

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Phạm Thị Phương Trâm

**NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SỬ DỤNG MẪU LƯU GIỮ
TRÊN THẺ TÁCH HUYẾT TƯƠNG TRONG XÉT NGHIỆM
THEO DÕI ĐIỀU TRỊ CHO BỆNH NHÂN NHIỄM HIV**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Phạm Thị Phương Trâm



NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SỬ DỤNG MẪU LƯU GIỮ
TRÊN THẺ TÁCH HUYẾT TƯƠNG TRONG XÉT NGHIỆM
THEO DỐI ĐIỀU TRỊ CHO BỆNH NHÂN NHIỄM HIV

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 8 42 01 14

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. BS. Phạm Hồng Thắng 
2. PGS. TS. Đỗ Thị Huyền 

Hà Nội – 2024

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu dưới sự hướng dẫn của TS. BS. Phạm Hồng Thắng và PGS. TS. Đỗ Thị Huyền. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.

Tác giả luận văn



Phạm Thị Phương Trâm

LỜI CẢM ƠN

Với lòng kính trọng, tôi xin được bày tỏ lời cảm ơn sâu sắc nhất tới TS. BS. Phạm Hồng Thắng, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, Bộ Y tế đã tận tình hướng dẫn, theo sát quá trình nghiên cứu làm luận văn và đã cho tôi những ý tưởng nghiên cứu, giúp đỡ và động viên tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận văn. Tôi cũng xin được bày tỏ lòng kính trọng và lời cảm ơn tới cô giáo - PGS. TS. Đỗ Thị Huyền, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã luôn ủng hộ, động viên và chia sẻ cho tôi những kiến thức, kinh nghiệm về sinh học phân tử và giúp tôi chỉnh sửa bản luận văn này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban giám đốc Học Viện, các thầy, cô giáo, chuyên viên của Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giảng dạy, hướng dẫn tôi trong quá trình học tập tại đây.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cùng toàn thể cán bộ Khoa HIV/AIDS đã động viên, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi để tôi tham gia học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Dự án MOVIDA, dự án hợp tác giữa Viện Pasteur Paris, Pháp và Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã cung cấp nguồn lực: kinh phí, hoá chất, sinh phẩm, nâng cao chuyên môn kỹ thuật... để thực hiện nghiên cứu này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS. TS. Nguyễn Anh Tuấn, ThS. Ngô Thị Hồng Hạnh, ThS. Lê Thị Hồng Nhung, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, Bộ Y tế và TS. Yoann Madec, Viện Pasteur Paris, Pháp đã đóng góp nhiều ý kiến khoa học, hỗ trợ rất nhiều và tạo điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong thời gian tôi viết và hoàn thành luận văn.

Tôi xin đặc biệt gửi lời cảm ơn cán bộ, bệnh nhân của Trung tâm y tế Nam Từ Liêm và Bệnh viện Đa khoa Đống Đa đã đã cộng tác, tin tưởng và tham gia trong thời gian nghiên cứu thực hiện tại thực địa.

Tôi xin trân thành cảm ơn Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF) đã trao hỗ trợ cho tôi, mã tài trợ [VINIF.2023.ThS.140] - học viên Phạm Thị Phương Trâm.

Cuối cùng, tôi muốn dành sự biết ơn và tình cảm sâu sắc đến gia đình thân yêu: bố, mẹ của tôi, chồng và con tôi, bạn bè đã luôn là động lực mạnh mẽ cho tôi trong thời gian học tập, hoàn thành luận văn của mình.

Tác giả luận văn

Phạm Thị Phương Trâm

III

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	I
LỜI CẢM ƠN.....	II
MỤC LỤC	III
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ CÁI VIẾT TẮT.....	VI
DANH MỤC CÁC BẢNG	VII
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	VIII
MỞ ĐẦU.....	1
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	4
1.1. TỔNG QUAN VỀ VIRUS GÂY HỘI CHỨNG SUY GIẢM MIỄN DỊCH, TÌNH HÌNH NHIỄM VIRUS VÀ ĐIỀU TRỊ.....	4
1.1.1. Virus gây hội chứng suy giảm miễn dịch và tình hình nhiễm virus	4
1.1.2. Thuốc kháng retrovirus trong điều trị HIV	6
1.2. XÉT NGHIỆM ĐO TẢI LƯỢNG HIV-1, GIẢI TRÌNH TỰ GEN PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN KHÁNG THUỐC VÀ VAI TRÒ TRONG THEO DÕI ĐIỀU TRỊ HIV	8
1.2.1. Xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 và vai trò trong theo dõi điều trị HIV... ..	8
1.2.2. Xét nghiệm giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc HIV-1 và vai trò trong điều trị ARV	11
1.3. KHOẢNG TRỐNG TRONG THEO DÕI TẢI LƯỢNG VIRUS VÀ NGHIÊN CỨU VỀ SỬ DỤNG MẪU KHÔ TRONG XÉT NGHIỆM ĐO TẢI LƯỢNG HIV-1 VÀ GIẢI TRÌNH TỰ GEN KHÁNG THUỐC	14
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	18
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	18
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	18
2.2.1. Thiết kế nghiên cứu	18
2.2.2. Địa điểm, thời gian và phạm vi nghiên cứu	18
2.2.3. Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu	19
2.2.3.1. Cỡ mẫu	19
2.2.3.2. Phương pháp chọn mẫu	19
2.2.4. Sơ đồ nội dung nghiên cứu	21
2.2.5. Sàng lọc, tuyển chọn người bệnh tham gia nghiên cứu.....	21

2.2.6. Thu thập mẫu máu toàn phần, thông tin người bệnh	22
2.2.7. Chuẩn bị mẫu giấy tách huyết tương PSC, huyết tương từ mẫu máu toàn phần	22
2.2.8. Đánh giá khả năng sử dụng mẫu PSC cho kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV-1.....	23
2.2.8.1. Kỹ thuật xét nghiệm đo tải lượng HIV-1.....	23
2.2.8.2. Đánh giá khả năng sử dụng mẫu PSC cho xét nghiệm tải lượng virus dựa trên độ nhạy, độ đặc hiệu so với mẫu huyết tương tươi.....	24
2.2.9. Đánh giá khả năng sử dụng mẫu lưu PSC trong kỹ thuật giải trình tự gen xác định đột biến liên quan đến kháng thuốc của HIV-1.....	25
2.2.9.1. Lựa chọn cặp mẫu cho đánh giá	25
2.2.9.2. Kỹ thuật giải trình tự gen xác định đột biến HIV kháng thuốc	25
2.2.9.2.1. Tách chiết RNA từ mẫu bệnh phẩm	26
2.2.9.2.2. Phản ứng phiên mã ngược tổng hợp cDNA và PCR một bước khuếch đại vùng gen mục tiêu	26
2.2.9.2.3. Phản ứng PCR lồng	27
2.2.9.2.4. Điện di kiểm tra sản phẩm khuếch đại.....	27
2.2.9.2.5. Làm sạch sản phẩm khuếch đại.....	27
2.2.9.2.6: Phản ứng khuếch đại gen cho giải trình tự.....	27
2.2.9.2.7: Tinh chế sản phẩm gen đã khuếch đại cho giải trình tự và điện di mao quản.....	28
2.2.9.2.8: Phân tích trình tự, tìm đột biến liên quan đến kháng thuốc HIV-1.....	28
2.2.9.2. Đánh giá khả năng sử dụng mẫu lưu PSC trong kỹ thuật giải trình tự gen phát hiện đột biến HIV kháng thuốc	28
2.2.10. Đạo đức nghiên cứu.....	29
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	30
3.1. TUYỂN CHỌN, THU THẬP MẪU TỪ NGƯỜI NHIỄM HIV	30
3.1.1. Đặc điểm người bệnh tham gia nghiên cứu	30
3.1.2. Thu thập và chuẩn bị mẫu bệnh phẩm.....	31
3.2. NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SỬ DỤNG MẪU LƯU TRỮ TRONG THỂ TÁCH HUYẾT TƯƠNG TRONG XÉT NGHIỆM ĐO TẢI LƯỢNG HIV-1	33
3.2.1. Kết quả thực hiện xét nghiệm đo tải lượng HIV-1-1 từ mẫu lưu trữ	

trong thẻ tách huyết tương và mẫu huyết tương	33
3.2.2. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của mẫu PSC so với mẫu huyết tương	36
3.2.3. Đánh giá độ tương đồng giữa kết quả tải lượng trên cặp mẫu huyết tương và mẫu PSC có tải lượng virus phát hiện	39
3.2.4. Đánh giá độ tái lập của mẫu PSC trong xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 ..	40
3.2.5. Đánh giá ảnh hưởng của việc lưu mẫu PSC qua âm sâu trước khi thực hiện xét nghiệm đo tải lượng HIV-1	41
3.3. NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SỬ DỤNG MẪU PSC TRONG XÉT NGHIỆM XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN HIV KHÁNG THUỐC	42
3.3.1. Nghiên cứu lựa chọn cặp mẫu để làm xét nghiệm kháng thuốc	42
3.3.2. Tỷ lệ khuếch đại thành công đoạn gen PR-RT (Pol) của HIV-1.....	44
3.3.3. So sánh độ tương đồng nucleotide, subtype và đặc điểm đột biến liên quan đến kháng thuốc của HIV-1 giữa hai loại mẫu	47
KẾT LUẬN	61
KIẾN NGHỊ	62
DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ	63
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	64
Phụ lục 1: Phiếu thông tin và chấp thuận tham gia nghiên cứu.....	i
Phụ lục 2: Kết quả xét nghiệm tải lượng HIV-1 cả 250 mẫu huyết tương và 250 mẫu PSC	vii
Phụ Lục 3: Phiếu thu thập thông tin bệnh nhân	xxxiv
Phụ lục 4: Bản thảo công trình công bố và thư của tạp chí.....	xxxvi

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Tiếng Việt	Tiếng Anh
HIV	Virus gây hội chứng suy giảm miễn dịch	Human immunodeficiency virus
AIDS	Hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải	Acquired immunodeficiency syndrome
WHO	Tổ chức Y tế thế giới	World Health Organization
CD4	Tế bào lympho T mang thụ thể CD4	CD4 T cell
ARV	Thuốc kháng retrovirus	Antiretroviral
Cart	Liệu pháp điều trị ARV kết hợp	Combination anti-retroviral therapy
IVD	Chẩn đoán <i>in vitro</i>	<i>In vitro</i> diagnostics
EDTA	Axit ethylene diamine tetra acetic	Ethylenediaminetetraacetic acid
PKNT (OPC)	Phòng khám ngoại trú	Outpatient clinic
PSC	Thẻ tách huyết tương khô	Plasma separation card
DBS	Mẫu giọt máu khô	Dried blood spot
DPS	Mẫu huyết tương khô	Dried plasma spot
HT	Mẫu huyết tương	Plasma
RT-PCR	Phản ứng phiên mã ngược - PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
Real-time RT-PCR	Phản ứng phiên mã ngược - PCR theo thời gian thực	Real-time reverse transcription polymerase chain reaction
Ct	Chu kỳ ngưỡng	Cycle threshold
QS	Nội kiểm tra trong xét nghiệm Real-time PCR	Quantitation Standard
TLVR (VL)	Tải lượng virus	Viral load
NNRTI	Thuốc ức chế men sao chép ngược non-nucleoside	Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor
NRTI	Thuốc ức chế men sao chép ngược nucleoside	Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor
PI	Thuốc ức chế men protease	Protease Inhibitor

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Đặc điểm người bệnh tham gia nghiên cứu từ hai phòng khám ngoại trú tại Hà Nội, từ tháng 10/2022 - 3/2023, N=250	30
Bảng 3.2. Dải tải lượng HIV-1 từ mẫu huyết tương và mẫu PSC	35
Bảng 3.3. Độ nhạy, độ đặc hiệu trong xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 của mẫu lưu trữ trên thẻ tách huyết tương (PSC), so sánh với mẫu huyết tương, tại ngưỡng phân loại thất bại điều trị 1.000 bản sao/ml	36
Bảng 3.4. Độ tái lập của kỹ thuật xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 trên mẫu PSC trên 23 mẫu được chọn ngẫu nhiên.....	40
Bảng 3.5. Độ nhạy, độ đặc hiệu của kỹ thuật đo tải lượng HIV-1 so sánh giữa mẫu PSC chưa lưu âm sâu và mẫu PSC đã lưu tủ âm 80°C.	41
Bảng 3.6. Một số đặc điểm của 20 cặp mẫu PSC - huyết tương sử dụng cho xét nghiệm gen phát hiện đột biến kháng thuốc HIV-1.....	42
Bảng 3.7. Tỷ lệ khuếch đại thành công đoạn gen PR-RT (thuộc gen Pol) của HIV-1, so sánh giữa mẫu PSC và huyết tương theo các khoảng tải lượng virus	44
Bảng 3.8. So sánh độ tương đồng nucleotide, subtype và đặc điểm đột biến liên quan đến kháng thuốc của HIV-1 giữa 19 cặp mẫu PSC - huyết tương.....	47
Bảng 3.9. Chấm điểm các đột biến kháng thuốc và diễn giải kháng thuốc của 5 cặp mẫu có khác biệt về kết quả đột biến giữa huyết tương và mẫu PSC	57

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Sơ đồ vòng đời của HIV và mục tiêu, vị trí tác động của các loại thuốc kháng virus hiện có	7
Hình 1.2. Công nghệ giải trình tự Sanger.....	13
Hình 1.3. Quy tắc ký hiệu vị trí đột biến.....	13
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu	21
Hình 2.2. Tấm thẻ tách huyết tương Cobas plasma separation card.....	23
Hình 3.1. Hình ảnh chuẩn bị mẫu PSC trong tủ an toàn sinh học.....	32
Hình 3.2. Bản đọc gốc kết quả xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 trên mẫu lưu trữ trong thẻ tách huyết tương và mẫu huyết tương từ hệ thống xét nghiệm.	34
Hình 3.3. Đồ thị Bland-Altman về độ tương đồng giữa giá trị tải lượng.	39
Hình 3.4. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm khuếch đại đoạn gen PR-RT từ 20 mẫu huyết tương và 20 mẫu PSC.....	45
Hình 3.5. Môi quan hệ di truyền của 19 mẫu PSC và 20 mẫu HT đã giải trình tự trong nghiên cứu	50
Hình 3.6. Hình ảnh chromastogram một số vị trí đột biến gen quan trọng liên quan đến tính kháng thuốc của HIV phát hiện được trong nghiên cứu	52
Hình 3.7. Hình ảnh chromastogram vị trí quan trọng K103 của cặp mẫu PSC-huyết tương số 15 ở các lần xét nghiệm khác nhau	55

MỞ ĐẦU

HIV (Human immunodeficiency virus - virus gây suy giảm miễn dịch ở người) được phát hiện lần đầu tiên vào những năm 1980 và cho đến nay vẫn được coi là một tác nhân truyền nhiễm nguy hiểm, gây ra đại dịch toàn cầu. Sự ra đời của thuốc kháng retrovirus (ARV) và việc sử dụng phối hợp các nhóm thuốc kháng virus khác nhau đã mang lại hiệu quả cao trong việc ức chế HIV. Việc điều trị bằng ARV không chỉ giúp giảm tải lượng virus ở người nhiễm HIV, mà còn giảm nguy cơ lây truyền HIV trong cộng đồng, góp phần kiểm soát hiệu quả dịch bệnh. Theo số liệu ước tính từ Bộ Y tế Việt Nam và UNAIDS, đến năm 2024, cả nước có khoảng 250.000 người đang sống chung với HIV, trong đó khoảng 195.000 (78%) người đang điều trị ARV. Nhu cầu xét nghiệm theo dõi điều trị ARV là rất lớn, trong đó có nhiều bệnh nhân ở miền núi, vùng sâu vùng xa.

Nhằm nâng cao hiệu quả điều trị, Bộ Y tế Việt Nam đã ban hành Quyết định 5968/QĐ-BYT ngày 31/12/2021 về Hướng dẫn điều trị HIV/AIDS, trong đó nhấn mạnh việc thực hiện xét nghiệm tải lượng virus định kỳ để theo dõi và đánh giá hiệu quả điều trị. Trường hợp người bệnh điều trị ARV được xét nghiệm định kỳ nếu kết quả xét nghiệm tải lượng trên mẫu huyết tương HIV ≥ 1.000 bản sao/ml có thể chỉ ra rằng người bệnh không tuân thủ đúng phác đồ điều trị hoặc không đáp ứng với phác đồ hiện tại. Trên cơ sở đó, bác sĩ có thể đưa ra các tư vấn nhằm hỗ trợ người bệnh tăng cường tuân thủ điều trị và thực hiện xét nghiệm đo tải lượng lại sau 3 tháng, hoặc chỉ định xét nghiệm giải trình tự gen HIV để xác định các đột biến kháng thuốc, từ đó lựa chọn phác đồ điều trị phù hợp hơn. Do đó, trong quá trình điều trị HIV bằng thuốc ARV, việc giám sát và kiểm tra định kỳ tải lượng virus và sự xuất hiện của các đột biến kháng thuốc là vô cùng quan trọng.

Mặc dù việc giám sát định kỳ đóng vai trò then chốt trong điều trị ARV, tỷ lệ bao phủ các xét nghiệm theo dõi điều trị HIV ở các khu vực vùng sâu, vùng xa còn thấp. Nguyên nhân chính là do các phòng xét nghiệm có năng lực thực hiện các xét nghiệm này chỉ tập trung tại tuyến tỉnh và trung ương. Việc vận chuyển mẫu huyết tương từ vùng sâu, vùng xa đến các phòng xét nghiệm trung tâm gặp nhiều khó khăn do mẫu huyết tương có yêu cầu nghiêm ngặt về nhiệt độ bảo quản và đảm bảo an toàn sinh học trong vận

chuyển, dẫn đến chi phí vận chuyển cao. Mẫu giọt máu khô (DBS) hay mẫu huyết tương khô (DPS) đã được nghiên cứu và khuyến cáo sử dụng cho vùng xa trung tâm, tuy nhiên vẫn tồn tại một số hạn chế. Mẫu DBS có nguy cơ phân loại sai người bệnh thất bại điều trị trong xét nghiệm đo tải lượng HIV-1. Mẫu DBS là máu toàn phần khô bao gồm cả RNA của virus tự do và DNA tiền virus đã cài trong tế bào vật chủ, do vậy, kết quả giải trình tự gen không phản ánh được xác thực quần thể virus đang chiếm ưu thế, lưu hành trong cơ thể người bệnh, khó áp dụng trong theo dõi lâm sàng. Mẫu DPS có bản chất là mẫu huyết tương tuy nhiên nhược điểm là tính ổn định, mẫu không bền sau thời gian ngắn bảo quản dẫn đến tỉ lệ khuếch đại thành công thấp. Để khắc phục hạn chế của các loại mẫu hiện có, thẻ tách huyết tương (PSC - Plasma Separation Card) đã được phát triển. Với thẻ này, mẫu máu sẽ được nhỏ trực tiếp lên thẻ, làm khô và có thể vận chuyển dễ dàng ở nhiệt độ thường đến các phòng xét nghiệm. Thẻ tách huyết tương giúp giảm nguy cơ lây nhiễm trong quá trình vận chuyển và cho phép gửi mẫu qua đường bưu điện.

Mẫu PSC đã được thử nghiệm cho việc thu thập và lưu trữ mẫu để xét nghiệm tải lượng HIV-1 trong một số nghiên cứu tại châu Phi. Tuy nhiên, khả năng xác định đột biến gen HIV phát hiện đột biến kháng thuốc khi sử dụng mẫu PSC vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ. Tại Việt Nam, mẫu PSC trong xét nghiệm điều trị HIV hiện chưa được đánh giá và áp dụng trong thực tế. Do vậy, câu hỏi đặt ra là: A. Mẫu thu và bảo quản trên thẻ tách huyết tương (PSC) có đảm bảo tốt cho xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 về cả độ nhạy và độ đặc hiệu so với mẫu huyết tương hay không? B. Mẫu PSC có thể sử dụng được để xác định trình tự gen liên quan tính kháng thuốc của HIV hay không?

Để trả lời cho câu hỏi trên, đề tài "*Nghiên cứu khả năng sử dụng mẫu lưu giữ trên thẻ tách huyết tương trong xét nghiệm theo dõi điều trị cho bệnh nhân nhiễm HIV*" được thực hiện để đánh giá việc sử dụng thẻ tách huyết tương trong thu thập và bảo quản mẫu cho xét nghiệm tải lượng HIV-1 và xét nghiệm giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc.

Mục tiêu của nghiên cứu:

- Nghiên cứu đánh giá được khả năng sử dụng mẫu lưu giữ trên thẻ tách huyết tương trong xét nghiệm đo tải lượng HIV-1;
- Nghiên cứu đánh giá được khả năng sử dụng mẫu lưu giữ trên thẻ tách huyết tương trong xét nghiệm xác định đột biến HIV kháng thuốc.

Nội dung nghiên cứu: Nghiên cứu được tiến hành tại Phòng Thí nghiệm tham chiếu quốc gia về sinh học phân tử HIV, đạt tiêu chuẩn ISO 15189 với các nội dung chính như sau:

- Tuyển chọn, thu thập mẫu từ người nhiễm HIV;
- Đánh giá khả năng sử dụng mẫu lưu trữ trong thẻ tách huyết tương trong xét nghiệm đo tải lượng HIV-1;
- Đánh giá khả năng sử dụng mẫu thẻ tách huyết tương trong xét nghiệm xác định đột biến HIV kháng thuốc

Đóng góp của luận văn:

Kết quả nghiên cứu cho thấy sử dụng thẻ tách huyết tương PSC là khả thi trong xét nghiệm tải lượng HIV-1 và xét nghiệm kháng thuốc HIV-1. Kết quả của nghiên cứu có ý nghĩa lớn trong theo dõi điều trị và giám sát tải lượng, kháng thuốc ở người nhiễm HIV điều trị ARV, đặc biệt là tại các khu vực vùng sâu, vùng xa điều kiện lấy mẫu, bảo quản vận chuyển khó khăn; có thể giúp tăng cường tiếp cận xét nghiệm theo dõi điều trị cho bệnh nhân ở vùng sâu, vùng xa, giảm chi phí y tế, tăng cường hiệu quả điều trị nâng cao chất lượng cuộc sống cho người nhiễm và góp phần thực hiện các mục tiêu dự phòng.

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. TỔNG QUAN VỀ VIRUS GÂY HỘI CHỨNG SUY GIẢM MIỄN DỊCH, TÌNH HÌNH NHIỄM VIRUS VÀ ĐIỀU TRỊ

1.1.1. Virus gây hội chứng suy giảm miễn dịch và tình hình nhiễm virus

Virus gây hội chứng suy giảm miễn dịch (HIV) là virus thuộc chi *Lentivirus*, họ Retroviridae, phân họ Orthoretrovirinae. Căn cứ vào đặc điểm di truyền và sự khác biệt về kháng nguyên của virus, HIV được phân tuýp thành HIV-1 và HIV-2. Về di truyền, hệ gen của HIV-2 tương đồng khoảng 55% so với hệ gen của HIV-1. Trong hai tuýp huyết thanh thì HIV-1 lây lan rộng và là nguyên nhân gây ra phần lớn (khoảng 95%) các ca bệnh trên thế giới. Các nghiên cứu chỉ ra rằng HIV-1 có độc lực mạnh hơn so với HIV-2 [1]. HIV-1 có tốc độ biến đổi di truyền cao, linh hoạt, chia thành nhiều phân nhóm, nhiều subtype, biến thể... làm cho chúng có khả năng thích nghi và né tránh hệ miễn dịch cao hơn [2]. Tốc độ nhân lên của HIV-1 nhanh hơn HIV-2 dẫn đến tải lượng trong máu của người nhiễm HIV-1 cao hơn, tăng nguy cơ lây lan [3-5]. HIV-2 có khả năng gây bệnh thấp hơn và tiến triển chậm hơn so với HIV-1, nhưng vẫn có thể dẫn đến AIDS nếu không được điều trị. Ở các nước Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam, hầu như người mắc HIV là thuộc HIV tuýp 1. HIV-2 chủ yếu lưu hành ở Tây Phi và ít lây lan hơn. Về phân nhóm của HIV-1, chúng tiếp tục được phân loại thành các nhóm và phân nhóm (subtype), với các nhóm chính bao gồm nhóm M (Major), N (Non-M), O (Outlier) và P (Pending). Nhóm M là nhóm phổ biến nhất và chứa nhiều subtype, bao gồm A, B, C, D, F, G, H, J, K, và các dạng tái tổ hợp (CRF). Các phân tích dịch tễ học và cây phát sinh chủng loại chỉ ra rằng, HIV-1 tiến hóa và lây nhiễm vào cá thể người đầu tiên vào khoảng năm 1920 đến 1940 từ virus gây suy giảm miễn dịch ở loài tinh tinh ở Trung Phi [6]. Năm 1983, hai nhà khoa học Luc Montagnier và Françoise Barré-Sinoussi tại Viện Pasteur ở Paris đã phân lập được HIV-1 từ các mẫu máu của bệnh nhân AIDS, và phát hiện này đã được công nhận với giải Nobel Y học vào năm 2008.

HIV có cấu trúc đặc trưng với một lớp vỏ lipid bao quanh lõi hình cầu, được bao bọc trong lõi là bộ gen gồm hai phân tử RNA sợi đơn dương giống hệt nhau. Sau khi xâm nhập vào tế bào miễn dịch của vật chủ, RNA virus được phiên mã ngược tạo ra DNA nhờ vào enzyme reverse transcriptase và

enzyme DNA polymerase. Sau đó, DNA virus xâm nhập và cài vào hệ gen của tế bào vật chủ nhờ vào enzyme integrase. Vật chất di truyền của virus có thể được phiên mã, dịch mã sử dụng bộ máy của tế bào vật chủ để tạo ra hạt virus mới, giải phóng ra ngoài, lây nhiễm vào các tế bào khác [7].

HIV lây truyền chủ yếu qua ba con đường chính: (1) Quan hệ tình dục không an toàn: HIV lây truyền qua quan hệ tình dục không bảo vệ với người nhiễm, đặc biệt là khi có tiếp xúc với dịch tiết sinh dục hoặc máu. (2) Tiếp xúc với máu: HIV có thể lây truyền qua các tiếp xúc trực tiếp với máu nhiễm virus, như dùng chung kim tiêm hoặc qua truyền máu không an toàn. (3) Từ mẹ sang con: HIV có thể lây truyền từ mẹ sang con trong quá trình mang thai, sinh nở hoặc cho con bú.

HIV phá huỷ và làm suy giảm các tế bào T CD4+, một loại tế bào bạch cầu chịu trách nhiệm quan trọng trong việc bảo vệ cơ thể chống lại các tác nhân gây bệnh. Khi số lượng tế bào CD4+ giảm xuống mức quá thấp, hệ thống miễn dịch của cơ thể trở nên quá yếu để chống lại nhiễm trùng và bệnh tật, dẫn đến suy giảm khả năng miễn dịch của vật chủ, tăng nguy cơ nhiễm trùng cơ hội và tăng tỉ lệ tử vong. Nhiễm HIV là bệnh mãn tính. Người nhiễm HIV nếu không được điều trị có thể dẫn đến AIDS (acquired immunodeficiency syndrom – hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải) và tử vong trong khoảng thời gian từ 8 đến 10 năm nếu không được điều trị [8].

Quá trình nhiễm HIV có thể được chia thành ba giai đoạn chính:

- Giai đoạn nhiễm trùng cấp tính: Xảy ra trong vài tuần đầu sau khi nhiễm virus. Giai đoạn này thường kèm theo các triệu chứng giống cúm như sốt, phát ban, và đau họng. Lượng virus trong máu (tải lượng virus) tăng nhanh chóng, và virus lan rộng khắp cơ thể. Hệ miễn dịch bắt đầu đáp ứng bằng cách sản xuất kháng thể chống lại HIV.

- Giai đoạn nhiễm trùng mãn tính: Sau giai đoạn cấp tính, HIV bước vào giai đoạn tiềm ẩn kéo dài, trong đó virus tiếp tục nhân lên nhưng với tốc độ chậm hơn. Người nhiễm HIV trong giai đoạn này có thể không có triệu chứng rõ rệt trong nhiều năm, nhưng virus vẫn tiếp tục gây tổn thương hệ thống miễn dịch.

- Giai đoạn nhiễm HIV tiến triển (trước đây gọi là AIDS): Nếu không được điều trị, nhiễm HIV sẽ tiến triển đến giai đoạn AIDS, khi hệ thống miễn dịch suy yếu nghiêm trọng và không thể chống lại các nhiễm trùng cơ hội và

một số loại ung thư. Giai đoạn này được xác định khi số lượng tế bào CD4+ giảm xuống dưới 200 tế bào/mm³ hoặc khi xuất hiện một hoặc nhiều bệnh nhiễm trùng cơ hội hoặc ung thư liên quan đến AIDS.

Trên toàn cầu, số ca nhiễm HIV tiếp tục tăng, nhưng sự tập trung, nỗ lực của các chương trình phòng chống và điều trị đã giúp kiểm soát dịch bệnh tốt hơn. Theo UNAIDS, ước tính có khoảng 39 triệu người đang sống với HIV trên toàn thế giới vào năm 2024, với khoảng 1,5 triệu ca nhiễm mới mỗi năm, khoảng 76% người nhiễm đang được điều trị thuốc kháng retrovirus (ARV).

Tại Việt Nam, theo số liệu từ Bộ Y tế Việt Nam và UNAIDS, tính đến năm 2024, cả nước có khoảng 250.000 người đang sống với HIV, với khoảng 6.100 ca nhiễm mới mỗi năm, trong đó có khoảng 195.000 người đang điều trị ARV, đạt 78% [9-11]. Như vậy nhu cầu xét nghiệm tải lượng HIV-1 theo dõi điều trị là rất lớn. Hơn nữa cả 63/63 tỉnh thành đều có người nhiễm HIV và người điều trị ARV, trong đó nhiều tỉnh miền núi, vùng sâu, vùng xa.

1.1.2. Thuốc kháng retrovirus trong điều trị HIV

Thuốc kháng retrovirus (ARV) là thuốc có tác dụng chống lại retrovirus. Thuốc kháng retrovirus là thuật ngữ thường được gọi chung cho trên 40 loại thuốc đang được sử dụng hiện nay để điều trị nhiễm HIV. ARV không có khả năng loại trừ hoàn toàn HIV ra khỏi cơ thể người bệnh, tuy nhiên, sự kết hợp của các nhóm thuốc kháng virus khác nhau trong phác đồ điều trị làm tăng hiệu quả ức chế virus, trì hoãn phá hủy các tế bào T CD4, kéo dài giai đoạn người bệnh không có triệu chứng hoặc chỉ có các triệu chứng nhẹ, giảm sự phát triển của HIV kháng thuốc [1]. Sử dụng hiệu quả ARV cũng giúp giảm nguy cơ lây truyền HIV và góp phần quan trọng trong việc khống chế đại dịch HIV/AIDS trên toàn cầu.

Việc phát triển các loại thuốc điều trị nhiễm virus gây suy giảm miễn dịch ở người đã bắt đầu ngay sau khi loại virus này được phát hiện. Thuốc kháng virus đầu tiên - chất ức chế men sao chép ngược - được đưa vào thực hành lâm sàng là Zidovudine. Thuốc kháng virus hoạt động bằng cách can thiệp vào các bước thiết yếu trong quá trình nhân lên của virus và được phân loại theo bước mà chúng ức chế trong vòng đời của virus (Hình 1.1). Một cách phân loại phụ là dựa trên cấu trúc hóa học của chúng [12]. Hiện tại, có bảy nhóm thuốc ARV chính như sau:

- (1) Thuốc ức chế men sao chép ngược Nucleoside (NRTIs - nucleoside reverse transcriptase inhibitors). Các thuốc này ngăn chặn reverse transcriptase, một enzyme cần thiết cho việc chuyển đổi RNA của virus thành DNA, giúp virus tích hợp vào genome của tế bào chủ. Ví dụ như Zidovudine (AZT), Lamivudine (3TC), và Tenofovir (TDF).

- (2) Thuốc ức chế men sao chép ngược không Nucleoside (NNRTIs - non nucleoside reverse transcriptase inhibitors). Cùng cơ chế với NRTIs. Ví dụ như Efavirenz (EFV), Nevirapine (NVP), và Etravirine (ETR).

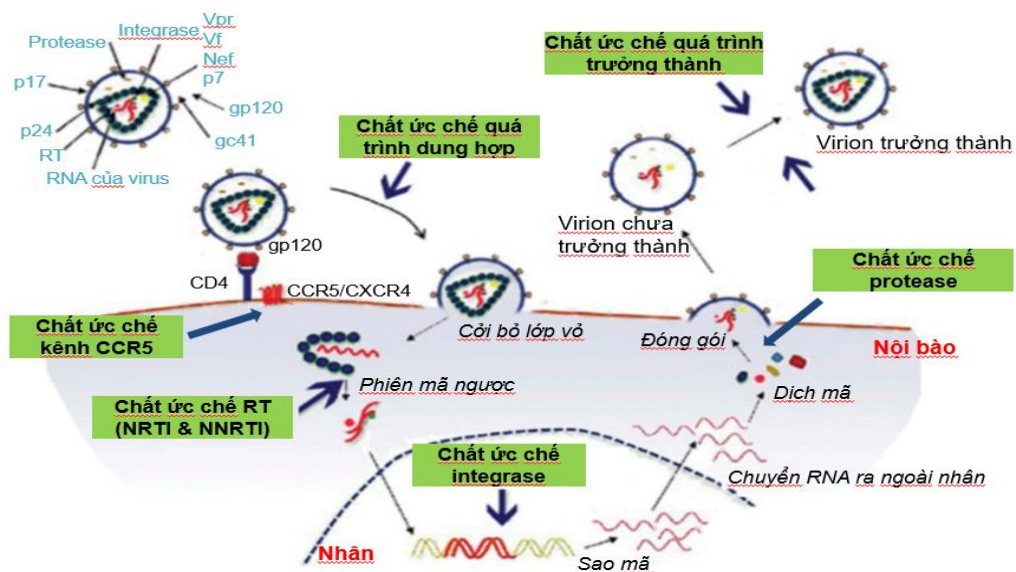
- (3) Thuốc ức chế protease (PIs - protease inhibitors). Các thuốc này ức chế enzyme protease, cần thiết cho việc cắt các protein virus thành các phần nhỏ, từ đó tạo ra các bản sao hoàn chỉnh của virus. Ví dụ bao gồm Ritonavir (RTV), Lopinavir (LPV), và Atazanavir (ATV).

- (4) Thuốc ức chế integrase (INSTIs – integrase inhibitors). Các thuốc này ngăn chặn enzyme integrase, giúp ngăn chặn việc tích hợp DNA của virus vào genome của tế bào chủ. Ví dụ bao gồm Raltegravir (RAL), Elvitegravir (EVG), và Dolutegravir (DTG).

- (5) Thuốc ức chế kênh CCR5 (CCR5 antagonists): Các thuốc này ngăn cản HIV xâm nhập vào tế bào chủ bằng cách chặn các thụ thể CCR5 trên bề mặt tế bào. Ví dụ bao gồm Maraviroc (MVC).

- (6) Thuốc ức chế fusion (fusion inhibitors): Các thuốc này ngăn chặn quá trình kết hợp của virus với tế bào chủ. Ví dụ bao gồm Enfuvirtide (T-20).

- (7) Thuốc ức chế trưởng thành (MIs – maturation inhibitors) đang trong thử nghiệm lâm sàng giai đoạn cuối.



Hình 1.1. Sơ đồ vòng đời của HIV và mục tiêu, vị trí tác động của các loại thuốc kháng virus hiện có [12].

Điều trị HIV thường được thực hiện bằng cách kết hợp nhiều loại thuốc ARV để tạo ra một phác đồ điều trị hiệu quả. Đây gọi là liệu pháp kháng retrovirus kết hợp (cART - combined antiretroviral therapy). Các phác đồ thường bao gồm ít nhất ba loại thuốc từ các nhóm khác nhau để tăng cường hiệu quả điều trị và giảm nguy cơ hình thành virus kháng thuốc. Một người có chẩn đoán nhiễm HIV có thể được điều trị bằng cách lựa chọn và phối hợp thuốc trong số hơn 40 loại thuốc ARV hiện có. Ở các nước có nền kinh tế hạn chế, trong đó có nước ta, trước năm 2019, thuốc cấp phát cho người bệnh thuộc 2 nhóm là nhóm ức chế enzyme sao chép ngược và nhóm ức chế enzyme protease. Vì vậy, các đột biến kháng thuốc đang lưu hành cũng chủ yếu tập trung vào gen mã hóa hai enzyme này.

1.2. XÉT NGHIỆM ĐO TẢI LƯỢNG HIV-1, GIẢI TRÌNH TỰ GEN PHÁT HIỆN ĐỘT BIẾN KHÁNG THUỐC VÀ VAI TRÒ TRONG THEO DÕI ĐIỀU TRỊ HIV

1.2.1. Xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 và vai trò trong theo dõi điều trị HIV

Xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 là một kỹ thuật sinh học phân tử giúp định lượng nồng độ HIV trong máu của người nhiễm, thường được biểu thị dưới dạng số lượng bản sao của RNA virus trên một đơn vị mẫu (bản sao/ml).

Nguyên lý của kỹ thuật này là sử dụng phương pháp real-time RT-PCR. Đầu tiên, RNA được tách chiết từ mẫu huyết tương. Quá trình ly giải tế bào và giải phóng RNA được thực hiện thông qua việc sử dụng các dung dịch ly giải và enzyme chuyên dụng. Qua các bước rửa, RNA của virus được tách ra khỏi các thành phần khác có trong mẫu. Bước tiếp theo là phản ứng phiên mã ngược, RNA của HIV-1 được chuyển đổi thành cDNA sử dụng các đoạn mồi đặc hiệu cho HIV-1 dưới sự xúc tác của enzyme reverse transcriptase. Sau khi cDNA được tổng hợp, nó sẽ trải qua quá trình khuếch đại thông qua phản ứng PCR. Quá trình PCR bao gồm ba giai đoạn chính: Biến tính: Sợi cDNA kép được tách thành hai sợi đơn ở nhiệt độ cao (thường khoảng 94-98°C); Gắn mồi: Nhiệt độ được hạ xuống để các mồi đặc hiệu gắn vào sợi đơn cDNA (thường khoảng 50-65°C); Kéo dài: Tại nhiệt độ tối ưu (thường khoảng 72°C), enzyme Taq DNA polymerase tổng hợp sợi DNA mới, tạo ra các bản sao của đoạn gen mục tiêu. Trong quá trình PCR đang diễn ra, kỹ thuật real-

time-PCR sử dụng các đầu dò huỳnh quang để phát hiện và định lượng sản phẩm khuếch đại theo thời gian thực. Các đầu dò này được thiết kế để gắn đặc hiệu vào đoạn gen của HIV-1. Khi Taq DNA polymerase gặp đầu dò trong quá trình kéo dài DNA, nó sẽ phân cắt đầu dò, giải phóng chất phát huỳnh quang. Tín hiệu huỳnh quang này sẽ được máy real-time PCR phát hiện trong mỗi chu kỳ PCR. Lượng tín hiệu huỳnh quang thu được tỷ lệ thuận với lượng cDNA HIV-1 đã được khuếch đại, và từ đó có thể định lượng RNA của virus trong mẫu ban đầu. Hệ thống máy tự động vẽ đường cong khuếch đại dựa trên sự thay đổi tín hiệu huỳnh quang theo từng chu kỳ PCR. Đường cong này cho biết mức độ khuếch đại của RNA HIV-1 trong mỗi mẫu. Hệ thống cũng xác định giá trị Ct, là số chu kỳ PCR cần thiết để tín hiệu huỳnh quang vượt qua ngưỡng nền. Giá trị Ct càng thấp thì lượng RNA ban đầu càng cao, và ngược lại. Do vậy, giá trị Ct được sử dụng để tính toán số lượng bản sao RNA HIV-1 (bản sao/ml) trong mẫu ban đầu. Hệ thống xét nghiệm sử dụng đường chuẩn (được tính toán từ Ct của các mẫu chuẩn/chứng đã biết trước nồng độ trong từng mẻ chạy) để tính toán, định lượng tuyệt đối RNA của HIV-1 có trong mẫu cần xét nghiệm. Ngoài ra, mỗi ống phản ứng đều được bổ sung thêm một chứng nội kiểm tra (QS), có bản chất là một đoạn RNA tổng hợp nhân tạo không phải HIV-1, đã biết trước nồng độ, được khuếch đại bằng các môi đặc hiệu và phát hiện tín hiệu bằng kênh màu riêng. QS được đưa vào mẫu bệnh phẩm từ giai đoạn đầu của quy trình xét nghiệm, được coi là một chứng nội kiểm để kiểm soát quá trình từ chiết tách RNA, phiên mã ngược, đến khuếch đại và phát hiện tín hiệu. Số lượng bản sao của RNA trong QS đã được xác định trước, do đó QS cũng cung cấp một tiêu chuẩn để so sánh và chuẩn hóa kết quả định lượng RNA HIV-1 từ mẫu bệnh nhân.

Trên thị trường có nhiều loại sinh phẩm thương mại được dán nhãn IVD (*In vitro* Diagnostics - sử dụng cho chẩn đoán) để đo tải lượng HIV-1, trong đó, các sản phẩm được Tổ chức y tế thế giới khuyến cáo và được sử dụng rộng rãi bao gồm: COBAS HIV-1 Test (Roche Diagnostics), Abbott real-time HIV-1 Assay (Abbott Molecular), Xpert HIV-1 Viral Load (Cepheid), VERSANT HIV-1 RNA 1.0 Assay (Siemens Healthcare Diagnostics) [13].

Xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 đóng vai trò quan trọng trong việc theo dõi và quản lý điều trị HIV. Những vai trò chính bao gồm:

- Đánh giá hiệu quả điều trị: Xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 được sử dụng để đánh giá hiệu quả của phác đồ điều trị ARV. Nếu tải lượng virus giảm xuống mức không phát hiện được (thường dưới 50 bản sao/ml), điều này cho thấy phác đồ điều trị đang hoạt động hiệu quả. Ngược lại, nếu tải lượng virus vẫn cao hoặc tăng trở lại, có thể cho thấy sự không đáp ứng với phác đồ hiện tại hoặc tuân thủ điều trị kém.
- Phát hiện không tuân thủ điều trị hoặc thất bại điều trị: WHO khuyến cáo rằng nếu tải lượng HIV-1 ≥ 1.000 bản sao/ml sau 6 tháng điều trị là dấu hiệu của việc bệnh nhân không tuân thủ điều trị hoặc thất bại điều trị nếu bệnh nhân tuân thủ điều trị chặt chẽ. Khi gặp trường hợp này, bác sỹ cần tư vấn sâu, hỗ trợ tuân thủ điều trị cho bệnh nhân và thực hiện xét nghiệm lại sau 3 tháng.
- Quản lý sự xuất hiện kháng thuốc: Khi tải lượng virus không giảm hoặc tăng trở lại, xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 có thể được kết hợp với xét nghiệm kháng thuốc (genotyping) để xác định sự hiện diện của các đột biến kháng thuốc, từ đó điều chỉnh phác đồ điều trị phù hợp.
- Dự phòng lây nhiễm: Việc đạt được mức tải lượng virus không phát hiện được là một phần quan trọng trong chiến lược dự phòng lây nhiễm HIV trong cộng đồng. Người nhiễm HIV có tải lượng virus không phát hiện được không có khả năng lây truyền HIV qua quan hệ tình dục (khái niệm “U=U”, tức là Undetectable = Untransmittable).

Xét nghiệm tải lượng HIV-1 cần được thực hiện định kỳ 3-6 tháng một lần trong suốt quá trình điều trị để liên tục đánh giá tình trạng của bệnh nhân và điều chỉnh điều trị kịp thời. Tại các nước có nguồn lực hạn chế như nước ta, xét nghiệm tải lượng HIV-1 được khuyến cáo thực hiện định kỳ một năm một lần cho bệnh nhân điều trị ARV ổn định và 3-6 tháng một lần cho phụ nữ mang thai đang điều trị ARV. Việt Nam đang nỗ lực để đạt mục tiêu 95-95-95 vào năm 2025 và chấm dứt đại dịch AIDS vào năm 2030. Cụ thể nội dung mục tiêu này là “95% số người nhiễm HIV trong cộng đồng biết tình trạng HIV của mình; 95% số người nhiễm HIV biết tình trạng nhiễm HIV của mình được điều trị thuốc kháng HIV; 95% số người được điều trị thuốc kháng HIV có tải lượng virus dưới ngưỡng phát hiện” [5]. Để hiện thực mục tiêu 95 thứ 3, việc tăng cường độ bao phủ của xét nghiệm đo tải lượng virus định kỳ cho tất cả các bệnh nhân đang điều trị ARV là vô cùng quan trọng.

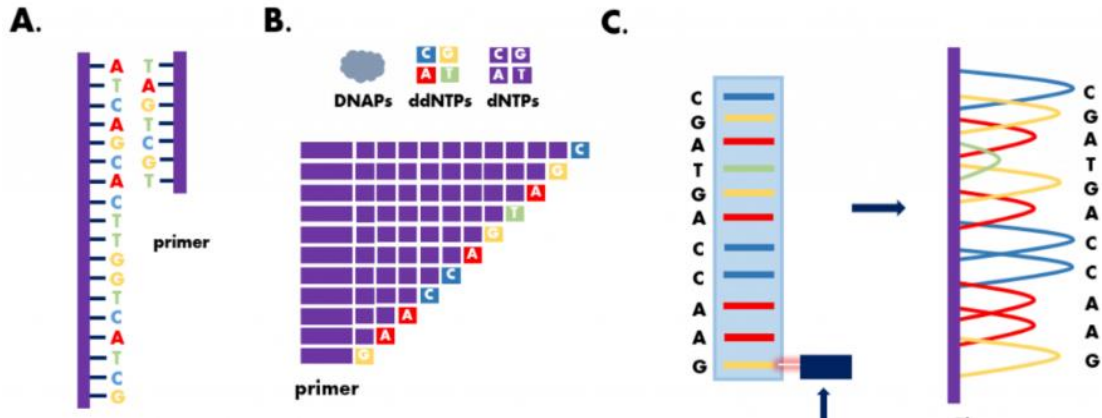
1.2.2. Xét nghiệm giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc HIV-1 và vai trò trong điều trị ARV

HIV là một loại virus có tốc độ đột biến gen rất cao. Nguyên nhân là do các yếu tố sau: (1) HIV là một retrovirus, nó sử dụng enzyme sao chép ngược reverse transcriptase để chuyển đổi RNA của nó thành DNA khi nhiễm vào tế bào chủ. Enzyme này có độ chính xác thấp và không có cơ chế sửa lỗi, dẫn đến tạo ra nhiều lỗi hoặc đột biến trong mỗi lần sao chép. (2) HIV sao chép rất nhanh trong cơ thể, tạo ra hàng tỷ hạt virus mới mỗi ngày. Với mỗi lần sao chép, số lượng đột biến có thể tích lũy lớn, góp phần vào tính biến đổi cao của virus. (3) Áp lực chọn lọc từ hệ miễn dịch của cơ thể vật chủ, cũng như từ thuốc kháng retrovirus, tạo điều kiện cho các biến thể kháng thuốc hoặc né tránh miễn dịch có lợi thế tồn tại và phát triển. Những biến thể này có thể sinh sôi nhanh chóng trong quần thể virus, gây khó khăn cho điều trị và kiểm soát nhiễm trùng.

Gen *Pol* có kích thước khoảng 2.500 bp mã hóa cho ba enzyme quan trọng nhất của virus: protease (PR), reverse transcriptase (RT) và integrase (INT). Việc sử dụng rộng rãi các thuốc ức chế enzyme transcriptase và protease trong các phác đồ điều trị đã dẫn đến sự phát triển và tạo ra tỉ lệ lưu hành cao của các đột biến kháng thuốc, tập trung tại vùng mã hóa cho hai enzyme này. Hiện nay, xét nghiệm các đột biến HIV kháng thuốc thực hiện sử dụng phương pháp PCR khuếch đại một phần gen *Pol* và giải trình tự bằng phương pháp Sanger để tìm đột biến. Đây cũng là kỹ thuật đang được coi là chuẩn vàng và sử dụng phổ biến trên thế giới. Bên cạnh một số bộ sinh phẩm IVD thương mại đang lưu hành trên thị trường, Tổ chức y tế thế giới đã ban hành tài liệu khuyến cáo về phương pháp, quy trình xét nghiệm giải trình tự gen phát hiện đột biến kháng thuốc HIV-1 [14]. Quy trình xét nghiệm thường quy chủ yếu tập trung vào việc giải trình tự hai đoạn gen PR và RT. Gần đây, theo khuyến cáo mới, thuốc DTG (thuộc nhóm ức chế enzyme integrase) được sử dụng trong phác đồ điều trị bậc 1 ưu tiên, các phòng thí nghiệm đã bắt đầu mở rộng việc giải trình tự thêm đoạn gen INT. Cũng đã có những nghiên cứu ứng dụng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới để xác định được các đột biến có tần số thấp trên gen *Pol* hoặc toàn hệ gen của virus.

Nguyên lý của quy trình kỹ thuật bao gồm tách chiết RNA tổng số từ mẫu bệnh phẩm, phiên mã ngược RNA virus sang cDNA và khuếch đại sản

phẩm trong cùng ống phản ứng sử dụng đoạn mồi đặc hiệu cho đoạn gen PR-RT, thực hiện phản ứng PCR lồng với cặp mồi khác để tăng độ đặc hiệu và khuếch đại số lượng lớn bản sao của đoạn gen đích. Sản phẩm khuếch đại thành công được quan sát sử dụng kỹ thuật điện di trên gel agarose, sản phẩm là đoạn DNA kích thước khoảng 1 Kb. Sau khi tinh sạch, sản phẩm khuếch đại được giải trình tự gen sử dụng phương pháp Sanger. Kỹ thuật giải trình tự gen bằng phương pháp Sanger, còn được gọi là phương pháp dideoxy, là một trong những phương pháp cổ điển và phổ biến nhất để xác định trình tự nucleotide của đoạn DNA. Nguyên lý cơ bản của phương pháp này là phản ứng được thực hiện trong một hỗn hợp chứa: Mẫu DNA (khuôn mẫu), một primer ngắn, bổ sung cho một đầu của mẫu DNA để khởi đầu quá trình tổng hợp, DNA polymerase để tổng hợp chuỗi mới. Bốn loại deoxynucleotide triphosphates (dNTPs): dATP, dTTP, dCTP, và dGTP là các nucleotide tự nhiên. Bốn loại dideoxynucleotide triphosphates (ddNTPs) được đánh dấu bằng các chất huỳnh quang hoặc phóng xạ. Các ddNTP này thiếu nhóm hydroxyl (-OH) tại vị trí 3' trên đường ribose, ngăn cản việc gắn thêm nucleotide tiếp theo, do đó làm dừng quá trình tổng hợp DNA khi một ddNTP được gắn vào chuỗi. Trong quá trình tổng hợp, DNA polymerase sẽ ngẫu nhiên tích hợp một trong bốn loại ddNTP vào chuỗi DNA đang được tổng hợp, dẫn đến việc kết thúc chuỗi tại điểm đó. Điều này tạo ra một tập hợp các đoạn DNA có chiều dài khác nhau, mỗi đoạn kết thúc tại một vị trí nhất định với một ddNTP cụ thể. Các đoạn DNA có kích thước khác nhau này sau đó được phân tách bằng kỹ thuật điện di trên gel polyacrylamide hoặc máy tự động hóa. Các đoạn DNA ngắn hơn sẽ di chuyển nhanh hơn qua gel, trong khi các đoạn dài hơn di chuyển chậm hơn. Xác định trình tự DNA: Sau khi điện di, các đoạn DNA được phát hiện dựa trên tín hiệu huỳnh quang hoặc phóng xạ từ các ddNTP đã đánh dấu. Tín hiệu này được ghi nhận, cho phép xác định trình tự các nucleotide trong đoạn DNA mẫu, bắt đầu từ vị trí của primer và kết thúc tại vị trí của ddNTP.



Hình 1.2. Công nghệ giải trình tự Sanger [15]

- A. DNA bị biến tính và liên kết với mồi
- B. Quá trình kéo dài xảy ra trong một hỗn hợp phản ứng đơn lẻ, trong đó, việc bổ sung ddNTP có đánh dấu huỳnh quang sẽ dẫn đến sự kết thúc
- C. Điện di trên gel mao quản để phân tách các mảnh đã kết thúc theo kích thước và kích thích bằng laser để phát hiện

Ước tính có trên 200 đột biến đã được xác định có liên quan đến kháng thuốc điều trị HIV. Cách quy ước ký hiệu vị trí đột biến như Hình 1.2: Axit amin của chủng hoang dại_Vị trí codon_Axit amin thay thế dẫn đến khả năng kháng thuốc, ví dụ: K65R có nghĩa là vị trí codon 65, axit amin K bị thay thế/đột biến thành R. Các đột biến được phân loại theo mức độ ảnh hưởng, tác động đến đặc tính kháng thuốc của virus như sau:

- (1) Các đột biến chính (major mutation): chủ yếu nằm ở các vị trí tác động của thuốc ARV, đóng vai trò quan trọng trong việc giảm nhạy cảm của virus với thuốc ARV.
- (2) Các đột biến bổ sung (accessory mutation): thường xuất hiện kèm, và hỗ trợ cho tác động của các đột biến chính.
- (3) Đột biến đa hình (polymorphic mutation): tồn tại tự nhiên, không liên quan đến tính kháng thuốc của virus.



Hình 1.3. Quy tắc ký hiệu vị trí đột biến [16]

K: axit amin Lysine, R: axit amin Arginine

Các đột biến kháng thuốc được phân loại theo nhóm thuốc chịu tác động và vùng gen. Trong đó, các đột biến kháng thuốc nhóm PI (trên đoạn gen PR), NRTI, NNRTI (trên đoạn gen RT) được quan tâm nhiều nhất, do việc sử dụng rộng rãi, từ lâu các thuốc thuộc nhóm này trong các phác đồ điều trị bậc 1 và cả bậc 2.

Xét nghiệm giải trình tự gen để phát hiện đột biến kháng thuốc HIV-1 là một công cụ quan trọng trong việc quản lý điều trị ARV.

- Đối với cá nhân người bệnh, xét nghiệm này giúp tối ưu hóa phác đồ điều trị, cải thiện chất lượng cuộc sống và ngăn ngừa thất bại điều trị. Xét nghiệm giải trình tự gen giúp xác định các đột biến kháng thuốc HIV-1, từ đó cho phép bác sĩ điều chỉnh phác đồ điều trị ARV phù hợp nhất. Điều này tăng cường khả năng kiểm soát sự phát triển của virus, giảm tải lượng virus trong cơ thể và duy trì sức khỏe tốt hơn cho bệnh nhân. Bằng cách tránh sử dụng các thuốc mà virus đã kháng, bệnh nhân sẽ có khả năng duy trì hiệu quả điều trị lâu dài hơn. Điều này không chỉ giúp kiểm soát tình trạng bệnh mà còn giảm nguy cơ các tác dụng phụ không mong muốn từ việc dùng thuốc không hiệu quả.
- Đối với cộng đồng, khi nhiều bệnh nhân được điều trị hiệu quả hơn nhờ xét nghiệm phát hiện đột biến kháng thuốc, nguy cơ sự lây lan của các chủng virus kháng thuốc trong cộng đồng giảm xuống. Điều này góp phần vào việc bảo vệ sức khỏe cộng đồng và ngăn ngừa sự phát triển của đại dịch kháng thuốc. Điều này cũng hỗ trợ các chương trình điều trị HIV ở quy mô cộng đồng, giúp giảm tải cho hệ thống y tế và tăng hiệu quả của các chiến lược phòng ngừa và điều trị HIV.

1.3. KHOẢNG TRỐNG TRONG THEO DÕI TẢI LƯỢNG VIRUS VÀ NGHIÊN CỨU VỀ SỬ DỤNG MẪU KHÔ TRONG XÉT NGHIỆM ĐO TẢI LƯỢNG HIV-1 VÀ GIẢI TRÌNH TỰ GEN KHÁNG THUỐC

Xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 và giải trình tự gen HIV để phát hiện đột biến kháng thuốc được thực hiện thường quy trên mẫu huyết tương, được coi là tiêu chuẩn vàng. Những xét nghiệm này yêu cầu trang thiết bị hiện đại và kỹ thuật viên có trình độ cao, được đào tạo về sinh học phân tử, do đó chỉ có thể được thực hiện tại các phòng xét nghiệm cấp tỉnh hoặc trung ương. Tuy nhiên, hệ thống vận chuyển mẫu huyết tương từ các phòng khám ngoại trú ở vùng sâu,

vùng xa đến các phòng xét nghiệm trung tâm còn nhiều hạn chế. Việc này đòi hỏi tuân thủ nghiêm ngặt các điều kiện về nhiệt độ để bảo đảm chất lượng mẫu và đảm bảo an toàn sinh học khi vận chuyển, dẫn đến chi phí vận chuyển cao. Chính những hạn chế này là yếu tố quan trọng khiến cho việc tiếp cận với các xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 và xét nghiệm kháng thuốc gen HIV tại các khu vực xa trung tâm còn gặp nhiều khó khăn, chưa đáp ứng được nhu cầu của người bệnh và xã hội.

Một trong những giải pháp để cải thiện tiếp cận với xét nghiệm theo dõi điều trị HIV cho người bệnh ở vùng sâu, vùng xa là sử dụng thiết bị xét nghiệm tại chỗ như máy GenXpert, có thể xét nghiệm đơn lẻ từng mẫu [17, 18]. Tuy nhiên, thiết bị này cũng có chi phí đắt, ở những nơi xa, có ít người bệnh thì hiệu quả đầu tư không cao [19]. Hơn nữa, vấn đề đảm bảo chất lượng xét nghiệm tại các điểm xét nghiệm tại chỗ cũng cần được chú trọng. Một giải pháp khác được đề cập đến trong hướng dẫn của Tổ chức Y tế Thế giới là mẫu giọt máu khô (DBS – dried blood spot) [20]. Loại mẫu này có kỹ thuật lấy mẫu đơn giản, ít nguy cơ lây nhiễm, có thể gửi mẫu qua đường bưu điện ở nhiệt độ thường. Mẫu DBS đã được đánh giá rộng rãi qua nhiều nghiên cứu, cho thấy có thể được sử dụng trong xét nghiệm tải lượng virus, xét nghiệm phát hiện đột biến kháng thuốc, xác định nồng độ thuốc ARV,...[21-23]. Tuy nhiên, một hạn chế của mẫu DBS là nguy cơ phân loại sai người bệnh thất bại điều trị trong xét nghiệm đo tải lượng HIV-1. Mẫu DBS là máu toàn phần khô bao gồm cả RNA của virus tự do trong huyết tương và DNA tiền virus đã cài trong tế bào các miễn dịch, dẫn đến kết quả giải trình tự gen không phản ánh xác thực quần thể virus đang lưu hành và chiếm ưu thế trong cơ thể người bệnh [21-25]. Do vậy, việc xác định đột biến kháng thuốc từ mẫu DBS tuy có tỉ lệ khuếch đại thành công cao nhưng cho kết quả có sự khác biệt với kết quả từ mẫu huyết tương nên khó áp dụng trong theo dõi lâm sàng. Một loại mẫu khô khác là mẫu huyết tương khô (DPS – dried plasma sample) cho kết quả xác định gen kháng thuốc tương đồng cao với mẫu huyết tương, tuy nhiên tính ổn định của mẫu thấp sau thời gian ngắn bảo quản [24, 26, 27].

Để khắc phục hạn chế của các loại mẫu hiện có, thẻ tách huyết tương khô (PSC – plasma separation card) đã được nghiên cứu, phát triển. Thẻ PSC là thiết bị y tế dùng để thu thập và lưu trữ mẫu huyết tương từ máu toàn phần; được thiết kế để có thể sử dụng trực tiếp, dễ dàng, không yêu cầu thêm các thiết bị, máy

móc khác, phù hợp với điều kiện hạn chế cơ sở hạ tầng phòng thí nghiệm. Trái ngược với các loại mẫu là chất lỏng, các loại giấy khô khả năng lưu trữ mẫu trong một ma trận xốp như chất liệu sợi cellulose hoặc sợi thủy tinh để duy trì độ ổn định của các chất phân tích mà không cần bảo quản lạnh. Trên thực tế, độ ổn định của một số nhóm chất phân tích (ví dụ: chất chuyển hóa của thuốc, cytokine và RNA) được cải thiện khi làm khô, vì chúng ít bị phân hủy hơn do quá trình thủy phân, phân hủy quang học, hoạt động của DNAase và RNAase. Các mẫu khô có nhiều lợi ích trong việc vận chuyển và bảo quản mẫu do tính ổn định ở nhiệt độ thường và ít nguy cơ lây nhiễm. Hơn nữa, mẫu PSC này được kỳ vọng có ưu thế hơn mẫu DBS, DPS trong bảo quản mẫu bệnh phẩm do có bản chất tương tự như mẫu huyết tương. Thẻ PSC thường có cấu tạo đơn giản, gồm các lớp sau: (1) Lớp màng lọc tách huyết tương: đây là lớp quan trọng nhất, có vai trò tách các tế bào máu ra khỏi huyết tương nhờ các lỗ xốp của màng lọc, (2) Lớp hấp thụ huyết tương: phần này giúp lưu trữ huyết tương đã được lọc tách, giúp mẫu ổn định mà không cần đông lạnh, (3) Bao bì bảo vệ: thường được đóng gói trong các túi chống nhiễm bẩn, kín khí chống ẩm, giúp giữ nguyên chất lượng mẫu trong quá trình vận chuyển. Thẻ PSC đã được thử nghiệm ứng dụng phát hiện nhiều chỉ thị sinh học (biomarker) khác nhau, ví dụ HemaSep card, Burnett card, Cobas card...[28-30]

Các nghiên cứu của các tác giả Carmona, 2019; Vubil, 2020; Kiyaga, 2023; Chimoyi, 2024 và cộng sự..., thử nghiệm tại Châu Phi cho thấy mẫu thu và lưu trữ trong PSC đảm bảo tốt, cho các kết quả xét nghiệm với độ nhạy, độ đặc hiệu cao tương tự mẫu huyết tương trong xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 bằng sinh phẩm Roche Cobas [31-34]. Hiện tại, chưa có công bố trên thế giới về thử nghiệm, đánh giá loại mẫu PSC này sử dụng trong xét nghiệm giải trình tự gen HIV phát hiện đột biến kháng thuốc.

Tại Việt Nam hiện nay, mặc dù xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 định kỳ được bảo hiểm y tế đồng chi trả với người bệnh; hoặc một số nhóm người bệnh được hỗ trợ hoàn toàn từ nguồn dự án Quỹ Toàn Cầu, việc tiếp cận với xét nghiệm này vẫn còn rất hạn chế. Theo báo cáo từ Cục Phòng chống HIV/AIDS, Bộ Y tế, trong các năm từ 2017 đến 2020, tỉ lệ người bệnh đang điều trị ARV được xét nghiệm tải lượng định kỳ đạt khoảng 62,5 – 75,8%. Năm 2021, tỉ lệ này giảm còn 46% do tác động của dịch Covid-19. Một nguyên nhân chính là ở các vùng sâu, vùng xa, người bệnh không có điều kiện để di chuyển đến các

phòng thí nghiệm trung tâm hoặc chi phí vận chuyển mẫu huyết tương cao, không thể thực hiện thường xuyên. Việc sử dụng mẫu DBS hoặc thiết bị xét nghiệm tại chỗ vẫn chưa thực sự được áp dụng rộng rãi. Mẫu PSC có thể là một lựa chọn thay thế cho DBS và huyết tương trong xét nghiệm tải lượng HIV-1 ở vùng sâu, vùng xa tại Việt Nam. Tuy nhiên, Việt Nam chưa có công bố nào về thử nghiệm đánh giá mẫu PSC trong xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 để theo dõi điều trị cho người nhiễm HIV.

Đối với trường hợp người bệnh có kết quả tải lượng virus ≥ 1.000 bản sao/ml, nếu người bệnh đã tuân thủ điều trị tốt, cần được làm xét nghiệm giải trình tự gen HIV để xác định có hay không đột biến liên quan đến kháng với phác đồ đang điều trị. Việc xét nghiệm tìm đột biến kiểu gen HIV sẽ được tiến hành rất thuận lợi nếu mẫu PSC còn lưu sau khi làm tải lượng HIV-1 có thể sử dụng tiếp trong xét nghiệm giải trình tự gen. Người bệnh không cần di chuyển lên các phòng xét nghiệm trung tâm để lấy lại mẫu, tiết kiệm chi phí và thời gian. Tuy nhiên, hiện nay chưa có công bố nào đánh giá việc sử dụng mẫu lưu trữ trong thẻ PSC để xét nghiệm giải trình tự gen HIV phát hiện đột biến kháng thuốc.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

- Người bệnh dương tính HIV đáp ứng các tiêu chí sau:

* Tiêu chuẩn lựa chọn:

- + Người bệnh có kết quả khẳng định nhiễm HIV
- + Tuổi từ 18 trở lên
- + Đồng ý tham gia nghiên cứu

* Tiêu chuẩn loại trừ:

- + Người âm tính với HIV
- + Dưới 18 tuổi
- + Sức khỏe yếu, người bệnh có tiền sử rối loạn đông máu
- + Người bệnh không đồng ý tham gia nghiên cứu

- Thẻ tách huyết tương (Plasma separation card – PSC, Roche, Basel, Thụy Sĩ).

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu:

Nghiên cứu mô tả cắt ngang lấy mẫu trên thực địa và xét nghiệm phân tích trong phòng thí nghiệm.

2.2.2. Địa điểm, thời gian và phạm vi nghiên cứu

Nghiên cứu tuyển chọn người tham gia tại hai phòng khám ngoại trú tại Hà Nội là Trung tâm Y tế Nam Từ Liêm và Bệnh viện đa khoa Đống Đa.

Thời gian thu thập mẫu trên thực địa: từ tháng 10/2022 – tháng 3/2023

Phạm vi nghiên cứu: Nghiên cứu thực hiện trên mẫu bệnh phẩm từ người nhiễm HIV trước khi bắt đầu điều trị hoặc đã điều trị ARV. Phạm vi nghiên cứu tập trung vào thu thập mẫu máu toàn phần, tách huyết tương và nhỏ mẫu lên PSC để làm hai xét nghiệm theo dõi điều trị bao gồm: xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 và giải trình tự gen HIV để tìm đột biến kháng thuốc.

Việc chuẩn bị mẫu, xét nghiệm, đánh giá mẫu PSC được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm chuẩn thức. Tuy nhiên, để mô phỏng điều kiện bảo quản, thời gian thông thường vận chuyển mẫu khô từ vùng sâu, vùng xa, mẫu PSC sau khi khô sẽ được đóng gói, để ở nhiệt độ phòng trong vòng khoảng 2 tuần trước khi bảo quản âm sâu hoặc tiến hành thí nghiệm.

2.2.3. Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu

2.2.3.1. Cỡ mẫu

Nghiên cứu được thực hiện trên 250 người bệnh nhiễm HIV

2.2.3.2. Cách tính cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu

Cỡ mẫu cho nghiên cứu được tính toán áp dụng công thức ước tính cỡ mẫu từ độ nhạy, độ đặc hiệu

Độ nhạy: trong đánh giá này là khả năng phát hiện chính xác thất bại điều trị về virus học trên mẫu PSC. Tức là tải lượng HIV-1 trên mẫu PSC ≥ 1.000 bản sao/ml, mẫu huyết tương tương ứng có tải lượng HIV-1 ≥ 1.000 bản sao/ml. Đặt giả thuyết độ nhạy 90% với sai số chấp nhận là $\pm 5\%$ và độ tin cậy 95%, theo công thức ước tính cỡ mẫu từ độ nhạy bên dưới thì cần 138 trường hợp dương tính, làm tròn là 150 trường hợp có tải lượng HIV-1 ≥ 1.000 bản sao/ml.

$$n_{Se} = \frac{Z^2 \times Se \times (1 - Se)}{d^2}$$

trong đó:

- n_{Se} : Cỡ mẫu dương tính cần thiết
- Z : Điểm giới hạn Z tương ứng với mức ý nghĩa (ví dụ, $Z = 1.96$ cho mức ý nghĩa 5%)
- Se : Độ nhạy mong đợi của sinh phẩm
- d : Sai số chấp nhận được cho độ nhạy

Độ đặc hiệu: trong đánh giá này là khả năng phát hiện điều trị thành công về virus học. Tức là tải lượng HIV-1 trên mẫu PSC < 1.000 bản sao/ml trong số mẫu có tải lượng HIV-1 < 1.000 bản sao/ml. Đặt giả thuyết độ đặc hiệu 93% với sai số chấp nhận là $\pm 5\%$ và độ tin cậy 95%, theo công thức ước tính cỡ mẫu từ độ đặc hiệu bên dưới thì cần 100 trường hợp âm tính, là trường hợp có tải lượng HIV-1 < 1.000 bản sao/ml.

$$n_{Sp} = \frac{Z^2 \times Sp \times (1 - Sp)}{d^2}$$

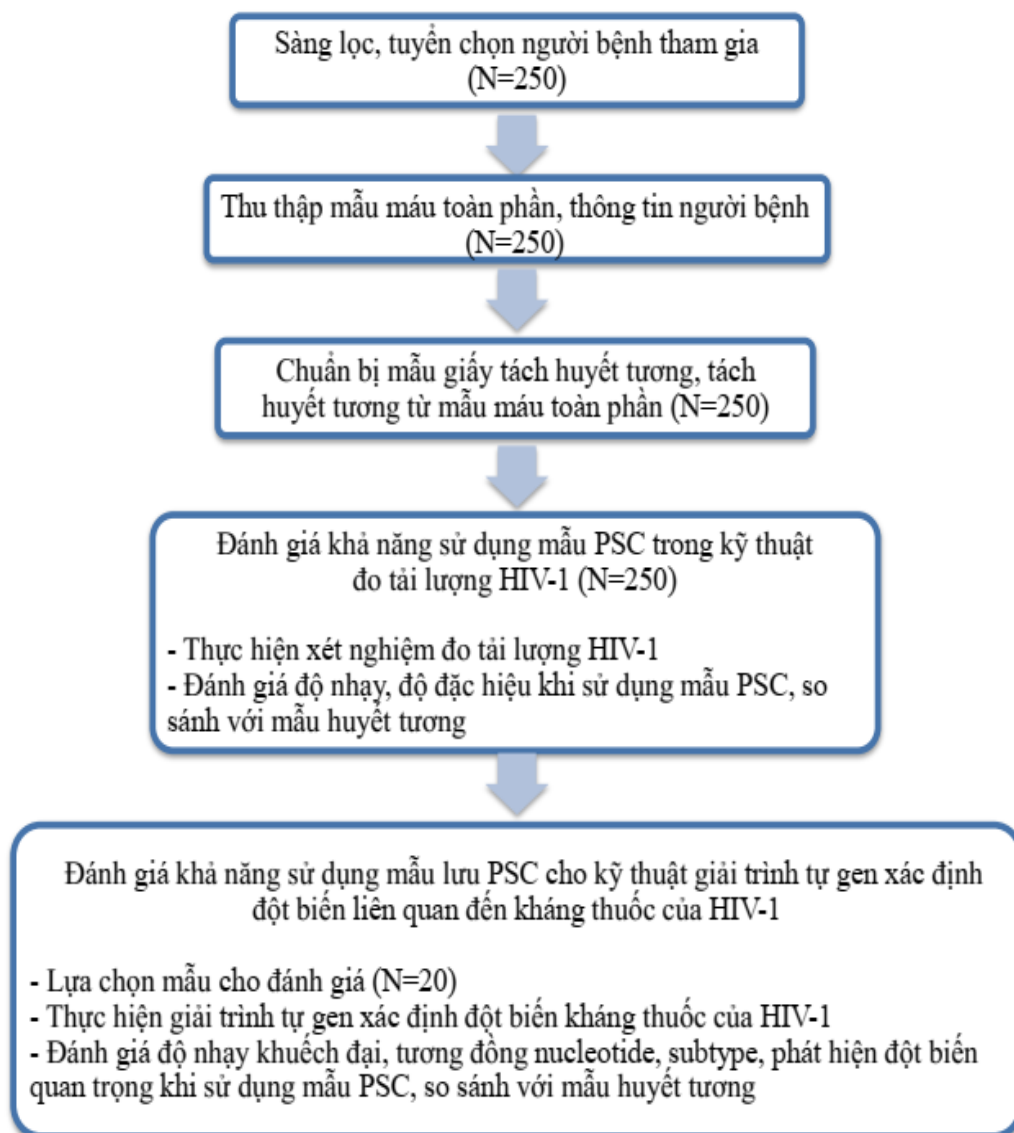
trong đó:

- n_{Sp} : Cỡ mẫu âm tính cần thiết
- Z : Điểm giới hạn Z
- Sp : Độ đặc hiệu mong đợi của sinh phẩm
- d : Sai số chấp nhận được cho độ đặc hiệu

Để lựa chọn được dải tải lượng HIV-1 rộng và đủ theo ước tính đã đề ra, nghiên cứu đã điều phối, tuyển chọn ba nhóm người bệnh sau theo thứ tự ưu tiên: Nhóm người bệnh mới chẩn đoán nhiễm HIV, chưa điều trị ARV: dự đoán có tải lượng virus >5.000 bản sao/ml. Nhóm người bệnh đã điều trị ARV trên 6 tháng: người bệnh khỏe mạnh, lâm sàng ổn định dự kiến có tải lượng virus không phát hiện; Người bệnh có biểu hiện nhiễm trùng cơ hội, thất bại điều trị dự kiến có tải lượng virus >1.000 bản sao/ml. Nhóm người bệnh mới điều trị ARV từ 1-3 tháng: dự đoán có tải lượng virus trung bình.

Đối với đánh giá mẫu PSC trong xét nghiệm giải trình tự gen HIV phát hiện đột biến kháng thuốc, trong số mẫu đã thu thập, nghiên cứu chọn toàn bộ mẫu từ người bệnh đã điều trị ARV lớn hơn 6 tháng, có kết quả tải lượng virus ≥ 1.000 bản sao/ml. Những mẫu này có tỉ lệ có xuất hiện đột biến kháng thuốc trong gen cao hơn, phục vụ đánh giá so sánh.

2.2.4. Sơ đồ nội dung nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

2.2.5. Sàng lọc, tuyển chọn người bệnh tham gia nghiên cứu

Tại hai phòng khám ngoại trú, bác sỹ sàng lọc người bệnh phù hợp tiêu chuẩn tuyển chọn và loại trừ. Người bệnh được cung cấp thông tin về nghiên cứu và được mời tham gia nghiên cứu. Những người bệnh đủ tiêu chuẩn tuyển chọn và đồng ý ký giấy tham gia nghiên cứu sẽ được tuyển chọn. Những bệnh nhân từ chối tham gia nghiên cứu vẫn nhận được sự chăm sóc y tế theo quy định thông thường. Mã nghiên cứu được ký hiệu là MOVIDA ID XXX, đánh từ 001 đến 250. Mã này được sử dụng để mã hóa mẫu máu toàn phần, phiếu thu thập thông tin điện tử trên phần mềm Redcap và độc lập với tên và mã số của người bệnh tại phòng khám ngoại trú.

2.2.6. Thu thập mẫu máu toàn phần, thông tin người bệnh

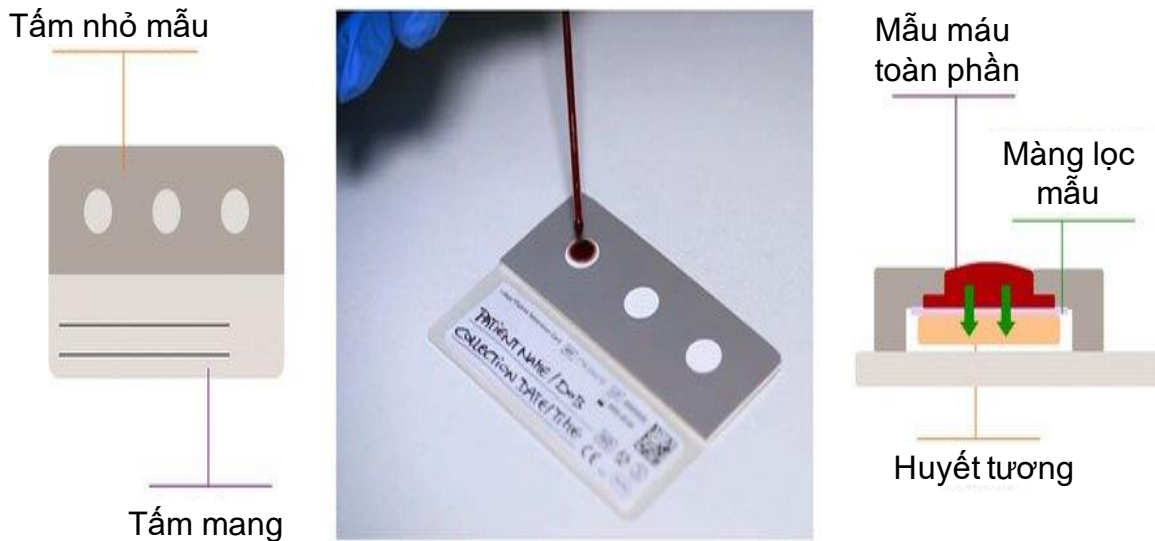
Mỗi người bệnh được lấy 6 ml máu toàn phần tĩnh mạch sử dụng kim bướm và ống lấy máu chân không có chống đông EDTA đã dán mã nghiên cứu. Ống mẫu sau khi lấy được đảo trộn nhẹ nhàng bằng tay từ 6-8 lần và đặt trong thùng giữ lạnh, nhiệt độ 2-8°C. Mẫu bệnh phẩm cùng với phiếu chỉ định lấy mẫu được chuyển đến phòng thí nghiệm, Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương vào mỗi cuối buổi sáng của buổi lấy mẫu.

Nghiên cứu viên cũng tiến hành thu thập, nhập liệu thông tin người bệnh từ hồ sơ bệnh án vào phiếu thu thập thông tin điện tử trên phần mềm Redcap. Các thông tin nghiên cứu thu thập là: tuổi, giới tính, ngày tham gia nghiên cứu, PKNT đang điều trị, ngày bắt đầu điều trị, phác đồ điều trị, người bệnh có đồng nhiễm HBV, HCV hay không... Vì lý do bảo mật thông tin người bệnh, các thông tin có tính chất định danh như họ và tên, mã điều trị tại PKNT, địa chỉ, số điện thoại... không được thu thập.

2.2.7. Chuẩn bị mẫu giấy tách huyết tương PSC, huyết tương từ mẫu máu toàn phần

Mã số dùng để mã hóa mẫu PSC và huyết tương từ một mẫu máu toàn phần được tạo ngẫu nhiên. Cán bộ thực hiện bước chuẩn bị mẫu khác với cán bộ thực hiện xét nghiệm. Mục đích để đảm bảo tính khách quan trong thực hiện xét nghiệm, cán bộ xét nghiệm không thể xác định, đối chiếu được kết quả hai loại mẫu. Danh sách mã nghiên cứu, mã mẫu PSC, mã mẫu huyết tương tương ứng do nghiên cứu viên chính giữ.

Đối với mỗi mẫu bệnh phẩm máu toàn phần, sau khi dán mã mẫu tương ứng vào hai tấm PSC, kỹ thuật viên đảo trộn kỹ, nhẹ nhàng ống máu từ 6-8 lần và nhỏ 140 µl máu vào mỗi vòng tròn. Sau đó, mẫu PSC được phơi khô ở nhiệt độ phòng trong khoảng 4 giờ trước khi được đóng gói với 3 gói chống ẩm vào túi có khóa zip. Túi mẫu được bảo quản ở nhiệt độ phòng trong vòng khoảng hai tuần trước khi được bảo quản trong tủ âm -20°C hoặc tiến hành xét nghiệm nếu đủ mẻ.



Hình 2.2. Tấm thẻ tách huyết tương Cobas plasma separation card [31].

Lượng máu toàn phần còn lại được ly tâm tốc độ 2500 vòng/phút trong 20 phút. Sau đó phần huyết tương được hút vào 2 ống cryotube 2 ml đã dán mã tương ứng. Ống huyết tương được bảo quản ở tủ âm -80°C đến khi đủ mẻ để thực hiện xét nghiệm.

2.2.8. Đánh giá khả năng sử dụng mẫu PSC cho kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV-1

2.2.8.1. Kỹ thuật xét nghiệm đo tải lượng HIV-1

- Hóa chất, sinh phẩm

- + Sinh phẩm chính: Cobas HIV-1 test (Roche, Basel, Thụy Sĩ)
- + Chứng sinh phẩm: Cobas HBV/HCV/HIV (gồm 1 chứng âm, 1 chứng dương thấp, 1 chứng dương cao).
- + Hóa chất hoàn nguyên mẫu khô: SPER cobas Specimen Pre-Extraction Reagent

- Thiết bị:

- + Máy vortex
- + Máy ly tâm
- + Hệ thống máy Roche Cobas 4800 (Roche, Basel, Thụy Sĩ)

- Quy trình thực hiện: theo khuyến cáo của hãng Roche trong “Package insert” cung cấp kèm sinh phẩm.

- + Đối với mẫu huyết tương: Kỹ thuật viên tiến hành trộn nhẹ mẫu sử dụng máy vortex. Ly tâm nhanh trong khoảng 30 giây. Xếp mẫu vào khay đựng mẫu. Nạp mẫu, sinh phẩm, vật tư vào máy và khởi động quy

trình tách chiết, pha hỗn hợp, luân nhiệt tự động trong xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 sử dụng mẫu huyết tương.

+ Đối với mẫu PSC: Cắt 1 khoanh giấy huyết tương khô cho vào ống đựng mẫu. Bổ sung 800 μ l dung dịch SPER. Ủ lãc mẫu trong điều kiện 65°C trong vòng 10 phút. Xếp mẫu vào khay đựng mẫu. Nạp mẫu, sinh phẩm, vật tư vào máy và khởi động quy trình tách chiết, pha hỗn hợp, luân nhiệt tự động trong xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 sử dụng mẫu PSC.

- Xác nhận kết quả: Mẻ chạy được xác nhận và phê duyệt kết quả khi chứng âm cho kết quả không phát hiện, chứng dương thấp, dương cao cho kết quả phù hợp trong khoảng giá trị nhà sản xuất mẫu chứng công bố. Kết quả mỗi mẫu được phê duyệt khi chứng nội kiểm QS có sự khuếch đại, Ct trong khoảng phù hợp. Kết quả tải lượng HIV-1 của mỗi mẫu được tính toán tự động từ giá trị Ct thu được trong quá trình khuếch đại mỗi đặc hiệu cho HIV-1, qua đó xác định nồng độ virus trong mẫu, được biểu thị bằng đơn vị bản sao/ml. Theo công bố từ hãng Roche, trên hệ thống Cobas 4800: khoảng tuyến tính cho xét nghiệm tải lượng HIV-1 trên mẫu PSC là 599 – 10⁷ bản sao/ml; khoảng tuyến tính cho xét nghiệm tải lượng HIV-1 trên mẫu huyết tương là 20 – 10⁷ bản sao/ml.

2.2.8.2. Đánh giá khả năng sử dụng mẫu PSC cho xét nghiệm tải lượng virus dựa trên độ nhạy, độ đặc hiệu so với mẫu huyết tương tươi

Mục tiêu thứ nhất của đề tài là Đánh giá khả năng sử dụng mẫu PSC trong xét nghiệm đo tải lượng HIV-1, so sánh với mẫu huyết tương tươi trong việc phân loại chính xác người bệnh không đạt ức chế virus (ngưỡng phân loại thất bại điều trị: tải lượng HIV-1 ≥ 1.000 bản sao/ml). Kết quả xét nghiệm tải lượng HIV-1 trên mẫu huyết tương được coi là tiêu chuẩn vàng để so sánh với kết quả từ mẫu PSC. Từ đó, độ nhạy và độ đặc hiệu khi sử dụng mẫu PSC trong xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 được tính toán.

Độ nhạy: được định nghĩa là khả năng phát hiện chính xác người bệnh không đạt ức chế virus (tải lượng HIV-1 ≥ 1.000 bản sao/ml) trên mẫu PSC, trong đó tải lượng virus được đo từ huyết tương được xem là mẫu chuẩn.

Mẫu âm tính giả (FN: false negative) là mẫu PSC có tải lượng HIV-1 < 1.000 bản sao/ml mà mẫu huyết tương tương ứng có tải lượng HIV-1 ≥ 1.000 bản

sao/ml. Công thức tính độ nhạy: Độ nhạy (%) = $TP \cdot 100 / (TP + FN)$, trong đó TP (TP: true positive) là số mẫu dương tính thật và FN (FN: false negative) là số mẫu âm tính giả.

Độ đặc hiệu: được định nghĩa là khả năng phát hiện chính xác người bệnh đạt ức chế virus (tải lượng HIV-1 <1.000 bản sao/ml).

Mẫu có kết quả dương tính giả (FP: false positive) là mẫu PSC có tải lượng HIV-1 ≥ 1.000 bản sao/ml trong khi mẫu huyết tương tương ứng có tải lượng HIV-1 <1.000 bản sao/ml.

Công thức tính độ đặc hiệu: Độ đặc hiệu (%) = $TN \cdot 100 / (TN + FP)$, trong đó TN (TN: true negative) là số mẫu âm tính thật và FP (FP: false positive) là số mẫu dương tính giả.

Nghiên cứu cũng tiến hành chuyển đổi kết quả giá trị tải lượng HIV-1 từ bản sao/ml sang log₁₀ bản sao/ml và sử dụng phân tích Bland-Altman để đánh giá độ tương đồng giữa tải lượng trên mẫu PSC và mẫu huyết tương. Ngoài ra, tỷ lệ mẫu có khác biệt nhiều hơn 1 log bản sao/ml cũng sẽ được tính toán. Các phân tích được tiến hành với phần mềm Stata (Stata Corporation, College Station, Texas, USA), với mức ý nghĩa 5%.

2.2.9. Đánh giá khả năng sử dụng mẫu lưu PSC trong kỹ thuật giải trình tự gen xác định đột biến liên quan đến kháng thuốc của HIV-1

2.2.9.1. Lựa chọn cặp mẫu cho đánh giá

Trong số 250 cặp mẫu, để đánh giá khả năng sử dụng mẫu PSC trong xét nghiệm xác định đột biến HIV-1 kháng thuốc, nhóm nghiên cứu tiến hành lựa chọn toàn bộ các cặp mẫu đáp ứng tiêu chuẩn lựa chọn như sau:

- Mẫu từ người bệnh có thời gian điều trị ARV từ 6 tháng trở lên.
- Cặp mẫu PSC-huyết tương đều có kết quả tải lượng HIV-1 ≥ 1.000 bản sao/ml.

2.2.9.2. Kỹ thuật giải trình tự gen xác định đột biến HIV kháng thuốc

- Hóa chất, sinh phẩm chính

+ Qiagen viral mini kit (Qiagen, Hilden, Đức)

+ Nuclisens nucleic acid extraction reagent (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Pháp)

+ SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Massachusetts, Mỹ)

- + AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase with Gold Buffer and MgCl₂ (ABI, Massachusetts, Mỹ)
- + ExoSapIT express clean up (ABI, Massachusetts, Mỹ)
- + BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI, Massachusetts, Mỹ)
- Thiết bị
 - + Máy ly tâm
 - + Hệ thống tách chiết tự động Emag (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Pháp)
 - + Máy PCR
 - + Máy vortex
 - + Máy chụp ảnh gel
 - + Máy giải trình tự ABI 3500 (ABI, Massachusetts, Mỹ)
- Quy trình thực hiện: theo quy trình công bố của Trung tâm Kiểm soát bệnh tật Hoa Kỳ và khuyến cáo về xét nghiệm kháng thuốc HIV-1 của Tổ chức Y tế thế giới [14].

2.2.9.2.1. Tách chiết RNA từ mẫu bệnh phẩm

RNA virus được tách chiết từ 140 µl mẫu huyết tương sử dụng sinh phẩm Qiagen viral mini kit (Qiagen, Hilden, Đức) theo quy trình khuyến cáo của hãng. Thể tích RNA hồi chính thu được sau tách chiết là 50 µl.

Đối với mẫu PSC, cắt 1 khoanh giấy tách huyết tương vào 2 ml đệm Nuclisens lysis buffer, ủ lắc nhẹ nhàng ở nhiệt độ phòng trong vòng 30 phút. Sau đó, nạp mẫu vào máy Nuclisens Emag và tách chiết sử dụng sinh phẩm Nuclisens nucleic acid extraction reagent (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Pháp). Thể tích RNA hồi chính thu được sau tách chiết là 50 µl.

2.2.9.2.2. Phản ứng phiên mã ngược tổng hợp cDNA và PCR một bước khuếch đại vùng gen mục tiêu

Trộn thành phần phản ứng như sau:

2x Reaction buffer mix	25 µl
PrtM-F1 primers	1 µl
RT-R1 primer (10 µM)	1 µl
DEPC-H ₂ O	12 µl
SS III RT-PCR enzyme	1 µl

Nhỏ 10 µl RNA đã biến tính vào 40 µl master mix, vortex nhẹ và ly tâm nhanh (spin down).

Đặt mẫu vào máy PCR, chạy với chu trình nhiệt như sau:

50°C 45 phút; 94°C 2 phút

94°C 15 giây; 50°C 20 giây; 72°C 2 phút trong 40 chu kỳ

72°C 10 phút, 4°C ∞

2.2.9.2.3. Phản ứng PCR lồng

Trộn thành phần phản ứng như sau

10x Gold buffer	5 µl
MgCl ₂ (25 µM)	4 µl
dNTPs (10 µM mỗi loại)	1 µl
PrtM-F2 primer (4 µM)	1,5 µl
RT-R2 primer (4 µM)	1,5 µl
DEPC-H ₂ O	34,5 µl
Taq Gold LD enzyme	0,5 µl

Nhỏ 2 µl sản phẩm ở bước trước vào mỗi ống phản ứng chứa 48 µl master mix, vortex nhẹ và ly tâm nhanh.

Đặt mẫu vào máy PCR, chạy với chu trình nhiệt như sau:

94°C 4 phút

94°C 15 giây; 55°C 20 giây; 72°C 2 phút; 40 chu kỳ

72°C 10 phút, 4°C ∞

2.2.9.2.4. Điện di kiểm tra sản phẩm khuếch đại

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Các mẫu khuếch đại thành công sẽ hiển thị một băng DNA đặc hiệu, kích thước khoảng 1 Kb.

2.2.9.2.5. Làm sạch sản phẩm khuếch đại

Chuẩn bị ống 0,2 ml, nhỏ vào mỗi ống 2 µl ExoSAP IT Express và 5 µl sản phẩm PCR.

Vortex đều, ly tâm nhanh và ủ trong máy PCR với chu trình nhiệt 37°C 4 phút, 80°C 1 phút, 4°C ∞. Với bộ kit này, các môi thừa và nucleotide dư thừa sau phản ứng PCR sẽ được cắt bỏ hoàn toàn.

2.2.9.2.6. Phản ứng khuếch đại gen cho giải trình tự

Trình tự vùng gen PRRT của gen *Pol* từ một mẫu được giải bằng 6 môi gồm PRT-F2, RT-R2, SeqF2, SeqR2, SeqF3, SeqR3. Phản ứng khuếch đại

gen cho giải trình tự có thành phần như sau:

Nước	12 μ l
Primer (4 μ M)	1 μ l
BigDye buffer	4 μ l
BigDye terminator	1 μ l
DNA template	2 μ l

Chu trình nhiệt như sau:

96°C, 10 giây; 50°C, 5 giây; 60°C, 4 phút; 25 chu kỳ
4°C ∞

2.2.9.2.7. Tinh chế sản phẩm gen đã khuếch đại cho giải trình tự và điện di mao quản

Pha hóa chất tinh sạch BigDye Xterminator: cho 20 μ l sản phẩm phản ứng cần 20 μ l Xterminator, 90 μ l Sam

Thêm 110 μ l hóa chất tinh sạch vào mỗi giếng phản ứng

Vortex 30 phút, 1400 vòng/ phút

Ly tâm mẫu 3000 vòng/ phút trong 3 phút

Có thể lưu mẫu ở 4°C trong vòng một tuần cho đến khi nạp và chạy trên máy Generic Analyzer ABI 3500.

2.2.9.2.8. Phân tích trình tự, tìm đột biến liên quan đến kháng thuốc HIV-1

Các trình tự giải được từ cùng một mẫu được kiểm soát chất lượng, ghép với nhau, để tạo một trình tự thống nhất (aligned sequence) với cut off xác định nucleotide hỗn hợp (mixture nucleotide) là 20%, sử dụng phần mềm ChromasPro (Technelysium, Queensland, Úc), RECall (Đại học British Columbia, Canada). Trình tự gen sau đó được tải lên cơ sở dữ liệu HIV Drug resistance database (Đại Học Stanford, Mỹ) để đối chiếu với trình tự gen hoang dại tham chiếu, tìm các điểm đột biến, xác định subtype và các đặc tính kháng thuốc liên quan.

2.2.9.2. Đánh giá khả năng sử dụng mẫu lưu PSC trong kỹ thuật giải trình tự gen phát hiện đột biến HIV kháng thuốc

Mục tiêu thứ hai của đề tài là Đánh giá khả năng sử dụng mẫu lưu PSC trong kỹ thuật giải trình tự gen phát hiện đột biến HIV kháng thuốc.

Nghiên cứu tiến hành đánh giá độ nhạy khi khuếch đại đoạn gen PR-RT (thuộc gen *Pol*) của HIV-1 khi sử dụng mẫu PSC, so sánh với mẫu huyết

tương. Độ nhạy khuếch đại là tỉ lệ phần trăm số mẫu khuếch đại thành công trên tổng số mẫu xét nghiệm.

Nghiên cứu cũng phân tích sự tương đồng/ khác biệt về nucleotide, xác định subtype từ hai loại mẫu bệnh phẩm khác nhau. Phân tích so sánh tương đồng nucleotide được thực hiện sử dụng phần mềm Bioedit (BioMérieux, Manchester, Vương quốc Anh) và xem xét qua cây phả hệ được xây từ phần mềm Mega X (Texas A&M University, USA).

Nghiên cứu cũng đánh giá khả năng xác định các điểm đột biến quan trọng của HIV-1 trong đoạn gen PR-RT khi sử dụng thẻ tách huyết tương PSC, so sánh với mẫu huyết tương.

2.2.10. Đạo đức nghiên cứu

Đề cương nghiên cứu đã được thông qua bởi Hội đồng Đạo đức của Viện Vệ sinh dịch tễ trung ương (số chấp thuận: NIHE IRB-29/2021 ngày 15/11/2021) và Viện Pasteur Paris (số chấp thuận: IRB00006966 ngày 24/12/2021) trước khi triển khai.

Dữ liệu được thu thập theo mã số dùng riêng cho nghiên cứu này, không bao gồm tên người bệnh, mã số người bệnh tại phòng khám và các thông tin định danh khác.

Chỉ những bệnh nhân chấp thuận bản đồng ý tự nguyện tham gia nghiên cứu mới được đưa vào nghiên cứu. Những bệnh nhân từ chối tham gia nghiên cứu vẫn nhận được sự chăm sóc y tế theo quy định thông thường.

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. TUYỂN CHỌN, THU THẬP MẪU TỪ NGƯỜI NHIỄM HIV

3.1.1. Đặc điểm người bệnh tham gia nghiên cứu

Bảng 3.1. Đặc điểm người bệnh tham gia nghiên cứu từ hai phòng khám ngoại trú tại Hà Nội, từ tháng 10/2022 - 3/2023, N=250

Đặc điểm (N=250)	Số lượng người bệnh	
	N	%
Phòng khám ngoại trú		
Trung tâm Y tế Nam Từ Liêm	170	68,0
Bệnh viện đa khoa Đống Đa	80	32,0
Tuổi		
18-24 tuổi	50	20,0
25-49 tuổi	166	66,4
>50 tuổi	34	13,6
Giới tính		
Nam	201	80,4
Nữ	49	19,6
Kết quả HBsAg gần nhất		
Dương tính	19	7,6
Âm tính	190	76,0
Chưa từng xét nghiệm	41	16,4
Kết quả AntiHCV-antibody gần nhất		
Dương tính	28	11,2
Âm tính	187	74,8
Chưa từng xét nghiệm	35	14,0
Thời gian điều trị ARV		
Chưa từng điều trị ARV	105	42
Đã điều trị từ <3 tháng	36	14,4
Đã điều trị hơn 3 tháng	109	43,6

Trong thời gian từ tháng 10 năm 2022 đến hết tháng 3 năm 2023, nghiên cứu đã tuyển chọn, thu thập thông tin, mẫu bệnh phẩm của 250 người nhiễm HIV đủ tiêu chuẩn tại hai phòng khám ngoại trú (PKNT) là Trung tâm Y tế Nam Từ Liêm và Bệnh viện Đa khoa Đống Đa tại Hà Nội. Số mẫu thu được từ PKNT, Trung tâm Y tế Nam Từ Liêm là 170 mẫu (chiếm 68,0%) và số mẫu thu được từ PKNT, Bệnh viện Đa khoa Đống Đa là 80 mẫu (chiếm 32%) (Bảng 3.1).

Trong số người bệnh tham gia, 50 người có độ tuổi từ 18 đến 24 tuổi (chiếm 20,0%), 166 người từ 25 đến 49 tuổi (chiếm 66,4%), 34 người từ 50 tuổi trở lên (chiếm 13,6%). Phần lớn người bệnh là nam giới (201 trường hợp chiếm tỉ lệ 80,4%). Tất cả các người bệnh đều có kết quả xét nghiệm huyết thanh học từ cơ sở y tế khẳng định có nhiễm HIV. Tỉ lệ người bệnh nhiễm HIV, có đồng nhiễm HBV hoặc HCV ở mức lần lượt là 7,6% và 11,2%, tuy nhiên có 41 người bệnh chưa từng xét nghiệm HbsAg và 35 người bệnh chưa từng xét nghiệm AntiHCV-antibody. Số lượng người bệnh trong nhóm mới phát hiện nhiễm HIV, chưa từng điều trị ARV và nhóm đã điều trị từ 3 tháng trở lên tương đương nhau, lần lượt là 105 người (chiếm 42%) và 109 người (chiếm 43,6%). Số người bệnh còn lại mới điều trị HIV dưới 3 tháng là 36 người (chiếm 14,4%).

Nghiên cứu đã tuyển chọn và thu thập được các mẫu bệnh phẩm từ người bệnh nhiễm HIV ở các độ tuổi khác nhau, cả nam và nữ, có bao gồm trường hợp đồng nhiễm HBV, HCV, có thời gian điều trị ARV khác nhau để đảm bảo tính đa dạng, bao phủ được dải tải lượng HIV-1 rộng, phục vụ các đánh giá tiếp theo.

3.1.2. Thu thập và chuẩn bị mẫu bệnh phẩm

Nghiên cứu đã thu thập đủ 250 mẫu máu toàn phần từ 250 người bệnh tham gia nghiên cứu. Tại phòng thí nghiệm, đánh giá tại thời điểm tiếp nhận mẫu, các mẫu máu toàn phần được chuyển gửi đến đảm bảo chất lượng.



Trộn nhẹ mẫu máu bằng cách đảo xuôi ngược ống máu 6-8 lần



Nhỏ 140 µl máu vào mỗi ô tròn sẵn có của tấm PSC



Phơi khô tự nhiên trong vòng 3 – 4 giờ



Mẫu PSC sau khi khô, mặt trước



Mẫu PSC sau khi khô, mặt sau



Tách bỏ lớp màng giấy chứa hồng cầu, huyết tương thấm và được làm khô ở lớp giấy phía dưới

Hình 3.1. Hình ảnh chuẩn bị mẫu PSC trong tủ an toàn sinh học

Ở điều kiện chuẩn, mỗi mẫu máu toàn phần đã được nhỏ ra hai thẻ tách huyết tương (Hình 3.1). Mẫu máu còn lại sau đó được ly tâm, chắt ra hai ống huyết tương; lưu trữ, bảo quản theo đúng quy trình đề cương nghiên cứu. Kết quả cho thấy 100% mẫu PSC đảm bảo chất lượng, thông tin về mã mẫu, ngày thu thập mẫu đầy đủ, đủ ba giọt máu trên mỗi thẻ, đủ hai thẻ, máu được nhỏ kín vòng tròn cắt sẵn, huyết tương khô thấm kín khoanh giấy phía dưới, hạt hút ẩm màu xanh chưa đổi màu. Tất cả các mẫu huyết tương đảm bảo chất lượng, thông tin về mã mẫu, ngày thu thập mẫu đầy đủ, mỗi mẫu có 2 ống huyết tương có thể tích khoảng 800 - 1200 µl, không tán huyết.

Từ thực nghiệm quy trình chuẩn bị mẫu PSC từ máu toàn phần chống đông bằng EDTA trong nghiên cứu này cho thấy, việc sử dụng pipetman để định lượng đủ lượng máu toàn phần 140 μ l và nhỏ vào các khoanh sẵn có của tấm thẻ tách huyết tương là kỹ thuật thông thường đối với kỹ thuật viên xét nghiệm y sinh học. Tương đồng với báo cáo của Carmona và cộng sự năm 2019, các cán bộ xét nghiệm tham gia phỏng vấn phần lớn đồng ý quy trình chuẩn bị mẫu PSC đơn giản, không phải học kỹ thuật mới và dễ thực hiện [31]. Trong công bố của Chimoyi và cộng sự năm 2024, nhóm nghiên cứu nhỏ mẫu PSC từ máu mao mạch (đầu ngón tay) sử dụng kim chích và ống mao dẫn. Phần lớn các cán bộ đồng ý quy trình dễ học, tuy nhiên, khi mới thực hiện còn gặp khó khăn để lấy đủ lượng mẫu cần thiết vào ống mao dẫn hoặc khi có bọt khí trong ống mao dẫn [34]. Nhìn chung, quy trình chuẩn bị mẫu PSC bằng máu toàn phần trong ống chống đông đơn giản, định lượng chính xác hơn từ máu đầu ngón tay. Cả hai cách lấy mẫu đều có thể nhân rộng và khả thi áp dụng tại các cơ sở y tế các tuyến để thực hiện thu thập mẫu bệnh phẩm cho người bệnh, sau khi cán bộ y tế được đào tạo. Tấm thẻ tách huyết tương có kích thước nhỏ gọn khoảng 10 x 8 cm, dễ dàng đóng gói trong phong bì để gửi qua đường bưu điện. Tuy nhiên, cũng có các điểm cần lưu ý như: lấy mẫu máu tĩnh mạch vào ống EDTA, không sử dụng loại ống lấy máu có thành phần chống đông khác, nhỏ đúng và đủ 140 μ l máu toàn phần vào mỗi khoanh, nếu lấy máu đầu ngón tay thì đảm bảo đủ lượng mẫu trong ống mao quản, phơi mẫu ở nhiệt độ thường trong khoảng 4 giờ, đảm bảo mẫu khô hoàn toàn trước khi đóng gói, đóng gói kín trong túi ziplock với gói hút ẩm. Các thông tin này cần được tập huấn cho cán bộ y tế và dán lưu đồ rút gọn ở khu vực lấy mẫu, chuẩn bị mẫu để đảm bảo tính chính xác của các xét nghiệm sinh học phân tử, đặc biệt là xét nghiệm định lượng sử dụng mẫu bệnh phẩm đó sau này.

3.2. NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SỬ DỤNG MẪU LƯU TRỮ TRONG THẺ TÁCH HUYẾT TƯƠNG ĐỂ XÉT NGHIỆM ĐO TẢI LƯỢNG HIV-1

3.2.1. Kết quả thực hiện xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 từ mẫu lưu trữ trong thẻ tách huyết tương và mẫu huyết tương

cobas® 4800**cobas HIV-1 Test Report**

Start of Run:	08-Nov-2022 11:48:54	MGP 2 lot/expiry:	H10655 / Mar-2023
System Name:	c4CZC917BC9J	Elution buffer 2 lot/expiry:	H14417 / May-2023
Instrument Serial No.:	x 480: 253D / z 480: 54321	Protease 2 lot/expiry:	J00472 / Aug-2023
Test Version:	1.2.0	RNA Quantitation standard lot/expiry:	H14005 / Jun-2023
Operator:	nihe	High positive control lot/expiry:	J10301 / Jul-2023
MWP ID:	ND0432908	Low positive control lot/expiry:	J10305 / Jul-2023
DWP 2 ID:	NG3800750	Negative control lot/expiry:	J10292 / Jan-2024
Wash buffer lot/expiry:	J07284 / Mar-2024	Master mix reagent 1 lot/expiry:	H10220 / May-2023
Lysis buffer 2 lot/expiry:	H09488 / Apr-2023	Master mix reagent 2 lot/expiry:	H14001 / May-2023

Run name 08-NOV-2022 11:48 HIV-1**Test status:** VALID**Controls**

Position	Sample ID	Control Type	Result	Flags	Accepted by
A01	0PHJ103016N064M	High Positive Control	1.72E+05 cp/mL		
B01	0PLJ103056N0CQJ	Low Positive Control	3.13E+02 cp/mL		
C01	0N1J102920O0LZI	Negative Control	Target Not Detected		

Specimens

Position	Sample ID	Specimen Type	Result 1	Flags	Accepted by
D01	2201004545	Plasma	5.01E+03 cp/mL		
E01	2201004546	Plasma	7.75E+02 cp/mL	X2	
F01	2201004547	Plasma	2.08E+04 cp/mL		
G01	2201004501	Plasma	Target Not Detected		
H01	2201011524	Plasma	Target Not Detected		
A02	2201004511	Plasma Separation Card	3.66E+04 cp/mL		
B02	2201004512	Plasma Separation Card	Target Not Detected		
C02	2201004513	Plasma Separation Card	< Titer min	X2	
D02	2201004514	Plasma Separation Card	< Titer min		
E02	2201004515	Plasma Separation Card	7.38E+02 cp/mL		
F02	2201004516	Plasma Separation Card	Target Not Detected		
G02	2201004517	Plasma Separation Card	2.33E+03 cp/mL		
H02	2201004518	Plasma Separation Card	Target Not Detected		
A03	2201004519	Plasma Separation Card	9.27E+02 cp/mL		
B03	2201004520	Plasma Separation Card	Target Not Detected	X2	

Hình 3.2. Bản đọc gốc kết quả xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 trên mẫu lưu trữ trong thẻ tách huyết tương và mẫu huyết tương từ hệ thống xét nghiệm.
Kết quả xét nghiệm đo tải lượng của 250 mẫu PSC và 250 mẫu huyết tương được trình bày trong phụ lục 2

Bảng 3.2. Dải tải lượng HIV-1 từ mẫu huyết tương và mẫu PSC

Dải tải lượng (N = 250)	Mẫu huyết tương		Mẫu PSC	
	n	%	n	%
< giới hạn phát hiện dưới*	56	22,4	98	39,2
< 1.000 bản sao/ml	67	26,8	11	4,4
1.000 bản sao/ml - 100.000 bản sao/ml	78	31,2	89	35,6
100.001 bản sao/ml - 10 ⁷ bản sao/ml**	49	19,6	52	20,8

* Giới hạn phát hiện dưới của kỹ thuật Roche Cobas HIV-1: đối với mẫu huyết tương là: 20 bản sao/ml; đối với mẫu PSC là 598 bản sao/ml

** Giới hạn phát hiện trên của kỹ thuật Roche Cobas HIV-1 đối với cả hai loại mẫu là 10.000.000 = 10⁷ bản sao/ml.

Xét nghiệm tải lượng virus sử dụng mẫu huyết tương được thực hiện trong vòng trung bình (IQR) 8 (2-17) ngày sau khi lấy mẫu. Thời gian lưu mẫu này trước xét nghiệm trong điều kiện -80°C vẫn đảm bảo mẫu huyết tương ổn định và cho kết quả tải lượng chính xác, theo khuyến cáo của Tổ chức Y tế thế giới trong tài liệu “Các cân nhắc kỹ thuật và vận hành để triển khai xét nghiệm đo tải lượng HIV-1” [13]. Kết quả bảng 3.2 cho thấy, tải lượng virus trong huyết tương thấp hơn giới hạn phát hiện dưới ở 56 người bệnh (chiếm 22,4%); được phát hiện nhưng <1.000 bản sao/ml ở 67 người bệnh (chiếm 26,8%); và ≥1.000 bản sao/ml ở 127 người bệnh còn lại (chiếm 50,8%). Xét nghiệm tải lượng virus trong huyết tương không thành công ở lần 1, phải làm lại lần 2 ở 5 mẫu trong số 250 mẫu (chiếm 2,0%) do lỗi “clot”, đầu côn hút gặp cục đông dây trong mẫu.

Tải lượng virus trên mẫu PSC được thực hiện trong vòng trung bình (IQR) 20 (14-29) ngày sau khi thu thập mẫu. Mẫu PSC sau khi khô được bảo quản ở nhiệt độ phòng trong khoảng 2 tuần (để mô phỏng nhiệt độ, thời gian vận chuyển mẫu nếu triển khai thực tế) trước khi được làm xét nghiệm luôn hoặc lưu ở tủ -80°C nếu chưa đủ mẻ chạy. Tải lượng virus trên mẫu PSC dưới giới hạn phát hiện dưới ở 98 người bệnh (chiếm 39,2%); được phát hiện nhưng <1.000 bản sao/ml ở 11 người bệnh (4,4%); và ≥1.000 bản sao/ml ở 141 người bệnh (56,4%) (Bảng 3.2). Xét nghiệm tải lượng virus trên mẫu PSC bị lỗi ở 10 trong số 250 mẫu (chiếm 4,0%), phải làm lại xét nghiệm. Lý do là lỗi “clot”, đầu côn hút mẫu gặp vật cản là tấm giấy khô nên không hút được đủ lượng mẫu.

Nguy cơ gặp lỗi đối với các loại mẫu khác nhau trong khi thực hiện xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 cần được xem xét, do mẫu bị lỗi cần chờ mẻ sau để làm lại xét nghiệm, kéo dài thời gian trả kết quả cho người bệnh. Tỷ lệ gặp lỗi, cần làm lại xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 cao hơn khi sử dụng mẫu PSC so với mẫu huyết tương. Số liệu trong nghiên cứu này cũng tương tự như công bố của Chimoyi và cộng sự năm 2024, tỉ lệ bị lỗi khi làm xét nghiệm đo tải lượng virus trên mẫu PSC cao hơn so với làm mẫu huyết tương, khoảng 8,8% (47/535) so với 2,7% (14/520) [34].

Từ kết quả tải lượng virus trên mẫu huyết tương cho thấy nghiên cứu này đã thu thập được cỡ mẫu có kết quả tải lượng virus đa dạng, dải tải lượng rộng, trải đủ từ giới hạn phát hiện dưới đến giới hạn phát hiện trên của kỹ thuật xét nghiệm.

3.2.2. Đánh giá độ nhạy, độ đặc hiệu của mẫu PSC so với mẫu huyết tương

Bảng 3.3. Độ nhạy, độ đặc hiệu trong xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 của mẫu lưu trữ trên thẻ tách huyết tương (PSC), so sánh với mẫu huyết tương, tại ngưỡng phân loại thất bại điều trị 1.000 bản sao/ml

	Số mẫu có TLVR trong Huyết tương ≥ 1.000 bản sao/ml	Số mẫu có TLVR trong Huyết tương < 1.000 bản sao/ml	Tổng
Số mẫu có TLVR trong PSC ≥ 1.000 bản sao/ml	126 (độ nhạy 99,2%)	15	141
Số mẫu có TLVR trong PSC < 1.000 bản sao/ml	1	108 (độ đặc hiệu 87,8%)	109
Tổng	127	123	250

Xét nghiệm tải lượng HIV-1 là kỹ thuật đo số lượng virus trong một đơn vị máu, là công cụ thường được sử dụng để theo dõi và đánh giá hiệu quả điều trị ARV. Tổ chức Y tế Thế giới khuyến cáo rằng ngưỡng tải lượng HIV-1 là 1.000 bản sao/ml là ngưỡng để phân loại thất bại điều trị virus học. Nếu một bệnh nhân đang điều trị ARV có tải lượng HIV-1 cao hơn 1.000 bản sao/ml trong hai lần xét nghiệm liên tiếp cách nhau ít nhất ba tháng, mặc dù

đã được hỗ trợ và tư vấn về tuân thủ điều trị, bệnh nhân đảm bảo tuân thủ điều trị tốt, thì điều này được coi là dấu hiệu của thất bại với phác đồ đang điều trị. Nói cách khác, ngưỡng 1.000 bản sao/ml được coi là ngưỡng quyết định lâm sàng, được sử dụng để xác định xem có cần thiết phải thay đổi phác đồ điều trị hay không, ví dụ như chuyển sang các loại thuốc ARV khác để tránh tình trạng kháng thuốc và duy trì hiệu quả điều trị của người bệnh [20].

Kết quả so sánh tải lượng virus giữa hai loại mẫu tại ngưỡng phân loại thất bại điều trị, được tổng hợp tại bảng 3.3 cho thấy, trong tổng số 250 cặp mẫu xét nghiệm, 234 cặp mẫu cho kết quả tương đồng giữa mẫu huyết tương và mẫu trên thẻ PSC. Như vậy, độ tương đồng trong phân loại thất bại điều trị đạt 93,6%. Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu trước đó, tỷ lệ cho kết quả tương đồng giữa mẫu PSC và mẫu huyết tương đạt từ 91,4% đến 98,2% [32-34].

Trong số 127 người bệnh có tải lượng virus trong mẫu huyết tương ≥ 1.000 bản sao/ml, tải lượng virus trong mẫu PSC cũng là ≥ 1.000 bản sao/ml ở 126 mẫu, tương ứng với độ nhạy là 99,2% (95,7-99,9), khoảng tin cậy (CI) 95%. Người bệnh duy nhất bị phân loại sai có tải lượng virus trong huyết tương là 1.410 bản sao/ml, trong khi kết quả trên PSC là < 599 bản sao/ml.

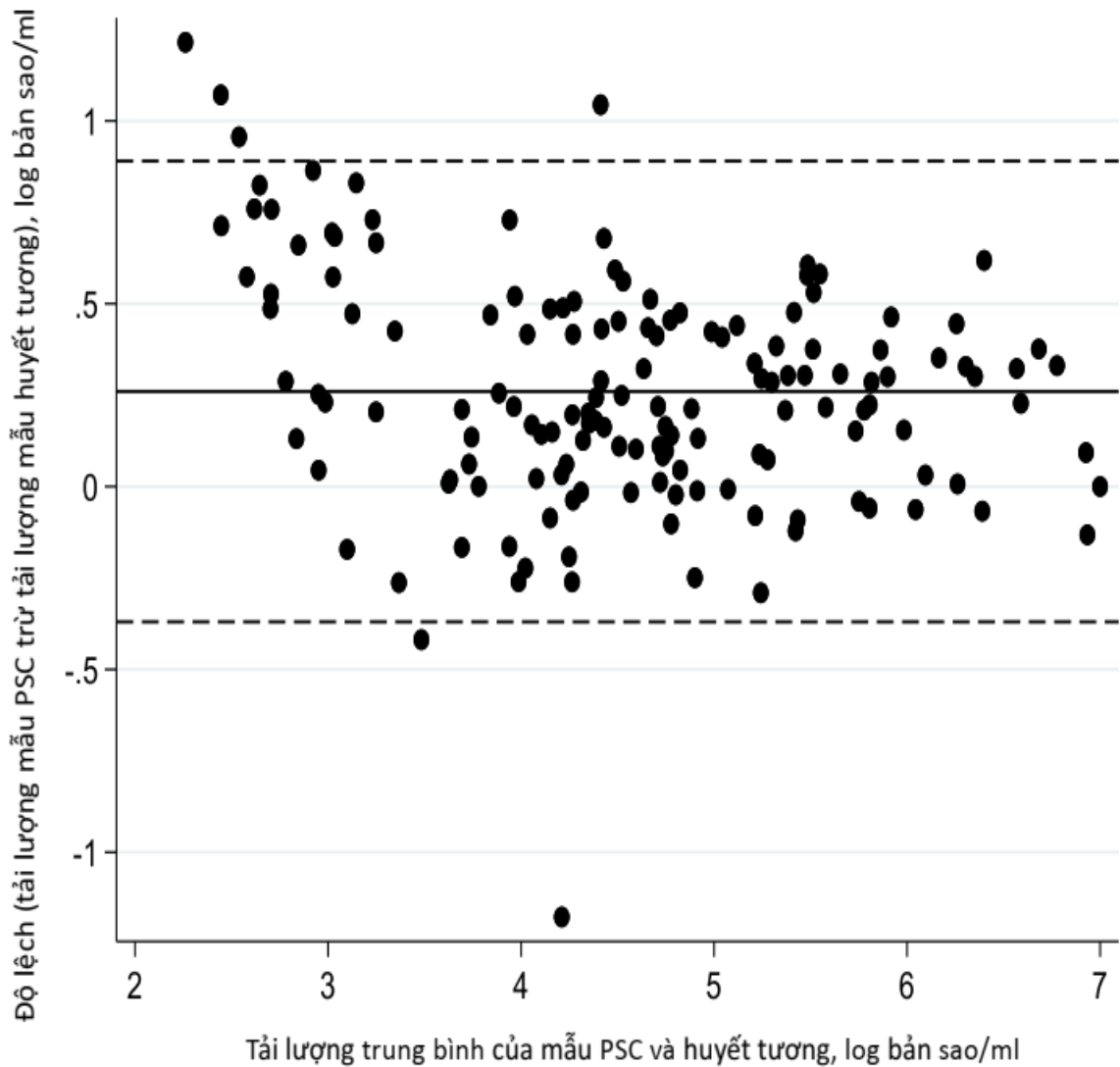
Trong số 123 người bệnh có tải lượng virus trong huyết tương < 1.000 bản sao/ml, tải lượng virus trong mẫu PSC cũng < 1.000 bản sao/ml ở 108 người bệnh, tương ứng với độ đặc hiệu là 87,8% (80,7-93,0), khoảng tin cậy (CI) 95%. Trong số 15 người bệnh bị phân loại sai, một người bệnh có tải lượng virus trong huyết tương < 20 bản sao/ml trong khi tải lượng virus PSC là 1070 bản sao/ml. Ở 14 người bệnh còn lại, tải lượng virus trong huyết tương dao động từ 115 bản sao/ml đến 813 bản sao/ml, trong khi tải lượng virus PSC dao động từ 1040 bản sao/ml đến 3940 bản sao/ml. Ở 14 người bệnh này, độ chênh lệch giá trị tải lượng trung bình giữa hai loại mẫu (IQR) là 0,7 log (0,6 log -0,8 log) bản sao/ml, trong đó có ba người bệnh có độ chênh lệch $< 0,5$ log bản sao/ml. Nếu coi ba người bệnh này được phân loại chính xác sử dụng mẫu PSC, độ đặc hiệu tăng lên là 90,2% (83,6-94,9) khoảng tin cậy (CI) 95%.

Độ nhạy 99,2% của kỹ thuật xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 trên mẫu PSC trong nghiên cứu đánh giá này là rất tốt, tương tự hoặc cao hơn các nghiên cứu trước đó (từ 86,4% đến 99,8%) [31-34]. Độ đặc hiệu 87,8% của

nghiên cứu này, thấp hơn so với các báo cáo trước đó (từ 94,6% đến 99,3%) [31-34]. Trong số các đánh giá về mẫu PSC trong xét nghiệm đo tải lượng HIV-1, đây là nghiên cứu đầu tiên đánh giá kỹ thuật xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 sử dụng mẫu PSC trên hệ thống Roche Cobas 4800, 3 nghiên cứu khác thực hiện trên máy Roche CAP/CTM, 1 nghiên cứu thực hiện máy Roche Cobas 8800 [31-34]. Các hệ thống máy khác nhau phân tích mẫu sử dụng các bộ sinh phẩm và thể tích dung dịch đệm hoàn nguyên mẫu khô khác nhau. Giới hạn phát hiện, dải tuyến tính cũng có sự khác biệt giữa các hệ thống xét nghiệm. Vì vậy, rất có thể việc thực hiện đánh giá tải lượng virus trong nghiên cứu này bị ảnh hưởng bởi hệ thống máy.

Nếu xét khả năng sử dụng mẫu PSC trong theo dõi cận lâm sàng, 99,2% người bệnh có tải lượng virus trên 1.000 bản sao/ml được phân loại đúng, mẫu PSC được đánh giá là có khả năng sử dụng tốt trong việc xác định người bệnh có thất bại trong điều trị virus học. Với 12,2% người bệnh có tải lượng virus ở mức từ dưới 20 bản sao/ml đến 813 bản sao/ml (tải lượng HIV-1 trong máu ở mức trung bình thấp), bị phân loại sai thành trên 1.000 bản sao/ml khi sử dụng mẫu PSC, sẽ chưa có ảnh hưởng lớn về quyết định điều trị vì người bệnh đang điều trị vẫn phải duy trì thuốc. Trong trường hợp này người bệnh sẽ được bác sỹ tư vấn, hỗ trợ tăng cường tuân thủ điều trị và thực hiện lại xét nghiệm tải lượng virus sau 3 tháng, theo hướng dẫn chăm sóc điều trị HIV quốc gia. Tuy nhiên, các trường hợp phát hiện sai này có thể gây ảnh hưởng tâm lý cho người bệnh, gây nghi ngờ về tuân thủ điều trị, hiệu quả điều trị, cũng như xác định sai về trường hợp thất bại điều trị nếu là xét nghiệm lần hai.

3.2.3. Đánh giá độ tương đồng giữa kết quả tải lượng trên cặp mẫu huyết tương và mẫu PSC có tải lượng virus phát hiện



Hình 3.3. Đồ thị Bland-Altman về độ tương đồng giữa giá trị tải lượng HIV đo được từ mẫu huyết tương và PSC trong 150 cặp mẫu
 Đường kẻ liền: độ chênh lệch trung bình (+0.26 log), đường kẻ đứt: 95% khoảng tin cậy

Theo tính toán ở 150 người bệnh có tải lượng virus phát hiện được trong cả hai loại mẫu, độ chênh lệch trung bình là +0,26 log bản sao/ml, các giá trị trong khoảng từ -1,17 log đến 1,21 log bản sao/ml. Trong đó giá trị tải lượng đo được từ mẫu PSC cao hơn so với đo trong huyết tương ở 122 (81,3%) trường hợp. Độ chênh lệch lớn hơn 0,5 log bản sao/ml trong 31 trường hợp (20,7%). Trực quan từ đồ thị Bland-Altman, Hình 3.3, cũng cho thấy xu hướng nồng độ PSC cao hơn so với trong huyết tương, nhưng độ chênh lệch vẫn ổn định bất kể mức tải lượng virus nào.

3.2.4. Đánh giá độ tái lập của mẫu PSC trong xét nghiệm đo tải lượng HIV-1

Bảng 3.4. Độ tái lập của kỹ thuật xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 trên mẫu PSC trên 23 mẫu được chọn ngẫu nhiên

Giá trị TLVR trên mẫu PSC Lần chạy 1 (bản sao/ml)	Giá trị TLVR trên mẫu PSC Lần chạy 2 (bản sao/ml)	Độ chênh lệch (log bản sao/ml)
<599	<599	-
796	<599	-
2 240	1 120	-0.30
6 040	4 740	-0.11
7 190	11 200	+0.19
8 140	9 950	+0.03
12 300	13 300	+0.02
17 400	14 100	-0.09
17 800	19 000	+0.03
24 200	22 600	-0.03
44 200	33 200	-0.12
53 200	64 000	+0.08
59 700	91 500	+0.19
63 100	55 700	-0.05
149 000	150 000	+0.01
218 000	241 000	+0.04
230 000	256 000	+0.05
247 000	204 000	-0.08
342 000	198 000	-0.24
597 000	893 000	+0.17
1 290 000	918 000	-0.15
3 180 000	2 450 000	-0.11
9 400 000	7 800 000	-0.08

Nghiên cứu chọn lọc ngẫu nhiên 23 mẫu PSC để thực hiện đo tải lượng HIV-1 lần hai. Kết quả xét nghiệm ở hai lần, độ chênh lệch được liệt kê trong bảng 3.4 cho thấy 2/23 trường hợp, độ chênh lệch không được tính toán do có một lần xét nghiệm có giá trị tải lượng không phát hiện. Độ chênh lệch trung

vị (IQR) là $-0.01 \log$ (IQR, $-0.11 \log$ đến $+0.08 \log$) và trong khoảng từ $-0.30 \log$ đến $+0.19 \log$ bản sao/ml. Độ chênh lệch giữa hai lần xét nghiệm rất tốt, tất cả các mẫu khảo sát đều thấp hơn $\pm 0.5 \log$ bản sao/ml. Kết quả này cho thấy kết quả xét nghiệm đo tải lượng virus từ mẫu PSC có độ ổn định cao.

3.2.5. Đánh giá ảnh hưởng của việc lưu mẫu PSC qua âm sâu trước khi thực hiện xét nghiệm đo tải lượng HIV-1

Bảng 3.5. Độ nhạy, độ đặc hiệu của kỹ thuật đo tải lượng HIV-1 so sánh giữa mẫu PSC chưa lưu âm sâu và mẫu PSC đã lưu tủ âm 80°C .

Mẫu PSC chưa lưu qua âm sâu trước khi xét nghiệm

	TLVR trên Huyết tương ≥ 1.000 bản sao/ml	TLVR trên Huyết tương < 1.000 bản sao/ml	Tổng
TLVR trên PSC ≥ 1.000 bản sao/ml	59 (100%)	6	65
TLVR trên PSC < 1.000 bản sao/ml	0	47 (88,7%)	47
Tổng	59	53	112

Mẫu PSC đã lưu âm sâu trước khi xét nghiệm

	TLVR trên Huyết tương ≥ 1.000 bản sao/ml	TLVR trên Huyết tương < 1.000 bản sao/ml	Tổng
TLVR trên PSC ≥ 1.000 bản sao/ml	67 (98,5%)	9	76
TLVR trên PSC < 1.000 bản sao/ml	1	61 (87,1%)	62
Tổng	68	70	138

Tất cả các mẫu PSC trong nghiên cứu này đều được để ở nhiệt độ phòng trong vòng khoảng 2 tuần trước khi xét nghiệm để mô phỏng nhiệt độ, thời gian cần thiết khi vận chuyển loại mẫu này nếu ứng dụng trong xét nghiệm đo tải lượng trên thực địa. Tuy nhiên, một số lượng mẫu PSC còn được bảo quản ở tủ -80°C trước khi xét nghiệm tải lượng virus do cần chờ đủ

mẻ. Do đó, để điều tra xem liệu việc đông lạnh mẫu PSC có ảnh hưởng đến giá trị kết quả đo tải lượng HIV-1 hay không, độ nhạy và độ đặc hiệu đã được tính toán, so sánh trên hai nhóm mẫu. Kết quả trên bảng 3.5 cho thấy nhóm mẫu PSC không được đông lạnh (112 mẫu) trước khi xét nghiệm tải lượng virus, độ nhạy là 100% (94,0-100) và độ đặc hiệu là 88,7% (77,0-95,7), khoảng tin cậy 95%. Đối với nhóm mẫu PSC đã được đông lạnh (138 mẫu) trước khi xét nghiệm tải lượng virus, độ nhạy là 98,5% (92,1-99,9) và độ đặc hiệu là 87,1% (77,0-93,9), khoảng tin cậy 95%. So sánh hai điều kiện này trong trong thử nghiệm T test, độ nhạy và độ đặc hiệu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, $p=0,99$ và $p=0,80$ ($Pvalue >0.05$).

Đánh giá này cho thấy, việc đông băng -80°C , tan băng mẫu lưu trữ trên thẻ PSC một lần trước khi làm xét nghiệm không có ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê tới độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm tải lượng HIV-1.

3.3. NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG SỬ DỤNG MẪU PSC TRONG XÉT NGHIỆM XÁC ĐỊNH ĐỘT BIẾN KHÁNG THUỐC HIV-1

3.3.1. Lựa chọn cặp mẫu để xác định đột biến kháng thuốc HIV-1

Bảng 3.6. Một số đặc điểm của 20 cặp mẫu PSC - huyết tương sử dụng cho xét nghiệm gen phát hiện đột biến kháng thuốc HIV-1

Đặc điểm (N=20)	Số liệu
Tuổi của người bệnh (năm), <i>Trung vị (IQR)</i>	37,5 (29 - 41)
Nam giới, <i>n(%)</i>	14 (70,0)
Thời gian điều trị ARV (tháng), <i>Trung vị (IQR)</i>	44,4 (10,5 – 49,5)
Thời gian lưu mẫu trong tủ âm cho đến khi thực hiện xét nghiệm gen (tháng), <i>Trung vị (IQR)</i>	
Huyết tương	15,3 (13,5 – 15,6)
PSC	14,2 (14,7 – 16,8)
Nhiệt độ bảo quản mẫu PSC và huyết tương	- 80°C ±3°C
Tải lượng virus (bản sao/ml), <i>trung vị (IQR)</i>	
Huyết tương	25.118 (5.754-218.776)
PSC	58.884(10.715 - 389.045)

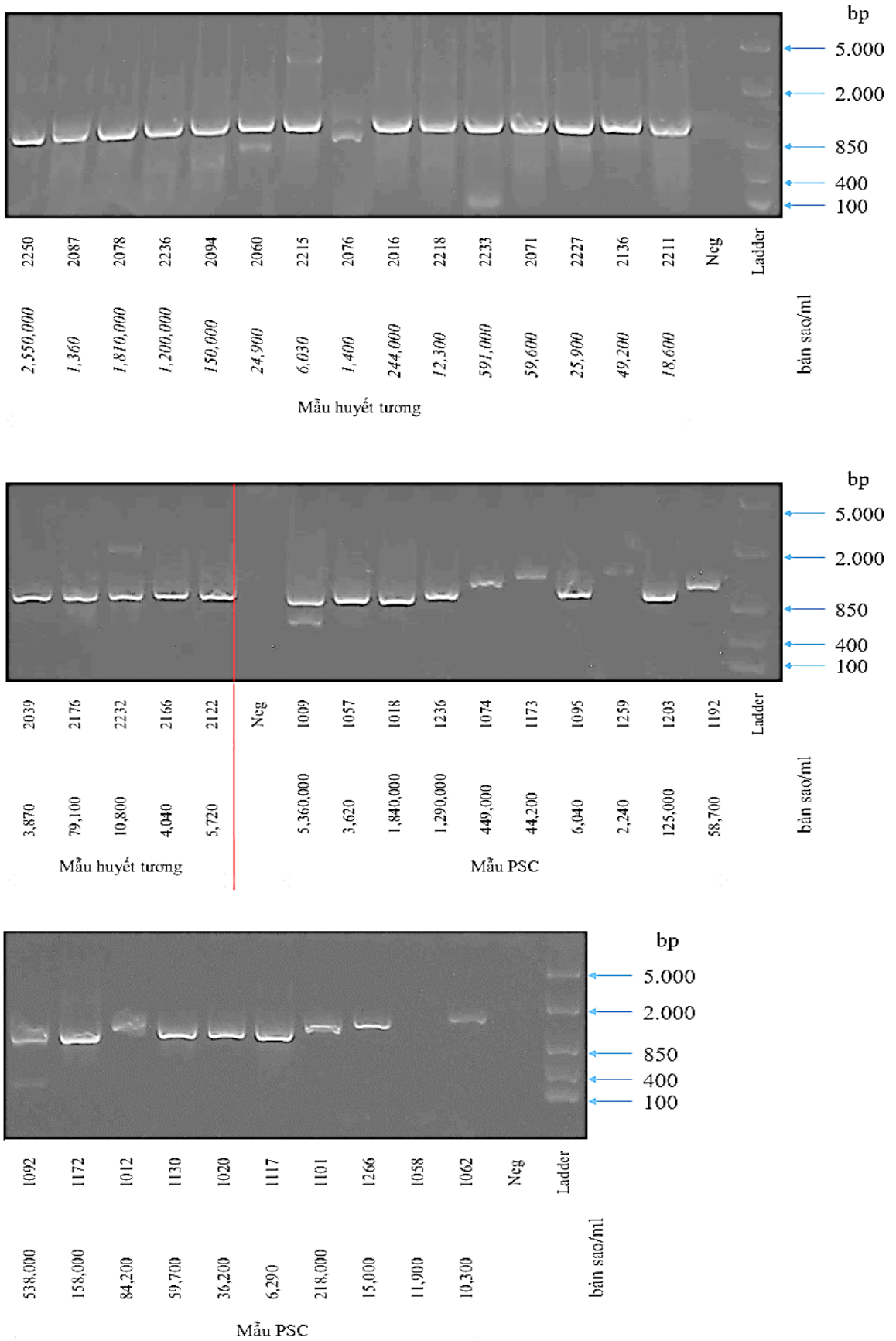
Đột biến kháng thuốc thường, có thể được tìm thấy ở những người bệnh có biểu hiện thất bại điều trị virus học. Vì vậy, trong số 250 cặp mẫu, nhóm nghiên cứu đã lựa chọn được 20 cặp mẫu (mẫu huyết tương và mẫu PSC) đáp ứng tiêu chuẩn có khả năng cao mang đột biến kháng thuốc gồm: (1) Cặp mẫu từ người bệnh có thời gian điều trị ARV từ 6 tháng trở lên; (2) cặp mẫu PSC-huyết tương đều có kết quả tải lượng HIV-1 ≥ 1.000 bản sao/ml.

Một số đặc điểm của người bệnh và mẫu bệnh phẩm của 20 cặp mẫu được mô tả trong bảng 3.6. Các mẫu được lấy từ người bệnh khoảng 37,5 tuổi. Phần lớn là nam giới, chiếm 14/20 (70%). Các người bệnh điều trị ARV trong vòng khoảng 44,4 tháng, khoảng bán phân vị (10,5-49,5) tháng. Mẫu huyết tương được bảo quản ở nhiệt độ âm sâu - 80°C trong khoảng 15,3 tháng. Thời gian bảo quản mẫu PSC trong nhiệt độ âm sâu - 80°C là khoảng 14,2 tháng. Tải lượng virus trung bình của các mẫu huyết tương là 25.118 (5.754 - 218.776) bản sao/ml và mẫu PSC là 58.884 (10.715 - 389.045) bản sao/ml.

3.3.2. Tỷ lệ khuếch đại thành công đoạn gen PR-RT (thuộc gen *Pol*) của HIV-1

Bảng 3.7. Tỷ lệ khuếch đại thành công đoạn gen PR-RT (thuộc gen *Pol*) của HIV-1, so sánh giữa mẫu PSC và huyết tương theo các khoảng tải lượng virus

Kết quả tải lượng	Mẫu huyết tương (N=20)				Mẫu PSC (N=20)				
	Số mẫu thực hiện XN	Số mẫu khuếch đại thành công	Thành công từ lần 1 (thể tích RNA = 10 μ l)	Thành công từ lần 2 (thể tích RNA = 20 μ l)	Số mẫu thực hiện XN	Số mẫu khuếch đại thành công	Thành công từ lần 1 (thể tích RNA = 10 μ l)	Thành công từ lần 2 (thể tích RNA = 20 μ l)	Thành công khi tách chiết lại (thể tích RNA = 20 μ l)
1.000 – 5.000 bản sao/ml	4	4	3	1	2	2	0	2	
5.001- 10.000 bản sao/ml	2	2	2		2	2	1	1	
10.001 - 100.000 bản sao/ml	8	8	8		8	7	5	1	1
101.000 - >10 ⁷ bản sao/ml	6	6	6		8	8	8		



Hình 3.4. Hình ảnh điện di kiểm tra sản phẩm khuếch đại đoạn gen PR-RT từ 20 mẫu huyết tương và 20 mẫu PSC.
Neg: Mẫu chứng âm; Ladder: DNA chuẩn (Thermo Fisher)

Nghiên cứu đã thực hiện khuếch đại thành công đoạn gen PR-RT (thuộc gen *Pol*) của HIV-1 trên 19/20 mẫu PSC, tỉ lệ khuếch đại thành công của mẫu PSC là 95%. Đối với mẫu huyết tương, đoạn gen này được khuếch đại thành công ở cả 20 mẫu đạt tỉ lệ 100% (Hình 3.4). Tỉ lệ khuếch đại thành công trên mẫu PSC thu được từ nghiên cứu này cao tương đồng với các nghiên cứu trước đó thực hiện trên mẫu giọt máu khô (DBS) [21, 22, 25, 35] và cao hơn nhiều so với sử dụng mẫu huyết tương khô (DPS). Tỉ lệ khuếch đại thành công trong xét nghiệm giải trình tự gen sử dụng DPS được báo cáo thấp khoảng 66% và giảm mạnh sau từ 1 - 3 tháng lưu mẫu ở cả nhiệt độ âm sâu và nhiệt độ thường [24, 26, 27].

Kết quả (Bảng 3.7) cho thấy, đối với mẫu PSC, ở lần khuếch đại đầu tiên với thể tích RNA đầu vào cho phản ứng RT-PCR là 10 μ l, 8 trên 8 mẫu (100%) có tải lượng virus lớn hơn 100.000 bản sao/ml có thể được khuếch đại. Tỉ lệ khuếch đại thành công ở lần đầu tiên giảm xuống 5/7 mẫu (71,4%) đối với các mẫu có tải lượng từ 10.001 đến 100.000 bản sao/ml, 1/2 (50%) đối với các mẫu có tải lượng từ 5.001 to 10.000 bản sao/ml; 0/2 (0%) đối với các mẫu có tải lượng từ 1.000 to 5.000 bản sao/ml. Tại lần khuếch đại thứ 2, với thể tích RNA đầu vào ở phản ứng RT-PCR tăng lên 20 μ l, thực hiện cho các mẫu chưa khuếch đại được ở lần 1, 4/6 mẫu đã được khuếch đại thành công. Một mẫu PSC còn lại đã được khuếch đại thành công sau khi được tách chiết lại, khuếch đại với thể tích RNA đầu vào ở phản ứng RT-PCR là 20 μ l. Có duy nhất một mẫu chưa khuếch đại được, có tải lượng HIV-1 là 11.400 bản sao/ml, tuy nhiên, nhóm nghiên cứu chưa có cơ hội làm lại mẫu này từ bước tách chiết, do trong quá trình tách chiết lại bị lỗi máy và không còn mẫu để thực hiện lại.

Đối với mẫu huyết tương, phần lớn tất cả các mẫu (19/20) đã được khuếch đại thành công từ lần xét nghiệm đầu tiên với thể tích RNA đầu vào ở phản ứng RT-PCR là 10 μ l. Có một mẫu với kết quả tải lượng từ 1.000 đến 5.000 bản sao/ml cần làm lại lần hai, và khuếch đại được khi thể tích RNA đầu vào ở phản ứng RT-PCR là 20 μ l.

3.3.3. So sánh độ tương đồng nucleotide, subtype và đặc điểm đột biến liên quan đến kháng thuốc của HIV-1 giữa hai loại mẫu

Bảng 3.8. So sánh độ tương đồng nucleotide, subtype và đặc điểm đột biến liên quan đến kháng thuốc của HIV-1 giữa 19 cặp mẫu PSC - huyết tương

Người bệnh	Mã trình tự	Loại mẫu	Phân nhóm (Subtype)	Tỉ lệ tương đồng nucleotide	Đột biến quan trọng nhóm PI	Đột biến bổ sung nhóm PI	Đột biến quan trọng nhóm NRTI	Đột biến quan trọng nhóm NNRTI
1	1092p	PSC	CRF01_AE	99.1	-	-	-	V106I
1	2233P	HT	CRF01_AE		-	-	-	V106I
2	1117p	PSC	CRF01_AE	99.4	-	-	-	-
2	2039P	HT	CRF01_AE		-	-	-	-
3	1172p	PSC	CRF01_AE	97.3	-	-	-	-
3	2071P	HT	CRF01_AE		-	-	-	-
4	1266P	PSC	CRF01_AE	99.0	-	-	K65R,S68G,V75M, M184V	A98G,K103N,Y181C, G190A
4	2232p	HT	CRF01_AE		-	-	K65R,S68G,V75M,M18 4V	A98G,K103N,Y181C, G190A
5	1020p	PSC	CRF01_AE	97.7	-	-	-	K103N,K238T
5	2211P	HT	CRF01_AE		-	-	-	K103KN,K238RT
6	1192p	PSC	CRF01_AE	98.8	-	-	M184V	A98AG,K103N,

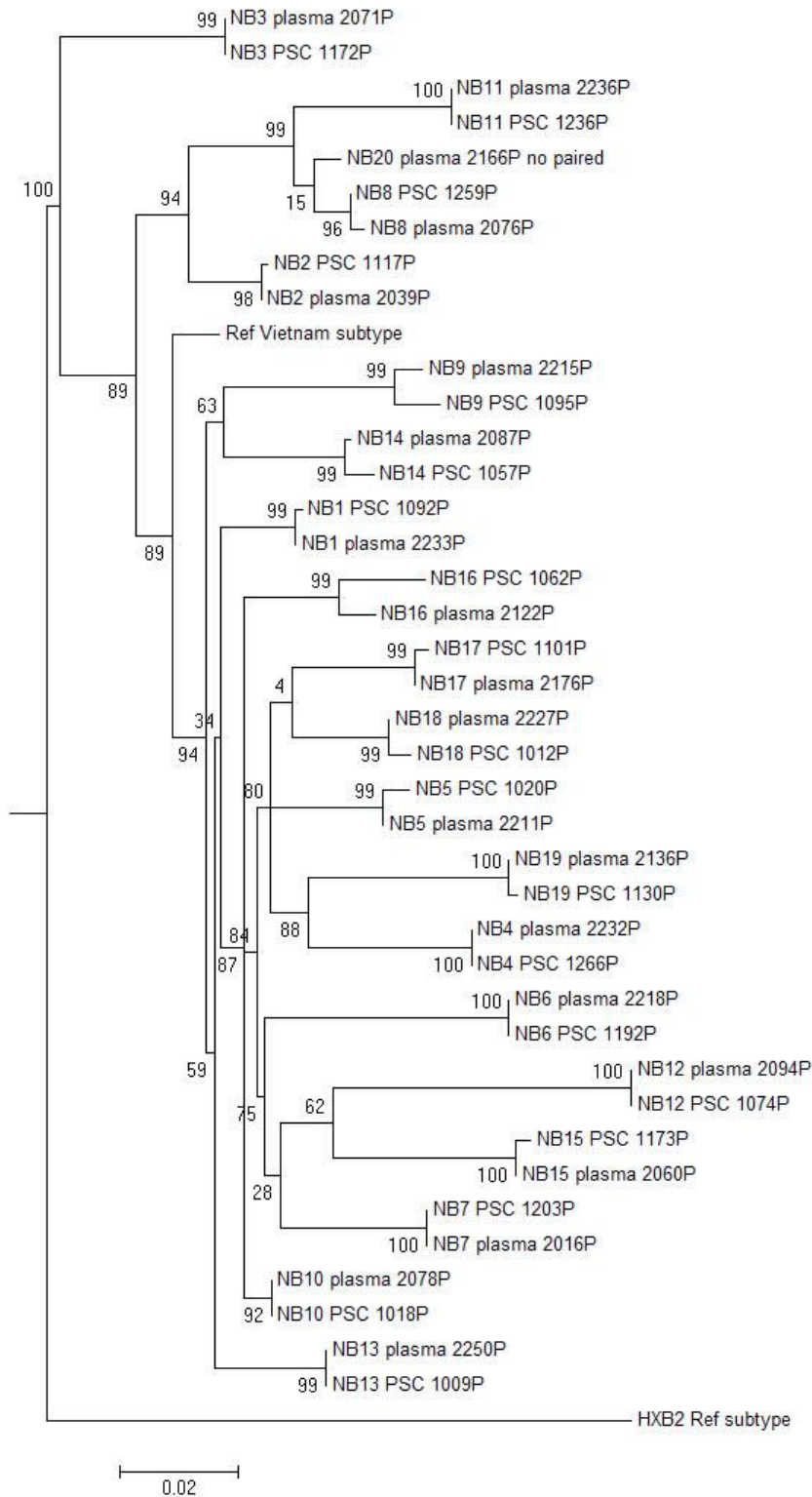
								P225H
6	2218P	HT	CRF01_AE		-	-	M184V	A98AG,K103N, P225H
7	1203p	PSC	CRF01_AE	98.7	-	-	-	K103N
7	2016p	HT	CRF01_AE		-	-	-	K103N
8	1259P	PSC	CRF01_AE	99.7	-	-	M184V	-
8	2076p	HT	CRF01_AE		-	-	M184V	-
9	1095p	PSC	CRF01_AE	98.1	-	-	-	-
9	2215p	HT	CRF01_AE		-	-	-	-
10	1018p	PSC	CRF01_AE	99.8	-	-	-	-
10	2078p	HT	CRF01_AE		-	-	-	-
11	1236p	PSC	CRF01_AE	99.5	-	-	K70KQ,M184I	K103N,K238T
11	2236p	HT	CRF01_AE		-	-	K70KQ,M184I	K103N,K238T
12	1074p	PSC	CRF01_AE	97.9	-	-	K65KR,S68G,M184MI	K103N,Y188C, M230ML
12	2094p	HT	CRF01_AE		-	-	K65R,S68G,M184MI	K103N,Y188C, M230ML
13	1009p	PSC	CRF01_AE	99.4	-	-	-	-
13	2250p	HT	CRF01_AE		-	-	-	-
14	1057p	PSC	CRF01_AE	98.3	M46L	-	-	-
14	2087p	HT	CRF01_AE		M46L	-	-	-
15	1173p	PSC	CRF01_AE	98.0	-	-	V75M	- *

15	2060p	HT	CRF01_AE		-	-	V75M	K103N
16	1062P	PSC	CRF01_AE	95.9	-	-	-	-
16	2122p	HT	CRF01_AE		-	-	-	-
17	1101p	PSC	CRF01_AE	97.8	-	-	-	K103N
17	2176P	HT	CRF01_AE		-	-	-	K103KN
18	1012p	PSC	CRF01_AE	99.1	-	-	-	-
18	2227P	HT	CRF01_AE		-	-	-	-
19	1130p	PSC	CRF01_AE	98.7	-	-	K65R,T69del,V75M	V106M,V179D, Y181C
19	2136P	HT	CRF01_AE		-	-	K65KR,T69del,V75M	V106VM,V179VD,Y1 81YC
Tỉ lệ tương đồng nucleotide giữa huyết tương và PSC trung bình				98.5				

Quy tắc ký hiệu vị trí đột biến: Axit amin của chủng hoang dại_Vị trí codon_Axit amin thay thế

Ký hiệu “-”: Không phát hiện đột biến

Các vị trí đột biến có sự khác biệt giữa mẫu PSC và huyết tương được tô màu xám đậm



Hình 3.5. Mối quan hệ di truyền của 19 mẫu PSC và 20 mẫu HT đã giải trình tự trong nghiên cứu

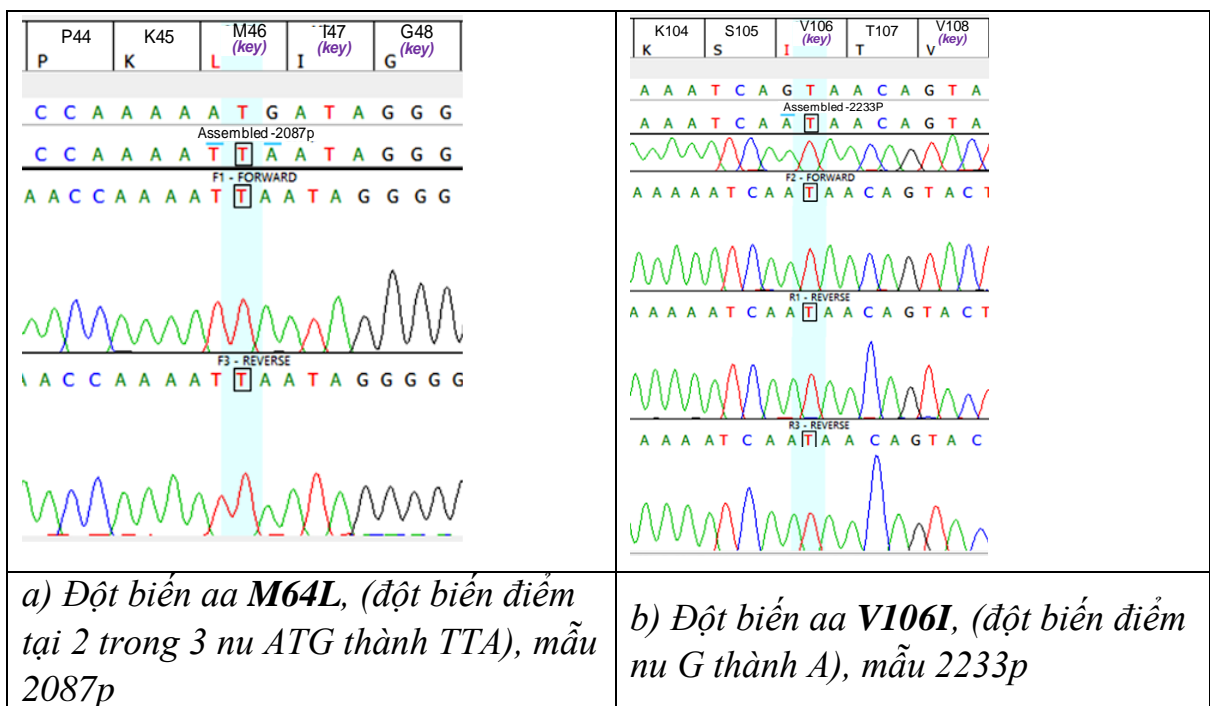
Cây phả hệ được xây dựng bằng phương pháp Neighbor-Joining. Số lần lặp lại bootstrap là 1.000

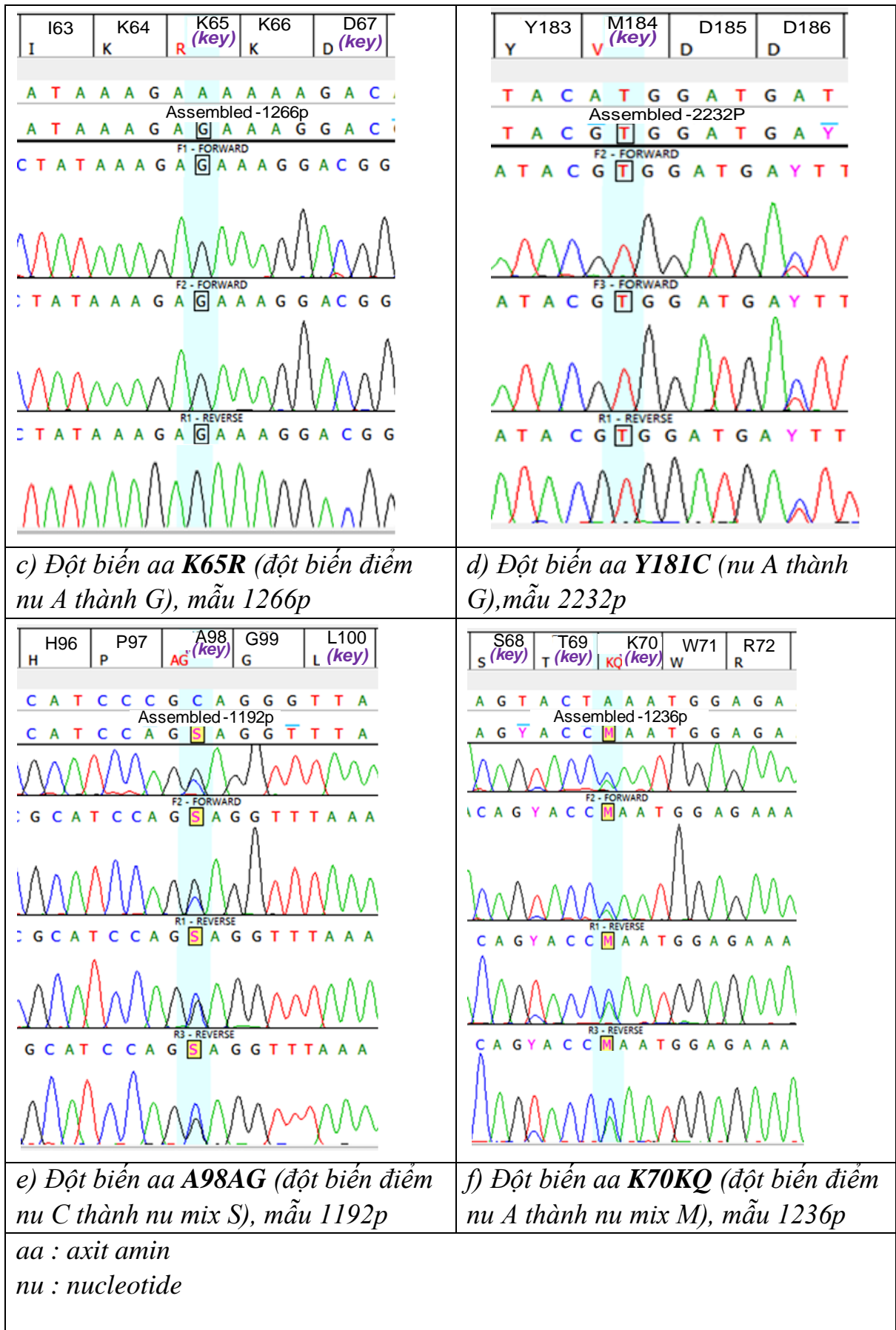
Trình tự tham chiếu: Vietnam subtype CRF01_AE. Mã NCBI: FJ185235.1

Trình tự tham chiếu: Ref HXB2 subtype B. Mã NCBI: K03455.1

Mẫu được ký hiệu theo nguyên tắc: Mã người bệnh_loại mẫu_mã mẫu giải trình tự

Dựa trên bảng 3.8, kết quả giải trình tự đoạn gen PR-RT của HIV-1 từ hai loại mẫu PSC và huyết tương của cùng một bệnh nhân cho thấy mức độ tương đồng nucleotide cao, trung bình đạt 98,5%, giao động trong khoảng từ 95,9% đến 99,5%. Kết quả này cao tương tự với kết quả của các nghiên cứu trước đó đánh giá mẫu máu khô DBS, mẫu huyết tương khô DPS trong xét nghiệm giải trình tự gen kháng thuốc HIV-1 [21-23, 25, 27]. 15/19 cặp mẫu so sánh, tương đương 78%, có tỉ lệ tương đồng nucleotide lớn hơn 98%. Cây phả hệ trong Hình 3.5 tiếp tục minh họa mức độ tương đồng rất cao giữa mẫu PSC và mẫu huyết tương tương ứng từ cùng một bệnh nhân. Các mẫu PSC-huyết tương tương đồng được sắp xếp thành từng cặp trên cây phả hệ, với giá trị bootstrap tại các nút này đều đạt từ 92 trở lên, cho thấy mức độ tin cậy cao tại những vị trí này. Kết quả từ cây phả hệ cũng cho thấy, phần lớn (15 mẫu trong số 20 mẫu) có mối quan hệ di truyền gần gũi với gen từ chủng chuẩn của Việt Nam và có 5 mẫu có mối quan hệ di truyền phân thành một nhánh khác so với gen từ chủng chuẩn. Trong số 5 mẫu này, mẫu NB3 có kiểu gen khác xa nhất. Xét trong nhóm 15 mẫu có quan hệ di truyền gần với gen từ chủng chuẩn Việt Nam, chúng tôi cũng nhận thấy nhóm gen này của các chủng virus hiện nay đã tiến hóa khá đa dạng, tạo ra nhiều nhánh phụ có khoảng cách di truyền xa so với nhóm gốc. Điều đó nói lên rằng virus HIV đang lưu hành tại Việt Nam đang có những biến đổi mạnh mẽ trên các gen liên quan đến thuốc ARV. Do vậy, việc giám sát kháng thuốc ở bệnh nhân HIV là hết sức cần thiết.





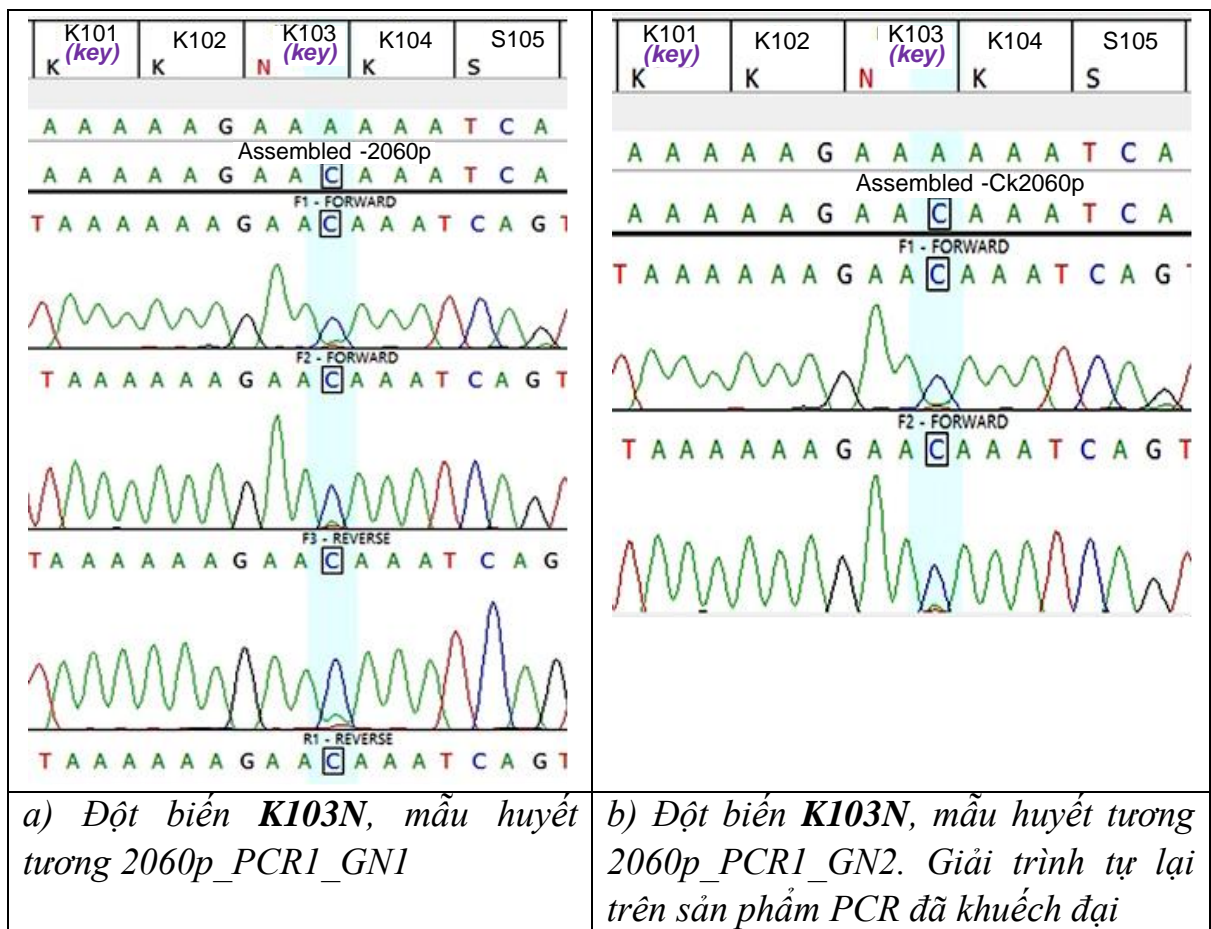
Hình 3.6. Hình ảnh chromatogram một số vị trí đột biến gen quan trọng liên quan đến tính kháng thuốc của HIV phát hiện được trong nghiên cứu

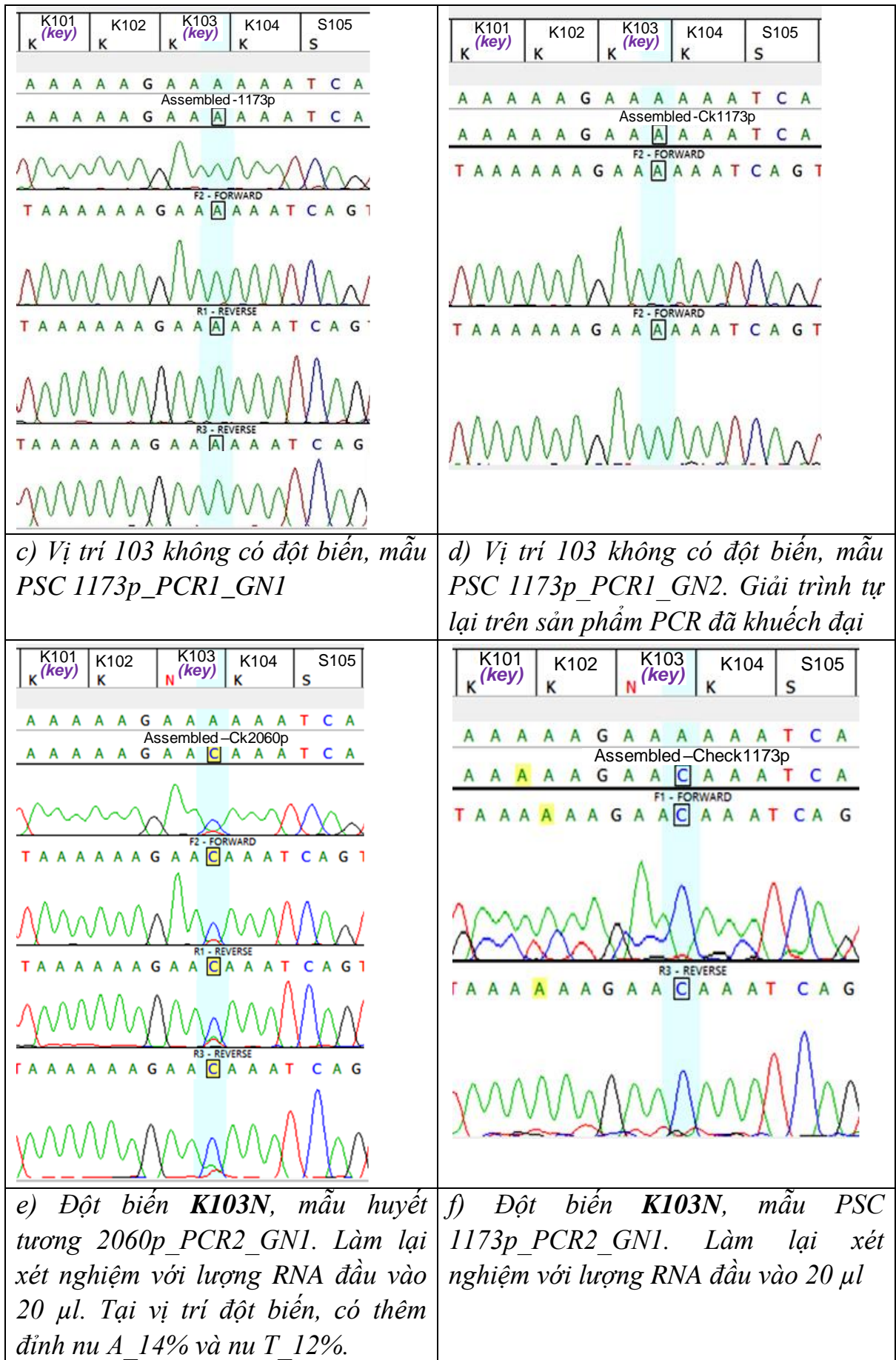
Từ bảng 3.8 có thể thấy, các trình tự đoạn gen PR-RT giải được, sau khi phân tích trên ngân hàng dữ liệu HIV Stanford đều cho kết quả thống nhất 100% về subtype giữa hai loại mẫu PSC và huyết tương. Tất cả 19 cặp mẫu được giải trình tự đều thuộc subtype CRF01_AE. Trong số các subtype HIV đang lưu hành tại Việt Nam, subtype CRF01_AE chiếm tỉ lệ lớn nhất, đặc biệt phổ biến trong nhóm người bệnh tiêm chích ma túy.

Các đặc điểm đột biến quan trọng liên quan đến kháng thuốc HIV-1 trên cả ba nhóm thuốc PI, NRTI, và NNRTI đã được phân tích kỹ lưỡng từ các trình tự thu thập được, thể hiện trên bảng 3.8. Kết quả xác định đột biến quan trọng liên quan đến kháng thuốc giống hệt nhau giữa mẫu PSC và mẫu huyết tương ở 14 trên 19 cặp mẫu, chiếm tỉ lệ 73,7%. Trong số tổng cộng 37 điểm đột biến quan trọng phát hiện được từ mẫu huyết tương (**K238RT** được đếm hai lần là **K238R** và **K238T**), 35/37 điểm đột biến (tương đương 94.6%) được phát hiện đúng trên mẫu PSC tương ứng.

Phân tích cụ thể, trong số năm cặp mẫu có ít nhất một điểm có khác biệt là cặp mẫu: 5, 12, 15, 17, 19, bốn cặp mẫu sau có vị trí đột biến đã được xác định đúng trên mẫu PSC: cặp mẫu 5 (PSC: **K103N**, **K238T** so với huyết tương: **K103KN**, **K238RT**), cặp mẫu 12 (PSC: **K65KR** so với huyết tương: **K65R**), cặp mẫu 17 (PSC: **K103N** so với huyết tương: **K103KN**), cặp mẫu 19 (PSC: **K65R**, **V106M**, **V179D**, **Y181C** so với huyết tương: **K65KR**, **V106VM**, **V179VD**, **Y181YC**). Sự khác biệt nhỏ chủ yếu liên quan đến sự hiện diện hoặc không hiện diện của bazơ nitơ hỗn hợp (mixture acid amid), là kết quả của nucleotide hỗn hợp xuất hiện tại các vị trí đột biến này. Trong cơ thể vật chủ, HIV bao gồm một quần thể các "quasispecies" - là các biến thể di truyền khác nhau, có mối liên hệ di truyền chặt chẽ, cùng tồn tại và cạnh tranh với nhau. Các biến thể di truyền này có nguyên nhân do người bệnh bị nhiễm HIV từ nhiều hơn một nguồn lây hoặc do các biến đổi, thích nghi trong quá trình nhân lên của virus dưới áp lực chọn lọc từ môi trường miễn dịch của cơ thể vật chủ và thuốc ARV. Từ trình tự gen thu được, có thể quan sát rõ hiện tượng này, tại một vị trí, có hai hoặc nhiều hơn hai đỉnh nucleotide khác nhau, ví dụ đột biến **A98AG** hoặc **K70KQ** tại Hình 3.6.e và f. Tại các vị trí: **K103KN**, **K65KR**, **V106VM**, **V179VD**, **Y181YC** có sự hiện diện song song biến thể có kiểu gen đột biến và vẫn còn biến thể có kiểu gen như chủng hoang dại. Vị trí **K238RT** tồn tại song song hai biến thể đột biến từ K thành R hoặc T. Khi tính tổng số các vị trí khác biệt trong 4 cặp mẫu 5, 12, 17, 19

đang xem xét, mẫu huyết tương có xu hướng phát hiện được điểm bazơ nitơ hỗn hợp nhiều hơn là các mẫu PSC, 7/8 vị trí phát hiện được trên mẫu huyết tương và không phát hiện được trên mẫu PSC tương ứng. Lý giải cho quan sát này khả năng là nồng độ RNA virus trong cùng thể tích sản phẩm tách chiết từ mẫu PSC theo lý thuyết nhỏ bằng 1/2 so với mẫu huyết tương, do thể tích mẫu đầu vào tách chiết giữa PSC/huyết tương là 70 µl/140 µl. Ngoài ra, mẫu khô thường khó tách chiết hơn mẫu huyết tương tươi. Điều này có thể là nguyên nhân làm giảm khả năng tóm bắt được đầy đủ các biến thể di truyền của virus trong phản ứng PCR khi thực hiện kỹ thuật xét nghiệm kháng thuốc từ mẫu PSC. Tuy nhiên, có một trường hợp PSC phát hiện được biến thể hoang dại tại vị trí đột biến hỗn hợp **K65KR**, mà không phát hiện được từ mẫu huyết tương tương ứng.





Hình 3.7. Hình ảnh chromatogram vị trí quan trọng K103 của cặp mẫu PSC-huyết tương số 15 ở các lần xét nghiệm khác nhau

Đối với cặp mẫu số 15 còn lại, kiểu gen từ huyết tương đã xác định được đột biến quan trọng nhóm NNRTI: **K103N**, trong khi đó không được phát hiện được đột biến này trong mẫu PSC tương ứng. Nhóm nghiên cứu đã thực hiện lặp lại bước giải trình tự đoạn gen *pol* đã khuếch đại và kết quả đặc điểm kháng thuốc của mẫu PSC 15 (PCR1-GN2) vẫn thống nhất với lần giải trình tự đầu tiên PSC 15 (PCR1-GN1), mẫu PSC không phát hiện được đột biến **K103N**. Tiếp theo, nhóm nghiên cứu đã thực hiện xét nghiệm lại cả mẫu PSC và huyết tương của người bệnh 15 từ bước sao chép ngược RT-PCR với lượng RNA đầu vào là 20 μ l. Tại lần xét nghiệm thứ hai này, đặc điểm đột biến từ mẫu huyết tương vẫn thống nhất với lần xét nghiệm một, mẫu PSC 15 (PCR2-GN) đã tìm thấy đột biến **K103N**. Hình ảnh chromatogram tại vị trí quan trọng K103 của cặp mẫu PSC-huyết tương số 15 ở các lần xét nghiệm khác nhau ở Hình 3.7. Nhóm nghiên cứu có thể loại trừ khả năng nhầm lẫn mã mẫu hoặc nhiễm chéo trong thao tác xét nghiệm. Bởi vì mẫu huyết tương và PSC của người bệnh 15 có sự giống nhau đến 98% về trình tự nucleotide và là hai mẫu duy nhất có một đột biến chính nhóm NRTI: **V75M**, đặc điểm này khác với tất cả các mẫu còn lại trong nghiên cứu này. Một giả định lý giải cho trường hợp cặp mẫu 15 này là do các biến thể di truyền trong quần thể HIV trong mẫu của người bệnh mà có thể tóm bắt được hoặc không tóm bắt được trong phản ứng PCR ở mỗi lần xét nghiệm khác nhau. Ở lần khuếch đại thứ hai với thể tích đầu vào RNA tăng lên gấp đôi, tại vị trí nucleotide C thay thế cho A, phát hiện vẫn còn đỉnh A_14% và T_12%, tuy nhiên không đọc vị trí này là nucleotide hỗn hợp do cut off của kỹ thuật này là 20%, Hình 3.7.e. Một giả định khác là do sai sót của enzyme phiên mã ngược (vốn là enzyme không có cơ chế đọc sửa) trong khi thực hiện phản ứng RT-PCR ở lần xét nghiệm đầu tiên. Sự sai khác về đặc điểm kháng thuốc giữa các lần xét nghiệm độc lập từ cùng một mẫu bệnh phẩm cũng đã được báo cáo trong nghiên cứu về độ tái lập trong xét nghiệm giải trình tự gen kháng thuốc HIV-1 của Millière và cộng sự, năm 2021 [36].

Bảng 3.9. Chấm điểm các đột biến kháng thuốc và diễn giải kháng thuốc của 5 cặp mẫu có khác biệt về kết quả đột biến giữa huyết tương và mẫu PSC

Cặp mẫu	Điểm nhóm PI					Điểm nhóm NRTI								Điểm nhóm NNRTI			
	Đột biến quan trọng nhóm PI	Đột biến phụ nhóm PI	ATV/r	DRV/r	LPV/r	Đột biến	ABC	AZT	D4T	DDI	FTC	3TC	TDF	Đột biến	DOR	EFV	NVP
PSC 5	-	-	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	K103N, K238T	0	90	90
Plasma 5	-	-	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	K103KN, K238RT	0	90	90
PSC 12	-	-	0	0	0	K65KR, S68G, M184MI	60	-20	50	70	75	75	40	K103N, Y188C, M230ML	60	165	180
Plasma 12	-	-	0	0	0	K65R, S68G, M184MI	60	-20	50	70	75	75	40	K103N, Y188C, M230ML	60	165	180
PSC 15	-	-	0	0	0	V75M	0	10	30	15	0	0	0	-	0	0	0
Plasma 15	-	-	0	0	0	V75M	0	10	30	15	0	0	0	K103N	0	60	60
PSC 17	-	-	0	0	0	None	0	0	0	0	0	0	0	K103N	0	60	60
Plasma 17	-	-	0	0	0	None	0	0	0	0	0	0	0	K103KN	0	60	60

PSC 19	-	-	0	0	0	K65R, T69del, V75M	60	0	120	105	30	30	60	V106M, V179D, Y181C	35	100	130
Plasma 19	-	-	0	0	0	K65KR, T69del, V75M	60	0	120	105	30	30	60	V106VM, V179VD, Y181YC	35	100	130

	Tăng nhạy cảm với thuốc: Điểm < 0
	Nhạy cảm với thuốc: Điểm 0 - 9
	Có nguy cơ kháng thuốc thấp: Điểm 10 - 14
	Kháng thuốc thấp: Điểm 15 - 29
	Kháng thuốc trung bình: Điểm 30 - 59
	Kháng cao: Điểm >= 60

Quy tắc ký hiệu vị trí đột biến: Axit amin của chủng hoang dại_Vị trí codon_Axit amin thay thế
 Ký hiệu “-”: Không phát hiện đột biến

Phân tích, phiên giải kết quả gen sang đặc tính kháng thuốc của virus sử dụng thuật toán của cơ sở dữ liệu HIVDR Stanford đối với 5 cặp mẫu có khác biệt về kết quả đột biến được thể hiện tại Bảng 3.9. Có thể thấy rằng các điểm không tương đồng về các đột biến chính giữa các mẫu huyết tương và mẫu PSC không dẫn đến thay đổi trong đặc tính kháng thuốc của các mẫu, ngoại trừ cặp mẫu 15. Trong trường hợp này, đã quan sát thấy sự khác biệt đáng kể về độ nhạy cảm với thuốc NNRTI. Cụ thể, mẫu huyết tương của mẫu 15 cho thấy kháng cao với efavirenz (EFV) và nevirapine (NVP), trong khi mẫu PSC lại cho thấy nhạy cảm với cả EFV và NVP. Do vậy, 18/19 cặp PSC-plasma được nghiên cứu có cùng kết quả phiên giải tình trạng kháng thuốc từ kiểu gen đối với các nhóm thuốc PI, NRTI và NNRTI. Sau khi làm lại, đã phát hiện được điểm đột biến quan trọng K103N trên mẫu PSC số 15, do vậy, các đột biến quan trọng phát hiện từ mẫu huyết tương đều có thể tìm thấy đúng trên mẫu PSC.

Nghiên cứu này cho thấy rằng mẫu PSC là hiệu quả trong việc xác định kháng thuốc HIV-1 ở những người bệnh chưa đạt ức chế virus, vượt qua được các hạn chế về khả năng khuếch đại thấp của mẫu huyết tương khô (DPS) (1) và sự khác biệt về đặc điểm đột biến kháng thuốc quan sát được với mẫu máu khô (DBS) (2). (1) Khi sử dụng mẫu PSC, tỷ lệ khuếch đại thành công đạt 95% tại ngưỡng 1.000 bản sao/ml. Mặc dù mẫu DPS có độ tương đồng đặc điểm kháng thuốc HIV-1 so với mẫu huyết tương cao, nhưng mẫu DPS đã được chứng minh có tỷ lệ khuếch đại PCR thấp và giảm sau 1 đến 2 tháng lưu trữ ở -20°C , dẫn đến hiệu suất giải trình tự kém. Trong nghiên cứu này, PSC cho thấy kết quả khuếch đại tốt hơn nhiều so với các mẫu DPS (tỷ lệ thành công khuếch đại ở các nghiên cứu trước từ 33,3% - 83,3%, thậm chí giảm còn 12,5% khi lưu mẫu 2 tháng ở -20°C) [26, 27]. Mẫu PSC trong nghiên cứu này được giữ ở nhiệt độ phòng trong khoảng 14 ngày trước khi lưu đông lạnh ở -80°C trong vòng khoảng 14,2 tháng trước khi thực hiện xét nghiệm gen kháng thuốc HIV-1. (2) Khi sử dụng mẫu PSC, mức độ tương đồng nucleotide trung bình cao đạt 98,5% giữa các cặp mẫu PSC và huyết tương. Trong số tổng cộng 37 điểm đột biến quan trọng phát hiện được từ mẫu huyết tương, 35/37 điểm đột biến (tương đương 94,6%) được phát hiện đúng trên mẫu PSC tương ứng. Một trong những nhược điểm của mẫu DBS đã được đề cập trong hướng dẫn của WHO, là kết quả xét nghiệm giải trình tự kháng thuốc HIV-1 có thể không phản ánh chính xác tình trạng hiện tại của các virus

đang nhân lên trong huyết tương. Sự hiện diện và khuếch đại của DNA tiền virus có thể giải thích cho sự khác biệt này [14]. Sự khác biệt này đã được mô tả trong nhiều nghiên cứu, khi các đột biến được phát hiện trong các mẫu DBS không xuất hiện trong các mẫu huyết tương, cho thấy vai trò của DNA tiền virus trong việc ảnh hưởng đến kết quả giải trình tự gen kháng thuốc HIV-1 khi sử dụng mẫu DBS [21, 22, 25, 35]. Ngoài ra, người ta cũng đã chỉ ra rằng các đột biến kháng thuốc mới mắc phải có thể được phát hiện sớm hơn trong RNA huyết tương so với DNA tiền virus. Không giống như mẫu DBS, mẫu PSC là huyết tương khô, không bị ảnh hưởng bởi DNA tiền virus trong kết quả giải trình tự kháng thuốc HIV-1 và tốt hơn mẫu DBS trong việc xác định các chủng virus kháng thuốc mới xuất hiện.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã cho thấy mẫu lưu trữ trên thẻ tách huyết tương PSC khả thi trong thực hiện xét nghiệm đo tải lượng HIV-1. So sánh với kết quả mẫu đo tải lượng virus từ huyết tương, xét nghiệm đo tải lượng HIV-1 bằng mẫu lưu trữ trên thẻ tách huyết tương PSC có độ nhạy 99,2%, độ đặc hiệu 87,8%, độ tương đồng 93,6%. Xu hướng nồng độ virus trong mẫu PSC cao hơn so với trong huyết tương. Đo tải lượng virus từ thẻ tách huyết tương có độ ổn định tốt, chênh lệch giữa hai lần xét nghiệm thấp hơn ± 0.5 log bản sao/ml. Việc bảo quản mẫu PSC trong -80°C và tan băng mẫu lưu trữ trên thẻ PSC một lần trước khi làm xét nghiệm không có ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê tới độ nhạy, độ đặc hiệu của xét nghiệm đo tải lượng HIV-1.

Mẫu lưu trữ trên thẻ tách huyết tương PSC thể hiện hiệu quả trong việc xác định đặc điểm di truyền gen kháng thuốc, khắc phục được các hạn chế về khả năng khuếch đại thấp của mẫu huyết tương khô (DPS) và sự khác biệt về đặc điểm đột biến kháng thuốc quan sát được với mẫu máu khô (DBS). Nghiên cứu này lần đầu tiên đã thực hiện thành công xét nghiệm giải trình tự gen phát hiện đột biến HIV kháng thuốc từ mẫu thẻ tách huyết tương PSC với tỷ lệ khuếch đại thành công đoạn PR-RT (thuộc gen *Pol*) là 95%. Tỷ lệ tương đồng nucleotide trung bình giữa cặp PSC-huyết tương là 98,5%, với kết quả thống nhất 100% về subtype giữa hai loại mẫu. Các đột biến quan trọng phát hiện từ mẫu huyết tương đều có thể tìm thấy tương đồng trên mẫu PSC.

KIẾN NGHỊ

1. Từ kết quả nghiên cứu cho thấy có thể ứng dụng triển khai sử dụng mẫu lưu trữ trên thẻ tách huyết tương PSC trong chỉ định xét nghiệm tải lượng trong theo dõi điều trị ARV cho người bệnh nhiễm HIV đặc biệt ở ở vùng sâu, vùng xa nơi có điều kiện vận chuyển, bảo quản khó khăn.
2. Việc sử dụng mẫu lưu trữ trên thẻ tách huyết tương PSC trong xét nghiệm phát hiện đột biến gen HIV kháng thuốc ở những mẫu tải lượng HIV-1 cao nghi ngờ thất bại với phác đồ điều trị ARV là khả thi, đặc biệt cho người nhiễm HIV ở ở vùng sâu, vùng xa. Tuy nhiên, cần triển khai các đánh giá tiếp theo với cỡ mẫu lớn hơn, trong điều kiện thực địa trước khi triển khai rộng rãi.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. Đặc điểm HIV kháng thuốc trên nhóm bệnh nhân đang điều trị ARV có tải lượng HIV-1 không bị ức chế ở một số cơ sở điều trị tại Hà Nội năm 2022-2023

Phạm Thị Phương Trâm, Ngô Thị Hồng Hạnh, Lê Thị Hồng Nhung, Nguyễn Anh Tuấn, Đỗ Thị Huyền, Nguyễn Thị Phương Thùy, Mai Thị Bích Hồng, Phạm Hồng Thắng

(Đã gửi bài đăng trên Tạp chí Y học dự phòng, đã có thư chấp nhận đăng bài)

2. Evaluation of the cobas plasma separation card to identify HIV-infected patients in virological failure in real-life conditions in Vietnam.

Hanh Thi Hong NGO, MSc 1, Binh Thanh NGUYEN, MD, MSc 1, Tram Thi Phuong PHAM, BSc 1, Nhung Thi Hong LE, MSc 1, Hien Ba PHAM, MD 2, Trang Thi Thu NGUYEN, MD 3, Mohand AIT-AHMED, MSc 4, Tuan Anh NGUYEN, PhD 1, Thang Hong PHAM, MD, PhD 1, Yoann MADEC, PhD 5.

(Đã gửi bài đăng trên tạp chí PloS one, đã có thư của Tạp chí gửi các góp ý của phản biện cần chỉnh sửa)

3. An effective new sampling method for HIV drug resistance genotyping in a resource-limited setting: plasma separation card (PSC) compared with plasma sample.

Tram Thi Phuong PHAM, BSc* 1, Hanh Thi Hong NGO, MSc* 1, Nhung Thi Hong LE, MSc 1, Huong Thi Thu PHAN, PhD2, Nhan Thi DO, PhD2, Tuan Anh NGUYEN, PhD1 , Huyen Thi DO, PhD3, Mohand AIT-AHMED, MSc4, Yoann MADEC, PhD5, Thang Hong PHAM, MD, PhD1§.

(Đã hoàn thiện bản thảo)

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bruggemans, A., et al., *The HIV-2 OGH double reporter virus shows that HIV-2 is less cytotoxic and less sensitive to reactivation from latency than HIV-1 in cell culture*. J Virus Erad, 2023. **9**(3): p. 100343.
2. Nyamweya, S., et al., *Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis*. Rev Med Virol, 2013. **23**(4): p. 221-40.
3. Andersson, S., et al., *Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection*. Arch Intern Med, 2000. **160**(21): p. 3286-93.
4. Gottlieb, G.S., et al., *Lower levels of HIV RNA in semen in HIV-2 compared with HIV-1 infection: implications for differences in transmission*. Aids, 2006. **20**(6): p. 895-900.
5. Popper, S.J., et al., *Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2*. J Infect Dis, 1999. **180**(4): p. 1116-21.
6. Williams, A., et al., *Geographic and Population Distributions of Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 and HIV-2 Circulating Subtypes: A Systematic Literature Review and Meta-analysis (2010-2021)*. J Infect Dis, 2023. **228**(11): p. 1583-1591.
7. *Human Immunodeficiency Virus (HIV)*. Transfus Med Hemother, 2016. **43**(3): p. 203-22.
8. Cao, D., et al., *A Matter of Life or Death: Productively Infected and Bystander CD4 T Cells in Early HIV Infection*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 626431.
9. *HIV and AIDS Data Hub for Asia Pacific*. <https://www.aidsdatahub.org/>. 2023.
10. *Niềm tin chấm dứt dịch AIDS ở Việt Nam vào năm 2030*. 2023.
11. *World Health Organisation (WHO). Antiretroviral therapy coverage Estimates by WHO region*. <https://apps.who.int/gho/data/view.main.23300REGION?lang=en>. 2021.
12. Aquaro, S., et al., *Mechanisms underlying of antiretroviral drugs in different cellular reservoirs with a focus on macrophages*. Virulence, 2020. **11**(1): p. 400-413.
13. *World Health Organisation (WHO). Technical and operational considerations for implementing HIV viral load testing*. 2014.

14. World Health Organisation (WHO). *Manual for HIV drug resistance testing using dried blood spot specimens*. 2020.
15. *Giải trình tự Sanger*. <https://tapchisinhhoc.com/giai-trinh-tu-sanger-la-gi.html/>.
16. Wensing, A.M., et al., *2022 update of the drug resistance mutations in HIV-1*. *Top Antivir Med*, 2022. **30**(4): p. 559-574.
17. Nash, M., et al., *Performance of the Xpert HIV-1 Viral Load Assay: a Systematic Review and Meta-analysis*. *J Clin Microbiol*, 2018. **56**(4).
18. Bwana, P., J. Ageng'o, and M. Mwau, *Performance and usability of Cepheid GeneXpert HIV-1 qualitative and quantitative assay in Kenya*. *PLoS One*, 2019. **14**(3): p. e0213865.
19. Simeon, K., et al., *Comparative cost analysis of point-of-care versus laboratory-based testing to initiate and monitor HIV treatment in South Africa*. *PLOS ONE*, 2019. **14**(10): p. e0223669.
20. World Health Organisation (WHO). *Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: recommendations for a public health approach*. . 2016.
21. Monleau, M., et al., *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*, 2014. **52**(2): p. 578-86.
22. Omooja, J., et al., *HIV-1 drug resistance genotyping success rates and correlates of Dried-blood spots and plasma specimen genotyping failure in a resource-limited setting*. *BMC Infect Dis*, 2022. **22**(1): p. 474.
23. Rottinghaus, E.K., et al., *Evaluation of dried blood spots collected on filter papers from three manufacturers stored at ambient temperature for application in HIV-1 drug resistance monitoring*. *PLoS One*, 2014. **9**(10): p. e109060.
24. Ji, H. and P. Sandstrom, *Overview of the Analytes Applied in Genotypic HIV Drug Resistance Testing*. *Pathogens*, 2022. **11**(7).
25. Parry, C.M., et al., *Field study of dried blood spot specimens for HIV-1 drug resistance genotyping*. *J Clin Microbiol*, 2014. **52**(8): p. 2868-75.
26. Monleau, M., et al., *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*, 2010. **65**(8): p. 1562-6.

27. Rodriguez-Auad, J.P., et al., *Use of Dried Plasma Spots for HIV-1 Viral Load Determination and Drug Resistance Genotyping in Mexican Patients*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 240407.
28. Baillargeon, K.R. and C.R. Mace, *Microsampling tools for collecting, processing, and storing blood at the point-of-care*. Bioeng Transl Med, 2023. **8**(2): p. e10476.
29. Thompson, B., et al., *Application of novel plasma separation filter cards for quantification of nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitor di/triphosphates in dried blood spots using LC-MS*. Bioanalysis, 2023. **15**(13): p. 739-756.
30. Vubil, A., et al., *Performance of two plasma separation devices for HIV-1 viral load measurement in primary healthcare settings*. Microbiol Spectr, 2023. **11**(6): p. e0054623.
31. Carmona, S., et al., *Separation of Plasma from Whole Blood by Use of the cobas Plasma Separation Card: a Compelling Alternative to Dried Blood Spots for Quantification of HIV-1 Viral Load*. J Clin Microbiol, 2019. **57**(4).
32. Kiyaga, C., et al., *The plasma separation card as a novel solution for enhancing central laboratory capability for HIV-1 viral load monitoring in limited-access settings*. PLOS Glob Public Health, 2023. **3**(6): p. e0002099.
33. Vubil, A., et al., *Accurate HIV viral load measurement in primary health care settings using the cobas® plasma separation card*. PLOS ONE, 2020. **15**(5): p. e0232122.
34. Chimoyi, L., et al., *Assessment of the performance of the plasma separation card for HIV-1 viral load monitoring in South Africa*. J Clin Microbiol, 2024. **62**(4): p. e0164923.
35. Rottinghaus, E.K., et al., *Dried blood spot specimens are a suitable alternative sample type for HIV-1 viral load measurement and drug resistance genotyping in patients receiving first-line antiretroviral therapy*. Clin Infect Dis, 2012. **54**(8): p. 1187-95.
36. Millière, L., et al., *Assessment of intra-sample variability in HIV-1 DNA drug resistance genotyping*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2021. **76**(8): p. 2143-2147.

Phụ lục 1: Phiếu thông tin và chấp thuận tham gia nghiên cứu**THÔNG TIN NGHIÊN CỨU**

Dự án MOVIDA Việt Nam:

**Tăng cường tiếp cận với xét nghiệm tải lượng HIV-1 ở bệnh nhân
điều trị ARV ở vùng sâu vùng xa
(Giai đoạn I ter)**

Mã đề cương: 2020-067

Địa điểm nghiên cứu:

- **Bệnh viện Đa khoa Đống Đa**
- **Trung tâm y tế quận Nam Từ Liêm**

Nghiên cứu viên chính:

- **GS.Đặng Đức Anh, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương**
- **TS. Yoann Madec, Viện Pasteur (Cộng hòa Pháp)**

Giới thiệu

Bạn được mời tham gia nghiên cứu MOVIDA. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá loại mẫu mới để xét nghiệm tải lượng HIV-1 trong máu và các xét nghiệm HIV khác.

Việc tham gia nghiên cứu là hoàn toàn tự nguyện, Bạn được chăm sóc điều trị theo quy định của Bộ Y tế cho dù có tham gia nghiên cứu này hay không.

Phiếu thông tin này cung cấp cho bạn các thông tin để bạn có thể cân nhắc việc tham gia nghiên cứu hay không. Bạn hãy đọc kỹ phiếu thông tin này để hiểu bản chất và nguy cơ (nếu có) khi tham gia. Bạn có thể hỏi bất kỳ câu hỏi nào mà bạn không hiểu hoặc muốn biết rõ hơn. Trước khi quyết định tham gia hay không, bạn có thể trao đổi với người thân hoặc cán bộ y tế.

Nếu đồng ý, hãy ký xác nhận ở phần dưới phiếu thông tin này để đảm bảo

rằng bạn đã:

- Hiểu những gì bạn vừa được đọc
- Đồng ý tham gia nghiên cứu này
- Đồng ý thực hiện theo các bước mô tả trong nghiên cứu
- Đồng ý cho sử dụng các thông tin cá nhân và sức khỏe như được mô tả dưới đây

Bạn sẽ được giữ một bản Phiếu thông tin và đồng ý này.

Nếu bạn đã quyết định tham gia nhưng thay đổi ý kiến, bạn có thể rút khỏi nghiên cứu bất cứ lúc nào. Nếu quyết định rút thì hãy thông báo cho bác sỹ điều trị và nêu rõ bạn có đồng ý cho sử dụng mẫu bệnh phẩm của bạn hay không.

1.) MỤC ĐÍCH NGHIÊN CỨU

Xét nghiệm tải lượng HIV-1 có vai trò quan trọng trong đánh giá thành công hay thất bại điều trị đối với người nhiễm HIV đang điều trị ARV. Tuy nhiên xét nghiệm này không phổ biến vì kỹ thuật phức tạp, máy móc đắt tiền, phải thường xuyên bảo trì bảo dưỡng, cán bộ xét nghiệm được đào tạo bài bản và thiết bị xét nghiệm cao cấp. Do đó nhiều người nhiễm HIV đang điều trị ARV không dễ dàng tiếp cận với xét nghiệm này.

Mẫu giấy tách huyết tương khô PSC là loại giấy thấm cho phép thu thập lưu trữ máu, có thể là công cụ hiệu quả cho xét nghiệm tải lượng HIV-1.

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá chất lượng kết quả tải lượng HIV-1 với một loại mẫu mới: Giấy thấm tách huyết tương Cobas® Plasma Separation Card (PSC)

Tổng số 250 người sẽ được tuyển chọn.

2.) TIÊU CHUẨN TUYỂN CHỌN

Bạn được mời tham gia nghiên cứu vì bạn:

- Trên 18 tuổi
- Có kết quả xét nghiệm HIV dương tính
- Có đủ sức khỏe thể chất và tâm thần để cho máu và đồng ý tham gia.

3.) QUY TRÌNH

Bạn được mời tham gia trong lần khám định kỳ. Nghiên cứu cần:

- Lấy một mẫu máu tĩnh mạch của bạn (khoảng 10ml)
- Một số thông tin của bạn (tuổi, giới, trình trạng điều trị ARV, đồng nhiễm HBV, HCV)

4.) MẪU MÁU VÀ THÔNG TIN CỦA BẠN ĐƯỢC SỬ DỤNG NHƯ THẾ NÀO?

Mẫu máu của bạn được gửi đến Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương vào bảo quản lạnh đến khi xét nghiệm. Mẫu của bạn được dùng để đánh giá kỹ thuật xét nghiệm tải lượng HIV-1.

Tiền sử y khoa và kết quả tải lượng của bạn được lưu giữ trong một cơ sở dữ liệu điện tử để phân tích. Dữ liệu của bạn được mã hóa và không có tên của bạn

trong cơ sở dữ liệu này. Cơ sở dữ liệu này được bảo vệ an toàn tại Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương (VSDTTU) và Viện Pasteur Paris, Pháp. Chỉ có người có thẩm quyền mới được phép truy cập cơ sở dữ liệu này.

Xét nghiệm trong tương lai

Mẫu máu của bạn được lưu giữ cho đến khi kết thúc nghiên cứu. Phần còn lại của mẫu máu được bảo quản cho các nghiên cứu sau này để đánh giá những xét nghiệm khác nhau có thể thực hiện trên mẫu PSC (Ví dụ như xét nghiệm kháng thuốc HIV-1, xét nghiệm viêm gan). Mẫu của bạn được định danh duy nhất bằng mã số, không có tên của bạn. Kết quả những loại xét nghiệm trong tương lai này sẽ không được thông báo cho bạn hoặc bác sỹ điều trị.

5.) NGUY CƠ

Việc lấy máu có thể gây khó chịu hoặc thâm tím vùng da lấy máu. Đôi khi mạch máu bị sưng phồng và có cục đông hoặc viêm vùng tiêm chích. Nhiễm trùng nhẹ hoặc chảy máu hiếm gặp hơn. Nếu có thì cũng được điều trị dễ dàng. Nếu bạn bị tổn thương vì lấy máu bạn sẽ được bác sỹ điều trị miễn phí.

6.) LỢI ÍCH

Kết quả xét nghiệm tải lượng HIV-1 trong huyết tương của bạn sẽ được gửi đến bác sỹ điều trị để thông báo cho bạn.

Kết quả nghiên cứu này giúp Bộ Y tế đưa ra quyết định để tăng cường xét nghiệm tải lượng HIV-1 trong theo dõi điều trị bệnh nhân.

7.) CHI PHÍ BỒI HOÀN

Nghiên cứu này cung cấp hỗ trợ cho người tham gia

8.) CHI PHÍ THAM GIA NGHIÊN CỨU

Bạn không phải trả khoản tiền nào để tham gia nghiên cứu.

9.) BẢO MẬT THÔNG TIN

Nếu đồng ý tham gia, thông tin của bạn sẽ được bảo mật. Thông tin tham gia nghiên cứu được ghi trong hồ sơ bệnh án của bạn. Toàn bộ mẫu và thông tin cho nghiên cứu này và nghiên cứu trong tương lai được bảo mật. Bệnh phẩm và dữ liệu của bạn được mã hóa tại Viện VSDTTU và đối tác nghiên cứu, không có tên, địa chỉ, số điện thoại hoặc thông tin khác để xác định đó là bạn.

Để giám sát nghiên cứu này, đối tác nghiên cứu có thể kiểm tra tài liệu nghiên cứu để đảm bảo nghiên cứu được thực hiện đúng quy định đạo đức. Cán bộ Viện Pasteur Paris sẽ không được tiếp cận hồ sơ bệnh án của bạn mà không có sự chấp thuận của Hội đồng Đạo đức nghiên cứu Y sinh học và Nghiên cứu viên chính.

Nghiên cứu này được hội đồng đạo đức Viện Pasteur Paris và Viện VSDTTU phê duyệt.

Nhà tài trợ đáp ứng các quy định về luật pháp bao gồm việc đóng bảo hiểm trách nhiệm dân sự cho tổn thương do nghiên cứu.

10.) CÂU HỎI

Nếu có vấn đề hay câu hỏi về nghiên cứu này, hãy liên hệ với Nghiên cứu

viên chính GS. TS. Đặng Đức Anh, số điện thoại at +84-43-9721055.

Nếu có câu hỏi về quyền của người tham gia nghiên cứu, hãy liên hệ với Hội đồng đạo đức - Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương: PGS. TS. Nguyễn Thị Thùy Dương, điện thoại +84-43-9721923

11.) Các thông tin khác về bảo mật thông tin cá nhân

Viện Pasteur Paris tuân thủ theo quy định của Châu Âu về việc bảo mật thông tin cá nhân của bạn. Trong khuôn khổ của nghiên cứu này, các cán bộ chịu trách nhiệm xử lý số liệu của bạn nhằm mục đích phân tích kết quả nghiên cứu để trả lời câu hỏi nghiên cứu. Các hành động phù hợp đã được thiết lập tại Viện Pasteur Paris để bảo mật thông tin của bạn. Dữ liệu của bạn được xử lý vì nó cần thiết cho mục đích nghiên cứu y tế công cộng.

Điều gì xảy ra với thông tin của bạn và ai được truy cập thông tin đó?

Thông tin cá nhân của bạn không được tiết lộ trong bài báo nào liên quan đến nghiên cứu này. Tất cả các dữ liệu được đăng ký trong hồ sơ bảo vệ bằng mật mã và được phân tích sử dụng mã định danh (sử dụng mã số thay cho tên bạn). Dữ liệu của bạn được bảo mật tại Viện VSDTTU và Viện Pasteur Paris (Pháp) để phân tích. Dữ liệu đó không có thông tin xác định bạn là ai như tên, họ hoặc địa chỉ.

Thông tin thu thập cần cho nghiên cứu này bao gồm:

- Họ tên và chữ ký của bạn (được bác sỹ điều trị giữ) được ghi trong Phiếu đồng ý tham gia nghiên cứu,
- Tuổi và giới tính của bạn,
- Tình trạng sức khỏe của bạn, bao gồm cả bệnh sử (ngày xét nghiệm HIV, HBV, HCV, ngày và loại thuốc ARV).

Trừ kết quả phân tích virus học được thực hiện trong nghiên cứu này, các thông tin mô tả ở trên trong hồ sơ bệnh án của bạn hoặc được bạn cung cấp trực tiếp cho nghiên cứu. Bạn có quyền không cung cấp một số thông tin này nhưng sẽ làm ảnh hưởng đến khả năng đạt được mục tiêu nghiên cứu.

Ai sẽ có dữ liệu của bạn?

Dữ liệu của bạn được chuyển bảo mật tới:

- Viện Pasteur hoặc đối tác của Viện (như bệnh viện tham gia nghiên cứu, phòng thí nghiệm thực hiện xét nghiệm),
- Cơ quan có thẩm quyền ở Việt Nam hoặc Pháp để đảm bảo trách nhiệm hành chính
- Cơ sở dịch vụ hành chính hoặc khoa học khác của Viện Pasteur Paris
- Viện VSDTTU.

Dữ liệu này được định danh bằng mã số tham gia nghiên cứu gồm 1 ký tự và 4 con số trừ khi cần thiết để biết danh tính của bạn (đảm bảo chất lượng, bồi thường trong trường hợp tổn thương do quy trình nghiên cứu)

Dữ liệu của bạn sẽ được sử dụng thế nào sau khi kết thúc nghiên cứu này?

Trừ khi bạn có yêu cầu khác, thông tin do bạn cung cấp sẽ được bảo vệ đến khi kết thúc nghiên cứu này cho mục đích nghiên cứu khác liên quan đến HIV hoặc virus Viêm gan để thực hiện nghiên cứu y tế công cộng nói chung hoặc phát triển sáng kiến y tế khác.

Trừ khi bạn có yêu cầu khác, dữ liệu của bạn sẽ được chuyển chỉ với mục đích nghiên cứu khoa học về HIV hoặc virus viêm gan cho đội ngũ khoa học và học thuật quốc tế. Các biện pháp bảo vệ dữ liệu sẽ luôn được tiến hành để đảm bảo bảo mật thông tin của bạn và quyền bảo mật thông tin của bạn.

Quyền bảo mật thông tin của bạn là gì?

Bạn có thể thực hiện các quyền bảo mật thông tin như sau:

- Quyền yêu cầu thông tin đang được xử lý yêu cầu bản sao thông tin (quyền tiếp cận).
- Quyền yêu cầu đính chính thông tin nếu không chính xác hoặc không đầy đủ. Trong khi chúng tôi xem xét yêu cầu của bạn, bạn có quyền hạn chế xử lý số liệu.
- Quyền phản đối việc sử dụng thông tin của bạn cho nghiên cứu khoa học vào bất cứ thời điểm nào mà không có sự đồng ý của bạn.
- Nếu bạn phản đối việc sử dụng thông tin của bạn cho nghiên cứu khoa học, bạn có thể yêu cầu xóa dữ liệu đã được thu thập đến thời điểm này. Tuy nhiên, những dữ liệu đã thu thập trước đó sẽ không bị xóa nếu việc đó có thể khiến cho mục đích nghiên cứu không thể thực hiện được hoặc phá hỏng thành quả nghiên cứu..
- Quyền khiếu nại với cơ quan bảo vệ dữ liệu. Cơ quan này ở Pháp là La Commission nationale de l'informatique et des libertés de France (CNIL)¹. Nếu bạn muốn truy cập thông tin cá nhân của bạn, hãy gửi đề nghị đến:
- GS. Đặng Đức Anh. Số điện thoại: (84-4) 39721055
- Cán bộ bảo mật thông tin – Viện Pasteur Paris: email : dpo@pasteur.fr

DPO - Institut Pasteur – Direction juridique, 28 rue du Docteur Roux,
75 724 Paris Cedex 15, France

Thông tin của bạn được lưu giữ bao lâu?

Các hồ sơ chứa thông tin cá nhân của bạn được giữ trong vòng hai năm sau khi công bố nghiên cứu cuối cùng được xuất bản và được lưu giữ tại địa điểm nghiên cứu và bởi nhà tài trợ trong vòng 25 năm sau khi kết thúc nghiên cứu hoặc theo quy định của luật pháp.

¹<https://www.cnil.fr/en/home>

PHIẾU ĐỒNG Ý THAM GIA NGHIÊN CỨU

Tôi đã được giải thích tất cả các thông tin ở trên và các câu hỏi của tôi đã được trả lời. Tôi được khuyến khích hỏi về bất kỳ khía cạnh nào trong nghiên cứu này.

Việc ký vào phiếu này không có nghĩa là tôi từ bỏ bất kỳ quyền lợi về mặt pháp luật nào và tôi đồng ý tham gia nghiên cứu này. Tôi sẽ nhận được 1 bản phiếu đã ký này

_____ <i>(In hoa) Tên người tham gia nghiên cứu</i>	_____ <i>Chữ ký người tham gia nghiên cứu</i>	_____ <i>Ngày</i>
--	--	----------------------

Tôi xác nhận rằng bản chất, mục đích, lợi ích tiềm tàng và nguy cơ có thể liên quan đến việc tham gia nghiên cứu này đã được giải thích cho người tham gia đã ký tên ở trên và bất kỳ câu hỏi nào về nghiên cứu này đã được giải đáp. Một bản phiếu đồng ý sẽ được đưa cho người tham gia.

_____ <i>(In hoa) Tên người nhận phiếu đồng ý</i>	_____ <i>Chữ ký người nhận phiếu đồng ý</i>	_____ <i>Ngày</i>
--	--	----------------------

Tôi xác nhận rằng Người nhận phiếu đồng ý nói trên là người được ủy quyền

_____ <i>(In hoa) Tên nghiên cứu viên chính</i>	_____ <i>Chữ ký Nghiên cứu viên chính</i>	_____ <i>Ngày</i>
--	--	----------------------

Phụ lục 2: Kết quả xét nghiệm tải lượng HIV-1 cả 250 mẫu huyết tương và 250 mẫu PSC

Số TT	Mã mẫu huyết tương	PKNT lấy mẫu	Ngày lấy mẫu	Ngày xét nghiệm	Kết quả tải lượng HIV-1 lần 1 (bản sao/ml)	Ngày xét nghiệm lại	Kết quả tải lượng HIV-1 lần 2 (bản sao/ml)	Mã NIHE	Mã Movida
1	2134	NTL	05/10/2022	12/10/2022	29.800			2201011168	51
2	2059	NTL	05/10/2022	12/10/2022	213	05/04/2023	605	2201011169	52
3	2132	NTL	05/10/2022	12/10/2022	8.070			2201011170	53
4	2103	NTL	06/10/2022	12/10/2022	391			2201011171	54
5	2164	NTL	07/10/2022	12/10/2022	95			2201011173	56
6	2211	NTL	07/10/2022	12/10/2022	18.600			2201011174	57
7	2174	NTL	07/10/2022	12/10/2022	15.500			2201011175	58
8	2089	NTL	07/10/2022	12/10/2022	28.400			2201011176	59
9	2199	NTL	07/10/2022	12/10/2022	89			2201011177	60
10	2073	NTL	07/10/2022	12/10/2022	1.410			2201011178	61
11	2111	NTL	07/10/2022	12/10/2022	372			2201011179	62
12	2259	NTL	07/10/2022	12/10/2022	45			2201011180	63
13	2182	NTL	07/10/2022	12/10/2022	98			2201011181	64
14	2131	NTL	07/10/2022	12/10/2022	472	05/04/2023	707	2201011182	65

15	2019	NTL	07/10/2022	12/10/2022	<20			2201011183	66
16	2063	NTL	07/10/2022	12/10/2022	276			2201011184	67
17	2028	NTL	07/10/2022	12/10/2022	93			2201011185	68
18	2150	NTL	07/10/2022	12/10/2022	734	05/04/2023	529	2201011186	69
19	2257	NTL	10/10/2022	12/10/2022	Target not detected			2201011187	70
20	2265	NTL	10/10/2022	12/10/2022	593			2201011188	71
21	2248	NTL	10/10/2022	12/10/2022	70			2201011189	72
22	2266	NTL	10/10/2022	12/10/2022	52			2201011190	73
23	2230	NTL	10/10/2022	12/10/2022	Target not detected			2201011191	74
24	2086	NTL	10/10/2022	12/10/2022	<20			2201011192	75
25	2133	NTL	10/10/2022	12/10/2022	248			2201011193	76
26	2206	NTL	10/10/2022	12/10/2022	Target not detected			2201011194	77
27	2033	NTL	10/10/2022	12/10/2022	Target not detected			2201011195	78
28	2184	NTL	10/10/2022	12/10/2022	<20			2201011196	79
29	2238	NTL	10/10/2022	12/10/2022	135.000			2201011197	80
30	2027	NTL	10/10/2022	12/10/2022	30			2201011198	81
31	2048	NTL	10/10/2022	12/10/2022	Target not detected			2201011199	82
32	2262	NTL	10/10/2022	12/10/2022	589			2201011200	83
33	2095	NTL	10/10/2022	12/10/2022	5.100			2201011201	84
34	2047	NTL	10/10/2022	12/10/2022	Target not detected			2201011202	85

35	2144	NTL	10/10/2022	12/10/2022	20			2201011203	86
36	2219	NTL	10/10/2022	12/10/2022	Target not detected			2201011204	87
37	2007	NTL	10/10/2022	12/10/2022	Target not detected			2201011205	88
38	2194	NTL	10/10/2022	12/10/2022	Target not detected			2201011206	89
39	2001	NTL	10/10/2022	12/10/2022	Target not detected			2201011207	90
40	2070	NTL	10/10/2022	12/10/2022	<20			2201011208	91
41	2106	NTL	10/10/2022	12/10/2022	260			2201011209	92
42	2240	NTL	10/10/2022	12/10/2022	Target not detected			2201011210	93
43	2026	NTL	10/10/2022	12/10/2022	81			2201011211	94
44	2214	NTL	10/10/2022	12/10/2022	43			2201011212	95
45	2040	NTL	10/10/2022	12/10/2022	295			2201011213	96
46	2252	NTL	10/10/2022	12/10/2022	68.700			2201011214	97
47	2269	NTL	10/10/2022	12/10/2022	46			2201011215	98
48	2082	NTL	11/10/2022	12/10/2022	328			2201011216	99
49	2107	NTL	12/10/2022	20/10/2022	193			2201012598	100
50	2049	NTL	12/10/2022	20/10/2022	Target not detected			2201012599	251
51	2023	NTL	12/10/2022	20/10/2022	123			2201012600	252
52	2139	NTL	12/10/2022	20/10/2022	171	05/04/2023	194	2201012601	253
53	2085	NTL	12/10/2022	20/10/2022	45			2201012602	254
54	2147	NTL	12/10/2022	20/10/2022	433			2201012603	255

X

55	2072	NTL	12/10/2022	20/10/2022	309	05/04/2023	567	2201012604	256
56	2201	NTL	12/10/2022	20/10/2022	173			2201012605	257
57	2037	NTL	12/10/2022	20/10/2022	538			2201012606	258
58	2227	NTL	13/10/2022	20/10/2022	25.900			2201012607	259
59	2029	NTL	13/10/2022	20/10/2022	29			2201012608	260
60	2136	NTL	13/10/2022	20/10/2022	49.200			2201012609	261
61	2146	NTL	14/10/2022	20/10/2022	471.000			2201012610	262
62	2044	NTL	14/10/2022	20/10/2022	<20			2201012611	263
63	2221	NTL	17/10/2022	20/10/2022	39.800			2201012612	264
64	2054	NTL	17/10/2022	20/10/2022	63.000			2201012613	265
65	2041	DD	18/10/2022	20/10/2022	65.000			2201012614	1
66	2006	DD	19/10/2022	20/10/2022	485.000			2201012615	2
67	2018	DD	19/10/2022	20/10/2022	44			2201012616	3
68	2079	DD	19/10/2022	20/10/2022	14.700			2201012617	4
69	2233	DD	19/10/2022	20/10/2022	591.000			2201012618	5
70	2045	DD	19/10/2022	20/10/2022	Target not detected			2201012619	6
71	2034	DD	19/10/2022	20/10/2022	Target not detected			2201012620	7
72	2113	DD	19/10/2022	20/10/2022	Target not detected			2201012621	8
73	2039	DD	19/10/2022	20/10/2022	3.870			2201012622	9
74	2046	DD	21/10/2022	25/10/2022	1.380.000			2201012712	10

75	2071	DD	21/10/2022	25/10/2022	59.600			2201012713	11
76	2232	DD	24/10/2022	25/10/2022	10.800			2201012714	12
77	2118	DD	24/10/2022	25/10/2022	7.130			2201012715	13
78	2031	DD	24/10/2022	01/11/2022	59.800			2201012716	14
79	2210	DD	24/10/2022	08/03/2023	Target not detected			2201004435	15
80	2166	NTL	24/10/2022	25/10/2022	4.040			2201012718	267
81	2130	DD	26/10/2022	01/11/2022	18.400			2201004436	16
82	2011	DD	28/10/2022	01/11/2022	38			2201004437	17
83	2163	DD	28/10/2022	01/11/2022	4.090.000			2201004438	18
84	2066	DD	28/10/2022	01/11/2022	22.300			2201004439	19
85	2122	NTL	28/10/2022	01/11/2022	5.720			2201004440	241
86	2231	NTL	28/10/2022	01/11/2022	>10 ⁷			2201004441	266
87	2247	NTL	28/10/2022	01/11/2022	152.000			2201004442	269
88	2169	NTL	28/10/2022	01/11/2022	22.100			2201004443	242
89	2124	NTL	31/10/2022	01/11/2022	<20			2201004444	243
90	2042	NTL	31/10/2022	01/11/2022	741			2201004445	244
91	2093	NTL	31/10/2022	01/11/2022	135			2201004446	245
92	2141	NTL	31/10/2022	01/11/2022	Target not detected			2201004447	246
93	2243	NTL	31/10/2022	01/11/2022	Target not detected			2201004448	247
94	2176	NTL	31/10/2022	01/11/2022	79.100			2201004449	248

95	2251	NTL	31/10/2022	01/11/2022	17.700			2201004450	249
96	2205	DD	31/10/2022	01/11/2022	15.900			2201004451	20
97	2017	DD	31/10/2022	01/11/2022	16.000			2201004452	21
98	2056	DD	31/10/2022	01/11/2022	181.000			2201004453	22
99	2171	DD	01/11/2022	03/11/2022	548			2201004454	23
100	2167	NTL	01/11/2022	03/11/2022	Target not detected			2201004455	101
101	2229	NTL	01/11/2022	03/11/2022	26			2201004456	102
102	2112	NTL	01/11/2022	03/11/2022	124			2201004457	250
103	2077	NTL	02/11/2022	03/11/2022	Target not detected			2201004460	103
104	2043	NTL	02/11/2022	03/11/2022	287			2201004461	104
105	2234	DD	04/11/2022	07/11/2022	35.000			2201004701	24
106	2216	NTL	07/11/2022	08/11/2022	5.010			2201004545	105
107	2264	NTL	07/11/2022	08/11/2022	775			2201004546	106
108	2173	NTL	07/11/2022	08/11/2022	20.800			2201004547	107
109	2123	DD	08/11/2022	28/11/2022	37.800			2201004762	25
110	2100	DD	08/11/2022	28/11/2022	3.120.000			2201004763	26
111	2032	DD	08/11/2022	28/11/2022	974.000			2201004764	27
112	2036	NTL	08/11/2022	28/11/2022	70.900			2201004765	109
113	2129	NTL	08/11/2022	28/11/2022	471.000			2201004766	108
114	2160	DD	09/11/2022	28/11/2022	848			2201004767	28

115	2030	DD	09/11/2022	28/11/2022	211.000			2201004768	29
116	2157	DD	09/11/2022	28/11/2022	316.000			2201004769	30
117	2143	DD	09/11/2022	28/11/2022	1.230.000			2201004770	31
118	2218	NTL	09/11/2022	28/11/2022	12.300			2201004771	110
119	2121	NTL	09/11/2022	28/11/2022	27			2201004772	111
120	2149	NTL	09/11/2022	28/11/2022	7.760			2201004773	112
121	2178	NTL	10/11/2022	28/11/2022	196			2201004774	113
122	2016	NTL	10/11/2022	28/11/2022	244.000			2201004775	114
123	2098	NTL	10/11/2022	28/11/2022	644			2201004776	115
124	2126	DD	14/11/2022	28/11/2022	143.000			2201004777	32
125	2075	DD	14/11/2022	28/11/2022	67.300			2201004778	33
126	2097	DD	14/11/2022	28/11/2022	51.100			2201004779	34
127	2168	DD	14/11/2022	28/11/2022	125.000			2201004780	35
128	2137	NTL	14/11/2022	28/11/2022	10.500			2201004781	116
129	2120	NTL	15/11/2022	28/11/2022	823			2201004782	117
130	2239	NTL	15/11/2022	28/11/2022	208.000			2201004783	118
131	2051	DD	16/11/2022	28/11/2022	4.740			2201004784	36
132	2114	DD	16/11/2022	28/11/2022	4.170			2201004785	37
133	2260	DD	16/11/2022	28/11/2022	561.000			2201004786	38
134	2159	DD	16/11/2022	28/11/2022	19.700			2201004787	39

135	2058	NTL	17/11/2022	28/11/2022	27.600			2201004788	119
136	2138	NTL	17/11/2022	28/11/2022	3.770			2201004789	120
137	2195	NTL	18/11/2022	28/11/2022	155.000			2201004790	121
138	2225	NTL	18/11/2022	28/11/2022	45.900			2201004791	122
139	2220	DD	18/11/2022	28/11/2022	115			2201004792	40
140	2190	DD	18/11/2022	28/11/2022	12.200			2201004793	41
141	2177	DD	18/11/2022	28/11/2022	46.300			2201004794	42
142	2068	NTL	21/11/2022	28/11/2022	5.970			2201004795	123
143	2067	NTL	22/11/2022	28/11/2022	174.000			2201004796	124
144	2268	NTL	22/11/2022	28/11/2022	184.000			2201004797	125
145	2065	DD	23/11/2022	28/11/2022	3.150			2201004798	43
146	2108	DD	23/11/2022	28/11/2022	9.360			2201004799	44
147	2181	DD	23/11/2022	28/11/2022	806.000			2201004800	45
148	2165	DD	24/11/2022	28/11/2022	2.990.000			2201004801	46
149	2193	DD	24/11/2022	28/11/2022	495.000			2201004802	47
150	2200	NTL	25/11/2022	28/11/2022	1.080.000			2201004804	175
151	2135	DD	25/11/2022	28/11/2022	Target not detected			2201004805	49
152	2202	DD	28/11/2022	11/01/2023	50.400			2201004910	50
153	2076	NTL	28/11/2022	11/01/2023	1.400			2201004911	126
154	2255	DD	28/11/2022	11/01/2023	Target Not Detected			2201004912	176

155	2061	DD	29/11/2022	11/01/2023	216			2201004913	177
156	2155	DD	29/11/2022	11/01/2023	10.500			2201004914	178
157	2060	NTL	30/11/2022	11/01/2023	24.900			2201004915	174
158	2053	NTL	01/12/2022	11/01/2023	243			2201004916	173
159	2235	DD	05/12/2022	11/01/2023	1.530			2201004917	179
160	2115	DD	05/12/2022	11/01/2023	2.650.000			2201004918	180
161	2215	NTL	09/12/2022	11/01/2023	6.030			2201004919	127
162	2209	NTL	12/12/2022	11/01/2023	51.800			2201004920	128
163	2064	DD	12/12/2022	11/01/2023	24.800			2201004921	181
164	2196	DD	12/12/2022	11/01/2023	1.590.000			2201004922	182
165	2223	DD	12/12/2022	11/01/2023	179.000			2201004923	183
166	2099	DD	12/12/2022	11/01/2023	170.000			2201004924	184
167	2217	DD	15/12/2022	11/01/2023	35.100			2201004925	185
168	2069	DD	15/12/2022	11/01/2023	19.000			2201004926	186
169	2253	DD	16/12/2022	11/01/2023	301.000			2201004927	187
170	2025	NTL	16/12/2022	11/01/2023	474.000			2201004928	129
171	2222	NTL	19/12/2022	11/01/2023	4.200			2201004929	130
172	2172	DD	19/12/2022	11/01/2023	684.000			2201004930	188
173	2055	DD	20/12/2022	11/01/2023	90			2201004931	189
174	2078	NTL	21/12/2022	11/01/2023	1.810.000			2201004932	131

175	2208	NTL	21/12/2022	11/01/2023	13.100			2201004933	132
176	2236	NTL	21/12/2022	11/01/2023	1.200.000			2201004934	133
177	2179	NTL	21/12/2022	11/01/2023	Target Not Detected			2201004935	134
178	2119	DD	21/12/2022	11/01/2023	7.590.000			2201004936	190
179	2140	DD	22/12/2022	11/01/2023	11.700			2201004937	191
180	2020	DD	22/12/2022	11/01/2023	18.100			2201004938	192
181	2008	NTL	27/12/2022	11/01/2023	13.600			2201004939	172
182	2241	DD	28/12/2022	11/01/2023	295.000			2201004940	193
183	2038	DD	28/12/2022	11/01/2023	1.190.000			2201004941	194
184	2212	DD	29/12/2022	11/01/2023	19.400			2201004942	195
185	2175	DD	29/12/2022	11/01/2023	666			2201004943	196
186	2156	DD	30/12/2022	11/01/2023	106.000			2201004944	197
187	2170	DD	30/12/2022	11/01/2023	6.670			2201004945	198
188	2237	DD	04/01/2023	11/01/2023	15.600			2201004946	199
189	2154	NTL	05/01/2023	11/01/2023	304.000			2201004947	135
190	2094	NTL	05/01/2023	11/01/2023	150.000			2201004948	136
191	2192	NTL	06/01/2023	11/01/2023	82.900			2201004949	137
192	2127	NTL	10/01/2023	11/01/2023	38.500			2201004990	138
193	2191	DD	10/01/2023	11/01/2023	< 20			2201004991	200
194	2228	DD	10/01/2023	11/01/2023	493			2201004992	201

195	2005	DD	10/01/2023	11/01/2023	Target Not Detected			2201004993	202
196	2254	DD	10/01/2023	11/01/2023	Target Not Detected			2201004994	203
197	2009	DD	10/01/2023	11/01/2023	129			2201004995	204
198	2074	DD	10/01/2023	11/01/2023	Target Not Detected			2201004996	205
199	2250	NTL	17/01/2023	24/02/2023	2.550.000			2301001001	139
200	2258	NTL	18/01/2023	24/02/2023	11.500			2301001002	140
201	2128	DD	18/01/2023	24/02/2023	18.500			2301001003	206
202	2186	NTL	30/01/2023	24/02/2023	156.000			2301001004	141
203	2104	NTL	31/01/2023	24/02/2023	110.000			2301001005	142
204	2224	NTL	01/02/2023	24/02/2023	454.000			2301001006	143
205	2021	NTL	06/02/2023	24/02/2023	<20			2301001007	144
206	2012	NTL	06/02/2023	24/02/2023	9.390			2301001008	145
207	2125	NTL	06/02/2023	24/02/2023	17.700			2301001009	146
208	2246	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001010	147
209	2083	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001011	148
210	2050	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001012	149
211	2101	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001013	150
212	2207	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001014	151
213	2092	NTL	07/02/2023	08/03/2023	Target not detected			2301001015	152
214	2091	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001016	157

215	2015	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001017	158
216	2102	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001018	159
217	2084	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001019	160
218	2256	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001020	161
219	2183	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001021	162
220	2013	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001022	163
221	2270	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001023	164
222	2062	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001024	165
223	2161	NTL	07/02/2023	24/02/2023	47			2301001025	166
224	2081	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001026	167
225	2142	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001027	168
226	2087	NTL	07/02/2023	24/02/2023	1.360			2301001028	169
227	2022	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001029	170
228	2024	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001030	171
229	2116	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001031	153
230	2162	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001032	154
231	2152	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001033	155
232	2189	NTL	08/02/2023	24/02/2023	119.000			2301001034	156
233	2226	NTL	08/02/2023	24/02/2023	44			2301001035	207
234	2204	NTL	08/02/2023	24/02/2023	clot	08/03/2023	Target not detected	2301001036	208

xix

235	2158	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001037	209
236	2185	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001038	210
237	2203	NTL	08/02/2023	24/02/2023	101			2301001039	211
238	2109	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001040	212
239	2052	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001041	213
240	2110	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001042	214
241	2010	NTL	08/02/2023	24/02/2023	52			2301001043	215
242	2035	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001044	216
243	2267	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001045	217
244	2180	NTL	08/02/2023	24/02/2023	clot	08/03/2023	63.300	2301001046	218
245	2096	NTL	10/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001047	219
246	2145	NTL	10/02/2023	24/02/2023	4.930			2301001048	220
247	2261	NTL	13/02/2023	24/02/2023	100			2301001049	221
248	2004	NTL	15/02/2023	24/02/2023	15.600			2301001050	222
249	2187	NTL	15/02/2023	24/02/2023	31.300			2301001051	223
250	2249	NTL	27/02/2023	08/03/2023	>10 ⁷			2301001152	224

Số TT	Mã mẫu PSC	PKNT lấy mẫu	Ngày lấy mẫu	Ngày xét nghiệm	Kết quả tải lượng HIV-1 lần 1 (bản sao/ml)	Ngày xét nghiệm lại	Kết quả tải lượng HIV-1 lần 2 (bản sao/ml)	Mã NIHE	Mã Movida
1	1086	NTL	05/10/2022	08/11/2022	62.600			2201004503	51
2	1228	NTL	05/10/2022	08/11/2022	1.220	28/03/2023	2.640	2201004504	52
3	1094	NTL	05/10/2022	08/11/2022	24.700			2201004505	53
4	1056	NTL	06/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004506	54
5	1167	NTL	07/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004508	56
6	1020	NTL	07/10/2022	08/11/2022	36.200			2201004509	57
7	1059	NTL	07/10/2022	08/11/2022	60.600			2201004510	58
8	1147	NTL	07/10/2022	08/11/2022	36.600			2201004511	59
9	1064	NTL	07/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004512	60
10	1157	NTL	07/10/2022	08/11/2022	<599			2201004513	61
11	1073	NTL	07/10/2022	08/11/2022	<599			2201004514	62
12	1030	NTL	07/10/2022	08/11/2022	738			2201004515	63
13	1246	NTL	07/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004516	64
14	1070	NTL	07/10/2022	08/11/2022	2.330	28/03/2023	4.750	2201004517	65
15	1114	NTL	07/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004518	66

16	1069	NTL	07/10/2022	08/11/2022	927			2201004519	67
17	1001	NTL	07/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004520	68
18	1219	NTL	07/10/2022	08/11/2022	3.940	28/03/2023	3.840	2201004521	69
19	1199	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004522	70
20	1239	NTL	10/10/2022	08/11/2022	<599			2201004523	71
21	1217	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004524	72
22	1083	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004525	73
23	1023	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004526	74
24	1194	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004527	75
25	1129	NTL	10/10/2022	08/11/2022	<599			2201004528	76
26	1145	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004529	77
27	1084	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004530	78
28	1232	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004531	79
29	1035	NTL	10/10/2022	08/11/2022	327.000			2201004532	80
30	1189	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004533	81
31	1171	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004534	82
32	1015	NTL	10/10/2022	08/11/2022	796	28/03/2023	<599	2201004535	83
33	1005	NTL	10/10/2022	08/11/2022	16.900			2201004536	84
34	1229	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004537	85

35	1077	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004538	86
36	1127	NTL	10/10/2022	08/11/2022	<599			2201004539	87
37	1166	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004540	88
38	1238	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004541	89
39	1209	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004542	90
40	1071	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004543	91
41	1161	NTL	10/10/2022	08/11/2022	<599			2201004544	92
42	1061	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004548	93
43	1184	NTL	10/10/2022	08/11/2022	954			2201004549	94
44	1245	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004550	95
45	1017	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004551	96
46	1170	NTL	10/10/2022	08/11/2022	176.000			2201004552	97
47	1072	NTL	10/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004553	98
48	1027	NTL	11/10/2022	08/11/2022	1.500			2201004554	99
49	1026	NTL	12/10/2022	08/11/2022	<599			2201004555	100
50	1216	NTL	12/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004556	251
51	1103	NTL	12/10/2022	08/11/2022	635			2201004557	252
52	1032	NTL	12/10/2022	08/11/2022	1.140	28/03/2023	1.780	2201004558	253
53	1159	NTL	12/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004559	254

54	1233	NTL	12/10/2022	08/11/2022	840			2201004560	255
55	1128	NTL	12/10/2022	08/11/2022	2.260	28/03/2023	2.480	2201004561	256
56	1076	NTL	12/10/2022	08/11/2022	994			2201004562	257
57	1090	NTL	12/10/2022	08/11/2022	3.640			2201004563	258
58	1012	NTL	13/10/2022	08/11/2022	84.200			2201004564	259
59	1031	NTL	13/10/2022	08/11/2022	clot	28/11/2022	Target not detected	2201004565	260
60	1130	NTL	13/10/2022	08/11/2022	59.700			2201004566	261
61	1109	NTL	14/10/2022	08/11/2022	909.000			2201004567	262
62	1247	NTL	14/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004568	263
63	1097	NTL	17/10/2022	08/11/2022	65.900			2201004569	264
64	1255	NTL	17/10/2022	08/11/2022	4.190			2201004570	265
65	1036	DD	18/10/2022	08/11/2022	61.700			2201004571	1
66	1111	DD	19/10/2022	08/11/2022	1.410.000			2201004572	2
67	1118	DD	19/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004573	3
68	1008	DD	19/10/2022	08/11/2022	23.100			2201004574	4
69	1092	DD	19/10/2022	08/11/2022	538.000			2201004575	5
70	1240	DD	19/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004576	6
71	1046	DD	19/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004577	7
72	1230	DD	19/10/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004578	8
73	1117	DD	19/10/2022	08/11/2022	6.290			2201004579	9

74	1106	DD	21/10/2022	08/11/2022	2.940.000			2201004580	10
75	1172	DD	21/10/2022	08/11/2022	158.000			2201004581	11
76	1266	DD	24/10/2022	07/11/2022	15.000			2201004462	12
77	1254	DD	24/10/2022	07/11/2022	11.800			2201004463	13
78	1190	DD	24/10/2022	07/11/2022	97.600			2201004464	14
79	1248	DD	24/10/2022	07/11/2022	604.000			2201004465	15
80	1058	NTL	24/10/2022	07/11/2022	11.900			2201004466	267
81	1033	DD	26/10/2022	07/11/2022	27.400			2201004467	16
82	1019	DD	28/10/2022	07/11/2022	Target not detected			2201004468	17
83	1049	DD	28/10/2022	07/11/2022	8.760.000			2201004469	18
84	1065	DD	28/10/2022	07/11/2022	32.400			2201004470	19
85	1062	NTL	28/10/2022	07/11/2022	10.300			2201004471	241
86	1133	NTL	28/10/2022	07/11/2022	>10 ⁷			2201004472	266
87	1250	NTL	28/10/2022	07/11/2022	613.000			2201004473	269
88	1081	NTL	28/10/2022	07/11/2022	14.200			2201004474	242
89	1063	NTL	31/10/2022	07/11/2022	Target not detected			2201004475	243
90	1143	NTL	31/10/2022	07/11/2022	1.260			2201004476	244
91	1025	NTL	31/10/2022	07/11/2022	Target not detected			2201004477	245
92	1267	NTL	31/10/2022	07/11/2022	Target not detected			2201004478	246
93	1163	NTL	31/10/2022	07/11/2022	Target not detected			2201004479	247

XXV

94	1101	NTL	31/10/2022	07/11/2022	218.000	28/03/2023	241.000	2201004480	248
95	1002	NTL	31/10/2022	07/11/2022	28.100			2201004481	249
96	1191	DD	31/10/2022	07/11/2022	42.900			2201004482	20
97	1260	DD	31/10/2022	08/11/2022	18.400			2201004582	21
98	1004	DD	31/10/2022	08/11/2022	clot	28/11/2022	690.000	2201004583	22
99	1257	DD	01/11/2022	08/11/2022	2.050			2201004584	23
100	1119	NTL	01/11/2022	08/11/2022	clot	28/11/2022	Target not detected	2201004585	101
101	1089	NTL	01/11/2022	08/11/2022	clot	28/11/2022	Target not detected	2201004586	102
102	1138	NTL	01/11/2022	08/11/2022	<599			2201004587	250
103	1141	NTL	02/11/2022	08/11/2022	Target not detected			2201004588	103
104	1132	NTL	02/11/2022	08/11/2022	880			2201004589	104
105	1256	DD	04/11/2022	08/11/2022	44.300			2201004590	24
106	1115	NTL	07/11/2022	08/11/2022	5.770			2201004591	105
107	1096	NTL	07/11/2022	08/11/2022	2.300	28/03/2023	2.360	2201004592	106
108	1168	NTL	07/11/2022	08/11/2022	20.100			2201004593	107
109	1264	DD	08/11/2022	28/11/2022	36.400			2201004806	25
110	1265	DD	08/11/2022	28/11/2022	7.420.000			2201004807	26
111	1125	DD	08/11/2022	28/11/2022	2.190.000			2201004808	27
112	1263	NTL	08/11/2022	28/11/2022	762.000			2201004809	108
113	1082	NTL	08/11/2022	28/11/2022	96.000			2201004810	109

114	1148	DD	09/11/2022	28/11/2022	940			2201004811	28
115	1054	DD	09/11/2022	28/11/2022	501.000			2201004812	29
116	1225	DD	09/11/2022	28/11/2022	642.000			2201004813	30
117	1155	DD	09/11/2022	28/11/2022	5.110.000			2201004814	31
118	1192	NTL	09/11/2022	28/11/2022	58.700			2201004815	110
119	1098	NTL	09/11/2022	28/11/2022	Target not detected			2201004816	111
120	1055	NTL	09/11/2022	28/11/2022	85.900			2201004817	112
121	1146	NTL	10/11/2022	28/11/2022	734			2201004818	113
122	1203	NTL	10/11/2022	28/11/2022	125.000			2201004819	114
123	1153	NTL	10/11/2022	28/11/2022	<20			2201004820	115
124	1043	DD	14/11/2022	28/11/2022	276.000			2201004821	32
125	1034	DD	14/11/2022	28/11/2022	53.200			2201004822	33
126	1014	DD	14/11/2022	28/11/2022	70.600			2201004823	34
127	1016	DD	14/11/2022	28/11/2022	247.000	28/03/2023	204.000	2201004824	35
128	1120	NTL	14/11/2022	28/11/2022	33.700			2201004825	116
129	1112	NTL	15/11/2022	28/11/2022	3.820	28/03/2023	1.010	2201004826	117
130	1177	NTL	15/11/2022	28/11/2022	419.000			2201004827	118
131	1113	DD	16/11/2022	28/11/2022	6.470			2201004828	36
132	1149	DD	16/11/2022	28/11/2022	4.260			2201004829	37
133	1066	DD	16/11/2022	28/11/2022	1.120.000			2201004830	38

134	1180	DD	16/11/2022	28/11/2022	29.800			2201004831	39
135	1029	NTL	17/11/2022	28/11/2022	75.000			2201004832	119
136	1075	NTL	17/11/2022	28/11/2022	20.200			2201004833	120
137	1261	NTL	18/11/2022	28/11/2022	190.000			2201004834	121
138	1021	NTL	18/11/2022	28/11/2022	59.200			2201004835	122
139	1162	DD	18/11/2022	28/11/2022	1.040			2201004836	40
140	1253	DD	18/11/2022	28/11/2022	17.200			2201004837	41
141	1053	DD	18/11/2022	28/11/2022	67.600			2201004838	42
142	1048	NTL	21/11/2022	28/11/2022	4.070			2201004839	123
143	1237	NTL	22/11/2022	28/11/2022	206.000			2201004840	124
144	1158	NTL	22/11/2022	28/11/2022	297.000			2201004841	125
145	1160	DD	23/11/2022	28/11/2022	1.720			2201004842	43
146	1201	DD	23/11/2022	28/11/2022	13.800			2201004843	44
147	1093	DD	23/11/2022	28/11/2022	1.150.000			2201004844	45
148	1079	DD	24/11/2022	28/11/2022	5.050.000			2201004845	46
149	1269	DD	24/11/2022	28/11/2022	828.000			2201004846	47
150	1044	NTL	25/11/2022	28/11/2022	3.010.000			2201004848	175
151	1152	DD	25/11/2022	28/11/2022	765			2201004849	49
152	1243	DD	28/11/2022	11/01/2023	63.100	05/04/2023	55.700	2201004950	50
153	1259	NTL	28/11/2022	11/01/2023	2.240	05/04/2023	1.120	2201004951	126

xxviii

154	1174	DD	28/11/2022	11/01/2023	Target Not Detected			2201004952	176
155	1142	DD	29/11/2022	11/01/2023	Target Not Detected			2201004953	177
156	1107	DD	29/11/2022	11/01/2023	7.200			2201004954	178
157	1173	NTL	30/11/2022	11/01/2023	44.200	05/04/2023	33.200	2201004955	174
158	1022	NTL	01/12/2022	11/01/2023	<599			2201004956	173
159	1139	DD	05/12/2022	11/01/2023	1.030			2201004957	179
160	1085	DD	05/12/2022	11/01/2023	2.270.000			2201004958	180
161	1095	NTL	09/12/2022	11/01/2023	6.040	05/04/2023	4.740	2201004959	127
162	1175	NTL	12/12/2022	11/01/2023	53.200	05/04/2023	64.000	2201004960	128
163	1154	DD	12/12/2022	11/01/2023	13.600			2201004961	181
164	1067	DD	12/12/2022	11/01/2023	3.180.000	05/04/2023	2.450.000	2201004962	182
165	1105	DD	12/12/2022	11/01/2023	149.000	05/04/2023	150.000	2201004963	183
166	1193	DD	12/12/2022	11/01/2023	342.000	05/04/2023	198.000	2201004964	184
167	1204	DD	15/12/2022	11/01/2023	100.000			2201004965	185
168	1121	DD	15/12/2022	11/01/2023	53.800			2201004966	186
169	1179	DD	16/12/2022	11/01/2023	244.000			2201004967	187
170	1102	NTL	16/12/2022	11/01/2023	1.120.000			2201004968	129
171	1178	NTL	19/12/2022	11/01/2023	4.380			2201004969	130

xxix

172	1052	DD	19/12/2022	11/01/2023	597.000	05/04/2023	893.000	2201004970	188
173	1212	DD	20/12/2022	11/01/2023	Target Not Detected			2201004971	189
174	1018	NTL	21/12/2022	11/01/2023	1.840.000			2201004972	131
175	1108	NTL	21/12/2022	11/01/2023	7.190	05/04/2023	11.200	2201004973	132
176	1236	NTL	21/12/2022	11/01/2023	1.290.000	05/04/2023	918.000	2201004974	133
177	1039	NTL	21/12/2022	11/01/2023	Target Not Detected			2201004975	134
178	1135	DD	21/12/2022	11/01/2023	9.400.000	05/04/2023	7.800.000	2201004976	190
179	1041	DD	22/12/2022	11/01/2023	12.300	05/04/2023	13.300	2201004977	191
180	1251	DD	22/12/2022	11/01/2023	24.200	05/04/2023	22.600	2201004978	192
181	1213	NTL	27/12/2022	11/01/2023	8.140	05/04/2023	9.950	2201004979	172
182	1151	DD	28/12/2022	11/01/2023	1.030.000			2201004980	194
183	1011	DD	28/12/2022	11/01/2023	486.000			2201004981	193
184	1100	DD	29/12/2022	11/01/2023	17.800	05/04/2023	19.000	2201004982	195
185	1222	DD	29/12/2022	11/01/2023	1.190			2201004983	196
186	1013	DD	30/12/2022	11/01/2023	59.700	05/04/2023	91.500	2201004984	197
187	1223	DD	30/12/2022	11/01/2023	17.400	05/04/2023	14.100	2201004985	198
188	1144	DD	04/01/2023	11/01/2023	12.800	05/04/2023	13.300	2201004986	199
189	1024	NTL	05/01/2023	11/01/2023	230.000	05/04/2023	256.000	2201004987	135

XXX

190	1074	NTL	05/01/2023	11/01/2023	449.000			2201004988	136
191	1003	NTL	06/01/2023	11/01/2023	80.700			2201004989	137
192	1134	NTL	10/01/2023	24/02/2023	115.000			2301001052	138
193	1183	DD	10/01/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001053	200
194	1140	DD	10/01/2023	24/02/2023	2.380			2301001054	201
195	1126	DD	10/01/2023	24/02/2023	1.070			2301001055	202
196	1028	DD	10/01/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001056	203
197	1060	DD	10/01/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001057	204
198	1252	DD	10/01/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001058	205
199	1009	NTL	17/01/2023	24/02/2023	5.360.000			2301001059	139
200	1268	NTL	18/01/2023	24/02/2023	30.000			2301001060	140
201	1087	DD	18/01/2023	24/02/2023	32.400			2301001061	206
202	1131	NTL	30/01/2023	08/03/2023	590.000			2301001062	141
203	1208	NTL	31/01/2023	24/02/2023	239.000			2301001063	142
204	1242	NTL	01/02/2023	24/02/2023	644.000			2301001064	143
205	1040	NTL	06/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001065	144
206	1176	NTL	06/02/2023	24/02/2023	28.900			2301001066	145
207	1221	NTL	06/02/2023	24/02/2023	64.500			2301001067	146

208	1088	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001068	147
209	1165	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001069	148
210	1270	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001070	149
211	1244	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001071	150
212	1181	NTL	07/02/2023	08/03/2023	Target not detected			2301001072	151
213	1123	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001073	152
214	1218	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001074	157
215	1047	NTL	07/02/2023	08/03/2023	Target not detected			2301001075	158
216	1258	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected	28/03/2023	Target not detected	2301001076	159
217	1200	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001077	160
218	1156	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001078	161
219	1235	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001079	162
220	1006	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001080	163
221	1262	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001081	164
222	1249	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001082	165
223	1227	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001083	166
224	1007	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001084	167
225	1205	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001085	168

226	1057	NTL	07/02/2023	24/02/2023	3.620			2301001086	169
227	1220	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001087	170
228	1206	NTL	07/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001088	171
229	1182	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001089	153
230	1215	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001090	154
231	1169	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001091	155
232	1164	NTL	08/02/2023	24/02/2023	117.000			2301001092	156
233	1042	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001093	207
234	1202	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001094	208
235	1234	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001095	209
236	1068	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001096	210
237	1186	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001097	211
238	1197	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001098	212
239	1187	NTL	08/02/2023	28/03/2023	Target not detected			2301001099	213
240	1050	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001100	214
241	1045	NTL	08/02/2023	08/03/2023	<599			2301001101	215
242	1136	NTL	08/02/2023	08/03/2023	Target not detected			2301001102	216
243	1122	NTL	08/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001103	217

244	1226	NTL	08/02/2023	24/02/2023	70.200			2301001104	218
245	1091	NTL	10/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001105	219
246	1099	NTL	10/02/2023	24/02/2023	1.880			2301001106	220
247	1038	NTL	13/02/2023	24/02/2023	Target not detected			2301001107	221
248	1231	NTL	15/02/2023	08/03/2023	16.800			2301001108	222
249	1224	NTL	15/02/2023	08/03/2023	80.900			2301001109	223
250	1078	NTL	27/02/2023	08/03/2023	7.380.000			2301001151	224

Phụ lục 3: Phiếu thu thập thông tin bệnh nhân

Patient Information / Thông tin bệnh nhân

Record ID _____

OPC

- Dong Da
 Dong Anh
 Nam Tu Liem

MOVIDA ID number / Mã số MOVIDA _____

Gender / Giới

- Male/Nam
 Female/Nữ

Age / Tuổi _____

Followed in the OPC from ART initiation / Được theo dõi tại phòng khám ngoại trú (OPC) từ khi bắt đầu khởi liệu điều trị ARV

- No / Không
 Yes / Có

Information at the date of enrolment in MOVIDA /

Thông tin về ngày tham gia vào dự án MOVIDA

Date of enrolment in MOVIDA / Ngày đăng ký tham gia dự án MODIVA _____

Duration on ART / Thời gian điều trị ARV

- Not yet on ART / Chưa điều trị ARV
 1 to 3 months on ART
 >3 months on ART

Date of beginning of the ART combination received at the time of the MOVIDA visit / Ngày bắt đầu điều trị ART vào thời điểm đăng ký tham gia MOVIDA _____

ART combination at the date of enrolment in MOVIDA / Phác đồ điều trị ART vào thời điểm đăng ký tham gia MOVIDA

- 3TC
 TDF
 AZT
 EFV
 NVP
 other

If other, please specify _____

Latest Hepatitis B status /**Tình trạng nhiễm viêm gan B trong lần xét nghiệm gần nhất**Date of last Hepatitis B testing / Ngày xét nghiệm
viêm gan B lần gần đây nhất _____

HBs antigen (HBsAg)

- Negative / âm tính
 Positive / dương tính
 Not done

Latest Hepatitis C status /**Tình trạng nhiễm viêm gan C trong lần xét nghiệm gần nhất**Date of last Hepatitis C testing / Ngày xét nghiệm
viêm gan C lần gần đây nhất _____

Anti-HCV antibodies

- Negative / âm tính Positive / dương
 tính

HCV viral load available

- Negative / âm tính Positive / dương
 tính

If available, HCV viral load level

(copies/mL)

Date of HCV viral load

Technique for HCV viral load

This section is only for patients on ART for >6 months /**Phần này chỉ dành cho bệnh nhân điều trị ARV trên 6 tháng**Date of the first ART combination initiation / Ngày
bắt đầu điều trị ART _____

List of ART molecules received since initiation

- 3TC
 ABC
 d4T
 TDF
 AZT
 EFV
 NVP
 other

If other, please specify

Phụ lục 4. Thư từ Tạp chí và bản thảo công trình công bố



CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM

Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Hà Nội, ngày 17 tháng 10 năm 2024

GIẤY XÁC NHẬN ĐĂNG BÀI BÁO

Trên Tạp chí Y học dự phòng

Tạp chí Y học dự phòng xác nhận bài báo của nhóm tác giả: **Phạm Thị Phương Trâm, Ngô Thị Hồng Hạnh, Lê Thị Hồng Nhung, Nguyễn Anh Tuấn, Đỗ Thị Huyền, Nguyễn Thị Phương Thùy, Mai Thị Bích Hồng, Phạm Hồng Thắng** với tiêu đề là: “**Đặc điểm HIV kháng thuốc trên nhóm bệnh nhân đang điều trị ARV có tải lượng HIV không bị ức chế ở một số cơ sở điều trị tại Hà Nội năm 2022-2023**” đã được phản biện đồng ý đăng trên tạp chí Y học dự phòng.

Bài báo dự kiến được xuất bản trên tập 34, số 6 - tháng 10 năm 2024. Trước khi đăng bài cần được chỉnh sửa hoàn thiện theo các ý kiến của các chuyên gia phản biện và Ban biên tập.

Tạp chí Y học dự phòng kính báo để các tác giả được biết.

Nơi nhận:

- Như trên;
- Lưu tòa soạn TC.

THƯ KÝ TÒA SOẠN

Đỗ Thị Thắm

Đặc điểm HIV kháng thuốc trên nhóm bệnh nhân đang điều trị ARV có tải lượng HIV không bị ức chế ở một số cơ sở điều trị tại Hà Nội năm 2022-2023

Phạm Thị Phương Trâm¹, Ngô Thị Hồng Hạnh¹, Lê Thị Hồng Nhung¹, Nguyễn Anh Tuấn¹, Đỗ Thị Huyền², Nguyễn Thị Phương Thùy³, Mai Thị Bích Hồng⁴, Phạm Hồng Thắng^{1*}

¹Phòng thí nghiệm Tham chiếu Quốc gia về Sinh học phân tử HIV, Khoa HIV/AIDS, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Bệnh viện Đa khoa Đống Đa, Hà Nội

⁴Trung tâm Y tế quận Nam Từ Liêm, Hà Nội

TÓM TẮT

Việt Nam đã đạt kết quả tích cực trong thực hiện chiến lược 95-95-95 về HIV. Tuy nhiên, Tổ chức Y tế Thế giới cảnh báo về sự gia tăng kháng thuốc HIV, đặc biệt ở bệnh nhân điều trị ARV lâu dài, làm giảm hiệu quả điều trị và tăng nguy cơ lây nhiễm mới. Nghiên cứu này nhằm đánh giá tỷ lệ và đặc điểm kháng thuốc HIV ở bệnh nhân đã điều trị trên 6 tháng với tải lượng virus không ức chế tại hai cơ sở điều trị ở Hà Nội. Chúng tôi lựa chọn toàn bộ 20 mẫu bệnh nhân đáp ứng tiêu chí trên từ dự án MOVIDA 1 ter để thực hiện xét nghiệm giải trình tự gen PR-RT và INT nhằm phát hiện đột biến kháng thuốc. Kết quả cho thấy 25,6% (20/78) bệnh nhân đã điều trị trên 6 tháng có tải lượng virus trên 1.000 bản sao/ml; và 65,0% (13/20) có gen đột biến kháng thuốc ở đoạn PR-RT, không ghi nhận đột biến ở đoạn INT. Đặc biệt, 38,5% bệnh nhân mang nhiều đột biến khác nhau, với mức độ kháng cao nhất ở nhóm NNRTI và NRTI như EFV, NVP và 3TC. Sự xuất hiện của virus tái tổ hợp với đoạn PR-RT thuộc phân nhóm CRF01_AE và đoạn INT thuộc phân nhóm B được ghi nhận. Nghiên cứu này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc theo dõi HIV kháng thuốc, tuân thủ các biện pháp nhằm ngăn chặn gia tăng HIV kháng thuốc.

Từ khóa: ARV; HIVDR; HIV

***Tác giả liên hệ: Phạm Hồng Thắng**

Địa chỉ: Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương

SĐT: 09 77.796.1629

Email: pht@nihe.org.vn

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo số liệu từ Bộ Y tế, kết quả thực hiện mục tiêu Chiến lược 95-95-95 tính đến 31/12/2023 của Việt Nam đã đạt những hiệu quả nhất định khi số người nhiễm HIV biết tình trạng nhiễm đạt 88%, số người nhiễm HIV được điều trị thuốc kháng vi rút ARV (anti-retroviral) đạt 88% và số người nhiễm HIV được điều trị ARV và có kết quả xét nghiệm tải lượng vi rút dưới ngưỡng ức chế đạt 98,3% [1]. Kết quả trên cho thấy hiệu quả của chương trình điều trị HIV/AIDS tại Việt Nam.

Tuy nhiên, báo cáo của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) vẫn đưa ra các cảnh báo về việc gia tăng tỷ lệ HIV kháng thuốc trong những năm gần đây liên quan đến việc gia tăng sử dụng các loại thuốc điều trị HIV [2]. Dữ liệu từ chương trình giám sát HIV kháng thuốc của Việt Nam giai đoạn 2017-2018 cho thấy tỷ lệ kháng thuốc mắc phải ADR (acquired HIV drug resistance) ở những bệnh nhân đang điều trị ARV trên 12±3 tháng có tải lượng không ức chế là 74,3% và ở những bệnh nhân điều trị ≥ 48 tháng có tải lượng không ức chế là 88,5% [3]. Tải lượng HIV không bị ức chế được xem là tình trạng bệnh nhân có điều trị ARV nhưng kết quả tải lượng HIV >1000 bản sao/ml và nguyên nhân có thể do bệnh nhân có mang các chủng HIV kháng thuốc. HIV Kháng thuốc ở những bệnh nhân đang điều trị sẽ làm giảm hiệu quả của thuốc trong việc ngăn chặn sự nhân lên của vi rút và làm tăng nguy cơ tử vong. Bên cạnh đó, nếu không ngăn ngừa HIV kháng thuốc có thể lan truyền dẫn đến gia tăng số ca nhiễm HIV và tỷ lệ mắc bệnh.

Hiện nay, theo khuyến cáo của WHO, Việt Nam đang sử dụng phác đồ bậc 1 ưu tiên là sự kết hợp của 3 loại thuốc tenofovir (TDF) - lamivudine (3TC) - dolutegravir (DTG), trong đó DTG là một loại thuốc thuộc nhóm ức chế men tích hợp integrase (INT) được đánh giá là hiệu quả tốt hơn và ít tác phụ hơn. Tại Việt Nam, một số nghiên cứu về tỷ lệ HIV kháng thuốc có báo cáo chưa ghi nhận trường hợp có kháng với DTG nhưng trong báo cáo của WHO 2024 ghi nhận tỷ lệ kháng DTG dao động từ 3,9% đến 8,6% ở một số quốc gia trên thế giới [4].

Giai đoạn 2020-2022, do ảnh hưởng của dịch COVID-19, có thể dẫn đến việc gián đoạn cung cấp các dịch vụ cho những người nhiễm HIV. Một báo cáo cho thấy tác động của dịch COVID-19, các hạn chế đi lại và tình trạng thất nghiệp đã ảnh hưởng đến khả năng tiếp cận thuốc kháng vi-rút ARV [5]. Các gián đoạn trong việc điều trị có thể làm tăng nguy cơ HIV

kháng thuốc.

Vì vậy, chúng tôi đề xuất nghiên cứu đánh giá tỷ lệ HIV kháng thuốc trong nhóm bệnh nhân có tiền sử điều trị HIV trên 6 tháng với tải lượng >1000 bản sao/ml ở hai cơ sở điều trị tại Hà Nội, giai đoạn 2022-2023 đồng thời phân tích một số đặc điểm về HIV kháng thuốc trong nhóm bệnh nhân này.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Bệnh nhân nhiễm HIV đã điều trị ARV >6 tháng và có kết quả tải lượng HIV trên mẫu huyết tương >1000 bản sao/ml. Đây là nhóm bệnh nhân được lựa chọn từ những bệnh nhân tham gia vào nghiên cứu MOVIDA 1 ter, có tiêu chí tuyển chọn từ 18 tuổi trở lên, có kết quả HIV dương tính và đồng ý tham gia vào nghiên cứu.

2.2. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Mẫu được thu thập tại Trung tâm Y tế Nam Từ Liêm và Bệnh viện Đống Đa, Hà Nội Phòng thí nghiệm Tham chiếu Quốc gia về sinh học phân tử HIV, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương là nơi thực hiện các xét nghiệm

Thời gian nghiên cứu từ tháng 10/2022- 4/2024

2.3. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả cắt ngang.

2.4. Cỡ mẫu nghiên cứu

Lựa chọn toàn bộ 20 mẫu bệnh nhân từ tổng số 250 mẫu bệnh nhân trong dự án MOVIDA 1 ter đáp ứng tiêu chí: đã điều trị ARV >6 tháng; có kết quả tải lượng HIV trên mẫu huyết tương >1000 bản sao/ml

2.5. Vật liệu, hóa chất và thiết bị chính

Xét nghiệm tải lượng HIV: thực hiện trên máy Roche Cobas 4800, sử dụng sinh phẩm Cobas HIV-1 test (Roche, Basel, Thụy Sĩ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Xét nghiệm HIV kháng thuốc: thực hiện trên vùng gen *Pol* của vi rút HIV: protease (PR), reverse transcriptase (RT) và integrase (INT).

ARN được tách chiết từ 140 µl mẫu huyết tương bằng bộ kit Qiagen Viral RNA (Qiagen, Hilden, Đức). Phản ứng RT-PCR được thực hiện với 10 µl ARN sản phẩm tách chiết với cặp mồi đặc hiệu, sử dụng enzyme Superscript™ III One-Step RT-PCR Platinum® Hi-Fidelity

Taq (Invitrogen, MA, Hoa Kỳ), theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phản ứng PCR lồng được thực hiện với 2 µl sản phẩm RT-PCR với cặp môi đặc hiệu, sử dụng enzyme AmpliTaq Gold DNA Polymerases (Applied Biosystems, MA, Hoa Kỳ), theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Sản phẩm khuếch đại được kiểm tra trực quan thông qua phương pháp điện di trên gel agarose. Sản phẩm PCR được làm sạch bằng ExoSAP-IT™ Express (Applied Biosystems, MA, Hoa Kỳ). Phản ứng giải trình tự được thực hiện bằng bộ kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, MA, Hoa Kỳ) và được tinh sạch bằng bộ BigDye XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, MA, Hoa Kỳ). Điện di mao quản được tiến hành trên máy ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, MA, Hoa Kỳ)

2.6. Xử lý và phân tích số liệu

Phân tích dữ liệu HIV kháng thuốc: Các trình tự xuôi ngược từ cùng một mẫu được ghép nối bằng phần mềm RECall (Đại học British Columbia, Canada) và được so sánh với trình tự tham chiếu HXB2 (số truy cập NCBI: K03455.1). Các đột biến HIV liên quan đến kháng thuốc và phân nhóm HIV được xác định sử dụng phân tích trên cơ sở dữ liệu HIVdb - Stanford HIV Genotypic Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu>)

Nhập liệu và quản lý số liệu bằng phần mềm REDCap.

Phân tích số liệu sử dụng Excel.

2.7. Đạo đức nghiên cứu

Đề cương nghiên cứu được xét duyệt và thông qua bởi Hội đồng xét duyệt luận văn cao học của của Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam theo Quyết định số 1094/QĐ-HVKHCN ngày 02/10/2023.

III. KẾT QUẢ

3.1. Đặc điểm chung của quần thể tham gia nghiên cứu.

Từ tháng 10 năm 2022 đến tháng 3 năm 2023, tổng cộng 250 người nhiễm HIV đã được tuyển chọn từ hai phòng khám ngoại trú tại Hà Nội, Trung tâm Y tế Nam Từ Liêm và Bệnh viện Đa khoa Đống Đa, để tham gia nghiên cứu (Bảng 1).

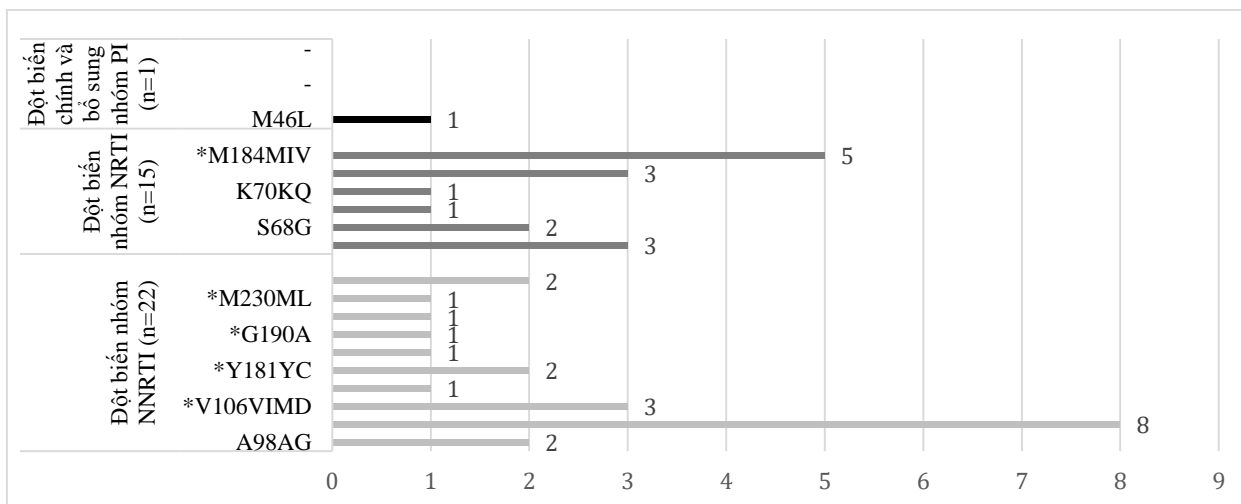
Bảng 1. Đặc điểm người bệnh tham gia nghiên cứu từ hai phòng khám ngoại trú tại Hà Nội, từ tháng 10/2022 – tháng 3/2023

Đặc điểm người bệnh tham gia nghiên cứu (N=250)		Số liệu	
Tuổi (n, %)			
	18 - 24 tuổi	50	20,0
	25 - 49 tuổi	166	66,4
	> 50 tuổi	34	13,6
Giới tính (n, %)			
	Nam	201	80,4
	Nữ	49	19,6
Phòng khám ngoại trú (n, %)			
	Trung tâm Y tế Nam Từ Liêm	170	68,0
	Bệnh viện đa khoa Đống Đa	80	32,0
Kết quả HBsAg gần nhất (n, %)			
	Dương tính	19	7,6
	Âm tính	190	76,0
	Không có thông tin	41	16,4
Kết quả AntiHCV-antibody gần nhất (n, %)			
	Dương tính	28	11,2
	Âm tính	187	74,8
	Không có thông tin	35	14,0
Thời gian điều trị ARV (n, %)			
	Chưa từng điều trị ARV	105	42
	Đã điều trị từ <3 tháng	36	14,4
	Đã điều trị từ 3 - 6 tháng	31	12,4
	Đã điều trị > 6 tháng	78	31,2
Nhóm người bệnh đã điều trị hơn 6 tháng, có tải lượng HIV không bị ức chế (n=20)		Số liệu	
Thời gian từ khi bắt đầu điều trị ARV, năm (Trung bình, min-max)		6,86	0,82 - 16,92

Thời gian từ lần cuối thay đổi phác đồ ARV, năm (Trung bình, min-max)	2,46	0,56 - 6,78
Tải lượng HIV (cp/ml) (n, %)		
1000 - 5000	4	20
5001 - 10.000	2	10
> 10.000	14	70
Phân nhóm HIV trên đoạn gen giải trình tự PRRT (n, %)		
CRF01_AE	20	100
B	0	0
Phân nhóm HIV trên đoạn gen giải trình tự INSTI (n, %)		
CRF01_AE	19	95
B	1	5

Trong số 250 bệnh nhân tham gia nghiên cứu, độ tuổi phổ biến từ 25-49 tuổi, chiếm 66,4% (166/250), nam giới chiếm 80,4% (201/250). Hơn 80% các bệnh nhân tham gia nghiên cứu được xét nghiệm kháng thể kháng HBV và HCV, kết quả cho thấy tỷ lệ bệnh nhân có kháng thể kháng HbsAg và kháng thể kháng HCV lần lượt là 7,6% và 11,2%. 58,0% (145/250) bệnh nhân đã được điều trị thuốc kháng vi rút ARV, trong đó 31,2% (78/145) bệnh nhân có thời gian điều trị trên 6 tháng, với trung bình năm điều trị là 6,86 năm (dao động từ 0,82-16,92 năm). 25% (20/78) bệnh nhân điều trị trên 6 tháng có tải lượng trên 1000 bản sao/ml. Phần lớn các bệnh nhân này có tải lượng vi rút cao trên 10.000 bản sao/ml, chiếm 70,0% (14/20). Kết quả giải trình tự đoạn gen PR-RT cho thấy 100,0% các mẫu bệnh phẩm đều mang vi rút thuộc phân nhóm CRF_01AE, trong khi giải trình tự đoạn gen INT cho thấy có 1 mẫu thuộc phân nhóm B (5,0%) và 19 mẫu thuộc phân nhóm CRF_01AE (95,0%).

3.2.Đặc điểm HIV kháng thuốc trong nhóm bệnh nhân điều trị trên 6 tháng, có tải lượng HIV không bị ức chế



Hình 1. Đột biến kháng thuốc ghi nhận ở 20 bệnh nhân đã điều trị hơn 6 tháng, có kết quả tải lượng HIV >1000 bản sao/ml

“*” Các đột biến chính

Kết quả giải trình tự gen HIV trên đoạn PR-RT và INT cho thấy có 13/20 (65,0%) bệnh nhân có mang gen đột biến kháng một trong các thuốc thuộc nhóm thuốc PI/NRTI/NNRTI, không ghi nhận có đột biến xuất hiện trên đoạn INT. Các đột biến chính được phát hiện và tần số xuất hiện thể hiện tại (Hình 1).

Trong số 13 trường hợp có mang gen đột biến kháng thuốc, có 5 (38,5%) trường hợp mang đồng thời nhiều đột biến khác nhau, có thể gây kháng đồng thời các thuốc thuộc hai nhóm thuốc NRTI và NNRTI. Đột biến xuất hiện phổ biến là đột biến K103KN (n=8), liên quan đến kháng nhóm thuốc ức chế men sao chép ngược non-nucleoside (NNRTI) và M184MIV (n=5), liên quan đến kháng nhóm thuốc ức chế men sao chép ngược nucleoside (NRTI). Ngoài ra, một số đột biến quan trọng khác liên quan đến kháng nhóm thuốc NRTI và NNRTI là K65KR (n=3), M230ML (n=1), G190A (n=1), Y181YC (n=2), V106VIMD (n=3). Đối với nhóm thuốc ức chế men protease (PI), một đột biến bổ sung phát hiện được là M46L (n=1). Mức độ kháng thuốc ARV do các đột biến ghi nhận ở trên được thể hiện trong (Bảng 2). 11/20 (55,0%) trường hợp có mang đột biến kháng thuốc nhóm NNRTI, trong đó có 9/11 (81,8%) trường hợp mang đột biến gây ra mức độ kháng cao với EFV và NVP. 7/ 20 (35,0%) trường hợp mang đột biến kháng thuốc nhóm NRTI, trong đó, mức độ kháng cao được ghi nhận ở các thuốc DDI, ABC, FTC, 3TC, với 6/7 trường hợp (85,7%).

Đối chiếu kết quả kháng thuốc với phác đồ điều trị hiện tại của bệnh nhân tại (Bảng 3), 9/17 (52,9%) bệnh nhân đang điều trị phác đồ bậc 1 có mang đột biến kháng thuốc, 2/3 (66,6%) bệnh nhân đang điều trị phác đồ bậc 2 có mang đột biến kháng thuốc. Trong số các bệnh nhân điều trị phác đồ bậc 1, có 2 trường hợp kháng với cả 3 loại thuốc trong phác đồ điều trị, 2 trường hợp kháng với 2 loại thuốc và 9 trường hợp kháng với các thuốc không nằm trong phác đồ điều trị. Trong các bệnh nhân điều trị phác đồ bậc 2, cả 2 trường hợp có kháng thuốc chỉ kháng với 1 loại thuốc trong phác đồ điều trị.

<i>Dolutegravir (DTG)</i>	0 (0,00)
<i>Elvitegravir (EVG)</i>	0 (0,00)
<i>Raltegravir (RAL)</i>	0 (0,00)

Bảng 3. So sánh giữa đột biến kháng thuốc phát hiện được và phác đồ người nhiễm HIV đang điều trị hiện tại

Phác đồ ARV hiện tại	Số người bệnh						
	Điều trị > 6 tháng	TL > 1000 bản sao/ml	Có kháng thuốc	Kháng với 1 loại thuốc trong phác đồ đang điều trị	Kháng với 2 loại thuốc trong phác đồ đang điều trị	Kháng với 3 loại thuốc trong phác đồ đang điều trị	Kháng với thuốc ngoài phác đồ đang điều trị
<i>Bậc 1</i>	74	17	9	1	2	2	9
TDF/3TC/DTG	26	6	2	0	1	0	2
TDF/3TC/EFV	35	6	4	0	1	2	4
TDF/3TC/LPV/r	5	3	2	0	0	0	2
AZT/3TC/EFV(hoặc NVP)	3	1	0	0	0	0	0
ABC/3TC/EFV	3	1	1	1	0	0	1
D4T/3TC/NVP	1	0	NA	NA	NA	NA	NA
ABC/3TC/LPV/r	1	0	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Bậc 2</i>	4	3	2	2	0	0	2
AZT/3TC/LPV/r	4	3	2	2	0	0	2
Tổng	78	20	11	3	2	2	11

4. BÀN LUẬN

Tổng số 250 bệnh nhân được tuyển chọn trong nghiên cứu này có sự tương đồng về tỷ lệ nam giới và nhóm tuổi với các nghiên cứu được thực hiện tại Việt Nam liên quan đến tình trạng HIV kháng thuốc trước điều trị và HIV kháng thuốc mắc phải [3]. Điểm đáng lưu ý là tỷ lệ người nhiễm HIV nằm trong độ tuổi lao động (25-49 tuổi) vẫn chiếm tỷ lệ cao so với các nhóm tuổi khác, tiếp theo đó là tỷ lệ 20% trong nhóm trẻ 18-24 tuổi. Báo cáo tình hình dịch của Cục phòng chống HIV/AIDS cũng nhấn mạnh vấn đề về sự trẻ hóa độ tuổi người nhiễm HIV đặc biệt trong nhóm MSM [1]. Các trường hợp bệnh nhân có tiền sử điều trị ARV >6 tháng, với thời gian điều trị trung bình là 6,86 năm (dao động từ 0,82-16,92 năm), 25% trong số đó có kết quả tải lượng trên 1000 bản sao /ml. Dữ liệu từ chương trình giám sát kháng thuốc cho thấy tỷ lệ tải lượng không ức chế ở bệnh nhân điều trị ARV trong 12±3 tháng là 4% và trong ≥48 tháng là 1% tại Việt Nam, nhưng dữ liệu chung ở 14 quốc gia cho thấy tỷ lệ này tăng khi bệnh nhân điều trị lâu hơn [6]. Báo cáo năm 2021 tại Ethiopia ghi nhận tỷ lệ không ức chế tải lượng 20,3% cho nhóm bệnh nhân điều trị ARV từ 6 tháng trở lên [7]. CRF01_AE là phân nhóm phổ biến phát hiện được trong nghiên cứu này, phù hợp với dữ liệu về phân nhóm HIV phổ biến tại Việt Nam [6]. Trong nghiên cứu này chúng tôi quan sát thấy có sự xuất hiện của phân nhóm HIV dạng tái tổ hợp CRF01_AE trên đoạn gen PRRT và phân nhóm B trên đoạn gen INT, có thể giải thích bằng sự lưu hành đồng thời của hai phân nhóm CRF01_AE và phân nhóm B, việc nhiễm trùng kép hai phân nhóm có thể là môi trường lý tưởng cho sự tái tổ hợp. Dạng tái tổ hợp CRF01_AE/B đã được báo cáo tại Thái Lan, Malaysia, Trung Quốc, là các quốc gia châu Á gần với Việt Nam và có sự giao thương với Việt Nam [8-10]. Sự xuất hiện của các dạng tái tổ hợp mới có thể là dấu hiệu của một mô hình dịch HIV-1 phức tạp, năng động và có tần suất tái tổ hợp cao, cần có các nghiên cứu để đánh giá về đặc điểm và phân bố các chủng tái tổ hợp mới xuất hiện.

Phác đồ điều trị bậc 1 có DTG hiện đang là phác đồ được khuyến cáo của WHO và Bộ Y tế. Tại Việt Nam hiện chưa ghi nhận báo cáo về trường hợp có kháng thuốc DTG và trong nghiên cứu này không phát hiện trường hợp nào mang gen đột biến kháng thuốc trên đoạn INT. Các đột biến trên đoạn gen PR-RT đã được ghi nhận nhiều trong các nghiên cứu về HIV kháng thuốc tại Việt Nam. Trong báo cáo của chúng tôi, tỷ lệ kháng thuốc mắc phải ADR là 65%, thấp hơn so với dữ liệu giám sát HIV kháng thuốc năm 2020 (74,3% ở 12±3 tháng). Sự khác

biệt này có thể liên quan đến mốc thời gian đánh giá khi chúng tôi đánh giá trên những bệnh nhân điều trị > 6 tháng, ngắn hơn mốc 12 tháng của chương trình giám sát kháng thuốc [3]. Các đột biến chính **K103KN**, **M184MIV** được phát hiện là những đột biến phổ biến. **K103N** được cảnh báo gây ra tình trạng kháng cao với EFV và NVP. **M184VI** mặc dù gây ra kháng cao với 3TC, FTC và kháng ABC ở mức độ thấp/trung bình, nhưng đột biến này lại làm tăng tính nhạy cảm với TDF và AZT và làm giảm sự nhân lên của HIV. Có hai trường hợp có mang đột biến **V106I** nhưng không thể hiện tính kháng với các thuốc thuộc nhóm NNRTI, tuy nhiên khi kết hợp với các đột biến như **V179D** có thể làm giảm nhạy cảm của các thuốc NVP, EFV, ETR và có thể là RPV [11].

Ngoài phác đồ bậc 1 TDF/3TC/DTG, phác đồ thay thế khác đang được sử dụng nhiều trong nghiên cứu của chúng tôi có TDF/3TC/EFV. Đây cũng là phác đồ được sử dụng phổ biến tại Việt Nam trước khi đưa DTG vào phác đồ ưu tiên. Với các bệnh nhân sử dụng phác đồ này chúng tôi ghi nhận hai bệnh nhân có đột biến kháng cả 3 loại thuốc trong phác đồ, tải lượng của các bệnh nhân này là 10.800 và 150.000 bản sao/ml. Tổ chức Y tế thế giới đã nhấn mạnh về mức độ kháng cao với các thuốc nhóm NNRTI và NRTI ở các trường hợp thất bại vì rút học và đưa ra khuyến cáo về tầm quan trọng của tuân thủ điều trị [6]. 7/20 trường hợp có tải lượng HIV >1000 bản sao/ml nhưng chưa ghi nhận có đột biến kháng thuốc. Tư vấn tuân thủ điều trị ở những bệnh nhân này sẽ mang lại hiệu quả điều trị và giảm nguy cơ kháng thuốc.

Hạn chế của nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại hai cơ sở điều trị, trên một cỡ mẫu nhỏ so với lượng bệnh nhân đang điều trị trên địa bàn Hà Nội, do vậy có thể chưa phản ánh hết các đặc điểm kháng thuốc trên những bệnh nhân đang điều trị ARV tại Hà Nội.

Kết quả chỉ được thực hiện trên những bệnh nhân đang điều trị trong khi thông tin về kháng thuốc trước điều trị và kháng thuốc lây truyền cũng là những thông tin quan trọng để có thể khái quát toàn cảnh HIV kháng thuốc.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã chỉ ra những điểm quan trọng, có ý nghĩa cho việc thực hiện các nghiên cứu mở rộng về HIV, cũng như nhấn mạnh thêm tầm quan trọng của việc theo dõi HIV kháng thuốc, tuân thủ các giải pháp nhằm ngăn chặn sự xuất hiện và gia tăng HIV kháng thuốc. Cụ thể: 25,6% (20/78) bệnh nhân điều trị trên 6 tháng có tải lượng trên 1000 bản sao/ml; 65,0%

(13/20) bệnh nhân có mang gen đột biến kháng thuốc xuất hiện trên đoạn PR-RT kháng các thuốc thuộc nhóm thuốc PI/NRTI/NNRTI, không ghi nhận có đột biến xuất hiện trên đoạn INT; 38,5% trường hợp mang đồng thời nhiều đột biến khác nhau, mức độ kháng cao ghi nhận ở các thuốc nhóm NNRTI và NRTI như EFV, NVP và 3TC; Có sự xuất hiện của dạng tái tổ hợp với đoạn PR-RT thuộc phân nhóm CRF01_AE và đoạn INT thuộc phân nhóm B.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương, Cục Phòng, chống HIV/AIDS, Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Bệnh viện Đa khoa Đống Đa, Trung tâm Y tế Nam Từ Liêm, Viện Pasteur Paris, Pháp và đặc biệt là những người tham gia nghiên cứu đã giúp chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

Học viên cao học Phạm Thị Phương Trâm được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số VINIF.2023.ThS.140.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Quyết định 612/QĐ-BYT, ngày 14/3/2024, Ban hành Kế hoạch phòng, chống HIV/AIDS năm 2024. 2024.
2. WHO. HIV Drug resistance. Ngày truy cập: 25/09/2024. <https://www.who.int/teams/global-hiv-hepatitis-and-stis-programmes/hiv/treatment/hiv-drug-resistance>.
3. Dat VQ, Anh NTL, Van NK, et al. The prevalence of pre-treatment and acquired HIV drug resistance in Vietnam: a nationally representative survey, 2017-2018. *J Int AIDS Soc.* 2022;25(2):e25857.
4. WHO. New report documents increase in HIV drug resistance to dolutegravir. Ngày truy cập: 25/09/2024. <https://www.who.int/news/item/05-03-2024-new-report-documents-increase-in-hiv-drug-resistance-to-dolutegravir>.
5. Tran NK, Vu BN, DeSilva MB. Impacts of the COVID-19 Pandemic on People Living with HIV Who Are Members of Vulnerable Groups in Vietnam. *AIDS Behav.* 2022;26(9):2855-65.
6. WHO. HIV drug resistance report. 2021.
7. Waju B, Dube L, Ahmed M, Assefa SS. Unsuppressed Viral Load Level in Public Health Facilities: Nonvirological Predictors among Adult Antiretroviral Therapy Users in Southwestern Ethiopia. *HIV AIDS (Auckl).* 2021;13:513-26.
8. Ramos A, Nguyen L, Hu DJ, et al. New HIV type 1 CRF01_AE/B recombinants displaying

unique distribution of breakpoints from incident infections among injecting drug users in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2003;19(8):667-74.

9. Wang B, Lau KA, Ong LY, et al. Complex patterns of the HIV-1 epidemic in Kuala Lumpur, Malaysia: evidence for expansion of circulating recombinant form CRF33_01B and detection of multiple other recombinants. *Virology*. 2007;367(2):288-97.

10. Ou W, Li K, Feng Y, et al. Characterization of a New HIV-1 CRF01_AE/B Recombinant Virus Form Among Men Who Have Sex with Men in Shanghai, China. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2019;35(4):414-8.

11. NNRTI Resistance Notes. Ngày truy cập: 25/09/2024 <https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/nnrti/#v106a.m.i>.

Characteristics of HIV drug resistance in ARV-treated patients with unsuppressed viral load at outpatient clinics in Hanoi, 2022-2023

Pham Thi Phuong Tram¹, Ngo Thi Hong Hanh¹, Le Thi Hong Nhung¹, Nguyen Anh Tuan¹, Do Thi Huyen², Nguyen Thi Phuong Thuy³, Mai Thi Bich Hong⁴, Pham Hong Thang¹

¹National Reference Laboratory of HIV/AIDS Molecular Biology, HIV/AIDS Department, National Institute of Hygiene and Epidemiology

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

³Dong Da General hospital, Hanoi

⁴Nam Tu Liem Medical centre, Hanoi

Vietnam has achieved positive results in implementing the 95-95-95 strategy for HIV. However, the World Health Organization warns of an increase in HIV drug resistance, particularly among patients undergoing long-term ARV treatment, which reduces treatment effectiveness and increases the risk of new infections. This study aims to evaluate the percentage and characteristics of HIV drug resistance in patients who have been treated for over six months with unsuppressed viral load at two outpatient clinics in Hanoi. We selected all 20 patient samples meeting above criteria from the MOVIDA 1 ter project to perform sequencing test on the PR-RT and INT gene segments to detect drug resistance mutations. The results showed that 25.6% (20/78) of treated patients had a viral load above 1,000 copies/ml, and 65.0% (13/20) had drug resistance mutations in the PR-RT region, with no mutations detected in the INT region. Notably, 38.5% of patients carried multiple mutations, with the highest resistance levels observed in NNRTI and NRTI group such as EFV, NVP, and 3TC. The present of recombinant viruses with the PR-RT belonging to the CRF01_AE subtype and the INT from the B subtype was noted. This study underscores the importance of monitoring HIV drug resistance and adhering to measures to prevent the increase of HIV drug resistance.

Keywords: ARV; HIVDR; HIV



Phạm Trâm <trampham.nihe@gmail.com>

TR: PLOS ONE Decision: Revision required [PONE-D-24-27626] - [EMID:bba47c9a011aa90b]

Yoann MADEC <yoann.madec@pasteur.fr>

lúc 22:19 10 tháng 10, 2024

Đến: Phạm Hồng Thang <pht@nihe.org.vn>, Nguyễn Anh Tuấn <nat@nihe.org.vn>, "ngohanh_85@yahoo.com" <ngohanh_85@yahoo.com>, Phạm Trâm <trampham.nihe@gmail.com>, Hồng Nhung Lê <hongnhungnihe@gmail.com>

Dear all,

We have received the decision from PLOS one.

The MOVIDA 1 ter manuscript must be modified to fulfil criteria for publication.

However, comments are manageable and we should see the paper published soon.

Feel free to read the comments from the 4 reviewers (at the bottom of this message) and share with me your answers.

Best regards,

Yoann

De : em.pone.0.8ea5e3.5828fa17@editorialmanager.com <em.pone.0.8ea5e3.5828fa17@editorialmanager.com> **De la part de** PLOS ONE

Envoyé : jeudi 10 octobre 2024 17:10

À : Yoann MADEC <yoann.madec@pasteur.fr>

Objet : PLOS ONE Decision: Revision required [PONE-D-24-27626] - [EMID:bba47c9a011aa90b]

PONE-D-24-27626

Evaluation of the cobra plasma separation card to identify HIV-infected patients in virological failure in real-life conditions in Vietnam

PLOS ONE

Dear Dr. Madec,

Thank you for submitting your manuscript to PLOS ONE. After careful consideration, we feel that it has merit but does not fully meet PLOS ONE's publication criteria as it currently stands. Therefore, we invite you to submit a revised version of the manuscript that addresses the points raised during the review process.

The manuscript has been assessed by four reviewers and their comments are available below. They have provided suggestions on how to strengthen the manuscript. Please review their comments and make the appropriate revisions.

Please submit your revised manuscript by Nov 23 2024 11:59PM. If you will need more time than this to complete your

revisions, please reply to this message or contact the journal office at plosone@plos.org. When you're ready to submit your revision, log on to <https://www.editorialmanager.com/pone/> and select the 'Submissions Needing Revision' folder to locate your manuscript file.

Please include the following items when submitting your revised manuscript:

- A rebuttal letter that responds to each point raised by the academic editor and reviewer(s). You should upload this letter as a separate file labeled 'Response to Reviewers'.
- A marked-up copy of your manuscript that highlights changes made to the original version. You should upload this as a separate file labeled 'Revised Manuscript with Track Changes'.
- An unmarked version of your revised paper without tracked changes. You should upload this as a separate file labeled 'Manuscript'.

If you would like to make changes to your financial disclosure, please include your updated statement in your cover letter. Guidelines for resubmitting your figure files are available below the reviewer comments at the end of this letter.

If applicable, we recommend that you deposit your laboratory protocols in protocols.io to enhance the reproducibility of your results. Protocols.io assigns your protocol its own identifier (DOI) so that it can be cited independently in the future. For instructions see: <https://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines#loc-laboratory-protocols>. Additionally, PLOS ONE offers an option for publishing peer-reviewed Lab Protocol articles, which describe protocols hosted on protocols.io. Read more information on sharing protocols at https://plos.org/protocols?utm_medium=editorial-email&utm_source=authorletters&utm_campaign=protocols.

We look forward to receiving your revised manuscript.

Kind regards,

Emma Campbell, Ph.D
Staff Editor
PLOS ONE

Journal Requirements:

When submitting your revision, we need you to address these additional requirements.

1. Please ensure that your manuscript meets PLOS ONE's style requirements, including those for file naming. The PLOS ONE style templates can be found at https://journals.plos.org/plosone/s/file?id=wjVg/PLOSONe_formatting_sample_main_body.pdf and https://journals.plos.org/plosone/s/file?id=ba62/PLOSONe_formatting_sample_title_authors_affiliations.pdf

2. We suggest you thoroughly copyedit your manuscript for language usage, spelling, and grammar. If you do not know anyone who can help you do this, you may wish to consider employing a professional scientific editing service.

The American Journal Experts (AJE) (<https://www.aje.com/>) is one such service that has extensive experience helping authors meet PLOS guidelines and can provide language editing, translation, manuscript formatting, and figure formatting to ensure your manuscript meets our submission guidelines. Please note that having the manuscript copyedited by AJE or any other editing services does not guarantee selection for peer review or acceptance for publication.

Upon resubmission, please provide the following:

The name of the colleague or the details of the professional service that edited your manuscript

A copy of your manuscript showing your changes by either highlighting them or using track changes (uploaded as a *supporting information* file)

A clean copy of the edited manuscript (uploaded as the new *manuscript* file)

3. Thank you for stating the following financial disclosure:
"The authors have declared that no competing interests exist."

Please state what role the funders took in the study. If the funders had no role, please state: ""The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.""

If this statement is not correct you must amend it as needed.

Please include this amended Role of Funder statement in your cover letter; we will change the online submission form on your behalf.

4. Thank you for stating the following in the Acknowledgments Section of your manuscript:
"We would like to thank Professor Diane Descamps and Dr Florence Damond for the valuable discussions and their reading of the manuscript. We would like to thank Roche diagnostics for providing HIV assays, consumables and funding for the study."

We note that you have provided funding information that is currently declared in your Funding Statement. However, funding information should not appear in the Acknowledgments section or other areas of your manuscript. We will only publish funding information present in the Funding Statement section of the online submission form.

Please remove any funding-related text from the manuscript and let us know how you would like to update your Funding Statement. Currently, your Funding Statement reads as follows:

"The study was funded by Roche diagnostics"

Please include your amended statements within your cover letter; we will change the online submission form on your behalf.

Additional Editor Comments:

One or more reviewers has recommended that you cite specific previously published works. As always, we recommend that you please review and evaluate the requested works to determine whether they are relevant and should be cited. It is not a requirement to cite these works. We appreciate your attention to this request.

[Note: HTML markup is below. Please do not edit.]

Reviewers' comments:

Reviewer's Responses to Questions

Comments to the Author

1. Is the manuscript technically sound, and do the data support the conclusions?

The manuscript must describe a technically sound piece of scientific research with data that supports the conclusions. Experiments must have been conducted rigorously, with appropriate controls, replication, and sample sizes. The conclusions must be drawn appropriately based on the data presented.

Reviewer #1: Yes

Reviewer #2: Yes

Reviewer #3: Partly

Reviewer #4: Yes

2. Has the statistical analysis been performed appropriately and rigorously?

Reviewer #1: Yes

Reviewer #2: Yes

Reviewer #3: No

Reviewer #4: Yes

3. Have the authors made all data underlying the findings in their manuscript fully available?

The [PLOS Data policy](#) requires authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available without restriction, with rare exception (please refer to the Data Availability Statement in the manuscript PDF file). The data should be provided as part of the manuscript or its supporting information, or deposited to a public repository. For example, in addition to summary statistics, the data points behind means, medians and variance measures should be available. If there are restrictions on publicly sharing data—e.g. participant privacy or use of data from a third party—those must be specified.

Reviewer #1: Yes

Reviewer #2: No

Reviewer #3: Yes

Reviewer #4: Yes

4. Is the manuscript presented in an intelligible fashion and written in standard English?

PLOS ONE does not copyedit accepted manuscripts, so the language in submitted articles must be clear, correct, and unambiguous. Any typographical or grammatical errors should be corrected at revision, so please note any specific errors here.

Reviewer #1: Yes

Reviewer #2: Yes

Reviewer #3: Yes

Reviewer #4: No

5. Review Comments to the Author

Please use the space provided to explain your answers to the questions above. You may also include additional comments for the author, including concerns about dual publication, research ethics, or publication ethics. (Please upload your review as an attachment if it exceeds 20,000 characters)

Reviewer #1: Thank you for allowing me to review this important manuscript. It is timely especially as countries are striving to reach epidemic control and useful for programs to review especially in countries where it is challenging to monitor plasma viral load due to courier/transport issues and existing infrastructure. VL monitoring is critical for management of PLHIV on ART and the use of PSC was shown to have a sensitivity of 99.2% which is really important in terms of identifying clients with VL>1000copies/ml. The authors have been rigorous with the documentation of the process and the methods.

There are a few minor grammatical corrections that need to be reviewed and if the limitation could be documented, that would really add to the well written manuscript.

Reviewer #2: This manuscript is well written and points to advancements in HIV monitoring using diagnostic tests that address the challenges faced when using the gold standard. The PSC has been evaluated in SSA settings and this study adds to the growing evidence of using PSC as a formidable alternative to EDTA plasma in resource scarce settings. I have a few comments for clarity and consideration.

1. The references from South Africa are laboratory evaluations but there is a recent paper in South Africa evaluated PSC in real time settings. Chimoyi L, Hans L, Oladimeji M, Kindra G, Diallo K, Ayalew K, Setswe GK, Carmona S. Assessment of the performance of the plasma separation card for HIV-1 viral load monitoring in South Africa. *J Clin Microbiol.* 2024 Apr 10;62(4):e0164923. doi: 10.1128/jcm.01649-23. Epub 2024 Mar 12. PMID: 38470024; PMCID: PMC11026085. The authors should consider including the findings in the discussion while comparing and contrasting their findings.

2. The beauty of the PSC is that it eliminates the need for cold chain, the authors have mentioned that they chose to freeze some samples. It is not very clear why this was necessary although the findings showed that there was no difference in the specificity and sensitivity with the unfrozen samples.

3. What was the mean viral load of the patients enrolled? I was expecting to see this indicator summarized in the participant/patient description (Lines 153-155)?

4. The paragraph (from Line 282) on cost-effectiveness seems misplaced. This study did not assess cost-effectiveness, and it is not clear why the authors chose to include this in the discussion. I would suggest removing this.

5. The authors mentioned that the PSC samples were processed seven days after they were received and those not tested frozen. How long were the samples frozen for before testing?

Reviewer #3: Editor's Review of Manuscript- PONE-D-24-27626

Title: Evaluation of the Cobas plasma separation card to identify HIV-infected patients in virological failure in real-life conditions in Vietnam

This study evaluates the use of Plasma Separation cards (PSC) for potential use in HIV viral load testing to increase viral load testing/ scale-up in settings where handling of plasma samples proves difficult. However, while this study outcome remains important in contributing to the WHO target of 95-95-95, there are gaps identified in this review as follows.

The study design is consistent with the approach taken by the study. The sample size is appropriate to answer the set performance characteristics on sensitivity and specificity.

1. Abstract: The authors have not clearly described how they arrived at the results presented. i.e. how sample size and criteria were used in obtaining the 250 samples.

2. The reviewer has noted inconsistencies in the flow of the manuscript making it difficult for the reader to keep up with the content flow and interpretation of the results; see lines 109-113 and 156-169.
3. Statements on failed viral load results or recollected samples can be presented in a simple manner so as not to lose the reader.
4. The statement on the input sample for DPS was 140µl of whole blood is unclear; was 2 or 1 PSC used? It is unknown how much of the plasma is contained in the two DPS or single DPS used for testing. Is there a formula that compensates for the volume of DPS when compared to plasma samples?
5. The reviewer has noted that the authors refer to a possible reason for the upward misclassification of the DPS viral load. Was the study designed to answer questions on cross-contamination? Was the study also designed to answer questions on the stability of DPS compared to plasma?
6. This study has identified limitations with the use of DPS, especially over quantitation of viral load for certain viral threshold ≤ 1000 cp/ml which has not categorically been mentioned in the text.
7. Tables and figure titles do not explicitly describe themselves. The same applies to the legends.
8. The Figure 1 title is not well aligned with the content in the figure and no description in the legend.
9. Results presented in Table 3 and Table 4 are inconsistent with the study methods. No mention of how the data was obtained and analyzed.
10. While this study remains important in improving access to VL through the use of PSC, there are similar studies previously conducted on the same and equally referenced by the authors. What is new about this study compared to Kiyaga C, et al 2023 published in PLOS Glob Public Health?

While statistical analysis on sensitivity and specificity have been done, the authors based the study findings on consensus outcome only.

Reviewer #4: The manuscript introduction, methods and results are well written overall, although some minor revision is suggested:

Line 68 - use of "However" no confusing - it may be better to simply state that POC devices exist. The info is correct.

Line 71 - a reference re cost, etc., of POC would be good.

Please review the methods to ensure scientific language throughout the manuscript - most is acceptable, but a final review may be useful.

Some short paragraphs in methods and results could be combined for smoother flow.

Line 112 - could ambient temperature over the time be given?

Line 113 - what should be which.

Line 129 - Please check LOD for the PSC - my documents say 738cp/mL.

Lines 197-199 - the forceps cleaning could be listed in methods.

Line 223 - is the argument not that poorer sensitivity (false negatives) is MORE of an issue than poor specificity?

It may be useful to contrast and reference Chimoyi et al, J Clin Microbiol. 2024 Apr; 62(4): e01649-23 - they found near-perfect specificity and lower sensitivity (as well as the laboratory staff finding the process onerous). They also refer to a VL of 1,337 cp/mL at the discrepancy level.

Was freeze-thaw of plasma samples considered for the differences around 1000cp/mL? Was there any difference noted around those that were concordant vs those discordant and freezing vs tested fresh?

Line 267-269 - Rephrase sentence.

The discussion has good information, but a style review is highly recommended as it does not read as well as the earlier sections.

6. PLOS authors have the option to publish the peer review history of their article ([what does this mean?](#)). If published, this will include your full peer review and any attached files.

If you choose "no", your identity will remain anonymous but your review may still be made public.

Do you want your identity to be public for this peer review? For information about this choice, including consent withdrawal, please see our [Privacy Policy](#).

Reviewer #1: No

Reviewer #2: No

Reviewer #3: No

Reviewer #4: No

[NOTE: If reviewer comments were submitted as an attachment file, they will be attached to this email and accessible via the submission site. Please log into your account, locate the manuscript record, and check for the action link "View Attachments". If this link does not appear, there are no attachment files.]

While revising your submission, please upload your figure files to the Preflight Analysis and Conversion Engine (PACE) digital diagnostic tool, <https://pacev2.apexcovantage.com/>. PACE helps ensure that figures meet PLOS requirements. To use PACE, you must first register as a user. Registration is free. Then, login and navigate to the UPLOAD tab, where you will find detailed instructions on how to use the tool. If you encounter any issues or have any questions when using PACE, please email PLOS at figures@plos.org. Please note that Supporting Information files do not need this step.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. ([Remove my information/details](#)). Please contact the publication office if you have any questions.

 **Reviewer_PONE-D-24-27626_.docx**
17K

1 **Evaluation of the cobas® plasma separation card to identify HIV-infected patients in virological**
2 **failure in real-life conditions in Vietnam**

3

4 **Hanh Thi Hong NGO, MSc¹, Binh Thanh NGUYEN, MD, MSc¹, Tram Thi Phuong PHAM, BSc¹, Nhung**
5 **Thi Hong LE, MSc¹, Hien Ba PHAM, MD², Trang Thi Thu NGUYEN, MD³, Mohand AIT-AHMED, MSc, ⁴,**
6 **Tuan Anh NGUYEN, PhD¹, Thang Hong PHAM, MD, PhD¹, Yoann MADEC, PhD^{5§}**

7

8

9 1 National Reference Laboratory of HIV Molecular Biology, National Institute of Hygiene and
10 Epidemiology, Hanoi, Vietnam

11 2 Dong Da General Hospital, Hanoi, Vietnam.

12 3 Nam Tu Liem District Medical Center, Hanoi, Vietnam

13 4 Center for Translational Research, Institut Pasteur, Université de Paris, Paris, France

14 5 Epidemiology of emerging diseases, Institut Pasteur, Université de Paris, F-75015, Paris, France

15

16

17 **Corresponding author:**

18 Yoann Madec

19 Epidemiology of emerging diseases unit

20 Institut Pasteur

21 25 rue du Dr Roux

22 75015 Paris, France

23 yoann.madec@pasteur.fr

24 Telephone: +33 1 4061 3828

25

26 **Funding:** The study was funded by Roche diagnostics.

27

28 **Running head title:** Performance of cobas PSC for viral load testing

29

30 **Abstract**

31 Background: Standard of care for HIV-infected patients on antiretroviral therapy (ART) relies on regular
32 monitoring of HIV viral load. Access to viral load monitoring progressed in recent years, but its access
33 remains scarce in some settings. Alternatives to plasma, such as dried specimen, can help bring routine
34 viral load testing in remote settings. This study aimed to evaluate performances of the cobas® plasma
35 separation card (PSC) to detect virological failure at the threshold of 1000 copies/mL, in real-life
36 conditions in Vietnam.

37 Setting: Patients were enrolled in two hospitals in Hanoi (Vietnam).

38 Methods: This cross-sectional evaluation enrolled HIV-infected adults who provided a plasma and a
39 PSC sample. Sensitivity and specificity of PSC, as compared to plasma, to identify patients in virological
40 failure were estimated.

41 Results: Overall, 250 patients were enrolled. Of the 127 (50.8%) patients with plasma viral load ≥ 1000
42 copies/mL, the PSC viral load was also ≥ 1000 copies/mL in 126 (sensitivity (95% confidence interval
43 (CI)): of 99.2% (95.7-99.9)). Of the 123 (49.2%) patients with plasma viral load < 1000 copies/mL, the
44 PSC viral load was also < 1000 copies/mL in 108 (specificity (95% CI): 87.8% (80.7-93.0)). Overall, the
45 concordance rate was 93.6%.

46 Conclusions: This field evaluation of the cobas® PSC, showed the extremely good capacity of PSC to
47 identify patients in virological failure. The specificity was 87.8%, lower than in previous reports.
48 However, in case of discrepancy, the PSC viral load level was never far from the 1000 copies/mL
49 threshold, and this result is probably due to measurement error inherent to the technique.

50

51 **Keywords:** HIV; viral load; sensitivity; specificity; plasma separation card; dried specimen

52 **Introduction**

53 Following the World Health Organization (WHO) recommendations, standard of care for HIV-infected
54 patients on antiretroviral therapy (ART) relies on regular monitoring of HIV viral load (VL) (1). HIV VL
55 monitoring is essential to detect sub-optimal adherence or virological failure, and in this latter case to
56 adapt the ART combination. In developing countries, national guidelines for HIV care essentially follow
57 the WHO recommendations (1).

58 The UNAIDS launched its 95-95-95 targets to end the AIDS epidemic by 2025 (2). Following these
59 targets, in 2025, 95% of those infected with HIV must know their HIV status, of them 95% must be on
60 ART, and of these latter 95% must be virologically suppressed. In 2021, the UNAIDS estimated that 92%
61 of those on ART were virologically suppressed (3), close to the target. However, tremendous disparities
62 between countries persist (3).

63 To increase the number of HIV-infected patients on ART, the need for VL monitoring is increasing.
64 Access to VL monitoring has progressed in recent years, but it remains complex in some settings.
65 Plasma is the preferred sample type for HIV VL testing, and is considered the gold standard. Low access
66 to VL monitoring is jointly explained by remoteness and by the difficulty to convey plasma samples to
67 a laboratory able to measure HIV VL, as plasma must be shipped respecting a strict cold-chain to
68 prevent nucleic acid deterioration (4,5). However, in recent years, point-of-care (POC) devices have
69 been developed. Some of them, showing very good performances as compared to plasma (6), can help
70 improve HIV VL monitoring coverage. Still, POC devices necessitate a well-organised supply circuit and
71 can be costly. Blood sampling using dried blood spots (DBS) is another option that can help improve
72 HIV VL monitoring coverage, an option that is mentioned in the WHO guidelines (1). If DBS are an
73 appealing tool as they do not require new machines, special attention must be paid to the choice of
74 the technique as their performances are not all equivalent (6,7).

75 A disadvantage of DBS lies in the risk of proviral DNA amplification which could lead to overestimation
76 of the HIV VL level (8), thus explaining a lower specificity. To overcome this defect, some suggested to
77 collect dried plasma spots (DPS) with overall good results, but not always homogeneous (9). Moreover,
78 collection of DPS, as opposed to DBS, requires centrifugation, which is out of reach for some
79 laboratories.

80 Recently, paper cards have been developed which allow to deposit whole blood but that can separate
81 plasma from the remaining blood components through layers of filter papers. The cobas® plasma
82 separation card (PSC) showed very good performances both in terms of sensitivity and specificity to
83 detect virological failure at the threshold of 1000 copies/mL (10–12).

84 In the current study, we aimed to evaluate the sensitivity and specificity of the cobas® PSC to detect
85 virological failure at the threshold of 1000 copies/mL, in real-life conditions in Vietnam.

86

87 **Methods**

88 The study was a cross-sectional evaluation enrolling HIV-infected adults (≥ 18 years) who visited Nam
89 Tu Liem and Dong Da outpatients clinics (OPCs) in Hanoi (Vietnam) for routine care, between
90 September 7, 2022 and February 15, 2023.

91 The main goal of the study was to estimate sensitivity and specificity of the cobas[®] PSC, as compared
92 to plasma, to identify patients in virological failure defined at the threshold of 1000 copies/mL (1), the
93 current threshold used in Vietnam.

94 Under the assumption that sensitivity is 98%, for the lower limit of the 95% confidence interval not to
95 be lower than 94%, enrolment of 150 patients with plasma VL ≥ 1000 copies/mL was targeted. Based
96 on prior experience, specificity (i.e. ability to identify patients with VL < 1000 copies/mL) was expected
97 to be less of an issue (13). Therefore, under the assumption that specificity is 98%, for the lower limit
98 of the 95% confidence interval not to be lower than 93%, enrolment of 100 patients with plasma VL
99 < 1000 copies/mL was targeted. Overall, the targeted number of patients to be enrolled was 250. Given
100 the high rate of virological success usually documented in Vietnam (14–16), to find patients with
101 plasma VL ≥ 1000 copies/mL, we targeted patients not yet on ART or on ART for < 3 months.

102 *Blood sampling and sample preparation*

103 At the OPC laboratory, 6 mL venous blood were drawn in EDTA tube. Immediately after collection, the
104 blood sample was stored in a cool box. Once all blood samples were collected, and within 3 hours from
105 blood collection, all samples were transferred to the HIV molecular laboratory at the National Institute
106 of Hygiene and Epidemiology (NIHE) in Hanoi (Vietnam).

107 Upon reception at the HIV molecular laboratory, 140 μ L of whole blood was spotted on each of the
108 three spots of two cobas[®] PSC using calibrated pipette. PSC were then left to dry at ambient
109 temperature, directly on the work bench, for a minimum of 3 hours. After drying, standard operating
110 procedures (SOP) were to place the PSC individually in Ziploc bags with 4g desiccants (i.e. 4 bags) and
111 to keep them at ambient temperature in a dedicated box for seven days before being tested, then
112 stored at -80°C if testing was not done.

113 The remaining whole blood was centrifugated for 20 minutes at 2500 rpm, after what plasma was
114 collected in 2mL cryotubes. Plasma samples were stored immediately at -80°C unless they were to be
115 tested within the following 24 hours.

116 *HIV VL testing*

117 All the plasma and PSC samples were processed for VL test using the Cobas[®] HIV-1 Quantitative nucleic
118 acid test on the cobas[®] 4800 System (Roche, Basel, Switzerland), according to the manufacturer's
119 instructions. The cobas[®] 4800 System consists of two separate devices, cobas[®] \times 480 for sample
120 preparation and cobas[®] z480 analyser for amplification/detection. Real-time detection and

121 discrimination of PCR products are accomplished by measuring the fluorescence of the released
122 reporter dyes for the viral targets and RNA QS, respectively.

123 Plasma samples (1000 μ L) were loaded in the cobas[®] 4800 System, 400 μ L was the sample processing
124 volume, and the lower limit of detection [LoD] was established at 20 copies/mL.

125 For PSC samples, the top layers were removed to access the DPS. Then, an individual DPS was removed
126 from the card and incubated at 56°C with 800 μ L of Specimen Pre-Extraction Reagent (SPER-Roche) for
127 10 min at 1000 rpm on a preheated thermomixer. Samples were then loaded in the cobas[®] 4800
128 System, without removing the DPS, the system automatically processing 400 μ L with the lower limit of
129 detection [LoD] was 599 copies/mL (17).

130 Plasma and PSC samples (after incubation) have the same analytical workflow and processing volume
131 on the cobas[®] 4800 System. Interpretation of VL results was performed according to manufacturers'
132 instructions.

133 Of note, the same two technicians throughout the study handled preparation and testing of all
134 samples.

135 *Statistical analysis*

136 In patients for whom both plasma and PSC VL levels were above the corresponding lower detection
137 limit, concordance between VL measurements on plasma and on PSC was investigated using a Bland-
138 Altman analysis.

139 Sensitivity and specificity of the PSC and their corresponding confidence intervals (CI), as compared to
140 plasma, to identify patients in virological failure at the threshold of 1000 copies/mL were estimated.
141 Sensitivity was the proportion of patients with VL \geq 1000 copies/mL on PSC, among patients who
142 presented a plasma VL \geq 1000 copies/mL. Specificity was the proportion of patients with VL <1000
143 copies/mL on PSC, among patients who presented a plasma VL <1000 copies/mL. To test whether some
144 conditions influenced the sensitivity (or specificity), chi-2 tests were used.

145 All analysis were performed using Stata 17 (Stata Corps. College Station, TX, USA).

146 *Ethics approval and consent to participate*

147 The study was approved by the institutional review board at Institut Pasteur in Paris (France) and at
148 the NIHE in Hanoi (Vietnam). All methods were performed in accordance with guidelines and
149 regulations relevant to human research. Written informed consent was obtained from all participants
150 of the study.

151

152 **Results**

153 Overall, 250 HIV-infected patients were enrolled: 170 (68.0%) in Nam Tu Liem OPC and 80 (32.0%) in
154 Dong Da OPC. Of these patients, 199 (79.6%) were male, the median (inter quartile range (IQR)) age
155 was 34 (26-44) years. At reception at the HIV molecular laboratory, one whole blood sample was

156 haemolysed and the sample was discarded. The patient however provided a new whole blood sample
157 at a later visit.

158 Plasma VL testing failed in five (2.0%) samples out of 250, due to clotting. Those samples were retested
159 in the next batch. Plasma VL was measured in median (IQR) 8 (2-17) days after blood collection. Plasma
160 VL was below the lower detection limit in 64 (25.6%) patients, was detected but <1000 copies/mL in
161 59 (23.6%) patients and was ≥ 1000 copies/mL in the remaining 127 (50.8%) patients.

162 In 245 (98.0%) patients, PSC was created the same day the whole blood sample was collected and
163 arrived at the HIV molecular laboratory at NIHE. In the remaining five (2.0%) patients, PSC were created
164 on the following day. PSC VL testing failed in 10 (4.0%) of the 250 samples, due to pipetting problem,
165 probably because the paper spot that remained in the tube loaded in the machine came into contact
166 with the pipet during the automated extraction leading to insufficient reagent volume extracted; it
167 even failed twice for one PSC sample. At the third attempt, the PSC VL result was below the detection
168 limit. PSC VL was measured in median (IQR) 20 (14-29) days after creation. PSC VL was below the lower
169 detection limit in 98 (39.2%) patients, was detected but <1000 copies/mL in 11 (4.4%) patients and
170 was ≥ 1000 copies/mL in the remaining 141 (56.4%) patients.

171 *Quantitative comparison of PSC versus plasma*

172 In 150 patients, both plasma and PSC VL measurements were above their respective lower detection
173 limit. The mean difference was 0.26 log copies/mL (Table 1) indicating higher values in PSC than in
174 plasma; in 28 (18.7%) cases, VL level was however lower in PSC than in plasma. The median (IQR)
175 difference was 0.23 (0.04-0.46) log copies/mL. The difference was larger than 0.5 log copies/mL in 31
176 (20.7%) cases. The Bland-Altman analysis (Figure 1) also shows a tendency towards higher levels in PSC
177 than in plasma, but the difference was stable whatever the VL level.

178 *Qualitative comparison of PSC versus plasma*

179 Of the 127 patients with plasma VL ≥ 1000 copies/mL, the PSC VL was also ≥ 1000 copies/mL in 126,
180 corresponding to a sensitivity (95% CI) of 99.2% (95.7-99.9) (Table 2). The only patient with downward
181 misclassification showed a plasma VL of 1410 copies/mL while the result on PSC was <599 copies/mL.
182 Of the 123 patients with a plasma VL <1000 copies/mL, the PSC VL was also <1000 copies/mL in 108,
183 corresponding to a specificity (95% CI) of 87.8% (80.7-93.0). Overall, the concordance rate was 93.6%.
184 Of the 15 patients with upward misclassification, one patient presented a undetectable plasma VL
185 while the PSC VL was 1070 copies/mL. In the 14 other patients, the plasma VL ranged from 115
186 copies/mL to 813 copies/mL, while the PSC VL ranged from 1040 copies/mL to 3940 copies/mL. In
187 these 14 patients, the median (IQR) difference was 0.7 (0.6-0.8) log copies/mL, and was <0.5 log
188 copies/mL in three patients. If these three patients were considered as correctly classified, the
189 specificity (95% CI) would be 90.2% (83.6-94.9).

190 Some PSC were frozen prior to VL testing. To investigate whether freezing could impact the
191 performances, sensitivity and specificity were estimated if VL was tested on PSC that were not frozen
192 on the one hand, and on PSC that had been previously frozen on the other hand. Neither sensitivity
193 nor specificity differed between the two conditions ($p=0.99$ and $p=0.85$, respectively; Table 3).

194 The PSC conservation duration prior to VL measurement was also investigated by defining two
195 categories: PSC VL measured <21 days or ≥ 21 days from PSC collection. Neither sensitivity nor
196 specificity differed by PSC conservation time ($p=0.36$ and $p=0.70$, respectively; Table 3).

197 Spots from the PSC were pre-cut, however forceps were used to pull-out the spot, the forceps needing
198 sterilization after each use (dip in the Sodium hypochlorite solution 10% for 1 minute and transfer to
199 the isopropanol 70% for 1 minute to disinfect). To investigate if cross contamination could explain the
200 15 discrepancies observed, we looked if the VL measured in the well preceding each discrepancy was
201 ≥ 1000 copies/mL or not. This was the case in half of the discrepancies (8/15), while the level was lower
202 in the previous well in the remaining cases.

203 Finally, to have an idea of the reproducibility of the PSC VL measurements, we randomly selected 24
204 samples tested on January 11 2023, when only one incubation batch was needed, and remeasured the
205 PSC VL level. The median (IQR) difference between the two PSC VL results was -0.01 (-0.11 to $+0.08$)
206 and it ranged from -0.30 to $+0.19$ log copies/mL (Table 4). In two cases, the difference was not
207 estimated as at least one of the two VL result was undetected.

208

209 **Discussion**

210 This field evaluation of the cobas® PSC, in routine condition, showed the extremely good capacity of
211 the PSC to identify patients in virological failure at the threshold of 1000 copies/mL, with a sensitivity
212 (95% CI) of 99.2% (95.7-99.9). This result confirms those previously observed in other settings (10–
213 12,18).

214 On the other hand, identification of patients with a VL <1000 copies/mL was deceiving, as the
215 specificity (95% CI) was only of 87.8% (80.7-93.0), much lower than the first evaluations published (10–
216 12), but similar to a more recent evaluation (18). This result was due to an overestimation of VL in PSC
217 as compared to plasma. When three discordant samples that presented a difference <0.5 log
218 copies/mL were considered as concordant, the specificity (95% CI) was improved to 90.2% (83.6-94.9),
219 yet without reaching the level from previous evaluations.

220 Overall, correct classification occurred in 93.6% of the samples, and performances of the PSC compared
221 well within those reported by four other technologies that were qualified as acceptable for HIV VL
222 monitoring in a recent meta-analysis (7).

223 Still, one can argue that poorer sensitivity is less of an issue than poor specificity. Indeed, in case of VL
224 above the 1000 copies/mL threshold, the patient would undergo adherence support sessions and then

225 VL would be retested within 3 to 4 months. Given the sensitivity observed, it appears statistically
226 unlikely that a true VL below the threshold would again be above the 1000 copies/mL threshold when
227 remeasured. Nevertheless, these unnecessary VL measurements represent a cost weighting on the
228 national programmes. Moreover, receiving a VL result suggestive of therapeutic failure may induce
229 some stress and anxiety in the patient. Hopefully, counselling and adherence support can help the
230 patient maintain high adherence or even improve it. It is also important to note that in the 15 patients
231 with upward misclassification on PSC, the plasma VL was detectable in all but one patients, suggesting
232 that residual low level viral replication was on-going in these patients, and that enhanced adherence
233 to ART could be beneficial to them.

234 Still, we wondered what could explain the lower specificity in our study. Some samples had been tested
235 after freezing, and we investigated whether this could have impacted the specificity. However, the
236 specificity was not significantly different when PSC were tested after staying at room temperature only
237 or after freezing at -20°C. The duration of PSC conservation did not impact the specificity either.

238 PSC sample preparation for HIV VL testing required to remove the top layers of the card to reach the
239 layer where plasma migrated. There, the spot was pulled-out by a sterile forceps. After each sample,
240 the forceps must be sanitized before being used again. This means extra manipulation for the
241 laboratory staff increasing the risk of cross-contamination if the forceps was not correctly sanitized.
242 We investigated if cross-contamination could explain the specificity observed in our study by looking
243 at the VL level in the well preceding the well where a discrepancy was identified. In half of the cases,
244 the PSC VL in the previous well was indeed higher than 1000 copies/mL, but in the remaining half it
245 was lower than 1000 copies/mL. Although cross contamination could not formally be ruled-out, we
246 believe that it is highly unlikely it explains our results. Indeed, the laboratory staff is highly experienced
247 and standard operating procedures were implemented.

248 In case of discrepancy, the PSC VL level was within a reasonable distance from the 1000 copies/mL
249 threshold and was always <4000 copies/mL, in line with a previous evaluation (12). It is possible that
250 these discrepancies are explained by measurement error inherent to the technique, as it has been
251 reported that variability is larger at lower VL level (10,12). Although the PSC is supposed to provide a
252 plasma matrix free of cell-associated RNA, maybe contamination can occur when whole blood is
253 spotted, if the quantity of whole blood spotted did not respect requirements for example.

254 This evaluation was conducted on the cobas® 4800 instrument, while the previous evaluations were
255 conducted on the cobas® 6800/8800 instrument (10,12). Although the manufacturer mentions PSC use
256 in the instrument specification, PSC preparation is different in the cobas® 4800 instrument than in the
257 other cobas® instruments. When using PSC samples, the cobas® 4800 instrument processed a volume
258 of 400 µL while the other cobas® instruments was 850 µL. As illustrated on HCV VL testing, although
259 the correlation was good, the cobas® 4800 system led to lower HCV VL levels than when using the

260 cobas® 6800 system (19). Maybe the use of the cobas® 4800 system explains the lower specificity we
261 observed for identifying HIV virological failure at the 1000 copies/mL threshold.

262 From a practical point-of-view, of the 250 PSC samples tested, failure occurred in 10 samples and 1
263 sample even had to be tested 3 times before succeeding. Each time, the error message suggested the
264 volume automatically extracted was too low for VL testing, likely due to the paper spot left in the tube
265 loaded in the instrument. As previously mentioned, the preparation of the PSC samples requires to use
266 sterile forceps to pull-out the dried plasma spot. This step can raise the risk of cross contamination if
267 the forceps are not correctly sanitized or if the laboratory is not well organised. Despite plasma must
268 be vortexed and spun before VL testing, PSC preparation remains more time-consuming for the
269 laboratory staff as it requires several extra manipulation steps.

270 In terms of quantitative difference, PSC VL was over-estimated as compared to plasma. The mean
271 difference, estimated when results were above the detection limit in both sample types, was 0.23 log
272 copies/mL higher on PSC than on plasma. The mean difference is higher than reported in other studies
273 (10). Nevertheless, PSC showed good reproducibility on the 24 PSC samples tested twice, as all
274 absolute differences were <0.3 log copies/mL.

275 One strength of this study was its conduct in field condition in terms of PSC conservation, in a
276 laboratory performing routine VL testing for Northern provinces of Vietnam. Sample preparation, for
277 both plasma and PSC, was however centralised at the laboratory performing VL testing to optimize
278 sample quality. Nevertheless, previous studies have shown that blood spotting was not an issue at the
279 clinical site level, even if calibrated blood quantities must be used. Another limitation was the use of
280 convenience sampling, which does not reflect the prevalence of virological failure, and thus did not
281 allow estimating the positive and negative predictive values.

282 Interestingly, a cost-effectiveness analysis in Zambia, identified that combined use of plasma and dried
283 specimens in remote facilities and clinical sites with a low number of patients significantly improved
284 VL testing coverage and patients' outcomes (20).

285 **Conclusions**

286 PSC performance found in our study, and confirmed in another settings, were not as high as the initial
287 evaluations led us to expect. Still, correct classification was found in 93.6% of the samples, with a nearly
288 perfect identification of patients truly in virological failure. Using the cobas® PSC led to some upward
289 misclassification, however in case of VL above the threshold defining failure, VL would be remeasured
290 after adherence support which would likely confirm their real status regarding virological failure. PSC
291 qualifies to add to the arsenal already available to improve VL coverage that remains too low in some
292 settings.

293

294 **Authors' contributions**

295 YM designed the study and obtained funding. YM, TAN, THP, HTHN and MAA supervised the study.
296 Patient enrolment was supervised by HBP and TTTN. Data accrual and viral load testing was performed
297 by HTHN, BTN, TTPP, NTHL. Statistical analysis were performed by YM. The manuscript was drafted by
298 YM and critically revised by HTHN and TTPP. All the authors have read and approved the final
299 manuscript.

300

301 **Acknowledgements**

302 We would like to thank Professor Diane Descamps and Dr Florence Damond for the valuable
303 discussions and their reading of the manuscript. We would like to thank Roche diagnostics for providing
304 HIV assays, consumables and funding for the study.

305

306 **Statement on conflicts of interests**

307 The study was funded by Roche diagnostics. However Roche diagnostics was not involved in the
308 design and implementation of the study, nor in the analysis and nor in the manuscript writing.

309 All authors declare no conflict of interest.

310

311

312 **References**

313

314 1. World Health Organization. Consolidated guidelines on HIV prevention, testing, treatment, service
315 delivery and monitoring: recommendations for a public health approach [Internet]. 2021 update.
316 Geneva: World Health Organization; 2021 [cited 2023 May 2]. Available from:
317 <https://apps.who.int/iris/handle/10665/342899>

318 2. 2025-AIDS-Targets_en.pdf [Internet]. [cited 2023 May 2]. Available from:
319 https://www.unaids.org/sites/default/files/2025-AIDS-Targets_en.pdf

320 3. Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet [Internet]. [cited 2023 May 2]. Available from:
321 <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>

322 4. Roberts T, Cohn J, Bonner K, Hargreaves S. Scale-up of Routine Viral Load Testing in Resource-Poor
323 Settings: Current and Future Implementation Challenges. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.*
324 2016 Apr 15;62(8):1043–8.

325 5. Newman H, Hardie D. HIV-1 viral load testing in resource-limited settings: Challenges and
326 solutions for specimen integrity. *Rev Med Virol.* 2021 Mar;31(2):e2165.

327 6. Nguyen LBL, Soumah AA, Hoang VT, Nguyen AT, Pham TH, Royer-Devaux S, et al. Performances of
328 Dried Blood Spots and Point-of-Care Devices to Identify Virological Failure in HIV-Infected
329 Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *AIDS Patient Care STDs.* 2023 Feb 1;37(2):66–
330 83.

331 7. Vojnov L, Carmona S, Zeh C, Markby J, Boeras D, Prescott MR, et al. The performance of using
332 dried blood spot specimens for HIV-1 viral load testing: A systematic review and meta-analysis.
333 Newell ML, editor. *PLOS Med.* 2022 Aug 22;19(8):e1004076.

334 8. Zida S, Tuailon E, Barro M, Kwimatouo Lekpa Franchard A, Kagoné T, Nacro B, et al. Estimation of
335 HIV-1 DNA Level Interfering with Reliability of HIV-1 RNA Quantification Performed on Dried Blood
336 Spots Collected from Successfully Treated Patients. *J Clin Microbiol.* 2016 Jun;54(6):1641–3.

337 9. Fong Y, Markby J, Andreotti M, Beck I, Bourlet T, Brambilla D, et al. Diagnostic Accuracy of Dried
338 Plasma Spot Specimens for HIV-1 Viral Load Testing: A Systematic Review and Meta-analysis.
339 *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr.* 2022 Mar 1;89(3):261–73.

340 10. Carmona S, Seiverth B, Magubane D, Hans L, Hoppler M. Separation of Plasma from Whole
341 Blood by Use of the cobas Plasma Separation Card: a Compelling Alternative to Dried Blood Spots
342 for Quantification of HIV-1 Viral Load. *J Clin Microbiol.* 2019 Apr;57(4):e01336-18.

343 11. Vubil A, Zicai AF, Siteo N, Nhachigule C, Meggi B, Loquiha O, et al. Accurate HIV viral load
344 measurement in primary health care settings using the cobas® plasma separation card. *PLoS One.*
345 2020;15(5):e0232122.

346 12. Hans L, Marins EG, Simon CO, Magubane D, Seiverth B, Carmona S. Classification of HIV-1
347 virological treatment failure using the Roche cobas plasma separation card on cobas 8800
348 compared to dried blood spots on Abbott RealTime HIV-1. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin
349 Virol.* 2021 Jul;140:104839.

- 350 13. Taieb F, Tram TH, Ho HT, Pham VA, Nguyen L, Pham BH, et al. Evaluation of Two Techniques
351 for Viral Load Monitoring Using Dried Blood Spot in Routine Practice in Vietnam (French National
352 Agency for AIDS and Hepatitis Research 12338). *Open Forum Infect Dis*. 2016 Sep;3(3):ofw142.
- 353 14. Rangarajan S, Colby DJ, Giang LT, Bui DD, Hung Nguyen H, Tou PB, et al. Factors associated
354 with HIV viral load suppression on antiretroviral therapy in Vietnam. *J Virus Erad*. 2016
355 Apr;2(2):94–101.
- 356 15. Dat VQ, Duong BD, Nhan DT, Hai NH, Anh NTL, Thu HHK, et al. Viral load suppression and
357 acquired HIV drug resistance in adults receiving antiretroviral therapy in Viet Nam: results from a
358 nationally representative survey. *West Pac Surveill Response J*. 2018 Sep 30;9(3):16–24.
- 359 16. Lefrancois LH, Nguyen BT, Pham TTP, Le NTH, Dao HTT, Tran TH, et al. Assessment of HIV viral
360 load monitoring in remote settings in Vietnam - comparing people who inject drugs to the other
361 patients. Nelson JA, editor. *PLOS ONE*. 2023 Feb 21;18(2):e0281857.
- 362 17. Diagnostics [Internet]. [cited 2023 Jul 5]. cobas® Plasma Separation Card. Available from:
363 <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/cobas-plasma-separation-card.html>
- 364 18. Kiyaga C, Makoha C, Nkugwa I, Okiira C, Okwir R, Gebreab SZ, et al. The plasma separation
365 card as a novel solution for enhancing central laboratory capability for HIV-1 viral load monitoring
366 in limited-access settings. *PLOS Glob Public Health*. 2023;3(6):e0002099.
- 367 19. Vermehren J, Stelzl E, Maasoumy B, Michel-Treil V, Berkowski C, Marins EG, et al. Multicenter
368 Comparison Study of both Analytical and Clinical Performance across Four Roche Hepatitis C Virus
369 RNA Assays Utilizing Different Platforms. Loeffelholz MJ, editor. *J Clin Microbiol*. 2017
370 Apr;55(4):1131–9.
- 371 20. Nichols BE, Girdwood SJ, Crompton T, Stewart-Isherwood L, Berrie L, Chimhamhiwa D, et al.
372 Monitoring viral load for the last mile: what will it cost? *J Int AIDS Soc*. 2019 Sep;22(9):e25337.

373

374

375 Figure 1: Bland-Altman analysis to evaluate the concordance between plasma and PSC viral load levels
376 in 150 patients with both plasma and PSC viral load measurements above the lower detection limits
377 (full line: mean difference (+0.26); dashed-line: 95% confidence interval limits of the difference)
378
379

380 Table 1: Description of viral load measurements above the lower detection limit

	Plasma	PSC	Plasma and PSC
N (%) > lower detection limit	186 (74.4)	152 (60.8)	150 (60.0)
N (%) ≥1000 copies/mL	127 (50.8)	141 (56.4)	126 (50.4)
Median (IQR) in log copies/mL*	4.19 (2.67-5.08)	4.69 (3.80-5.42)	-
Median (IQR) difference in log copies/mL**	-	-	+0.23 (0.04-0.45)

381 IQR: inter quartile range

382 *Only considering those with viral load > lower detection limit; **difference is PSC viral load minus
 383 plasma viral load

384 Table 2: Sensitivity and specificity of the Cobas plasma separation card, as compared to plasma, to
385 identify patients in virological failure at the threshold of 1000 copies/mL

	Plasma viral load \geq 1000 copies/mL	Plasma viral load <1000 copies/mL	Total
PSC viral load \geq 1000 copies/mL	126 (99.2%)	15	141
PSC viral load <1000 copies/mL	1	108 (87.8%)	109
Total	127	123	250

386 PSC: plasma separation card

387

388

389 Table 3: Effect of freezing and time since PSC collection on the sensitivity and specificity

	Plasma VL \geq 1000 copies/mL	Sensitivity (95% CI)	Plasma VL <1000 copies/mL	Specificity (95% CI)
Without freezing	60	100 (94.0-100)	52	88.5 (76.6-95.6)
With freezing	67	98.5 (92.0-99.9)	71	87.3 (77.3-94.0)
p		0.99		0.84
<21 days	81	100 (95.5-100)	55	89.1 (77.8-95.9)
\geq 21 days	46	97.8 (88.5-99.9)	68	86.8 (76.4-93.8)
p		0.36		0.70

390

391 Table 4: Reproducibility of the PSC technique on 20 randomly selected samples

1 st PSC viral load measure	2 nd PSC viral load measure	Difference (in log copies/mL)
<599	<599	-
796	<599	-
2 240	1 120	-0.30
6 040	4 740	-0.11
7 190	11 200	+0.19
8 140	9 950	+0.03
12 300	13 300	+0.02
17 400	14 100	-0.09
17 800	19 000	+0.03
24 200	22 600	-0.03
44 200	33 200	-0.12
53 200	64 000	+0.08
59 700	91 500	+0.19
63 100	55 700	-0.05
149 000	150 000	+0.01
218 000	241 000	+0.04
230 000	256 000	+0.05
247 000	204 000	-0.08
342 000	198 000	-0.24
597 000	893 000	+0.17
1 290 000	918 000	-0.15
3 180 000	2 450 000	-0.11
9 400 000	7 800 000	-0.08

392

393