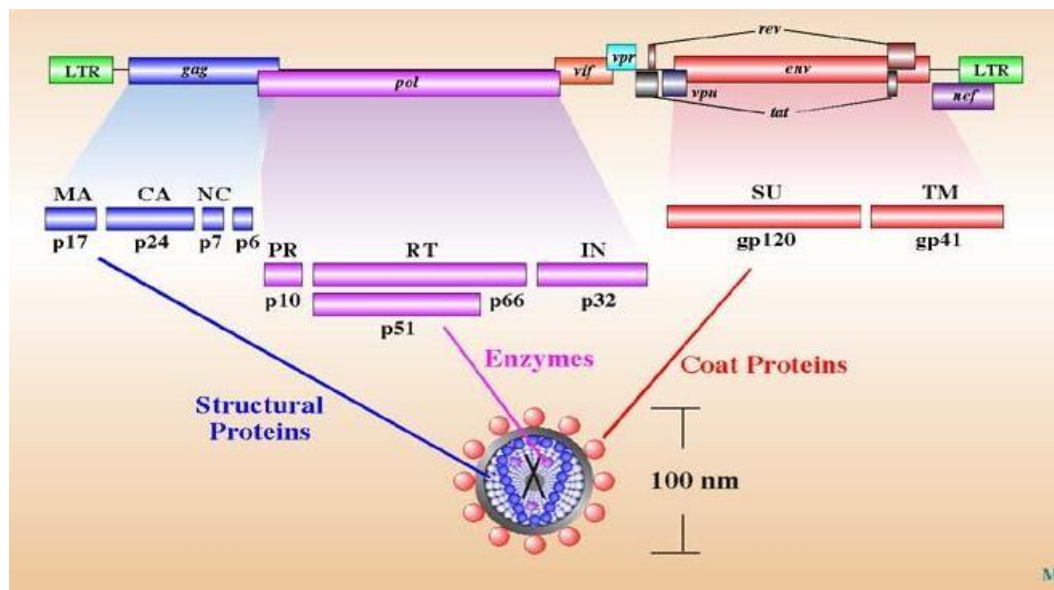
Là một màng lipid kép có kháng nguyên chéo với màng tế bào người. Gắn trên màng này là các gai nhú; đó là các phân tử glycoprotein gồm 2 phần: Glycoprotein màng ngoài (còn gọi là kháng nguyên gp120). Glycoprotein xuyên màng (còn gọi là kháng nguyên gp41), đầu ngoài của gp 41 gắn liền với kháng nguyên gp120. Cả hai kháng nguyên gp120 và gp41 cùng tham gia vào khâu đầu tiên của quá trình xâm nhập tế bào trong chuỗi biến đổi bệnh lý và tính kháng nguyên luôn biến đổi gây khó khăn cho các cơ chế bảo vệ cơ thể và sản xuất vaccine phòng bệnh.

Lớp capsid

Gồm 2 lớp protein: lớp ngoài hình cầu, lớp trong hình trụ. Đây là kháng nguyên rất quan trọng để chẩn đoán nhiễm HIV/AIDS vì tính kháng nguyên tương đối ổn định.

Lõi (genome và một số enzyme đặc biệt)

Bộ gen của HIV gồm hai phân tử RNA đơn, mỗi sợi có khoảng 9200 cặp base với 2 nhóm gen: là nhóm gen cấu trúc và gen điều hòa.



Hình 1.3. HIV-1 genome [39]

HIV-1 genes cấu trúc gồm có 03 gen chính

- Gag (group-specific antigen) mã hóa cho polyprotein gag và được enzym protease của virus cắt ra thành protein matrix (p17); protein capsid (p24); protein nucleocapsid SP1 (P7) và protein P6 trong quá trình virus trưởng thành.
- Env (Envelop) mã hóa cho glycoprotein (gp160), gp 160 được enzyme protease cắt tạo thành glycoprotein bề mặt (gp120) và glycoprotein gp41 có ái tính với thụ thể CD4.
- Pol mã hóa cho các enzyme phiên mã ngược của virus (Reverse Transcriptase - RT), RNase H, integrase (IN), và HIV protease (PR). Enzyme Protease HIV cắt polyprotein Gag để tạo ra các protein cấu trúc, enzyme RT có chức năng phiên mã RNA thành DNA, và IN có

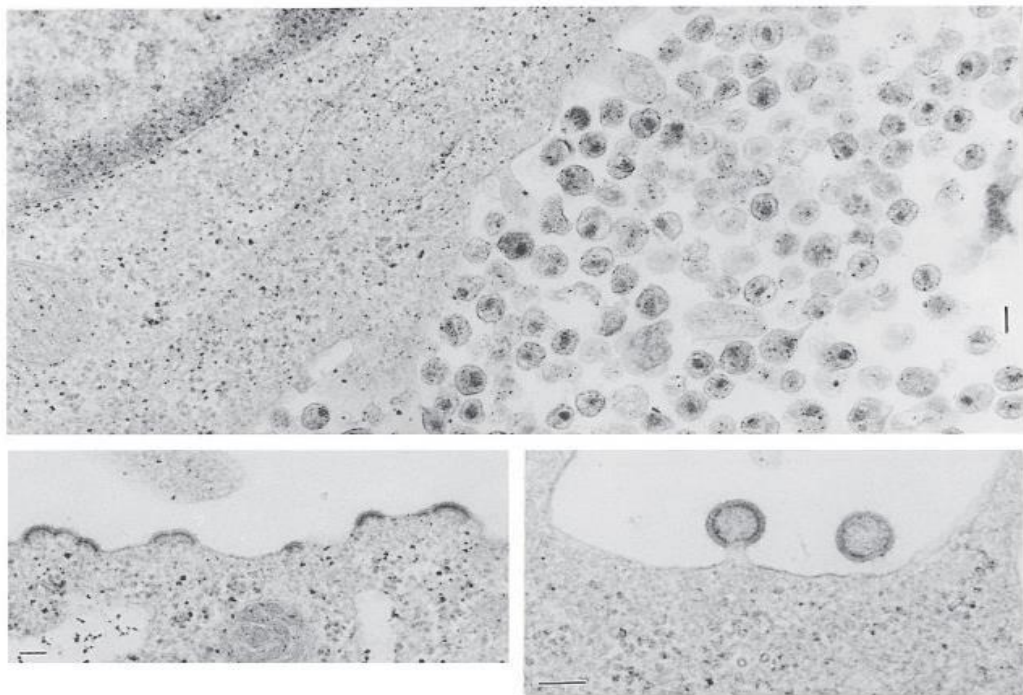
chức năng giúp tích hợp DNA sợi kép của HIV vào bộ gen tế bào vật chủ. Các xét nghiệm kháng thuốc HIV được thực hiện trên gen Pol.

HIV-1 genes và U3 (unique 3' region), R (terminal redundancy region) và U5 (unique 5' region) Long Terminal Repeat (LTR), gen env (envelope), gag (group antigen) và pol (polymerase) genes mã hóa cho protein cấu trúc. Các gene điều hòa và phụ như: nef (negative factor gene), tat (transcriptional transactivator), rev (regulator of viral expression), vif (virion infectivity factor), vpr (viral protein R) và vpu (viral protein U) liên quan mật thiết đến chu trình nhân lên của vi rút, gây nhiễm và đột biến.

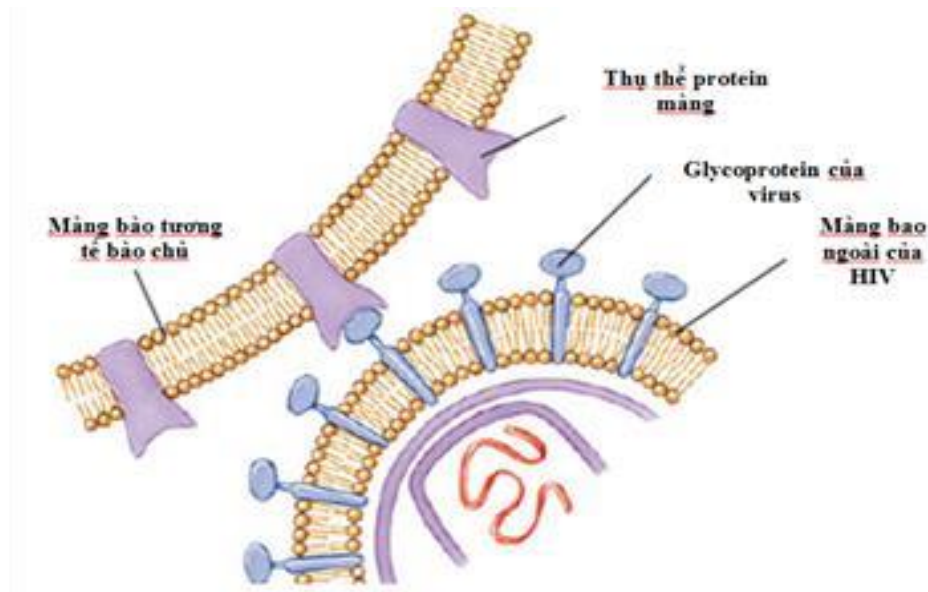
1.1.2. Sự nhân lên của vi rút

a. Vi rút gắn và xâm nhập vào tế bào đích:

Phân tử gp120 của vi rút gắn lên thụ thể CD4 (có trên bề mặt tế bào lympho T CD4 và một số tế bào khác) và các đồng thụ thể (CCR5 hoặc CXCR4) của tế bào đích, nhờ đó dẫn đến sự thay đổi cấu hình không gian và làm bộc lộ vị trí tác động của phân tử gp41 tham gia trong quá trình hòa màng giữa vi rút và tế bào đích. Nucleocapside của vi rút sẽ được phóng thích vào trong tế bào chất.



Hình 1.4. Tế bào lympho nhiễm HIV cho thấy có nhiều vi rút trên bề mặt tế bào, vi rút mới hình thành nảy chồi từ màng tế bào [15]



Hình 1.5. Sự nhận diện tế bào ký chủ của HIV [14]

Quá trình cởi bỏ lớp capsid xảy ra đồng thời hoặc ngay sau khi xâm nhập. Quá trình này cần có độ pH axit trong môi trường nội bào.

b. *Quá trình sao chép RNA thành DNA tiền vi rút.*

Sau khi có sự cởi bỏ lớp capsid, nhờ có enzyme sao chéo ngược, RNA của vi rút được sao chép thành DNA bổ sung sợi đơn và sau đó thành sợi đôi.

DNA sợi đôi của tiền vi rút có thể đi qua màng nhân nhờ enzyme integrase, xen vào trong bộ gen của tế bào đích và được gọi là DNA tiền vi rút. Ở giai đoạn này vi rút có thể tồn tại lâu dài trong tế bào đích trong trạng thái “ngủ” và tránh được sự tác động của hệ thống miễn dịch và của các loại thuốc kháng vi rút.

c. *Quá trình sao chép và tổng hợp virion mới:*

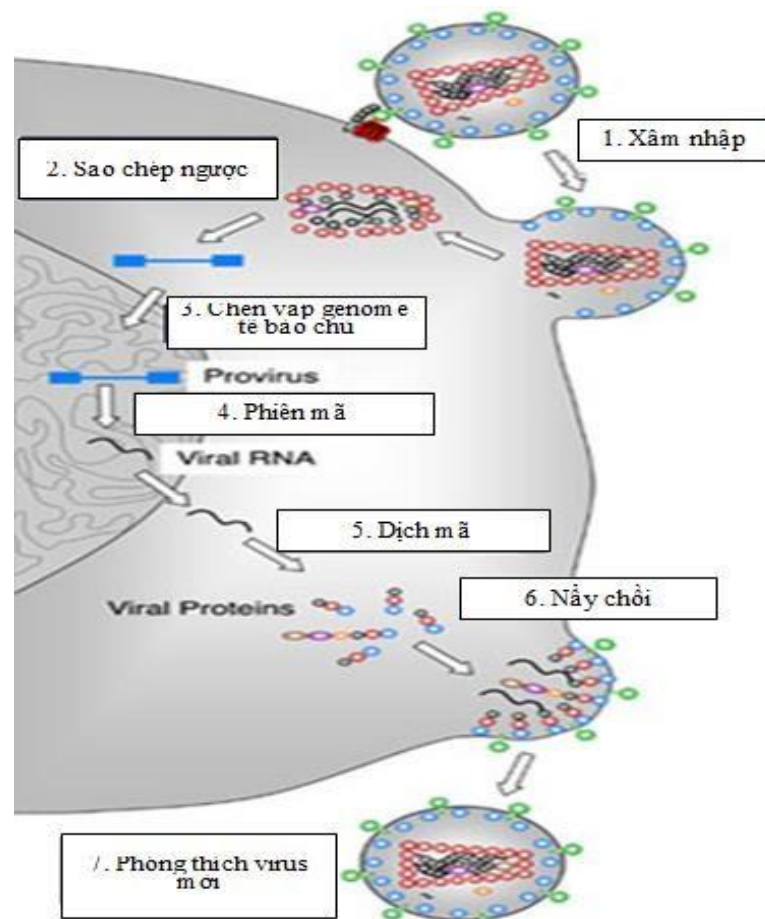
Khi tế bào đích được hoạt hóa, DNA tiền vi rút cũng bắt đầu quá trình sao chép và nhân lên. DNA tiền vi rút, nhờ các enzyme của tế bào, sao chép thành các phân tử RNA là chất liệu di truyền của vi rút sẽ di chuyển ra tế bào chất, ở tế bào chất tổng hợp protein sớm là những thành phần enzyme cần thiết cho các giai đoạn nhân lên tiếp theo của vi rút. Các tiền protein được

tổng hợp nhờ những enzyme của vi rút và tế bào, các tiền protein này sẽ được phân cắt thành protein cấu trúc và chức năng.

d. ***Quá trình đóng gói và giải phóng vi rút ra khỏi tế bào:***

Bộ gen vi rút mới được tổng hợp và polypeptide capsid lắp ráp với nhau để tạo thành vi rút thể hệ sau.

Vi rút trưởng thành qua quá trình nảy chồi. Các glycoprotein màng bao vi rút được chèn vào màng tế bào; nucleocapsid vi rút sau đó nảy chồi qua màng tại các vị trí bị thay đổi này và tạo được một màng bao ngoài. Quá trình này giải phóng những hạt virion mới [16, 85].



Hình 1.6. Chu kỳ nhân lên của HIV gồm 7 bước [141]

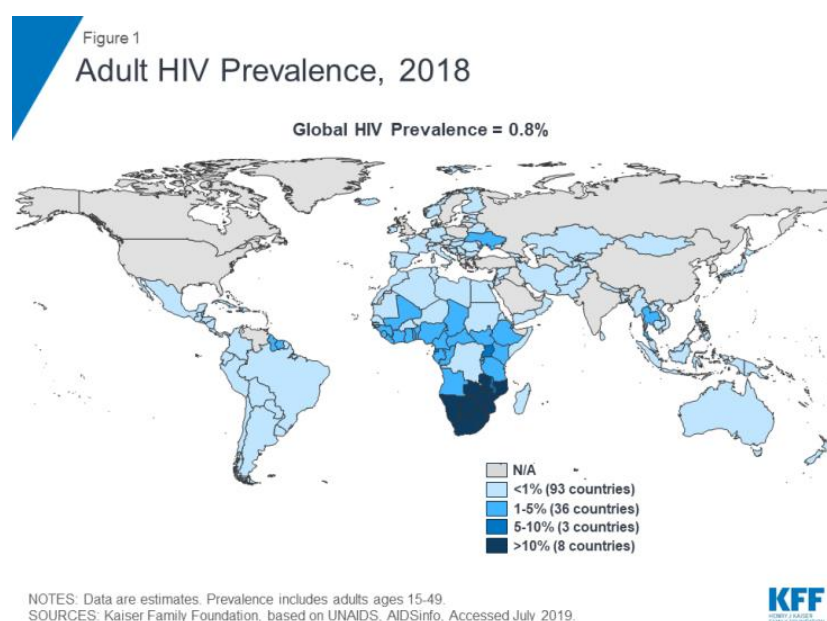
1.2. Dịch tễ học nhiễm HIV/AIDS

1.2.1. Tình hình nhiễm HIV/AIDS trên thế giới

Theo số liệu của UNAIDS, tính đến tháng 7/2019, thế giới có khoảng 37,9 triệu người (32,7 triệu-44,0 triệu) sống chung với HIV. Trong đó, tính riêng năm 2018, có 1,7 triệu người nhiễm mới HIV và 770.000 người tử vong do AIDS, khoảng 36,2 triệu – 42 triệu người lớn và trẻ vị thành niên từ 15 tuổi đang sống chung với HIV và khoảng 1,7 triệu (1,3 triệu – 2,2 triệu) trẻ em <15 tuổi [166]. Khu vực tiểu vùng Sahara của Châu Phi vẫn bị ảnh hưởng nặng nề nhất khi chiếm trên 50% số người sống chung với HIV trên toàn thế giới.

Tại Châu Á, Đông Nam Á là nơi có tỷ lệ hiện nhiễm HIV cao nhất, với nhiều xu hướng dịch khác nhau. Tỷ lệ hiện nhiễm tại Cam-pu-chia, Myanmar và Thái Lan có dấu hiệu giảm. Ấn Độ (đặc biệt tại tỉnh Papua) lại đang có xu hướng gia tăng.

Trên thế giới mỗi ngày có khoảng 4500 người mới nhiễm HIV, trong đó có 47% tập trung ở tiểu vùng Sahara của Châu Phi. Số lượng các ca nhiễm mới trên đối tượng trẻ em dưới 15 tuổi ước tính khoảng 160.000 trường hợp, chiếm khoảng 10% các ca nhiễm mới trên toàn cầu [166].



Hình 1.7: Tỷ lệ mắc HIV ở người lớn trong độ tuổi từ 15 - 49 [166]

Bảng 1.1: Tình hình nhiễm HIV trên thế giới, 2018 (UNAIDS) [166]

Khu vực	Tỷ lệ %	Nhiễm mới	Tử vong do AIDS
Toàn cầu	37,9 triệu (100%)	1,7 triệu	770,000
Đông và Nam Phi	20,6 triệu (54%)	800,000	310,000
Tây và trung Phi	5 triệu (13%)	280,000	160,000
Châu Á - TBD	5,9 triệu (16%)	310,000	200,000
Tây trung Âu và Bắc Mỹ	2,2 triệu (6%)	68,000	13,000
Châu Mỹ la tinh	1,9 triệu (5%)	100,000	35,000
Đông Âu và Trung Á	1,7 triệu (4%)	150,000	38,000
Vùng Caribe	340,000 (<1%)	16,000	6,700
Trung Đông và Bắc Phi	240,000(<1%)	20,000	8,500

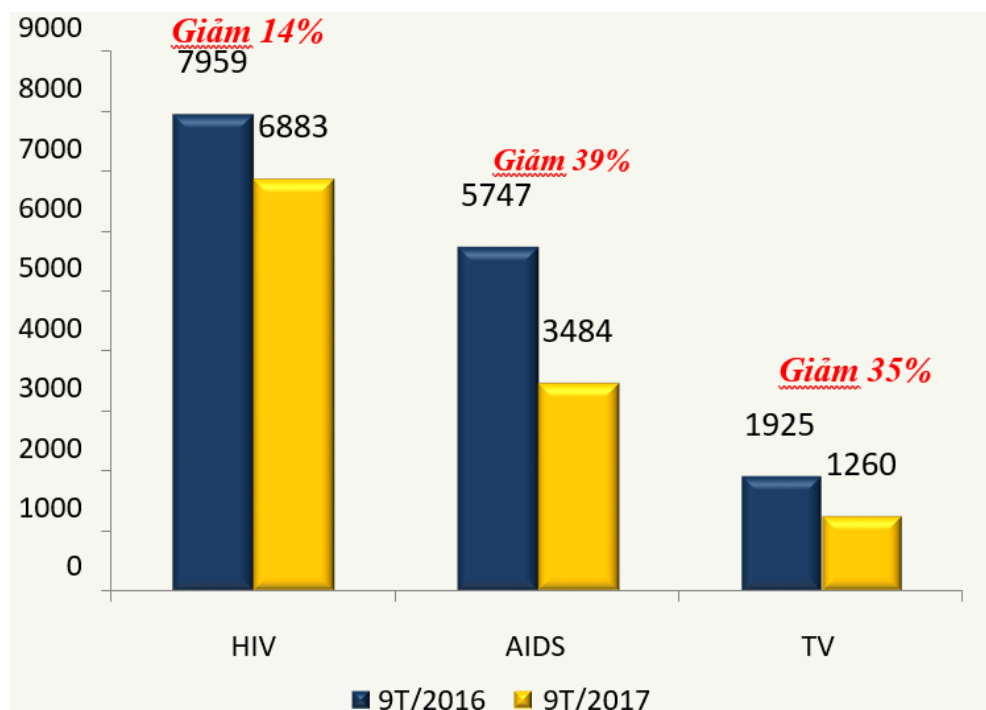
Châu Á – Thái Bình Dương là khu vực có dịch HIV tiến triển nhanh nhất trên toàn cầu. Ước tính châu Á – Thái Bình Dương chiếm 16% tỷ lệ hiện nhiễm HIV trên toàn cầu trong năm 2018, tăng 2% so với 14% năm 2016. Các ca nhiễm mới HIV có xu hướng giảm theo các năm trở lại đây, năm 2001 số lượng là 450.000 người, 2009 là 360.000 người đến năm 2016 số lượng này là 270.000. Tuy nhiên đến 2018, số lượng ca nhiễm mới lại tăng lên 280,000.

Dịch HIV ở châu Á – Thái Bình Dương vẫn tập trung ở nhóm người tiêm chích ma túy, mại dâm và khách hàng của họ, nam giới có quan hệ đồng tính (MSM). Trong đó, nhóm MSM đang là nhóm có sự gia tăng đáng kể nhất khi tỉ lệ mới mắc của nhóm này chiếm tới 32% tổng số người nhiễm mới HIV trên toàn khu vực [166].

Nhiễm mới HIV ở trẻ em tại châu Á: tỷ lệ mới mắc HIV giảm do việc mở rộng tiếp cận dịch vụ phòng lây nhiễm HIV từ mẹ sang con đã làm giảm đáng kể số trẻ em bị nhiễm mới, tỷ lệ tử vong liên quan đến AIDS của nhóm tuổi này cũng giảm.

1.2.2. Tình hình nhiễm HIV/AIDS tại Việt Nam

Theo số liệu Cục phòng chống HIV/AIDS (VAAC) năm 2019, con số tích lũy người nhiễm HIV được phát hiện (còn sống) là 210.450 người, số bệnh nhân AIDS còn sống là 102.448 bệnh nhân, số nhiễm HIV đã tử vong lũy tích là 93.990 trường hợp [12]. Năm 2019, số nhiễm HIV được phát hiện là 10.453 trường hợp, số bệnh nhân được điều trị ARV là 135.055 (chiếm 64% tổng số người hiện nhiễm HIV) [12]. Trong số những người được xét nghiệm mới phát hiện nhiễm HIV thì tỷ lệ nhiễm của nam nhiều hơn nữ. Điều này có liên quan đến hành vi, lối sống, đường lây truyền của HIV khác nhau giữa nam giới và nữ giới và sự gia tăng các ca mới mắc trên nhóm MSM [12], [13]. Nhìn chung số liệu phát hiện người nhiễm HIV tại Việt Nam những năm gần đây có xu hướng giảm so các năm trước đó, tuy nhiên số liệu phát hiện phụ thuộc vào nhiều yếu tố trong đó có yếu tố triển khai công tác tư vấn xét nghiệm [10, 12].

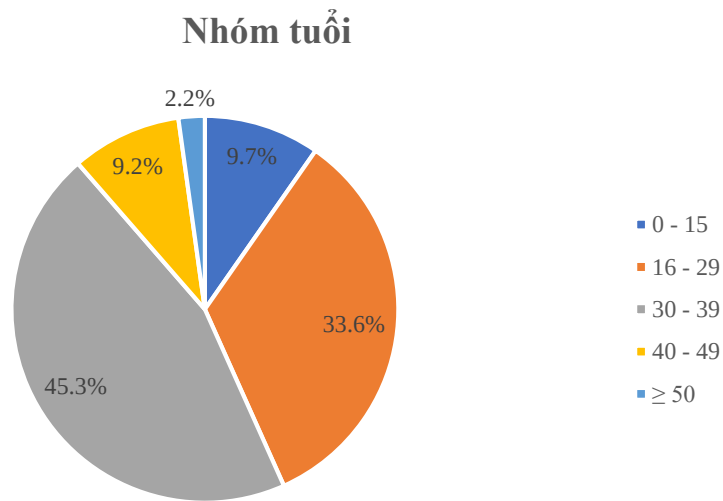


Biểu đồ 1.1: Số liệu mới mắc HIV/AIDS 2017 so với cùng kỳ năm 2016 [11]

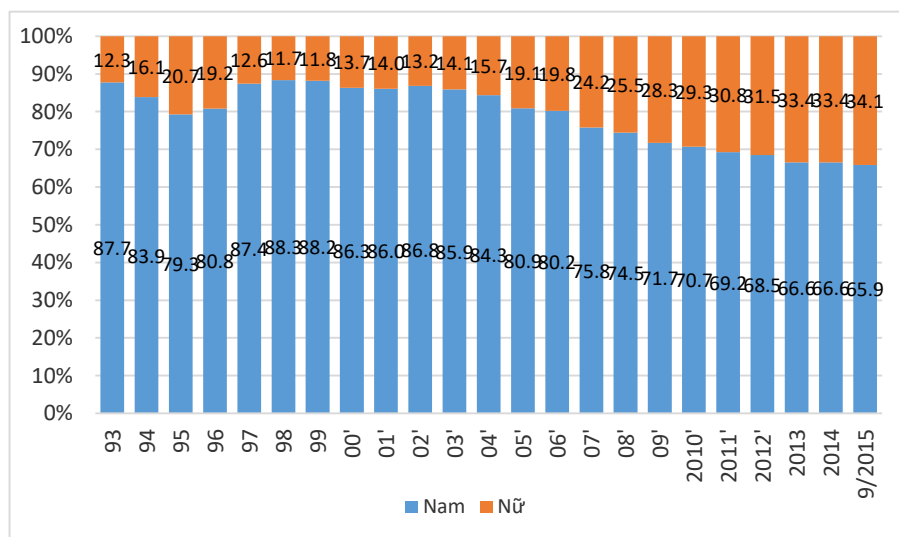
Hiện nay, tại các tỉnh trong cả nước công tác tư vấn xét nghiệm đã phát hiện được nhiều người nhiễm HIV. Tuy nhiên, tại các tỉnh có tỷ lệ đáng kể người nhiễm HIV được phát hiện tình cờ từ hệ thống bệnh viện trong đó chủ yếu các bệnh nhân đã chuyển sang giai đoạn AIDS, mắc các bệnh liên quan đến suy giảm miễn dịch: Lao, nhiễm khuẩn đường sinh dục. Một số tỉnh có tỷ lệ người nhiễm HIV là phụ nữ có thai 10% là do xét nghiệm phát hiện sớm nhiễm HIV hạn chế [13].

Phân bố nhiễm HIV theo địa dư, dịch HIV tiếp tục lan rộng theo địa dư, thời gian xuất hiện dịch HIV tại các địa phương của Việt Nam có sự khác biệt đáng kể. HIV xuất hiện đầu tiên ở thành phố Hồ Chí Minh và một số tỉnh biên giới giáp Campuchia, các tỉnh cực Nam Trung bộ, sau đó lan ra thành phố lớn và các tỉnh vùng biển Đông Bắc. Dịch HIV không chỉ xảy ra khu vực thành thị mà còn xảy ra ở các khu vực nông thôn, miền núi cao, vùng sâu, vùng xa, vùng đồng bào dân tộc thiểu số, đã có 100% các tỉnh, thành phố báo cáo có người nhiễm HIV/AIDS [11].

Nhiễm HIV phân bố theo nhóm tuổi: nhiễm HIV chủ yếu tập trung trong nhóm tuổi lao động chính từ 20 – 39 tuổi, có 40% người nhiễm HIV mới phát hiện trong năm 2017 có độ tuổi từ 30 – 39, độ tuổi từ 20 - 29 chiếm tỷ lệ là 30%; nhóm tuổi từ 14 - 19 tuổi chiếm 3% và nhóm trẻ em tuổi từ 0 - 13 tuổi là 2% [11]. Trong những năm đầu tiên của vụ dịch, chủ yếu người nhiễm HIV là nhóm tuổi 30 – 39 tuổi, sau những năm của thế kỷ 20 người nhiễm HIV ngày càng được trẻ hóa từ nhóm tuổi 20 - 39 tuổi.

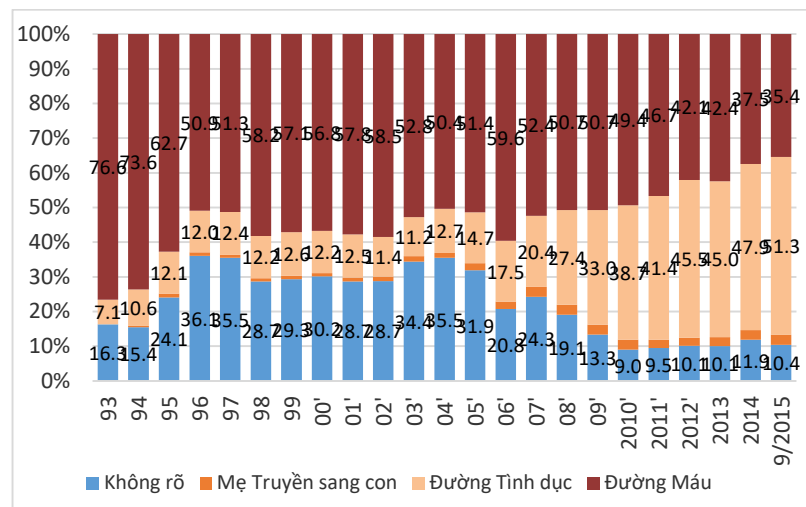


Biểu đồ 1.2. Phân bố ca nhiễm HIV theo nhóm tuổi trong năm 2019 [13]



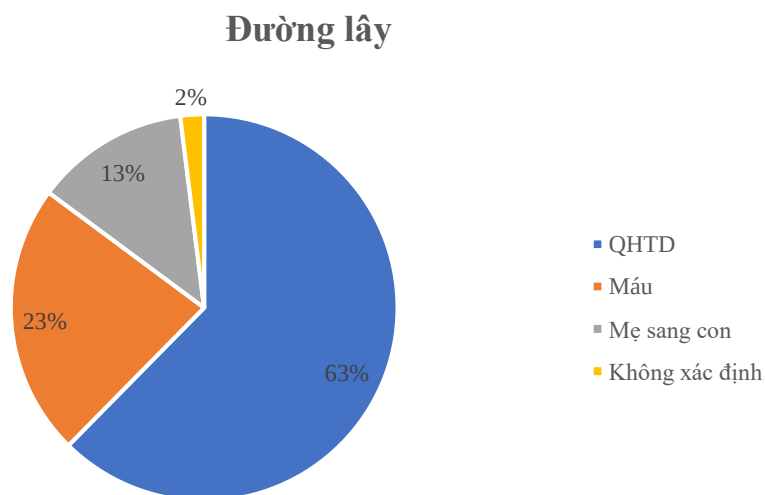
Biểu đồ 1.3. Tỷ lệ nhiễm HIV theo giới tính từ 1993 – 9/2015 [8].

Đánh giá về sự phân bố theo nguy cơ lây nhiễm của HIV, lây truyền HIV qua đường tình dục ngày càng chiếm tỷ trọng chính trong lây truyền HIV [10, 13].



Biểu đồ 1.4. Phân bố tỉ lệ nhiễm HIV theo đường lây qua các năm

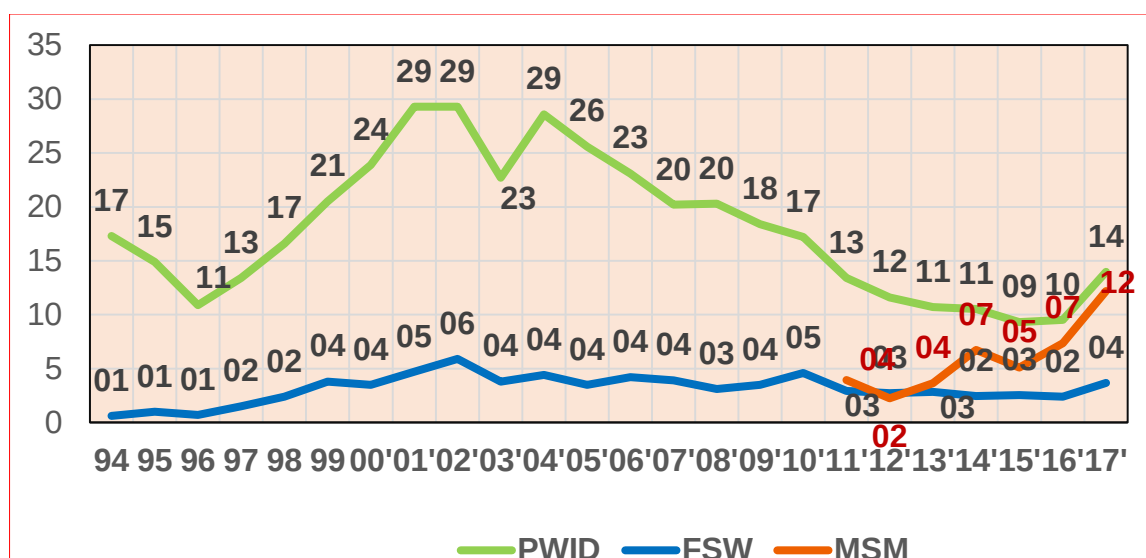
(Nguồn: Cục phòng chống HIV/AIDS) [8]



Biểu đồ 1.5. Phân bố tỉ lệ nhiễm HIV theo đường lây trong năm 2019 [13]

Kết quả trên biểu đồ 1.4 và 1.5, ta thấy tỷ lệ người nhiễm HIV được phát hiện lây truyền qua đường tình dục ngày càng gia tăng, lây truyền qua đường máu có xu hướng giảm. Năm 2018, số người lây truyền qua đường tình dục chiếm tỷ lệ cao nhất 63%; số người nhiễm HIV lây truyền qua đường máu chỉ chiếm 23% [7].

Số liệu giám sát trọng điểm HIV cho thấy nguy cơ lây truyền HIV qua con đường tình dục ngày càng chiếm tỷ lệ cao trong lây truyền HIV, trong đó tỷ lệ nhiễm HIV trong nhóm đối tượng đồng tính nam (Men sex Men - MSM) (đã tăng từ 5.7% năm 2015 lên 8% năm 2016 và 12% vào năm 2017). Đặc biệt lây nhiễm ở nhóm tuổi trẻ là cảnh báo quan trọng về nguy cơ lây truyền HIV trong nhóm này sẽ chiếm tỷ lệ đáng kể trong tương lai. Tỷ lệ nhiễm trong nhóm nghiện chích ma túy đạt đỉnh trong giai đoạn 2001-2002 với tỷ lệ nhiễm dao động 29%, sau đó được kiểm soát khá tốt. Trong giai đoạn 2015-2017, tỷ lệ nhiễm HIV trong nhóm nghiện chích ma túy dao động từ 9% đến 14%, sự thay đổi này cần theo dõi kỹ chiều hướng. Tỷ lệ nhiễm HIV trong nhóm phụ nữ bán dâm cũng đạt đỉnh cao nhất giai đoạn 2001-2002 với tỷ lệ nhiễm dao động 5-6%. Giai đoạn 2015-2017 tỷ lệ nhiễm HIV trong nhóm phụ nữ bán dâm trong khoảng 3-4% (Biểu đồ 1.6) [9, 10, 13].



Ghi chú: PWID- nghiện chích ma túy; FSW- phụ nữ bán dâm; MSM- nam tình dục đồng giới

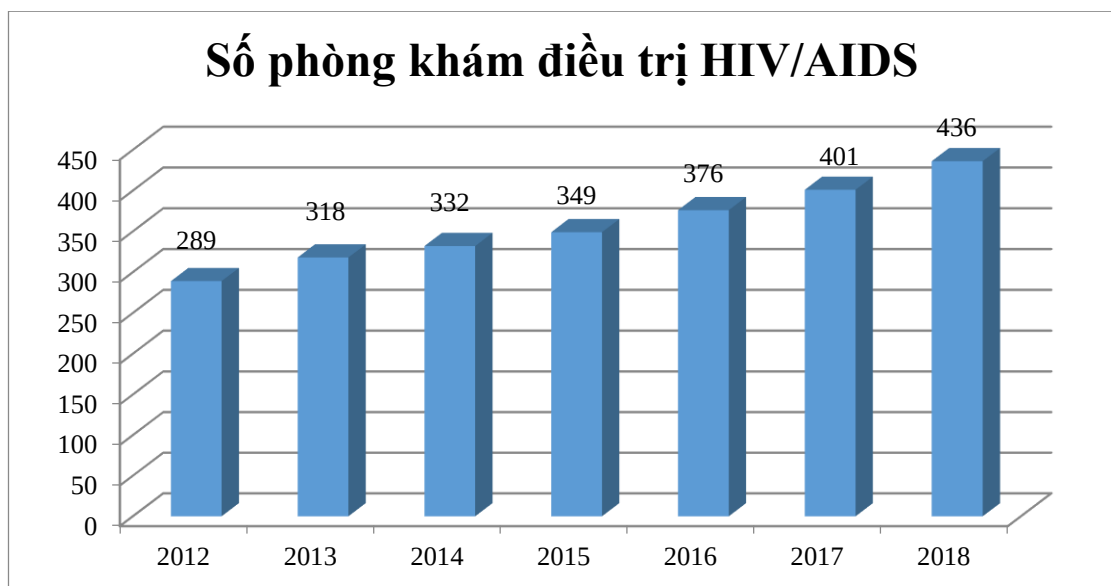
Biểu đồ 1.6. Tỷ lệ nhiễm HIV trong các nhóm nguy cơ cao [3]

Về hành vi nguy cơ trong các nhóm đối tượng nguy cơ cao, sự gia tăng đáng kể tỉ lệ các đối tượng MSM khi quan hệ tình dục với nhau ít sử dụng bao cao su và PNBD khi quan hệ tình dục với các khách hàng thường xuyên

không sử dụng BCS . Điều này phản ánh rõ ràng qua việc gia tăng tỉ lệ lây truyền HIV qua đường tình dục trong các năm vừa qua [3]. Nhìn chung số liệu cho thấy dịch HIV ở Việt Nam vẫn là dịch tập trung ở một số nhóm đối tượng nguy cơ cao như nghiện chích ma túy, phụ nữ bán dâm và nhóm đồng tính nam, trong đó nguy cơ nhiễm HIV có xu hướng tăng ở nhóm đồng tính nam.

1.3. Tình hình điều trị ARV tại Việt Nam

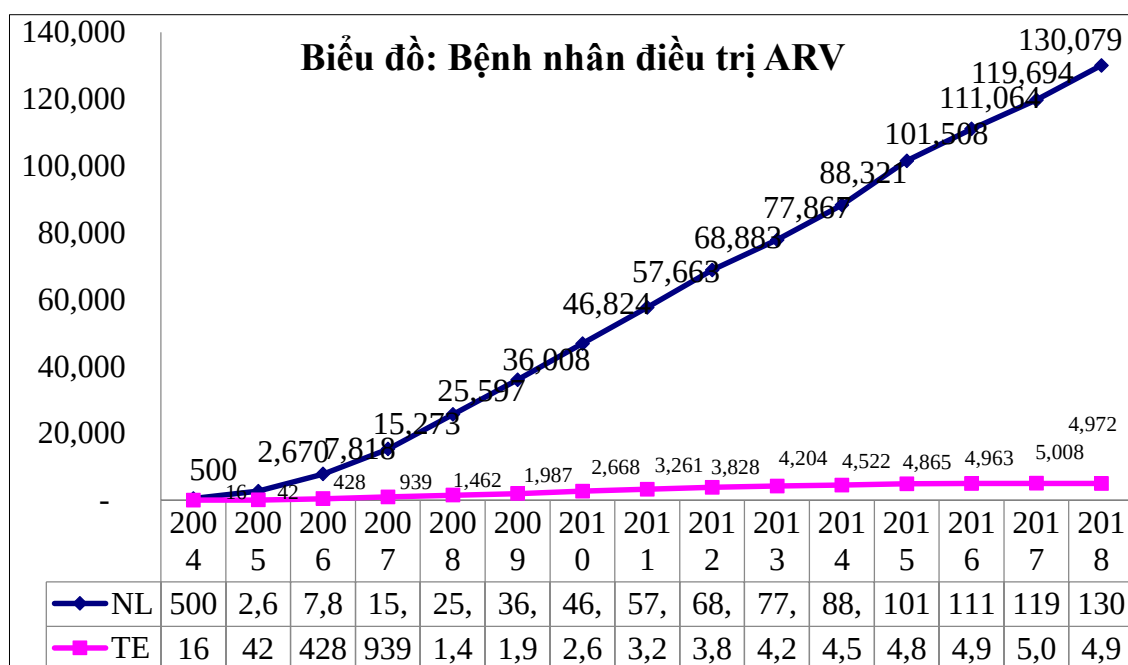
Ở Việt nam, đã có Hướng dẫn quốc gia chẩn đoán và điều trị HIV/AIDS do Bộ Y tế phát hành năm 2000 đã khuyến cáo phác đồ điều trị gồm 2 thuốc ARV. Tính đến 2018, toàn quốc đã có 436 cơ sở điều trị ARV, cung cấp điều trị cho khoảng 138.000 người nhiễm HIV, đáp ứng điều trị cho trên 50% người nhiễm trên toàn quốc [166].



Biểu đồ 1.7. Số lượng phòng khám HIV/AIDS từ 2012 – 2018 [166]

WHO khuyến cáo sử dụng phác đồ chứa TDF là phác đồ ưu tiên trong điều trị HIV [175]. Tại Việt Nam, phác đồ TDF đã được thay thế từ năm 2011

trong Quyết định 4139/QĐ-BYT ngày 02/11/2011 Về việc sửa đổi, bổ sung một số nội dung trong “Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị HIV/AIDS”.



**Biểu đồ 1.8. Số lượng điều trị ARV và số tử vong
tương ứng từ 2004 - 2018 [166]**

1.4. Xét nghiệm chẩn đoán nhiễm HIV tại Việt Nam [2]

1.4.1 Mục đích, nguyên tắc của xét nghiệm

- An toàn truyền máu và cấy ghép mô, nội tạng: xét nghiệm sàng lọc HIV để đảm bảo an toàn truyền máu và các chế phẩm của máu, cấy ghép mô và nội tạng, cho tinh dịch, trứng, phôi.
- Giám sát dịch tễ HIV/AIDS: xác định tỷ lệ nhiễm HIV trong một số nhóm quần thể nhất định theo thời gian và địa điểm nhằm theo dõi sự phân bố, chiều hướng phát triển của dịch từ đó cung cấp thông tin cho việc lập kế hoạch, dự phòng, khống chế và đánh giá hiệu quả các biện pháp phòng, chống HIV/AIDS.
- Chẩn đoán nhiễm HIV: xác định tình trạng nhiễm HIV của người được làm xét nghiệm.

- Xét nghiệm theo dõi điều trị HIV/AIDS
- Dùng cho các mục đích nghiên cứu.
- Đảm bảo tính bí mật, tự nguyện.
- Được tư vấn trước và sau xét nghiệm.
- Tuân thủ chiến lược, phương cách, quy trình xét nghiệm.
- Đảm bảo chất lượng xét nghiệm và an toàn sinh học.
- Kết nối với các chương trình dự phòng và chăm sóc điều trị

1.4.2. Thực hiện xét nghiệm chẩn đoán nhiễm HIV

1.4.2.1 Phương pháp xét nghiệm chẩn đoán nhiễm HIV

Trong chẩn đoán HIV, xét nghiệm phát hiện kháng thể kháng HIV là phương pháp tiêu chuẩn để xác định tình trạng nhiễm HIV ở những người từ 18 tháng tuổi trở lên. Các xét nghiệm vi rút học tìm kháng nguyên vi rút, các chất liệu di truyền RNA/DNA của vi rút có thể phát hiện tình trạng nhiễm HIV trong giai đoạn cửa sổ huyết thanh học dùng trường hợp khó chẩn đoán hoặc xét nghiệm lại.

Xét nghiệm chẩn đoán nhiễm HIV chia thành các phương pháp chính:

1.4.2.1.1. Phương pháp gián tiếp: phát hiện sự hiện diện của kháng thể kháng HIV trong máu hoặc các dịch tiết để xác định tình trạng nhiễm HIV ở người lớn và trẻ em trên 18 tháng tuổi.

a. Xét nghiệm phát hiện kháng thể kháng HIV gồm các kỹ thuật sau:

+ **Kỹ thuật xét nghiệm ngưng kết hạt vi lượng (Microtiter particle agglutination):** Kỹ thuật ngưng kết hạt vi lượng được coi là đơn giản

Những hạt hữu hình (gelatin, latex, hồng cầu) được gắn với các thành phần kháng nguyên của vi rút HIV-1/HIV-2 sẽ cho phản ứng ngưng kết khi có sự hiện diện của kháng thể đặc hiệu với HIV nếu có trong mẫu thử. Thành phần của sinh phẩm là những hạt gelatin đã được gắn kháng nguyên tái tổ hợp HIV1 (gp41) và HIV 2 (gp 36).

+ Kỹ thuật xét nghiệm nhanh

Kỹ thuật xét nghiệm nhanh bao gồm:

- Miếng dịch thấm.
- Miếng dịch lọc.
- Miếng dịch sắc ký, đây là nguyên lý kỹ thuật phổ biến trong các sinh phẩm nhanh xét nghiệm anti-HIV trên thị trường Việt Nam.

Theo Tổ chức Y tế thế giới, các sinh phẩm chẩn đoán nhanh thường được dùng ở những phòng xét nghiệm có số lượng mẫu < 40 mẫu/ngày, những nơi có điều kiện hạn chế về trang thiết bị máy móc, vùng sâu vùng xa... Việc sử dụng sinh phẩm nhanh cho phép triển khai xét nghiệm sàng lọc anti HIV mở rộng và trả kết quả sớm trong ngày đối với các trường âm tính, chuyển sớm những bệnh nhân, những mẫu xét nghiệm có kết quả 2 vạch màu để làm xét nghiệm khẳng định và kết nối điều trị sớm nhất có thể đối với những người được chẩn đoán xác định nhiễm virus HIV.

+ Các kỹ thuật miễn dịch gắn men *ELISA* (enzyme-linked immunosorbent assay)

Kỹ thuật ELISA Sandwich

- Kháng thể kháng HIV có trong mẫu thử sẽ kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên vi rút đã được cố định trên phiên nhựa vi lượng. Phức hợp kháng nguyên - kháng thể sẽ được phát hiện bởi cộng hợp là các kháng nguyên vi rút gắn men khi cho phản ứng hiện màu với cơ chất thích hợp.

- Giá trị mật độ quang (OD: optical density) của phản ứng màu tỷ lệ thuận với lượng kháng thể kháng HIV hiện diện trong mẫu thử.

Kỹ thuật ELISA gián tiếp

Kháng thể kháng HIV có trong mẫu thử sẽ kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên vi rút HIV đã được cố định sẵn trên giá đỡ. Phức hợp kháng nguyên - kháng thể này được phát hiện bởi một cộng hợp là một kháng thể kháng

immunoglobuline người (Ig) có gắn chất đánh dấu và sẽ cho phản ứng hiện màu/phát quang với một cơ chất thích hợp. Giá trị mật độ quang của phản ứng màu/phát quang tỷ lệ thuận với lượng kháng thể kháng HIV hiện diện trong mẫu thử.

Kỹ thuật ELISA cạnh tranh

- Kháng thể kháng HIV có trong mẫu thử sẽ cạnh tranh với cộng hợp là kháng thể kháng HIV có gắn với chất đánh dấu để kết hợp với các kháng nguyên của vi rút đã cố định trên giá đỡ.

- Giá trị mật độ quang tỷ lệ nghịch với lượng kháng thể kháng HIV trong mẫu.

1.4.2.1.2. Phương pháp trực tiếp: phát hiện sự hiện diện các thành phần của HIV

- Phát hiện các axit nucleic của vi rút: +) HIV-ADN provirus (có trong tế bào nhiễm); +) HIV-ARN (vi rút tự do trong huyết tương).
- Phát hiện kháng nguyên vi rút trong máu (p24).

Phương pháp xét nghiệm trực tiếp được dùng để phát hiện nhiễm HIV ở trẻ dưới 18 tháng tuổi. Đối với trẻ em sinh ra từ mẹ HIV, kháng thể kháng HIV của mẹ có thể tồn lưu trong máu trẻ cho đến trước 18 tháng tuổi do đó xét nghiệm phát hiện kháng thể dương tính ở trẻ chưa thể kết luận trẻ bị nhiễm HIV mà cần thực hiện các xét nghiệm vi rút học. Xét nghiệm chẩn đoán nhiễm HIV cho trẻ sinh từ mẹ có huyết thanh dương tính nên được tiến hành từ 4 - 6 tuần sau khi sinh hoặc sau đó càng sớm càng tốt với các kỹ thuật phát hiện DNA/RNA provirus hoặc kháng nguyên p24 của HIV.

Kỹ thuật PCR (Polymerase Chain Reaction) phát hiện HIV-DNA thường được chỉ định do có độ nhạy, độ đặc hiệu cao, có thể sử dụng giọt máu khô lấy trên giấy thấm (dry blood spot- DBS) dễ bảo quản và vận chuyển từ những nơi xa phòng xét nghiệm. Trẻ cần được khẳng định sớm tình trạng nhiễm HIV để được điều trị sớm không cần chờ có các dấu hiệu lâm sàng hoặc suy giảm miễn dịch.

Các phương pháp trực tiếp phát hiện tác nhân vi rút còn được dùng trong các trường hợp chẩn đoán sớm nhiễm HIV ở người lớn trong giai đoạn cửa sổ chưa có sự chuyển đổi huyết thanh hoặc khi xét nghiệm bằng phương pháp gián tiếp tìm kháng thể có kết quả không rõ ràng.

+ ***Phát hiện kháng nguyên p24 (antigen p24)*** Phát hiện kháng nguyên p24 thông thường được sử dụng trong:

- Phát hiện sớm giai đoạn mới nhiễm HIV: Trong giai đoạn đầu mới nhiễm HIV, kháng nguyên p24 có thể được phát hiện trước khi có sự biến đổi huyết thanh, ở giai đoạn cửa sổ khi chưa có kháng thể.

- Theo dõi diễn tiến nhiễm HIV: Kháng nguyên p24 có thể được phát hiện rất sớm ở giai đoạn mới nhiễm. Cùng với sự xuất hiện kháng thể, nồng độ kháng nguyên p24 tự do trong máu giảm. Ở giai đoạn cuối, cùng với sự giảm kháng thể kháng p24, sự tái xuất hiện và gia tăng nồng độ p24 tự do là một tiên lượng chuyển sang AIDS.

- Theo dõi đáp ứng điều trị với thuốc kháng vi rút.

- Phát hiện có sự nhân lên của vi rút trong nuôi cấy tế bào

+ ***Các kỹ thuật sinh học phân tử phát hiện HIV-ARN hoặc HIV-ADN provirus.***

- Các kỹ thuật sinh học phân tử được áp dụng trong xét nghiệm phát hiện sớm nhiễm HIV; đo tải lượng vi rút trong theo dõi điều trị.

- Các kỹ thuật PCR và Real time PCR phát hiện ADN tiền vi rút trong tế bào nhiễm hoặc HIV - ARN trong huyết tương.

- Các nguyên tắc chung của các kỹ thuật sinh học phân tử:

- + Nguyên tắc của kỹ thuật PCR: Phản ứng PCR (Polymerase Chain Reaction: phản ứng tổng hợp chuỗi) là kỹ thuật cho phép khuếch đại một lượng rất nhỏ phân tử ADN đích được tách chiết từ các tế bào nhiễm hoặc

được tổng hợp từ các ARN của vi rút nhờ enzyme sao chép ngược RT (ADNc).

+ Nguyên tắc của kỹ thuật Real time PCR phát hiện nhiễm HIV (Kỹ thuật PCR theo thời gian thực): Real time PCR là phương pháp cho phép khuếch đại và xác định số lượng các chuỗi ADN được tạo ra trong từng chu kỳ nhiệt.

+ Nguyên tắc của kỹ thuật PCR - lai phân tử: Sản phẩm PCR đã được đánh dấu với biotinyle sẽ được lai ghép với các mẫu dò đặc hiệu với ADN đích đã được cố định trên các giếng của phiến nhựa vi lượng và được phát hiện bởi các tín hiệu cho phép đọc được với máy quang kế (colorimetric).

1.4.2.1.3 Phương pháp phát hiện đồng thời kháng nguyên và kháng thể, kỹ thuật phát hiện đồng thời kháng nguyên và kháng thể: Một số sinh phẩm dùng kỹ thuật phát hiện đồng thời kháng nguyên vi rút (p24) và kháng thể kháng HIV cho phép phát hiện sớm nhiễm HIV trong giai đoạn chuyển đổi huyết thanh. Kháng nguyên p24 hoặc các kháng thể kháng HIV hiện diện trong mẫu thử kết hợp đặc hiệu với kháng thể kháng p24 và các kháng nguyên vi rút được gắn trên giá đỡ. Phức hợp kháng nguyên - kháng thể sẽ được phát hiện bởi các cộng hợp gắn chất đánh dấu cho phản ứng hiện màu sau khi cho cơ chất.

Kỹ thuật hóa phát quang và điện hóa phát quang

+ **Kỹ thuật hóa phát quang**: *phát hiện đồng thời cả kháng nguyên và kháng thể*: Kháng nguyên HIV-1/HIV-2 và kháng thể đơn dòng (chuột) kháng HIV p24 phủ trên bề mặt vi hạt sẽ gắn đặc hiệu với kháng nguyên p24 của vi rút HIV và các kháng thể kháng HIV-1/HIV-2 có trong mẫu thử và sẽ được phát hiện bằng sự phát sáng sau khi được kết hợp với cộng hợp là kháng nguyên HIV-1/HIV-2 [tái tổ hợp], peptid tổng hợp và kháng thể kháng HIV p24 [đơn dòng chuột]) gắn chất phát quang và kết hợp với chất kích hoạt

+ Kỹ thuật điện hóa phát quang

Nguyên lý của kỹ thuật dựa trên nguyên lý sandwich dùng để phát hiện đồng thời kháng nguyên HIV p24 và/hoặc các kháng thể kháng HIV-1/HIV-2 có trong mẫu thử.

- Kháng nguyên HIV p24 có trong mẫu thử sẽ kết hợp với các kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên HIV p24 gắn biotin và các kháng thể đơn dòng kháng kháng nguyên HIV p24 gắn ruthenium (chất đánh dấu phát quang). Phức hợp miễn dịch dạng bánh kẹp được tạo ra sẽ bao gồm cả biotin và ruthenium.

- Các kháng thể kháng HIV-1/HIV-2 có trong mẫu thử sẽ kết hợp với các kháng nguyên tái tổ hợp, các peptid đặc hiệu HIV-1/HIV-2 gắn biotin và các kháng nguyên tái tổ hợp, các peptid đặc hiệu HIV-1/HIV-2 gắn ruthenium. Phức hợp miễn dịch tương ứng được tạo ra dưới dạng bánh kẹp.

1.5. Xét nghiệm theo dõi điều trị HIV/AIDS

1.5.1 Xét nghiệm đo tải lượng HIV-1

Xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 được chỉ định khi:

- Người bệnh nghi ngờ thất bại điều trị ARV.
- Theo dõi định kỳ người bệnh điều trị ARV.

Ngày nay các sinh phẩm xét nghiệm tải lượng HIV-1 dựa vào nguyên lý Real time PCR được sử dụng phổ biến do ưu điểm nhanh, cho kết quả sau vài giờ, độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

Loại mẫu: theo WHO mẫu huyết tương được tách từ máu toàn phần chống đông bằng EDTA được coi là loại mẫu tiêu chuẩn trong XN đo tải lượng HIV nhưng đòi hỏi điều kiện vận chuyển bảo quản mẫu tốt. WHO cũng khuyến cáo sử dụng mẫu giọt máu khô (DBS) ở những nơi có điều kiện vận chuyển bảo quản mẫu khó khăn.

Tải lượng vi rút thường được tính bằng bản sao/ml (copy/ml).

1.5.1.1 Ý nghĩa của xét nghiệm tải lượng HIV

Nghiên cứu về một số đặc điểm vi rút học của HIV của nhiều tác giả cho thấy nguy cơ lây truyền vi rút HIV liên quan mật thiết với tải lượng HIV trong cơ thể người nhiễm. Cùng với xét nghiệm số lượng tế bào lympho T-CD4, tải lượng vi rút đã trở thành chỉ số đánh giá đáp ứng điều trị quan trọng nhất đối với nhiễm HIV, đóng vai trò quan trọng trong việc đánh giá và tiên lượng tiến triển bệnh và kết quả điều trị của bệnh nhân [40, 52, 71, 78, 98].

Tải lượng vi rút thường được tính bằng bản sao/ml (copy/ml). Ngoài ra số lượng bản sao của vi rút còn được quy đổi dưới dạng logarit thập phân (log10) để thuận lợi cho việc theo dõi sự thay đổi của tải lượng vi rút trong điều trị. Sự thay đổi của một hoặc nhiều log cho thấy sự thay đổi trong tải lượng vi rút một hoặc nhiều logarit.

Số lượng bản sao	Log10
10	1.0
50	1.7
100	2.0
500	2.7
1000	3.0
10,000	4.0
50,000	4.7
100,000	5.0
1,000,000	6.0

1.5.1.2 Đo tải lượng HIV bằng kỹ thuật Real time PCR

Nguyên tắc của kỹ thuật Real time PCR phát hiện nhiễm HIV (kỹ thuật PCR theo thời gian thực): Real time PCR là phương pháp cho phép khuếch đại và xác định số lượng các chuỗi DNA được tạo ra trong từng chu kỳ nhiệt.

Nguyên lý của Real time PCR: vừa chạy PCR vừa phát hiện sản phẩm PCR tạo thành, cần có chất đánh dấu để phát hiện sản phẩm, do đó sử dụng các hoá chất đánh dấu huỳnh quang trong hỗn hợp phản ứng.

Tải lượng vi rút cũng có thể đo được trong dịch cơ thể khác so với máu hoặc huyết tương (ví dụ: dịch não tủy, dịch âm đạo hoặc tinh dịch). Tuy nhiên, xét nghiệm này thường được thực hiện cho các mục đích khoa học và không được chính thức cấp phép cho các lý do khác.

1.5.1.3 Đo tải lượng HIV trên mẫu giấy thấm giọt máu khô DBS (Dried Blood spot)

Kỹ thuật xét nghiệm tải lượng vi rút từ mẫu DBS sử dụng mẫu bệnh phẩm là giọt máu khô thay vì huyết tương trong xét nghiệm tải lượng vi rút. So với các phương pháp sử dụng mẫu huyết tương, kỹ thuật này có ưu điểm là dễ bảo quản và an toàn, dễ vận chuyển không cần bảo quản lạnh và có thể chuyển gửi qua hệ thống bưu điện.

Các nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam đã chỉ ra các hiệu quả của việc thực hiện kỹ thuật DBS trong theo dõi tải lượng vi rút thường quy tại các khu vực có nguồn lực hạn chế. Ở các cơ sở điều trị tuyến dưới, DBS rất dễ thực hiện bởi kỹ thuật này không yêu cầu kỹ năng cao từ các nhân viên y tế. Bên cạnh đó, mẫu có thể bảo quản dễ dàng và giữ được ở nhiệt độ môi trường xung quanh trong ít nhất 2 tuần trước khi thực hiện [60, 81, 126, 169]. Tại các phòng xét nghiệm, kỹ thuật xét nghiệm mẫu DBS việc chuẩn bị mẫu sẽ khác so với mẫu huyết tương và việc thực hiện chạy máy xét nghiệm tương tự như mẫu huyết tương trong xét nghiệm tải lượng vi rút, do đó không yêu cầu việc mua sắm thêm hệ thống máy xét nghiệm chính. DBS cũng cho phép thực hiện việc xét nghiệm giám sát kháng thuốc trong những điều kiện hạn chế ngân sách như Việt Nam [22, 58, 82].

1.5.2 Xét nghiệm HIV kháng thuốc ARV

Có hai loại xét nghiệm phát hiện HIV kháng thuốc: xét nghiệm kiểu gen và thử nghiệm kiểu hình.

1.5.2.1 Thử nghiệm kiểu hình kháng thuốc (*phenotyping*)

Đây là phương pháp chính xác nhưng rất phức tạp và tốn kém, chỉ được thực hiện ở một vài phòng thí nghiệm trên thế giới. Thử nghiệm kiểu hình chủ yếu được dùng trong nghiên cứu và xác định lại các đột biến gen gây kháng thuốc. Các chủng vi rút được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung ARV. Kết quả được xác định bằng tỷ lệ CI 50 hoặc CI 90 (nồng độ ức chế 50 hoặc 90%) của chủng vi rút cần nghiên cứu so với chủng hoang dại nhạy cảm với thuốc.

Thử nghiệm ở mức độ kiểu hình phụ thuộc rất nhiều các thông số như số lượng vi rút dùng trong thử nghiệm, loại tế bào dùng làm tế bào chủ cho vi rút nhân lên và cách thức đánh giá sự nhân lên của vi rút.

1.5.2.2 Xét nghiệm kiểu gen (*genotyping*)

Phương pháp phát hiện các đột biến gen liên quan đến tính kháng với các loại thuốc ARV của HIV trong máu bệnh nhân

Xét nghiệm kiểu gen là xét nghiệm thông thường được sử dụng trong phát hiện HIV kháng thuốc.

Các đột biến và kiểu gen cụ thể có thể tìm trên trang web cơ sở dữ liệu về HIV kháng thuốc của Đại học Stanford – Hoa Kỳ. Trang web này duy trì và thường xuyên cập nhật danh mục các đột biến liên quan đến kháng với mỗi loại thuốc kháng vi rút.

Có nhiều phương pháp khác nhau để xác định kháng thuốc kiểu gen:

- Kỹ thuật lai chuyên biệt: dựa trên nguyên lý của kỹ thuật PCR và ELISA. Phương pháp sử dụng một môi biotinyl hóa cho phản ứng PCR, sau đó sản phẩm được gắn lên bề mặt các vi giếng, và đem lai với mẫu dò oligonucleotid có một đầu được gắn enzyme alkaline phosphatase. Xác định tỷ lệ của chủng hoang dại và đột biến nhờ vào phương pháp đo mật độ quang.

- Kỹ thuật phát hiện đột biến điểm với mỗi chuyên biệt: sử dụng mỗi chuyên biệt có tính đặc hiệu cao ở đầu 3' với chủng hoang dại và chủng đột biến nhằm phát hiện những đột biến chính đã biết.

- Kỹ thuật Real time PCR: sử dụng mẫu dò được đánh dấu đặc hiệu với chủng đột biến cũng nhằm phát hiện những đột biến chính đã biết.

- Chíp gen (*Gene chip array*): Một bộ chíp gồm vài nghìn giếng nhỏ gắn hàng triệu các mẫu dò có khả năng lai chuyên biệt với các đoạn trình tự gen protease và RT liên quan đến đích tác động của các thuốc ARV. Các đột biến được ghi nhận dựa vào tín hiệu huỳnh quang.

- Giải trình tự gen (*sequencing*): Là sự phối hợp giữa PCR và phương pháp enzyme học thông qua việc sử dụng bốn loại dideoxynucleotid được đánh dấu bằng 4 màu khác nhau. Các dideoxynucleotid này không còn khả năng hình thành cầu nối phosphodiester và do đó sẽ làm ngưng quá trình tổng hợp chuỗi, dẫn đến sự hình thành một tập hợp nhiều đoạn DNA có kích thước cách nhau một nucleotid. Các phân đoạn DNA sẽ được điện di qua những ống mao quản chứa gel polyacrylamid có khả năng phân tách 2 trình tự DNA chỉ chênh nhau một nucleotid, kết quả sẽ được xử lý và đọc qua hệ thống máy vi tính.

Xét nghiệm kháng thuốc được thực hiện khi người bệnh nghi ngờ thất bại vi rút học khi điều trị bằng ARV. Đối với HIV do số lượng đột biến điểm là rất lớn, kỹ thuật giải trình tự chuỗi là phương pháp được sử dụng nhiều nhất và được coi là chính xác nhất để theo dõi HIV kháng thuốc.

Đồng thời, khi theo dõi đột biến kháng thuốc, cần lưu ý một số vấn đề:

- Bệnh nhân thất bại điều trị không luôn luôn đồng nghĩa với sự xuất hiện các đột biến kháng thuốc. Không tuân thủ điều trị có thể là nguyên nhân làm cho tải lượng vi rút tăng do nồng độ thuốc không đủ để ức chế. Cần tăng cường sự tuân thủ điều trị trước khi đánh giá xuất hiện đột biến kháng thuốc.

- Bệnh nhân có thể kháng với những thuốc chưa từng sử dụng do một số đột biến gây ra hiện tượng kháng chéo với nhiều thuốc cùng nhóm.

1.5.2.3 Phân loại đột biến kháng thuốc

Đột biến là sự biến đổi bộ gen HIV, sự biến đổi này dẫn tới sự thay đổi axit amin so với chủng hoang dại, điều này làm giảm mức độ nhạy cảm của vi rút đối với thuốc ARV. Trong kết quả kháng thuốc, đột biến được thể hiện bằng sự kết hợp của các chữ cái và con số.

Chữ cái đầu	Con số	Chữ cái thứ hai
<i>Tên axit amin của chủng hoang dại</i>	<i>Vị trí đột biến</i>	<i>Tên axit amin của chủng đột biến</i>

Ví dụ: M184V: đột biến xảy ra tại vị trí **184** biến đổi axit amin *Methionin* thành *Valin*.



Hình 1.8: Đột biến M184V, T215F đối với nhóm NRTIs và đột biến K101E, G190A đối với nhóm NNRTIs

- **Đột biến chính** (*major resistance mutation*): Chỉ cần 1 đột biến cũng có thể gây ra kháng thuốc.
- **Đột biến phụ** (*minor resistance mutation*): Cần kết hợp nhiều đột biến mới gây ra tính kháng.
- **Đột biến đa hình** (*polymorphism*): những khác biệt giữa chủng HIV trên người nhiễm so với chủng hoang dại nhưng chưa ảnh hưởng đến tính kháng thuốc.
- **Đột biến kháng chéo**: đột biến gây tính kháng với nhiều thuốc trong nhóm. Hiện tượng này gây tính kháng với cả những thuốc mà bệnh nhân chưa có tiền sử sử dụng.
- Xem xét hiện tượng kháng chéo rất quan trọng khi đổi phác đồ điều trị cho bệnh nhân, tránh tình trạng sử dụng những loại thuốc không còn hiệu quả cho bệnh nhân đó.
- Đột biến cần theo dõi (*Surveillance Drug Resistance Mutations - SDRMs*): thường là những đột biến kháng thuốc chỉ xuất hiện sau một thời gian tiếp xúc với ARV; ở bệnh nhân chưa tiếp xúc với ARV, những đột biến này là chỉ điểm của kháng thuốc do lây truyền nên cần theo dõi, giám sát sự xuất hiện của chúng để có hướng dẫn kịp thời việc sử dụng phác đồ ARV phù hợp. Danh sách đột biến cần theo dõi theo WHO được liệt kê trong phụ lục 1.

Cách tính điểm đột biến và mức độ kháng thuốc

Trình tự gen của mẫu bệnh phẩm được so sánh với chủng hoang dại trên ngân hàng dữ liệu quốc tế về đột biến kháng thuốc ARV của Đại học Stanford – Hoa Kỳ. Các đột biến sẽ được đánh giá bằng số điểm cụ thể. Mức độ kháng với một thuốc được đánh giá dựa trên tổng số điểm của các đột biến liên quan đến tính kháng đối với thuốc đó [81]:

- **Nhạy** (< 0 - 9 điểm): vi rút vẫn còn nhạy với thuốc.

- **Có khả năng kháng thấp** (10 - 14 điểm): vì rút mang những đột biến chưa có khả năng kháng thuốc nhưng có thể kết hợp với nhiều đột biến khác gây nên tính kháng.
- **Kháng thấp** (15 - 29 điểm): vì rút giảm mức độ nhạy cảm với thuốc, bệnh nhân có thể đáp ứng không tốt về mặt vi rút khi điều trị.
- **Kháng trung bình** (30 - 59 điểm): vì rút thể hiện khả năng kháng với thuốc làm giảm hiệu quả điều trị.
- **Kháng cao (≥ 60 điểm)**: vì rút mang tính kháng cao với thuốc và bệnh nhân không đáp ứng điều trị về mặt vi rút học

1.5.3 Xét nghiệm đếm tế bào lympho T-CD4

Do hướng tính đặc hiệu của gp120 HIV đối với thụ thể CD4 và thụ thể CD4 có nhiều trên các tế bào lympho T-CD4, một tế bào đóng vai trò trung tâm của hầu hết các đáp ứng miễn dịch nên nhiễm HIV có ảnh hưởng rất lớn lên hệ thống miễn dịch. HIV làm ly giải các tế bào lympho T-CD4 hoặc bất hoạt chức năng của tế bào này dẫn đến hệ thống miễn dịch của cơ thể suy giảm. Tế bào lympho T-CD4 bị giảm số lượng, giảm chức năng, đáp ứng miễn dịch dịch thể và đáp ứng miễn dịch tế bào cũng vì vậy mà giảm sút, hệ thống miễn dịch suy giảm không có khả năng chống đỡ bệnh tật, bệnh nhân dễ mắc các nhiễm trùng cơ hội và ung thư. Tóm lại, trong số các tế bào có thụ thể CD4, sự biến động lympho T-CD4 có liên quan mật thiết tới khả năng bảo vệ của hệ thống miễn dịch. Do vậy, việc theo dõi lympho T-CD4 rất có giá trị tiên lượng tình trạng miễn dịch của cơ thể.

Ý nghĩa của xét nghiệm tế bào lympho T-CD4 là:

- Đánh giá mức độ suy giảm miễn dịch và giai đoạn bệnh trong nhiễm HIV.
- Theo dõi diễn tiến bệnh.
- Chỉ định điều trị dự phòng bằng Cotrimoxazole.

- Chỉ định điều trị thuốc kháng vi rút (ARV).
- Theo dõi và đánh giá hiệu quả điều trị.

Năm 2017, theo quy định của Bộ Y tế các bệnh nhân nhiễm HIV cần được theo dõi định kỳ 6 tháng bằng xét nghiệm tế bào lympho T-CD4 nếu không có XN tải lượng HIV thường quy hoặc đang điều trị dự phòng bệnh nhiễm trùng cơ hội để có chỉ định can thiệp kịp thời (Hướng dẫn điều trị và chăm sóc HIV/AIDS *Quyết định số 5418/QĐ-BYT ngày 01/12/2017 của Bộ Y tế*). Các hướng dẫn xét nghiệm điều trị thường xuyên được cập nhật phù hợp với hướng dẫn của WHO và điều kiện thực tế ở Việt Nam.

Hiện có rất nhiều dòng máy hiện diện tại các phòng xét nghiệm đếm tế bào CD4 như:

- FacsCalibur - Becton Dickinson (Mỹ).
- Cytomics EC500 - Beckman Coulter (Mỹ).
- Máy Facs Count - Becton Dickinson (Mỹ).
- Máy Cyflow SL3, CyFlow Counter - Partec (Đức).
- PCA – Guava – Milipore (Mỹ).
- Pima analyser – Alere – (Anh) (Máy đếm tế bào sách tay)
- CD4 BD FACSPresto- Becton Dickinson (Mỹ) (Máy đếm tế bào sách tay)

1.5.3.1 Các kỹ thuật đếm tế bào lympho T-CD4

Các xét nghiệm đếm tế bào lympho T-CD4 ban đầu được thực hiện bằng cách sử dụng các hạt bi từ và đếm trên kính hiển vi. Trong phương pháp này người ta dùng các hạt bi từ gắn kháng thể kháng CD14 để loại bỏ tế bào mono (có CD4) sau đó dùng các hạt bi từ gắn kháng thể anti-CD4 để thu thập tế bào CD4 sau đó đếm số lượng các tế bào này trên kính hiển vi. Tuy giá thành xét nghiệm thấp, nhưng phương pháp này có nhiều điểm hạn chế về thời gian và số lượng mẫu được thực hiện. Tiếp đến, xét nghiệm đếm tế bào lympho T-CD4 dựa trên kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy (flow cytometry)

ngày càng trở nên phổ biến và cho đến nay phương pháp này được xem như là phương pháp chuẩn mực cho xét nghiệm đếm tế bào lympho T-CD4. Phương pháp đếm tế bào dòng chảy (flow cytometry) là một phương pháp dùng để phân tích đồng thời các đặc điểm lý hóa của từng tế bào đơn với tốc độ phân tích từ vài trăm đến vài ngàn tế bào trong một giây.

1.5.3.2 Nguyên lý cơ bản của đếm tế bào theo nguyên lý dòng chảy

Nguyên lý đếm tế bào lympho T-CD4 kỹ thuật đếm tế bào dòng chảy

Ứng dụng của nguyên lý tế bào dòng chảy được dùng trong việc xác định số lượng tuyệt đối và phần trăm số lượng tế bào lympho T-CD4 trong máu toàn phần còn được gọi là xét nghiệm đếm tế bào lympho T-CD4. Để xác định được quần thể tế bào lympho T-CD4 trong máu toàn phần, các hãng khác nhau sử dụng các chiến lược tạo cổng, kháng thể và cách thức tính số lượng tuyệt đối tế bào khác nhau để xác định số lượng và phần trăm tế bào lympho T-CD4 có trong máu toàn phần. Số lượng tuyệt đối lympho T-CD4 trong máu toàn phần thường có thể xác định thông qua việc sử dụng các hạt bi với số lượng xác định hoặc đo chính xác thể tích mẫu phân tích chính xác. Với nguyên lý đo thể tích, thông thường nhà sản xuất thiết kế máy có khả năng đo chính xác một lượng thể tích nhất định, sau đó căn cứ trên số tế bào thực tế đếm được, độ pha loãng và thể tích mẫu máu ban đầu cho vào để tính toán số lượng tuyệt đối lympho T-CD4/ μl .

Lympho T-CD4 tuyệt đối/ μl = (Số lượng tế bào đếm được x Tổng thể tích mẫu sau xử lý)/(Thể tích mẫu được hút bởi máy x Thể tích mẫu máu ban đầu)

Trong khi đó, với nguyên lý xác định thể tích dựa trên bi chuẩn. Ban đầu nhà sản xuất hay người sử dụng cho một lượng bi chuẩn với số lượng biết trước vào trong ống tuýp xử lý mẫu. Sau khi trộn đều với mẫu máu, hỗn dịch tế bào máu và bi chuẩn xem như đồng nhất. Trong quá trình đếm, máy sẽ đếm được

một lượng nhỏ xác định bi chuẩn và tế bào máu. Từ các thông số trên, máy sẽ tính toán ra giá trị số lượng tuyệt đối lympho T-CD4.

Lympho T-CD4 tuyệt đối/ μ l = (Số lượng tế bào đếm được x Tổng số bi chuẩn ban đầu)/(Số bi chuẩn được đếm bởi máy x Thể tích mẫu máu ban đầu)

Cách tính giá trị phần trăm lympho T-CD4 khi có giá trị số lượng tế bào lympho T-CD4 và tổng lympho bào.

1.6. THEO DÕI ĐIỀU TRỊ HIV/AIDS

1.6.1 Theo dõi lâm sàng

Một trong các đánh giá được áp dụng phổ biến để đánh giá trình trạng bệnh và đáp ứng điều trị ở bệnh nhân HIV/AIDS là thông qua các triệu chứng lâm sàng và nhiễm trùng cơ hội kèm theo ở bệnh nhân. Theo WHO, các nhiễm trùng cơ hội liên quan đến HIV được chia làm 4 giai đoạn từ 1 đến 4 (Phụ lục 1), tùy thuộc vào các triệu chứng bệnh liên quan đến HIV ở người nhiễm [172]. Trong đó, giai đoạn 1 bao gồm các triệu chứng nhẹ hoặc không có nhiễm trùng cơ hội kèm theo, giai đoạn 4 bao gồm các nhiễm trùng cơ hội nặng xảy ra ở các bệnh nhân ở giai đoạn AIDS. Bệnh lý HIV/AIDS tiến triển được xác định cho các mục đích giám sát bao gồm các trường hợp bệnh nhân có giai đoạn lâm sàng 3 hoặc 4 và thông tin này có thể được sử dụng để tính toán gánh nặng bệnh tật và nhu cầu điều trị ARV [4]. Trong điều kiện không có xét nghiệm CD4, đánh giá giai đoạn lâm sàng vẫn đóng vai trò quan trọng trong đánh giá tình trạng của bệnh nhân và là bằng chứng để cung cấp các gói điều trị phù hợp [174]. Đối với bệnh nhân đang điều trị bằng thuốc ARV trong hơn 24 tuần, các nhiễm trùng cơ hội mới hoặc tái diễn có thể là một bằng chứng để các bác sĩ lâm sàng đưa ra các quyết định điều trị. Trước 24 tuần điều trị ARV, các sự kiện lâm sàng phần lớn chịu ảnh hưởng của việc tái tạo miễn dịch hoặc độc tính điều trị và có thể không phản ánh chính xác sự suy giảm miễn dịch [168]. Theo hướng dẫn của WHO sự xuất hiện của các

giai đoạn lâm sàng 3 hoặc 4 mới hoặc tái phát hơn 24 tuần sau khi bắt đầu điều trị cho thấy bệnh nhân có biểu hiện của thất bại điều trị [142].

Đánh giá lâm sàng là phương pháp phổ biến nhất trong theo dõi điều trị bệnh nhân HIV/AIDS bởi sự nhanh chóng và ít tốn kém so với theo dõi bằng CD4 hay tải lượng vi rút. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy, đánh giá lâm sàng có độ nhạy và độ đặc hiệu kém hơn so với các đánh giá khác [28, 67, 153]. Hạn chế của phương pháp này là do các biểu hiện lâm sàng thường xuất hiện muộn nhất khi các bệnh nhân đã ở tình trạng nặng của bệnh. Các biện pháp can thiệp muộn vào thời điểm này không đem lại hiệu quả cao và với chi phí cao hơn. Tuy vậy, tại các nước có nguồn lực hạn chế trong đó có Việt Nam, đánh giá bằng lâm sàng vẫn là phương pháp phổ biến nhất trong điều trị cho người nhiễm HIV/AIDS. Phương pháp này vẫn có giá trị trong các trường hợp bệnh nhân ở giai đoạn lâm sàng sớm khi chưa có các triệu chứng nặng và các trường hợp bệnh nhân mới đăng ký điều trị.

1.6.2 Theo dõi số lượng tế bào CD4

Trong hơn hai thập kỷ qua, khi xét nghiệm tải lượng HIV-1 được triển khai rộng rãi thì xét nghiệm đếm tế bào CD4 được coi là xét nghiệm cơ bản nhất trong việc đánh giá tình trạng và theo dõi tiến triển của bệnh nhân HIV/AIDS. Số lượng tế bào CD4 là một dự báo quan trọng của sự tiến triển bệnh và tử vong ở những người sống chung với HIV/AIDS [49, 112] và là tiêu chuẩn chính để đánh giá điều kiện bắt đầu điều trị thuốc kháng vi rút, dự phòng các nhiễm trùng cơ hội và theo dõi đáp ứng điều trị [43, 49].

Xét nghiệm CD4 có giá trị theo dõi cao hơn so với đánh giá lâm sàng, theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế Thế giới [172]. Xét nghiệm này còn đóng vai trò quan trọng trong việc chỉ định điều trị dự phòng nhiễm trùng cơ hội và khởi động điều trị ARV. Đối với hầu hết bệnh nhân điều trị, đáp ứng điều trị thích hợp được định nghĩa là sự gia tăng số lượng CD4 trong phạm vi từ 50

đến 150 tế bào/mm³ trong năm đầu tiên điều trị ARV, thường là đáp ứng nhanh trong 3 tháng đầu điều trị. Sau đó, tăng trung bình khoảng 50 đến 100 tế bào/mm³ mỗi năm cho tới khi đạt tới mức trạng thái ổn định [61]. Bệnh nhân bắt đầu điều trị với số lượng CD4 thấp [17, 86, 93] hoặc ở độ tuổi cao hơn có thể có sự tăng lên đáng kể và có sự ức chế về vi rút. Đánh giá đáp ứng bằng xét nghiệm CD4 sẽ có giá trị chẩn đoán cao hơn so với đánh giá lâm sàng, giúp giảm các tình trạng tàn tật và tử vong của bệnh nhân [23, 137].

Tại Việt Nam trong rất nhiều năm, khi xét nghiệm tải lượng HIV-1 chưa phổ biến, xét nghiệm đếm tế bào CD4 được thực hiện tại thời điểm bắt đầu điều trị và sau đó mỗi 6 tháng. Số lượng CD4 còn là tiêu chuẩn để quyết định điều trị ARV cho bệnh nhân. Tuy nhiên, theo Hướng dẫn mới nhất của Bộ Y tế ban hành (QĐ số 5418/QĐ-BYT ngày 01/12/2017), điều trị ARV sẽ được cung cấp cho tất cả các đối tượng nhiễm HIV/AIDS bất kể số lượng tế bào CD4 của bệnh nhân là bao nhiêu [5]. Xét nghiệm CD4 sẽ không còn được xét nghiệm định kỳ mà có thể được thực hiện khi bắt đầu điều trị hoặc khi muốn đánh giá tình trạng đáp ứng miễn dịch của bệnh nhân. Tuy nhiên, xét nghiệm này vẫn đóng vai trò quan trọng trong việc chẩn đoán HIV giai đoạn tiến triển của bệnh nhân [174]. Việc xác định các bệnh nhân HIV tiến triển sẽ giúp các bác sĩ cung cấp các gói can thiệp điều trị phù hợp với từng đối tượng cụ thể trong bối cảnh cắt giảm nguồn viện trợ cho điều trị HIV/AIDS tại Việt Nam [172, 174].

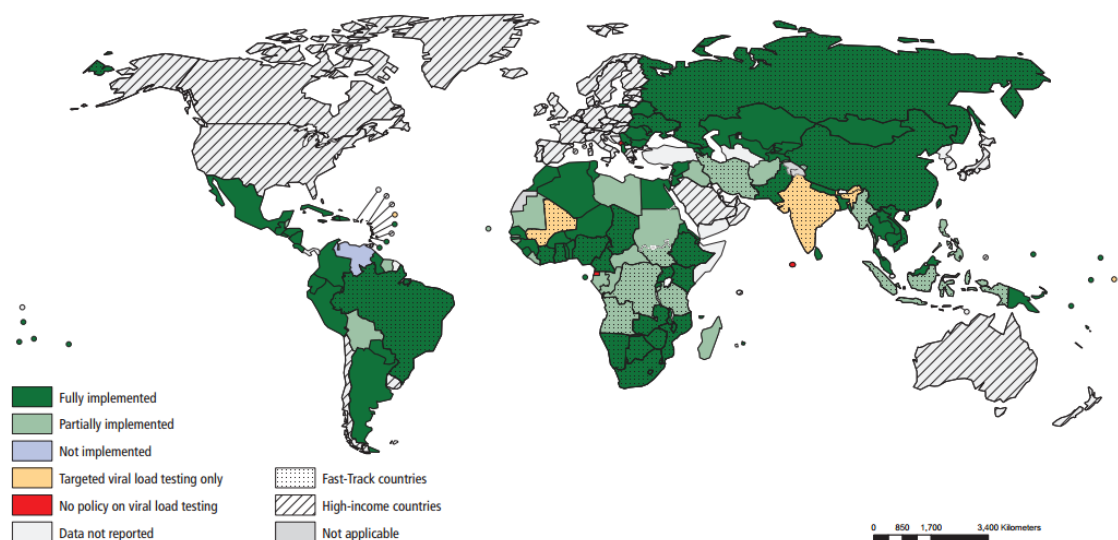
1.6.3 Theo dõi tải lượng HIV

Trong thập kỷ trước, việc mở rộng điều trị ARV ở các nước có nguồn lực hạn chế đòi hỏi cách tiếp cận đơn giản [26]. Do năng lực phòng thí nghiệm không đáp ứng đủ, nên nhiều chương trình đã giảm thiểu việc theo dõi đáp ứng điều trị bằng xét nghiệm [96] nhằm tối ưu cho việc mở rộng điều trị. Đặc biệt, theo Hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới năm 2003, việc đánh

giá tải lượng HIV-1 - được thực hiện thường xuyên để theo dõi bệnh nhân nhiễm HIV ở các nước có thu nhập cao - không được khuyến cáo sử dụng tại các nước có nguồn lực hạn chế [74]. Thiết bị để xét nghiệm tải lượng vi rút thường không có hoặc có nhưng không sử dụng. Nếu có sẵn thiết bị xét nghiệm, việc kiểm tra tải lượng vi rút cũng rất tốn kém: một xét nghiệm tải lượng vi rút có giá dao động từ \$20 đến \$160 (đô la Mỹ). Bên cạnh đó, phần lớn những người nhiễm HIV vẫn không thể tiếp cận được điều trị và do nguồn tài chính còn hạn chế nên người ta cho rằng cần áp dụng các biện pháp phòng ngừa và bắt đầu điều trị hơn là thực hiện các xét nghiệm đắt tiền nhằm theo dõi bệnh nhân đang điều trị [62]. Tuy nhiên, có một số lý do quan trọng để thực hiện theo dõi tải lượng vi rút trong các điều kiện hạn chế nguồn lực: gần 1,5 triệu người trên toàn thế giới đang được điều trị bằng thuốc kháng vi-rút, điều này làm tăng đáng kể nhu cầu phát hiện những trường hợp thất bại điều trị. Hơn 800.000 trẻ sơ sinh mới nhiễm HIV hàng năm, nhưng không thể chẩn đoán nhiễm trùng mà không cần xét nghiệm tải lượng vi rút. Khi nhu cầu xét nghiệm tải lượng vi rút tăng, công nghệ để xác định tải lượng vi rút đang trở nên đơn giản hơn, cùng với đó là chi phí thấp hơn [74].

Với các nguồn viện trợ trị giá 8,3 tỷ đô la hàng năm trong điều trị HIV ở các nước đang phát triển [74], vấn đề liệu có thể cung cấp dịch vụ chăm sóc HIV hiệu quả cao nếu không có giám sát tải lượng vi rút đã được xem xét lại. Hướng dẫn sửa đổi của WHO về điều trị HIV ở các nước có nguồn lực hạn chế đã được công bố tại Hội nghị Thế giới về AIDS XVI tại Toronto vào tháng 8 năm 2006 đã công nhận sự gia tăng sử dụng các xét nghiệm tải lượng vi rút ở nhiều nước. Lần đầu tiên, dữ liệu tải lượng vi rút được xem xét theo các tiêu chí để xác định thất bại điều trị và ngưỡng giới hạn tải lượng vi rút trong các điều kiện hạn chế nguồn lực đã được đề xuất. Các hướng dẫn này cung cấp các bằng chứng hữu ích cho các nghiên cứu sâu hơn về câu hỏi này.

Mặc dù giá thành các xét nghiệm hiện nay vẫn còn cao, nhưng việc kiểm tra tải lượng vi rút có thể giúp tránh sử dụng các phác đồ điều trị với chi phí cao hơn khi không cần thiết (ví dụ phác đồ bậc 2). Hướng dẫn mới nhất của Tổ chức Y tế thế giới đã khuyến cáo theo dõi tải lượng vi rút thường quy, cùng với xét nghiệm CD4 và các đánh giá lâm sàng [172]. Các nghiên cứu trên thế giới cũng đã chỉ ra xét nghiệm tải lượng vi rút thường quy có chi phí hiệu quả cao, đồng thời giảm thiểu các gánh nặng điều trị ở các bệnh nhân thất bại điều trị [21, 23, 147, 148, 153].

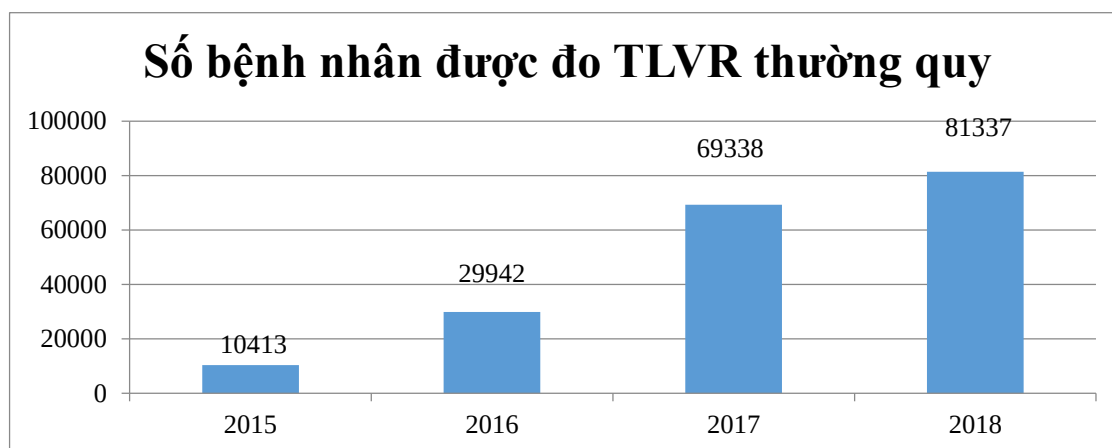


Source: Global AIDS Monitoring (UNAIDS/WHO/UNICEF) and WHO HIV Country Intelligence Tool, 2019

Biểu đồ 1.9. Phân bố triển khai theo dõi TLVR tại các quốc gia thu nhập thấp và trung bình tính đến tháng 7/2019 [176]

Tại Việt Nam, cam kết thực hiện mục tiêu 90-90-90 với 90% các bệnh nhân HIV/AIDS điều trị ARV có tải lượng vi rút ở dưới ngưỡng ức chế đòi hỏi cấp thiết phải mở rộng theo dõi tải lượng vi rút tại các phòng khám trên toàn quốc. Hướng dẫn mới nhất của Bộ Y tế (Quyết định số 5418/QĐ-BYT ngày 01/12/2017 của Bộ Y tế về việc ban hành Hướng dẫn điều trị và chăm

sóc HIV/AIDS) cũng đã đưa ra quy định về xét nghiệm tải lượng vi rút thường quy trên các bệnh nhân điều trị.



Biểu đồ 1.10. Số lượng theo dõi TLVR thường quy tại Việt Nam [13]

1.7. HIV KHÁNG THUỐC

HIV có khả năng nhân lên rất nhanh có thể đạt đến 10 tỷ bản sao mới trong một ngày trên người nhiễm HIV không được điều trị và các bản sao này có tỉ lệ đột biến rất cao. Vì vậy, trong quá trình điều trị ARV các chủng đột biến HIV kháng thuốc (HIVKT) có thể xuất hiện trong vòng vài ngày nếu như nồng độ thuốc không đủ để ức chế sự nhân lên của HIV.

HIV kháng thuốc là các trường hợp đang điều trị ARV nhưng có tải lượng HIV trên 1000 bản sao/ml và có đột biến HIV kháng thuốc. Các đột biến HIV kháng thuốc là đột biến có liên quan đến việc kháng một hoặc nhiều loại thuốc ARV. Kháng thuốc được định nghĩa là khả năng của HIV đột biến và nhân lên so với chủng HIV hoang dại nhạy cảm với thuốc dưới sự có mặt của thuốc kháng vi rút trong máu. Đó là những đột biến xảy ra ở các gen mã hóa cho các phân tử đích mà thuốc ARV tác động. Dưới áp lực chọn lọc của thuốc ARV, HIV mang các đột biến kháng thuốc dần dần chiếm ưu thế lấn át các chủng vi rút nhạy cảm với thuốc và dẫn tới sự tồn tại các chủng HIV đột biến kháng thuốc ARV. Các đột biến rất hay gặp ở HIV vì vi rút này có khả

năng tái bản rất nhanh và không có các protein cần thiết để sửa chữa những lỗi sao chép trong quá trình đó. Vì vậy kháng thuốc ARV vẫn sẽ xảy ra ở những người đã được tiếp cận điều trị sớm, thậm chí cả khi họ được điều trị bằng phác đồ phù hợp và tuân thủ tốt.

Sự hình thành kháng thuốc:

- + Kháng thuốc được hình thành bởi áp lực chọn lọc và sự lây truyền.
- + Tốc độ vi rút nhân lên rất cao, có khoảng 10 tỷ bản sao vi rút sinh ra mỗi ngày.
- + Men sao mã ngược của HIV thiếu khả năng đọc sửa nên rất dễ gây lỗi và dẫn đến đột biến.
- + HIV đột biến xuất hiện tự nhiên khi vi rút nhân lên cho dù người nhiễm có đang được điều trị thuốc kháng vi rút hay không.
- + Đột biến của vi rút có thể gây ra đề kháng nhưng không phải mọi đột biến đều gây ra đề kháng thuốc.
- + HIV đề kháng với một thuốc, vi rút vẫn nhân lên trong khi bệnh nhân đang dùng thuốc đó.
- + Dưới áp lực chọn lọc của thuốc kháng vi rút một đột biến ngẫu nhiên có thể làm HIV nhân lên dễ hơn so với chủng hoang dại.
- + Một khi gen kháng thuốc xuất hiện nó tiếp tục nhân lên và lan truyền trong cộng đồng dẫn đến phác đồ thuốc điều trị hiện tại của bệnh nhân không còn hiệu quả.
- + Một đột biến có thể đề kháng với nhiều loại thuốc.
- + Lũy tích gen kháng thuốc làm cho việc điều trị thất bại dẫn đến tiến triển bệnh trên lâm sàng xấu và bệnh nhân có thể tử vong.
- + Các xét nghiệm để xác định kháng thuốc chỉ phát hiện được gen kháng thuốc khi nó xuất hiện ở trên 20% quần thể vi rút.

HIV kháng thuốc được phân làm 2 loại là HIV kháng thuốc lây truyền (TDR: transmitted drug resistance) và HIV kháng thuốc mắc phải (ADR: acquired drug resistance).

***HIV kháng thuốc lây truyền** là tình trạng HIV kháng thuốc được xác định ở những người mới nhiễm HIV xảy ra trên những bệnh nhân chưa điều trị ARV nhưng lại bị nhiễm bởi chủng HIV kháng thuốc. Đối với các bệnh nhân chưa điều trị ARV này HIV kháng thuốc lây truyền có thể xuất hiện trong nhiều tháng hoặc nhiều năm khi không có áp lực chọn lọc của thuốc ARV do bệnh nhân chưa đủ tiêu chuẩn điều trị ARV, nó có thể đã chuyển thành dạng hoang dại hoặc ở “dạng ngủ”. Chỉ sau 6 năm kể từ ngày AZT được đưa vào điều trị cho bệnh nhân HIV đã có những bệnh nhân được phát hiện đề kháng với AZT do ở những bệnh nhân này đã nhiễm chủng HIV kháng thuốc từ những bệnh nhân có kháng thuốc do điều trị ARV [134]. Mặt khác cũng có một số chủng HIV đề kháng tự nhiên với một số thuốc ARV như sự đề kháng tự nhiên với NNRTI của HIV-2 hay sự kém nhạy cảm với các PI, NNRTI của một số phân type HIV-1 so với phân type B thường gặp ở Mỹ và các nước Châu Âu. Tỷ lệ kháng thuốc tiên phát rất khác nhau giữa các cộng đồng nhưng có xu hướng ngày càng tăng do việc mở rộng điều trị ARV như trong nghiên cứu của Lan NT và cộng sự tại Việt Nam trên 200 bệnh nhân nhiễm HIV chưa được điều trị ở thành phố Hồ Chí Minh phát hiện có 6.5% có đột biến gen đề kháng với ARV trong đó có 4.5% kháng nhóm NRTI, NNRTI và 2% kháng nhóm PI [65].

***HIV kháng thuốc mắc phải (acquired drug resistance):** HIV kháng thuốc trên quần thể bệnh nhân đang điều trị ARV bậc 1.

Là tình trạng xuất hiện các đột biến HIV kháng thuốc dưới áp lực chọn lọc của thuốc ARV trên quần thể người bệnh đang điều trị ARV bậc 1. Kháng thuốc của HIV mắc phải chủ yếu do tuân thủ điều trị kém, gián đoạn điều trị, nồng độ thuốc trong huyết thanh không đủ hoặc sử dụng các phối hợp thuốc

hoặc các phác đồ thuốc không tối ưu. HIV có đặc trưng là sự sản xuất và thay thế vi rút ở mức rất cao. Với các bệnh nhân không được điều trị ARV số lượng các tế bào nhiễm HIV được nhân lên ở trong các mô lympho vào khoảng 10^7 đến 10^8 tế bào [32]. Do đời sống của các tế bào nhiễm vi rút rất ngắn (một đến hai ngày) nên đòi hỏi vi rút phải gây nhiễm các tế bào mới với tốc độ rất nhanh theo cấp số nhân. Mặt khác quần thể vi rút trong một cá thể bị nhiễm thường không đồng nhất, đặc biệt sự sao chép ngược từ RNA sang DNA của vi rút rất dễ sai lệch gây ra trung bình một đột biến cho mỗi lần sao chép genome của vi rút. Tốc độ sản xuất vi rút cao kết hợp với tỉ lệ đột biến tăng trong mỗi chu kỳ sinh trưởng làm cho mỗi bệnh nhân đều chứa một phức hợp nhiều biến chủng (quasispecie) khác nhau được tạo nên bởi một hay nhiều đột biến.

1.8. Tình hình nghiên cứu trên thế giới và Việt Nam

1.8.1. Nghiên cứu trên thế giới

Chương 2

ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các bệnh nhân nhiễm HIV bắt đầu điều trị ARV theo phác đồ bậc một tại phòng khám ngoại trú bệnh viện Bạch Mai .

Tiêu chuẩn lựa chọn:

Tiêu chuẩn tham gia:

1. Tuổi ≥ 16 .
2. Có kết quả xét nghiệm HIV (+) được khẳng định theo chiến lược III của Bộ Y tế.
3. Đủ tiêu chuẩn điều trị ARV theo phác đồ bậc 1 của Bộ Y tế theo từng giai đoạn.

Giai đoạn	Quyết định	Tiêu chuẩn
4/2011 – 01/11/2011	QĐ 3003/QĐ-BYT ngày 19/8/2009	- CD4 < 250 TB/mm ³ - GDLS 4 - GDLS 3 với CD4 < 350 TB/mm ³
Từ 02/11/2011 – 04/2014	QĐ 3003/QĐ-BYT ngày 02/11/2011	- CD4 < 350 TB/mm ³ - GDLS 3 hoặc 4

4. Hoàn thành khóa tập huấn bắt buộc về tuân thủ điều trị của Bộ Y tế

5. Đồng ý và ký bản thỏa thuận tham gia nghiên cứu

Tiêu chuẩn loại trừ: Bệnh nhân đã hoặc đang điều trị ARV trước khi được tiếp cận với đề tài nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Cỡ mẫu

Tất cả các bệnh nhân được đăng ký điều trị tại phòng khám ngoại trú Bệnh viện Bạch Mai và đủ tiêu chuẩn lựa chọn đều được mời tham gia nghiên cứu. Tổng cộng có 648 người bệnh đồng ý tham gia nghiên cứu với tỉ lệ đồng ý là 90%.

2.2.2. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu thuần tập, tiền cứu. Đối tượng nghiên cứu được theo dõi từ thời điểm trước điều trị đến 36 tháng sau điều trị.

a. Theo dõi tải lượng HIV-1 huyết tương thường quy và xác định đặc điểm vi rút học của bệnh nhân thất bại điều trị phác đồ bậc một

- Giám sát lâm sàng và xét nghiệm: Khám lâm sàng định kỳ, theo dõi trên xét nghiệm: 1 tháng sau khi điều trị ARV: CTM, AST, ALT. 6 tháng một lần: TB lympho T CD4, CTM, AST, ALT
- Đo tải lượng vi rút: mỗi 6 tháng sau khi được điều trị ARV trong vòng 36 tháng trên 305 đối tượng. 343 người bệnh còn lại trong mẫu nghiên cứu được đánh giá tải lượng vi rút tại thời điểm trước điều trị, 36 tháng sau điều trị và các thời điểm nghi ngờ thất bại điều trị theo hướng dẫn của Bộ Y tế.
- Xác định gen kháng thuốc: chỉ thực hiện trên những bệnh nhân có tải lượng vi rút > 1,000 copies/ml.

b. Bước đầu đánh giá mức độ khả thi của đo tải lượng vi rút bằng kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS-PBS

Lựa chọn ngẫu nhiên 79 bệnh nhân trong nhóm được làm TLVR định kỳ để tiến hành đo TLVR theo cả 2 phương pháp là huyết tương và giọt máu khô (DBS-PBS) tại các thời điểm M0, M6, M12, M24 và M36 (M0: thời

điểm trước điều trị ARV, M6, M12, M24, M36: sau 6, 12, 24 và 36 tháng). Tổng cộng có 264 mẫu DBS được thu thập trong nghiên cứu này.

2.2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu: Nghiên cứu được triển khai thực hiện tại Bệnh viện Bạch Mai, khoa Vi sinh, Phòng thí nghiệm chẩn đoán phân tử viện Vệ sinh Dịch tễ trung ương từ tháng 4/2011- tháng 11/2017. Bệnh nhân được thu tuyển từ tháng 4/2011 đến tháng 12/2013, theo dõi trong vòng 36 tháng từ thời điểm thu tuyển. Thời điểm kết thúc thu thập mẫu bệnh phẩm là tháng 7/2017.

2.2.4. Phân tích số liệu

Các biến số theo dõi trong nghiên cứu

- Các yếu tố nhân khẩu học: Tuổi, giới, nghề nghiệp, địa chỉ
- Các yếu tố nguy cơ nhiễm HIV
- Các yếu tố về điều trị ARV: thời gian, phác đồ điều trị ARV, nhiễm trùng cơ hội
- Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng khi bắt đầu điều trị và sau 6, 12, 18, 24, 30, 36 : giai đoạn lâm sàng theo WHO I, II, III, IV (phụ lục 1) , số lượng tế bào CD4, tải lượng HIV, xét nghiệm CTM, ALT, AST, hemoglobin
- Các nhiễm trùng cơ hội có hay không
- Phác đồ ARV được sử dụng khi bắt đầu điều trị
- Có thay đổi phác đồ hay không, nếu có ghi nhận lại
- Tải lượng vi rút khi bắt đầu điều trị (M0) và tại các thời điểm M6, M12, M24, và M36
- Đánh giá thất bại điều trị: đánh giá thất bại lâm sàng, thất bại miễn dịch, thất bại vi rút học dựa trên kết quả thăm khám và xét nghiệm.

- Đặc tính, đặc điểm của kháng thuốc kiểu gen: đột biến kháng thuốc theo vị trí, đột biến kháng thuốc theo nhóm thuốc, kháng thuốc theo từng loại thuốc ARV (Phụ lục 5)
- Tình trạng bệnh nhân sau 36 tháng điều trị:
 - Kết quả xét nghiệm miễn dịch, tải lượng HIV, xác định gen kháng thuốc ở bệnh nhân thất bại điều trị.

Định nghĩa một số biến số dùng trong nghiên cứu:

- Tải lượng HIV-1 (HIV-1 viral load): số lượng bản sao của HIV-1 (HIV-1 RNA) trong 1 ml huyết tương.
- Số lượng tế bào lympho T-CD4: tế bào/mm³ (TB/ mm³)
- Các định nghĩa về thất bại điều trị: Các tiêu chuẩn thất bại điều trị được xác định theo “Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị HIV/AIDS” Bộ Y tế ban hành 19/8/2009 [17] (Thất bại về lâm sàng, thất bại về miễn dịch, thất bại về vi rút học).
 - Thất bại lâm sàng: Xuất hiện mới hoặc tái phát các bệnh lý giai đoạn lâm sàng 4 sau điều trị ít nhất 6 tháng
 - Thất bại miễn dịch: CD4 giảm xuống bằng hoặc dưới mức CD4 ban đầu trước điều trị; hoặc CD4 giảm dưới một nửa so với mức CD4 cao nhất đạt được (nếu biết giá trị này); hoặc CD4 dưới 100 tế bào/mm³ máu liên tục trong 1 năm liền, không tăng
 - Thất bại vi rút học: Tải lượng vi rút huyết tương trên 1000 bản sao/ml sau điều trị ít nhất 6 tháng

Trong nghiên cứu này thất bại điều trị được xác định bằng thất bại vi rút học tại thời điểm nghiên cứu.

Phân tích thống kê:

Dữ liệu sau khi được thu thập được kiểm tra và nhập vào máy tính thống kê và phân tích bằng phần mềm STATA 14.0.

Tỉ suất tử vong và tỉ suất xuất hiện gen kháng thuốc được tính toán bằng phân tích sống còn Kaplan – Meier. Kiểm định log-rank test được sử dụng để xác định sự khác biệt giữa các phân nhóm.

Xét nghiệm vi rút học sẽ được thực hiện trên tất cả bệnh nhân còn tham gia nghiên cứu sau 36 tháng điều trị ARV. Kết quả đánh giá là % bệnh nhân còn tham gia ở mỗi nhóm có tải lượng vi rút dưới ngưỡng phát hiện tại thời điểm sau 3 năm. Mô hình hồi quy logistic được sử dụng để xác định các yếu tố liên quan đến ức chế vi rút ở bệnh nhân tại thời điểm sau 3 năm điều trị.

2.3. Thực hiện kỹ thuật xét nghiệm trong nghiên cứu

2.3.1. Cách lấy mẫu và bảo quản mẫu xét nghiệm đo tải lượng vi rút, xét nghiệm DBS-PBS, lưu mẫu xét nghiệm gen kháng thuốc, xét nghiệm sinh hóa, huyết học

a. Chuẩn bị và thu thập mẫu xét nghiệm đo tải lượng vi rút huyết tương, DBS-PBS

- Các mẫu máu toàn phần được thu nhận từ máu tĩnh mạch tại mỗi thời điểm cho các mẫu huyết tương và DBS-PBS. Các mẫu cho việc đo tải lượng virus huyết tương (xác định là phương pháp chuẩn) được lấy máu tĩnh mạch có chống đông K2 EDTA thể tích 4ml máu toàn phần vào tube nhựa vô trùng có nắp đậy ghi các thông tin cá nhân, mã số bệnh phẩm được vận chuyển tới khoa Vi sinh bệnh viện Bạch Mai, ly tâm 2000 vòng/10phút, được tách huyết huyết tương cho vào tube nhựa có nắp đậy vô trùng và không có ADNase/ARNase, bảo quản lạnh âm sâu (-70°C) cho tới khi làm các xét nghiệm vi rút học

- Để chuẩn bị mẫu DBS-PBS, ngay sau khi được thu thập lấy khoảng 1 giọt (70 uL) trên 5 chấm của giấy Whatman 903r. Các giọt máu được để khô trên giá ở nhiệt độ phòng trong tối thiểu 4 giờ. Sau đó các mẫu DBS được chuyển đến khoa Vi sinh để thực hiện xét nghiệm đo tải lượng vi rút (thực hiện ngay hoặc được lưu đông -80°C) cho đến khi xét nghiệm, các mẫu bảo quản được đánh số, đặt trong túi loại bỏ khí chứa 2 gói chống ẩm và bảo quản đông ở -80°C .

- Mẫu huyết tương còn được bảo quản đông ở -80°C để lưu mẫu cho thực hiện xét nghiệm xác định gen kháng thuốc.

b. Xét nghiệm sinh hóa, huyết học

- Lấy máu xét nghiệm CTM, AST, ALT, đếm số lượng tế bào lympho T CD4.

2.3.2. Sinh phẩm và hoá chất, kỹ thuật thiết bị thực hiện

- Bộ sinh phẩm dùng trong kỹ thuật RT real-time PCR định lượng HIV-RNA trong huyết tương COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test v2.0 (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ) trên hệ thống máy COBAS®AmpliPrep xử lý mẫu tự động và COBAS®TaqMan 96 Analyzer để tự động khuếch đại và phát hiện (Roche).

- Giấy Whatman 903r, đệm muối phosphat không chứa calcium và magnesium (PBS) trong ống mẫu CAP/CTM S. Dịch đẩy PBS, cùng với giấy DBS, sau đó được xử lý theo quy trình COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test v2.0 (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ) trên hệ thống máy COBAS®AmpliPrep xử lý mẫu tự động và COBAS®TaqMan 96 Analyzer để tự động khuếch đại và phát hiện (Roche)

- Xét nghiệm giải trình tự gen (sequencing) xác định gen đột biến kháng thuốc bằng máy giải trình tự hệ thống ABI 3130XL

- Xét nghiệm sinh hoá thăm dò chức năng gan, huyết học: Đo nồng độ men AST, ALT, CTM, đếm tế bào lympho T CD4 trên hệ thống đếm dòng tế bào BD FACSCount (BD Biosciences - Mỹ).

2.3.3. Các bước tiến hành nội dung nghiên cứu theo sơ đồ tiến trình

- Tiến hành thu thập mẫu bệnh phẩm theo tiến trình ở đối tượng nghiên cứu tại phòng khám ngoại trú khoa Truyền nhiễm bệnh viện Bạch Mai.

- Triển khai các xét nghiệm theo quy định tại thời điểm trước khi điều trị ARV: CTM, AST, ALT, CD4, xét nghiệm đo tải lượng vi rút.

- Xét nghiệm theo dõi bệnh nhân điều trị theo định kỳ trên 2 nhóm nghiên cứu: CTM, AST, ALT, CD4,

- Đo tải lượng vi rút: mỗi 6 tháng sau khi được điều trị ARV trong vòng 36 tháng trên 305 đối tượng. 343 người bệnh còn lại được đánh giá tải lượng vi rút tại thời điểm trước điều trị, 36 tháng sau điều trị và các thời điểm nghi ngờ thất bại điều trị.

- Xét nghiệm phát hiện gen kháng thuốc kháng HIV khi có thất bại điều trị (dựa trên kết quả đo tải lượng vi rút).

- Tiến hành điều tra thông tin bệnh nhân theo biểu mẫu.

2.3.4. Các xét nghiệm

a. Các xét nghiệm về vi rút học

- Xét nghiệm đo tải lượng HIV, DBS-PBS thực hiện trên 2 nhóm nghiên cứu theo tiến trình thiết kế nghiên cứu: tại khoa Vi sinh bệnh viện Bạch Mai.

- Xét nghiệm xác định gen kháng thuốc kháng HIV: tại Phòng thí nghiệm chẩn đoán phân tử viện Vệ sinh Dịch tễ trung ương - Phòng đạt tiêu chuẩn xét nghiệm kháng thuốc của WHO.

b. Các xét nghiệm thăm dò chức năng gan, huyết học, tế bào miễn dịch: xét nghiệm AST, ALT, CTM, tế bào lympho T CD4, thực hiện tại bệnh viện Bạch Mai

- Các xét nghiệm chẩn đoán nhiễm trùng cơ hội: HBV, HCV, CMV, nuôi cấy tìm vi nấm: thực hiện tại khoa Vi sinh bệnh viện Bạch Mai.

2.3.5. Kỹ thuật được sử dụng trong nghiên cứu

2.3.5.1 Xét nghiệm Đo tải lượng HIV: phát hiện và định lượng HIV - RNA trong huyết tương, DBS-PBS bằng bộ sinh phẩm COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 trên hệ thống máy COBAS® AmpliPrep xử lý mẫu tự động và COBAS® TaqMan 48 Analyzer để tự động khuếch đại và phát hiện.

Quy trình thực hiện (Phụ lục 2, Phụ lục 3):

Nguyên lý:

Xét nghiệm COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1,v2.0 Test là xét nghiệm khuếch đại axit nucleic dùng để định lượng RNA của vi rút gây suy giảm miễn dịch tít 1 (HIV-1) trong huyết tương người.

Những nguyên tắc cơ bản của Xét nghiệm định lượng COBAS® TaqMan®

Xét nghiệm COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1,v2.0 định lượng trên khoảng động rất rộng vì lượng sản phẩm khuếch đại tăng theo số mũ trong suốt pha tăng trưởng của quá trình khuếch đại. Nồng độ HIV-1 trong mẫu cao thì cường độ huỳnh quang phát ra từ mẫu dò HIV-1 tăng vượt mức tín hiệu nền càng sớm. Trong khi đó, lượng RNA HIV-1 QS không thay đổi giữa các mẫu, nên tín hiệu huỳnh quang phát ra từ mẫu dò HIV-1 QS sẽ được phát hiện tại cùng một chu kỳ ở tất cả các mẫu. Các mẫu có tín hiệu huỳnh quang của QS bị tác động, nồng độ được điều chỉnh một cách phù hợp. Sự xuất hiện của tín hiệu huỳnh quang đặc hiệu được ghi lại dưới dạng giá trị ngưỡng (Ct). Ct được xác định là số chu kỳ khuếch đại mà cường độ huỳnh quang chất nhuộm vượt giá trị ngưỡng đã được xác định trước (Mức Huỳnh quang được chỉ định), và đường cong khuếch đại bắt đầu đi vào pha tăng số mũ. Giá trị Ct cao cho thấy nồng độ HIV-1 ban đầu thấp. Nồng độ định lượng tăng gấp đôi tương ứng giá trị Ct giảm 1 chu kỳ khuếch đại HIV-1 RNA. Tuy nhiên nếu nồng độ mẫu đo tăng 10 lần thì giá trị Ct tương ứng chỉ giảm 3,3 chu kỳ.

Lấy mẫu, vận chuyển và bảo quản mẫu

Xét nghiệm COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan HIV-1,v2.0 sử dụng các mẫu huyết tương. Dùng ống tiết trùng để đựng máu và EDTA để chống đông và trộn đều theo hướng dẫn của nhà sản xuất ống.

Bảo quản mẫu máu toàn phần ở nhiệt độ 2 - 25°C không quá 24 giờ. Tách huyết tương ra khỏi mẫu máu toàn phần trong vòng 24 giờ bằng cách ly tâm với tốc độ 800 - 1600 x g trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Chuyển huyết tương vào ống polypropylene tiết trùng. Các nghiên cứu này sử dụng Xét nghiệm COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1.

Vận chuyển máu toàn phần hoặc huyết tương phải tuân thủ các quy định của quốc gia hoặc chính quyền địa phương về vận chuyển các tác nhân có khả năng gây bệnh³⁹. Máu toàn phần phải được vận chuyển ở nhiệt độ 2-25°C và ly

tâm trong vòng 24 giờ sau khi lấy máu. Huyết tương phải được vận chuyển ở nhiệt độ 2-8°C hoặc đông lạnh ở nhiệt độ -20°C đến -80°C.

Các mẫu huyết tương có thể được bảo quản ở nhiệt độ phòng (25-30°C) trong 1 ngày; ở nhiệt độ 2-8°C trong 6 ngày. Các mẫu huyết tương ổn định trong 6 tuần nếu đông lạnh ở nhiệt độ -20°C đến -80°C. Các mẫu huyết tương nên được chia nhỏ rồi bảo quản trong các ống tiệt trùng 1100-1200 µL, trong các ống polypropylene có nắp vặn 2,0mL.

2.3.5.2 Xét nghiệm Giải trình tự xác định gen kháng thuốc

Nguyên tắc: Các phân đoạn DNA được khuếch đại trong phản ứng giải trình tự có đầu tận cùng là các dideoxynucleotide triphosphate (ddNTP) được đánh dấu huỳnh quang do đó chúng sẽ phát ra ánh sáng huỳnh quang khi đi qua hệ thống chiếu sáng bằng tia laser của máy. Các tín hiệu màu sẽ được chuyển thành tín hiệu điện và hiển thị trên màn hình vi tính. Mỗi đỉnh biểu hiện cho một nucleic acid và mỗi màu biểu hiện cho một loại nucleic acid xác định.

Quy trình thực hiện kỹ thuật (Phụ lục 4)

- Đánh giá và phân tích kết quả kháng thuốc tham khảo quy trình phân tích trình tự HIV-1 kháng thuốc bằng phần mềm DNASTAR.

Bảng 2.1 Danh sách các đột biến đề kháng thuốc ARV trong 3 nhóm NRTI, NNRTI và PI

Nhóm thuốc	Vị trí	Các đột biến quan tâm
NRTI	Đoạn gen mã hoá RT	M41L, A62V, K65R, D67N, K70R, L74V, V75I, F77L, Y115F, F116Y, Q151M, M184V, L210W, T215F/Y, K219E/Q
NNRTI	Đoạn gen mã hoá RT	V90I, A98G, L100I, K101P/E/H, K103N, V106M/I/A, V108I, E138A/G/K, V179D/F/T, Y181C/I/V, Y188L/C/H, G190S/A, P225H, M230L
PI (các đột biến chính)	Đoạn gen mã hoá Protease	D30N, V32I, L33F, M46I/L, I47V/A, G48V, I50L/V, Q58E, T74P, L76V, V82L/T/A/F/S, N83D, I84V, N88S, L90M

Nguồn: Hướng dẫn của Hiệp hội AIDS Quốc tế - Hoa Kỳ 2010

Đánh giá đề kháng một thuốc ARV bằng cách cộng điểm đề kháng của tất cả các đột biến liên quan đến đề kháng thuốc đó. Điểm đề kháng với một thuốc ARV của mỗi đột biến được xác định qua chương trình MARVEL (Mutation ARV Evidence Listing), dựa trên các cơ sở dữ liệu về liên quan của đột biến với kháng thuốc. Hình 2.1 minh họa cách tính điểm đột biến với MARVEL. Tổng điểm được quy ra mức độ kháng thuốc theo bảng 2.2.

Mutation Scoring								
PR	ATV/r	DRV/r	FPV/r	IDV/r	LPV/r	NFV	SQV/r	TPV/r
I54V	15	0	10	15	10	15	15	15
V82A	15	0	10	30	25	30	10	0
L90M	20	0	20	20	10	60	40	0
L10I	0	0	0	0	0	5	0	0
A71V	0	0	0	0	0	5	0	0
I54V+V82A+L90M	-	-	-	10	10	-	-	-
I54V+V82A	5	-	5	-	-	-	5	-
I54V+L10I+V82A	5	-	5	5	5	-	5	-
L90M+A71V	5	-	-	-	-	-	5	-
I54V+V82A+A71V	5	-	5	-	-	-	5	-
L10I+L90M	5	-	-	-	-	-	5	-
Total:	75	0	55	80	60	115	90	15

Hình 2.1. Minh họa tính điểm đột biến kháng thuốc nhóm PI bằng chương trình MARVEL (hình chụp từ màn hình máy tính)

Nguồn: HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm [29]

Drug Resistance Interpretation: RT			
NRTI Resistance Mutations:		M184V, T215Y	
NNRTI Resistance Mutations:		V108I, Y181C	
Other Mutations:		None	
Nucleoside RTI		Non-Nucleoside RTI	
lamivudine (3TC)	High-level resistance	delavirdine (DLV)	High-level resistance
abacavir (ABC)	Intermediate resistance	efavirenz (EFV)	Intermediate resistance
zidovudine (AZT)	Low-level resistance	etravirine (ETR)	Intermediate resistance
stavudine (D4T)	Low-level resistance	nevirapine (NVP)	High-level resistance
didanosine (DDI)	Low-level resistance		
emtricitabine (FTC)	High-level resistance		
tenofovir (TDF)	Susceptible		

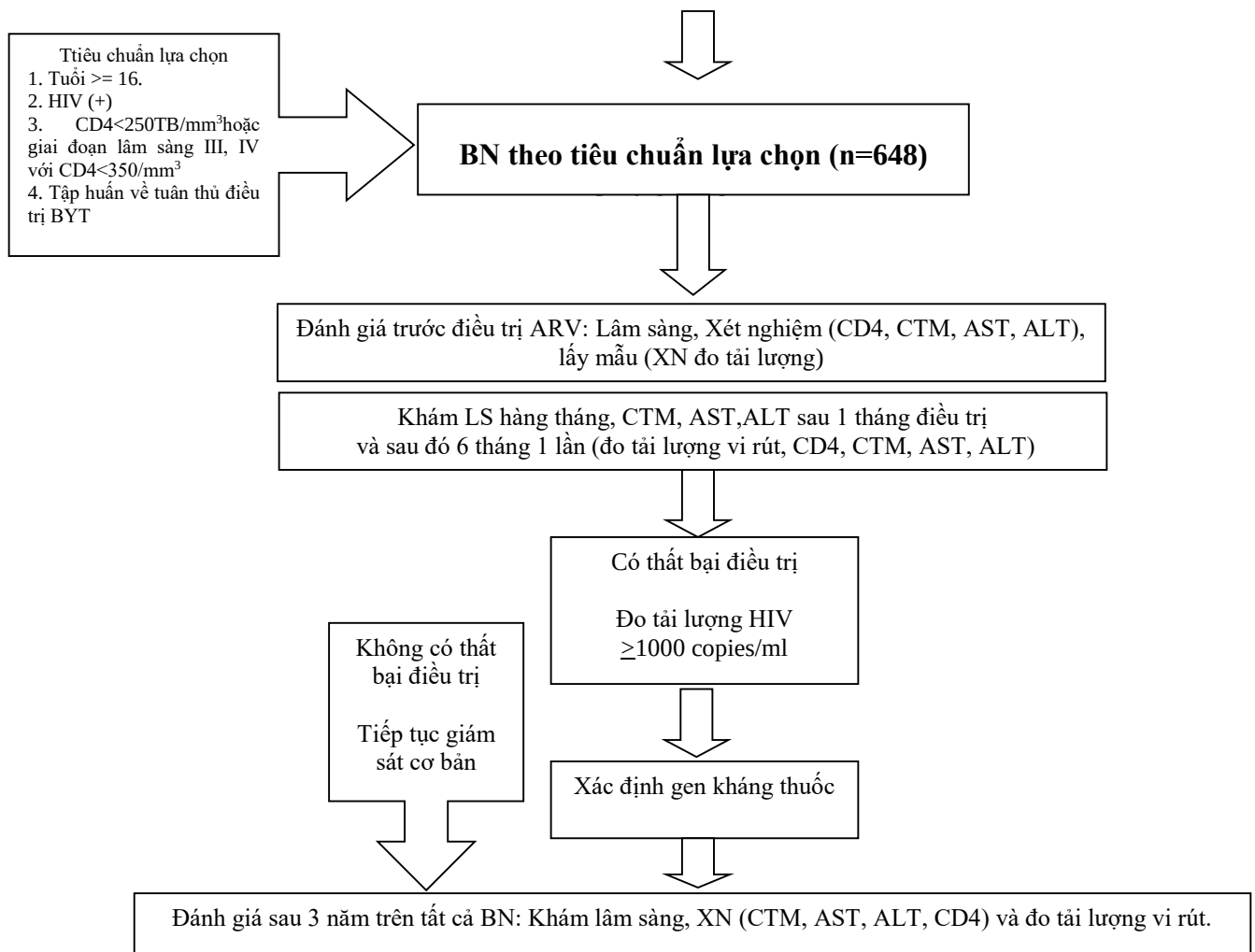
Hình 2.2. Minh họa phiên giải kết quả đánh giá kháng thuốc nhóm NRTI và NNRTI bằng chương trình HIVdb (hình chụp từ màn hình máy tính)

Nguồn: HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm [29]

2.4. Y Đức

Trước khi tiến hành nghiên cứu, Y đức của nghiên cứu được thông qua BIDMC tại Boston và Hội đồng khoa học và Y đức của bệnh viện Bạch mai, Hội đồng Đạo đức Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương.

Sơ đồ tiến trình nghiên cứu



Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Đặc điểm bệnh nhân tại thời điểm được chọn vào nghiên cứu

3.1.1 Đặc điểm về tuổi, giới và tình trạng hôn nhân của bệnh nhân

Bảng 3.1. Đặc điểm nhân khẩu học

Đặc điểm nhân khẩu học	Số lượng (N=648)	Tỉ lệ %
Giới tính		
Nam	408	63,0
Nữ	240	37,0
Nhóm tuổi		
18 - 30 tuổi	195	30,1
31 - 40 tuổi	321	49,5
41 - 50 tuổi	86	13,3
> 50 tuổi	46	7,1
Tuổi trung bình	35,1 ± 8,7	
Tình trạng hôn nhân		
Độc thân	92	14,2
Đã kết hôn	472	72,8
Ly thân/Ly dị	25	3,9
Góa	51	7,9
Không có thông tin	8	1,2

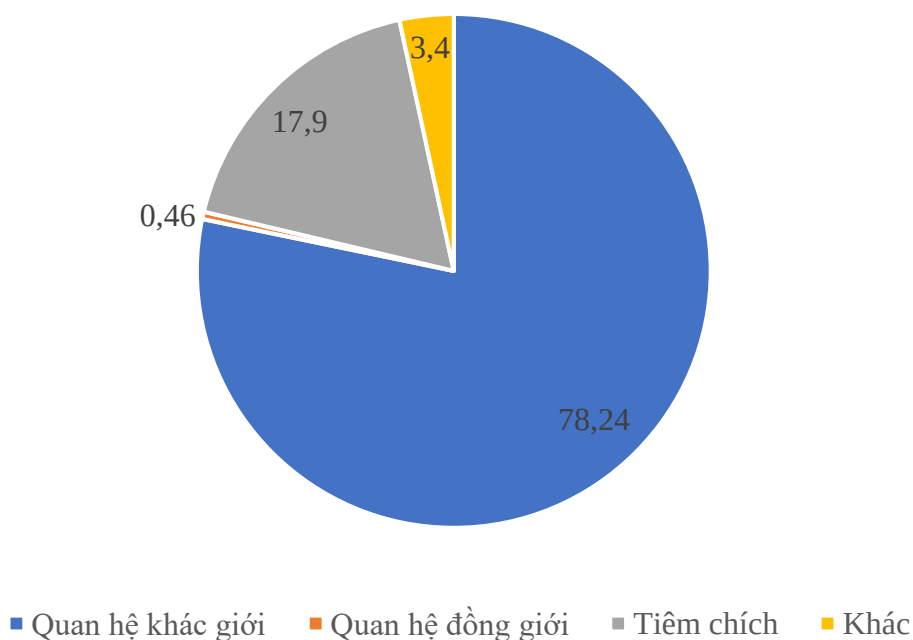
Tổng số bệnh nhân tham gia nghiên cứu là 648 bệnh nhân, nam giới chiếm phần lớn đối tượng nghiên cứu với 63%. Tuổi trung bình tại thời điểm trước khi bắt đầu điều trị ARV phác đồ bậc 1 của người bệnh là 35,1 ± 8,7 tuổi. Trong đó, nhóm tuổi từ 31 - 40 tuổi chiếm tỉ lệ cao nhất với 49,5%, tiếp đến là 18 - 30 tuổi là 30,1%, 41 - 50 tuổi (13,3%) và nhóm trên 50 tuổi chiếm 7,1%. Phần lớn đối tượng đều đã kết hôn với tỉ lệ 72,8% và có 14,2% sống độc thân.

Bảng 3.2. Đặc điểm về nghề nghiệp và trình độ học vấn

Đặc điểm thu nhập và việc làm	Số lượng (N=648)	Tỉ lệ %
Trình độ học vấn		
Tiểu học/Dưới tiểu học	42	6,6
Trung học cơ sở	209	32,7
Trung học phổ thông	272	42,5
Trên THPT	117	18,3
Tình trạng việc làm		
Thất nghiệp	81	12,7
Nông dân	101	15,8
Kinh doanh/Buôn bán	152	23,8
Công nhân	77	12,0
Công chức/Văn phòng	69	10,8
Khác	160	25,0

Tỉ lệ người bệnh học hết bậc THPT là 60,8%, trong đó có 18,3% hoàn thành bậc học Cao đẳng hoặc Đại học. Phần lớn đối tượng đều có việc làm với tỉ lệ thất nghiệp hoặc đang đi học chỉ chiếm 12,7%.

3.1.2 Đặc điểm về đường lây truyền nhiễm HIV

**Biểu đồ 3.1. Đặc điểm về đường lây truyền HIV**

Lây truyền HIV qua quan hệ tình dục chiếm phần lớn đối tượng nghiên cứu với tỉ 78,24%. Tỉ lệ đối tượng lây truyền qua tiêm chích ma túy chỉ chiếm 17,9%. Có 0,46% người bệnh lây truyền qua đường quan hệ đồng tính và 3,4% không xác định nguồn lây hoặc lây truyền kép TCMT và QHTD.

3.1.3. Đặc điểm lâm sàng, xét nghiệm về huyết học, hoá sinh, nhiễm trùng cơ hội và điều trị của bệnh nhân tại thời điểm trước khi bắt đầu điều trị ARV phác đồ bậc 1

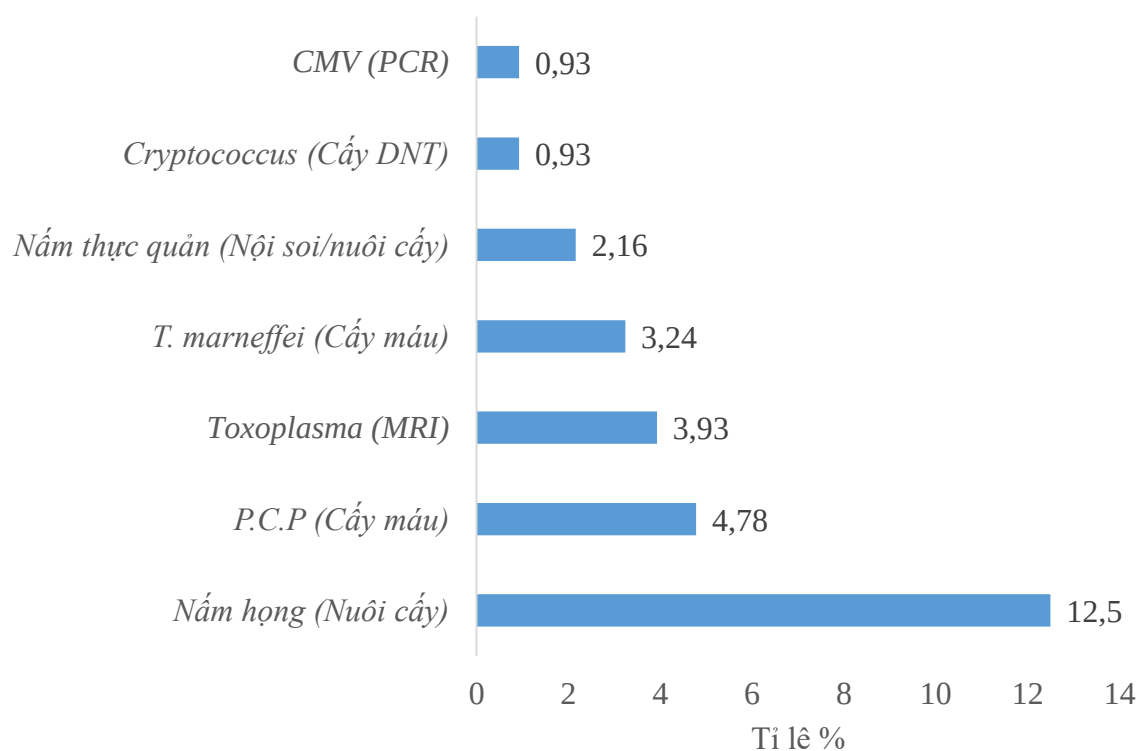
Bảng 3.3. Đặc điểm lâm sàng tại thời điểm trước khi bắt đầu điều trị ARV phác đồ bậc 1

Đặc điểm lâm sàng	Số lượng (N=648)	Tỉ lệ %
Giai đoạn lâm sàng		
Giai đoạn 1	300	46,3
Giai đoạn 2	48	7,4
Giai đoạn 3	70	10,8
Giai đoạn 4	230	35,5
Chỉ số BMI		
Thiếu cân	397	61,3
Bình thường	222	34,3
Thừa cân	29	4,5
BMI trung bình	19.7	2,7
Chức năng vận động		
Bình thường	461	71,1
Đi lại, làm việc nhẹ	174	26,9
Nằm một chỗ	13	2,0

Tại thời điểm trước khi bắt đầu điều trị thuốc ARV bậc 1, quan sát ở bảng 3.3 nhận thấy tỉ lệ người bệnh ở giai đoạn lâm sàng 4 là 35,5% và giai

đoạn lâm sàng 3 là 10,8%. Trung bình chỉ số khối cơ thể BMI là 19,7 với tỉ lệ bệnh nhân thiếu cân lên tới 61,3%. Phần lớn đối tượng đều có chức năng vận động bình thường với tỉ lệ 71,1%.

- Đặc điểm xét nghiệm nhiễm trùng cơ hội của bệnh nhân tại thời điểm trước khi bắt đầu điều trị ARV phác đồ bậc 1



Biểu đồ 3.2. Các nhiễm trùng cơ hội thường gặp của bệnh nhân tại thời điểm trước khi bắt đầu điều trị ARV phác đồ bậc 1`

Các nhiễm trùng cơ hội gặp phải trong nhóm bệnh nhân tham gia nghiên cứu bao gồm Nấm họng (12,5%), viêm phổi P.C.P (*Pneumocystis jiroveci*) (4,78%), Toxoplasma (3,93%) và nấm *T. marneffeii* (3,24%).

Bảng 3.4. Một số đặc điểm về điều trị HIV của bệnh nhân

Đặc điểm điều trị HIV	Số lượng (N=648)	Tỉ lệ %
Thời gian từ khi có XN HIV(+) đến khi điều trị ARV		
<1 tháng	247	38,1
1 - <12 tháng	236	36,4
12 - <36 tháng	82	12,7
≥ 36 tháng	82	12,7
Phác đồ ARV ban đầu		
AZT/3TC/NVP	186	28,7
AZT/3TC/ EFV	81	12,5
TDF/3TC/EFV	357	55,1
Khác	23	3,5
Điều trị Cotrimoxazole	550	84,9
Điều trị Lao	93	14,4

Có 74,5% người bệnh được điều trị ARV trong vòng 1 năm sau khi phát hiện có xét nghiệm khẳng định HIV (+), trong đó có 38,1% được điều trị trong vòng 1 tháng. Phác đồ ARV ban đầu phổ biến nhất là TDF/3TC/EFV với tỉ lệ sử dụng là 55,1%, tiếp đến là AZT/3TC/NVP (28,7%) và tỉ lệ bệnh nhân được điều trị dự phòng Cotrimoxazole là 84,9% và điều trị lao đồng thời tại thời điểm ban đầu là 14,4%.

Bảng 3.5. Đặc điểm về xét nghiệm CD4 và xét nghiệm TLVR

Đặc điểm TB CD4 và TLVR	Số lượng (N=648)	Tỉ lệ %
Số lượng TB CD4/mm ³		
<100	301	46,5
100 - <200	96	14,8
200 - <350	186	28,7
350 - <500	52	8,0
≥500	13	2,0
CD4 trung bình	162,8 ± 148,6	
Tải lượng vi rút (bản sao/mL)		
<20	11	1,7
20 - <1000	16	2,5
1000 - <5000	27	4,2
5000 - <10000	22	3,4
10000	572	88,3
TLVR trung bình	363,951 ± 843,627	

Tỉ lệ bệnh nhân có HIV ở giai đoạn tiến triển tại thời điểm trước khi bắt đầu điều trị ARV phác đồ bậc 1 lên tới 61,3%, trong đó có 46,5% có CD4 dưới mức 100 TB/mm³. Trung bình số lượng tế bào CD4 là $162,8 \pm 148,6$ TB/mm³. Trung bình tải lượng vi rút lên tới $363,951 \pm 843,627$ bản sao/ml. Tỉ lệ bệnh nhân có vi rút ở dưới ngưỡng phát hiện chỉ là 1,7%, trong khi đó, tỉ lệ có tải lượng vi rút HIV ≥ 10.000 bản sao/ml chiếm tới 88,3%.

Bảng 3.6. Một số đặc điểm về tiền sử nghiện chất (thuốc lá, rượu/bia) của bệnh nhân

Đặc điểm nghiện chất	Số lượng (N=648)	Tỉ lệ %
Tần suất hút thuốc lá		
Không bao giờ	408	63,0
1 điếu/ngày	7	1,1
2-10 điếu/ngày	136	21,0
11-20 điếu/ngày	60	9,3
>20 điếu/ngày	29	4,5
Tần suất uống rượu/bia		
Không bao giờ	512	79,0
1-3 lần/tháng	62	9,6
1-2 lần/tuần	24	3,7
3-4 lần/tuần	21	3,2
Ít nhất 5 lần/tuần	21	3,2

Tỉ lệ người bệnh có hút thuốc lá hàng ngày là 37,0%, trong đó có 4,5% nghiện thuốc lá nặng với tần suất hút trên 20 điếu/ngày. Tỉ lệ lạm dụng rượu/bia ít hơn với 21% có tần suất uống bia trên 3 lần/1 tháng. Có 3,2% người bệnh uống rượu với tần suất hàng ngày.

Bảng 3.7. Đặc điểm xét nghiệm máu của bệnh nhân

Đặc điểm công thức máu	Số lượng (N=648)	Tỉ lệ %
Hemoglobin (g/L)		
Bình thường	463	71,5
Thiếu máu*	185	28,5
WBC (G/L)		
≤10	606	93,5
>10	42	6,5
PLT (G/L)		
≥100	603	93,1
<100	45	6,9

Tỉ lệ người bệnh có thiếu máu dựa trên kết quả Hemoglobin là 28,5%. Có 6,5% có bạch cầu ở mức >10 G/L và 6,9% có tiểu cầu ở mức dưới 100 G/L tại thời điểm đánh giá ban đầu.

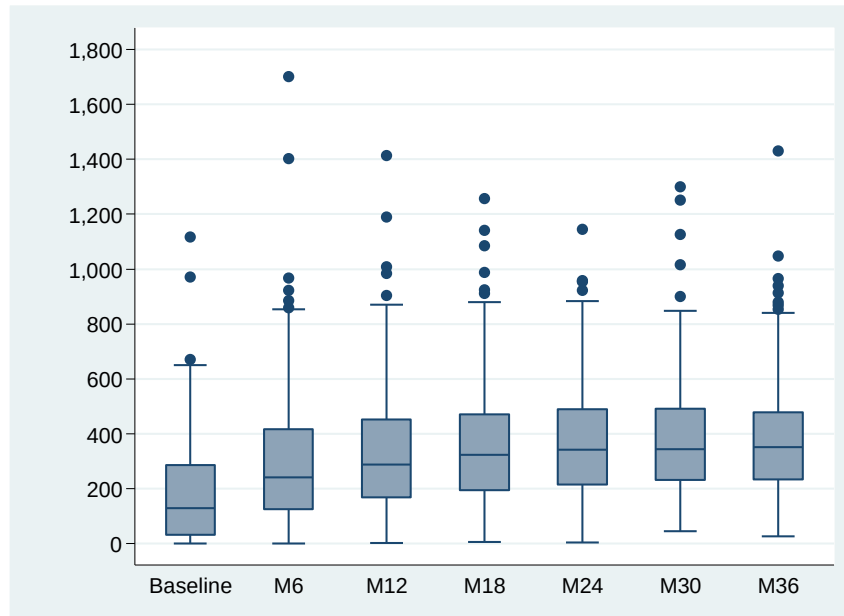
Bảng 3.8. Đặc điểm một số xét nghiệm huyết thanh học viêm gan, men gan

Đặc điểm chức năng gan	Số lượng (N=648)	Tỉ lệ %
HBsAg (+)	85	13,1
Anti-HCV (+)	238	36,7
AST (U/L)		
≤80	564	87,0
>80	84	13,0
ALT (U/L)		
≤80	580	89,5
>80	68	10,5

Tỉ lệ bệnh nhân có anti - HCV là 36,7%, trong khi đó, tỉ lệ có HBsAg thấp hơn với 13,1%. Có 13% đối tượng có tăng men gan AST trên 2 lần và 10,5% có tăng men gan ALT trên 2 lần.

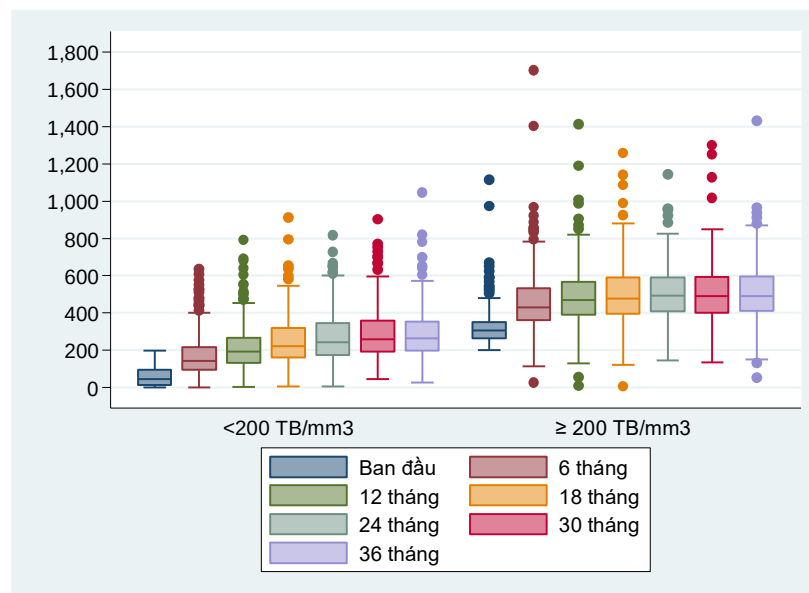
3.2. Kết quả theo dõi điều trị của bệnh nhân

3.2.1. Xét nghiệm đếm tế bào lympho T-CD4, đo tải lượng HIV



Biểu đồ 3.3. Tiến triển về trung vị số lượng tế bào CD4

Tại thời điểm ban đầu, trung vị số lượng TB CD4 là 130 TB/mm³ (IQR=33 – 287). Sau 6 tháng, trung vị TB CD4 đã tăng lên 242 (IQR=125 – 417). Sau 36 tháng điều trị, trung vị CD4 là 352 (IQR=235 – 478).



Biểu đồ 3.4. Tiến triển trung vị số lượng TB CD4 theo nhóm HIV tiến triển

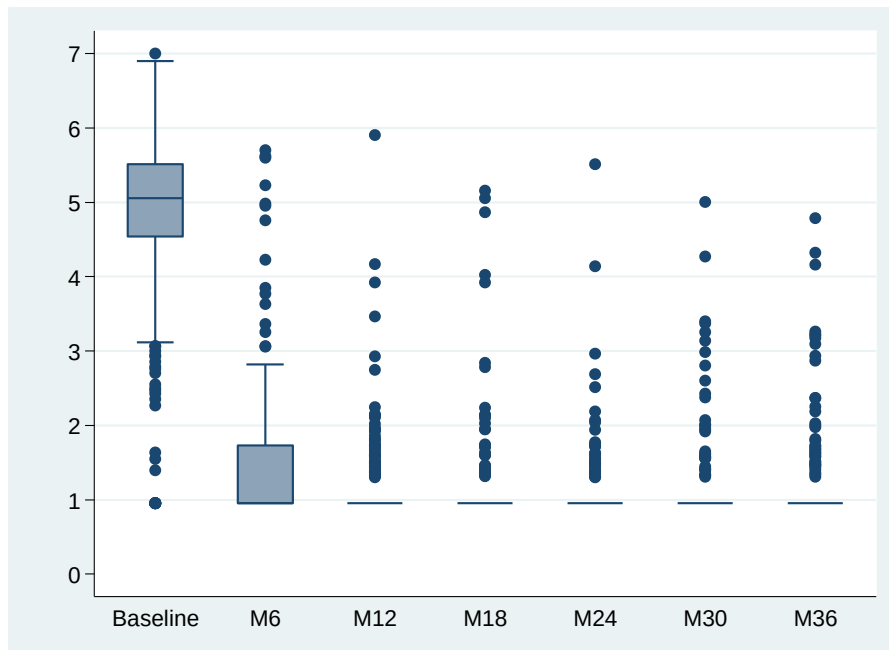
Tại thời điểm ban đầu, trung vị số lượng TB CD4 ở nhóm HIV tiến triển là 45 TB/mm³ (IQR = 14 – 96), và ở nhóm CD4 $\geq$ 200 TB/mm³ là 305 TB/mm³ (IQR = 261 – 350). Sau 36 tháng điều trị, trung vị CD4 ở nhóm HIV tiến triển đã tăng lên 265 TB/mm³ (IQR = 197 – 254) và ở nhóm CD4 $\geq$ 200 TB/mm³ đã tăng lên 490 TB/mm³ (IQR = 411 – 596). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở tất cả các thời điểm đánh giá ($p < 0,001$).

Bảng 3.9. Tỷ lệ phân bố bệnh nhân có CD4 < 200 TB/mm³ tại các thời điểm

CD4 < 200 TB/mm ³	Tổng (N=648)		
	N	Số lượng	Tỷ lệ %
Ban đầu	648	397	61,3
6 tháng	592	251	42,4
12 tháng	571	184	32,2
18 tháng	551	141	25,6
24 tháng	538	111	20,6
30 tháng	529	93	17,6
36 tháng	515	75	14,6

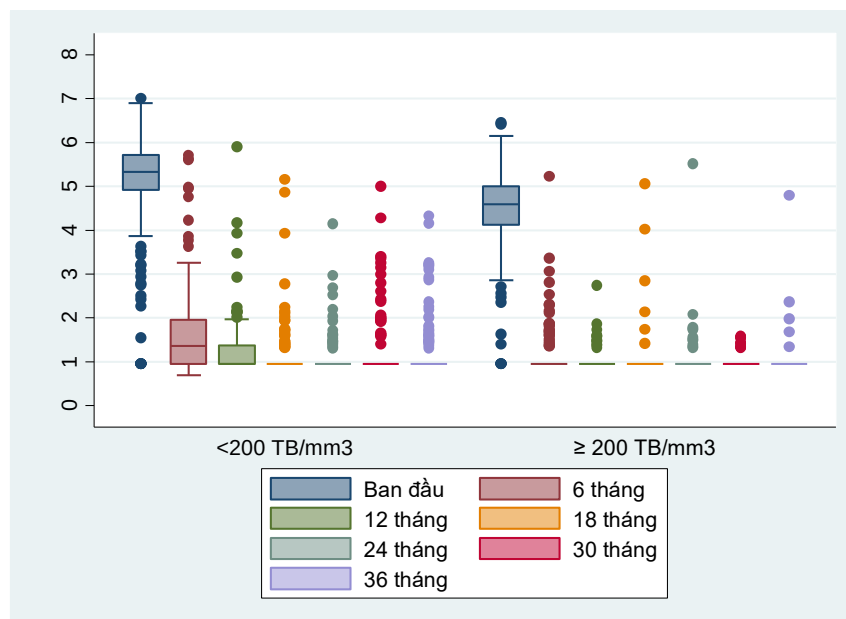
Tại thời điểm ban đầu, tỷ lệ người bệnh nhiễm HIV ~~tiến triển~~ xét nghiệm có số lượng tế bào TCD4 dưới 200 tế bào/mm³ là 61,3%. Sau 6 tháng điều trị, tỷ lệ này đã giảm xuống 42,4%, sau 12 tháng là 32,2%, sau 18 tháng là 25,6%, sau 24 tháng là 20,6% và 30 tháng là 17,6%. Tại thời điểm 36 tháng, tỷ lệ người bệnh có CD4 dưới 200 TB/mm³ là 14,6%. $\geq$

3.2.2. Xét nghiệm tải lượng vi rút



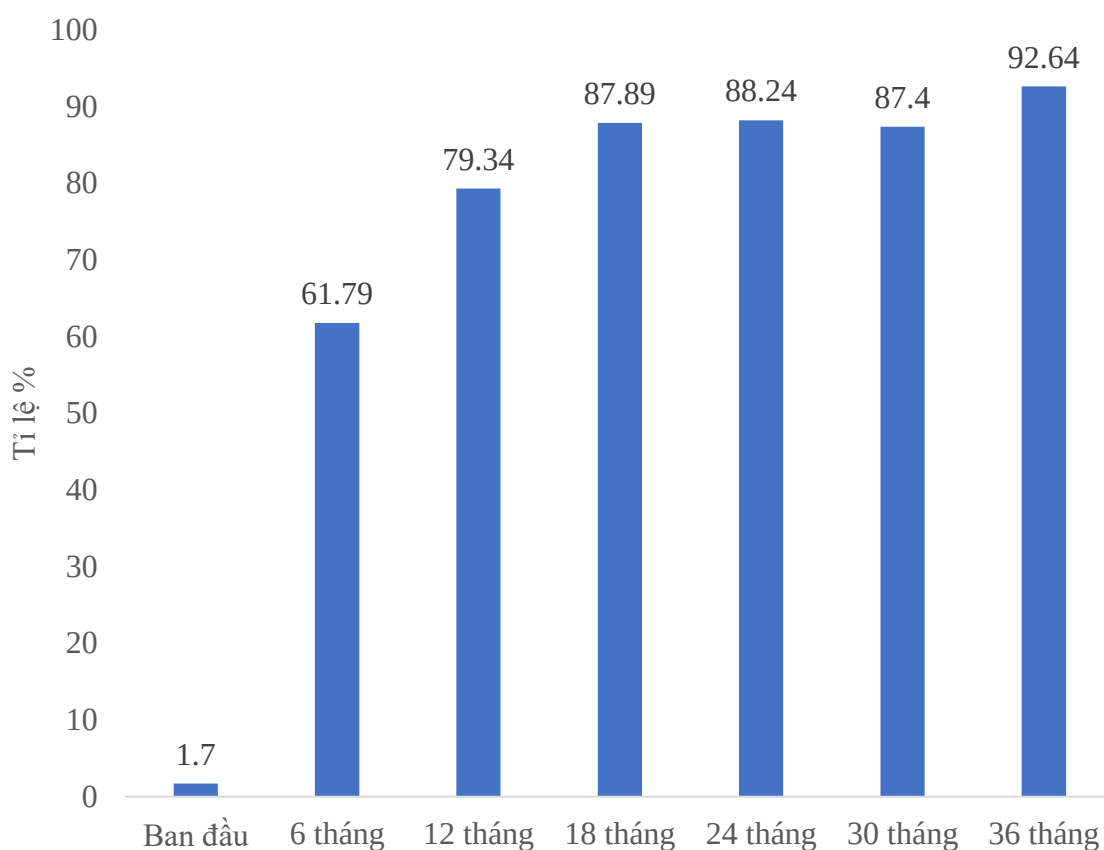
Biểu đồ 3.5. Tiến triển về trung vị tải lượng vi rút

Trước điều trị, trung vị $\log_{10}$ TLVR ở đối tượng nghiên cứu là 5,05 (IQR=4,54 – 5,51). Sau 6 tháng điều trị, trung vị TLVR đã giảm đáng kể xuống 0,95 (tương đương dưới ngưỡng phát hiện <20 bản sao/ml) và tiếp tục duy trì ở các tháng tiếp theo.



Biểu đồ 3.6. Tiến triển trung vị TLVR theo nhóm HIV tiến triển

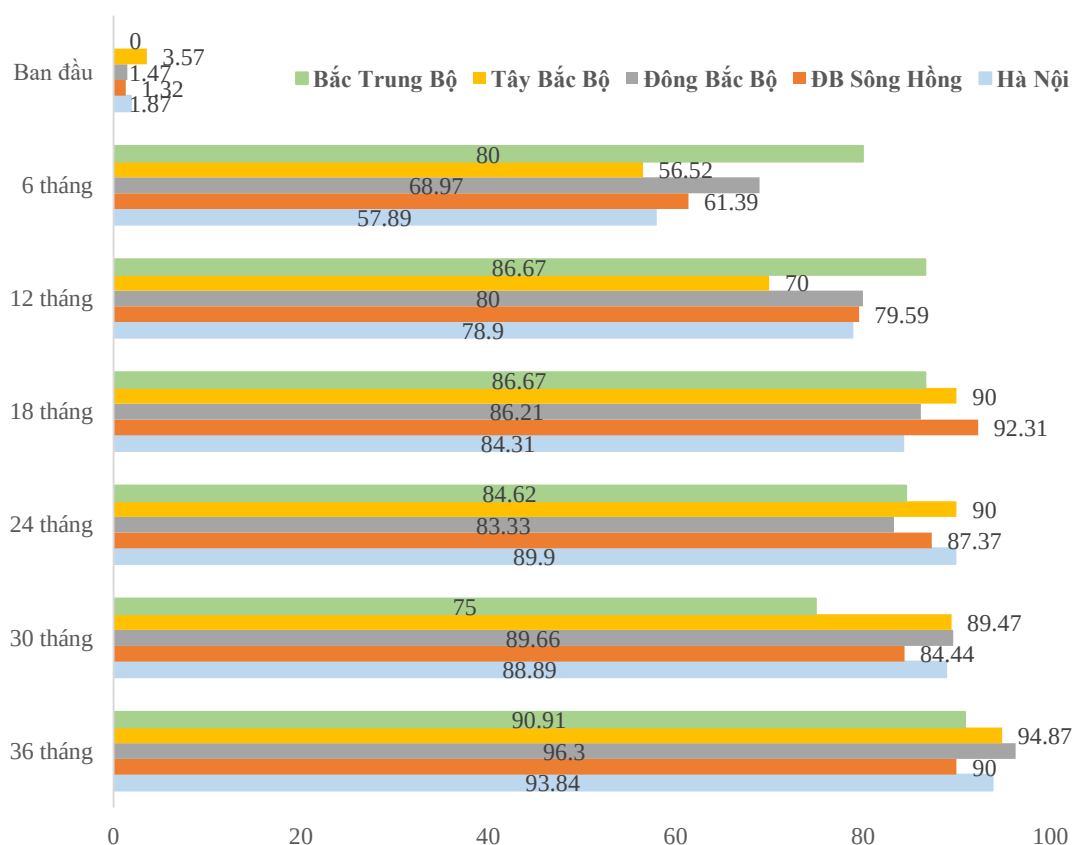
Tại thời điểm trước điều trị, trung vị log₁₀ TLVR ở nhóm HIV tiến triển là 5,33 bản sao/mL (IQR = 4,92 – 5,72) và ở nhóm CD4 $\geq$ 200 TB/mm³ là 4,69 bản sao/mL (IQR = 4,12 – 5,00). Sau 36 tháng điều trị, trung vị log₁₀ TLVR ở cả 2 nhóm đã giảm xuống 0,95 (tương đương dưới ngưỡng phát hiện <20 bản sao/ml). Sự khác biệt không ý nghĩa thống kê tại các thời điểm 12 – 36 tháng sau điều trị.



Biểu đồ 3.7. Tỉ lệ bệnh nhân có TLVR < 20 bản sao/ml tại các thời điểm

Tỉ lệ người bệnh có TLVR dưới ngưỡng phát hiện (<20 bản sao/ml) tại thời điểm trước khi bắt đầu điều trị ARV phác đồ bậc 1 là 1,7%. Tỉ lệ này tăng lên đáng kể tại các thời điểm sau đó, với 61,79% sau 6 tháng và 79,34 % sau 12 tháng. Tại các thời điểm 18, 24 và 36 tháng, tỉ lệ ghi nhận được lần

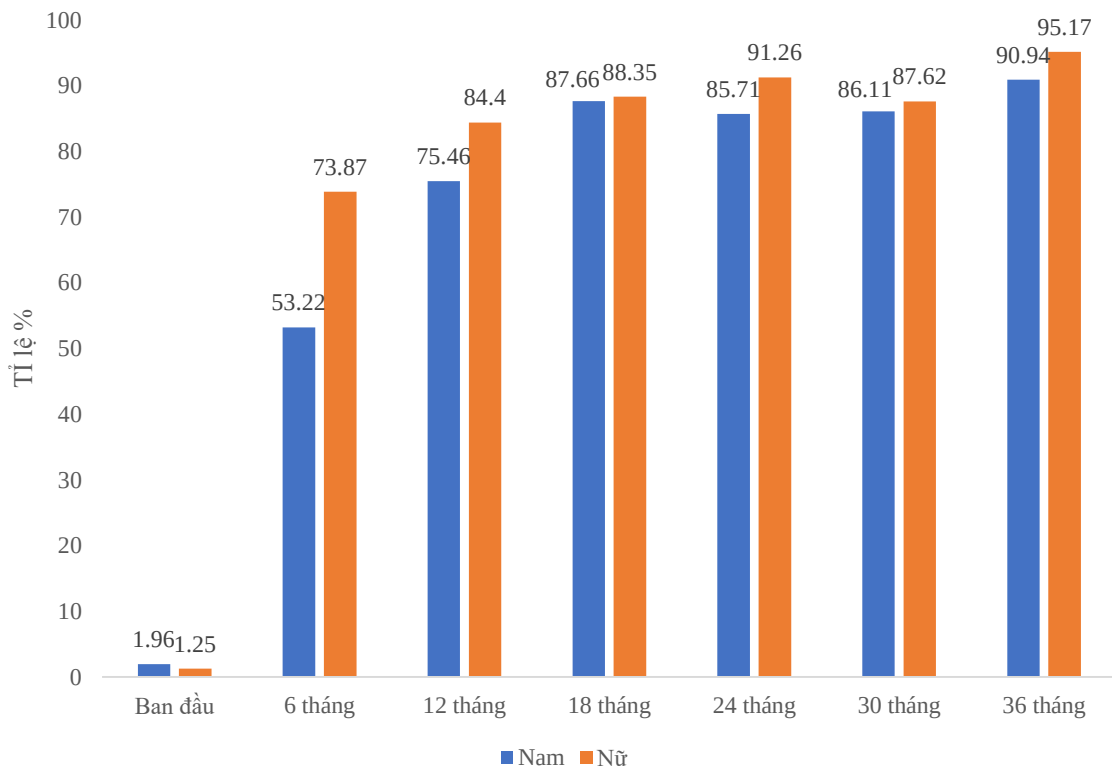
lượt là 87,89%, 88,24% và 92,64%. Kiểm định Mc-Nemar cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa thời điểm ban đầu và các thời điểm đánh giá sau đó.



Biểu đồ 3.8. Tỷ lệ bệnh nhân có TLVR < 20 bản sao/ml tại các thời điểm theo vùng địa lý

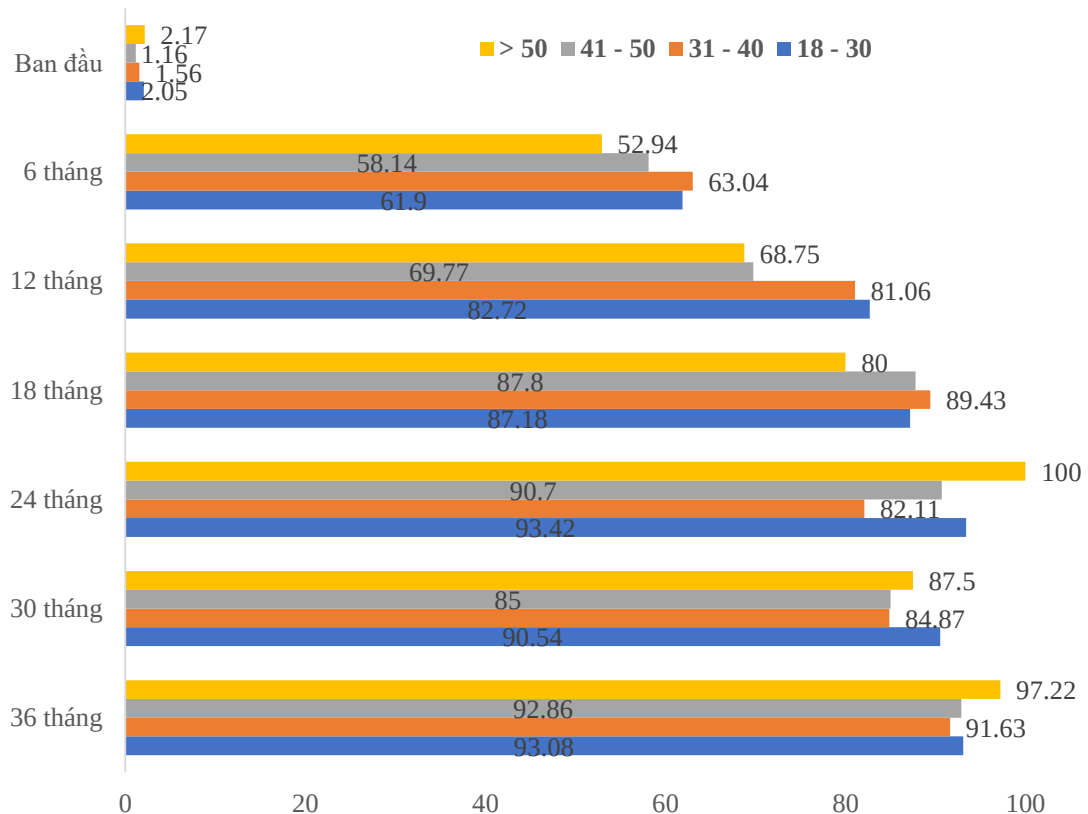
Không có sự khác biệt đáng kể về đáp ứng tải lượng vi rút ở người bệnh theo vùng địa lý sinh sống tại các bệnh nhân điều trị ARV phác đồ bậc 1 tại Bệnh viện Bạch Mai. Tại thời điểm 6 tháng, tỉ lệ người bệnh có TLVR < 20 bản sao/ml cao nhất ở vùng Bắc Trung Bộ với tỉ lệ 80% và thấp nhất ở Tây Bắc Bộ với 56,52%, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p=0,45$). Tại thời điểm kết thúc nghiên cứu (36 tháng sau điều trị), tỉ lệ người bệnh có TLVR ở dưới ngưỡng phát hiện tại Hà Nội là 93,84%, các tỉnh Đồng

bằng Sông Hồng khác là 90%, Đông Bắc Bộ là 96,3%, Tây Bắc Bộ là 94,87% và tại các tỉnh Bắc Trung Bộ là 90,91% ($p=0,43$).



Biểu đồ 3.9. Tỷ lệ bệnh nhân có TLVR < 20 bản sao/ml tại các thời điểm theo giới tính

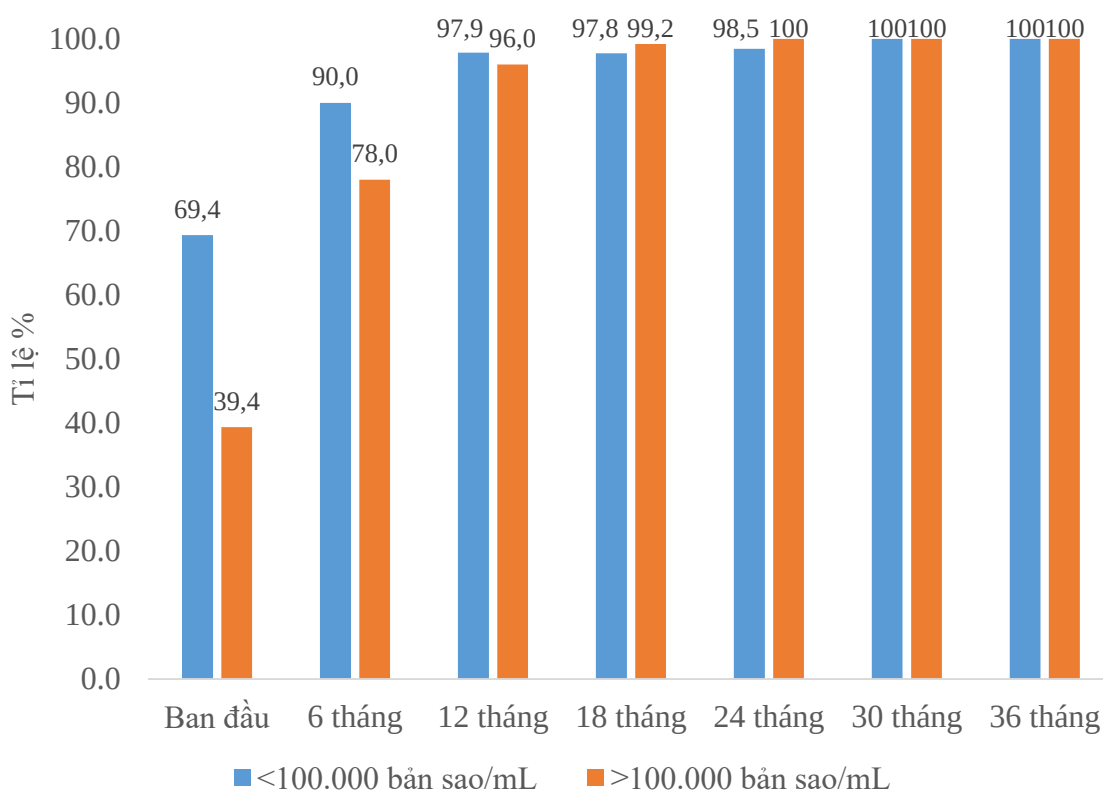
Nữ giới có tỉ lệ đáp ứng điều trị về vi rút cao hơn nam giới tại tất cả các thời điểm đánh giá. Tại thời điểm 6 tháng, tỉ lệ người bệnh có TLVR < 20 bản sao/ml ở nữ giới là 73,87%, cao hơn đáng kể so với nam giới với 53,22% ($p=0,001$). Tại thời điểm kết thúc nghiên cứu (36 tháng sau điều trị), tỉ lệ có TLVR ở dưới ngưỡng phát hiện ở nữ giới là 95,17% và ở nam giới 90,94%, tuy nhiên sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p=0,07$).



Biểu đồ 3.10. Tỷ lệ bệnh nhân có TLVR < 20 bản sao/ml tại các thời điểm theo nhóm tuổi

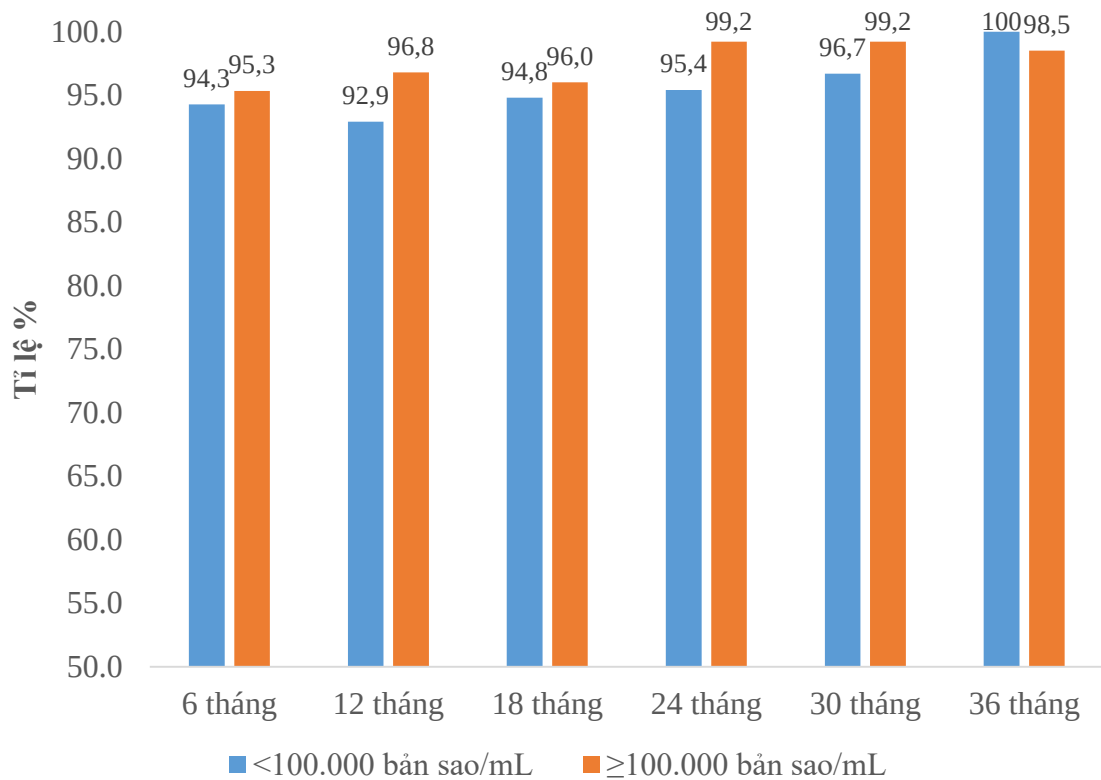
Tại thời điểm 6 tháng sau điều trị, nhóm tuổi có tỷ lệ đáp ứng tốt nhất về TLVR là nhóm tuổi từ 31 – 40 với 63,04%, nhóm tuổi có tỷ lệ TLVR < 20 bản sao/ml thấp nhất là nhóm trên 50 tuổi với chỉ 52,94%. Tuy nhiên, sự khác biệt giữa các nhóm tuổi tại thời điểm 6 tháng không có ý nghĩa thống kê với $p=0,83$. Sau 3 năm điều trị, tất cả các nhóm tuổi đều có tỷ lệ TLVR ở dưới ngưỡng phát hiện đạt trên 90%, cao nhất ở nhóm tuổi trên 50 với 97,22% và thấp nhất ở nhóm 31 – 40 với 91,63% ($p=0,68$).

3.2.3. Tiến triển giai đoạn lâm sàng và tuân thủ điều trị của bệnh nhân



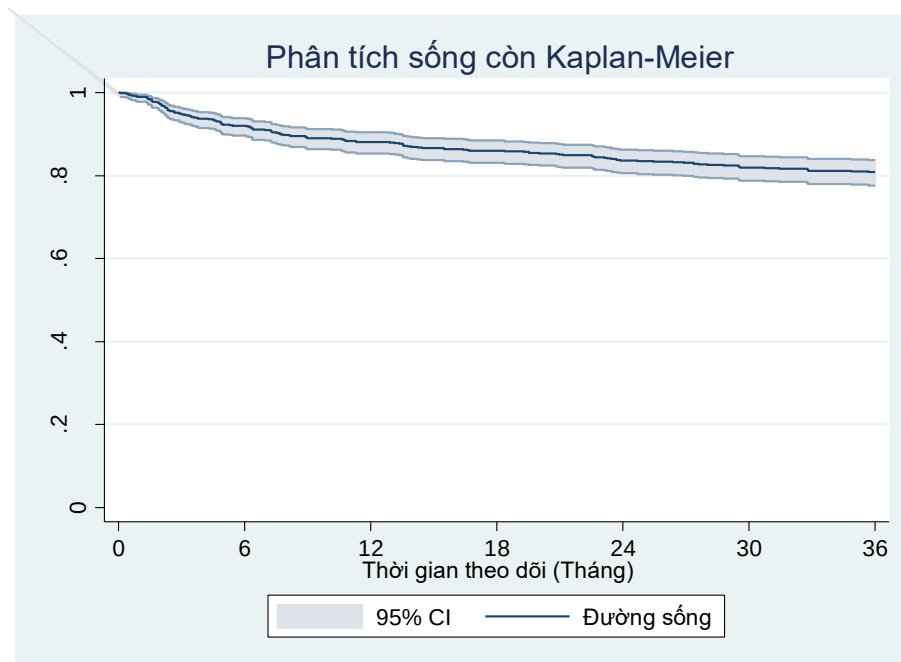
Biểu đồ 3.11. Tiến triển về giai đoạn lâm sàng 1 & 2 tại các thời điểm

Tại thời điểm trước khi bắt đầu điều trị ARV phác đồ bậc 1 và 6 tháng, tỉ lệ người bệnh ở giai đoạn lâm sàng 1 & 2 thấp hơn đáng kể ở nhóm có TLVR ≥ 100.000 bản sao/ml. Tuy nhiên, tại các thời điểm sau đó, tỉ lệ người bệnh có giai đoạn lâm sàng 1 và 2 không có sự khác biệt. Tại thời điểm 36 tháng, 100% người bệnh trong nghiên cứu có giai đoạn lâm sàng 1 hoặc 2.



Biểu đồ 3.12. Tỷ lệ tuân thủ tốt chế độ điều trị tại các thời điểm

Tỷ lệ tuân thủ điều trị tốt không có sự khác biệt giữa nhóm người bệnh có TLVR < 100.000 bản sao/ml và trên 100.000 bản sao/ml. Tại các thời điểm đánh giá, phần lớn người bệnh đều có mức độ tuân thủ điều trị tốt, với tỷ lệ đều $\geq 95\%$.

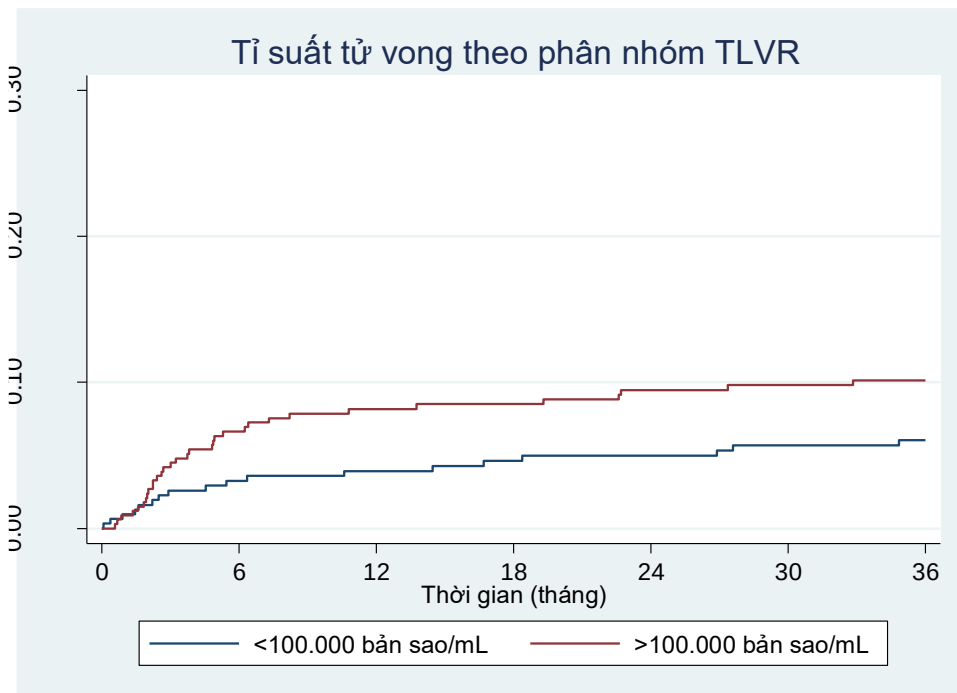


Biểu đồ 3.13. Tỷ suất duy trì điều trị của bệnh nhân theo thời gian

Bảng 3.10. Tỷ lệ duy trì điều trị cộng dồn tại từng thời điểm

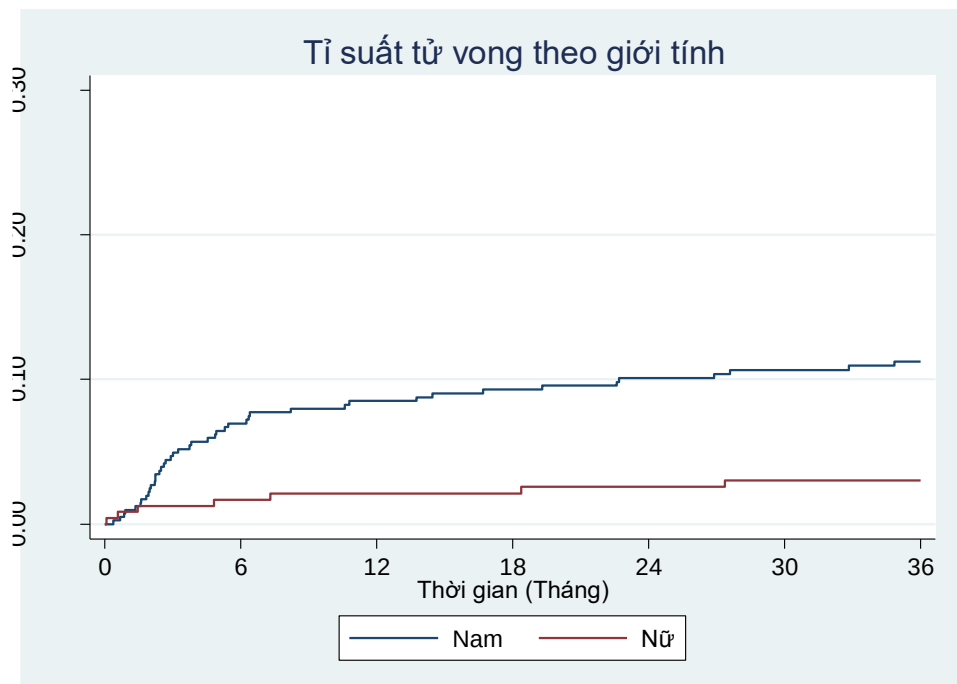
Thời điểm đánh giá	Số ca tử vong/mất dấu/chuyển đi (cộng dồn)	Số ca duy trì điều trị	Tỷ lệ % cộng dồn
6 tháng	52	596	92,0
12 tháng	77	571	88,1
18 tháng	91	557	86,0
24 tháng	106	542	83,6
30 tháng	117	531	81,9
36 tháng	133	515	79,5

Tỷ lệ duy trì điều trị sau 6 tháng điều trị là 92,0%, sau 12 tháng là 88,1%, 18 tháng là 86,0%, 24 tháng là 83,6%, 30 tháng là 81,9% và sau 36 tháng là 79,5%.



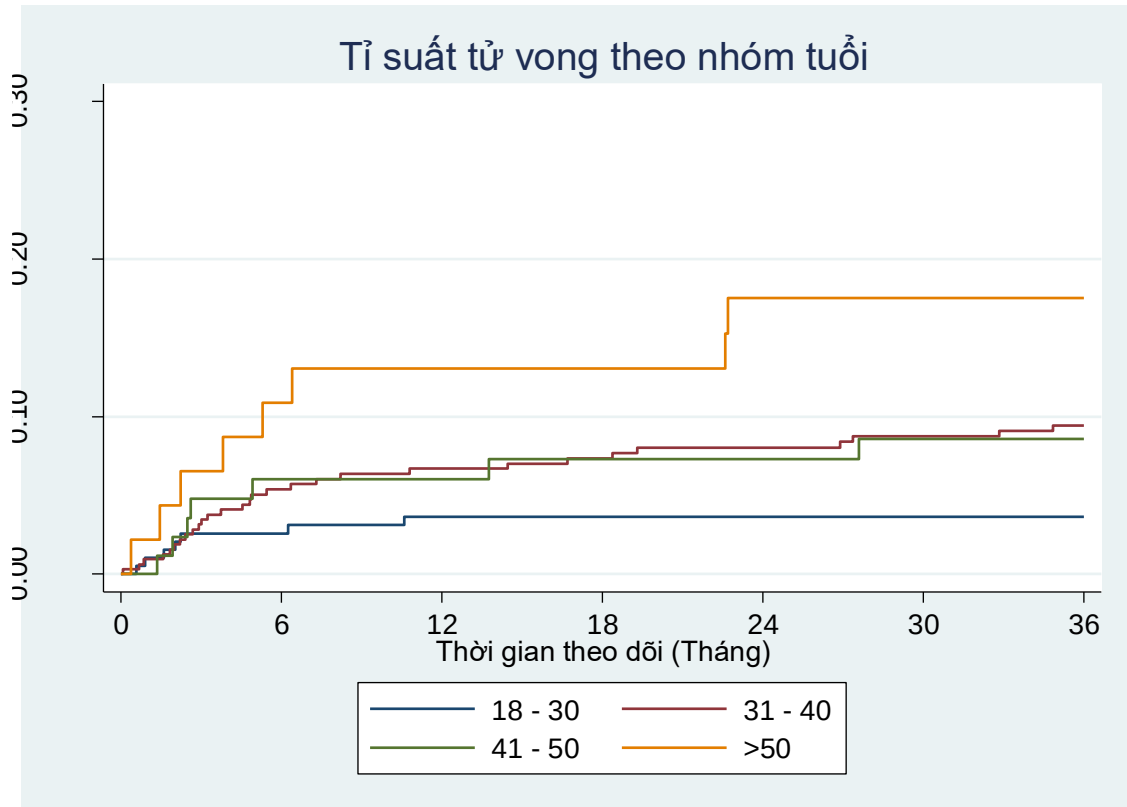
Biểu đồ 3.14. Tỷ suất tử vong theo phân nhóm TLVR

Tỷ suất tử vong chung của người bệnh trong nghiên cứu là 2,52/1000-bệnh nhân/năm. Người bệnh có TLVR ban đầu >100.000 bản sao/ml có tỷ suất tử vong cao hơn nhóm còn lại. Kiểm định log-rank test $p < 0,05$.



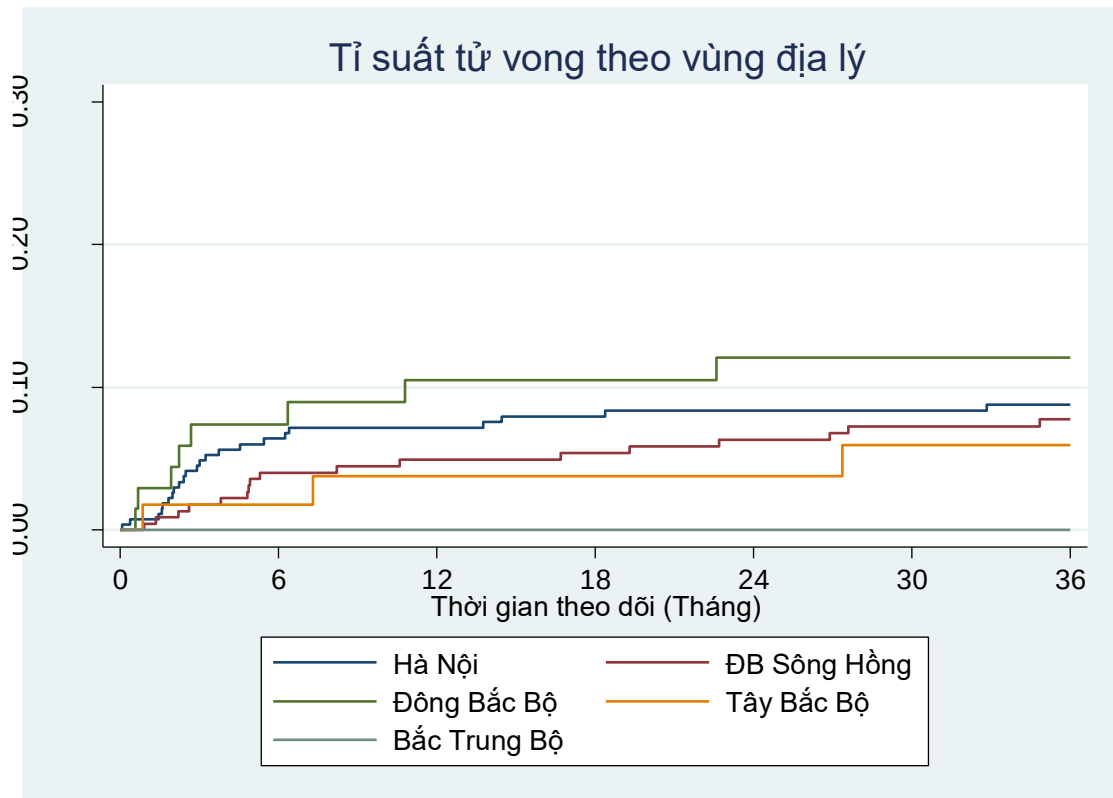
Biểu đồ 3.15. Tỷ suất tử vong theo giới tính

Tỉ suất tử vong ở nam giới (3,55/1000-bệnh nhân/năm) cao hơn so với nữ giới (0,89/1000-bệnh nhân/năm). Kiểm định log-rank test $p < 0,05$.



Biểu đồ 3.16. Tỉ suất tử vong theo phân nhóm tuổi

Bệnh nhân >50 tuổi có tỉ suất tử vong cao nhất (5,7/1000-bệnh nhân/năm) và nhóm tuổi từ 18 – 30 có tỉ suất tử vong thấp nhất (1,12/1000-bệnh nhân/năm). Hai nhóm tuổi từ 31 – 40 và 41 – 50 có tỉ suất tử vong gần như tương đồng, cao hơn nhóm tuổi 18 – 30 và thấp hơn nhóm tuổi >50. Kiểm định log-rank test $p < 0,05$.



Biểu đồ 3.17. Tỉ suất tử vong theo vùng địa lý

Tỉ suất tử vong cao nhất ở các bệnh nhân Đông Bắc Bộ với 3,86/1000-bệnh nhân/năm, thấp nhất tại Bắc Trung Bộ khi không ghi nhận trường hợp nào tử vong sau 36 tháng theo dõi. Sự khác biệt về tỉ suất tử vong giữa các vùng địa lý không có ý nghĩa thống ($p=0,35$).

3.3. So sánh TLVR huyết tương và DBS-PBS

Bảng 3.11. Đặc điểm TLVR huyết tương và DBS-PBS trước và sau điều trị ARV

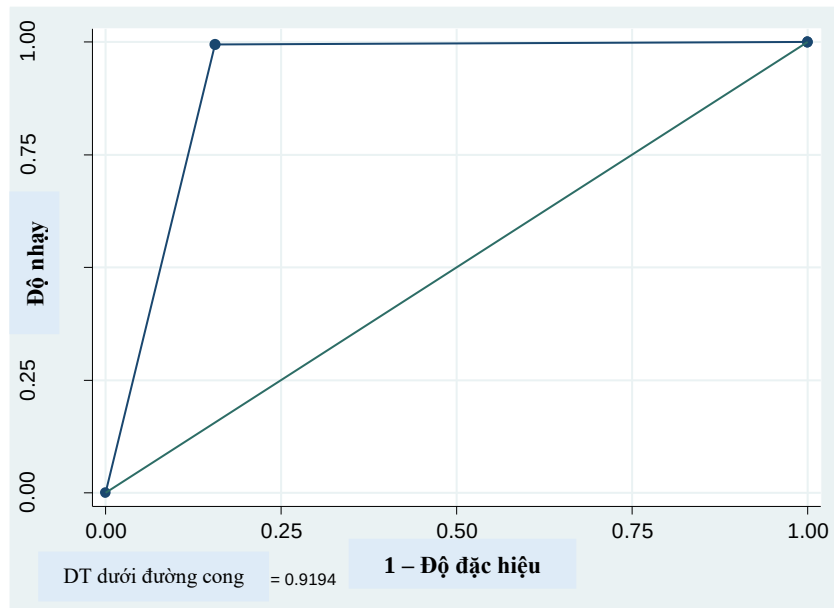
	Trước ARV		Sau ARV		Tổng (N=264)	
TLVR Plasma	Tần số	Tỉ lệ %	Tần số	Tỉ lệ %	Tần số	Tỉ lệ %
<20	0	0	145	78,38	145	54,92
20 - <1000	2	2,53	40	21,62	42	15,91
1000 - <5000	1	1,27	0	0	1	0,38
≥5000	76	96,2	0	0	76	28,79
TLVR DBS-PBS						
<400	4	5,06	178	96,22	182	68,94
400 - <1000	10	12,66	6	3,24	16	6,06
1000 - <5000	24	30,38	1	0,54	25	9,47
≥5000	41	51,9	0	0	41	15,53

Tỉ lệ TLVR huyết tương dưới ngưỡng phát hiện là 54,92% và dưới 1000 bản sao/mL là 70,83%. Tỉ lệ có TLVR trên 5000 bản sao/ml là 28,79%. Phân tích TLVR bằng kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS-PBS cho thấy tỉ lệ dưới ngưỡng <400 bản sao/ml là 68,94%; từ 400 - <1000 bản sao/ml là 6,06% và trên 5000 bản sao/ml là 15,53%.

Bảng 3.12. Độ nhạy và độ đặc hiệu của TLVR DBS-PBS so với TLVR huyết tương

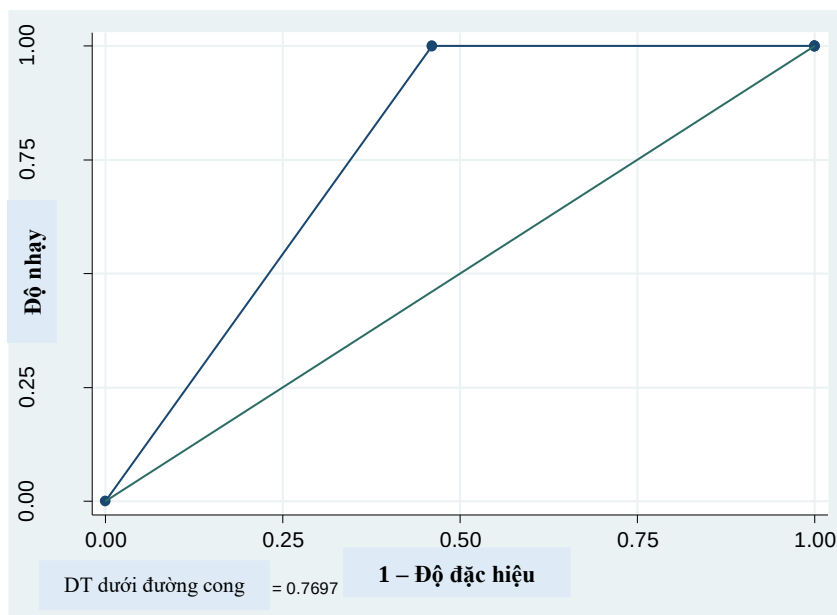
DBS-PBS	Plasma	
	<1000	≥1000
Ngưỡng 1000 bản sao/ml		
<1000	186	12
≥1000	1	65
Độ nhạy	99,47%	
Độ đặc hiệu	84,42%	
Ngưỡng 5000 bản sao/ml	<5000	≥5000
<5000	188	35
≥5000	0	41
Độ nhạy	100%	
Độ đặc hiệu	53,95%	

Đo tải lượng vi rút bằng kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS-PBS đều cho độ nhạy và độ đặc hiệu cao. DBS-PBS có độ nhạy và độ đặc hiệu là 99,47% và 84,42% ở ngưỡng 1000 bản sao/ml, tuy nhiên, chỉ đạt độ đặc hiệu 53,95% ở ngưỡng 5000 bản sao/ml. Kết quả cho thấy kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS có độ nhạy và độ đặc hiệu cao ở ngưỡng 1000 bản sao, tuy nhiên, độ đặc hiệu thấp ở ngưỡng 5000 bản sao. Điều này cho thấy, DBS sẽ có ý nghĩa thực tiễn cao hơn khi đo lường tải lượng vi rút sau điều trị ARV.



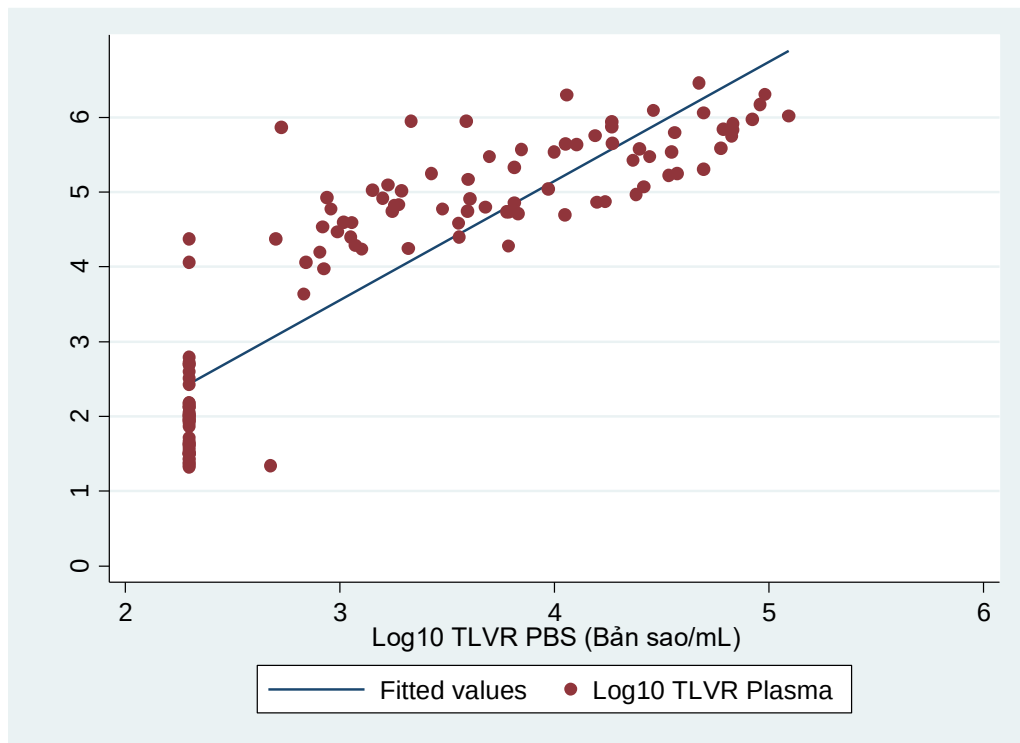
Biểu đồ 3.18. Đường cong ROC TLVR Plasma và TLVR DBS-PBS ở ngưỡng 1000 bản sao/ml

Đường cong ROC so sánh TLVR huyết tương là DBS-PBS được mô tả trong biểu đồ 3.18. Diện tích dưới đường cong là 0,9194 với độ nhạy và độ đặc hiệu ở ngưỡng 1000 bản sao/ml là 99,47% và 84,42%.



Biểu đồ 3.19. Đường cong ROC TLVR Plasma và TLVR PBS ở ngưỡng 5000 bản sao/ml

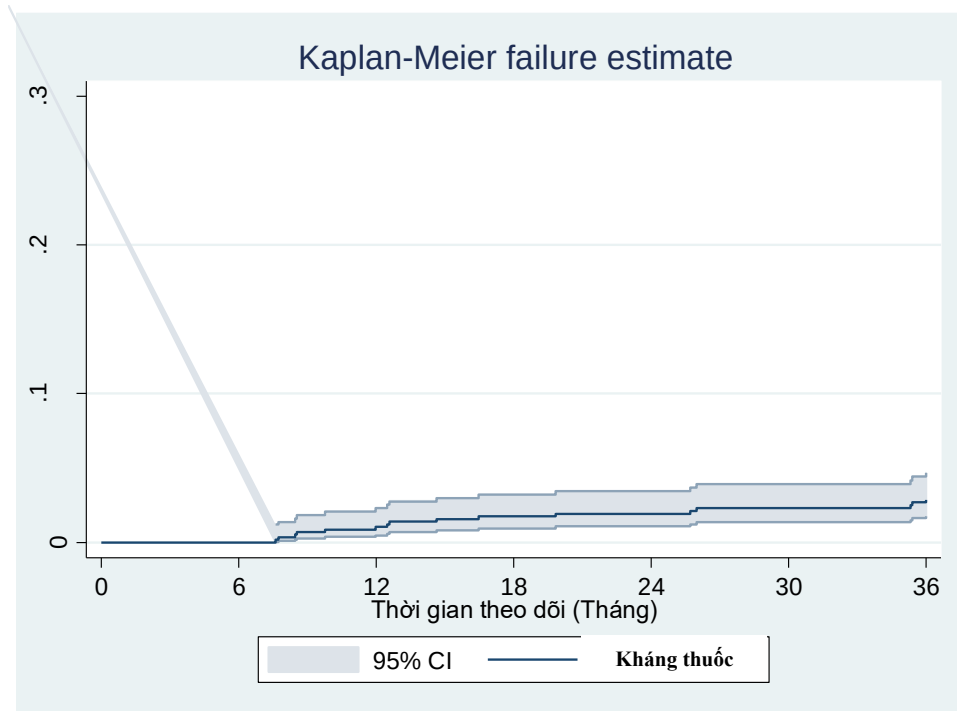
Đường cong ROC so sánh TLVR huyết tương là DBS-PBS được mô tả trong biểu đồ 3.19. Diện tích dưới đường cong là 0,7697 với độ nhạy và độ đặc hiệu ở ngưỡng 5000 bản sao/ml là 100% và 53,95%.



Biểu đồ 3.20. Tương quan giữa Log10 TLVR Plasma và Log10 TLVR PBS

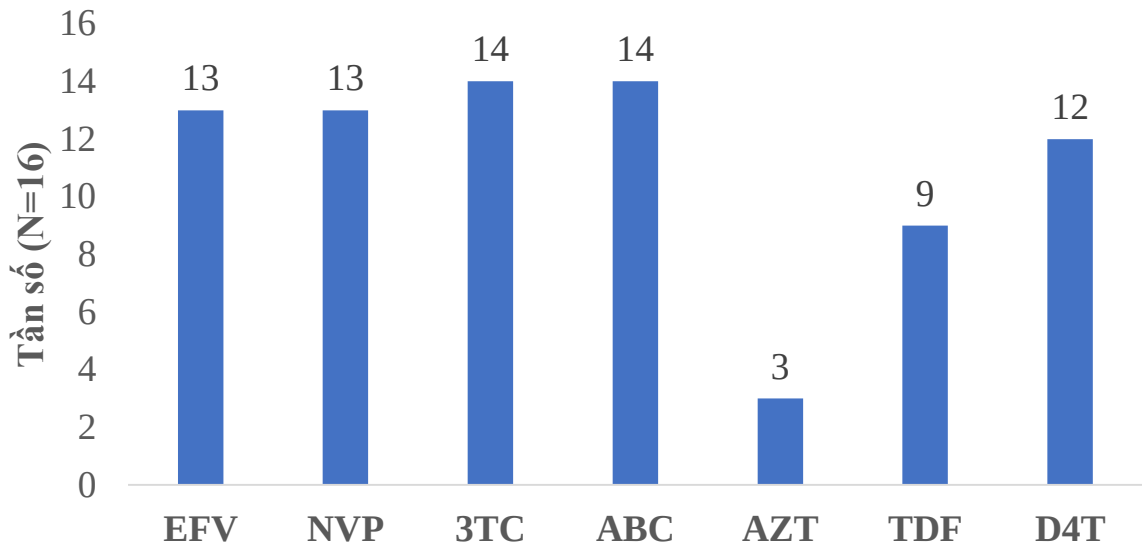
Đánh giá mức độ tương quan giữa Log10 TLVR huyết tương và Log10 TLVR DBS-PBS cho thấy hệ số tương quan Pearson là $r = 0,88$ được phân tích trên biểu đồ 3.20 ($p < 0,001$).

3.4. Đặc điểm kháng thuốc và gen có đột biến kháng thuốc



Biểu đồ 3.21. Tỷ suất xuất hiện đột biến gen kháng thuốc theo thời gian

Sau 36 tháng điều trị, có 16 bệnh nhân mang đột biến gen kháng thuốc với tỷ lệ 2,47% (16/648). Tỷ suất xuất hiện kháng thuốc ghi nhận được là 9,76/1000 bệnh nhân-năm. Giá trị trung vị thời gian từ khi bắt đầu điều trị ARV đến khi kháng định xuất hiện đột biến gen kháng thuốc là 1,13 năm (IQR=0,77 – 2,15). Kháng thuốc ở người bệnh xuất hiện đầu tiên sau 6 tháng điều trị.



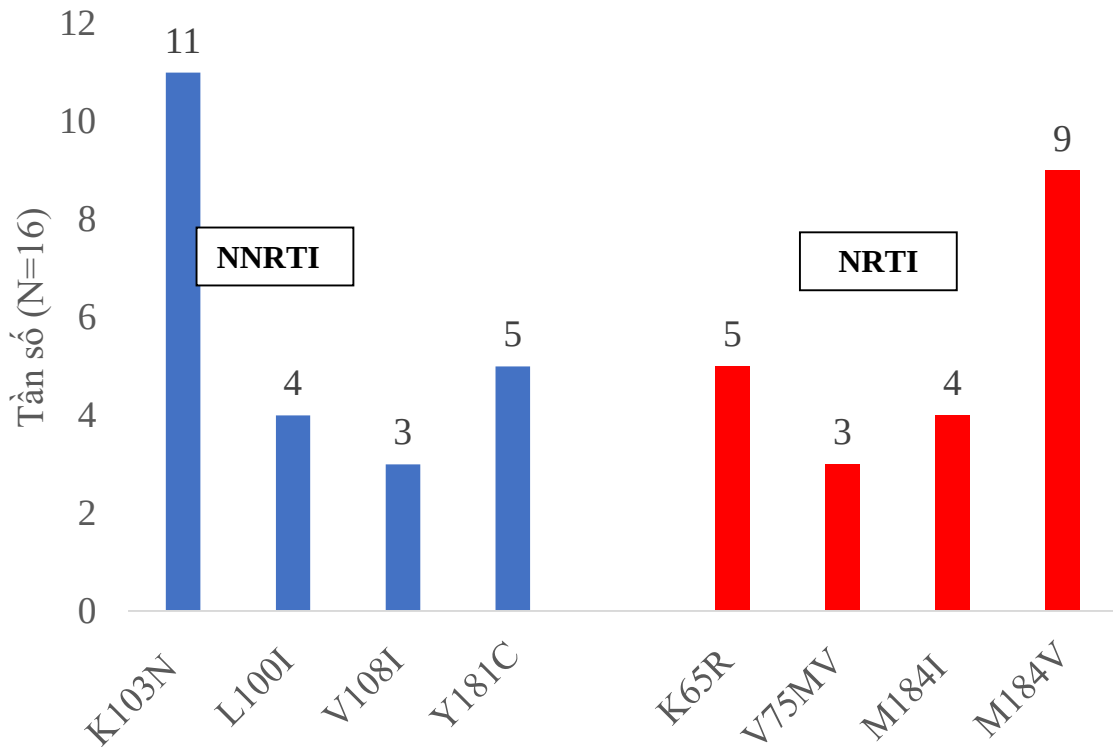
Biểu đồ 3.22. Số lượng kháng các thuốc ARV phổ biến (N=16)

Tỉ lệ kháng các thuốc phổ biến được sử dụng trong điều trị tại Việt Nam được trình bày trong biểu đồ 3.22. EFV, NVP, 3TC có tỉ lệ kháng từ 81,3% - 87,5%. Tỉ lệ kháng ABC là 87,5% (14/16) trường hợp và d4T là 12/16 trường hợp. AZT và TDF có tỉ lệ kháng thấp hơn với chỉ 3/16 đối với AZT và 9/16 trường hợp đối với TDF.

Bảng 3.13. Số lượng đột biến gen liên quan đến kháng thuốc theo nhóm thuốc

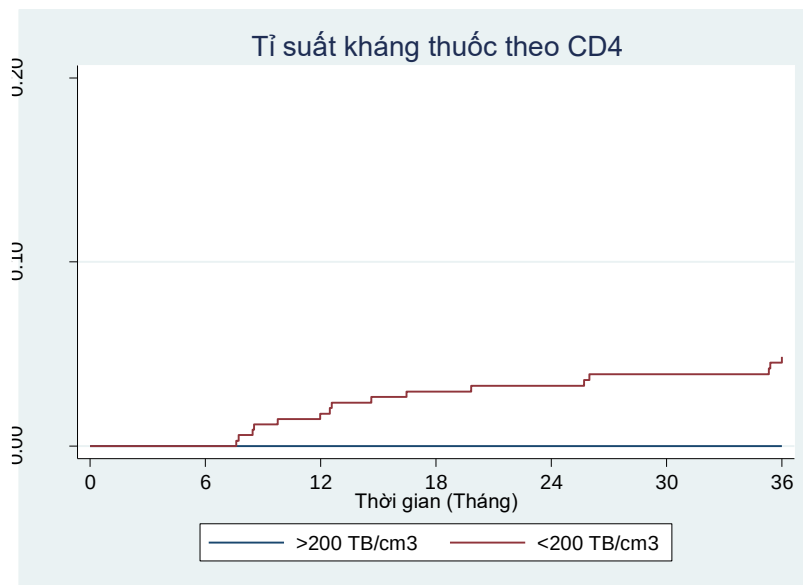
Gen kháng thuốc	Tần số (N=16)	Tỉ lệ %
Số lượng đột biến gen liên quan kháng NNRTI		
Không có đột biến	3	18,8
2 đột biến	1	6,3
3 đột biến	8	50,0
4 đột biến	2	12,5
5 đột biến	2	12,5
Số lượng đột biến gen liên quan kháng NRTI		
Không có đột biến	2	12,5
1 đột biến	3	18,8
2 đột biến	4	25,0
3 đột biến	5	31,3
4 đột biến	1	6,3
7 đột biến	1	6,3
Số lượng đột biến gen liên quan kháng PI		
Không có đột biến	16	100

Quan sát ở bảng 3.13 cho thấy có 81,3% người bệnh có từ 2 đột biến liên quan đến kháng NNRTI và 87,7% có từ 1 đột biến gen liên quan đến kháng NRTI. Trên nhóm PI, không phát hiện trường hợp người bệnh có đột biến gen liên quan kháng PI.



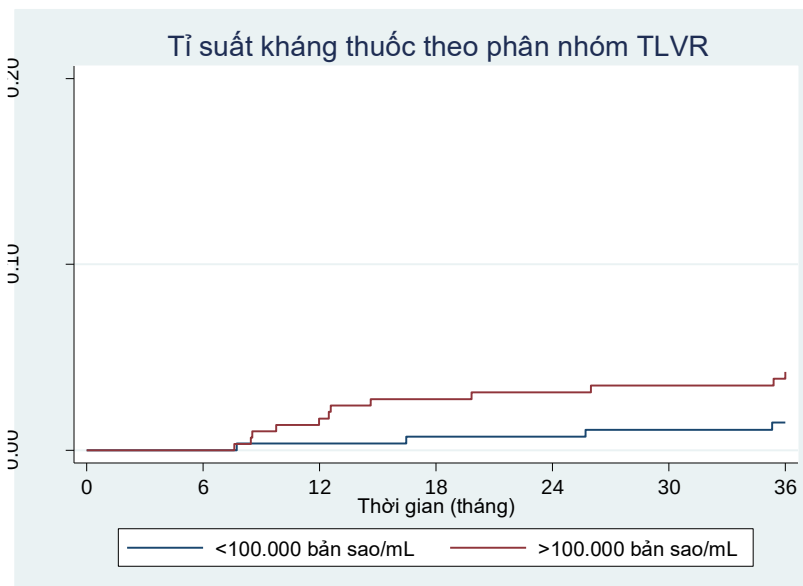
Biểu đồ 3.23. Các đột biến gen kháng thuốc phổ biến theo nhóm thuốc

Các đột biến gen liên quan đến kháng thuốc phổ biến theo từng nhóm thuốc được trình bày trong biểu đồ 3.23. Ở nhóm NNRTI, các đột biến gen phổ biến bao gồm K103N (11/16), Y181C (5/16), L100I (4/16) và V108I là 3/16 trường hợp. Trên nhóm NRTI, M184V là đột biến liên quan đến kháng thuốc phổ biến nhất (9/16), tiếp đến lần lượt là K65R (5/16), M184I (4/16) và V75MV (3/16).



Biểu đồ 3.24. Tỷ suất xuất hiện kháng thuốc theo phân nhóm CD4 ban đầu

Tất cả các trường hợp xuất hiện kháng thuốc đều xảy ra ở người bệnh có HIV giai đoạn tiến triển ($CD4 < 200 \text{ TB/mm}^3$) tại thời điểm ban đầu. Kiểm định log-rank test cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,001$.



Biểu đồ 3.25. Tỷ suất xuất hiện kháng thuốc theo phân nhóm TLVR ban đầu

Người bệnh có TLVR ban đầu trên 100.000 bản sao/mL có tỷ suất xuất hiện kháng thuốc cao hơn nhóm bệnh nhân còn lại. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p \text{ log-rank test} = 0,05$.

Bảng 3.14: Phân bố TLVR, đột biến liên quan đến kháng thuốc theo từng nhóm thuốc ca lâm sàng.

ID	Nhóm	Thời gian xuất hiện kháng thuốc*	CD4 ban đầu	TLVR ban đầu	TLVR tại thời điểm kháng thuốc	Thất bại	Đột biến gen kháng nhóm NNRTI	Đột biến gen kháng nhóm NRTI
37	TD TLVR thường quy	26	28	241.000	132.160	Miễn dịch + Vi rút	K103N	M184V
130	TD TLVR thường quy	35	164	101.000	1.370	Vi rút	K103N, K101E, G190A	V75M, M184V
279	TD TLVR thường quy	20	17	399.000	72.900	Miễn dịch + Vi rút	Y181C, V106I, H221Y	M184V
288	TD TLVR thường quy	9	34	296.000	11.230	Miễn dịch + Vi rút	K101F, Y181C, G190A	T69N, M184V
553	TD TLVR thường quy	8	34	396.000	95.300	Miễn dịch + Vi rút	V106M, V179D	V75MV, M184V
578	TD TLVR thường quy	10	78	391.000	418.000	Miễn dịch + Vi rút	K103N, V108IV, P225H	T215Y, V75M, M184V

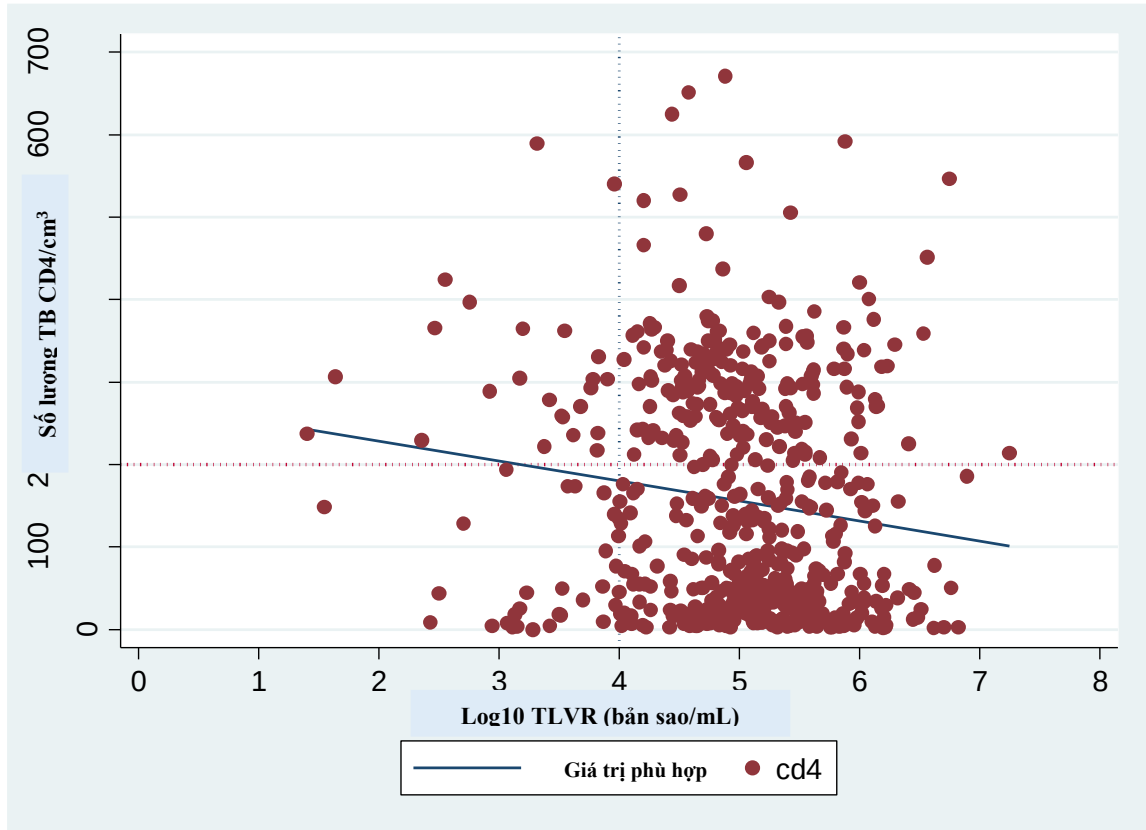
ID	Nhóm	Thời gian xuất hiện kháng thuốc*	CD4 ban đầu	TLVR ban đầu	TLVR tại thời điểm kháng thuốc	Thất bại	Đột biến gen kháng nhóm NNRTI	Đột biến gen kháng nhóm NRTI
584	TD TLVR thường quy	15	61	179.000	2.910	Miễn dịch + Vi rút	K103N, V90I, V108I, H221Y, K238T	m184i
585	TD TLVR thường quy	12	7	429.000	8.370	Miễn dịch + Vi rút	K103N, V108I, P225H, E138EG	K70EK, K741L, M184V
650	TD TLVR thường quy	8	64	13.600	16.800	Miễn dịch + Vi rút	L100I, V179T, Y188L	K65R
2	TD TLVR không thường quy	35	43	17.820	4.550	Miễn dịch + Vi rút	K103N, Y181C	K65R, K75M, M184I
168	TD TLVR không thường quy	26	6	12.700	32.200	Miễn dịch + Vi rút	K103N, V108I, Y181C	M184V, K75M, M41L, D67N, T69D, T69D, V75M
212	TD TLVR không thường quy	36	106	609.000	1.801	Vi rút	K101E, V179T, Y181C, G190S	K65R, A62V, M184V

ID	Nhóm	Thời gian xuất hiện kháng thuốc*	CD4 ban đầu	TLVR ban đầu	TLVR tại thời điểm kháng thuốc	Thất bại	Đột biến gen kháng nhóm NNRTI	Đột biến gen kháng nhóm NRTI
246	TD TLVR không thường quy	13	4	654.000	803.000	Miễn dịch + Vi rút	K103N, Y181CY, Y188L	K70EK, M184IMV, K219EK
524	TD TLVR không thường quy	12	0	403.630	72.400	Miễn dịch + Vi rút	K103N, L100I, M230L, V106M, V179D	K65KR, T69NT, M184I, L74LV
563	TD TLVR không thường quy	8	178	765.375	728.000	Miễn dịch + Vi rút	K103N, L100I, M230L	K65R, M184I
631	TD TLVR không thường quy	16	8	61.100	89.155	Miễn dịch + Vi rút	K103N, L100I	K65N, A62V, M184V

(*Tháng -khi bác sỹ lâm sàng chỉ định XN gen kháng thuốc kháng HIV)(CT: can thiệp)

Tất cả 16 bệnh nhân đều có xác nhận thất bại vi rút học, trong đó, 2 trường hợp thất bại vi rút đơn thuần và 14 trường hợp thất bại cả miễn dịch và vi rút.

3.5. Một số yếu tố liên quan đến kết quả theo dõi điều trị ức chế TLVR của bệnh nhân



Biểu đồ 3.26. Tương quan giữa chỉ số CD4 và chỉ số tải lượng vi rút tại thời điểm ban đầu

Phân tích tương quan Pearson cho thấy, kết quả hai chỉ số số lượng tế bào CD4 và tải lượng vi rút của bệnh nhân có sự tương quan yếu và không có ý nghĩa thống kê ($r = -0,03$; $p = 0,44$).

Bảng 3.15. Liên quan giữa CD4, TLVR và giai đoạn lâm sàng tại thời điểm ban đầu

Phân loại GĐLS	GĐLS 1 & 2		GĐLS 3 & 4		Giá trị p
	Tần số (n=291)	Tỉ lệ %	Tần số (n=262)	Tỉ lệ %	
Phân nhóm CD4					
<100	58	21.89	207	78.11	<0.001
100-199	52	65.00	28	35.00	
≥200	181	87.02	27	12.98	
Phân nhóm TLVR					
20 - <1.000	9	75.00	3	25.00	0.29
≥1.000 - <10.000	22	53.66	19	46.34	
≥10.000	260	52.00	240	48.00	

Bảng 3.15 cho thấy mối liên quan giữa số lượng tế bào CD4 và số lượng TLVR và biểu hiện lâm sàng của bệnh nhân. Tỉ lệ bệnh nhân ở GĐLS 3 và 4 cao hơn đáng kể ở nhóm bệnh nhân có CD4<100 tế bào/mm³ so với nhóm bệnh nhân có CD4>200 tế bào/ mm³ (78,11% so với 12,98%; p<0,001). Trong khi đó, giữa các phân nhóm về tải lượng vi rút, sự khác biệt giữa giai đoạn lâm sàng 1 & 2 và 3 & 4 không có sự khác biệt đáng kể (p=0,29).

Bảng 3.16. Một số yếu tố liên quan đến ức chế TLVR ở người bệnh nhân

Yếu tố	OR	95% CI		p
Giới tính				
Nam	1			
Nữ	1,42	1,18	1,72	<0,001
Nhóm tuổi				
18 - 30 tuổi	1			
31 - 40 tuổi	0,93	0,74	1,18	0,57
41 - 50 tuổi	0,84	0,61	1,15	0,28
>50 tuổi	0,90	0,63	1,29	0,57
Đường lây truyền				
Tiêm chích ma túy	1			
QHTD/Khác	0,94	0,71	1,25	0,67
Giai đoạn lâm sàng				
Giai đoạn 3 & 4	1			
Giai đoạn 1 & 2	1,43	1,18	1,74	<0,001
Nghiện thuốc lá				
Không	1			
Có	0,86	0,69	1,07	0,18
Nghiện rượu/bia				
Không	1			
Có	1,00	0,79	1,27	0,99
Đồng nhiễm viêm gan C				
Âm tính	1			
Dương tính	0,93	0,75	1,15	0,49
Điều trị ARV sớm <4 tuần				

Yếu tố	OR	95% CI		p
Không	1			
Có	1,05	0,86	1,28	0,62
Phác đồ điều trị ARV				
Phác đồ chứa AZT/Khác	1			
Phác đồ TDF	0,97	0,80	1,19	0,80
Chỉ số khối cơ thể				
Thiếu cân	1			
Bình thường	1,30	1,05	1,60	0,02
CD4 (tế bào/mm³)				
<200	1			
≥200	3,41	2,73	4,27	<0,001

Phân tích hồi quy logistic đa biến cho thấy, nữ giới có xu hướng đạt ức chế vi rút cao hơn so với nam giới (OR=1,42, $p<0,001$). Các đối tượng có GĐLS 1 và 2 tại thời điểm ban đầu cũng có đáp ứng vi rút tốt hơn các bệnh nhân ở GĐLS 3 hoặc 4 (OR=1,43; $p<0,001$). Bệnh nhân có CD4 trên 200 tại thời điểm trước điều trị cũng có xu hướng đạt TLVR dưới ngưỡng cao hơn các bệnh nhân HIV tiến triển (OR=3,41; $p<0,001$).

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. Đặc điểm nhân khẩu học của nhóm bệnh nhân nhiễm HIV trong nghiên cứu

4.1.1. Tuổi và giới tính

Trong thời gian gần đây, độ tuổi của người nhiễm HIV điều trị ARV tại Việt Nam và trên toàn thế giới đang có xu hướng tăng lên, nguyên nhân chủ yếu là do người bệnh có đáp ứng tốt với điều trị do đó tỷ lệ tử vong giảm và thời gian sống của người bệnh được cải thiện một cách đáng kể. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tuổi trung bình của của bệnh nhân nghiên cứu là $35,1 \pm 8,7$ tuổi, trong đó, 2 nhóm tuổi chiếm tỉ lệ cao nhất lại là 2 nhóm tuổi trẻ từ 18 – 30 (30,1%) và lứa tuổi cận trung niên từ 31 - 40 tuổi (chiếm 49,5%). Lý giải cho kết quả này là do các người bệnh thu tuyển trong nghiên cứu của chúng tôi là từ 2012 - 2015. Trong giai đoạn này, độ tuổi hiện nhiễm HIV chủ yếu tại Việt Nam theo báo cáo của Bộ Y tế năm 2015 (tỉ lệ bệnh nhân từ 20-29 là 32,9% và từ 30-40 là 45,1%) [4].

Về giới tính, nam giới chiếm đến 63% (bảng 3.1) trong nhóm đối tượng nghiên cứu. Trong nghiên cứu của chúng tôi, có tới 78,24% (biểu đồ 3.1) người bệnh khai thác đường lây truyền là qua quan hệ tình dục. Điều này phản ánh tình hình dịch tại Việt Nam khi đang có sự dịch chuyển từ tiêm chích ma túy sang quan hệ tình dục, chủ yếu ở đối tượng vợ và bạn tình của người nhiễm HIV và cả đối tượng nam tình dục đồng giới. Theo báo cáo của Cục Phòng, chống HIV/AIDS, từ năm 2015 đến năm 2016, tỉ lệ HIV dương tính trên nhóm MSM đã tăng từ 5,1% đến 7,4%, đứng thứ 2 chỉ sau nhóm nghiện chích ma túy [11]. Nhóm MSM đang được coi là nhóm định hình dịch HIV tại Việt Nam trong giai đoạn hiện tại. Trong nghiên cứu này, tỉ lệ người bệnh điều trị ARV thuộc nhóm MSM chỉ là 0,46%. Tuy nhiên, đang có xu

hướng gia tăng trong các năm từ 2016 - 2019 theo như ghi nhận trong các báo cáo của Phòng khám là 5,5%. Các nghiên cứu đánh giá đáp ứng điều trị trên đối tượng MSM cần được chú trọng hơn trong giai đoạn tới.

4.1.2. Tình trạng hôn nhân và việc làm

Đa phần bệnh nhân trong nghiên cứu hiện đang sống cùng với vợ hoặc chồng, chiếm 72,8% (bảng 3.1). Đây là vấn đề rất đáng lưu tâm bởi trong 5 năm trở lại, dịch tại Việt Nam đang có xu hướng dịch chuyển từ tiêm chích ma túy sang quan hệ tình dục không an toàn. Bằng chứng là, theo báo cáo của Cục phòng, chống HIV/AIDS năm 2014, có tới 34% các ca nhiễm mới trong năm 2013 tại Việt Nam là từ vợ/chồng của người nhiễm. Kết quả này gợi ý chúng ta cần chú ý theo dõi và dự phòng cho vợ và chồng của bệnh nhân đang điều trị để giảm thiểu nguy cơ lây truyền HIV qua quan hệ tình dục.

Nghiên cứu cho thấy đáp ứng tốt với điều trị ARV với tải lượng vi rút ở dưới ngưỡng phát hiện sẽ giúp giảm thiểu nguy cơ lây truyền HIV tới trên 90%. Tuy nhiên, sử dụng các biện pháp quan hệ tình dục an toàn vẫn được khuyến cáo là phương pháp dự phòng lây nhiễm hiệu quả nhất. Do đó, tư vấn ban đầu cho người bệnh đóng vai trò quan trọng, không chỉ trong điều trị mà còn có tác động đáng kể tới hành vi lây nhiễm và dự phòng HIV cho vợ/chồng hoặc bạn tình của người nhiễm.

Về việc làm, có 12,7% (bảng 3.2) bệnh nhân hiện đang thất nghiệp hoặc chưa đi làm. So với các nghiên cứu trước đây tại Việt Nam, tỉ lệ người không có việc làm trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn, tuy nhiên vẫn ở mức đáng chú ý.

Điều trị toàn diện cho bệnh nhân HIV không chỉ là vấn đề sức khỏe, mục tiêu của chương trình điều trị còn là giúp bệnh nhân hòa nhập xã hội và trở lại trạng thái tâm lý - xã hội ổn định. Tình trạng không có việc làm càng dẫn đến việc bệnh nhân không có thu nhập, điều kiện kinh tế kém đồng thời

gia tăng sự kỳ thị và phân biệt đối xử ở gia đình, cộng đồng cũng như từ chính người bệnh.

4.2. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng trước điều trị ARV

4.2.1. Đặc điểm lâm sàng

Tỉ lệ người bệnh trong nhóm nghiên cứu ở giai đoạn lâm sàng 4 là 35,5% và giai đoạn lâm sàng 3 chiếm 10,8%. Trung bình chỉ số khối cơ thể BMI là 19,7 với tỉ lệ đối tượng thiếu cân lên tới 61,3% (bảng 3.3). Thời điểm này, bệnh nhân xuất hiện nhiều nhiễm trùng cơ hội, trong đó có nhiều nhiễm trùng cơ hội nghiêm trọng bao gồm lao, *nấm T. marneffeii*, *nấm Cryptococcus* và viêm phổi *P.C.P* (biểu đồ 3.2). Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu tại Việt Nam trong giai đoạn từ 2013 – 2015 khi phần lớn người bệnh HIV đến điều trị HIV ở giai đoạn muộn, đặc biệt là tại các phòng khám tuyến trung ương [121], [120]. Bệnh nhân HIV ở giai đoạn lâm sàng 3 và 4 có tỉ lệ tử vong cao, do đó việc quản lý và điều trị sớm các nhiễm trùng cơ hội là ưu tiên hàng đầu nhằm giảm thiểu nguy cơ tử vong và kéo dài thời gian sống của người bệnh [29].

Tỉ lệ bệnh nhân có HIV ở giai đoạn tiến triển tại thời điểm trước điều trị lên tới 61,3%, trong đó có 46,5% có CD4 dưới mức 100 TB/mm³. Trung bình số lượng tế bào CD4 là $162,8 \pm 148,6$ TB/mm³. Tỉ lệ bệnh nhân có vi rút ở dưới ngưỡng phát hiện chỉ là 1,7%, trong khi đó, tỉ lệ có tải lượng vi rút HIV ≥ 10.000 bản sao/mL chiếm tới 88,3%. Trung bình tải lượng vi rút lên tới 363.951 ± 843.627 bản sao/mL (bảng 3.5). Hướng dẫn mới nhất của Tổ chức Y tế thế giới đã khuyến cáo điều trị ARV cho mọi đối tượng nhiễm HIV và Việt Nam bắt đầu mở rộng theo tiêu chuẩn này trên toàn bộ các cơ sở điều trị từ năm 2017. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu cho thấy, các bệnh nhân trong nghiên cứu phần lớn đều có tình trạng miễn dịch suy giảm trầm trọng và tải lượng vi rút ở mức rất cao tại thời điểm trước điều trị ARV. Các nghiên cứu

tại các quốc gia khác cũng cho thấy, mặc dù CD4 trung bình trước điều trị có xu hướng tăng lên, tuy nhiên, tỉ lệ bệnh nhân có CD4 ở mức thấp vẫn chiếm tỉ lệ đáng kể [18, 64]. Đây có thể là kết quả của việc phát hiện và điều trị muộn ở người nhiễm HIV/AIDS tại Việt Nam. Mặc dù Việt Nam đã mở rộng tiêu chuẩn điều trị cho toàn bộ người nhiễm HIV bất kể số lượng tế bào CD4, tình trạng bệnh nhân đăng ký điều trị muộn vẫn rất phổ biến. Điều này dẫn tới bệnh nhân bắt đầu điều trị khi đã có dấu hiệu suy giảm miễn dịch nặng, nhiều nhiễm trùng cơ hội nghiêm trọng và có tải lượng vi rút ở mức rất cao. Việc điều trị và hồi phục ở các bệnh nhân này thường rất khó khăn và cần được cải thiện nhanh chóng nhằm đáp ứng được các mục tiêu 90 – 90 – 90 mà Việt Nam đang hướng tới.

4.2.2. Đặc điểm cận lâm sàng

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỉ lệ người bệnh trong nghiên cứu có thiếu máu lên đến 28,6% (bảng 3.7). Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu đã được thực hiện trên thế giới. Ross J Harris và cộng sự báo cáo tỉ lệ 35% trên 121.000 người bệnh HIV có thiếu máu tại thời điểm bắt đầu điều trị ARV tại châu Âu [47]. Tại Hoa Kỳ, tỉ lệ thiếu máu được xác định là 24,3% trong một nghiên cứu thuần tập thực hiện bởi tác giả Curkendall SM và cộng sự [31]. Trên trẻ em, tình trạng thiếu máu còn trầm trọng hơn, trong nghiên cứu của Nyesigire Ruhinda E tại Uganda cho thấy tỉ lệ này lên tới 57,6% và 60,5% trong nghiên cứu của Lorna A Renner tại 8 nước châu Phi [91], [103]. Nhiều kết quả nghiên cứu còn cho thấy, thiếu máu là yếu tố dự báo độc lập tới tình trạng tử vong và giảm đáp ứng điều trị về vi rút học ở người nhiễm HIV [47], [75]. Do đó, chẩn đoán và điều trị sớm thiếu máu ở người nhiễm HIV là cần thiết nhằm nâng cao chất lượng chăm sóc và điều trị của chương trình HIV.

Tỉ lệ bệnh nhân có viêm gan C là 36,7%, trong khi đó, tỉ lệ viêm gan B thấp hơn với 13,1% (bảng 3.8). Kết quả này phù hợp với nhiều báo cáo trước đó tại Việt Nam khi tỉ lệ viêm gan C đặc biệt cao trên nhóm người nhiễm HIV. Nguyên nhân phần lớn là do đặc điểm tương tự về đường lây truyền giữa HIV và HCV trên nhóm đối tượng nghiện chích ma túy. Tình trạng đồng nhiễm HIV/viêm gan và các bệnh lý về gan là một trong những nguyên nhân hàng đầu gây tử vong ở bệnh nhân HIV/AIDS [80]. Mặc dù điều trị ART đã mang hiệu quả đáng kể giúp bệnh nhân HIV có thể kéo dài sự sống, tuy nhiên, tình trạng đồng nhiễm HIV/viêm gan có thể làm gia tăng tỉ lệ tử vong do các bệnh gan mãn tính, đồng thời giảm hiệu quả của quá trình điều trị ART [80]. Vi rút HIV gây suy giảm miễn dịch khiến bệnh nhân viêm gan tiến triển nhanh hơn đến xơ gan và ung thư gan so với nhiễm viêm gan B, C đơn thuần [108, 125]. Tương tự, vi rút viêm gan thúc đẩy sự gia tăng nhanh số lượng HIV trong máu, đồng thời làm tăng độc tố của thuốc kháng vi rút (ARV) dẫn đến bệnh nhân đáp ứng kém đối với điều trị ART [80]. Viêm gan C đang là gánh nặng điều trị ở bệnh nhân HIV, đặc biệt nếu không được điều trị kịp thời, bệnh nhân có thể dẫn đến xơ gan và ung thư gan, gây suy giảm sức khỏe, khả năng lao động hay nặng hơn là tử vong. Kết quả này gợi ý chúng ta cần chú ý quan tâm theo dõi và điều trị sớm viêm gan cho các bệnh nhân đồng nhiễm HIV/HCV.

4.2.3. Vai trò của xét nghiệm CD4 tại thời điểm trước điều trị

Hướng dẫn mới nhất của Tổ chức Y tế thế giới đã khuyến cáo điều trị ARV cho mọi đối tượng nhiễm HIV và Việt Nam bắt đầu mở rộng tiêu chuẩn này trên toàn bộ các cơ sở điều trị từ năm 2017. Tuy nhiên, kết quả nghiên cứu cho thấy, các bệnh nhân trong nghiên cứu phần lớn đều có tình trạng suy giảm miễn dịch trầm trọng và tải lượng vi rút ở mức rất cao tại thời điểm trước điều trị ARV. Các nghiên cứu tại các quốc gia khác cũng cho thấy, mặc

dù CD4 trung bình trước điều trị có xu hướng tăng lên, tuy nhiên, tỉ lệ bệnh nhân có CD4 ở mức thấp vẫn chiếm tỉ lệ đáng kể [18, 64]. Đây có thể là kết quả của việc phát hiện và điều trị muộn ở người nhiễm HIV/AIDS tại Việt Nam. Điều này cho thấy, không chỉ mở rộng tiêu chuẩn điều trị mà việc nhanh chóng kết nối bệnh nhân đến các cơ sở điều trị mới là can thiệp cần ưu tiên trong bối cảnh Việt Nam đang cam kết thực hiện mục tiêu 90 – 90 – 90 và tiến tới kết thúc HIV vào năm 2030.

Đánh giá mối tương quan định lượng giữa CD4 và TLVR, kết quả cho thấy không có sự tương quan giữa chỉ số này. Điều này phù hợp với các nghiên cứu khác trên thế giới khi định lượng tải lượng vi rút không phản ánh tình trạng suy giảm miễn dịch của bệnh nhân [124, 132]. Đánh giá tình trạng suy giảm miễn dịch của bệnh nhân đóng vai trò quan trọng trong việc khởi động các can thiệp điều trị bao gồm dự phòng và điều trị nhiễm trùng cơ hội, đặc biệt ở các bệnh nhân điều trị muộn. Các bệnh nhân có CD4 <100 tế bào/mm³ có nguy cơ mắc các nhiễm trùng cơ hội nặng với tỉ lệ tử vong cao bao gồm nấm *Cryptococcus*, viêm phổi *P.C.P*, nhiễm trùng toxoplasma hệ thần kinh trung ương và cả nấm *Talaromyces marneffe*. Đánh giá kết quả CD4 sẽ giúp các bác sĩ lâm sàng đưa ra các can thiệp điều trị phù hợp cho bệnh nhân, đồng thời giảm các chi phí cho các chỉ định không cần thiết. Hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới đã khuyến cáo các cơ sở điều trị HIV cần cung cấp các gói điều trị phù hợp cho các bệnh nhân HIV giai đoạn tiến triển có CD4 <200 tế bào/mm³ và điều trị dự phòng bằng Cotrimoxazole cho các bệnh nhân có CD4 ≤ 350 tế bào/mm³ [170, 173]. Trong khi đó, xét nghiệm tải lượng vi rút đánh giá tại thời điểm ban đầu trước khi điều trị lại không mang nhiều ý nghĩa về mặt lâm sàng và điều trị. Kết quả nghiên cứu cho thấy, không có sự khác biệt đáng kể giữa về tỉ lệ bệnh nhân có giai đoạn lâm sàng 3 & 4 giữa các phân nhóm tải lượng vi rút khác nhau. Điều này có thể giải thích

do tại thời điểm ban đầu trước khi điều trị HIV, phần lớn bệnh nhân đều có tải lượng vi rút ở mức rất cao, do đó, xét nghiệm này không có giá trị phân loại và tiên đoán các nhiễm trùng cơ hội có thể gặp ở bệnh nhân. Như vậy, có thể thấy rằng xét nghiệm CD4 vẫn tiếp tục đóng vai trò quan trọng trong đánh giá trước điều trị ở bệnh nhân HIV/AIDS, đặc biệt là ở các bệnh nhân đăng ký điều trị ở giai đoạn muộn.

Từ các kết quả trong nghiên cứu, chúng tôi đánh giá xét nghiệm CD4 vẫn nên được chỉ định tại thời điểm ban đầu trước khi điều trị ARV ở các bệnh nhân HIV/AIDS nhằm phát hiện các bệnh nhân có HIV tiến triển, đồng thời là cơ sở để cung cấp các gói dịch vụ điều trị phù hợp theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế thế giới.

4.3. Xét nghiệm TLVR bằng kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS

Xét nghiệm tải lượng vi rút HIV được Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) năm 2010 khuyến cáo là phương pháp ưu tiên hàng đầu để theo dõi đáp ứng điều trị và chẩn đoán thất bại điều trị ở người nhiễm HIV đang được điều trị bằng thuốc kháng vi rút (ART) [130]. Theo dõi TLVR có độ nhạy và giá trị tiên đoán dương tính (PPV) cao hơn trong chẩn đoán thất bại điều trị so với theo dõi miễn dịch bằng đếm số lượng TB CD4 hoặc thăm khám lâm sàng [38]. Bên cạnh đó, theo dõi TLVR còn cho phép phát hiện chính xác và sớm thất bại về vi rút học, từ đó cho phép bệnh nhân có thể chuyển các phác đồ phù hợp trước khi tích lũy các đột biến kháng thuốc [46]. Chẩn đoán vi rút học về thất bại điều trị trước thất bại miễn dịch hoặc lâm sàng cũng giúp ngăn ngừa việc chuyển đổi phác đồ bậc 2 không phù hợp với chi phí đắt hơn đáng kể. Trong Hướng dẫn điều trị HIV mới nhất đã khuyến nghị theo dõi TLVR định kỳ (thực hiện trên tất cả bệnh nhân sau 6 tháng kể từ khi bắt đầu điều trị ARV, và sau đó ít nhất 12 tháng một lần) ở các nước thu nhập thấp và trung

bình [130]. Theo hướng dẫn của WHO, nhiều nước thu nhập thấp và trung bình, trong đó có Việt Nam đang tăng cường xét nghiệm TLVR, chuyển từ chỉ định xét nghiệm có mục đích sang xét nghiệm thường quy cho tất cả bệnh nhân điều trị ARV. Tuy nhiên, chúng ta phải đối mặt với nhiều thách thức trong việc tăng cường xét nghiệm TLVR, bao gồm việc thiếu kinh phí, cơ sở hạ tầng của các phòng xét nghiệm nghiệm hạn chế, thiếu cán bộ lâm sàng và cán bộ xét nghiệm chuyên môn cao, thiếu hiểu biết về giá trị theo dõi TLVR giữa các bác sĩ lâm sàng và bệnh nhân, đồng thời hệ thống vận chuyển bệnh phẩm yếu và phản hồi kết quả chậm [68], [106]. Trong năm 2015, chỉ có khoảng 22% bệnh nhân điều trị ARV trên toàn cầu (báo cáo dữ liệu từ 86 quốc gia) được thực hiện TLVR thường quy [165]. Như vậy, với tốc độ hiện tại, việc mở rộng xét nghiệm TLVR cho bệnh nhân điều trị ARV sẽ không đáp ứng nhu cầu vào năm 2020.

Xét nghiệm TLVR bằng phương pháp giọt máu khô (DBS) đang ngày càng được sử dụng phổ biến trong việc mở rộng xét nghiệm TLVR HIV tại Châu Phi và Châu Á. Ưu điểm của DBS là dễ thu thập, thuận tiện trong lưu trữ và vận chuyển hơn so với mẫu bệnh phẩm huyết tương [57]. DBS có thể được tiến hành thông qua việc chích ngón tay, do đó, loại bỏ các chi phí về ống lấy máu và ly tâm [87]. Mặt khác, mẫu bệnh phẩm DBS, một khi đã được sấy khô thì không còn được coi là nguy hiểm sinh học. Từ đó, các bệnh phẩm DBS có thể được lưu trữ và vận chuyển ở nhiệt độ môi trường với chi phí ít hơn so với vận chuyển bằng chuỗi lạnh ở bệnh phẩm huyết tương [114]. Không đòi hỏi phải thực hiện quy trình ly tâm, vận chuyển bằng dây truyền lạnh hoặc nhân viên thực hiện được đào tạo chuyên sâu, kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS có thể đơn giản hóa rất nhiều việc lưu mẫu và vận chuyển đến phòng xét nghiệm tham chiếu từ các địa điểm ở xa hoặc không có điều kiện thực hiện tại chỗ. Do đó, DBS có thể khắc phục việc thiếu năng lực

phòng thí nghiệm tại các cơ sở thiếu thôn trang thiết bị hoặc có điều kiện về nhân lực hạn chế. Mặc dù có nhiều ưu điểm, cách tiếp cận tốt nhất để theo dõi đáp ứng điều trị ARV bằng phương pháp TLVR DBS vẫn đang được xác định trên toàn thế giới. Ngưỡng thích hợp để xác định thất bại về vi rút học bằng DBS vẫn là một chủ đề tranh luận trên nhiều nghiên cứu [110]. Dựa trên những báo cáo của một tổng quan hệ thống từ 43 nghiên cứu, WHO gần đây đã khuyến nghị ngưỡng phát hiện thất bại điều trị bằng DBS là 1000 bản sao/mL [130]. Tuy nhiên, độ nhạy và độ đặc hiệu của DBS vẫn có sự khác biệt tùy thuộc vào nền tảng của xét nghiệm TLVR. Cụ thể, tính đặc hiệu của xét nghiệm DBS trong trường hợp người bệnh ở mức độ nhiễm vi rút thấp hơn đã được đặt câu hỏi, vì sao DBS có thể cho kết quả đếm TLVR ở mức cao hơn so với huyết tương thông qua việc phát hiện RNA HIV liên quan đến tế bào [114]. Hơn nữa, nhiều nghiên cứu kiểm tra việc thực hiện xét nghiệm DBS đã được thực hiện bằng cách sử dụng mẫu máu toàn bộ từ tĩnh mạch và đã được chuẩn bị trong phòng xét nghiệm và đã được kiểm soát thay vì dựa trên mẫu bệnh phẩm thu được trong điều kiện thực tế lâm sàng [130].

Tại Việt Nam, nghiên cứu của chúng tôi là một trong những nghiên cứu đầu tiên đánh giá việc thực hiện xét nghiệm TLVR bằng kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS so với phương pháp huyết tương đang được áp dụng thường quy tại các phòng khám HIV. Kết quả nghiên cứu kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS-PBS cho kết quả với độ nhạy 99,47% và độ đặc hiệu là 84,42% ở ngưỡng 1000 bản sao/mL. Ở ngưỡng 1000 bản sao/mL độ nhạy của chúng tôi cao hơn và độ đặc hiệu thấp hơn so với số liệu trong báo cáo của WHO với sinh phẩm này độ nhạy là 81,02% và độ đặc hiệu là 96,74% [116]. Tuy nhiên, độ đặc hiệu chỉ đạt là 53,95% ở ngưỡng 5000 bản sao/mL (bảng 3.12), điều này cho thấy, DBS sẽ có ý nghĩa thực tiễn cao hơn khi đo lường tải lượng vi rút sau điều trị ARV. Kết quả này tương đồng với một số nghiên cứu

đã được thực hiện trên thế giới. Tác giả Ning Tang và cộng sự nghiên cứu trên 497 bệnh nhân HIV tại Bờ Biển Ngà cho thấy độ nhạy của kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS có thể đạt 93% và độ đặc hiệu là 95% ở ngưỡng 1000 bản sao/ml theo khuyến cáo của WHO. Tương quan giữa xét nghiệm DBS và phương pháp huyết tương cũng đạt kết quả tốt với hệ số tương quan lần lượt là 0,896 và 0,901 ($p < 0,001$) [163]. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy mức độ tương quan giữa TLVR huyết tương và TLVR DBS-PBS có hệ số tương quan Pearson là 0,88 ở ngưỡng 1000 bản sao/mL được phân tích trên biểu đồ 3.13 ($p < 0,001$). Trong một nghiên cứu khác của Pieter Pannus và cộng sự thực hiện năm 2016 trên 272 người nhiễm HIV tại Bỉ, độ nhạy và độ đặc hiệu của ba kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS bao gồm Roche CAP/CTM, Abbott Realtime và bioMérieux NucliSENS nằm trong khoảng từ 76% - 80,8% và từ 87,3% - 92,9% [94]. Tại Ấn Độ, trong một nghiên cứu sử dụng kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS so sánh với phương pháp huyết tương sử dụng hệ thống Abbott m2000rt, Ujjwal Neogi đã báo cáo độ nhạy và độ đặc hiệu tuyệt đối 100% ở ngưỡng $>3.7 \log_{10}$ bản sao/mL. Tuy nhiên ở ngưỡng 2.17 đến 3 $\log_{10}$ bản sao/mL, độ nhạy đạt được chỉ là 50% [89]. Tại Việt Nam, một nghiên cứu trước đây được thực hiện bởi Fabien Taieb và cộng sự đã tiến hành so sánh kỹ thuật DBS được cung cấp bởi Roche có tên “free virus elution (FVE)” với 2 kỹ thuật TLVR huyết tương COBAS AmpliPrep TaqMan HIV-1v 2.0 và Abbott Real-time HIV-1. Nghiên cứu trên 198 bệnh nhân tại Bệnh viện Đống Đa, kết quả cho thấy ở ngưỡng 1000 bản sao/mL, độ nhạy và độ đặc hiệu là 93,3% và 94,8%, ở ngưỡng 3000 bản sao/mL, độ nhạy và độ đặc hiệu là 97,4% và 96,3% và ở ngưỡng 5000 bản sao/mL là 100% và 98,8% [117].

Các kết quả nghiên cứu đều cho thấy độ nhạy và độ đặc hiệu cao của kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS khi so sánh với phương pháp

TLVR huyết tương ở ngưỡng từ 1000 bản sao/mL trở lên. Đây cũng là ngưỡng khuyến cáo của Tổ chức Y thế giới trong xác định thất bại điều trị [68], [130]. Việc lựa chọn ngưỡng này đã ra nhiều cuộc tranh luận về việc liệu các mục tiêu mong muốn của việc theo dõi tải lượng vi rút thường xuyên, ở cả mức độ sức khỏe cá nhân và cộng đồng, có thể đạt được bằng cách sử dụng ngưỡng 1000 bản sao/ml hay không và liệu nó có chứng minh được là đây là mức tối ưu trên các nhóm bệnh nhân khác nhau như trẻ sơ sinh, trẻ em, thanh thiếu niên, và phụ nữ có thai và cho con bú hay không. Ở hầu hết các nước phát triển, mục tiêu của điều trị ARV là đạt được sự ức chế vi rút bền vững ở người nhiễm HIV, thường được xác định là dưới giới hạn phát hiện của xét nghiệm TLVR (ví dụ <20, <25, <37, <40 bản sao/ml), tuy nhiên nếu sử dụng kỹ thuật đo tải lượng vi rút bằng DBS thì không phát hiện được đến ngưỡng thấp này. Dữ liệu từ các nghiên cứu cho thấy rằng nồng độ vi rút trong máu ở mức độ thấp từ 50 đến 999 bản sao/mL trong thời gian dài có liên quan đến việc tăng nguy cơ đột biến kháng thuốc, trong đó phổ biến là M184I/V và K103N [119]. Điều này có thể ảnh hưởng tới hiệu quả của các phác đồ bậc 1 được sử dụng phổ biến tại các quốc gia có nguồn lực hạn chế. Một số nghiên cứu còn cho thấy mặc dù, nồng độ vi rút dưới ngưỡng 1000 bản sao/mL, người bệnh vẫn được ghi nhận là nguy cơ thất bại về virus học [111], ngay cả ở mức độ tải lượng vi rút rất thấp từ 50 đến 199 bản sao/mL trong ít nhất 6 tháng [66]. Tuy nhiên, kết quả từ các nghiên cứu ở các quốc gia đang phát triển lại cho thấy sự tương đồng với khuyến cáo của WHO. Mức tải lượng vi rút dưới 1000 bản sao/mL đã được chứng minh là giảm nguy cơ tiến triển bệnh và đồng thời giảm lây truyền của HIV [79]. Dữ liệu hiện có báo cáo rằng lây truyền qua đường tình dục là rất khó xảy ra với ngưỡng tải lượng vi rút <1700 bản sao/mL và thậm chí còn thấp hơn với ngưỡng tải lượng vi rút <400 bản sao/mL [101], [42], [70]. Ngoài ra, lây truyền từ mẹ

sang con chỉ giảm xuống còn khoảng 1% ở ngưỡng tải lượng vi rút <1000 bản sao/mL [54]. Như vậy có thể thấy rằng, sử dụng ngưỡng 1000 bản sao/mL có thể là tiêu chuẩn nhằm đem lại lợi ích cho cả cá nhân và sức khỏe cộng đồng, đồng thời đơn giản hóa cách tiếp cận theo dõi tải lượng vi rút thông thường.

Sử dụng kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS để xét nghiệm tải lượng vi rút là một phương pháp đầy hứa hẹn mang lại những lợi ích liên quan đến việc thu thập và xử lý mẫu bệnh phẩm. Đồng thời cho phép vận chuyển mẫu bệnh phẩm không cần chuỗi lạnh, tuy nhiên, việc sử dụng DBS cũng ảnh hưởng đến việc lựa chọn ngưỡng tải lượng vi rút trong đánh giá tiến triển điều trị. Các xét nghiệm tải lượng vi rút trong phòng thí nghiệm nhằm thích nghi với các mẫu bệnh phẩm DBS đặt ra những thách thức kỹ thuật cụ thể, có thể kể đến như độ nhạy thấp hơn do thể tích mẫu thấp hơn, sự khác biệt về hiệu quả của việc chiết xuất axit nucleic và sự hiện diện của các chất ức chế khuếch đại như hemoglobin [95]. Kết quả là, mức giới hạn của phát hiện nồng độ vi rút ở DBS cao hơn đáng kể so với TLVR huyết tương, ngay cả đối với cùng một xét nghiệm. Ngoài ra, khuếch đại DNA hoặc RNA liên quan đến tế bào trong DBS có thể làm giảm tính đặc hiệu của xét nghiệm này [95]. Các vấn đề cụ thể liên quan đến đo lường của kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS đã dẫn đến sự miễn cưỡng ban đầu khi sử dụng ngưỡng 1000 bản sao/mL. Do đó, hướng dẫn của WHO 2013 khuyến nghị xem xét ngưỡng từ 3000 đến 5000 bản sao/mL đối với các mẫu bệnh phẩm DBS [129]. Tuy nhiên, những tiến bộ trong công nghệ, cũng như sự xuất hiện của các quy trình khuếch đại và khuếch đại đặc hiệu RNA đã cải thiện tính đặc hiệu của DBS trong đo lường TLVR HIV [171]. Hơn nữa, một tổng quan hệ thống đã chứng minh hiệu suất chấp nhận được đối với DBS so với huyết tương ở hầu hết các công nghệ khác nhau trong ngưỡng 1000 bản sao/mL [130]. Do đó, các hướng dẫn gần đây của WHO đã khuyến nghị ngưỡng 1000

bản sao/mL nhằm đo lường TLVR bằng DBS trên hầu hết các nền tảng xét nghiệm [130], [171]. Ngưỡng này được khuyến nghị cho tất cả các phương pháp đo lường TLVR, dù sử dụng phương pháp huyết tương hay DBS, nhằm đơn giản hóa quy trình đạo tạo và cho phép thực hiện theo dõi tải lượng vi rút một cách nhất quán và chính xác. Tuy nhiên, bổ sung dữ liệu và kết quả nghiên cứu về hiệu suất của mẫu DBS sử dụng ngưỡng tải lượng virus là 1000 bản sao/mL trong theo dõi TLVR thường quy, cũng kết quả điều trị của người bệnh sử dụng ngưỡng này trên thực tế là cần thiết nhằm đưa ra khuyến cáo chính xác nhất.

Kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS-PBS có độ nhạy là 99,47%, độ đặc hiệu đạt 84,42% ở ngưỡng 1000 bản sao/mL, có sự tương quan giữa TLVR huyết tương và TLVR DBS-PBS cho hệ số tương quan Pearson là $r = 0,88$ được phân tích trên biểu đồ 3.20 ($p < 0,001$). Như vậy có thể thấy rằng, vẫn còn nhiều hạn chế trong sử dụng DBS nhằm đánh giá tiến triển về TLVR và thất bại điều trị. Việc sử dụng kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS cần cân nhắc tính chi phí – hiệu quả - hiệu suất trong từng điều kiện cụ thể. Ví dụ, các cơ sở tuyến dưới không có điều kiện về trang thiết bị để đo lường TLVR có thể sử dụng DBS nhằm giảm thiểu chi phí vận chuyển và lưu trữ. Tuy nhiên, ở các cơ sở tuyến tỉnh hoặc Trung ương với trang thiết bị và nhân lực đầy đủ, TLVR huyết tương vẫn được khuyến cáo sử dụng như tiêu chuẩn vàng trong đánh giá tiến triển điều trị và chẩn đoán thất bại điều trị ở người bệnh HIV được điều trị ARV.

4.4. Kết quả theo dõi điều trị và các yếu tố liên quan

4.4.1. Theo dõi tải lượng vi rút thường quy

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy các bệnh nhân được điều trị có đáp ứng tốt về tải lượng vi rút ở mức rất cao. Trung vị tải lượng vi rút của bệnh nhân đã giảm xuống dưới ngưỡng phát hiện ngay trong 6 tháng đầu điều

trị ARV. Tỷ lệ bệnh nhân đạt mức ức chế vi rút dưới ngưỡng phát hiện (< 20 bản sao/ml) sau 36 tháng điều trị lên tới 92,64% (biểu đồ 3.5). Kết quả này cao hơn so với một số nghiên cứu tại Hoa Kỳ và Châu Âu khi tỷ lệ đạt ức chế vi rút chỉ từ 58 – 85% [73, 76]. Tại Việt Nam, nghiên cứu của Suresh Rangarajan thực hiện trên 1255 bệnh nhân người lớn điều trị ARV ít nhất 1 năm tại 4 tỉnh báo cáo tỷ lệ bệnh nhân đạt mức tải lượng vi rút < 1000 bản sao/mL là 93%, cao hơn so với kết quả nghiên cứu này [160]. Một nghiên cứu khác được thực hiện bởi Vũ Quốc Đạt và cộng sự trên 365 người bệnh điều trị tại 16 phòng khám ngoại trú trên toàn quốc đã báo cáo tỷ lệ ức chế vi rút sau 36 tháng là 95,1% [34]. Nghiên cứu của Junko Tanuma và cộng sự thực hiện năm 2017 cũng cho thấy kết quả tương tự khi tỷ lệ người bệnh đạt mức TLVR dưới ngưỡng phát hiện sau 12 tháng là 95,5% [121]. Tuy nhiên, ngưỡng phát hiện trong các nghiên cứu này là 1000 bản sao/mL, cao hơn rất nhiều so với ngưỡng phát hiện là 20 bản sao/mL của bộ sinh phẩm mà chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu. Tại các quốc gia phát triển, các nghiên cứu cho thấy tỷ lệ người bệnh HIV điều trị ARV có TLVR đạt dưới ngưỡng phát hiện thấp hơn. Nghiên cứu tại Hoa Kỳ từ 1997 – 2015 báo cáo tỷ lệ dưới ngưỡng của 31.390 bệnh nhân điều trị kháng vi rút là 32% năm 1997 và đạt mức 86% năm 2015 [123]. Tại Canada, nghiên cứu của James Wilton và cộng sự thực hiện từ 2000 đến 2015 báo cáo tỷ lệ đạt được chỉ là 79,5% [131]. Tại Thụy Sĩ, tỷ lệ ghi nhận được trên cơ sở dữ liệu của 15.200 người nhiễm HIV năm 2012 là 68% [63]. Các quốc gia có nguồn lực hạn chế lại báo cáo tỷ lệ ức chế vi rút tốt hơn. Tại Nam Phi, một trong những quốc gia có gánh nặng HIV/AIDS cao nhất trên thế giới đã báo cáo tỷ lệ người bệnh đạt ức chế vi rút trong một nghiên cứu trên 5649 người bệnh là 93,1% [51]. Tại khu vực châu Mỹ - Latin, nghiên cứu tại Brazil báo cáo tỷ lệ này là 90% [41]. Khu vực châu Á – Thái Bình Dương đặc biệt là tại khu vực Đông Nam Á là khu vực có dịch HIV phát triển

nhANH NHẤT TRONG VÒNG 10 NĂM TRỞ LẠI ĐÂY ghi nhận tỉ lệ ức chế vi rút ở bệnh nhân điều trị ARV đạt hiệu quả cao. Trong đó, tại Trung Quốc, tỉ lệ người bệnh có TLVR ở dưới ngưỡng phát hiện là 91%, tại Malaysia là 92% và tại Thái Lan là 96% [41].

Trong thập kỷ trước, việc mở rộng điều trị ARV ở các nước có nguồn lực hạn chế đòi hỏi cách tiếp cận đơn giản [26]. Do năng lực phòng thí nghiệm không đáp ứng đủ, nên nhiều chương trình đã giảm thiểu việc theo dõi đáp ứng điều trị bằng xét nghiệm [96] nhằm tối ưu cho việc mở rộng điều trị. Đặc biệt, việc đánh giá nồng độ RNA HIV-1 (tải lượng vi rút) - được thực hiện thường xuyên để theo dõi bệnh nhân nhiễm HIV ở các nước có thu nhập cao - không được khuyến cáo sử dụng tại các nước có nguồn lực hạn chế theo Hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới năm 2003 [74]. Thiết bị để xác định tải lượng vi rút thường không có hoặc không sử dụng. Nếu có sẵn thiết bị xét nghiệm, việc kiểm tra tải lượng virus rất tốn kém: một xét nghiệm tải lượng vi rút có giá từ \$20 đến \$160 (đô la Mỹ). Bên cạnh đó, phần lớn những người nhiễm HIV vẫn không thể tiếp cận được điều trị do nguồn tài chính còn hạn chế nên người ta cho rằng cần áp dụng các biện pháp phòng ngừa và bắt đầu điều trị hơn là thực hiện các xét nghiệm đắt tiền nhằm theo dõi bệnh nhân đang điều trị [62]. Tuy nhiên, với sự phát triển của trang thiết bị kỹ thuật cùng nguồn lực cho HIV ngày càng tăng, TLVR đã dần trở thành một tiêu chuẩn vàng trong theo dõi và đánh giá đáp ứng điều trị kháng vi rút ở người nhiễm HIV/AIDS. Hướng dẫn mới nhất của Tổ chức Y tế thế giới đã khuyến cáo theo dõi tải lượng vi rút thường quy, cùng với xét nghiệm CD4 và các đánh giá lâm sàng [172]. Các nghiên cứu ở nhiều nước trên thế giới cũng đã chỉ ra xét nghiệm tải lượng vi rút thường quy có hiệu quả cao trong việc giảm thiểu các gánh nặng điều trị cho các bệnh nhân nghi thất bại điều trị do tránh được chuyển đổi phác đồ quá sớm nếu chỉ dựa vào dấu hiệu thất bại về miễn dịch

[21, 23, 147, 148, 153]. Tổ chức Y tế thế giới khuyến cáo xét nghiệm TLVR cần được thực hiện cho tất cả người bệnh đang điều trị ARV sau 6 tháng và tối thiểu 12 tháng/1 lần. Cách tiếp cận này nhằm đảm bảo các bác sĩ lâm sàng có thể đưa ra chỉ định sớm hơn, bao gồm hỗ trợ và nâng cao tuân thủ điều trị chuyển đổi phác đồ điều trị. Hầu hết các quốc gia chỉ có thể đủ khả năng cung cấp ART bậc một và hai, điều này thể hiện một bước quan trọng để đạt được sự công bằng hơn trong cung cấp dịch vụ điều trị HIV ở các nước phát triển và các quốc gia có nguồn lực hạn chế. Theo dõi TLVR sẽ giúp kéo dài thời gian sử dụng các phác đồ đầu tiên, ngăn ngừa sự xuất hiện kháng thuốc và kéo dài tuổi thọ cho người nhiễm HIV được điều trị bằng thuốc ARV [109]. Mặt khác, điều này còn giúp giảm gánh nặng thăm khám cho bệnh nhân và nhân viên y tế, khi các bệnh nhân có TLVR ở dưới ngưỡng phát hiện có thể nhận thuốc trong khoảng thời gian dài hơn và yêu cầu thăm khám ít thường xuyên hơn [105]. Tuy nhiên, tính đến thời điểm hiện tại, theo dõi TLVR thường quy vẫn có nhiều thách thức, trong đó đáng kể nhất là chi phí vận hành và thiếu hụt trang thiết bị và nhân lực y tế tại các khu vực có nguồn lực hạn chế. Điều này đòi hỏi, các nhà chính sách cần nghiên cứu các giải pháp đồng bộ và phù hợp với từng cấp độ của hệ thống chăm sóc sức khỏe và nguồn lực địa phương [107]. Việt Nam đã triển khai theo dõi tải lượng vi rút thường quy cho người nhiễm HIV trên toàn quốc từ 2018. Tuy nhiên, nhiều cơ sở điều trị chưa thể tự thực hiện xét nghiệm và phải chuyển gửi mẫu đến các cơ sở có năng lực thực hiện. Điều này có thể làm giảm tính nhanh chóng và kịp thời của xét nghiệm TLVR trong việc điều trị cho bệnh nhân, đồng thời gia tăng các chi phí vận chuyển và lưu mẫu. Trong bối cảnh hiện tại, các chiến lược xét nghiệm tại chỗ và phương pháp giọt máu khô có thể được cân nhắc nhằm giảm thiểu các hạn chế này [36], [144]

Tỉ lệ cao (>90%) bệnh nhân trong nghiên cứu đạt mức ức chế vi rút sau 36 tháng điều trị ARV cho thấy hiệu quả của chương trình điều trị tại Việt Nam và triển vọng đáp ứng được các mục tiêu 90 – 90 – 90 mà Bộ Y tế đề ra. Số liệu được tính toán trên 515 người bệnh còn lại trong nghiên cứu tính đến thời điểm 36 tháng (loại trừ 133 trường hợp tử vong/mất dấu hoặc chuyển đi) (bảng 3.10). Nếu ước tính trên 648 người bệnh bắt đầu điều trị từ thời điểm ban đầu thì tỉ lệ người bệnh đạt ức chế TLVR chỉ ở mức 73,8% (478/648 trường hợp). Thời gian để đạt được mục tiêu này trong điều kiện điều trị tại Bệnh viện Bạch Mai có thể mất từ 12 tháng điều trị trở lên. Một trong những nguyên nhân hàng đầu ảnh hưởng đến việc đáp ứng muộn ở bệnh nhân là do tình trạng bệnh nhân đăng ký khám và điều trị ở giai đoạn muộn. Có tới trên 60% bệnh nhân có HIV tiến triển và xấp xỉ 50% có các nhiễm trùng cơ hội nghiêm trọng tại thời điểm trước điều trị. Kết quả nghiên cứu gợi ý rằng, không chỉ cải thiện chất lượng điều trị mà các can thiệp nhằm phát hiện sớm nhiễm HIV và chuyển gửi điều trị trong thời gian sớm nhất là vấn đề cần được ưu tiên trong giai đoạn tới để đạt được mục tiêu 90 – 90 – 90.

4.4.2. Các yếu tố liên quan đến ức chế tải lượng vi rút

Phân tích từ mô hình hồi quy logistic cho thấy, mắc các nhiễm trùng cơ hội, và suy giảm miễn dịch nặng nề trước điều trị có liên quan đến việc đáp ứng vi rút học kém hơn. Cụ thể, các bệnh nhân có số lượng tế bào lympho T-CD4<200 tế bào/mm³ và ở giai đoạn lâm sàng 3 hoặc 4 có nguy cơ không đạt mức ức chế vi rút cao hơn gấp 1,43 – 3,41 lần so với các nhóm bệnh nhân còn lại (nhóm có số lượng tế bào lympho T-CD4≥200 tế bào/mm³, giai đoạn lâm sàng 1 và 2 (bảng 3.16) ($p<0,001$). Điều này phản ánh chính xác các kết luận từ các nghiên cứu trên thế giới khi tải lượng vi rút >100.000 bản sao/mL có sự liên quan chặt chẽ tới việc suy giảm số lượng tế bào CD4 và tiến triển tới giai đoạn AIDS ở bệnh nhân HIV/AIDS. Nghiên cứu của các tác giả Rangarajan

và Tanuma cũng báo cáo kết quả tương tự khi các bệnh nhân có HIV tiến triển có đáp ứng điều trị thấp hơn đáng kể [102], [121]. Đây là kết quả của việc phát hiện và đăng ký điều trị muộn của bệnh nhân. Nhiều nghiên cứu tại Việt Nam đã cho thấy, mặc dù tiêu chuẩn điều trị ARV đã được mở rộng nhanh chóng trong thời gian gần đây, nhưng người bệnh đăng ký điều trị muộn vẫn chiếm tỉ lệ cao. Kết quả này có thể giải thích do sự kết hợp giữa các yếu tố xã hội, bao gồm lo sợ kỳ thị và phân biệt đối xử và tình trạng lâm sàng [121]. Điều này cần được cải thiện nhanh chóng, đặc biệt trong bối cảnh Việt Nam triển khai ARV tới tuyến huyện với điều kiện cơ sở vật chất và trình độ chuyên môn thấp hơn so với các cơ sở điều trị tuyến Trung ương. Một số các yếu tố khác liên quan tới đáp ứng về tải lượng vi rút ở bệnh nhân bao gồm giới tính và tình trạng dinh dưỡng. Nam giới có xu hướng đáp ứng vi rút kém hơn so với nữ giới, đồng thời, các bệnh nhân thiếu cân ($BMI < 18,5$) cũng có đáp ứng tải lượng vi rút thấp hơn so với các bệnh nhân có BMI ở mức bình thường. Kết quả này không tương đồng so với nghiên cứu của Suresh Rangarajan và cộng sự thực hiện năm 2016 khi xác định giới tính không có sự liên quan đến ức chế TLVR ở người bệnh [102]. Điều này có thể lý giải do sự khác biệt về đường lây truyền, khi phần lớn nam giới trong nghiên cứu của chúng tôi lây truyền qua tiêm chích ma túy, còn ở nữ giới chủ yếu là lây truyền qua đường quan hệ tình dục với bạn tình/chồng là người nhiễm HIV và có thể phụ nữ tuân thủ chế độ điều trị tốt hơn so với bệnh nhân nam. Tình trạng dinh dưỡng đóng vai trò quan trọng trong điều trị người nhiễm HIV/AIDS khi hội chứng suy kiệt là một trong những nguyên nhân gây tử vong hàng đầu ở bệnh nhân HIV tại Việt Nam [30]. Kết quả này cho thấy, tư vấn dinh dưỡng và cải thiện cân nặng của bệnh nhân cần được chú ý hơn bởi các cán bộ lâm sàng trong quá trình điều trị. Tuân thủ điều trị là yếu tố quan trọng liên quan đến đáp ứng vi rút ở người nhiễm HIV. Tuy nhiên, trong

ngiên cứu của chúng tôi, không có sự khác biệt về ức chế tải lượng vi rút giữa các mức tuân thủ điều trị ở người bệnh. Điều này có thể lý giải do công tác tư vấn và hỗ trợ tuân thủ điều trị tốt tại Bệnh viện Bạch Mai, trong đó phần lớn người bệnh đều có tuân thủ tốt, do đó, không có sự khác biệt đáng kể khi đánh giá đáp ứng điều trị.

4.5. Đột biến kháng thuốc

4.5.1. Tỷ lệ kháng thuốc

Trong nghiên cứu của chúng tôi, có 16 trường hợp thất bại điều trị ARV phải chuyển sang phác đồ bậc 2, 100% bệnh nhân có thất bại điều trị đều có kháng ít nhất với một thuốc điều trị. Trên 16 bệnh nhân trong cả 2 nhóm quan sát được giải trình tự gen kháng thuốc, tỉ lệ kháng thuốc ghi nhận được rất cao ở nhóm NNRTI, trong đó, EFV và NVP có tỉ lệ kháng 81,3% (biểu đồ 3.22). Ở nhóm NRTI, các thuốc 3TC, ABC đều có tỉ lệ kháng cao. Hầu hết các thuốc nhóm PI đều không ghi nhận có kháng thuốc, với chỉ 3 trường hợp mang đột biến kháng (bảng 3.13). Tại các quốc gia có nguồn lực hạn chế, hầu hết các nghiên cứu về kháng thuốc ARV đều được thực hiện trên các người bệnh có thất bại điều trị, thất bại miễn dịch hoặc lâm sàng do sự không sẵn có của theo dõi TLVR thường quy. Trên thế giới, tỉ lệ kháng thuốc ghi nhận tại Malawi là 93% trong nghiên cứu của Hosseinipour và cộng sự năm 2009 [50], tại Thái Lan là 95% theo nghiên cứu của Bunupuradah T và cộng sự thực hiện năm 2007 và 79% trong nghiên cứu của Chasombat S năm 2011 [140, 143]. Tại khu vực Mỹ - La tinh, các nghiên cứu tại Brazil và Panama báo cáo tỉ lệ lần lượt là 78% và 73% trong nghiên cứu của Inocêncio LA năm 2010 và Arteaga G cũng trong năm 2010 [150], [138]. Tại châu Âu, kết quả ghi nhận được tại Bulgaria là 70,1% và tại Ý là 81% [35]. Tại Việt Nam, nghiên cứu tại TP. Hồ Chí Minh được thực hiện bởi Nguyễn Hữu Chí cho thấy tỉ lệ kháng thuốc trên nhóm bệnh nhân có chẩn đoán thất bại lâm

sàng hoặc miễn dịch là 97,2% [52]. Một nghiên cứu khác của Trương Thị Xuân Liên báo tỉ lệ thấp hơn là 87,9% trên nhóm đối tượng người lớn [53] và 63% trên nhóm đối tượng trẻ em trong nghiên cứu của Võ Thị Thanh Nhân [167].

Tại Hoa Kỳ, tỉ lệ đề kháng chung trên nhóm bệnh nhân điều trị ARV lên đến 47,9% trong một nghiên cứu thực hiện trong năm 2002 [104]. Tại Vương Quốc Anh (United Kingdom), tỉ lệ được xác định là 17% trong nghiên cứu của D. Pillay và cộng sự cũng thực hiện trong năm 2002 [97]. Tuy nhiên, tại các quốc gia đang phát triển hoặc có nguồn lực hạn chế, tỉ lệ kháng thuốc trên bệnh nhân HIV được điều trị ARV được báo cáo thấp hơn. Nghiên cứu tại Nam Phi báo cáo tỉ lệ là 4,3%, tại Campuchia là 6,7%, tại CHDCND Congo là 7,7%, tại Bờ Biển Ngà là 14,2% và tại Ấn Độ là 11,3% [162], [158], [145], [45], [146]. Có thể thấy rằng, tỉ lệ kháng thuốc hiện mắc ở các nước phát triển cao hơn đáng kể so với các quốc gia đang phát triển. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỉ lệ kháng thuốc chung trên cả 2 nhóm bệnh nhân là 2,47% (16/648 bảng 3.13). Điều này có thể lý giải do các quốc gia phát triển có tỉ lệ kháng thuốc lây truyền rất cao. Nghiên cứu tại Hoa Kỳ cho thấy kháng thuốc lây truyền thấp nhất là 3,4% và có thể lên đến 26% trong một số nghiên cứu [48, 53, 56, 69, 118]. Trong một nghiên cứu khác tại 17 nước thuộc châu Âu, tỉ lệ kháng thuốc lây truyền được báo cáo là 9,1% [115]. Ngoài ra, một số nghiên cứu đơn lẻ khác tại Pháp và Ý cho thấy tỉ lệ khá cao, lần lượt là 11% và 15% [32], [68]. Tại Bỉ, tỉ lệ được ghi nhận lên tới 29% trong nghiên cứu của Van Vaerenbergh và cộng sự thực hiện năm 2011 [127]. Các nghiên cứu thực hiện tại Burkina Faso, Bờ Biển Ngà, Senegal, Trung Quốc hầu hết đều báo cáo tỉ lệ dưới 5% [19, 133, 162]. Tại Việt Nam, một số nghiên cứu được thực hiện trong giai đoạn trước cũng cho thấy tỉ lệ thấp dưới 5%, bao gồm nghiên cứu của Ishizaki A thực hiện tại Hải Phòng năm 2008 (2,6%)[56],

ngiên cứu của Nguyễn Trần Hiền tại Hà Nội năm 2008 (1,5%) [92] và nghiên cứu của Trương Thị Xuân Liên tại TP. Hồ Chí Minh năm 2010 (2,7%) [6]. Tất cả đều nằm trong ngưỡng thấp theo phân loại của Tổ chức Y tế Thế giới ($<5\%$). Chỉ có một báo cáo tỉ lệ lớn hơn 5%, tuy nhiên nghiên cứu này ở nhóm bệnh nhân đặc biệt là bệnh nhân HIV có lao màng não [164]. Tỷ lệ kháng thuốc lây truyền cao ở các nước phát triển có thể được giải thích bởi thực tế là bệnh nhân ở các quốc gia này được tiếp cận điều trị bằng thuốc kháng vi rút sớm hơn so với các nước đang phát triển. Như vậy, các bệnh nhân thời gian uống thuốc với thuốc kéo dài hơn và sử dụng nhiều loại thuốc hơn. Sau đột biến kháng thuốc, những bệnh nhân này tiếp tục truyền các chủng HIV kháng thuốc ra cộng đồng, gây kháng thuốc lan rộng. Ở những bệnh nhân đã có kháng thuốc lan truyền trước điều trị, thuốc không kiểm soát được sự sao chép của HIV, do đó tiếp tục chọn lọc thêm các đột biến kháng thuốc và gây ra thất bại điều trị. Tuy nhiên, tỷ lệ kháng thuốc lây truyền đang giảm ở các nước đang phát triển, cùng với đó xu hướng giảm tỷ lệ kháng thuốc mới mắc, do sử dụng các phác đồ HAART ngay từ đầu được theo dõi điều trị chặt chẽ, chuyển phác đồ sớm và xét nghiệm kháng thuốc trước điều trị [44, 56, 155]. Nghiên cứu của Gill và cộng sự thực hiện ở Anh cho thấy tỉ lệ kháng thuốc đã giảm đáng kể gấp > 12 lần trong khoảng thời gian từ 1997 đến 2008 [44].

Tại Việt Nam, các phác đồ điều trị bậc một hiện nay bao gồm 3 thuốc ARV, trong đó, hai thuốc nhóm NRTI và 1 thuốc nhóm NNRTI. Đó đó, nếu đề kháng đồng thời cả hai nhóm thuốc này sẽ làm vi rút không bị ức chế và tiếp tục nhân lên, gây ra trước tiên là thất bại vi rút, sau đó đến biểu hiện thất bại miễn dịch và lâm sàng. Nếu sự nhân lên của HIV không được ức chế hoàn toàn sau điều trị, hoặc nếu không thể chuyển phác đồ điều trị do bị hạn chế lựa chọn, bệnh nhân kháng đồng thời NRTI và NNRTI có thể có nguy cơ xuất

hiện thêm các đột biến đề kháng các thuốc ARV khác [88]. Điều này gây các khó khăn trong việc xây dựng phác đồ thích hợp để kiểm soát sự nhân lên của HIV. Cuối cùng, vì các chủng HIV có thể được lan truyền cho các bệnh nhân khác [24], do đó kháng đồng thời NRTI và NNRTI có thể ảnh hưởng đến điều trị và kết quả lâm sàng với những người nhiễm HIV mới. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỉ lệ bệnh nhân có kháng cả NNRTI và NRTI là 100% (kháng ít nhất một thuốc trong 2 nhóm) trong số 16 bệnh nhân có thất bại điều trị. Tỉ lệ này cao hơn so với kết quả từ nghiên cứu tại Thành phố Hồ Chí Minh của Trịnh Thị Xuân Liên với tỉ lệ ghi nhận là 87,9% [6].

Kháng PI rất hiếm, trong nghiên cứu không phát hiện trường hợp mang đột biến kháng PI. Tỉ lệ này thấp hơn đáng kể so với các nghiên cứu được thực hiện tại châu Âu và châu Mỹ. Lý giải cho vấn đề này có thể do các thuốc nhóm PI ít được sử dụng ở Việt Nam, do phần lớn các thuốc PI đều nằm trong phác đồ bậc 2 với chi phí cao hơn và không có sẵn tại nhiều phòng khám HIV. Tỷ lệ kháng cả 3 nhóm thuốc được báo cáo trong nghiên cứu của Richman và cộng sự năm 2004 là 13% ở bệnh nhân HIV tại Hoa Kỳ. Nghiên cứu lấy mẫu ngẫu nhiên từ 1797 bệnh nhân đại diện cho trên 13000 bệnh nhân nhiễm HIV bắt đầu điều trị trong 3 năm từ 1996-1998 [104]. Cũng tại Hoa Kỳ, Napravnik S và cộng sự báo cáo kết quả là 8% khi nghiên cứu trên 1587 bệnh nhân năm 2006 [157]. Tại Canada, Cheung và cộng sự đã tiến hành tổng kết các kết quả kháng thuốc của các bệnh nhân thất bại điều trị trong 8 năm từ 1996 – 2003, tỷ lệ kháng đồng thời NNRTI và NRTI là được ghi nhận là 7% [33]. Tại Anh, tỉ lệ này được công bố là 4% trong nghiên cứu của Phillips và cộng sự năm 2005 [99] , và 6,6% trong nghiên cứu của tác giả Jones và cộng sự năm 2008 [59]. Tại Ý, Zaccarelli và cộng sự tiến hành nghiên cứu thuần tập trên 623 bệnh nhân thất bại vi rút học trong 4 năm từ 6/1999 đến 6/2002; kết quả cho thấy có khoảng 50% bệnh nhân có đề kháng ít

nhất một nhóm thuốc ARV và kháng đồng thời hai nhóm là 3,9% [136]. Điều này có thể được giải thích bởi thực tế là tại các nước phát triển, việc điều trị ARV đã được bắt đầu từ rất sớm, với các phác đồ ban đầu chỉ bao gồm một hoặc hai loại thuốc ARV (trong đó có bao gồm các thuốc nhóm PI). Tuy nhiên, kể từ khi thực hiện chiến lược ARV hoạt tính cao (HAART), với sự kết hợp của ba thuốc ARV khi bắt đầu điều trị, tỉ lệ kháng PI và kháng cả 3 nhóm thuốc đã cho thấy xu hướng giảm xuống đáng kể. Nghiên cứu của Phillips và cộng sự năm 2007 thực hiện theo dõi dọc 7916 bệnh nhân đã báo cáo tỉ lệ thất bại điều trị với phác đồ ba thuốc thuộc ba nhóm khác nhau ở Anh đã giảm dần theo thời gian [100]. Một nghiên cứu khác thực hiện năm 2008 tại Tây Ban Nha đã cho thấy tỉ lệ kháng cả 3 nhóm thuốc giảm một nửa từ 2002 – 2005 (từ 83% xuống 46%) [151].

Trong nghiên cứu của chúng tôi sau 36 tháng điều trị, có 16/648 bệnh nhân có xuất hiện gen kháng thuốc (tỉ lệ 2,47%). Tỉ suất ghi nhận được là 9,5/1000 bệnh nhân/năm ở nhóm có theo dõi TLVR thường quy và 6,7/1000 bệnh nhân/năm ở nhóm chứng (bảng 3.13). Kết quả này tương đồng với kết quả từ nghiên cứu của Trần Phương Thúy thực hiện tại Bệnh viện Bệnh Nhiệt Đới Trung ương năm 2012 với tỉ lệ ghi nhận được là 9,63/1000 bệnh nhân/năm. So với nghiên cứu trên thế giới, kết quả của chúng tôi có tỉ suất mới mắc thấp hơn. Nghiên cứu của Hira và cộng sự thực hiện năm 2004 ở Ấn Độ báo cáo tỷ lệ mới mắc kháng 2 nhóm NNRTI và NRTI là 44/1000 bệnh nhân-năm điều trị, và tỷ lệ mới mắc đề kháng PI là 32/1000 bệnh nhân/năm điều trị [149]. Tỉ suất mới mắc đóng vai trò trong việc dự báo nhu cầu điều trị ARV bậc 2 tại các phòng khám ngoại trú. Ví dụ như, nếu năm 2016 có 100.000 người được điều trị ARV bậc 1 và chưa có đề kháng thuốc, chưa bao gồm số lượng được điều trị tăng thêm mỗi năm, thì năm đến năm 2017, tỉ suất mới mắc gợi ý có 9300 trường hợp có xuất hiện kháng thuốc và cần chuyển

sang các phác đồ mới. Như vậy có thể thấy rằng, tỉ suất mới mắc có thể giúp cho việc lập kế hoạch dự trữ và cung ứng thuốc điều trị bậc hai cho hệ thống các điểm điều trị ARV được kịp thời và chủ động hơn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng nhận thấy, trong số 16 bệnh nhân có mang chủng HIV đột biến kháng thuốc nhóm NNRTI thì có tới 15 bệnh nhân cũng đồng thời có xuất hiện đột biến của HIV đề kháng thuốc nhóm NRTI (bảng 3.15), mặc dù các đột biến này không có đặc tính gây đề kháng chéo giữa hai nhóm thuốc. Như vậy, một khi quần thể HIV ở một bệnh nhân có sự xuất hiện đột biến đề kháng với một nhóm thuốc thì sẽ rất mau chóng có đột biến kháng với nhóm thuốc kia. Do vậy, hầu hết bệnh nhân có HIV đề kháng thuốc sẽ có đề kháng đồng thời hai nhóm thuốc NRTI và NNRTI, cũng đồng nghĩa với việc cần được chuyển đổi sang một phác đồ ARV bậc hai. Sau 36 tháng theo dõi, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy có 2 trường hợp kháng cả 3 nhóm thuốc NRTI, NNRTI và PI được phát hiện trong nhóm bệnh nhân theo dõi tải lượng vi rút định kỳ (bảng 3.15). Kết quả này thấp hơn đáng kể so với các nghiên cứu khác trên thế giới. Tỉ suất mới mắc cả 3 nhóm thuốc trong nghiên cứu của Napravnik S và cộng sự thực hiện năm 2007 tại Hoa Kỳ là 13/1000 bệnh nhân/năm điều trị ARV [157]. Một nghiên cứu khác của Gill và cộng sự thực hiện năm 2010 ở Anh đã báo cáo tỷ lệ mới mắc cả 3 nhóm thuốc là 207 trường hợp/1000 người-năm trong năm 1996 và giảm xuống còn 15,6 trường hợp/1000 người/năm sau 12 năm tại thời điểm 2008 [44]. Các nghiên cứu của Phillips và cộng sự năm 2007 [100], Mascolini M và cộng sự năm 2008 [151] và Gill và cộng sự (2010) [35] cũng cho thấy các kết quả tương tự: hiệu quả về giảm tỷ lệ thất bại điều trị và tỷ lệ kháng nhiều nhóm thuốc ở châu Âu, đồng thời phản ánh sự tiến bộ của thực hành điều trị trong giai đoạn hiện nay. Tại Việt Nam, tỉ lệ thấp tình trạng kháng 3 nhóm thuốc hiện nay tạo điều kiện thuận lợi hơn cho việc lựa chọn phác đồ bậc hai cho bệnh nhân thất bại với

phác đồ bậc một. Tuy nhiên, theo dõi đáp ứng điều trị và phát hiện sớm kháng thuốc vẫn cần được khuyến cáo do nguồn cung cấp và sự đa dạng các thuốc bậc 2 vẫn còn khá hạn chế tại Việt Nam.

4.5.2. Gen đột biến kháng thuốc

Đột biến M184V gặp với tỷ lệ rất cao, chiếm 56,25% (9/16) (biểu đồ 3.16) trong số bệnh nhân có đột biến kháng NRTI, có thể do tất cả các phác đồ bậc một chúng ta đang sử dụng đều có lamivudine là thuốc chọn lọc đột biến này. Tỷ lệ đột biến M184V trong số bệnh nhân thất bại virus là 67% trong nghiên cứu của Võ Thị Thanh Nhân năm 2010 [167] và 86% trong nghiên cứu của Trương Thị Xuân Liên [6]. Các nghiên cứu trên bệnh nhân HIV chưa điều trị ở Miền Bắc Việt Nam đều không phát hiện thấy đột biến này trong quần thể bệnh nhân nghiên cứu (Nguyễn Trần Hiền - 2008 [92] và Ishizaki A - 2009) [55]. Lamivudin là thuốc được sử dụng rất nhiều ở Việt nam để điều trị viêm gan B mạn tính là một bệnh có tỷ lệ mắc cao trong dân số. Thuốc này được coi là có hàng rào kháng thuốc kém và có tỷ lệ kháng thuốc cao rất nhanh sau khi bắt đầu điều trị viêm gan B mạn tính, lên tới 14-32% sau 1 năm điều trị [156]. Tuy nhiên kháng lamivudin trong điều trị HIV/AIDS do đột biến M184V xuất hiện chậm hơn nhiều so với trong điều trị viêm gan virus B, với tỷ lệ mới mắc trong nghiên cứu này là 29/1000 người/năm. Có thể lý giải do việc dùng kết hợp 3 thuốc và với liều cao hơn trong điều trị viêm gan B. Tỷ lệ cao đột biến M184V cũng khác biệt rõ rệt với nghiên cứu của Liying Ma (2007), nghiên cứu tại Trung Quốc trên 16 bệnh nhân thất bại điều trị được giải mã gen, không phát hiện trường hợp nào có đột biến M184V, do phác đồ điều trị trước thất bại đều không có lamivudine [72], nên không có áp lực của thuốc này để chọn lọc đột biến M184V. Một số nghiên cứu khác ở Trung Quốc trên bệnh nhân được điều trị bậc một với AZT-ddI-NVP cũng không phát hiện đột biến này [135].

Các đột biến đề kháng NRTI trong đó đột biến K65R có vai trò trong đề kháng tenofovir chiếm tỷ lệ 31,25% (5/16 bệnh nhân HIV mang đột biến kháng (biểu đồ 3.16). Tenofovir cũng ít bị đề kháng nhất trong các thuốc nhóm NRTI. Điều này thuận lợi cho việc điều trị ARV trong giai đoạn sắp tới, vì với Quyết định sửa đổi và bổ sung Hướng dẫn 2009 của Bộ y tế về điều trị HIV/AIDS (tháng 11/2011) [1], Tenofovir đã trở thành thuốc được ưu tiên lựa chọn cho các phác đồ ARV bậc một. Tuy nhiên khi tenofovir được sử dụng rộng rãi, cũng sẽ có nguy cơ kháng thuốc trong những năm tới.

Các đột biến đề kháng NNRTI hay gặp nhất là K103N (11 bệnh nhân mang đột biến kháng), Y181C/I (8 bệnh nhân mang đột biến kháng) và G190A/S (3 bệnh nhân mang đột biến kháng (bảng 3.15), đều là các đột biến liên quan đến đề kháng chéo trong nhóm NNRTI, có thể giúp lý giải tình trạng bị đề kháng cao của hầu hết các thuốc trong nhóm NNRTI. Trong 3 đột biến này thì số bệnh nhân mang đột biến kháng K103N gặp nhiều nhất với 11/16 trường hợp (biểu đồ 3.16). Các nghiên cứu khác tại Việt Nam cho thấy kết quả: tỷ lệ mang đột biến K103N là 16% (Võ Thị Thanh Nhân) và 32% (Trương Thị Xuân Liên); tỷ lệ mắc đột biến Y181C là 56% (Võ Thị Thanh Nhân) và 51% (Trương Thị Xuân Liên); tỷ lệ mắc đột biến G190A là 44% (Võ Thị Thanh Nhân) và 38% (Trương Thị Xuân Liên) [6, 154, 167].

4.6. Hạn chế của đề tài

Đây là một trong số ít nghiên cứu đầu tiên cung cấp bằng chứng về tiến triển tải lượng vi rút HIV theo thời gian của bệnh nhân điều trị ARV tại Việt Nam. Tuy nhiên, nghiên cứu có một số hạn chế, bao gồm việc tuyển chọn bệnh nhân từ Bệnh viện Bạch Mai có thể không phản ánh đúng tình trạng chung của bệnh nhân HIV/AIDS ở miền Bắc Việt Nam vì phần lớn bệnh nhân ở đây tình trạng nặng hơn so bệnh nhân ở các cơ sở tuyến dưới. Bên cạnh đó một số yếu tố trong điều trị có thể liên quan đến đáp ứng tải lượng vi rút của

bệnh nhân như tuân thủ điều trị, các yếu tố về xã hội chưa được đưa vào mô hình phân tích trong nghiên cứu.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đề tài: “THEO DÕI TẢI LƯỢNG HIV THƯỜNG QUY Ở BỆNH NHÂN ĐIỀU TRỊ THUỐC KHÁNG VI RÚT BẬC MỘT TẠI KHU VỰC MIỀN BẮC VIỆT NAM” chúng tôi xin đưa ra một số kết luận sau:

1. Đánh giá kết quả theo dõi tải lượng vi rút huyết tương thường quy và bước đầu đánh giá mức độ khả thi của đo tải lượng vi rút bằng kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV từ mẫu DBS trên bệnh nhân điều trị thuốc ARV bậc một ở miền Bắc Việt Nam

- Tỷ lệ bệnh nhân có tải lượng HIV-1 dưới ngưỡng phát hiện (<20 bản sao/mL) tại thời điểm trước khi bắt đầu điều trị ARV phác đồ bậc 1 là 1,7%. Tỷ lệ này tăng lên đáng kể sau khi bệnh nhân được điều trị ARV. Tại các thời điểm 6, 12, 18, 24, 30 và 36 tháng sau khi điều trị, tỷ lệ bệnh nhân có tải lượng HIV-1 dưới ngưỡng phát hiện lần lượt là 61,79%, 79,34%, 87,89%, 88,24%, 87,4% và 92,64%. Kiểm định McNemar cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa thời điểm ban đầu và các thời điểm đánh giá sau đó. Điều này cho thấy bệnh nhân trong nhóm nghiên cứu của chúng tôi đáp ứng tốt với phác đồ điều trị ARV bậc 1.
- Giá trị vị trung vị $\log_{10}$ tải lượng HIV-1 tại thời điểm trước khi điều trị là 5,0 bản sao/mL ở cả 2 nhóm quan sát. Tại thời điểm 36 tháng sau khi bệnh nhân được điều trị ARV phác đồ bậc 1, giá trị này là 0,9 bản sao/mL ở cả nhóm chứng và nhóm can thiệp. Kiểm định Wilcoxon signed-rank test cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa thời điểm ban đầu và thời điểm 36 tháng sau điều trị ($p < 0,001$), nhưng không có sự khác biệt về giá trị trung vị TLVR giữa hai nhóm bệnh nhân này sau 36 tháng điều trị ARV.
- So sánh giữa 2 nhóm người bệnh có HIV tiến triển và $CD4 \geq 200$ TB/mm³ tại thời điểm ban đầu, cải thiện CD4 ở nhóm HIV tiến triển chậm hơn so với nhóm HIV không tiến triển. Tại thời điểm 36 tháng sau điều trị, trung vị CD4 ở nhóm HIV tiến triển là 265 TB/mm³ (IQR

= 197 – 254) và ở nhóm $CD4 \geq 200$ TB/mm³ là 490 TB/mm³ (IQR = 411 – 596). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở tất cả các thời điểm đánh giá ($p < 0,001$). Về TLVR, không có sự khác biệt có ý nghĩa sau 36 tháng điều trị giữa 2 nhóm HIV tiến triển và không tiến triển.

- Tỷ suất tử vong chung của người bệnh trong nghiên cứu là 2,52/1000-bệnh nhân/năm. Người bệnh có TLVR ban đầu > 100.000 bản sao/mL có tỷ suất tử vong cao hơn nhóm còn lại. Kiểm định log-rank test $p < 0,05$, Kiểm định log-rank test cho thấy không có sự khác biệt đáng kể về tỷ suất tử vong theo thời gian giữa hai nhóm nghiên cứu

+ So sánh TLVR huyết tương và TLVR DBS

- Ở ngưỡng 1000 bản sao /mL, độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp xét nghiệm tải lượng HIV-1 bằng DBS-PBS lần lượt 99,47% và 84,42%. Ở ngưỡng 5000 bản sao/mL độ nhạy là 100% nhưng độ đặc hiệu chỉ đạt được 53,95%.
- Hệ số tương quan Pearson giữa Log10 TLVR huyết tương và Log10 TLVR DBS-PBS là 0,88 ($p < 0,001$).

2. Mô tả đặc điểm vi rút học của bệnh nhân thất bại điều trị phác đồ bậc một tại bệnh viện Bạch Mai

- Tỷ lệ bệnh nhân mang chủng HIV đột biến kháng thuốc sau 36 tháng điều trị ARV phác đồ bậc 1 là 2,47% trong đó tỷ suất ở nhóm có theo dõi TLVR thường quy là 9,5/1000 bệnh nhân và 6,7/1000 bệnh nhân ở nhóm chứng, Kháng thuốc ở người bệnh xuất hiện đầu tiên sau 6 tháng điều trị.
- Các chủng HIV mang gen đột biến với nhóm NNRTI là K103N, Y181C), L100I và V108I; Với nhóm NRTI là các đột biến M184V, K65R, M184I và V75MV; không ghi nhận đột biến kháng liên quan PI.
- Tất cả các trường hợp bệnh nhân mang chủng HIV có gen kháng thuốc đều gặp ở người bệnh có HIV giai đoạn tiến triển ($CD4 < 200$ TB/mm³). Bệnh nhân có TLVR ban đầu trên 100.000 bản sao/mL có tỷ suất xuất

hiện kháng thuốc cao hơn nhóm bệnh nhân còn lại. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p \text{ log-rank test} = 0,05$

KHUYẾN NGHỊ

Đựa trên kết quả nghiên cứu, nhóm nghiên cứu đưa ra một số khuyến nghị sau:

1. Kết quả của nghiên cứu này củng cố thêm các hướng dẫn của Bộ Y tế sau này việc xét nghiệm theo dõi tải lượng HIV trong điều trị ART là cần thiết mà không cần phải phân chia nhóm theo mức độ tải lượng để điều trị (?) (khuyến nghị này cần nhắc sửa lại ý sau, hoặc có thể bỏ)
2. Phương pháp xét nghiệm tải lượng HIV-1 bằng mẫu DBS có độ nhạy và độ đặc hiệu tương đối cao ở ngưỡng 1000 bản sao/mL, có thể áp dụng lấy mẫu DBS trong xét nghiệm tải lượng HIV-1 ở những nơi vùng sâu vùng xa trong những điều kiện lấy mẫu vận chuyển bảo quản hạn chế. Tuy nhiên lấy mẫu DBS xét nghiệm tải lượng HIV có ý nghĩa thực tiễn cao hơn khi đo lường tải lượng HIV-1 sau điều trị ARV. Cần có nghiên cứu đánh giá rộng trước khi áp dụng và có hướng dẫn riêng khi lấy mẫu DBS.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN
ĐÃ CÔNG BỐ**

1. Trương Thái Phương, Nguyễn Thị Tuyết Mai, Bùi Minh Vượng, Đỗ Duy Cường, Vũ Tường Vân (2018), “Tương quan giữa số lượng tế bào CD4, tải lượng HIV với giai đoạn lâm sàng ở bệnh nhân trước điều trị ARV tại bệnh viện Bạch Mai năm 2012 - 2015”, *Tạp chí Y học dự phòng*, tập 28, số 11 - 2018, tr. 93-99.
2. Trương Thái Phương, Lê Thị Ngân, Lê Trung Dũng, Đỗ Duy Cường, Vũ Tường Vân (2018), “Đánh giá đáp ứng tải lượng vi rút HIV và một số yếu tố liên quan ở bệnh nhân HIV/AIDS điều trị tại bệnh viện Bạch Mai từ 2012 - 2015 ”, *Tạp chí Y học dự phòng*, tập 28, số 11 - 2018, tr. 100-109.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Bộ Y tế (2011), QUYẾT ĐỊNH về việc sửa đổi, bổ sung một số nội dung trong “Hướng dẫn chẩn đoán và điều trị HIV/AIDS” 3003/QĐ-BYT HIV/AIDS, Hà Nội, Việt Nam.
2. MOH (2013), "Hướng dẫn quốc gia về xét nghiệm huyết thanh học HIV".
3. MOH (2014), "HIV/STI Integrated Biological and Behavioral Surveillance (IBBS) in Vietnam".
4. MOH (2014), "Tổng kết công tác phòng, chống HIV/AIDS năm 2013 và định hướng kế hoạch năm 2014".
5. MOH (2019), "QĐ số 5456/QĐ-BYT về ban hành "Hướng dẫn điều trị và chăm sóc HIV"".
6. Trương Thị Xuân Liên, Huỳnh Hoàng Khánh Thu, and Lương Thu Trâm (2010), "HIV kháng thuốc trên bệnh nhân nhiễm HIV tại thành phố Hồ Chí Minh", *Y học thực hành*. 742+743, pp. 418-422.
7. VAAC (2014), "Tổng kết công tác phòng, chống HIV/AIDS năm 2013 và định hướng kế hoạch năm 2014".
8. VAAC (2015), Tình hình dịch và định hướng phòng, chống HIV/AIDS ở Việt Nam trong thời gian tới, *Hội nghị khoa học quốc gia về HIV/AIDS lần thứ VI*, VAAC, Hà Nội, Việt Nam.
9. VAAC (2016), "Báo cáo công tác phòng, chống HIV/AIDS năm 2015".
10. VAAC (2017), "Báo cáo công tác phòng, chống HIV/AIDS 6 tháng đầu năm 2017 và nhiệm vụ trọng tâm 6 tháng cuối năm 2017".
11. VAAC (2017), "Báo cáo công tác phòng, chống HIV/AIDS năm 2017 và nhiệm vụ trọng tâm năm 2018".
12. VAAC (2019), "Báo cáo công tác phòng, chống HIV/AIDS năm 2019 và nhiệm vụ trọng tâm năm 2020".
13. VAAC (2019), "Điều trị HIV/AIDS tại Việt Nam: Kết quả - Thách thức - Định hướng".

TIẾNG ANH

14. Black, Jacquelyn G. (2012), *Microbiology : principles and explorations*, Wiley, Hoboken, NJ.
15. Brooks, George F., et al. (2013), *Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology*, McGraw-Hill Medical ; McGraw-Hill [distributor], New York; London.

16. Fields, Bernard N., Knipe, David M., and Howley, Peter M. (2013), *Fields virology*, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
17. Althoff, K. N., et al. (2010), "Virologic and immunologic response to HAART, by age and regimen class", *Aids*. 24(16), pp. 2469-79.
18. Auld, A. F., et al. (2017), "Trends in Prevalence of Advanced HIV Disease at Antiretroviral Therapy Enrollment - 10 Countries, 2004-2015", *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 66(21), pp. 558-563.
19. Ayoub, A., et al. (2009), "Low prevalence of HIV type 1 drug resistance mutations in untreated, recently infected patients from Burkina Faso, Cote d'Ivoire, Senegal, Thailand, and Vietnam: the ANRS 12134 study", *AIDS Res Hum Retroviruses*. 25(11), pp. 1193-6.
20. Barin, F., et al. (1985), "Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa", *Lancet*. 2(8469-70), pp. 1387-9.
21. Barnabas, R. V., et al. (2017), "Cost-effectiveness of routine viral load monitoring in low- and middle-income countries: a systematic review", *J Int AIDS Soc*. 20 Suppl 7.
22. Bertagnolio, S., et al. (2010), "Dried blood spots for HIV-1 drug resistance and viral load testing: A review of current knowledge and WHO efforts for global HIV drug resistance surveillance", *AIDS Rev*. 12(4), pp. 195-208.
23. Boyer, S., et al. (2013), "Monitoring of HIV viral load, CD4 cell count, and clinical assessment versus clinical monitoring alone for antiretroviral therapy in low-resource settings (Stratall ANRS 12110/ESTHER): a cost-effectiveness analysis", *Lancet Infect Dis*. 13(7), pp. 577-86.
24. Brenner, B. G., et al. (2002), "Persistence and fitness of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 acquired in primary infection", *J Virol*. 76(4), pp. 1753-61.
25. Buonaguro, L., Tornesello, M. L., and Buonaguro, F. M. (2007), "Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications", *Journal of virology*. 81(19), pp. 10209-10219.
26. Calmy, A., et al. (2004), "Simplifying and adapting antiretroviral treatment in resource-poor settings: a necessary step to scaling-up", *Aids*. 18(18), pp. 2353-60.
27. Calmy, A., et al. (2007), "HIV viral load monitoring in resource-limited regions: optional or necessary?", *Clin Infect Dis*. 44(1), pp. 128-34.

28. Crowe, S., et al. (2003), "Monitoring of human immunodeficiency virus infection in resource-constrained countries", *Clin Infect Dis.* 37(Suppl 1), pp. S25-35.
29. Croxford, S., et al. (2017), "Mortality and causes of death in people diagnosed with HIV in the era of highly active antiretroviral therapy compared with the general population: an analysis of a national observational cohort", *Lancet Public Health.* 2(1), pp. e35-e46.
30. Cuong do, D., et al. (2012), "Survival and causes of death among HIV-infected patients starting antiretroviral therapy in north-eastern Vietnam", *Scand J Infect Dis.* 44(3), pp. 201-8.
31. Curkendall, S. M., et al. (2007), "Incidence of anaemia among HIV-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy", *HIV Med.* 8(8), pp. 483-90.
32. Chaix, M. L., et al. (2009), "Stable frequency of HIV-1 transmitted drug resistance in patients at the time of primary infection over 1996-2006 in France", *Aids.* 23(6), pp. 717-24.
33. Cheung, P. K., Wynhoven, B., and Harrigan, P. R. (2004), "2004: which HIV-1 drug resistance mutations are common in clinical practice?", *AIDS Rev.* 6(2), pp. 107-16.
34. Dat, Vu Quoc, et al. (2018), "Viral load suppression and acquired HIV drug resistance in adults receiving antiretroviral therapy in Viet Nam: results from a nationally representative survey", *Western Pacific surveillance and response journal : WPSAR.* 9(3), pp. 16-24.
35. Di Giambenedetto, S., et al. (2009), "Evolution and predictors of HIV type-1 drug resistance in patients failing combination antiretroviral therapy in Italy", *Antivir Ther.* 14(3), pp. 359-69.
36. Dorward, Jienchi, Drain, Paul K., and Garrett, Nigel (2018), "Point-of-care viral load testing and differentiated HIV care", *The lancet. HIV.* 5(1), pp. e8-e9.
37. Engelman, Alan and Cherepanov, Peter (2012), "The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights", *Nature reviews. Microbiology.* 10(4), pp. 279-290.
38. Ferreyra, C., et al. (2012), "Evaluation of clinical and immunological markers for predicting virological failure in a HIV/AIDS treatment cohort in Busia, Kenya", *PLoS One.* 7(11), p. e49834.
39. Gatignol, A. and Jeang, K. T. (2000), "Tat as a transcriptional activator and a potential therapeutic target for HIV-1", *Adv Pharmacol.* 48, pp. 209-27.

40. Ghani, A. C., et al. (2001), "Surrogate markers for disease progression in treated HIV infection", *J Acquir Immune Defic Syndr*. 28(3), pp. 226-31.
41. Granich, Reuben, et al. (2017), "Status and methodology of publicly available national HIV care continua and 90-90-90 targets: A systematic review", *PLoS medicine*. 14(4), pp. e1002253-e1002253.
42. Gray, R. H., et al. (2001), "Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda", *Lancet*. 357(9263), pp. 1149-53.
43. "Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services and the Henry J. Kaiser Family Foundation" (1998), *Ann Intern Med*. 128(12 Pt 2), pp. 1079-100.
44. Gill, V. S., et al. (2010), "Improved virological outcomes in British Columbia concomitant with decreasing incidence of HIV type 1 drug resistance detection", *Clin Infect Dis*. 50(1), pp. 98-105.
45. Hanson, D. L., et al. (2009), "HIV type 1 drug resistance in adults receiving highly active antiretroviral therapy in Abidjan, Cote d'Ivoire", *AIDS Res Hum Retroviruses*. 25(5), pp. 489-95.
46. Harrigan, R. (1995), "Measuring viral load in the clinical setting", *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 10 Suppl 1, pp. S34-40.
47. Harris, Ross J., et al. (2008), "Prognostic importance of anaemia in HIV type-1-infected patients starting antiretroviral therapy: collaborative analysis of prospective cohort studies", *Antiviral therapy*. 13(8), pp. 959-967.
48. Hightow-Weidman, L. B., et al. (2011), "Transmitted HIV-1 drug resistance among young men of color who have sex with men: a multicenter cohort analysis", *J Adolesc Health*. 48(1), pp. 94-9.
49. Hogg, R. S., et al. (2001), "Rates of disease progression by baseline CD4 cell count and viral load after initiating triple-drug therapy", *Jama*. 286(20), pp. 2568-77.
50. Hosseinipour, M. C., et al. (2009), "The public health approach to identify antiretroviral therapy failure: high-level nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance among Malawians failing first-line antiretroviral therapy", *AIDS*. 23(9), pp. 1127-34.
51. Huerga, Helena, et al. (2018), "Progress towards the UNAIDS 90-90-90 goals by age and gender in a rural area of KwaZulu-Natal, South Africa: a household-based community cross-sectional survey", *BMC public health*. 18(1), pp. 303-303.

52. Hughes, M. D., et al. (1997), "Monitoring plasma HIV-1 RNA levels in addition to CD4+ lymphocyte count improves assessment of antiretroviral therapeutic response. ACTG 241 Protocol Virology Substudy Team", *Ann Intern Med.* 126(12), pp. 929-38.
53. Hurt, C. B., et al. (2009), "Transmitted antiretroviral drug resistance among acute and recent HIV infections in North Carolina from 1998 to 2007", *Antivir Ther.* 14(5), pp. 673-8.
54. Ioannidis, J. P., et al. (2001), "Perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 by pregnant women with RNA virus loads <1000 copies/ml", *J Infect Dis.* 183(4), pp. 539-45.
55. Ishizaki A., et al. (2009), "Profile of HIV type 1 infection and genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in treatment-naive HIV type 1-infected individuals in Hai Phong, Viet Nam", *AIDS Res Hum Retroviruses.* 25(2), pp. 175-82.
56. Jain, V., et al. (2010), "Transmitted drug resistance in persons with acute/early HIV-1 in San Francisco, 2002-2009", *PLoS One.* 5(12), p. e15510.
57. Johannessen, A., Troseid, M., and Calmy, A. (2009), "Dried blood spots can expand access to virological monitoring of HIV treatment in resource-limited settings", *J Antimicrob Chemother.* 64(6), pp. 1126-9.
58. Johannessen, A. (2010), "Dried blood spots in HIV monitoring: applications in resource-limited settings", *Bioanalysis.* 2(11), pp. 1893-908.
59. Jones, R., et al. (2008), "Triple-class antiretroviral agent resistance in a large cohort: prevalence and clinical outcomes", *Arch Intern Med.* 168(17), pp. 1926-7.
60. Kane, C. T., et al. (2008), "Quantitation of HIV-1 RNA in dried blood spots by the real-time NucliSENS EasyQ HIV-1 assay in Senegal", *J Virol Methods.* 148(1-2), pp. 291-5.
61. Kaufmann, G. R., et al. (2003), "CD4 T-lymphocyte recovery in individuals with advanced HIV-1 infection receiving potent antiretroviral therapy for 4 years: the Swiss HIV Cohort Study", *Arch Intern Med.* 163(18), pp. 2187-95.
62. Koenig, S. P., et al. (2006), "Monitoring HIV treatment in developing countries", *Bmj.* 332(7541), pp. 602-4.
63. Kohler, P., et al. (2015), "The HIV care cascade in Switzerland: reaching the UNAIDS/WHO targets for patients diagnosed with HIV", *Aids.* 29(18), pp. 2509-15.
64. Lahuerta, M., et al. (2014), "Advanced HIV disease at entry into HIV care and initiation of antiretroviral therapy during 2006-2011: findings

- from four sub-saharan African countries", *Clin Infect Dis.* 58(3), pp. 432-41.
65. Lan, N. T., et al. (2003), "HIV type 1 isolates from 200 untreated individuals in Ho Chi Minh City (Vietnam): ANRS 1257 Study. Large predominance of CRF01_AE and presence of major resistance mutations to antiretroviral drugs", *AIDS Res Hum Retroviruses.* 19(10), pp. 925-8.
 66. Laprise, C., et al. (2013), "Virologic failure following persistent low-level viremia in a cohort of HIV-positive patients: results from 12 years of observation", *Clin Infect Dis.* 57(10), pp. 1489-96.
 67. Laurent, C., et al. (2011), "Monitoring of HIV viral loads, CD4 cell counts, and clinical assessments versus clinical monitoring alone for antiretroviral therapy in rural district hospitals in Cameroon (Stratall ANRS 12110/ESTHER): a randomised non-inferiority trial", *Lancet Infect Dis.* 11(11), pp. 825-33.
 68. Lecher, S., et al. (2015), "Scale-up of HIV Viral Load Monitoring--Seven Sub-Saharan African Countries", *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 64(46), pp. 1287-90.
 69. Little S. J., et al. (2002), "Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV", *N Engl J Med.* 347(6), pp. 385-94.
 70. Loutfy, M. R., et al. (2013), "Systematic review of HIV transmission between heterosexual serodiscordant couples where the HIV-positive partner is fully suppressed on antiretroviral therapy", *PLoS One.* 8(2), p. e55747.
 71. Lyles, R. H., et al. (2000), "Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study", *J Infect Dis.* 181(3), pp. 872-80.
 72. Ma L., et al. (2007), "Genotype and phenotype patterns of drug-resistant HIV-1 subtype B' (Thai B) isolated from patients failing antiretroviral therapy in China", *J Acquir Immune Defic Syndr.* 44(1), pp. 14-9.
 73. Marconi, V. C., et al. (2010), "Outcomes of highly active antiretroviral therapy in the context of universal access to healthcare: the U.S. Military HIV Natural History Study", *AIDS Res Ther.* 7, p. 14.
 74. Markowitz, M., et al. (2005), "Induction with abacavir/lamivudine/zidovudine plus efavirenz for 48 weeks followed by 48-week maintenance with abacavir/lamivudine/zidovudine alone in antiretroviral-naïve HIV-1-infected patients", *J Acquir Immune Defic Syndr.* 39(3), pp. 257-64.

75. May, M., et al. (2010), "Prognosis of patients with HIV-1 infection starting antiretroviral therapy in sub-Saharan Africa: a collaborative analysis of scale-up programmes", *Lancet*. 376(9739), pp. 449-57.
76. May, M. T., et al. (2006), "HIV treatment response and prognosis in Europe and North America in the first decade of highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis", *Lancet*. 368(9534), pp. 451-8.
77. Mee, P., et al. (2008), "Evaluation of the WHO criteria for antiretroviral treatment failure among adults in South Africa", *Aids*. 22(15), pp. 1971-7.
78. Mellors, J. W., et al. (1997), "Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection", *Ann Intern Med*. 126(12), pp. 946-54.
79. Mocroft, A., et al. (2010), "Is it safe to discontinue primary *Pneumocystis jiroveci* pneumonia prophylaxis in patients with virologically suppressed HIV infection and a CD4 cell count <200 cells/microL?", *Clin Infect Dis*. 51(5), pp. 611-9.
80. Mohsen, A. H. and Easterbrook, P. (2003), "Hepatitis C testing in HIV infected patients", *Sex Transm Infect*. 79(1), p. 76.
81. Monleau, M., et al. (2010), "Effect of storage conditions of dried plasma and blood spots on HIV-1 RNA quantification and PCR amplification for drug resistance genotyping", *J Antimicrob Chemother*. 65(8), pp. 1562-6.
82. Monleau, M., et al. (2014), "Field evaluation of dried blood spots for routine HIV-1 viral load and drug resistance monitoring in patients receiving antiretroviral therapy in Africa and Asia", *J Clin Microbiol*. 52(2), pp. 578-86.
83. Monno, L., et al. (2005), "HIV-1 subtypes and circulating recombinant forms (CRFs) from HIV-infected patients residing in two regions of central and southern Italy", *J Med Virol*. 75(4), pp. 483-90.
84. Moore, D. M., et al. (2008), "CD4+ T-cell count monitoring does not accurately identify HIV-infected adults with virologic failure receiving antiretroviral therapy", *J Acquir Immune Defic Syndr*. 49(5), pp. 477-84.
85. Moore, J. P. and Doms, R. W. (2003), "The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(19), pp. 10598-602.
86. Moore, R. D. and Keruly, J. C. (2007), "CD4+ cell count 6 years after commencement of highly active antiretroviral therapy in persons with sustained virologic suppression", *Clin Infect Dis*. 44(3), pp. 441-6.

87. Napierala Mavedzenge, S., et al. (2015), "Finger Prick Dried Blood Spots for HIV Viral Load Measurement in Field Conditions in Zimbabwe", *PLoS One*. 10(5), p. e0126878.
88. Napravnik, S., et al. (2005), "HIV-1 drug resistance evolution among patients on potent combination antiretroviral therapy with detectable viremia", *J Acquir Immune Defic Syndr*. 40(1), pp. 34-40.
89. Neogi, Ujjwal, et al. (2012), "Dried blood spot HIV-1 RNA quantification: a useful tool for viral load monitoring among HIV-infected individuals in India", *The Indian journal of medical research*. 136(6), pp. 956-962.
90. Nkengasong, J. N., et al. (1994), "Genotypic subtypes of HIV-1 in Cameroon", *Aids*. 8(10), pp. 1405-12.
91. Nyesigire Ruhinda, E., Bajunirwe, F., and Kiwanuka, J. (2012), "Anaemia in HIV-infected children: severity, types and effect on response to HAART", *BMC Pediatr*. 12, p. 170.
92. Nguyen H.T., et al. (2008), "HIV drug resistance threshold survey using specimens from voluntary counselling and testing sites in Hanoi, Vietnam", *Antivir Ther*. 13 Suppl 2, pp. 115-21.
93. Palella, F. J., Jr., et al. (2016), "CD4 cell count at initiation of ART, long-term likelihood of achieving CD4 >750 cells/mm³ and mortality risk", *J Antimicrob Chemother*. 71(9), pp. 2654-62.
94. Pannus, Pieter, et al. (2016), "Sensitivity and specificity of dried blood spots for HIV-1 viral load quantification: A laboratory assessment of 3 commercial assays", *Medicine*. 95(48), pp. e5475-e5475.
95. Parkin, N. T. (2014), "Measurement of HIV-1 viral load for drug resistance surveillance using dried blood spots: literature review and modeling of contribution of DNA and RNA", *AIDS Rev*. 16(3), pp. 160-71.
96. Petti, C. A., et al. (2006), "Laboratory medicine in Africa: a barrier to effective health care", *Clin Infect Dis*. 42(3), pp. 377-82.
97. Pillay, D., et al. (2005), "Estimating HIV-1 drug resistance in antiretroviral-treated individuals in the United Kingdom", *J Infect Dis*. 192(6), pp. 967-73.
98. Phillips, A. and Pezzotti, P. (2004), "Short-term risk of AIDS according to current CD4 cell count and viral load in antiretroviral drug-naïve individuals and those treated in the monotherapy era", *Aids*. 18(1), pp. 51-8.
99. Phillips, A. N., et al. (2005), "Long term probability of detection of HIV-1 drug resistance after starting antiretroviral therapy in routine clinical practice", *AIDS*. 19(5), pp. 487-94.

100. Phillips, A. N., et al. (2007), "Risk of extensive virological failure to the three original antiretroviral drug classes over long-term follow-up from the start of therapy in patients with HIV infection: an observational cohort study", *Lancet*. 370(9603), pp. 1923-8.
101. Quinn, T. C., et al. (2000), "Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group", *N Engl J Med*. 342(13), pp. 921-9.
102. Rangarajan, Suresh, et al. (2016), "Factors associated with HIV viral load suppression on antiretroviral therapy in Vietnam", *Journal of virus eradication*. 2(2), pp. 94-101.
103. Renner, Lorna A., et al. (2013), "Anaemia and zidovudine-containing antiretroviral therapy in paediatric antiretroviral programmes in the IeDEA Paediatric West African Database to evaluate AIDS", *Journal of the International AIDS Society*. 16(1), pp. 18024-18024.
104. Richman, D. D., et al. (2004), "The prevalence of antiretroviral drug resistance in the United States", *AIDS*. 18(10), pp. 1393-401.
105. Roberts, T., et al. (2012), "Challenges and opportunities for the implementation of virological testing in resource-limited settings", *J Int AIDS Soc*. 15(2), p. 17324.
106. Roberts, T., et al. (2016), "Scale-up of Routine Viral Load Testing in Resource-Poor Settings: Current and Future Implementation Challenges", *Clin Infect Dis*. 62(8), pp. 1043-8.
107. Roberts, Teri, et al. (2012), "Challenges and opportunities for the implementation of virological testing in resource-limited settings", *Journal of the International AIDS Society*. 15(2), pp. 17324-17324.
108. Romeo, R., et al. (2000), "Hepatitis C is more severe in drug users with human immunodeficiency virus infection", *J Viral Hepat*. 7(4), pp. 297-301.
109. Rowley, C. F. (2014), "Developments in CD4 and viral load monitoring in resource-limited settings", *Clin Infect Dis*. 58(3), pp. 407-12.
110. Rutstein, S. E., et al. (2015), "Dried blood spots for viral load monitoring in Malawi: feasible and effective", *PLoS One*. 10(4), p. e0124748.
111. Ryscavage, P., et al. (2014), "Significance and clinical management of persistent low-level viremia and very-low-level viremia in HIV-1-infected patients", *Antimicrob Agents Chemother*. 58(7), pp. 3585-98.
112. Saah, A. J., et al. (1994), "Factors influencing survival after AIDS: report from the Multicenter AIDS Cohort Study (MACS)", *J Acquir Immune Defic Syndr*. 7(3), pp. 287-95.

113. Sharp, P. M. and Hahn, B. H. (2011), "Origins of HIV and the AIDS pandemic", *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1(1), p. a006841.
114. Smit, P. W., et al. (2014), "Systematic review of the use of dried blood spots for monitoring HIV viral load and for early infant diagnosis", *PLoS One.* 9(3), p. e86461.
115. SPREAD Program (2008), "Transmission of drug-resistant HIV-1 in Europe remains limited to single classes", *AIDS.* 22(5), pp. 625-35.
116. Sungkanuparph, S., et al. (2007), "Options for a second-line antiretroviral regimen for HIV type 1-infected patients whose initial regimen of a fixed-dose combination of stavudine, lamivudine, and nevirapine fails", *Clin Infect Dis.* 44(3), pp. 447-52.
117. Taieb, Fabien, et al. (2016), "Evaluation of Two Techniques for Viral Load Monitoring Using Dried Blood Spot in Routine Practice in Vietnam (French National Agency for AIDS and Hepatitis Research 12338)", *Open forum infectious diseases.* 3(3), pp. ofw142-ofw142.
118. Taiwo, B. (2009), "Understanding transmitted HIV resistance through the experience in the USA", *Int J Infect Dis.* 13(5), pp. 552-9.
119. Taiwo, B., et al. (2011), "Antiretroviral drug resistance in HIV-1-infected patients experiencing persistent low-level viremia during first-line therapy", *J Infect Dis.* 204(4), pp. 515-20.
120. Tanuma, Junko, et al. (2016), "Incidence of AIDS-Defining Opportunistic Infections and Mortality during Antiretroviral Therapy in a Cohort of Adult HIV-Infected Individuals in Hanoi, 2007-2014", *PloS one.* 11(3), pp. e0150781-e0150781.
121. Tanuma, Junko, et al. (2017), "Long-term viral suppression and immune recovery during first-line antiretroviral therapy: a study of an HIV-infected adult cohort in Hanoi, Vietnam", *Journal of the International AIDS Society.* 20(4), p. e25030.
122. Taylor, Barbara S., et al. (2008), "The challenge of HIV-1 subtype diversity", *The New England journal of medicine.* 358(15), pp. 1590-1602.
123. Tsuyuki, K., et al. (2019), "The Longitudinal Effects of Non-injection Substance Use on Sustained HIV Viral Load Undetectability Among MSM and Heterosexual Men in Brazil and Thailand: The Role of ART Adherence and Depressive Symptoms (HPTN 063)", *AIDS Behav.* 23(3), pp. 649-660.
124. Tuboi, S. H., et al. (2007), "Discordant responses to potent antiretroviral treatment in previously naive HIV-1-infected adults initiating treatment in resource-constrained countries: the antiretroviral

- therapy in low-income countries (ART-LINC) collaboration", *J Acquir Immune Defic Syndr.* 45(1), pp. 52-9.
125. Thio, C. L. (2009), "Hepatitis B and human immunodeficiency virus coinfection", *Hepatology.* 49(5 Suppl), pp. S138-45.
 126. van Deursen, P., et al. (2010), "Measuring human immunodeficiency virus type 1 RNA loads in dried blood spot specimens using NucliSENS EasyQ HIV-1 v2.0", *J Clin Virol.* 47(2), pp. 120-5.
 127. Van Vaerenbergh, K. (2001), "Study of the impact of HIV genotypic drug resistance testing on therapy efficacy", *Verh K Acad Geneeskde Belg.* 63(5), pp. 447-73.
 128. Wainberg, Mark A. and Brenner, Bluma G. (2010), "Role of HIV Subtype Diversity in the Development of Resistance to Antiviral Drugs", *Viruses.* 2(11), pp. 2493-2508.
 129. "WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee", (2013), *Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection: Recommendations for a Public Health Approach*, World Health Organization. Copyright (c) World Health Organization 2013., Geneva.
 130. "WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee", (2016), in nd, Editor, *Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection: Recommendations for a Public Health Approach*, World Health Organization. Copyright (c) World Health Organization 2016., Geneva.
 131. Wilton, James, et al. (2019), "Trends in HIV care cascade engagement among diagnosed people living with HIV in Ontario, Canada: A retrospective, population-based cohort study", *PloS one.* 14(1), pp. e0210096-e0210096.
 132. Wood, E., et al. (2002), "'Discordant' increases in CD4 cell count relative to plasma viral load in a closely followed cohort of patients initiating antiretroviral therapy", *J Acquir Immune Defic Syndr.* 30(2), pp. 159-66.
 133. Ye, J. R., et al. (2011), "The Prevalence of Drug Resistance Mutations Among Treatment-Naive HIV-Infected Individuals in Beijing, China", *AIDS Res Hum Retroviruses.*
 134. Yu, D., et al. (2011), "HIV drug resistance assessment in the Western Pacific region. A systematic review", *AIDS Rev.* 13(4), pp. 214-26.
 135. Yu, D., et al. (2011), "HIV Drug Resistance Assessment in the Western Pacific Region. A Systematic Review", *AIDS Rev.* 13(4), pp. 214-26.

136. Zaccarelli, M., et al. (2005), "Multiple drug class-wide resistance associated with poorer survival after treatment failure in a cohort of HIV-infected patients", *AIDS*. 19(10), pp. 1081-9.
137. Ahn, Jin Young, et al. (2015), "Effects of CD4 monitoring frequency on clinical endpoints in clinically stable HIV-infected patients with viral suppression", *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)*. 69(3), pp. e85-e92.
138. Arteaga G., et al. (2007), Prevalence of HIV drug resistance in treatment experienced, chronically HIV-infected individuals from Panama, *International AIDS Society 2007*, Editor^Editors.
139. Braun, Mark W. (2015), *Pathology C601/C602 Slides & Laboratory Units*, Indiana University School of Medicine, accessed, from <http://medsci.indiana.edu/c602web/602/c602web/toc.htm>.
140. Bunupuradah T., et al. (2007), Prevalence and predictors of etravirine resistance in Thai HIV-infected adults failing first-line NNRTI-based regimens, *International AIDS Society 2007*, Editor^Editors.
141. Center, The Aaron Diamond AIDS Research *HIV Replication*, accessed, from http://www.adarc.org/hiv_replication_632.html.
142. Colebunders, Robert, et al., "A new model to monitor the virological efficacy of antiretroviral treatment in resource-poor countries", *The Lancet Infectious Diseases*. 6(1), pp. 53-59.
143. Chasombat S, et al. (2011), Thailand national surveillance system to determine the development of HIV drug resistance among ARV treated patients, *IAS 2011*, Editor^Editors, Rome, Italia.
144. Drain, Paul K., et al. (2019), "Point-of-Care HIV Viral Load Testing: an Essential Tool for a Sustainable Global HIV/AIDS Response", *Clinical Microbiology Reviews*. 32(3), pp. e00097-18.
145. Edidi S, Butel C, and Monleau M, et al (2009), Low level of HIV resistance to antiretroviral in the Democratic Republic of Congo in clinics using national guideline of ART but presence of K65R in tenofovir naive patients., *7th European HIV Drug Resistance Workshop*, Editor^Editors, Stockholm, Sweden, p. Abstract 26.
146. Ekstrand ML, Shet A, Chandy S, Singh G, Shamsundar R, Madhavan V, Saravanan S, and Heylen E, Kumarasamy N. (2011), "Suboptimal adherence associated with virological failure and resistance mutations to first-line highly active antiretroviral therapy (HAART) in Bangalore, India", *Int Health*. . 3(1), pp. 27-34.
147. Estill, Janne, et al. (2013), "Cost-effectiveness of point-of-care viral load monitoring of ART in resource-limited settings: Mathematical

- modelling study", *AIDS (London, England)*. 27(9), p. 10.1097/QAD.0b013e328360a4e5.
148. Estill, Janne, et al. (2015), "The Cost-Effectiveness of Monitoring Strategies for Antiretroviral Therapy of HIV Infected Patients in Resource-Limited Settings: Software Tool", *PLOS ONE*. 10(3), p. e0119299.
 149. Hira S.K., et al. (2004), "High resistance to antiretroviral drugs: the Indian experience", *International Journal of STD & AIDS*. 15, pp. 173-7.
 150. Inocência L.A., et al. (2007), Brazilian network for HIV-1 genotyping (RENAGENO): prevalence of drug resistance mutations and HIV-1 subtypes among patients under antiretroviral therapy in Rio de Janeiro, Brazil, *International AIDS Society 2007*, Editor^Editors, Sydney, Australia.
 151. Jaén, A, et al. (2008), Epidemiological trends in genotypic resistance mutations in relation with antiretroviral exposure, *XVII International HIV Drug Resistance* Editor^Editors, Sitges, Spain.
 152. Kantor, Rami, et al. (2009), "Misclassification of First-Line Antiretroviral Treatment Failure Based on Immunological Monitoring of HIV Infection in Resource-limited Settings", *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 49(3), pp. 454-462.
 153. Keebler, Daniel, et al. (2014), "Cost-effectiveness of different strategies to monitor adults on antiretroviral treatment: a combined analysis of three mathematical models", *The Lancet Global Health*. 2(1), pp. e35-e43.
 154. Lien T.T.X., Tran T., Thu H.H.K., Tram L.T., Thanh L.C., T.C. Thanh, P.D. Quang, (2009), Drug resistance among HIV-infected patients in Hochiminh, Vietnam . :, *5th IAS Conference on HIV Pathogenesis and Treatment*, Editor^Editors, Abstract no. CDB020
 155. Lima VD, et al. (2010), "Epidemiology of antiretroviral multiclass resistance", *Am J Epidemiol*. 172(4), pp. 460-8.
 156. Lok Anna S. F. and B.J., McMahon (2009), *AASLD PRACTICE GUIDELINE UPDATE: Chronic Hepatitis B: Update 2009*
- accessed, from
http://www.aasld.org/practiceguidelines/documents/bookmarked%20practice%20guidelines/chronic_hep_b_update_2009%208_24_2009.pdf.
157. Napravnik S, Keys JR, and EB, Quinlivan (2007), *Triple-class Antiretroviral Drug Resistance: Risk and Predictors Among HIV-1-*

- infected Patients accessed, from
<http://www.medscape.com/viewarticle/555667>.
158. Phan V, et al. (2009), Impact of prolonged detectable HIV RNA after HAART failure in a CRF01-AE infected cohort: pathway and accumulation of resistance mutations. , *7th European HIV Drug Resistance Workshop*, Editor^Editors, Stockholm, Sweden.
 159. Ramatsebe, Majoalane Tina Maria (2014), *Genotypic characterization of gag-pol cleavage site mutations in HIV-1 infected patients failing HAART*, Faculty of Health Sciences, University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa.
 160. Rangarajan, Suresh, et al. (2016), "Factors associated with HIV viral load suppression on antiretroviral therapy in Vietnam", *Journal of Virus Eradication*. 2(2), pp. 94-101.
 161. Reynolds, Steven J., et al. (2009), "Failure of immunologic criteria to appropriately identify antiretroviral treatment failure in Uganda", *AIDS (London, England)*. 23(6), pp. 697-700.
 162. Silvia Bertagnolio, et al. (2011), Surveillance of Transmitted and Acquired HIV Drug Resistance Using WHO Surveys in Resource-limited Settings, *18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, Boston, USA.
 163. Tang, Ning, et al. (2017), "HIV-1 viral load measurement in venous blood and fingerprick blood using Abbott RealTime HIV-1 DBS assay", *Journal of Clinical Virology*. 92, pp. 56-61.
 164. Thao Vu, et al. (2011), HIV-1 Drug Resistance in Antiretroviral - naive patients with HIV-associated Tuberculous Meningitis in Ho Chi Minh city, Vietnam *18th Conference on Retroviruses and Oppotunistic Infections*, Editor^Editors, Boston, MA, USA, p. Paper # 625.
 165. UNAIDS (2016), "90-90-90 On the right track towards global target".
 166. UNAIDS (2019), "UNAIDS Data 2018".
 167. Vo Thi TN , Colby D, and Khanh TH, et al (2010), HIV drug resistance in children with treatment failure to first-line regiments in Ho Chi Minh City, Vietnam, *8th European HIV Drug Resistance Workshop*, Editor^Editors, Sorrento, Italy., p. Abstract 63.
 168. WHO (2007), *WHO case definitions of HIV for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children*, World Health Organization, Geneva.
 169. WHO (2010), "WHO manual for HIV drug resistance testing using dried blood spot specimens".

170. WHO (2014), "Guidelines on postexposure prophylaxis for HIV and the use of co-trimoxazole prophylaxis for HIV-related infections among adults, adolescents and children: recommendations for a public health approach".
171. WHO (2014), "Technical and operational considerations for implementing HIV viral load testing: interim technical update".
172. WHO (2016), *Consolidated Guidelines on the Use of Antiretroviral Drugs for Treating and Preventing HIV Infection: Recommendations for a Public Health Approach. 2nd edition.*, World Health Organization, Geneva.
173. WHO (2017), "Guidelines for managing advanced HIV disease and rapid initiation of antiretroviral therapy".
174. WHO (2017), *Guidelines for managing advanced HIV disease and rapid initiation of antiretroviral therapy*, World Health Organization, Geneva.
175. WHO (2018), "Updated Recommendations on First-Line And Second-Line Antiretroviral Regimens and Post-Exposure Prophylaxis and Recommendations on Early Infant Diagnosis of HIV".
176. WHO (2019), "HIV molecular diagnostics toolkit to improve access to viral load testing and infant diagnosis".

Phụ lục 1:

BẢNG PHÂN LOẠI GIAI ĐOẠN LÂM SÀNG THEO WHO (2007)

Giai đoạn lâm sàng 1
Không triệu chứng Bệnh lý hạch lympho toàn thân dai dẳng
Giai đoạn lâm sàng 2
Sụt cân vừa phải không rõ nguyên nhân (<10% cân nặng cơ thể) Nhiễm trùng đường hô hấp tái phát (viêm xoang, viêm amidan, viêm tai giữa, viêm họng) Bệnh zô-na Viêm khóe miệng Loét miệng tái phát Phát ban sẩn ngứa Nấm móng Viêm da bã nhờn
Giai đoạn lâm sàng 3
Sụt cân mức độ nặng không rõ nguyên nhân (>10% cân nặng cơ thể) Tiêu chảy mạn tính kéo dài trên 1 tháng không rõ nguyên nhân Sốt kéo dài không rõ nguyên nhân (không liên tục hoặc liên tục trên 1 tháng) Nấm candida miệng kéo dài Bạch sản dạng lông ở miệng Lao phổi Nhiễm khuẩn nặng (như viêm mủ màng phổi, viêm mủ cơ, nhiễm trùng xương khớp, hoặc viêm màng não, nhiễm khuẩn huyết) Viêm loét miệng, viêm lợi hoặc viêm quanh răng hoại tử cấp Thiếu máu (<8 g /dl), giảm bạch cầu trung tính (<0.5 x 10 ⁹ /l) hoặc giảm tiểu cầu mạn tính (<50 x 10 ⁹ /l) không rõ nguyên nhân

Giai đoạn lâm sàng 4

Hội chứng suy mòn do HIV

Viêm phổi do *Pneumocystis jirovecii* (PCP)

Viêm phổi do vi khuẩn tái phát

Nhiễm herpes simplex mãn tính (môi miệng, sinh dục, hoặc hậu môn, trực tràng) kéo dài trên 1 tháng, hay herpes nội tạng bất kể vị trí nào)

Nhiễm nấm candida thực quản (hoặc nấm candida khí quản, phế quản hoặc phổi)

Lao ngoài phổi

Kaposi sarcoma

Nhiễm cytomegalovi rút (viêm võng mạc hoặc nhiễm cytomegalovi rút tạng khác)

Toxoplasma ở thần kinh trung ương (sau thời kỳ sơ sinh)

Bệnh lý não do HIV

Nhiễm nấm *cryptococcus* ngoài phổi, bao gồm cả viêm màng não

Nhiễm mycobacteria không phải lao lan tỏa

Bệnh lý não chất trắng đa ổ tiến triển

Nhiễm *cryptosporidium* mạn tính

Nhiễm *Isosporia* mạn tính

Nhiễm nấm lan tỏa (bệnh do *histoplasma* ngoài phổi, *coccidioidomycosis*, *penicilliosis*)

U lympho (u lympho không Hodgkin não hoặc tế bào B)

Bệnh lý thận hoặc bệnh lý cơ tim liên quan tới HIV

Nhiễm khuẩn huyết tái phát (bao gồm cả *Salmonella* không thương hàn)

Ung thư cổ tử cung xâm lấn

Bệnh *leishmania* lan tỏa không điển hình

Adapted from WHO case definitions of HIV for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children. Geneva, World Health Organization, 2007

www.who.int/hiv/pub/guidelines/HIVstaging150307.pdf

Phụ lục 2:

Quy trình Xét nghiệm Đo tải lượng HIV: phát hiện và định lượng HIV - RNA trong huyết tương người bằng bộ sinh phẩm COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV Test, version 2.0 trên hệ thống máy COBAS® AmpliPrep xử lý mẫu tự động và COBAS® TaqMan 48 Analyzer để tự động khuếch đại và phát hiện.

Quy trình đo tải lượng HIV trên hệ thống máy

COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 48 Analyzer

1. Mục đích:

Tài liệu này hướng dẫn thực hiện quy trình xét nghiệm phát hiện và định lượng HIV - RNA trong huyết tương người

2. Phạm vi áp dụng:

Phòng xét nghiệm Sinh học phân tử – Khoa Vi sinh - Bệnh viện Bạch Mai

3. Định nghĩa:

- HIV: Human Immunodeficiency Virus
- RNA: Ribonucleotid acid
- DNA: Deoxyribonucleotid acid
- PCR: Polymerase chain reaction (Phản ứng khuếch đại chuỗi)
- Ct: threshold cycle (chu kỳ ngưỡng)
- EDTA: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
- Invalid: không giá trị
- Target Not Detected: không phát hiện
- IU: International Units
- Cp: copies

4. Bệnh phẩm:

Huyết tương của bệnh nhân được lấy và xử lý theo qui trình lấy mẫu

5. Vật liệu/ Trang thiết bị sử dụng:

6.1 Trang thiết bị, dụng cụ:

Dụng cụ thiết bị lấy, xử lý và bảo quản bệnh phẩm:

- Ống lấy máu có chất chống đông EDTA
- Máy ly tâm bàn tốc độ tối đa 3000vòng/phút
- Tủ lạnh 2-8°C
- Tủ âm sâu (-70°C)

Dụng cụ thiết bị tiến hành xét nghiệm:

- Hốt vô trùng
- Máy vortex
- Hệ thống máy tách chiết tự động COBAS®AmpliPrep và máy tự động khuếch đại và phát hiện COBAS®TaqMan® 48 Analyzer (Roche)(mã số: 393781 hoặc 394159)
- Máy tính có cài đặt phần mềm chức năng AMPLILINK
- Máy in được kết nối với máy tính
- Pipette vi lượng: 1000 µl
- Đầu côn có phin lọc
- SPU: Sample processing unit
- S-tube: Sample input tube với barcode clip
- K-tube, K-tip
- Sample Rack, Reagent Rack, SPU Rack
- K-carrier rack
- K-carrier, K-carrier transporter
- Găng tay không bột tal

6.2. Hóa chất, sinh phẩm:

- Bộ sinh phẩm COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV Test, version 2.0 (48 Tests), bao gồm:

HIV CS1	Hộp đựng thuốc thử có các hạt thủy tinh có từ tính HIV: 93% Isopropanol
HIV CS2	Hộp đựng thuốc thử ly giải HIV: 42.5% Guanidine thiocyanate
HIV CS3	Hộp đựng nhiều thuốc thử HIV: - Dung dịch Proteinase (Pase): chất đệm Tris, < 0,05 % EDTA, canxi clorid, canxi acetate, ≤ 7,8 % proteinase, glycerol. - - Dung dịch đệm tách rửa (EB): Chất đệm Tris-base, 0.2% Methylparaben
HIV CS4	Hộp đựng thuốc thử đặc hiệu với HIV có chứa: - HIV QS (Quantitation standard) - HIV MMX (HIV Master Mix) - HIV Mn²⁺ (dung dịch mangan HIV)
HIV H(+)C	Chứng dương tính cao (HIV High Positive Control): huyết tương người âm tính, không phản ứng với các thử nghiệm Anti-HCV, anti-HIV-1/2, HIVp24 Ag, và HBsAg; không phát hiện thấy HIV-1 RNA, HCV RNA và HBV DNA bằng các phương pháp PCR. Chất bảo quản 0,1 % ProClin® 300.
HIV L(+)C	Chứng dương tính thấp (HIV Low Positive Control): Huyết tương người âm tính, không phản ứng với các thử nghiệm Anti-HCV, anti-HIV-1/2, HIVp24 Ag, và HBsAg; không phát hiện thấy HIV-1 RNA, HCV RNA và HBV DNA bằng các phương pháp PCR. Chất bảo quản 0,1 % ProClin® 300.
CTM (-)C	Chứng âm tính (COBAS TaqMan Negative Control): huyết tương người âm tính, không cho phản ứng đối với Anti-HCV, Anti-HIV1/2 , HIV p24 Ag và HBsAg; không phát hiện thấy HIV-1 RNA, HCV RNA và HBV DNA bằng các phương pháp PCR.

	Chất bảo quản 0,1 % ProClin® 300.
HIV H(+)C Clip	Clip mã vạch mẫu chứng dương tính cao
HIV L(+)C Clip	Clip mã vạch mẫu chứng dương tính thấp
HIV(-) Clip	Clip mã vạch mẫu chứng âm tính

- COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® Wash Reagent (PGWR) (5.1 lít): Sodium citrate dihydrate, < 0.1% N-Methylisothiazolone-HCl

7. Nguyên lý:

Định lượng HIV - RNA trong huyết tương người dựa trên nguyên lý của kỹ thuật Real time PCR gồm 3 giai đoạn:

- Tách chiết RNA - HIV
- Phiên mã ngược chuyển RNA thành cDNA
- Khuếch đại cDNA sử dụng môi và mẫu dò đặc hiệu của HIV 1 (phân type M, O, N) và mẫu dò cho chứng nội HIV-1 QS (giới hạn được đưa vào để kiểm soát phản ứng khuếch đại và xác định các chất ức chế phản ứng PCR)

Nguyên lý của KT Real time PCR: Mẫu dò (probe) đặc hiệu thiết kế ở vùng protein cấu trúc lõi vùng gene HIV-1 *gag* được gắn chất huỳnh quang, trong phản ứng PCR nếu có sự nhân lên của DNA đích thì chất này sẽ liên kết với DNA đích đó và phát tín hiệu huỳnh quang. Các tín hiệu huỳnh quang phát ra sẽ được các đầu dò của máy luân nhiệt real time thu nhận và xử lý. Khi cường độ tín hiệu huỳnh quang của mẫu vượt qua đường tín hiệu huỳnh quang nền của phản ứng thì mẫu được xem là dương tính và ta lấy thời điểm vượt qua đó (biểu hiện qua giá trị chu kỳ ngưỡng - Ct) để so sánh với đường cong chuẩn (chứng chuẩn) được xây dựng từ chu kỳ ngưỡng của các mẫu chuẩn đã biết trước nồng độ từ đó suy ra số lượng DNA mẫu đưa vào phản ứng.

Độ nhạy của bộ sinh phẩm 20 copies/ml huyết tương, độ đặc hiệu $\geq 99,99\%$ cho HIV-1 nhóm M và nhóm O.

8. Quy trình:

8.1 Trước xét nghiệm: Chuẩn bị mẫu và thiết lập sơ đồ vị trí mẫu xét nghiệm định lượng

8.2 Tách chiết RNA vận hành máy COBAS AmpliPrep

8.2.1 Khởi động hệ thống, truy cập vào chương trình AMPLILINK

8.2.2 Thực hiện kiểm tra, bảo dưỡng vệ sinh hệ thống máy

8.2.3 Nạp hóa chất xét nghiệm vào khay chứa (reagent rack) tại các vị trí tương ứng: HIV CS1 khay 1 rãnh A, HIV CS2, HIV CS3 và HIV CS4 khay 2 rãnh B-E.

Chú ý: Sau khi bỏ ra khỏi tủ lạnh, hóa chất xét nghiệm cần được cài vào giá nạp sinh phẩm và đưa ngay vào máy COBAS® AmpliPrep và để cân bằng nhiệt độ ít nhất 30 phút trước khi tách mẫu bệnh phẩm đầu tiên.

8.2.4 Đặt SPU vào khay chứa SPU (SPU rack) tại vị trí tương ứng J, K hoặc L

8.2.5 Đặt K-tip vào vị trí tương ứng M, N, O hoặc P

8.2.6 Kết nạp K-carrier vào khay K-carrier, đọc mã vạch của khay K-carrier rồi tới mã vạch của K-carrier liên tiếp nhau trong 5 giây bằng cách sử dụng đầu đọc mã vạch cầm tay. Nạp vào máy tại vị trí tương ứng M, N, O hoặc P

8.3 Chuẩn bị mẫu xét nghiệm:

8.3.1 Cài Control barcode clip vào khay chứa mẫu (rack specimen) tại vị trí control tương ứng

8.3.2 Cài barcode clip mới vào khay chứa mẫu theo đúng số mẫu xét nghiệm

8.3.3 Trộn mẫu bệnh phẩm và chứng, hút 1000-1050 μ l cho từng mẫu

bệnh phẩm và chứng (control) vào mỗi S-tube, nạp K-tube vào khay chứa mẫu ở vị trí kế bên

8.3.4 Khởi tạo kết nhập cho mẫu và chứng

8.3.5 In báo cáo Sample Rack Order

8.3.6 Đưa khay chứa mẫu vào vị trí tương ứng trong máy F, G hoặc H.

8.3.7 Kiểm tra trạng thái hệ thống, chạy xét nghiệm

8.4 *Phiên mã ngược RNA thành cDNA, khuếch đại cDNA, đọc kết kết trên máy COBAS TaqMan 48*

- Sau khi máy hoàn thành tách RNA thì chuyển sản phẩm sang máy COBAS TaqMan 48:

+ Nhấn Open để mở nắp của buồng luân nhiệt, dùng dụng cụ chuyển K-carrier bằng tay để lấy K-carrier đã làm xong ra khỏi máy COBAS®AmpliPrep chuyển tiếp vào máy COBAS® TaqMan® 48. Chú ý để máy quét mã vạch K-carrier sao cho phát ra tiếng “bíp”.

+ Nếu số lượng K-tube < 6 thì bổ sung thêm K-tube trên K-carrier vào những vị trí được hướng dẫn bằng phần mềm AMPLILINK sao cho đủ 6 vị trí.

+ Nhấn Start, máy sẽ tự động đóng nắp buồng luân nhiệt và tự động khuếch đại và phân tích.

+ Khi đã kết thúc chương trình chạy, đèn báo màu vàng, dùng dụng cụ chuyển K-carrier bằng tay để lấy K-carrier ra khỏi máy COBAS® TaqMan® 48. Chú ý để máy quét mã vạch K-carrier sao cho phát ra tiếng “bíp”.

- Đọc kết quả sau khi máy kết thúc chương trình chạy: Nhấn Accept rồi in và lưu trữ kết quả.

8.5 *Bảo dưỡng cuối ngày:*

- Hoàn tất công việc vệ sinh máy.

- Ghi chép nhật ký vận hành máy.

9. Kiểm tra chất lượng:

+ Giá trị định lượng chấp nhận được nếu :

- Chứng âm: không phát hiện)
- Chứng dương: nằm trong khoảng cho phép của nhà sản xuất (đặc hiệu với từng lô thuốc thử) và không xuất hiện tín hiệu cờ báo.

+ Không nhận các kết quả của chứng không có giá trị khi xuất hiện thông báo lỗi (cờ báo flags):

- Chứng âm: Nếu chứng âm có tín hiệu cờ báo là invalid thì phải thực hiện lại xét nghiệm cả chứng và toàn bộ lô bệnh phẩm.
- Chứng dương: Nếu một hoặc cả hai chứng dương xuất hiện cờ báo invalid thì phải làm lại xét nghiệm toàn bộ lô bệnh phẩm.
 - o Chứng dương thấp: Invalid, $< 2.00E+01$ cp/ml, $>1.00E+07$ cp/ml, không phát hiện (Target Not Detected)
 - o Chứng dương cao: Invalid, $< 2.00E+01$ cp/ml, $>1.00E+07$ cp/ml, không phát hiện (Target Not Detected)

10. Ý nghĩa kết quả và báo cáo:

Kết quả định lượng HIV-RNA của máy COBAS TaqMan 48 được tính trực tiếp ra số copies/ml quy đổi tương ứng theo đơn vị quốc tế IU/ml là 0.6 cp/IU cho HIV-1 RNA theo hệ thống quy chuẩn của WHO.

- Xác định giá trị tham số Ct (được định nghĩa là số chu kỳ ngưỡng tại đó tín hiệu huỳnh quang vượt ngưỡng cố định, để so sánh với chu kỳ ngưỡng của mẫu chứng chuẩn từ đó suy ra số lượng DNA mẫu đưa vào phản ứng) cho HIV RNA và HIV QS RNA.

- Xác định nồng độ HIV RNA dựa trên giá trị Ct của HIV RNA và HIV QS RNA và mối tương quan với đường chuẩn đặc hiệu của lô thuốc thử.

- Xác định Các giá trị chứng dương của HIV có nồng độ trong giới hạn

Kết quả của mẫu bệnh phẩm được diễn giải như sau:

Giá trị trên máy	Trả lời kết quả
Target Not Detected	Không phát hiện thấy HIV-RNA
< 2.00E+01 cp/ml	< 20 cp/ml
≥ 2.00E+01 cp/ml đến ≤ 1.00E+07 cp/ml	nhận những kết quả trong giới hạn này: ≥ 20cp/ml đến ≤ 1.00 x 10 ⁷ cp/ml
> 1.00E+07 cp/ml	> 1.00 x 10 ⁷ cp/ml
Invalid	Không giá trị, chạy lại mẫu bệnh phẩm

11. An toàn:

Thực hiện theo đúng theo nguyên tắc phân loại cấp độ an toàn sinh học đối với nhóm nguy cơ của tác nhân sinh học (HIV thuộc nhóm 2). Thực hiện theo hướng dẫn sử dụng hoá chất sinh phẩm và an toàn khi sử dụng hoá chất phòng xét nghiệm

12. Lưu ý:

Việc lấy mẫu máu, vận chuyển và bảo quản không đúng tiêu chuẩn có thể dẫn đến kết quả sai, cho dù phản ứng được thực hiện đúng.

Quy trình này chỉ áp dụng cho phát hiện và định lượng HIV-RNA cho mẫu bệnh phẩm là huyết tương EDTA.

Quy trình này chỉ áp dụng cho phát hiện và định lượng HIV-RNA 1 nhóm M, O, không áp dụng cho chẩn đoán nhiễm HIV 2.

13. Tài liệu liên quan :

Tên tài liệu
- Phiếu trả lời kết quả xét nghiệm.
- Sổ kết quả xét nghiệm định lượng HIV-RNA
- Sơ đồ xét nghiệm định lượng trên hệ thống máy COBAS Ampliprep/COBAS TaqMan 48
- Sổ tay hướng dẫn lấy mẫu
- Sổ tay an toàn
- Hướng dẫn sử dụng hệ thống máy COBAS® Ampliprep/COBAS® TaqMan 48 Analyzer
- Tóm tắt treo tường hướng dẫn sử dụng hệ thống máy COBAS® Ampliprep/COBAS® TaqMan 48 Analyzer
- COBAS® Ampliprep/COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, version 2.0 (Roche Diagnostics GmbH)

Phụ lục 3:

Quy trình xét nghiệm đo tải lượng HIV bằng *kỹ thuật mẫu giọt máu khô* DBS-PBS

1. Chuẩn bị và thu thập mẫu xét nghiệm

Các mẫu máu toàn phần được thu nhận từ máu tĩnh mạch tại mỗi thời điểm cho các mẫu huyết tương và DBS-PBS. Các mẫu cho việc đo tải lượng virus huyết tương (xác định là phương pháp chuẩn) được vận chuyển tới khoa Vi sinh bệnh viện Bạch Mai. Để chuẩn bị mẫu DBS-PBS, ngay sau khi được thu thập lấy khoảng 1 giọt (70 μ L) máu được nhỏ lên 5 chấm của giấy Whatman 903r. Các giọt máu được hong khô ở nhiệt độ phòng trong tối thiểu 4 giờ. Sau đó các mẫu DBS được chuyển đến khoa Vi sinh để thực hiện xét nghiệm đo tải lượng vi rút (thực hiện ngay hoặc được lưu đông -80°C cho đến khi xét nghiệm, các mẫu bảo quản được đánh số, đặt trong túi loại bỏ khí chứa 2 gói chống ẩm và bảo quản đông ở -80°C)

Thực hiện kỹ thuật DBS-PBS: theo hướng dẫn của nhà sản xuất, 1 giọt máu tương đương 70 μ L trên chấm của giấy Whatman 903r được ủ với 1 mL đệm muối phosphat không chứa calcium và magnesium (PBS) trong ống mẫu CAP/CTM S ở nhiệt độ phòng trong 60 phút, không lắc. Dịch đầy PBS, cùng với giấy DBS, sau đó được xử lý theo quy trình COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 Test v2.0 (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ)

2. Quy trình giải phóng virus tự do bằng PBS, V1.0

1. Đưa bộ kit xét nghiệm AmpliPrep/cobas TagMan HIV-1 v2.0 ra khỏi tủ lạnh, để cân bằng ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 30 phút. Khởi động quy trình “Bảo dưỡng hàng ngày” trên máy, đối với mỗi lần sử dụng hàng ngày, trong khi bộ Kit cân bằng.

2. Sắp xếp và đánh dấu các ống mẫu S-tube cho xét nghiệm dựa trên thiết kế thí nghiệm.
3. Cắt các đốm máu khô theo đường kẻ đứt và đặt các đốm máu vào ống được đánh dấu tương ứng (cắt các đốm máu bằng kéo và gấp đốm máu khô xuôi xuống trung tâm, mặt phát hiện hướng vào trong và đặt vào ống mẫu S-tube).
4. Lau kéo bằng bleach và ethanol giữa mỗi mẫu, và nếu có thể bắt đầu với các mẫu có hiệu giá thấp nhất trước và kết thúc với mẫu có hiệu giá cao nhất để tránh nhiễm chéo.
5. Hút 1000mL đệm PBS (xem phần ghi chú) vào mỗi ống chứa mẫu DBS.
6. Ủ các mẫu ở nhiệt độ phòng (thời gian ủ 30 phút đến 2 giờ, chúng tôi hiện tại đang thực hiện với thời gian ủ khoảng 1 giờ trước khi đưa mẫu vào máy)
7. Nhẹ nhàng vỗ đáy ống để đồng nhất dung dịch nhưng chỉ xáo trộn tối thiểu lên các DBS.
8. Nạp các ống vào giá mẫu SK với các kẹp mã vạch.
9. Nạp vật tư tiêu hao vào hệ thống cobas AmpliPrep/cobas Taqman (CAP/CTM) và nạp trình tự mẫu vào hệ thống. Đảm bảo rằng số của giá mẫu SK được đưa vào hệ thống trùng khớp với số của giá mẫu SK mà các ống mẫu được nạp vào.
10. Lựa chọn quy trình chạy trên hệ thống (HI2DFSP96).
11. Nạp mẫu vào máy CAP/CTM sau khi trình tự mẫu đã được lưu.
12. Nạp sinh phẩm vào máy CAP/CTM sau khi thời gian ủ từ 30 phút đến 2 giờ đã đủ.
13. Chọn nút [Start] để bắt đầu mẻ chạy.

14. Đưa sinh phẩm ra khỏi máy, bỏ các vật tư tiêu hao đã sử dụng khi mẻ chạy được chuyển sang vị trí Cobas TaqMan (R) của hệ thống máy.

Lưu ý: *Phosphate-Buffered Saline không có calcium và magnesium được cung cấp bởi Mediatech, Inc. và sản xuất bởi Corning Cellgro, CAT# 21-040-CV.*

Phụ lục 4:

Quy trình xét nghiệm XÁC ĐỊNH KIỂU GEN VÀ ĐỘT BIẾN KHÁNG THUỐC HIV BẰNG GIẢI TRÌNH TỰ (Tham khảo QTKT Phòng Thí Nghiệm Chẩn Đoán Phân Tử - NIHE)

1. Nguyên lý cơ bản

- Phương pháp xác định kiểu gen và đột biến kháng thuốc của virus HIV-1 khuếch đại cả vùng gen *pol* của virus HIV-1 bao gồm 2 đoạn PR và RT.

- Quy trình xét nghiệm gồm các bước sau:

- ✓ Tách chiết ARN virus HIV từ mẫu bệnh phẩm.
- ✓ Phiên mã ngược ARN thành ADN bổ sung và khuếch đại đoạn gen protease (PR) có kích thước 697bp và đoạn gen Reverser Transcriptase (RT) kích thước 1405bp bằng kỹ thuật RT-PCR, sử dụng cặp mồi PCR_F1 và PCR_R3 cho đoạn PR, cặp mồi PCR_F3 và PCR_R1 cho đoạn RT.
- ✓ Thực hiện phản ứng Nested PCR, sử dụng sản phẩm RT-PCR làm khuôn, dùng cặp mồi PCR_F2 và PCR_R4 cho đoạn PR, cặp mồi PCR_F4 và PCR_R2 cho đoạn RT để khuếch đại đặc hiệu đoạn gen PR kích thước 573bp và đoạn gen RT kích thước 1139bp.
- ✓ Sản phẩm nested PCR được tinh sạch để tiến hành phản ứng Cycle sequencing sử dụng 2 mồi (PCR_F2, PCR_R4) cho đoạn PR và 4 mồi (PCR_F4, SEQ_F2, PCR_R2, SEQ_R1) cho đoạn RT.
- ✓ Sản phẩm Cycle sequencing sau tinh sạch được tiến hành điện di trên máy ABI 3130 để giải trình tự.
- ✓ Sử dụng phần mềm DNA Star Lasergene - Seqman để nối các trình tự thu được với các mồi riêng biệt thành 1 trình

tự gen hoàn chỉnh và xác định các nucleotide.

✓ Phân tích dữ liệu trình tự thu được bằng phần mềm trên trang web trực tuyến của Đại học Stanford để xác định kiểu gen và đột biến kháng thuốc của virus HIV.

2. Khái niệm, thuật ngữ

2.1. Vùng gen *pol* của virus HIV là một vùng gen trong cấu trúc gen tổng thể của virus HIV. Vùng gen *pol* được chia thành 3 đoạn, mã hóa cho 3 loại enzyme khác nhau của virus HIV: Protease (PR), Reverse Transcriptase (RT) và Integrase.

2.2. Đoạn gen PR mã hóa cho enzyme Protease. Đây là enzyme cắt chuỗi polyprotein mới được tổng hợp thành các đoạn protein ngắn hơn để tạo hạt virus hoàn chỉnh có khả năng gây bệnh.

2.3. Đột biến kháng thuốc trên đoạn gen PR là loại đột biến làm thay đổi cấu trúc enzyme Protease nên các thuốc kháng virus bị giảm tác dụng ức chế.

2.4. Đoạn gen RT mã hóa cho enzyme Reverse Transcriptase. Đây là enzyme sao mã ngược ARN của virus HIV thành ADN trong chu kỳ sống của virus HIV.

2.5. Đột biến kháng thuốc trên đoạn gen RT là loại đột biến làm thay đổi cấu trúc enzyme Reverse Transcriptase nên các thuốc kháng virus bị giảm tác dụng ức chế.

3. Đặc trưng của quy trình xét nghiệm

Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ tái lập cao:

- Độ tương đồng về trình tự nucleotide dao động trong khoảng 97 - 100%.
- Độ tái lập về kiểu gen của virus HIV xác định được là 100%.
- Độ tái lập về các đột biến kháng thuốc phát hiện được là 100%.

4. Loại mẫu bệnh phẩm

- Huyết tương được tách từ máu toàn phần sử dụng chất chống đông K2EDTA.

5. Sự chuẩn bị của bệnh nhân

- Bệnh nhân được xác định lấy khoảng 05 ml máu.

6. Loại dụng cụ chứa mẫu và các chất phụ gia

- Mẫu máu toàn phần được thu vào ống chân không (chứa chất chống đông EDTA)

- Mẫu huyết tương chứa trong các ống cryogenic đã được tiệt trùng và không có Rnase và Dnase

7. Thiết bị và vật tư tiêu hao

7.1.Thiết bị

- Tủ an toàn sinh học:
- Tủ PCR chamber ở phòng Amplification
- Máy PCR Proflex
- Máy điện di
- Máy đọc gel VESADOC
- Lò vi sóng
- Cân
- Máy ABI 3130
- Máy ly tâm 5415R
- Máy đông khô Concentrator 5301
- Máy ly tâm nhanh Mini-spin
- Máy lắc
- Máy lọc nước Milli-Q
- Tủ lạnh +4°C
- Tủ lạnh -20°C

- Tủ lạnh -80°C
- Pipet tự động, đơn kênh có thể tích hút từ 10 →1000µl
- Pipet tự động 8 kênh, thể tích 10 →100µl

7.2. Vật tư tiêu hao

- Giá xếp mẫu bệnh phẩm
- Khay lạnh
- Đầu côn loại 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl
- Tuýp Eppendorf Microcentrifuge 1,5 ml
- Tuýp PCR đơn 0,2ml
- Thanh 8 tuýp PCR 0,2ml
- Đĩa 96 giếng (Micro Amp)
- Tấm cao su phủ bề mặt đĩa phản ứng (Plate Septa)
- Tấm nhựa bọc ngoài đĩa phản ứng (Plate retainer)
- Khay nhựa đỡ đĩa phản ứng (Plate base)
- Túi rác các loại
- Thùng rác đựng đầu côn và hóa chất
- Găng tay không bột
- Giấy thấm không sợi (Kimmwipe)
- Giấy thấm

8. Hóa chất, sinh phẩm

8.1. Danh sách hóa chất, sinh phẩm:

TT	Tên hóa chất, sinh phẩm	Nhiệt độ phòng	Phòng Extraction
1	Sinh phẩm QIAamp Viral RNA mini - Qiagen. Mã: 52906.	-20°C	Phòng Reagent
2	Sinh phẩm SuperScript III One-Step RT-	-20°C	Phòng Reagent

TT	Tên hóa chất, sinh phẩm	Nhiệt độ phòng	Phòng Extraction
	PCR System with Platinum Taq High Fidelity - Invitrogen. Mã: 12574-030.		
3	Sinh phẩm Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity. Mã: 11304-029.	-20°C	Phòng Reagent
4	dNTPs - Invitrogen	-20°C	Phòng Reagent
	Hóa chất dùng để chạy điện di:		
6	Ultra Pure™ Agarose 100g - Invitrogen. Mã: CN16500-100.	Nhiệt độ phòng	Phòng Detection
7	- 50X TAE Buffer	Nhiệt độ phòng	Phòng Detection
8	- Trackit™ 1kb DNA Ladder - Invitrogen. Mã: 10488-072	4°C	Phòng Detection
9	- 6X Loading Dye - Fermentas. Mã: #R0611	4°C	Phòng Detection
10	Sinh phẩm BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing - Applied Biosystem. Mã: 4336915.		
	- BigDye v3.1 Reaction Mix	-20°C	Phòng Reagent
	- 5X BigDye Buffer	4°C	Phòng Reagent
11	3100 POP-7 polymer - ABI. Mã: 4352759.	4°C	Phòng Detection
12	10X Genetic Analyser Buffer with EDTA - ABI. Mã: 402824	4°C	Phòng Detection
13	Hi-Di™ Formamide - ABI. Mã: 4311320	-20°C	Phòng Amplification
14	Nước không chứa nuclease	4°C	Phòng Reagent

TT	Tên hóa chất, sinh phẩm	Nhiệt độ phòng	Phòng Extraction
15	Môi	-20 ⁰ C	Phòng Reagent
16	Ethanol 70 %	Nhiệt độ phòng	Khu vực SHPT
17	Virkon 2%	Nhiệt độ phòng	Khu vực SHPT
18	Sodium hypochloride 2 %	Nhiệt độ phòng	Khu vực SHPT
19	RNAseZAP - Ambion	Nhiệt độ phòng	Khu vực SHPT

8.2. Các môi sử dụng:

Tham khảo chi tiết sơ đồ vị trí môi (PCR1, PCR2, cycle sequencing) khi khuếch đại đoạn PR, đoạn RT hoặc đoạn RT- Begin/ RT- Middle khi tách đoạn tại phụ lục 1	Đoạn PR	Đoạn RT	Tách đoạn RT	
			RT - Begin	RT - Middle
PCR vòng 1	PCR-F1	PCR-F3	PCR-F3	PCR-F5
	PCR-R3	PCR-R1	PCR-R5	PCR-R1
PCR vòng 2	PCR-F2	PCR-F4	PCR-F4	PCR-F5
	PCR-R4	PCR-R2	PCR-R5	PCR-R2
Cycle sequencing	PCR-F2	PCR-F4	PCR-F4	PCR-F5
	PCR-R4	PCR-R2	PCR-R5	PCR-R2
		SEQ-F2		SEQ-R2

		SEQ-R1		
--	--	--------	--	--

Kiểm soát môi trường và an toàn

- Nhiệt độ cho phép: $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$
- Độ ẩm cho phép: $<80\%$

9. Quy trình kiểm soát chất lượng

9.1. Chứng dương: ARN đã được tách chiết từ những mẫu huyết tương được xác định là không có đột biến kháng thuốc trên đoạn PR và RT. Mẫu chứng dương cho quy trình được sử dụng từ bước PCR vòng 1.

9.2. Chứng âm: sản phẩm đã được tách chiết từ mẫu huyết thanh âm tính với ARN HIV hoặc sử dụng nước không có nuclease. Mẫu chứng âm cho quy trình được sử dụng từ bước PCR vòng 1 cho tới bước điện di sản phẩm PCR vòng 2.

9.3. Kiểm tra trình tự: thực hiện theo hướng dẫn đảm bảo chất lượng giải trình tự

10. Các bước tiến hành

10.1. Trước khi xét nghiệm

10.1.1. Lập các biểu mẫu cho số mẫu bệnh phẩm cần phân tích

- Lập danh sách mẫu xét nghiệm theo biểu mẫu “Danh sách mẫu xét nghiệm sinh học phân tử”
- Lập biểu mẫu cho từng giai đoạn của QTXN:

Giai đoạn	Tên biểu mẫu
Tách chiết ARN	Tách chiết ARN vi rút bằng QIAamp Viral RNA Mini
Phản ứng RT-PCR và Nested PCR	Phản ứng Nested RT-PCR cho gen PR và RT Xác định kiểu gen và phân tích đột biến kháng thuốc của HIV

Phản ứng RT-PCR và Nested PCR Khi tách đoạn RT	Phản ứng Nested RT-PCR cho gen RT (tách đoạn Begin và Middle) Xác định kiểu gen và phân tích đột biến kháng thuốc của HIV
Điện di sản phẩm PCR	Điện di axit nucleic
Chuẩn bị mẫu cho phản ứng Cycle Sequencing	Chuẩn bị mẫu cho phản ứng Cycle Sequencing
Phản ứng Cycle Sequencing	Phản ứng Cycle Sequencing - Xác định kiểu gen và phân tích đột biến kháng thuốc của HIV
Tinh sạch sản phẩm Cycle Sequencing	Tinh sạch sản phẩm phản ứng Cycle Sequencing
Điện di mao quản	Điện di mao quản trên máy ABI 3130
Phân tích kết quả	Kết quả giải trình tự

10.1.2. Trước mỗi giai đoạn của QTXN:

- Kiểm tra và khởi động các thiết bị cần sử dụng. Ví dụ:
 - ✓ Khởi động máy PCR ít nhất 5 phút trước khi thực hiện chương trình nhiệt.
 - ✓ Kiểm tra khởi động máy giải trình tự ABI 3130.
- Khử nhiễm dụng cụ, thiết bị, bề mặt, không gian làm việc theo hướng dẫn “Tổ chức thực hiện xét nghiệm sinh học phân tử” (HDCV03) và “Khử nhiễm phòng thí nghiệm” (HDAT03).
- Kiểm tra và chuẩn bị đủ vật tư tiêu hao và dụng cụ cần thiết như đầu côn, pipet, giá đựng ống nghiệm, khay lạnh, bình đá vảy.
- Chuẩn bị mẫu tương ứng với giai đoạn xét nghiệm: mẫu huyết tương/mẫu ARN/sản phẩm RT/sản phẩm PCR/sản phẩm cycle sequencing.

10.2. Tách chiết ARN

10.2.1. Mẫu có tải lượng HIV trên 3000 copies/ml:

- Thực hiện tách ARN từ mẫu bệnh phẩm theo hướng dẫn công việc “Tách chiết ARN virus (Qiagen)” (HDCV06). Thể tích mẫu bệnh phẩm sử dụng là 140µl.

10.2.2. Với mẫu có tải lượng HIV dưới 3000 copies/ml và thể tích huyết tương > 500 µl:

- Tra 500 µl mẫu vào các ống nắp xoáy 1,5 ml đã xếp theo đúng thứ tự các mẫu cần tách chiết.

- Ly tâm ống mẫu ở 20.000 vòng/phút trong 80 phút ở 4°C.

Lưu ý: khi đặt ống vào máy ly tâm, đánh dấu trên nắp và thân ống để xác định vị trí của axit nucleic bám vào ống sau khi ly tâm.

- Sau khi ly tâm, cẩn thận thải bỏ 360 µl phần dịch nổi trong ống bằng pipet, không chạm vào đáy ống để tránh lây đi kết tủa.

- Tra 560 µl dung dịch AVL - carrier ARN vào các ống. Trộn đều hỗn hợp bằng máy lắc trong 15 giây.

- Thực hiện các bước tách chiết “Tách chiết ARN virus (Qiagen)”.

10.2.3. Với mẫu có tải lượng < 3000 copies/ml nhưng thể tích huyết tương < 500 µl: thực hiện như mục 13.2.1.

10.3. Phản ứng PCR

10.3.1. Lựa chọn môi cho phản ứng PCR

- Sử dụng các môi như đã liệt kê ở mục 8.2.

- Trong trường hợp không khuếch đại thành công với những môi đã lựa chọn, phản ứng PCR có thể được thực hiện lại với tổ hợp môi mới: sử dụng chính cặp môi ở PCR vòng 1 để tiếp tục khuếch đại ở vòng 2.

10.3.2. Thực hiện phản ứng PCR vòng 1 (RT-PCR)

- **Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng (HHPU)** (tại phòng Reagent):

- ✓ Rã đông các ống chứa thành phần phản ứng nhiệt độ

phòng 15 phút:

- Môi [nồng độ 10 μ M];
- Nước không có nuclease;
- 2X Reaction Mix trong sinh phẩm SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity.

✓ Khi đã tan đông hoàn toàn, giữ các ống trên khay lạnh.

✓ Lưu ý: Chỉ lấy ống chứa enzyme từ tủ lạnh - 20oC và đặt ngay trên khay lạnh trước khi sử dụng.

✓ Chuẩn bị số lượng tuýp 0,2 ml phù hợp với số lượng mẫu. Mỗi mẫu cần hai ống, một để khuếch đại đoạn gen PR, ống còn lại khuếch đại đoạn gen RT. Ghi mã số mẫu trên thân tuýp. Ghi ký hiệu phản ứng PCR (PR1: đoạn gen PR; RT1: đoạn gen RT) và số thứ tự của mẫu trong lần thực hiện phản ứng trên cả thân và nắp tuýp PCR. Đặt các tuýp PCR trên khay lạnh.

✓ Chuẩn bị hai tuýp 1,5 ml, ký hiệu MPR và MRT để pha HHPU.

✓ Trộn đều tuýp môi và tuýp 2X Reaction Mix bằng máy vortex, ly tâm nhanh các ống.

Lưu ý: Không đảo trộn mạnh ống chứa enzyme. Ly tâm nhanh nếu cần thiết.

✓ Thành phần HHPU cho PCR vòng 1:

TT	Thành phần	Nồng độ sinh phẩm	Nồng độ phản ứng	Thể tích (μ l)		
				1 mẫu	Đoạn PR n mẫu	Đoạn RT n mẫu
1	2X Reaction Mix	MgSO ₄ : 2.4 mM dNTP: 400 μ M	MgSO ₄ : 1.2 mM dNTP: 200	12.50	12.50 x n	12.50 x n

		10 μ M	0.3 μ M	0.75	0.75 x n	0.75 x n
3	Mồi ngược	10 μ M	0.3 μ M	0.75	0.75 x n	0.75 x n
4	SuperScript Enzyme Mix			0.50	0.50 x n	0.50 x n
5	dH ₂ O			5.50	5.50 x n	5.50 x n
	<i>Tổng thể tích</i>			20.00	20.00 x n	20.00 x n

✓ Đảo trộn nhẹ nhàng để đồng nhất HHPU', ly tâm nhanh.

✓ Chia đều 20 μ l HHPU' vào từng tuýp PCR 0,2 ml đặt trên giá lạnh.

- **Tra mẫu ARN vào HHPU'** trong tủ an toàn sinh học (tại phòng Extraction):

✓ Trộn đều và ly tâm nhanh các ống chứa mẫu và ống chúng đã được chuẩn bị trước.

✓ Kiểm tra các mẫu ARN đã được sắp xếp theo thứ tự phù hợp.

✓ Tra 5 μ l từng mẫu vào các tuýp 0,2 ml tương ứng chứa HHPU', trộn đều bằng pipet 3 lần.

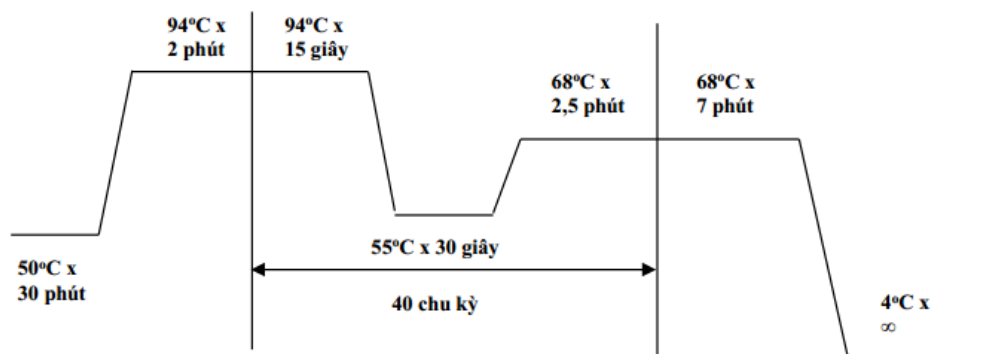
✓ Nếu dùng nước thay cho chúng âm, tra 5 μ l nước không có nuclease vào tuýp chứa HHPU' cho chúng âm.

Ly tâm nhanh các tuýp PCR.

- **Thực hiện phản ứng PCR** (tại phòng Amplification):

✓ Đặt các tuýp PCR 0,2 ml vào máy PCR Proflex.

✓ Lựa chọn chương trình nhiệt "PCR1" trong thư mục "IHHIVDRM" đã được cài đặt trên máy. Kiểm tra tổng thể tích phản ứng là 25 μ l.



- Sau phản ứng RT-PCR, bảo quản sản phẩm RT-PCR tại tủ 4°C (IVVI/REF/05) trong phòng Detection nếu sử dụng ngay trong vòng 24 giờ hoặc tủ -20°C trong phòng Amplification cho tới khi sử dụng.

10.3.3. Thực hiện phản ứng PCR vòng 2 (Nested PCR)

- Phản ứng PCR vòng 2 cho hai đoạn gen PR và RT được thực hiện trên hai máy PCR khác nhau, đảm bảo có hai máy sẵn sàng hoạt động nếu khuếch đại cả hai gen PR và RT cùng một lần.

- Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng (HHPU) (tại phòng Reagent):

- ✓ Rã đông các ống chứa thành phần phản ứng nhiệt độ phòng 15 phút:

- ✓ Môi [nồng độ 10 μ M];
- ✓ Nước không có nuclease;
- ✓ dNTPs [10mM];
- ✓ 10X High Fidelity Buffer
- ✓ Khi đã tan đông hoàn toàn, giữ các ống trên khay

lạnh.

- ✓ Lưu ý: Chỉ lấy ống chứa enzyme từ tủ lạnh -20°C và đặt trên khay lạnh ngay trước khi sử dụng enzyme.

- ✓ Chuẩn bị số lượng tuýp 0,2 ml phù hợp với số lượng mẫu. Mỗi mẫu cần hai ống, một để khuếch đại đoạn gen PR, ống còn lại khuếch đại đoạn gen RT. Ghi mã số mẫu trên thân tuýp. Ghi ký hiệu phản ứng PCR (PR2: đoạn gen PR; RT2: đoạn gen RT) và số thứ tự của mẫu trong lần thực hiện phản ứng trên cả thân và nắp tuýp PCR. Đặt các tuýp PCR trên khay lạnh.

- ✓ Chuẩn bị hai tuýp 1,5 ml, ký hiệu MPR và MRT để pha HHPU

- ✓ Trộn đều dung dịch trong ống chứa môi, dNTPs, Buffer bằng máy lắc, ly tâm nhanh các ống.

- ✓ Lưu ý: Không đảo trộn mạnh ống chứa enzyme. Ly tâm nhanh nếu cần thiết.

✓ Pha HHPU' cho PCR vòng 2:

TT	Thành phần	Nồng độ	Nồng độ của	1 mẫu	Đoạn PR n mẫu	Đoạn RT n mẫu
1	H2O không có nuclease			15,9	15,9 x n	15,9 x n
2	10X High Fidelity PCR Buffer	10X	1X	2,5	2,5 x n	2,5 x n
3	dNTPs	10 mM		0,5	0,5 x n	0,5 x n
4	MgSO4	50 mM		2,0	2,0 x n	2,0 x n
5	Mồi xuôi	10μM		0,5	0,5 x n	0,5 x n
6	Mồi ngược	10μM		0,5	0,5 x n	0,5 x n
7	Platinum Taq DNA polymerase			0,1	0,1 x n	0,1 x n
	Tổng thể tích			22,00		

✓ Đảo trộn nhẹ nhàng để đồng nhất HHPU', ly tâm nhanh ống.

✓ Chia đều 22 μl HHPU' vào từng tuýp PCR 0,2 ml đặt trên giá lạnh.

- **Tra sản phẩm PCR vòng 1 vào HHPU'** trong tủ PCR Chamber (tại p.Amplification):

✓ Đặt các tuýp PCR 0,2 ml chứa HHPU' trên khay lạnh.

✓ Trộn đều và ly tâm nhanh các ống chứa sản phẩm PCR vòng 1 đã được chuẩn bị trước.

✓ Sắp xếp các mẫu theo thứ tự phù hợp.

✓ Tra 3 μl sản phẩm PCR vòng 1 vào các tuýp 0,2 ml

tương ứng chứa HHPU' cho PCR vòng 2. Hút pipet lên xuống 3 lần để đồng nhất hỗn hợp.

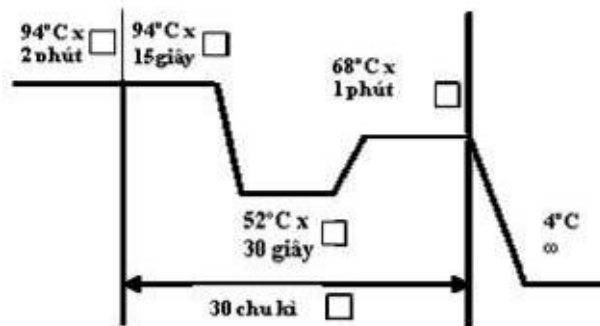
✓ Ly tâm nhanh các tuýp 0,2 ml.

- **Thực hiện phản ứng PCR** (tại phòng Amplification):

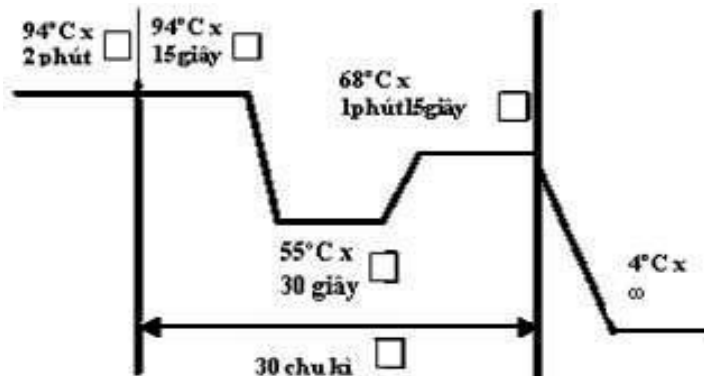
✓ Đặt riêng rẽ các tuýp PCR 0,2 ml PR2 và RT2 vào các máy PCR Proflex

✓ Lựa chọn chương trình nhiệt trong thư mục “IHHIVDRM” đã được cài đặt trên máy. Kiểm tra tổng thể tích phản ứng là 25 μ l.

✓ Khuếch đại đoạn PR, chọn chương trình “PCR2PR”. Kiểm tra thể tích khai báo.



✓ Khuếch đại đoạn RT, chọn chương trình “PCR2RT”. Kiểm tra thể tích khai báo



- Khi kết thúc quá trình chạy PCR, bảo quản sản phẩm PCR tại tủ 4°C

trong phòng Detection trong 24 giờ hoặc tủ -20°C trong phòng Amplification trong thời gian lâu hơn.

- *Lưu ý:* Khi không thể khuếch đại cả đoạn RT hoặc chất lượng giải trình tự đoạn RT không đảm bảo, thực hiện tách đoạn RT để khuếch đại riêng rẽ RT-Begin và RT-Middle bằng PCR vòng 1 và PCR vòng 2.

10.4. Điện di sản phẩm PCR vòng 2 (Tại phòng Detection)

- Điện di sản phẩm PCR vòng 2 theo hướng dẫn công việc “Điện di axit nucleic” (HDCV09) với các điều kiện điện di:

✓ Hiệu điện thế: 100 V

✓ Thời gian: 30 phút

- Sử dụng gel agarose 1% và thang chuẩn ADN 1kb.

- Với giếng cho thang chuẩn ADN: tra 5µl thang chuẩn ADN (nồng độ 0.1 µg/µl). Với các giếng cho mẫu: tra 1µl 6X Loading Dye và 5µl sản phẩm PCR vòng 2.

- Sản phẩm ADN được nhân lên có kích thước: đoạn PR (573bp), đoạn RT (1139bp).

- Đánh giá kết quả điện di sản phẩm PCR vòng 2 và xác định các mẫu có băng sản phẩm đặc hiệu để tinh sạch và pha loãng.

10.5. Chuẩn bị mẫu cho phản ứng Cycle Sequencing

10.5.1. Pha loãng sản phẩm PCR

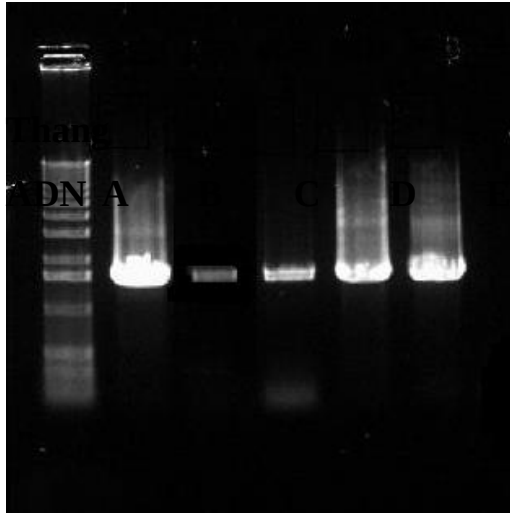
- Lượng ADN cần thiết cho phản ứng Cycle Sequencing (thể tích 10 µl), sử dụng sinh phẩm BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing là 05 - 20 ng.

- Xác định hệ số pha loãng mẫu để có lượng ADN phù hợp cho vào phản ứng Cycle Sequencing bằng 2 cách:

✓ Xác định nồng độ ADN bằng phương pháp đo quang phổ (tham khảo HDTB38 về cách sử dụng máy đo quang phổ).

✓ Xác định nồng độ ADN tương đối bằng cách so

sánh độ sáng của băng điện di sản phẩm PCR đặc hiệu với vạch có kích thước tương ứng trong thang chuẩn ADN.



Hình 1. Minh họa về cách xác định tỷ lệ pha loãng mẫu khi so sánh độ sáng của các băng điện di đặc hiệu với thang chuẩn ADN

Mẫu	A	B	C	D	E
Tỷ lệ pha loãng	1:40	Không pha loãng	1:5	1:15	1:20

- Tại phòng Amplification:

- ✓ Thực hiện pha loãng sản phẩm PCR đã tinh sạch trong tủ PCR chamber.
- ✓ Chuẩn bị số lượng tuýp 0,2 ml phù hợp. Ghi rõ mã số mẫu và tỷ lệ pha loãng trên các tuýp. Đặt các tuýp trên khay lạnh theo thứ tự cần pha loãng.
- ✓ Đặt các tuýp chứa sản phẩm PCR cần pha loãng trên khay lạnh theo thứ tự tương ứng.
- ✓ Tra nước không chứa nuclease vào tuýp 0,2 ml với thể tích đã tính toán.
- ✓ Tra sản phẩm PCR đã tinh sạch vào tuýp 0,2 ml tương ứng để có nồng độ ADN cần thiết.

- ✓ Hút pipet lên xuống 3 lần để đồng nhất hỗn hợp.
Sau đó ly tâm nhanh.
- ✓ Bảo quản sản phẩm PCR gốc (chưa pha loãng hết) ở tủ -20°C tại P. Amplification.

10.6. Thực hiện phản ứng cycle sequencing

10.6.1. Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng (HHPU) cho Cycle Sequencing (phòng Reagent):

- Rửa đông các ống chứa thành phần phản ứng tại nhiệt độ phòng:
 - ✓ Môi (nồng độ 2 μ M): 2 môi (PCR_F2, PCR_R4) cho đoạn PR và 4 môi (PCR_F4, SEQ_F2, PCR_R2, SEQ_R1) cho đoạn RT.
 - ✓ Nước không có nuclease.
 - ✓ 5X Big Dye Buffer .
- Lưu ý: Lấy ống Big Dye v3.1 Reaction Mix từ tủ -20°C và giữ trên khay lạnh.
- Chuẩn bị số lượng thanh 8 tuýp 0,2 ml phù hợp với số lượng mẫu. Ghi mã số mẫu trên thanh phản ứng và ghi vị trí tuýp ương ứng với biểu mẫu trên từng tuýp 0,2 ml.
- Chuẩn bị 1 tuýp 1,5 ml để pha HHPU.
- Dùng máy lắc để trộn đều dung dịch trong ống chứa môi, ống 5X Big Dye Buffer. Sau đó, ly tâm nhanh các ống.
- Lưu ý: Không đảo trộn mạnh ống chứa enzyme. Ly tâm nhanh nếu cần thiết.
- Pha HHPU cho Cycle sequencing:

TT	Thành phần	Cho 1 phản ứng (μ l)	Cho n phản ứng (μ l)
1	Big Dye v3.1 Reaction Mix	1,0	1,0 x n

2	5X Big Dye Buffer	2,0	2,0 x n
3	dH2O	3,0	3,0 x n
	Tổng thể tích	6,0	6,0 x n

- Chia HHPU vào từng tuýp 0,2 ml của thanh phản ứng với thể tích 6 μ l/tuýp.

- Tra các loại môi (nồng độ 2 μ M) vào từng tuýp 0,2 ml tương ứng trên thanh phản ứng với thể tích 2 μ l/ tuýp. Nồng độ cuối của môi là 0,4 μ M.

- Đảo trộn nhẹ nhàng để đồng nhất HHPU.

10.6.2. Tra sản phẩm PCR đã chuẩn bị vào HHPU (phòng Amplification):

- Đặt các thanh phản ứng trên khay lạnh.

- Trộn đều và ly tâm nhanh các ống chứa sản phẩm PCR đã được chuẩn bị cho phản ứng Cycle Sequencing.

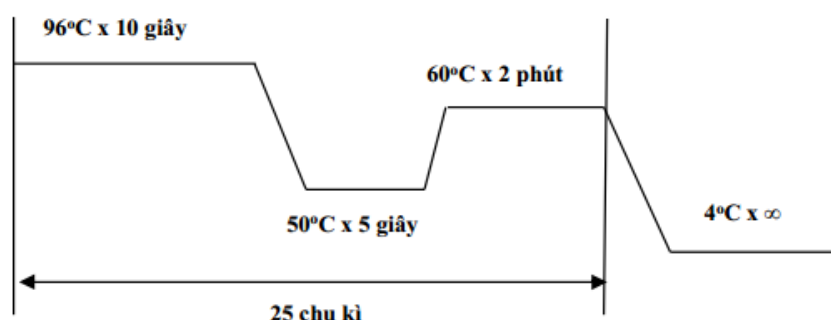
- Sắp xếp các ống chứa mẫu theo thứ tự phù hợp.

- Tra 2 μ l mẫu vào các tuýp 0,2 ml chứa HHPU Cycle Sequencing tương ứng.

- Hút pipet lên xuống 3 lần để đồng nhất hỗn hợp. Ly tâm nhanh các thanh phản ứng.

- Đặt các thanh phản ứng vào máy PCR Proflex.

- Lựa chọn chương trình nhiệt “HIVSEQ” trong thư mục “IHHIVDRM” đã được cài đặt trên máy. Kiểm tra tổng thể tích phản ứng là 10 μ l.



- Khi kết thúc chương trình nhiệt, bọc giấy bạc các sản phẩm Cycle Sequencing và bảo quản tại tủ 4°C trong phòng Detection.

10.7. Tinh sạch sản phẩm Cycle sequencing bằng hóa chất

- Tinh sạch sản phẩm phản ứng Cycle Sequencing theo hướng dẫn công việc “Giải trình tự ADN sử dụng sinh phẩm BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing trên máy ABI 3130”.

10.8. Giải trình tự bằng phương pháp điện di mao quản trên máy ABI 3130

- Tra 10µl mẫu vào các giếng trên đĩa 96 giếng Micro Amp theo đúng vị trí.

- Thực hiện điện di mao quản theo hướng dẫn “Giải trình tự ADN sử dụng BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing trên máy ABI 3130” .

✓ Sử dụng mao quản có chiều dài 50 mm và sinh phẩm POP-7 để chạy điện di.

✓ Chương trình chạy: RUN_POP7_50.

✓ Chương trình phân tích: Sequencing_POP7_V3.1

10.9. Phân tích kết quả

10.9.1. Xử lý dữ liệu kết quả

- Kết quả điện di mao quản được thu thập và xử lý bằng phần mềm DNA sequencing analysis v5.1 trên máy tính kết nối với máy ABI 3130. Sao chép kết quả ra đĩa CD/DVD và lưu vào máy tính IVVI-CPU-08.

- Kiểm tra chất lượng từng trình tự thu được theo các tiêu chuẩn.

- Sử dụng phần mềm SeqMan để tổng hợp trình tự nucleotide thu được từ các môi riêng biệt thành 1 trình tự gen hoàn chỉnh.

- Xác định trình tự nucleotide. Trình tự tổng hợp cần được khẳng định dựa trên dữ liệu từ tối thiểu 2 trình tự riêng biệt.

- Trình tự nucleotide tổng hợp cần được kiểm tra lại bởi một nhân viên

khác để có kết quả thống nhất trước khi đăng tải lên trang web phân tích. Sử dụng biểu mẫu “Kết quả giải trình tự” để tổng hợp kết quả.

- Lưu trình tự gen đã tổng hợp bằng 2 dạng file: FASTA và SQD theo từng mẫu trên máy tính IVVI-CPU-08.

- Trình tự gen đã tổng hợp được đăng tải lên trang web http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/sierra_sequence.html và được phân tích bởi phần mềm trực tuyến để xác định kiểu gen và những đột biến kháng thuốc trên đoạn gen PR và RT của virus HIV-1.

10.9.2. Báo cáo kết quả

- In bản báo cáo kết quả từ trang web và lưu giữ cùng các biểu mẫu thực hiện quy trình trong tập hồ sơ: “Xác định kiểu gen và phân tích đột biến kháng thuốc của HIV (In-house)”.

- Tham khảo thông tin về đột biến kháng thuốc theo phụ lục 2,3 và 4 của quy trình.

- Kết quả báo cáo tổng hợp bởi trang web gồm 5 phần:

Phần 1: Dữ liệu tổng quát:

- ✓ Số lượng bộ 3 mã hóa trên từng đoạn gen PR và RT (số lượng bộ 3 tối thiểu của đoạn PR: 10-95 codon và đoạn RT: 41-238 codon).

- ✓ Thông tin về những nucleotide được chèn thêm hoặc mất đi.

- ✓ Xác định kiểu gen của virus HIV-1: Kiểu gen của virus HIV-1 được xác định dựa trên độ tương đồng về trình tự nucleotide khi so sánh trình tự gen cần phân tích với trình tự gen tham khảo của các kiểu gen khác nhau của virus HIV-1 (kiểu gen A, B, C, D, F, G, H, J, K, CRF01_AE và CRF02_AG).

Phần 2: Đánh giá chất lượng của trình tự gen (QA):

- Chất lượng của trình tự gen được báo cáo bằng bảng và biểu đồ cột:

- ✓ Bảng báo cáo bao gồm các hạng mục đánh giá sau:
 - Đoạn trình tự gen có chứa bộ ba kết thúc hoặc bị dịch chuyển khung dịch mã acid amin khi chèn thêm hoặc mất đi nucleotide.
 - Đoạn trình tự gen có chứa các nucleotide không rõ ràng như: N (tổng hợp của A, C, G, T); B (tổng hợp của C, G, T); D (tổng hợp của A, G, T); H (tổng hợp của A, C, T) và V (tổng hợp của A, C, G).
 - Đoạn trình tự gen có chứa nhiều các đột biến không thường gặp. Các đột biến này không gây ra kháng thuốc và tần suất xuất hiện $< 0,05\%$.

✓ Biểu đồ hình cột:

- Cột màu xanh: Vị trí các bộ 3 mã hóa trên đoạn gen của mẫu khác với trình tự gen tham khảo của virus HIV subtype B.
- Cột cao màu xanh: Vị trí các đột biến có liên quan tới kháng thuốc.
- Cột màu đỏ: Vị trí các bộ 3 mã hóa có vấn đề về chất lượng trình tự, được nêu chi tiết trong bảng báo cáo.

Phần 3: Kết quả về các đột biến kháng thuốc trên vùng PR

- ✓ Liệt kê các loại đột biến kháng thuốc:
 - Đột biến kháng thuốc chính: gây ra kháng thuốc HIV.
 - Đột biến kháng thuốc thứ yếu: có thể gây ra kháng thuốc HIV hoặc khi phối hợp với các đột biến khác cũng sẽ gây ra kháng thuốc HIV.
 - Đột biến khác: là những đột biến thường gặp (kể cả ở

những bệnh nhân chưa được điều trị) và ảnh hưởng không đáng kể tới kháng thuốc HIV.

✓ Liệt kê khả năng kháng với 8 loại thuốc gây ức chế enzyme Protease (Atazanavir, Darunavir, Fosamprenavir, Indinavir, Lopinavir, Nelfinavir, Saquinavir và Tipranavir).

✓ Các mức độ kháng thuốc bao gồm:

- Không bị kháng.
- Có khả năng kháng thấp hoặc kháng mức độ thấp.
- Có khả năng kháng hoặc kháng mức độ trung bình.
- Kháng mức độ cao.

✓ Giải thích ảnh hưởng của từng đột biến kháng thuốc với 8 loại thuốc trên.

Phần 4: Kết quả về các đột biến kháng thuốc trên vùng Reverse Transcriptase

✓ Liệt kê các đột biến:

- Đột biến kháng nhóm thuốc Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTI).
- Đột biến kháng nhóm thuốc Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTI).
- Đột biến khác.

✓ Liệt kê khả năng kháng với:

- 7 loại thuốc nhóm NRTI (Lamivudine, Abacavir, Zidovudine, Stavudine, Didanosine, Emtricitabine, Tenofovir).
- 4 loại thuốc nhóm NNRTI (Delavirdine, Efavirenz, Etravirine, Nevirapine).

✓ Các mức độ kháng thuốc.

- ✓ Giải thích ảnh hưởng của từng đột biến kháng thuốc với 11 loại thuốc trên.

Phần 5: Tính điểm cho các đột biến kháng thuốc

- ✓ Với mỗi đột biến kháng thuốc phát hiện được, mức độ các đột biến gây kháng với thuốc kháng HIV được thể hiện dưới dạng điểm số. Không gây kháng thuốc: 0 điểm. Điểm số càng cao thì mức độ kháng càng tăng.
- ✓ Trong trường hợp phần 4 không giải thích rõ ảnh hưởng của các đột biến gây kháng với thuốc nào thì căn cứ vào điểm số để quyết định khả năng kháng thuốc của các đột biến.

10.10. Ghi dữ liệu file kết quả

Lưu dữ liệu kết quả xét nghiệm vào đĩa ghi dữ liệu “Xác định kiểu gen và phân tích đột biến kháng thuốc HIV (In-house)” định kỳ ít nhất 2 tháng/lần.

11. Kết quả và biện luận

11.1. Hiệu lực xét nghiệm:

- Lần xét nghiệm được coi là đạt khi:
 - ✓ Mẫu chứng dương có trình tự nucleotide rõ ràng và không có đột biến kháng thuốc.
 - ✓ Mẫu chứng âm: không có băng ADN khi điện di kiểm tra sản phẩm PCR vòng 2.

- Nếu kết quả xét nghiệm không đạt, QLCL, QLKT và nhân viên xét nghiệm cần thực hiện thủ tục “Xác định và kiểm soát sự không phù hợp” (MS-TT08).

11.2. Nhận định kết quả

- Trình tự nucleotide xác định bởi từng môi được coi là đạt khi đảm bảo các tiêu chuẩn nêu trong HDCV21.

- Đối với mỗi mẫu, trình tự nucleotide tổng hợp từ các môi được coi là đạt khi:

- ✓ Trình tự tổng hợp cần được khẳng định dựa trên tối thiểu 2 trình tự.

- ✓ Số lượng bộ 3 mã hóa cần thiết tối thiểu của đoạn PR: 10-95 codon và đoạn RT: 41-238 codon.

- ✓ Không có bộ ba kết thúc trong trình tự nucleotide phân tích.

- Khi có các vấn đề về chất lượng trình tự nucleotide, thảo luận để đưa ra biện pháp xử lý thích hợp:

- ✓ Tổng hợp và phân tích lại kết quả trình tự nucleotide trên phần mềm SeqMan.

- ✓ Thực hiện lại xét nghiệm từ phản ứng Cycle Sequencing hoặc phản ứng PCR nếu cần thiết.

Phụ lục 5

DANH SÁCH CÁC ĐỘT BIẾN CẦN THEO DÕI (SDRM_s)

Đột biến với NRTIs

<i>Đột biến</i>	<i>Điểm⁽¹⁾</i>	<i>Đột biến cần giám sát</i>	<i>Tỷ lệ đột biến</i>		<i>% không có thêm đột biến chính khác⁽²⁾</i>	<i>Mức độ kháng kiểu hình</i>			
			<i>Bệnh nhân chưa tiếp xúc ARV</i>	<i>Bệnh nhân đã điều trị ARV</i>		<i>3TC</i>	<i>ABC</i>	<i>AZT</i>	<i>TDF</i>
M184V	60	✓	0.2	52	35	>50	3	0.3	0.5
K65R	60	✓	0.04	4	30	5	3	0.8	2
Q151M	60	✓	0	3	9	1.7	4	5	1.1
M184I	60	✓	0.03	2	28	>50	1.7	0.3	0.6
T215Y	45	✓	0.02	28	21	1.5	1.8	6	1.4
T215F	45	✓	0.01	10	7	1.5	1.7	8	1.6
Y115F	45	✓	0.01	2	1	1.4	3	4	1.7
T69i	45	✓	0	1	3	3	5	18	4
K70R	30	✓	0.07	18	12	1.3	1.3	5	1.7
L74V	30	✓	0.01	9	6	1	1.5	0.3	0.6
L74I	30	✓	0.02	4	2	0.8	1.2	0.8	0.8
D67d	30		0	0.09	0	NA	NA	NA	NA
M41L	15	✓	0.3	30	2	1.1	1.1	2	1.5
D67N	15	✓	0.04	28	1	1.2	1.2	2	1.2
L210W	15	✓	0.06	19	2	1.2	1.4	4	1.6
T215I	15	✓	0.03	1	6	1.8	1.5	5	1.6
T215S	15	✓	0.3	0.9	13	0.8	0.8	0.3	0.7
T215C	15	✓	0.09	0.8	20	0.9	1	1.2	0.8
T215D	15	✓	0.3	0.6	45	1.3	0.8	0.3	0.6
T215V	15	✓	0.01	0.6	4	1.1	1	1.7	1
K70E	15	✓	0.02	0.6	7	2	1.1	0.2	1
K70G	15		0	0.4	4	1.4	1.2	0.3	1.1
T69d	15		0	0.2	2	NA	NA	NA	NA
T215E	15	✓	0.1	0.2	39	2	1.1	1.2	1.3
K65N	15		0.03	0.1	20	NA	NA	NA	NA
K219Q	10	✓	0.09	11	2	1.1	1	0.9	1
T69D	10	✓	0.03	6	3	1.1	1	0.8	0.9
K219E	10	✓	0.03	6	2	1	0.9	0.4	0.8
V75M	10	✓	0.03	3	1	0.9	1.3	1.4	1.1
K219N	10	✓	0.04	3	3	1.2	1.1	1.1	-1
K219R	10	✓	0.07	3	2	1.8	1.6	3	1.5
D67G	10	✓	0.05	2	5	1.1	1.1	2	1.2
F116Y	10	✓	0.01	2	0	1.1	1	3	1.2
F77L	10	✓	0.1	2	2	1	0.9	4	1.4
V75T	10	✓	0	1	6	1.8	1.6	0.8	0.9
D67E	10	✓	0.01	0.6	1	1.2	1.5	1	1.5
K70T	10		0.03	0.3	8	0.1	0.9	3	1.8
K70N	10		0.03	0.3	6	1	1.3	1.6	1.4
K70Q	10		0.02	0.2	3	NA	NA	NA	NA
K65E	10		0.03	0.1	22	NA	NA	NA	NA
A62V	5		0.9	4	3	0.9	1.0	1.2	1.2
V75I	5		0.04	3	4	1.5	1.1	1.8	0.9

⁽¹⁾Điểm tính mức độ kháng thuốc theo ngân hàng dữ liệu kháng thuốc HIV của Stanford,

⁽²⁾ tỷ lệ mẫu bệnh nhân có đột biến kháng thuốc không có thêm đột biến chính khác kháng NRTIs (điểm ≥ 30)/tổng số mẫu có đột biến kháng thuốc.

Đột biến với NNRTIs

Đột biến	Điểm ⁽¹⁾	Đột biến cần giám sát	Tỷ lệ đột biến		% không có thêm đột biến chính khác ⁽²⁾	Mức độ kháng kiểu hình			
			Bệnh nhân chưa tiếp xúc ARV	Bệnh nhân đã điều trị ARV		NVP	EFV	ETR	RPV
K103N	60	✓	1.0	36	37	24	21	1.3	2
Y181C	60	✓	0.1	20	29	16	2	8	3
G190A	60	✓	0.2	15	12	11	11	0.9	1.3
V106M	60	✓	0.01	5	15	18	32	0.6	NA
L100I	60	✓	0.01	4	1	3	14	6	7
Y188L	60	✓	0.04	4	55	>50	>50	3	10
G190S	60	✓	0.01	3	26	35	>50	0.9	NA
M230L	60	✓	0.02	2	5	6	7	4	5
V106A	60	✓	0.01	2	13	>50	7	0.4	NA
K103S	60	✓	0.04	2	5	11	7	1.5	1.7
K101P	60	✓	0	1	5	18	25	22	>50
Y188C	60	✓	0.01	0.9	19	>50	35	NA	NA
Y181I	60	✓	0.01	0.9	49	>50	1.4	30	24
Y181V	60	✓	0	0.6	56	>50	2	>50	NA
G190E	60	✓	0.02	0.5	67	>50	>50	>50	27
Y188H	60	✓	0.03	0.5	7	5	9	NA	NA
G190Q	60		0	0.3	70	>50	>50	NA	NA
K101E	30	✓	0.2	8	4	2	3	1.5	2
A98G	30		0.2	6	13	2	2	1.4	3
P225H	30	✓	0.02	4	2	2	3	1.2	NA
F227L	30		0.04	3	5	1.4	2	2	NA
K238T	30		0.04	2	3	3	2	1.4	NA
Y318F	30		0.1	2	4	NA	NA	NA	NA
E138K	30		0.1	0.4	18	-0.6	1	2	1.6
F227C	30		0	0.04	13	NA	NA	NA	NA
N348I	15		0.09	14	17	NA	NA	NA	NA
V108I	15		0.5	9	5	2	3	1	0.9
E138A	15		3	3	32	1.5	1.6	2	1.8
K101H	15		0	1	3	3	3	1.3	1
E138Q	15		0.03	1	3	1.4	1	NA	NA
E138G	15		0.3	0.7	18	2	1.4	3	1.7
V179F	15	✓	0	0.3	0	0.9	3	3	0.4
V179D	10		2	3	18	3	5	3	1.8

⁽¹⁾Điểm tính mức độ kháng thuốc theo ngân hàng dữ liệu kháng thuốc HIV của Stanford,

⁽²⁾ tỷ lệ mẫu bệnh nhân có đột biến kháng thuốc không có thêm đột biến chính khác kháng NNRTIs (điểm ≥ 60 /tổng số mẫu có đột biến kháng thuốc).

Đột biến với PIs

Đột biến	Điểm ⁽¹⁾	Đột biến cần giám sát	Tỷ lệ đột biến		% không có thêm đột biến chính khác ⁽²⁾	Mức độ kháng kiểu hình		
			Bệnh nhân chưa tiếp xúc ARV	Bệnh nhân đã điều trị ARV		ATV	DRV	LPV
I84V	60	✓	0.02	15	7	4	3	3
N88S	60	✓	0.03	2	70	7	0.9	1.1
I47A	60	✓	0	0.5	8	0.9	2	43
I50L	60	✓	0.01	0.5	48	6	0.4	0.3
I84A	60	✓	0	0.2	54	47	NA	6
I84C	60	✓	0	0.2	64	5	NA	1.9
V82A	30	✓	0.04	24	27	1.5	0.8	3
G48V	30	✓	0	4	3	4	0.8	2
L76V	30	✓	0.01	4	9	0.4	2	4
I50V	30	✓	0.02	2	11	0.9	4	4
V82F	30	✓	0	2	22	2	4	7
G48M	30	✓	0	0.5	0	2	1.1	1.8
L90M	25	✓	0.3	33	23	3	1.2	1.9
V82T	25	✓	0	3	18	2	0.6	3
V82S	25	✓	0	1	25	4	NA	6
V82M	25	✓	0	0.3	22	1	1.2	0.9
I54L	20	✓	0.01	3	4	2	3	1.9
I54M	20	✓	0	3	3	2	5	3
I54V	15	✓	0	27	1	3	1.4	4
M46I	15	✓	0.3	23	3	1.2	1.2	1.6
V32I	15	✓	0.01	5	2	3	3	1.3
I47V	15	✓	0.03	5	0.6	0.9	1.3	4
I54A	15	✓	0	1	0.5	12	NA	11
I54T	15	✓	0.01	0.9	2	9	6	9
I54S	15	✓	0	0.7	2	10	2	11
M46L	10	✓	0.3	10	4	1.5	1.3	1.6
G73S	10	✓	0.03	9	3	2	1.2	1.5
D30N	10	✓	0.02	6	28	3	-0.9	1.1
L24I	10	✓	0.02	6	3	2	1	1.8
F53L	10	✓	0.04	6	1	1.7	1.1	1.3
K20T	10		0.1	5	7	2	1.1	1.9
G73T	10	✓	0	3	1	2	1.6	1.5
T74P	10		0.04	2	6	2	1.5	1.4
G73C	10	✓	0	1	0.6	1.7	1.1	1.6
N83D	10	✓	0.02	0.8	12	3	0.9	1.3
V82C	10	✓	0	0.6	4	1.3	1.3	3
V82L	10	✓	0.02	0.3	30	2	1.5	1.2
L33F	5		0.4	13	2	1.2	2	1.8
L10F	5		0.2	10	3	1.4	1.5	2
L89V	5		0.06	4	4	1.2	3	1.4

⁽¹⁾Điểm tính mức độ kháng thuốc theo ngân hàng dữ liệu kháng thuốc HIV của Stanford,

⁽²⁾ tỷ lệ mẫu bệnh nhân có đột biến kháng thuốc không có thêm đột biến chính khác kháng PIs (điểm ≥ 30)/tổng số mẫu có đột biến kháng thuốc.