

計畫編號：DOH102-DC-2403

行政院衛生署疾病管制署 102 年度科技研究發展計畫

計畫名稱：HIV-1(人類免疫不全病毒第一型)抗藥性研究

## 研究報告

執行機構：疾病管制署

計畫主持人：楊志元 研究員

研究人員：陳昶勳、高振峰、陳必智

執行期間：102 年 1 月 1 日至 102 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意\*

# 目 錄

頁 碼

封面

目錄

壹、綜合資料

貳、計畫摘要

中文摘要

(3)

參、計畫內容

一、研究簡介

(6)

二、材料方法

(10)

三、結 果

(18)

四、討 論

(20)

五、表 圖

(24)

六、參考文獻

(29)

共 (31)頁

## 中文摘要：

關鍵字：HIV, 基因分型, 抗藥性

臺灣人類免疫不全病毒第一型 (HIV-1) 感染之本國病患，皆可接受健保給付之抗反轉錄病毒藥物治療，完整的醫療照顧與藥物治療已有效地延長這些病患的壽命，但長期服藥導致抗藥性病毒株的出現，同時這些抗藥性病毒株的產生，將會造成原生抗藥性人類免疫不全病毒株的傳播，使得抗愛滋病毒藥物的治療效果大打折扣。因此，本項研究計畫第一部份將着力於分析國內近年來原生抗藥性人類免疫不全病毒株之盛行率以及目前使用第一線高效能抗反轉錄病毒藥物 (HAART) 治療失敗之愛滋病病患產生抗藥性突變之情形，利用全國愛滋病指定醫院及疾病管制署各分局收集我國愛滋病病毒檢體，以分子流行病學方法，監測 HIV-1 基因亞型、抗藥性及發生率之流行趨勢，以了解 HIV-1 抗藥性在不同的亞型、地區及危險因子之散佈情形，研究結果將有助於了解 HIV-1 抗藥性在臺灣之嚴重程度，提供臨床醫生及本署業務單位防疫政策與選擇治療藥物之參考依據。

在 HIV 基因分型分析方面，根據本(2012)年度新通報之本國籍 HIV-1 感染者之危險因子之比例進行篩選，針對 HIV-1 Pol 基因進行核酸定序與亞型分析，總共完成 217 件檢測，結果統計有 183 件(84.3%)為 B 亞型為主要流行之病毒亞型，另有 21 件(9.7%)為 CRF01\_AE 亞型、13 件(6.0%)為 CRF07\_BC 亞型 [表一]。依危險因子進一步區分，在 CRF07\_BC 亞型中以靜脈藥癮者為主要族群，在 B 亞型中以同性性行為者所佔之比例最高。

而統計 2012 年新通報之 HIV-1 陽性個案之抗藥性盛行率監測共分析了 217 件檢體，具有抗藥性之主要突變點共有 16 件，抗藥

性盛行率為 7.4% (16/217)，與前年相比結果稍增(6.9%)。其中 PIs 為 2.3%(5 件)、NRTIs 為 4.6%(10 件)、NNRTIs 為 2.8% (6 件)。而針對 HAART 藥物治療失敗之 HIV-1 病患之抗藥性基因序列分析方面，自 2013 年一月至十一月共收集檢體 69 件，其中有 39 件(56.5%)具有一個以上之抗藥性相關之突變位點，其中以 NNRTIs 類別之抗藥性突變位點最普遍(40.6%)，其次是 NRTIs 類別之藥物(36.2%)，而 PIs 類別偵測案例最少(18.8%)。這樣的結果對於治療病患與防治 HIV-1 抗藥性傳播上將帶來考驗。此外，為因應往後二線藥物鑑定需要，嵌合酶基因抗藥性分析系統已建構完全，目前進行 50 個案例篩檢皆無抗藥性檢出，需再進一步觀察此趨勢。

## **Abstract**

**Keyword:** HIV-1, Genotyping, Drug resistance

All the domestic cases of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infected patients have been eligible to anti-retroviral therapy and covered by the national health insurance in Taiwan. The completely medical care and the pharmacological treatment lengthened effectively the life span of patients and their life quality, however drug-resistant after long time pharmacological treatment is inevitable. The HIV-1 virus of drug-resistant might cause widespread transmission of HIV-1 drug-resistant strain, and could diminish the efficiency of the anti-HIV therapy. The first part of this study will focus on the study of prevalence of naive HIV-1 infection with drug-resistant. We will apply molecular epidemiology to survey the trend of HIV-1 of drug-resistant and the distribution of HIV-1 subtype in Taiwanese patients. The study will probe extraordinary subtypes of HIV-1 and investigate the distribution of HIV-1 infection with drug-resistant in different subtypes、regions and risk factors.

The subtyping result among naive HIV-1 patients was 183 B subtype, 21 CRF01\_AE, and 13 CRF07\_BC in 2012. HIV-1 B subtype was dominant in MSM group and HIV-1 CRF07\_BC was prevalent in PWDU. When we analyzed drug resistance of these 16 samples, 5 cases have PIs drug resistance, 10 cases have NRTIs resistance, and 6 cases have NNRTIs resistance. The enrolled number of HIV-1 infected patients may have developed drug resistance for the first-line highly active anti-retroviral therapy (HAART) was 69 cases in 2012. When we analyzed drug resistance of these 50 samples, 13 cases do develop drug mutation to PIs, 25 cases to NRTIs, and 28 cases to NNRTIs. We also applied the analytic system of drug resistance for HIV-1 Integrase. When we test 50 samples for the HIV-1 Integrase drug resistance, we didn't found any mutations for the HIV-1 Integrase. In conclusion, the trend of drug resistance of HIV-1 should be monitored continually and obtain more complete data of epidemiological results of HIV-1 drug-resistant for reference of our policy making about HIV treatment.

## .計劃內容:

### 一、研究簡介:

#### \*愛滋病毒結構與分型:

HIV 在分類上屬於反錄病毒科( retroviridae)中的緩慢病毒(lentivirus)之一，在電子顯微鏡下觀察到愛滋病毒為 110nm 的球型病毒，具有糖化蛋白外套膜的病毒顆粒，其內殼含有雙股 RNA 基因體及病毒複製時所需要的酵素，例如反轉錄酶(reverse transcriptase)，嵌入酵素(integrase)，蛋白酶(viral protease)及一些調節蛋白。HIV 之 RNA 全長約為 9.2kb，共有 9 個基因，其中 gag、pol、env 為病毒組成蛋白酶，而 gag 基因所轉譯出來的蛋白質有 p24、p17、p2、p7、p1 及 p6 [1]；pol 基因轉譯出來的的產物有反轉錄酶、蛋白質酶以及嵌入酵素；env 基因的產物則是病毒的外套膜糖蛋白，包括 gp120 及 gp41 為和 CD4 淋巴球的接受器(receptor)結合之處，病毒進入宿主細胞所需(圖一)。其餘 6 個非結構性基因則與病毒的複製調控感染力及病毒成熟有關。其中 rev 及 tat 轉譯出病毒複製時所需的調控蛋白質；而 nef、vpr、vpu 及 vif 轉譯出輔助蛋白質 ( accessory protein )和病毒感染力有關。

愛滋病毒分為第一型 HIV-1 及第二型 HIV-2，分別源自於非洲東部及非洲西部，兩者在血清學反應上差異極大，HIV-2 和猴子的免疫缺乏病毒(simian immunodeficiency virus, SIV)較相似，而 HIV-1 和黑猩猩的免疫缺陷病毒較為相似之又分成兩大群: 主群 M(Major group) 及局外群 O (outlier)。主群 M 根據 env 基因的差異又分為十個亞型 A 至 K[2]，其彼此差異約在 20% 以上[1, 3]；局外群 O 尚未分亞型。如今又發現了新型(群)，命名為 N(New group)，是一位西非喀美隆(Cameroon)的婦女 1995 年 5 月因腸胃症狀住院，亦帶有大腸黴菌感

染，其檢體送到巴黎作病毒培養發現此新型病毒[4]。此三大群 M , O,N 其間差異達 50%以上。HIV 亞型的分布跟地區有關，例如：北美及西歐地區以 B 亞型為多，中國大陸以 C 亞型為多而以往臺灣和泰國以 B 亞型及 E 亞型為多。根據研究報告指出，不同亞型盛行於不同的族群，而且跟性別及性行為的模式有些關係[5]。

### \*愛滋病毒亞型

HIV-1 基因的亞型鑑定非常重要，可以知道 HIV-1 全球性的演化複雜性以及傳播的區域，其另一個特徵就是高度的、局部性的衝擊，個別流行的型態可能緊鄰而存在，但彼此卻只有很微妙的交互作用，而 HIV-1 亞型與感染的途徑、傳播的方式有關，對於疫苗的研發也有重要的影響。而且 HIV-1 不同亞型在人體中產生的自然突變點以及對於藥物感受度可能就有不同[3, 6]。

### \*愛滋病毒蛋白質酶( Viral protease )

愛滋病毒蛋白質酶全長為 297bp，由 99 個胺基酸所組成的單體 (monomer)分子量為約 11KD，當蛋白質酶從 gag-pol 聚合蛋白中被釋放出來後兩條胺基酸會以非共價鍵結合並以對稱的方式形成同質複體 (homodimer)，由兩組 Asp26-Thr26-Gly27 形成活化中心，若以點突變的方式將 Asp 換置成其它胺基酸則會造成酵素活性消失，所以一般將其歸類為 Aspartic 型的蛋白質酶，其較 conserved active-site motifs 位在 loop 靠近中心的地方[7, 8]。此酵素在病毒的生命週期非常重要，若無法形成成熟的蛋白質酶，則無法將反轉錄酶自聚合蛋白 (polyprotein) 上切下，即使能產生反轉錄酶 p66/p66 同質複體 ( homodimer) 也無法將未成熟的反轉錄酶(p66/p66, RT)切割成成熟且具有正常功能的異質副體( heterodimer)，也無法從 gag p55 蛋白質上切割出構成殼衣蛋白(Capsid)的各組成蛋白( p24 ,p17, p7,p6 )。

### \*愛滋病毒反轉錄酶( Viral Reverse Transcriptase; RT ):

反轉錄酶在愛滋病毒複製過程中扮演一個重要角色，將病毒單股 RNA 反轉錄成單股 DNA 再利用 DNA 聚合酶形成雙股 DNA，此雙股 DNA 能嵌入宿主染色體中進行之後轉譯及轉錄作用。反轉錄酶為異質複體 (heterodimer) 由兩個次單位體 (subunits) p66(66KDa) 、 p51(51KDa)構成，p51 是由 p66 經蛋白質酶切割產生，其具有相同的 N terminal 胺基酸序列，p66 的 C terminal 的部份具 Rnase H 活性[9, 10]。

### \*抗藥性與雞尾酒療法:

藥物治療對於受人類免疫不全病毒感染的患者已有很大的成效，不僅可以延長病人的壽命，並可進一步幫助恢復部分受影響的免疫系統功能。目前，絕大多數的病毒抑制劑，是藉由抑制人類免疫不全病毒的 *pol* 基因上與病毒活性或複製相關的病毒酵素，來達到抑制病毒生長的效果。依藥物抑制的病毒基因與機制可分為三大類。第一類主要是抑制病毒蛋白酶的活性(Protease inhibitor,PI)。第二類是以擬似核苷酸衍生物 nucleoside reverse transcriptase inhibitors,NRTIs)的方式，來抑制反轉錄酶的活性(。第三類是以非擬似核苷酸衍生物 (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors,NNRTIs)的形式，來抑制反轉錄酶的活性。近年來，由於三合一雞尾酒療法比使用單一病毒抑制劑更能有效地抑制病毒的感染，許多醫師開始使用兩種或者三種不同類別的病毒抑制劑來治療病人。但是在服用藥物過程中，可能因為病毒快速產生變異及病人不依醫師指示定時服藥等因素，病毒會在患者體內衍生出抗藥性病毒株。這些抗藥性病毒株的產生，已知與病人體內的病毒量快速增加，有極高的相關性。它會使得患者體內的病毒無法被完全地抑制，進而嚴重地影響到治療的效果與治療所需的時



間，更嚴重的是這些抗藥性病毒株的產生，會造成原生抗藥性病毒株的流行。

**\*臺灣愛滋病統計資料:**

根據疾病管制署統計累積到 102 年 10 月底，目前我國的本國籍愛滋病感染人數已達 26,148 人，就 102 年 10 月底為止，本國籍新增感染愛滋病毒者則為 1,913 人，預估到全年度至 12 月底約在 2,200 人左右(圖二)。近幾年臺灣感染愛滋病毒主體有年輕化趨勢，若依年齡分布，其中 15-24 歲佔了 26%；其次為 25-49 歲則佔了 68.7%，最具有生產力的年齡層若感染愛滋病毒對於國家實為一大隱憂。臺灣愛滋病在有些特定族群盛行率偏高，以危險因子作為分析，同性間性行為者 69%；異性間性行為佔 12.5%；另外靜脈藥癮者佔 1.6%。靜脈藥癮者比例有明顯下降的趨勢，代表政府推動針具清潔交換計畫有明顯的成效。

世界衛生組織也宣布亞洲是下一個愛滋病感染嚴重地區，在臺灣愛滋病感染率不斷攀升，感染年齡層也有下降的趨勢，愛滋病是一個相當值得重視的問題，在國外的研究有發現未曾服藥的愛滋感染者體內的病毒亦有產生抗藥性突變基因，如此會造成感染者未來採用 HAART 治療效果降低，因此，若能篩選未服藥的愛滋病患者體內病毒抗藥性之情形，除了可以了解病毒於宿主體內自然變異性亦可了解臺灣地區愛滋病感染現況與複雜性提供愛滋病防治與疫苗研發重要之訊息。

## 二、材料與方法:

### 檢體的收集:

西元 2012 年度由疾病管制署病毒實驗室、縣市衛生局與愛滋病指定醫院所收集的 HIV-1 陽性檢體共 200-250 件，收集之個案必需為 2012 年臺灣地區新通報之本國籍感染人類免疫缺乏病毒者，依危險因子與居住地區分佈為基準來篩選檢體，以增加基因序列資料庫之可信度，並依檢體資料按照地區、年齡、性別、危險因子作整理。

### HIV 血清學檢測

檢驗方法主要透過粒子凝集法初步篩選和西方墨點法確認，方能判讀為陽性個案。粒子凝集法-主要是利用 fujirebio 公司製造之 serodia HIV 1/2 套組，其原理為利用人工膠粒（Gelatin Particle）做載體（Carriers），再分別吸附（Coating）一層第一型或第二型去活化愛滋病毒抗原。若血液中存在第一型或第二型抗體，基於免疫反應原理，則會形成凝集現象，故可藉此判定人體血清或血漿中是否含有愛滋病毒之抗體。方法步驟如下：

1. 新開封試劑應於試劑盒上備註使用日期，冷凍乾燥之粒子其復原方式為：未敏感化粒子 D 瓶加入復元液（A）2 mL；第一型抗原敏感化粒子（C-1）及第二型抗原敏感化粒子（C2）則各加入 1.5 mL，已完成復原粒子應註明復原日期，溫和搖晃後置於室溫三十分鐘，待粒子完整復原始可使用。
2. 將 96 孔微量測定盤上標記檢體編號及加入試劑之代號。
3. 實驗組：於第一孔滴入血清稀釋液（B）75 mL，第二孔至第四孔各 25mL，陽性對照組：第一型（PC1）與第二型（PC2）之對照組需分別測定，第一孔滴入血清稀釋液（B）75 mL，而第二至第

八孔則均滴入 25 mL

4. 實驗組：以微量吸管分別吸取 25 mL 血清檢體加入第一孔中，並在液面下吸放混合至少五次，吸 25 mL 移入第二孔，同樣混勻後，再取 25 mL 移入第三孔，同樣混勻後，於第四孔吸 25 mL 連同微量吸管丟棄於可高壓滅菌之廢棄物容器內。陽性對照組：取對照用陽性血清 (E) 各 25 mL 分別加入第一型 (PC1) 及第二型 (PC2) 之第一孔，然後作二倍連續稀釋至第八孔後再丟棄 25 mL。
5. 實驗組及陽性對照組均於第二孔加入 25 mL 未敏感化粒子 (D)，當作陰性血清對照；實驗組：加 25 mL 第一型敏感化粒子 (C1) 於第三孔，加 25 mL 第二型敏感化粒子 (C2) 於第四孔。陽性對照組：第一型 (PC1) 的第三孔至第八孔各加 25 mL (C1)，第二型 (PC2) 的第三孔至第八孔各加 (C2) 敏感化粒子 25 mL。
6. 將 96 孔微量滴定盤振盪混合均勻後，加透明封膜於盤上，並註明實驗起訖時間，靜置於不易接觸及震動之平面上，於室溫下靜置二小時，使血清中之特異性抗體與抗原結合形成凝集；如未敏感化粒子呈現凝集現象則需進行 7 至 10 步驟。
7. 取已經溶解復元的未敏感化粒子 350 mL，加入一尖底離心管中。
8. 再將 50 mL 血清檢體加入離心管中，使用 tube mixer 加以完成混合，在室溫下放置 20 分鐘以上（靜置期間可震盪 1~2 次）。
9. 將試管進行離心沉澱（2,000 rpm/5 分鐘/室溫）完全分離，取得上清液 50 mL 置入 U 型盤第 2 孔中。
10. 重複 4-5 步驟。

西方墨點法-主要是利用 Bio-rad 公司製造之 new lav blot - I 套組，其原理為利用電泳原理，將愛滋病病毒蛋白質依不同分子量大小分離，再運用轉印技術將電泳膠內之蛋白質移轉至硝化纖維膜試紙表

面作保存，以偵測與之相對應存於人體血清或血漿中抗體的試驗法。  
方法步驟如下：

1. 以鑷子依序夾取出含有硝酸試紙條之末端置於反應槽中，號碼應朝上，每批次實驗所需試紙條之數量，除檢體數外需再加二條（陽性、陰性）進行對照組之平行測試。
2. 於反應槽下方以油性筆註明檢體流水號、陰性、陽性對照組。
3. 於各凹槽內加入 2 mL 洗滌液後開啟震盪板搖 5 分鐘，使試紙條充分濕潤。
4. 分別加入各 20 mL 血清檢體、陰性及陽性對照液於相對應之反應槽中，於室溫下加蓋搖擺作用 2 個小時。
5. 以負壓抽吸器吸乾各反應槽內之液體。
6. 各注入 2 mL 洗滌液，搖擺 5 分鐘後吸乾，重複此清洗步驟三次。
7. 各注入 2 mL 的結合液，加蓋後在室溫中搖擺作用一小時。
8. 重複步驟 5.6.5 至 5.6.6；洗滌三次。
9. 各注入 2 mL 之呈色液，搖擺作用約 5 分鐘使之呈色。
10. 以負壓抽吸器吸乾反應槽內液體並以二次蒸
11. 以負壓抽吸器吸淨反應槽內液體，在不損傷試紙條之情況下盡可能吸乾。
12. 抽吸管尖則以 10% 漂白水消毒後再以清水沖洗。
13. 比對呈色反應判讀後發報告，反應後之試紙條則遮光陰乾後黏貼。

### **病毒 RNA 的萃取**

使用 QIAGEN 公司的 QIAmp Viral RNA kit 進行 RNA 的純化。  
取血清 140uL 加入 560 uL Buffer AVL 於室溫下作用 10 分鐘，再加入 560 uL 絕對酒精混合完全(vortexing)，上述混合液再通過 QIAmp spin

column, column 以 Buffer AW 清洗兩次以後, 用 AVE buffer (Rnase Free) 將 RNA 溶出。製備的病毒 RNA 可用於反轉錄及聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)。

### HIV-1 亞型分析

根據 HIV-1 C2V3(env) 基因設計引子用於亞型分析, 將以 Qiagen ViralAmp 試劑萃取好的病毒 RNA 以 RT-PCR 與 Nest-PCR 的方法來增幅引子[11]所結合之特定片段, 再定序分析。

- a. 反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction): 使用 QIAGEN 公司的 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit 進行 RNA 反轉錄聚合酶連鎖反應。取病毒 RNA 5uL 加入 5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer 5 uL、5x Q-solution 5 uL、dNTP Mix 1 uL、QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix 1 uL、RNase inhibitor 10 units、forward primer-44F 和 reverse primer-35R (表一) 10 uM 各 1.5 uL 的混合物中, 補水至 25 uL, 以 ABI 9700 PCR machine 進行 50°C 30 分鐘, 再 94°C 15 分鐘 (Hot Start) 後, 以 94°C 30 秒、50°C 1 分 30 秒、72°C 1 分 30 秒, 進行 40 次反應, 最後在 72°C 作用 7 分鐘。
- b. 巢式聚合酶連鎖反應: Nest-PCR: 將第一次 PCR 的產物取 1uL 當模板(template) 加入 2x PCR Master Mix (Fermentas) 25 uL、forward primer-33F 和 reverse primer-48R (表一) 10 uM 各 1.5 uL 的混合物中, 補水至 50 uL, 以 ABI 9700 PCR machine 進行 94°C 5 分鐘裂解後, 以 94°C 30 秒、50°C 1 分 30 秒、72°C 1 分 30 秒, 進行 40 次反應, 最後在 72°C 作用 7 分鐘。
- c. 基因定序與演化樹分析: 將 Nest-PCR 的產物先以洋菜膠電泳分析

以 ETBR 染色後預期可見到約 526bp 的基因片段，再以 ABI 3730 定序儀作定序分析。將定序的結果直接上網比對可到 NCBI 核酸比對網站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>) 就可以比對的結果判斷亞型。演化樹是以電腦軟體 MolecuLar Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 3.1 軟體操作。

### **ViroSeq™ 抗藥性基因序列分析**

使用符合 FDA、CE 及本署 IVD (In vitro Diagnostics) 規範的 ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Celera Diagnostic, Abbott Laboratories, US)[12] 所包含的完整工作流程來分析 HIV-1 基因體中 pol 基因序列上的突變。此 ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System 可偵測到 HIV-1 pol 基因中反轉錄酶(reverse transcriptase) 以及蛋白酶區域(protease) 的基因突變，提供一份具病毒抗藥性基因證據的檢驗報告。此為一完整的檢驗系統[13, 14]，提供從血漿中分離病毒 RNA、進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應以及基因定序的所有試劑可獲得 HIV-1 整個蛋白酶基因的第 1 至第 99 個密碼子，與三分之二個反轉錄酶基因的第 1 至第 335 個密碼子的氨基酸序列並將此保守序列與 HXB-2 這個參考株進行比對，以鑑定出存在於檢體中的突變基因。最後，ViroSeq™ 軟體再利用其專利整合系統，分析出基因突變以及病毒抗藥性產生的報告。操作流程完全依照試劑組所附之操作手冊，依序為檢體 RNA 的萃取、反轉錄酶聚合酶鏈鎖反應、聚合酶鏈鎖反應、聚合酶連鎖反應產物純化、定序循環反應、定序自動偵測、軟體分析。

#### **檢體 RNA 的萃取**

將 0.5mL 的血清以低溫超高速離心 (22,000 x g for 60 min.) 沉澱

病毒顆粒，去除上清液，在沉澱的病毒顆粒中加入 600 uL Lysis 緩衝液，以震盪器充份混勻後，靜置於室溫下 10 分鐘，隨後加入 600 uL 異丙酮，以震盪器充份混勻後，離心 (15,000 x g for 15min.)，去除上清液，再加入 1 mL 冰的 70% 乙醇，再以震盪器充份混勻後，離心 (15,000 x g for 5min.)，去除上清液，乾燥後加入 50 uL RNA 稀釋液回溶，保存於-80°C 冷凍櫃。

### 反轉錄酶聚合酶連鎖反應

萃取出檢體中的人類免疫不全病毒的 RNA，須先經由反轉錄酶作用，反轉錄成 cDNA 後，再經由聚合酶連鎖反應 (PCR) 增殖放大包含 pol 基因的區域。取 10 µL 萃取出來的人類免疫不全病毒的 RNA，以莫洛尼鼠類白血病病毒 (Moloney murine leukemia virus) 的反轉錄酶，進行反轉錄酶反應 (65°C for 30 seconds, 42°C for 65 min., 99°C for 5 min.)，完成後所得之 cDNA 可接著進行聚合酶連鎖反應，或保存於-20°C 冷凍櫃。

### 聚合酶連鎖反應

將所有反轉錄作用所獲得之 cDNA 以 AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) 進行聚合酶連鎖反應 (50°C for 10 min., 93°C for 12 min., 93°C for 20 seconds, 64°C for 45 seconds, 66°C for 3 min., 72°C for 10 min.)，所設計的引子對增幅後可產生一 1.8 kb 大小的 amplicon，此 amplicon 可用來作為定序的模板。完成的 PCR 反應液可暫存於-20°C 冷凍櫃。

### 聚合酶連鎖反應產物純化

為了之後進行核酸定序反應，聚合酶連鎖反應之產物需先以離心

的方式經由玻璃纖維基質去除反應鹽類及引子，進而純化之。首先在玻璃纖維基質微量離心管柱中加入 300  $\mu$ L 200mM KCl 緊接著在加入 50  $\mu$ L 的 PCR 反應產物，離心 (800 x g for 15min.)，再加入 300  $\mu$ L 的二次水，離心 (800 x g for 15min.)，再加入 35  $\mu$ L 的二次水之後將玻璃纖維基質微量離心管柱倒放在一乾淨的離心管上，離心 (800 x g for 5min.)，取 5  $\mu$ L 的 DNA 濾出液，以 1.0% 洋菜膠，經電泳確認其 DNA 純度及濃度。其餘 DNA 濾出液則保存於-20°C 冷凍櫃，待日後 DNA 定序所用。

#### 定序循環反應和定序自動偵測

核酸定序反應以 BigDye terminator (Applied Biosystems, US) 試劑完成，由 7 個不同的引子分別進行定序循環反應 (25 cycles, 96°C for 10 seconds, 5°C for 5 seconds, and 60°C for 4 min.)，接著以 ABI Prism ABI3130 (Applied Biosystems, US) 核酸序列分析儀完成定序自動偵測。

#### 軟體分析

所獲得的 7 條序列片段輸入 Celera Diagnostics ViroSeq HIV-1 Genotyping System software version 2.6 之中，與 HXB-2[15] 這個參考株進行比對，包含了整個蛋白酶基因的第 1 至第 99 個密碼子，與三分之二個反轉錄酶基因的第 1 至第 335 個密碼子的氨基酸序列，也分別就是 HIV-1 基因體中第 2253 至第 2549 個核酸 (pol) 與第 2550 至第 3554 個核酸 (rt) 序列，以鑑定出存在於檢體中的突變基因。最後，ViroSeq 軟體再利用其專利整合系統，分析出基因突變以及病毒抗藥性產生的報告



## HIV-1 病毒基因亞型分析

利用 HIV-1 抗藥性分析所獲得之整個蛋白酶基因(protease gene) 的第 1 至第 99 個密碼子，與三分之二個反轉錄酶基因(reverse transcriptase gene)的第一至第 335 個密碼子，來進行 HIV-1 病毒基因分型。所有的基因序列將利用 Rega Subtyping Tool v.2.0 (<http://jose.med.kuLeuven.be/genotypetool/html/>) 完成，這是一個自動化的 HIV-1 分型工具，以基因系統樹分析(phylogenetic analysis)為基礎架構來決定病毒株之亞型[16]，此 HIV-1 分型工具之優勢為準確度為 100% 而可辨識率為 99.2% (沒有偽陽性出現) [17]。至於無法直接由 Rega Subtyping Tool v.2.0 決定病毒株之亞型者，則以 Viral Genotyping Tool (National Center For Biotechnology Information, USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>) 進行序列分析決定，此 HIV-1 分型工具優勢為快速並且可辨識率為 100% 而準確度則為 99.5% [17]。

### 三、研究結果

本研究計畫監測每年新通報之 HIV-1 陽性病患，2012 年新通報個案已分析了 217 件血漿或血清檢體，直接萃取 viral RNA 後，以 RT-PCR 針對 HIV-1 Pol 基因進行核酸定序與亞型分析。結果統計在 HIV 基因分型分析方面，根據 2012 年度新通報之本國籍 HIV-1 感染者之危險因子之比例進行篩選，針對 HIV-1 Pol 基因進行核酸定序與亞型分析，總共完成 217 件檢測，結果統計有 183 件(84.3%) 為 B 亞型為主要流行之病毒亞型，另有 21 件(9.7%)為 CRF01\_AE 亞型、13 件(6.0%)為 CRF07\_BC 亞型 [表一]。依危險因子進一步區分，在 CRF07\_BC 亞型中以靜脈藥癮者為主要族群，在 B 亞型中以同性性行為者所佔之比例最高。

而統計 2012 年新通報之 HIV-1 陽性個案之抗藥性盛行率監測共分析了 217 件檢體，具有抗藥性之主要突變點共有 16 件，抗藥性盛行率為 7.4% (16/217)，與前年相比結果稍增(6.9%)。其中 PIs 為 2.3%(5 件)、NRTIs 為 4.6%(10 件)、NNRTIs 為 2.8% (6 件)[表二]。而針對 HAART 藥物治療失敗之 HIV-1 病患之抗藥性基因序列分析方面，自 2013 年一月至十一月共收集檢體 69 件，其中有 39 件(56.5%)具有一個以上之抗藥性相關之突變位點，其中以 NNRTIs 類別之抗藥性突變位點最普遍(40.6%)，其次是 NRTIs 類別之藥物(36.2%)，而 PIs 類別偵測案例最少(18.8%)[表三]。而針對 HAART 藥物治療失敗之 HIV-1 病患之抗藥性基因序列分析方面。然其中有超過四成之(43.5%)病患沒有發現任何 HIV-1 抗藥性突變位點，代表有許多之病患可能有自行停藥之不良用藥習慣，導致無法檢測出其具有之抗藥性[表三]。此類個案有可能在未開始使用 HAART 藥物治療時，便發展出抗藥

性，這樣的結果對於治療病患與防治 HIV-1 抗藥性傳播上將帶來考驗。

#### 四、討 論：

何大一博士在西元 1996 年提出了高效能抗反轉錄酶(HAART)治療法即俗稱的雞尾酒療法(cocktail therapy)，結合蛋白質酶抑制劑(PI)與反轉錄酶抑制劑(RTI)共同抑制愛滋病毒於細胞內複製時所需的酵素。而目前美國 FDA 核准上市之抗愛滋病藥物共 6 大類計 25 種藥物 [20]，臺灣目前已核准引進了包括 NRTIs, NNRTIs, PIs 以及融合抑制劑 (fusion inhibitor) 共 4 大類計 18 種藥物，目前 HAART 治療通常會從 NRTIs、NNRTIs 以及 PIs 中選用三種藥物，一般會使用兩個 NRTIs 和一個 PIs 或 NNRTIs 的藥物組合來作為第一線的治療 [21]，它已被證實比單一病毒抑制劑更能有效地抑制病毒的感染的能力 [22]。當病患服用 HAART 治療後血漿中的病毒是可迅速被抑制，但是潛伏在 CD4 淋巴球中的病毒仍無法將其消滅 [23]，因此，科學家又提出新的治療方法，以 interleukin-2(IL-2) 搭配 HAART 來治療，因為 IL-2 是 T 細胞生長分裂所需的細胞激素，希望以 IL-2 來刺激潛伏病毒複製再以 HAART 將其抑制，但此方法已被證實無法完全消滅愛滋病毒 [24-26]。因此，目前被醫界廣為使用的治療方法即 HARRT 治療配方加上監測 CD4 淋巴球的數目與愛滋病毒量(Viral load)。

此外，愛滋病毒抗藥性的出現是造成臨床上治療的一個重大難題，從目前的研究可以說，病毒的抗藥性是由於基因變異性(genetic diversity)的結果。由於反轉錄酶本身具極高錯誤率(inherent high error rate)以及病毒在體內的高複製速率，導致容易產生許多的突變株(variants)。加上選擇性壓力(selective pressure)的出現，例如：抗愛滋病毒藥物的使用，便會驅使抗藥性病毒的快速出現，而這些抗藥性病毒就是其基因上產生突變出現病毒反彈(viral rebound)的現象 [27, 28]。本計劃研究目的為了解愛滋病毒抗藥性在未服藥病患

(treatment-naïve patient)中的盛行率與臺灣地區愛滋病毒亞型型別。在本研究中在初次確認愛滋病陽性之檢體中，分析了 217 件檢體，NRTIs 類別之抗藥性突變位點，從 HAART 治療方面來分析，在這些未服藥的病人在 F77L 突變位點對大部分 NRTI 藥物皆會產生抗藥性；NNRTIs 類別之抗藥性突變位點，其中 K101EP、K103NS、Y181C 會對 EFV、ETR、NVP 產生嚴重之抗藥性[表四]。而在 HIV-1 病毒蛋白質酶上發現最多的突變點多為次要突變點 L10I、M36I、L63P、A71I 及 V77I，這些次要的自然突變點的累積也有可能造成抗藥性的表現型(Phenotype)出現[29]。在愛滋病毒反轉錄酶上發現有一病人具有兩個以上的主要突變點，將會導致臨床治療以及傳染防治上相當棘手，未來針對 HAART 治療失敗之病患收集檢體進行分析，以了解這些在 Naïve(未服藥)族群逐漸累積、流行之 HIV-1 抗藥性突變位點是否也同樣在服藥族群中流行，了解抗藥性突變位點傳染之嚴重程度。

愛滋病毒抗藥性分析方面，目前感染 HIV-1 陽性患者的治療方式多採用高效能抗反轉錄酶(Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART)，為結合蛋白質酶抑制劑(Protease Inhibitor, PI)、反轉錄酶抑制劑(Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, NRTI)，與非核苷酸反轉錄酶抑制劑 ( Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor; NNRTI)，同時抑制愛滋病毒複製時所需要的兩個重要的酵素，然而一旦病患的服藥順從性不佳或同一種藥物服用時間太長，或是因為病毒複製過程中反轉錄(Reverse transcription)或轉錄作用所發生的自然突變所造成自然變異等，都有可能造成對 HAART 輕度到重度的抗藥性。本研究使用監測系統為亞培廠商所提供 ViroSeq™ HIV-1 Genotyping system kit (FDA. CE 認證、衛生署 IVD 認證) 來進行 HIV-1 抗藥性監測，主要是看 *Pol* 基因上是否有針對 PIs、NRTIs 或 NNRTIs

此三類的藥物具有抗藥性之突變位點產生。根據 WHO 發表之文獻建議，當原生 HIV-1 抗藥性盛行率為 5% 以下時，則後年再進行抗藥性盛行率之監測，而 5%-15% 則建議每年皆進行監測，而當盛行率高達 15% 以上時，建議所有 HIV-1 陽性個案在服藥前必須進行抗藥性檢測，以節省抗愛滋藥物支出[18]。而也有一些論文認為針對資源充足的高收入國家建議將 10% 的原生抗藥性盛行率做為服藥前是否必須進行抗藥性檢測之標準門檻[19]。本計劃結果落於 5%-15% 區間，建議每年皆進行監測。

在 HIV-1 疫情監測中，基因亞型之鑑定非常重要，可以知道病毒演化複雜性以及傳播流行的區域，而 HIV-1 亞型與感染的途徑、傳播的方式有關，對疫苗與藥物研發也有重要的影響。而且 HIV-1 不同亞型對於藥物感受度可能有差異進而影響產生不同的抗藥性病毒株[30]。在 2004 年之前臺灣地區愛滋病毒亞型研究，例如：陽明大學陳宜民教授的研究發現在 288 感染者中 B 亞型佔 68.2%、CRF01\_AE 亞型佔 27.3%，男性感染者多為 B 亞型，女性感染者多為 non-B 亞型[1, 3]。臺灣大學李君男教授藉由 vpu 基因的分型研究中也指出在 363 位感染者中 73.8% 為 B 亞型、23.1% 為 CRF01\_AE 亞型[6]。從亞型與性行為模式有研究發現 B 亞型多為男同性戀或雙性戀，CRF01\_AE 亞型多為男異性戀與異性戀族群主要傳播的型別[1, 5]。

自 2004 年後臺灣開始一波藉由靜脈藥癮者的途徑進入臺灣造成的大流行，並逐漸成為主要流行的亞型之一，HIV-1 陽性之靜脈藥癮者之亞型分析，更高達 96% 是感染 HIV-1 CRF07\_BC 重組病毒，而從演化樹中得知臺灣的 HIV-1 CRF07\_BC 重組病毒是接近大陸型的重組病毒[31]。而分析感染 HIV-1 之危險因子，靜脈藥癮者所佔的比例從 2005 年高達 72.3%，到 2006 年 60.4%；2007 年 58.8%；2008 年

35.1%；2009 年 17.9%，直到 2012 年則已下降至 1.6%，顯示政府推動之針具清潔交換計畫與美莎佟替代療法對於阻斷靜脈藥癮者散播 HIV-1 病毒有明顯之效用。而 HIV-1 CRF07\_BC 亞型在臺灣之流行，也同樣跟著靜脈藥癮者的控制而明顯地下降，在新通報之 HIV-1 陽性個案中所佔之比例由 2007 的 58.5%下降至今年的 6%。

臺灣地區本國籍新增感染 HIV-1 之藥癮病患於經由政府實施針具交換、替代療法政策，使得藥癮者愛滋病疫情已退燒而有所控制；取而代之，主要流行 HIV-1 之族群重新回到同性戀(含雙性戀)族群，佔所有感染者之八成以上，相對地，其主要之亞型 B 也同時成為臺灣主要流行之亞型，建議防疫作為可針對同性戀族群，而實驗室可建立更精確之發生率監測，以評估防疫政策之效果，例如將同性戀族群之 HAART 治療範圍擴大，以藥物治療之方式使 HIV-1 帶原者之病毒傳染力降至最低，最後藉由發生率監測顯示能獲得良好之控制，但對病患而言，提早服藥會導致抗藥性盛行率之上升，必須進行通盤之考量 [32]。

## 五、圖表

圖一、愛滋病毒結構與感染史(infection cycle)

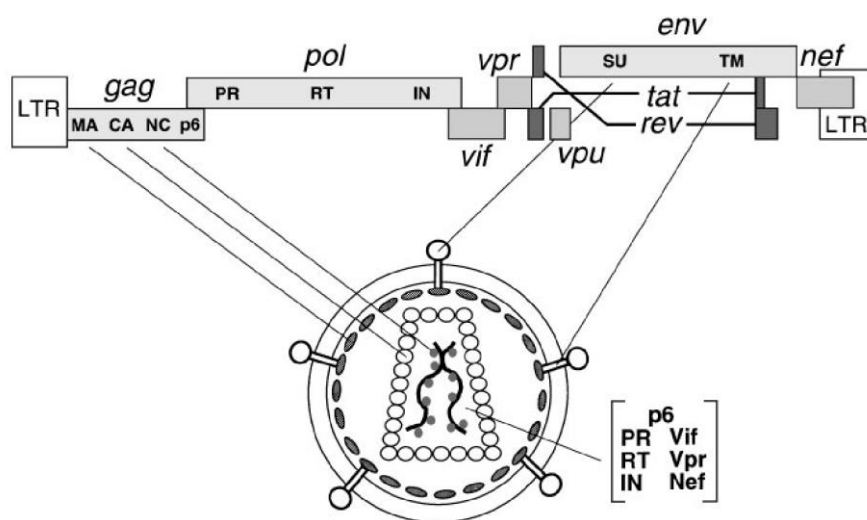
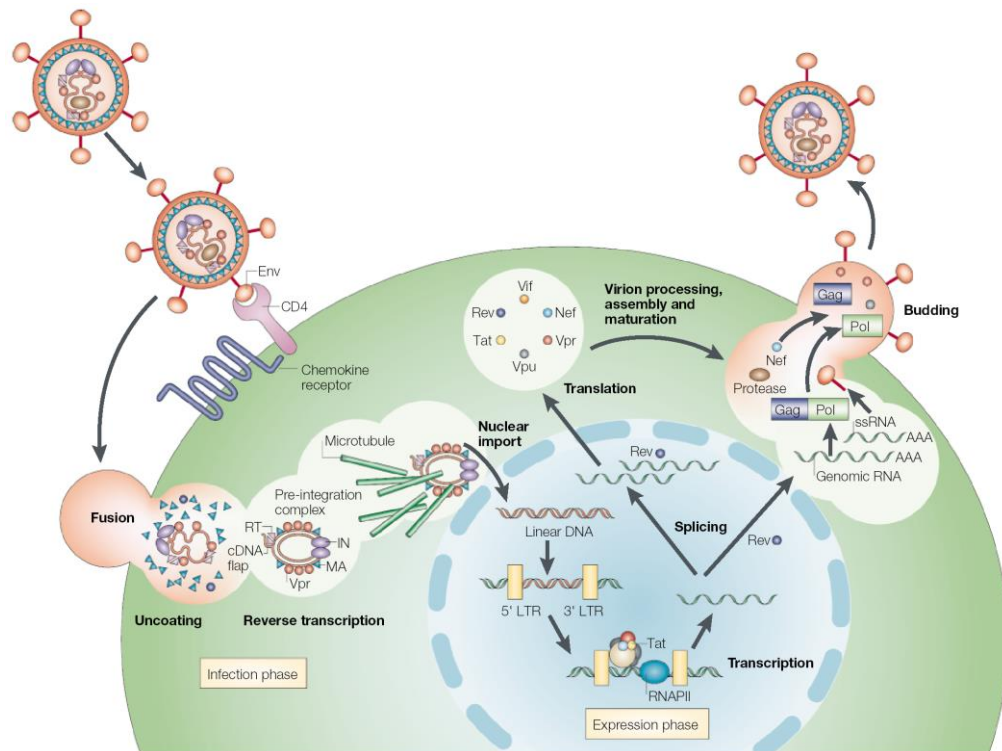
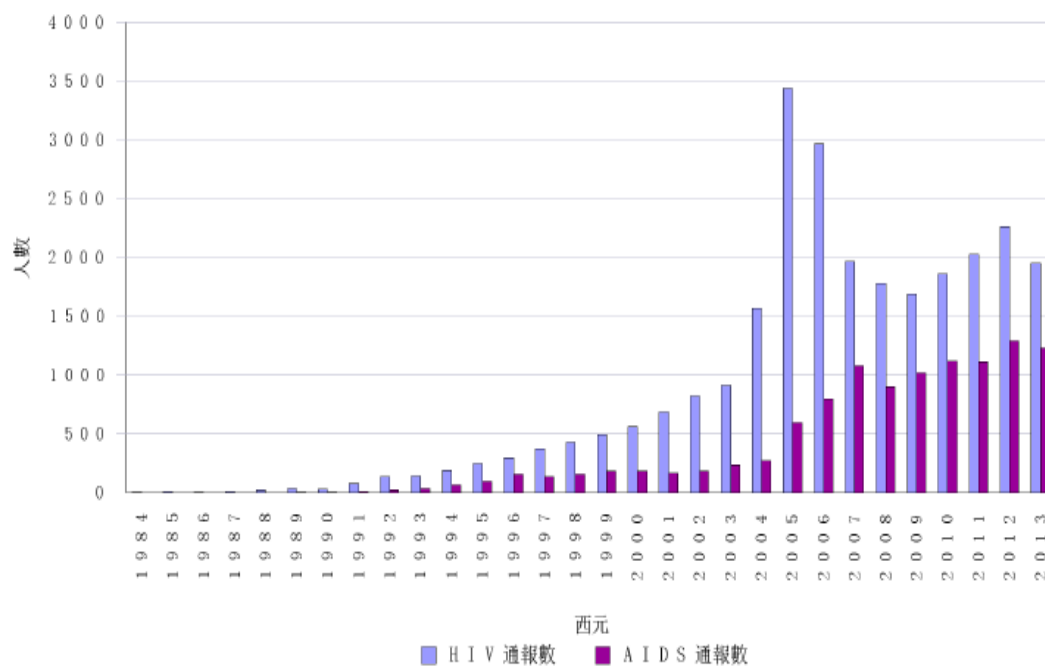


Figure 1 Organization of the HIV-1 genome and virion.



圖二、臺灣地區本國籍愛滋感染者歷年通報數分布圖

本國籍感染人類免疫缺乏病毒者趨勢圖  
1984年至2013年10月(依診斷日分析)



表一、2012 新通報 HIV-1 感染者(Naïve)個案之統計分析

<b>Table 1.</b> Comparison of Characteristics between Patients failing HAART and Naïve Patients Infected with HIV-1 virus in Taiwan, 2012			
<b>Characteristic</b>	<b>Total</b>	<b>**HAART</b>	<b>Naïve</b>
<b>Numbers</b>	286	69	217
<b>Age (years)</b>			
Mean ± SD	31.9 ± 6.5	33.1 ± 7.8	31.2 ± 4.3
<b>Sex</b>			
Male	259 (90.6%)	61 (88.4%)	198 (91.2%)
Female	27 (9.4%)	8 (11.6%)	19 (8.8%)
<b>Sociodemographic</b>			
Northern	166 (58.0%)	38 (55.1%)	128 (59.0%)
Central	60 (21.0%)	17 (24.6%)	43 (19.8%)
Southern	60 (21.0%)	14 (20.3%)	46 (21.2%)
<b>Recent infection</b>			
Recent	116 (40.6%)	2 (2.9%)	114 (52.5%)
Long-term (>155 days)	170 (59.4%)	67 (97.1%)	103 (47.5%)
<b>Route of transmission</b>			
MSM	192 (67.1%)	44 (63.8%)	148 (68.2%)
Heterosexual	33 (11.5%)	6 (8.7%)	27 (12.4%)
PWDU	20 (7.0%)	2 (2.9%)	18 (8.3%)
Bisexual or unknown	41 (14.3%)	17 (24.6%)	24 (11.1%)
<b>Subtyping</b>			
B	242 (84.6%)	59 (85.5%)	183 (84.3%)
CRF01_AE	28 (9.8%)	7 (10.1%)	21 (9.7%)
CRF07_BC	16 (5.6%)	3 (4.3%)	13 (6.0%)
Other	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)

\*\*HAART: Highly Active Anti-Retroviral Therapy (patients failing HAART)

表二、2012 新通報 HIV-1 感染者(Naïve) 具抗藥性突變位點之抗藥性分析

<b>Table 2. The Drug Resistance Mutations among Patients of Naïve Patients infected of HIV-1 in Taiwan, 2012</b>	
<b>Characteristic</b>	<b>Naïve</b>
<b>Case Number</b>	217
<b>Drug resistance mutations</b>	
<b>MDR</b> mutation	4 (1.8%)
any mutation	16 (7.4%)
any <b>PI</b> mutation	5 (2.3%)
any <b>NRTI</b> mutation	10 (4.6%)
any <b>NNRTI</b> mutation	6 (2.8%)

表三、第一線 HARRT 藥物治療失敗個案之抗藥性分析

<b>Table 3. The Drug Resistance Mutations among Patients of HAART treatment failure infected of HIV-1 in Taiwan, 2012</b>	
<b>Characteristic</b>	<b>**HAART</b>
<b>Case Number</b>	69
<b>Drug resistance mutations</b>	
<b>MDR</b> mutation	24 (34.8%)
any mutation	39 (56.5%)
any <b>PI</b> mutation	13 (18.8%)
any <b>NRTI</b> mutation	25 (36.2%)
any <b>NNRTI</b> mutation	28 (40.6%)

\*\*HAART: Highly Active Anti-Retroviral Therapy (Patients of HAART treatment failure)

表四、 2012 新通報 HIV-1 感染者(Naïve) 具抗藥性突變位點之分析

**Table 3.** Prevalence of HIV-1 Drug Resistance-associated Mutations among Naïve Patients in Taiwan, 2012

Mutation	Prevalence		Drug affected
	N	(%)	
<b>NRTI</b>			
D67E	1	(0.5%)	AZT, d4T
F77L	1	(0.5%)	ABC, ddI, AZT, d4T
Q151L	2	(0.9%)	ABC, ddI, AZT, d4T
M184V	5	(2.3%)	3TC, FTC
T215I	1	(0.5%)	ddI, AZT, d4T
K219Q	1	(0.5%)	AZT, d4T
<b>NNRTI</b>			
K101E	1	(0.5%)	EFV, NVP
K103N	3	(1.4%)	EFV, NVP
V179D	1	(0.5%)	All
Y181C	2	(0.9%)	All
Y188L	1	(0.5%)	All
<b>PI</b>			
G73A	1	(0.5%)	NFV, SQV/r, ATV/r
N83D	1	(0.5%)	TPV/r
N88T	1	(0.5%)	NFV
N88D	1	(0.5%)	NFV

## 六、參考文獻

1. Chen YM, Lee CM, Lin RY, Chang HJ. Molecular epidemiology and trends of HIV-1 subtypes in Taiwan. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998,**19**:393-402.
2. Yang R, Kusagawa S, Zhang C, Xia X, Ben K, Takebe Y. Identification and characterization of a new class of human immunodeficiency virus type 1 recombinants comprised of two circulating recombinant forms, CRF07\_BC and CRF08\_BC, in China. *J Virol* 2003,**77**:685-695.
3. Chen YM, Huang KL, Jen I, Chen SC, Liu YC, Chuang YC, *et al.* Temporal trends and molecular epidemiology of HIV-1 infection in Taiwan from 1988 to 1998. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001,**26**:274-282.
4. Mauclore P. [HIV-1 group N in Cameroon and apparent viruses in the chimpanzee]. *Bull Soc Pathol Exot* 2000,**93**:162.
5. Dillner L. HIV subtype may explain sexual transmission. *Bmj* 1996,**312**:530-531.
6. Lee CN, Wang WK, Fan WS, Twu SJ, Chen SC, Sheng MC, *et al.* Determination of human immunodeficiency virus type 1 subtypes in Taiwan by vpu gene analysis. *J Clin Microbiol* 2000,**38**:2468-2474.
7. Perryman AL, Lin JH, McCammon JA. HIV-1 protease molecular dynamics of a wild-type and of the V82F/I84V mutant: possible contributions to drug resistance and a potential new target site for drugs. *Protein Sci* 2004,**13**:1108-1123.
8. Hong L, Zhang XC, Hartsuck JA, Tang J. Crystal structure of an in vivo HIV-1 protease mutant in complex with saquinavir: insights into the mechanisms of drug resistance. *Protein Sci* 2000,**9**:1898-1904.
9. Tantillo C, Ding J, Jacobo-Molina A, Nanni RG, Boyer PL, Hughes SH, *et al.* Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J Mol Biol* 1994,**243**:369-387.
10. Yadav PN, Yadav JS, Modak MJ. Nucleoside drug resistance in HIV-1 reverse transcriptase. *Nat Struct Biol* 1995,**2**:193-195.
11. Yang JY, Lin TL, Luo CC, Chen HY, Twu SJ. Subtyping HIV-1 infections in Taiwan using peptide-enzyme immunoassay, reverse transcription-polymerase chain reaction, and sequencing. *J Formos Med Assoc* 2001,**100**:89-100.
12. Maes B, Schrooten Y, Snoeck J, Derdelinckx I, Van Ranst M, Vandamme AM, *et al.* Performance of ViroSeq HIV-1 Genotyping System in routine practice at a Belgian clinical laboratory. *J Virol Methods* 2004,**119**:45-49.

13. Mukaide M, Sugiura W, Matuda M, Usuku S, Noguchi Y, Suzuki K, *et al.* Evaluation of Viroseq-HIV version 2 for HIV drug resistance. *Jpn J Infect Dis* 2000,**53**:203-205.
14. Cunningham S, Ank B, Lewis D, Lu W, Wantman M, Dileanis JA, *et al.* Performance of the applied biosystems ViroSeq human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping system for sequence-based analysis of HIV-1 in pediatric plasma samples. *J Clin Microbiol* 2001,**39**:1254-1257.
15. Kuiken C, Korber B, Shafer RW. HIV sequence databases. *AIDS Rev* 2003,**5**:52-61.
16. de Oliveira T, Deforche K, Cassol S, Salminen M, Paraskevis D, Seebregts C, *et al.* An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics* 2005,**21**:3797-3800.
17. Wu X, Cai Z, Wan XF, Hoang T, Goebel R, Lin G. Nucleotide composition string selection in HIV-1 subtyping using whole genomes. *Bioinformatics* 2007,**23**:1744-1752.
18. Bennett DE, Myatt M, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF. Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment. *Antivir Ther* 2008,**13 Suppl 2**:25-36.
19. Weinstein MC, Goldie SJ, Losina E, Cohen CJ, Baxter JD, Zhang H, *et al.* Use of Genotypic Resistance Testing To Guide HIV Therapy: Clinical Impact and Cost-Effectiveness. *Annals of Internal Medicine* 2001,**134**:440-450.
20. Shafer RW, Schapiro JM. HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART. *AIDS Rev* 2008,**10**:67-84.
21. Hammer SM, Eron JJ, Jr., Reiss P, Schooley RT, Thompson MA, Walmsley S, *et al.* Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 2008,**300**:555-570.
22. Palella FJ, Jr., Baker RK, Moorman AC, Chmiel JS, Wood KC, Brooks JT, *et al.* Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006,**43**:27-34.
23. Siliciano RF. A reservoir for HIV in patients on combination antiretroviral therapy. *Hopkins HIV Rep* 1998,**10**:1, 5-6, 11.
24. Kulkosky J, Sullivan J, Xu Y, Souder E, Hamer DH, Pomerantz RJ. Expression of latent HAART-persistent HIV type 1 induced by novel cellular activating agents. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004,**20**:497-505.
25. Crowe S. Effect of interleukin-2 plus highly active antiretroviral therapy on HIV-1 replication and proviral DNA (COSMIC trial), by Ling *et al.* *Aids*

- 2003,**17 Suppl 4**:S105-107.
26. Martinez-Marino B, Ashlock BM, Shiboski S, Hecht FM, Levy JA. Effect of IL-2 therapy on CD8+ cell noncytotoxic anti-HIV response during primary HIV-1 infection. *J Clin Immunol* 2004,**24**:135-144.
  27. de la Rosa R, Ruiz-Mateos E, Rubio A, Abad MA, Vallejo A, Rivero L, *et al.* Long-term virological outcome and resistance mutations at virological rebound in HIV-infected adults on protease inhibitor-sparing highly active antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother* 2004,**53**:95-101.
  28. Mocroft A, Ruiz L, Reiss P, Ledergerber B, Katlama C, Lazzarin A, *et al.* Virological rebound after suppression on highly active antiretroviral therapy. *Aids* 2003,**17**:1741-1751.
  29. Yu M, Kabat W, Wang J. [Rapid detection of drug resistant HIV -1 to reverse transcriptase and protease inhibitors in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapies]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2000,**14**:325-329.
  30. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med* 2008,**358**:1590-1602.
  31. Lin YT, Lan YC, Chen YJ, Huang YH, Lee CM, Liu TT, *et al.* Molecular epidemiology of HIV-1 infection and full-length genomic analysis of circulating recombinant form 07\_BC strains from injection drug users in Taiwan. *J Infect Dis* 2007,**195**:1283-1293.
  32. Collazos J, Asensi V, Carton JA. Association of HIV transmission categories with sociodemographic, viroimmunological and clinical parameters of HIV-infected patients. *Epidemiol Infect* 2010,**138**:1016-1024.