

封面式樣

計畫編號：DOH92-DC-1024

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

台灣地區人類免疫不全病毒(HIV)的原生抗藥性與其亞型  
之鑑定與研究

研究報告

執行機構：台大醫事技術學系

計畫主持人：張淑媛

研究人員：洪健清、張淑芳、李君男、陳茂源、吳秀英

執行期間：92年01月01日至92年12月31日

\*本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見\*

## 目錄

中文摘要	3
英文摘要	5
本文	7
圖一	37
圖二	38
圖三	39
圖四	40
圖五	41
圖六	42
表一	43

## 中文摘要

人類免疫不全病毒的一個重要特性為其病毒株間的遺傳因子變異性很大。因此根據這些遺傳因子的變異性來作亞型的判別，已成為追蹤人類免疫不全病毒的傳播及其於特定地域分布的重要工具。根據之前的研究顯示，台灣地區流行的人類免疫不全病毒以 B 亞型病毒株最為盛行，約佔台灣感染總人數的百分之七十。而另一人類免疫不全病毒之 E 亞型病毒株則佔台灣感染人數的百分之二十五。其它曾在台灣地區分離之病毒株則包括 A、C 及 G 亞型，甚至一些特殊的 A/G 亞型重組病毒株，也曾自台灣地區感染的病人身上被分離。近年來，兩株特殊的 B/C 亞型重組病毒株，已在中國大陸地區造成人類免疫不全病毒感染之大流行。由於兩岸之間的交通往返越來越頻繁，小心監測這兩株特殊的 B/C 亞型重組病毒株，是否會輸入台灣並造成流行，是十分重要。本計劃將首先分析不同病人的 *gag-RT* 病毒基因序列，並從中了解不同亞型及特殊重組病毒株在台灣的分佈情形。我們一共收集有 268 個新近感染人類免疫不全病毒的病人檢體，其中 155 件來自台北市立性病防治所，113 件來自臺大醫院。經由分析檢體的 *gag-RT* 病毒基因序列，我們發現台灣地區流行的人類免疫不全病毒仍以 B 亞型病毒株最為盛行，約佔台灣感染總人數的百分之八十九，較往常的百分之七十高出十九個百分比。而另一株人類免疫不全病毒之 E 亞型病毒株，則佔台灣感染人數的百分之九點三，較往年下降十六個百分比。其它分離之病毒株則包括三株 G 亞型、一株 C 亞型、及一株 B/C\_07 亞型重組病毒株。研究結果顯示，B 及 E 亞型病毒株仍為台灣地區主要的人類免疫不全病毒株，而 B 亞型病毒株的盛行率有爬升的趨勢。此外，自從三合一雞尾酒療法實施以來，已有許多研究顯示，不但在受治療病人體內有抗藥性病毒株的產生，這些抗藥性病毒株也將會造成原生抗藥性人類免疫不全病毒的傳播。

而一些現有藥物在這些原生抗藥性病毒株感染的病患身上，治療效果也受到影響。因此，本計劃藉由分析蛋白酶(protease)及反轉錄酶(reverse transcriptase, RT)這兩個基因上與抗藥性相關的基因變異，來了解台灣地區原生抗藥性人類免疫不全病毒的盛行率。希望研究成果未來能幫助節省醫療成本，並提高個案的有效治療。所分析的治療藥物包括目前最常用的三類藥物：擬似核苷酸衍生物的反轉錄酶抑制藥物(nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTIs)，非擬似核苷酸衍生物的反轉錄酶抑制藥物(non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs)，及蛋白酶抑制藥物(protease inhibitors, PI)。我們一共分析了 268 個新近感染人類免疫不全病毒，且尚未服藥的病人檢體。研究結果顯示，台灣地區對於這三類藥物 NRTIs、NNRTIs、及 PI 有單一抗藥性的病毒盛行率分別為 2.6%、2.2%、及 0.3%。相較起來，台灣地區抗藥性病毒株的盛行率較日前歐美所報導的 1-11%，相對地較低。但是，值得注意的是有一位病人的病毒株同時對於 NRTIs 及 PI 這兩類藥物產生抗藥性。根據國外研究顯示，這種病毒株的產生將會使病人接受三合一雞尾酒療法的效果大打折扣。我們將會對這些病人做持續的追蹤研究，比較我們所做基因型的分析結果與病人接受治療的效果之間的關聯性。目前，在台灣遭受人類免疫不全病毒感染的本國病患，皆可接受健保給付的三合一雞尾酒療法。而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。如能在病人接受藥物治療前、或治療期間，偵測抗藥性病毒株的存在，不僅可供臨床醫師選擇適當的藥物加以治療，也可避免醫療資源的浪費。

中文關鍵詞(至少三個)：人類免疫不全病毒、亞型、原生抗藥性

## 英文摘要

Human Immunodeficiency virus (HIV) infection is a growing public health problem in Taiwan. As of November 2003, there have been 5,550 cumulative HIV-1 infections reported to the Center for Disease Controls, Taiwan. One of the characteristics of HIV viruses is their genomic heterogeneity and genetic subtyping has been a useful tool to track the spreading patterns of HIV and to study the genesis of the epidemic in specific areas. Previous studies have shown that subtype B strains are the most prevalent and are responsible for 70% of HIV infections in Taiwan. Another HIV strain, subtype E, accounts for 25% of HIV infections. Other HIV strains, like subtypes A, C, and G, have been isolated from infected individuals in Taiwan. It is noteworthy that, besides subtype E, some intersubtype recombinants of subtypes A and G were also identified among infected individuals. Furthermore, two unique B/C recombinant viruses are spreading in China and have caused serious HIV epidemics there. With the increasing frequency of traveling and communications between Taiwan and China, it is essential for us to monitor the introduction of these B/C recombinant viruses to Taiwan. In this proposal, we would like to analyze the *gag-RT* sequences to provide the knowledge of genetic epidemiology of HIV strains and the prevalence of intersubtype recombinants in Taiwan. We have collected a total of 268 specimens from recently HIV infected individuals. Among them, 155 are from the Taipei city STD control center and 113 are from National Taiwan University Hospital. After analysis of the *gag-RT* sequences, we found that the prevalence rate of HIV subtype B virus is 89%, which is higher than the 70% reported previously in Taiwan. Therefore, HIV subtype B is still the predominant virus circulating in Taiwan and the infected population is increasing. Another HIV subtype E virus accounts for 9.3% of HIV infections in Taiwan. The proportion is decreasing 16 % as compared to previous analysis. Other HIV subtypes identified in Taiwan include 3 subtype G, 1 subtype C and 1

B/C\_07 CRF virus. Overall, subtypes B and E are the dominant HIV viruses in Taiwan and the prevalence of subtype B is increasing. Since the availability of HAART (highly active antiretroviral therapy), the appearance of drug resistant viruses in treated individuals and the transmission of these drug resistant viruses have been reported by many groups. Antiviral drug resistance was observed in many primary infected individuals. As the transmission of primary drug resistant virus is increasing, the drug resistant test becomes important before patients receiving therapy. In our project, the *gag-RT* fragment amplified from patients' specimens includes both the protease and RT genes, which are the target genes of antiviral drugs. By analyzing the genetic variations observed in these specimens, we hope to estimate the prevalence of resistant HIV among primarily infected individuals in Taiwan. We analyzed three classes of drugs: NRTIs (nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTIs), NNRTI (non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs), and PIs (protease inhibitors). We have collected 268 specimens from recently infected and drug naïve individuals. From analysis we know the prevalences to one class of drug resistance, which includes NRTIs, NNRTIs, and PIs, are 2.6%, 2.2%, and 0.3%, respectively. They are relatively low as compared to the reported 1-11% in US and Europe. To be noticed, one patient developed drug resistance to two classes of drugs, NRTIs and PIs. Based on previous studies, such patients will have higher chance to fail the antiviral therapy. We will continue to follow up these patients to know the correlation between the genotypic analysis we performed and the outcomes after antiviral therapy. In Taiwan, the HAART therapy is available to HIV infected citizens covered by the national health insurance. Complete medical care and drug therapy have profoundly prolonged the life of these patients. If we can provide drug resistance test before or during antiviral therapy, it will help the clinical doctors to optimize the drug regimens and avoid any waste of medical resources.

Keywords: HIV, subtype, drug resistance

本文

## I. 前言

人類免疫不全病毒(HIV)是造成人類後天性免疫不全症候群(愛滋病, AIDS)的主因,並已造成全球性的大流行(Cohen and Fauci 2001)。至民國九十二年底為止,全球預計有四千兩百萬人遭到感染,其中包括三千七百萬名成年人及二百五十萬名小於十五歲的孩童(<http://www.unaids.org/hivaidsinfo/statistics>)。就民國九十二年間,人類免疫不全病毒感染及其所導致的愛滋病已造成三百萬人的死亡。人類免疫不全病毒在台灣的流行,約與亞洲同時期。自民國七十五年,第一例人類免疫不全病毒感染病患在台灣被鑑定後,台灣人口的陽性病毒感染率,已逐年快速增加(Chuang, Chang et al. 1993; Chen, Huang et al. 2001)。至今,根據衛生署疾病管制局的統計,在台灣已累積有五千五百五十人遭到人類免疫不全病毒的感染(<http://www.cdc.gov.tw>)。在台灣,被人類免疫不全病毒感染的病患中,有二千零五十二例(40.00%)可能是經由異性間的性接觸,一千八百五十五例(36.20%)則是經由同性間的性接觸,而六百一十五例(12.00%)是雙性戀者 (<http://www.cdc.gov.tw>)。這些加起來約佔人類免疫不全病毒感染人數的百分之九十。另一個與人類免疫不全病毒感染有關的危險因子---藥物注射,約佔台灣被感染人口的百分之二點零六,遠低於大陸的百分之七十一(Yu, Chen et al. 1999; Yu, Liu et al. 2001)(<http://www.cdc.gov.tw>)。因此,在



台灣，性接觸(88.20%)可能是造成人類免疫不全病毒感染的主要途徑。

根據人類免疫不全病毒 *env* 及 *gag* 基因序列的基因系統樹分析 (phylogenetic analysis), 人類免疫不全病毒可被分為三群---M 群(major)、O 群(outlier)及 N 群(new)。在 M 群內，人類免疫不全病毒株可再依病毒遺傳因子的相似與相異性，再細分為不同亞型(Freed and Martin 2001)。依目前的研究結果得知，至少有十個亞型存在，分別為 A 到 J 亞型 (<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db>)。雖然，在 *gag* 基因上，不同亞型間的核苷酸序列差異度約為百分之十四；而在 *env* 基因上，不同亞型間的序列差異度為百分之三十。同一病毒株的 *env* 及 *gag* 基因應為同一亞型。但是，E 亞型病毒株隨後被證明是一種特殊的重組病毒株(recombinant virus)，因為它的 *gag* 基因為 A 亞型，而 *env* 基因則為 E 亞型(Gao, Robertson et al. 1996)。自此，美國的 Los Alamos Laboratory 建議，要正確地鑑定人類免疫不全病毒株的亞型，必須分析多段的病毒基因序列。同時，由於以 PCR 的方法增幅全長人類免疫不全病毒基因體的技術日漸成熟，越來越多的重組病毒株被鑑定出來(Gao, Robertson et al. 1998; Robertson, Anderson et al. 1999)。「流通性重組病毒株」(circulating recombinant form, CRF)於是被用來命名造成區域性人類免疫不全病毒流行的重組病毒株(Robertson, Anderson et al. 1999; Robertson, Anderson et al. 2000)。像之前的 E 亞型就被重新命名為

CRF01\_AE (Robertson, Anderson et al. 1999)。

根據這些病毒遺傳因子的變異性來作亞型的判別，已成為追蹤人類免疫不全病毒的分布，及其隨時間所產生的分布異動之一項重要工具(Cohen and Fauci 2001)。A亞型病毒株主要分布在中非、歐洲、俄國及東亞。B亞型病毒株最初於西元1980年在美国被分離並研究。此外，它也曾在歐洲、南美洲及澳洲造成流行。必須注意的是，B亞型的變異病毒株，B' 亞型。B' 亞型主要分布在泰國、中國大陸、馬來西亞及日本(Weniger, Takebe et al. 1994; Graf, Shao et al. 1998)。C亞型病毒株在全球所感染的人口數為所有人類免疫不全病毒亞型中之冠。它主要遍布在東非、南非及印度;並且在這些國家造成十分嚴重的人類免疫不全病毒流行。在南非，年紀介於十五至四十九歲的人口中，約有百分之二十五至三十六受到人類免疫不全病毒的感染 (<http://www.unaids.org/hivaidsinfo/statistics>)。D亞型病毒株主要分布在中非。E亞型病毒株(CRF01\_AE)則分布在東南亞地區。在泰國，E亞型病毒株曾在毒物注射的人口中，造成快速且嚴重的流行。從西元1987年感染約百分之一的毒物注射人口，至西元1998年竟已有約百分之三十的毒物注射人口，受到E亞型病毒株的感染(Nerurkar, Nguyen et al. 1996; Mason, Kitsiripornchai et al. 1998)。近年來，E亞型病毒株甚至在越南及大陸都造成當地嚴重的流行(Kato, Shiino et al. 1999; Piyasirisilp, McCutchan et al.

2000)。至於台灣的人類免疫不全病毒流行狀況，台大醫學院的李君男教授、陽明醫學院的陳宜民教授及長庚醫學院的張學賢教授都曾做過亞型的分析 (Chen, Lee et al. 1998; Lee, Wang et al. 2000; Chen, Huang et al. 2001)。包括人類免疫不全病毒A、B、C、D、CRF01\_AE及G亞型都曾被分離出來過。其中以B亞型病毒株最為盛行，約佔台灣感染人數的百分之七十。B亞型病毒株在受感染的同性戀族群中占有相當高比例的感染。至於B' 亞型在台灣的盛行率，仍需更進一步的分析。E亞型病毒株約佔台灣感染人數的百分之二十五，並主要分布在經由異性性接觸而被感染的病患中。其他曾在台灣地區分離之人類免疫不全病毒亞型，包括A、C及G亞型，都曾被零星報告過。這些病毒株主要是經由異性性接觸而造成感染。值得注意的是，除了E亞型病毒株以外，兩株特殊的A/G亞型重組病毒株也曾在台灣地區感染的病人身上被分離出 (Lee, Chen et al. 1998; Lee, Chen et al. 1999; Lee, Wang et al. 2000)。其中一株含有A亞型的*gag*及*env*病毒基因，但是它的*vpu*基因則是屬於G亞型。另一株則有A亞型的*gag*基因及G亞型的*env*基因。很明顯的，這兩株A/G亞型重組病毒株應來自不同的起源。至於這些特殊重組病毒株是由外地引進，或者這些特殊病毒株是經由在台灣被感染患者的體內進行病毒遺傳因子的重組所造成，至今尚無定見。持續地調查以了解這些病毒在台灣的散佈，及其對台灣地區人類免疫不全病毒亞型流行的影響是必須的。

這幾年以來，在中國大陸被人類免疫不全病毒感染的人口數正在急遽增加中(Normile 2000)。根據美國愛滋病組織的統計顯示，在中國大陸約有八十五萬人遭到人類免疫不全病毒的感染(<http://www.unaids.org/hivaidsinfo/statistics>)。第一次的流行發生在西元 1989 年，主要分布在雲南省毒品注射的族群(Xia, Kreiss et al. 1994; Piyasirisilp, McCutchan et al. 2000)。從地理位置上來看，雲南省鄰近盛產海洛因毒品的 Myanmar，並被認為是這些毒品被輸往中國大陸的重要交通轉折點。根據中國大陸官方統計顯示，雲南省內遭人類免疫不全病毒感染的人口數為全國之冠，並約佔全中國大陸受感染總人口數的百分之四十(Yang, Xia et al. 2002)。近年來，人類免疫不全病毒已散佈至雲南省以外的地區。光在西元 1995 至 1997 年間，人類免疫不全病毒已造成雲南省以外地區超過百分之五十的新例感染(Yu, Liu et al. 2001)。新疆及廣西目前是有全中國大陸第二及第三多人類免疫不全病毒陽性感染人口的省份。這可能與新疆及廣西是海洛因毒品自雲南省輸往中國大陸境內內銷的主要途徑有關。最早在雲南省所分離的人類免疫不全病毒為 B 亞型及其變異株 B' 亞型(Wagner, Deml et al. 1996; Graf, Shao et al. 1998)。但是，變異株 B' 亞型所造成的感染比例已自西元 1990 年統計佔全 B 亞型的百分之二十，在西元 1996 年爬升至佔全 B 亞型的百分之九十(Luo, Tian et al. 1995)。此外，C 及 E 亞型曾分別在

西元 1992 及 1994 年在毒物注射及從事性交易活動的族群中造成流行 (Cheng, Zhang et al. 1994; Luo, Tian et al. 1995)。近年來，兩株特殊的 B/C 亞型重組病毒株(CRF07\_BC 及 CRF08\_BC)陸續在中國大陸被分離及鑑定，並已在當地毒物注射的族群中造成大流行(Piyasirisilp, McCutchan et al. 2000; Su, Graf et al. 2000)。CRF07\_BC 亞型重組病毒株是從一個來自新疆受感染的毒物注射者所分離出的病毒株。根據基因序列分析，CRF07\_BC 亞型重組病毒株的基因體包含四段與 B 亞型較接近的病毒遺傳因子。(1)位於 Gag 蛋白中 p17 的 C 端(nt478-620);(2)分別位於 Gag 及 Gag-Pol 蛋白中的 p7、p6，及 p6\* (nt1478-1908);(3)位於 Pol 蛋白中反轉錄酶(RT)的酵素活性位置 (nt2365-2613);(4)位於 *vpr* 及 *env* 遺傳因子之間(nt5102-5818)。CRF08\_BC 亞型重組病毒株則是分離自一位來自廣西受感染的毒物注射者。CRF08\_BC 亞型重組病毒株的基因體包含兩段與 B 亞型較接近的病毒遺傳因子。(1)位於 Gag 蛋白中 p24 的 N 端(nt604-1054);(2)位於 Pol 蛋白中反轉錄酶的酵素活性位置(nt2241-2538)。除了這兩株特殊的 B/C 亞型重組病毒株之外，一些新近產生的特殊 B/C 亞型重組病毒株也自雲南省德宏縣被分離及鑑定 (Yang, Xia et al. 2002)。這些新近鑑定的特殊 B/C 亞型重組病毒株，可能源自於 CRF08\_BC 亞型重組病毒株與其他不明病毒株，經由二次病毒遺傳因子重組而產生。這些特殊重組病毒株的產生，將會嚴重地影響到未來疫苗

之於預防人類免疫不全病毒感染的有效性。由於兩岸之間的交通往返越來越頻繁，小心監測這兩株特殊的 B/C 亞型重組病毒株，是否有輸入台灣並可能造成流行，實為必要。而要監測這些亞型重組病毒株的存在，不能只靠病毒的單一遺傳基因作為病毒亞型的判斷，而必須分析病毒的多段基因序列。

治療人類免疫不全病毒的藥物，通常可以延長病人的壽命，並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的方式，來抑制反轉錄酶的活性(nucleoside reverse transcriptase inhibitors,NRTIs)。第三類是以非擬似核苷酸衍生物的形式，來抑制反轉錄酶的活性(non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors,NNRTIs)。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，使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(Schuurman, Nijhuis et al. 1995; Eastman, Mittler et al. 1998)。它會使得患者體內的病毒沒辦法被完全地抑制，進而嚴重地影響到治療的效果與治療所需的時間(Coombs, Welles et al. 1996; O'Brien, Hartigan et al. 1996)。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。依最近歐美的研究指出，在北美及歐洲分別有百分之一至十一及百分之九至二十一的患者，是被原生抗藥性病毒株所感染(Boden, Hurley et al. 1999; Little, Daar et al. 1999; Yerly, Kaiser et al. 1999; Balotta, Berlusconi et al. 2000; Salomon, Wainberg et al. 2000; 2001)。這些被原生抗藥性病毒株所感染的病人，其接受藥物療法的成效，比被一般(無抗藥性)病毒株所感染的病人為差。例如，被原生抗藥性病毒株所感染的病人，經治療後，其體內病毒量降至 500copies/ml 以下所需的時間平均為十二週。遠較被一般病毒株感染病人的五週為長(Grant, Hecht et al. 2002)。因此，了解原生抗藥性病毒株的盛行率及其所抗藥的藥物種類，將增進治療效果並節省醫療資源。而鑑定抗藥性病毒株的方法，可分為表現型的分析及基因序列的分析(Hirsch, Brun-Vezinet et al. 2000)。表現型的分析，是經由細胞培養的方法來分離病毒，再以藥物感受性實驗(Drug susceptibility test)來決定其抗藥性。基因序列的分析，是直接分析與藥物抑制的機制相關的病毒基因上的變異。藉由分析經治療無效的病人檢體及細胞培養產生的抗藥性病毒株，在人類免疫不全病毒的 *pol* 基因上，已有許多與抗藥性相關的

基因變異陸續被得知。其中有些抗藥性是由逐漸產生的累積變異所導致，或者甚至是由單一基因變異所產生(Hanna and D'Aquila 1999; Hirsch, Brun-Vezinet et al. 2000)(<http://www.iasusa.org/>)。而這些基因變異的分析，已成為決定病毒株抗藥性的重要工具(Puchhammer-Stockl, Steininger et al. 2002)。一些研究甚至指出，抗藥性基因變異的分析，比之前所用的病人服藥史、病人體內的病毒量及 CD4 細胞數，更能有效地預測短期藥物治療的效果(Japour, Welles et al. 1995; Lorenzi, Opravil et al. 1999)。

人類免疫不全病毒的變異性，係來自基因點突變，及不同亞型病毒株之間的基因重組。雖然血清的分型方法，DNA 的異股泳動實驗(Heteroduplex mobility assay,HMA)及 PCR 結合雜交的分型方法，都屬於病毒分型方法，但是利用病毒 *env* 及 *gag/pol* 的基因序列所做的基因系統樹分析(phylogenetic analysis)仍是最常被使用的分型方法。在本計劃中，首先將調查是否有本地重複感染不同亞型病毒的狀況，或是否有由境外輸入的特殊重組病毒株，例如來自大陸的 B/C 亞型重組病毒株。這些研究成果將可幫助我們了解不同亞型病毒株在台灣的流行狀況，並可作為病毒診斷(如病毒量測定，viral load)、藥物治療(如抗藥性相關變異研究)及未來疫苗發展之參考。目前已知，在測定病毒量時，不同病毒亞型的測定效果不一(Todd, Pacht et al. 1995; Parekh, Phillips et al. 1999)。而不同亞型病毒遺傳因子的重組，將使病毒量測定更加複雜化。因此在測定病毒量之前，有必要先了解感染者所帶之病毒亞型或是特殊重組亞型。此外，在歐美，原生抗藥性人類免疫不全病毒的傳播已成為一個十分重要的問題(Hecht, Grant et al. 1998; Boden,



Hurley et al. 1999; Little, Daar et al. 1999; Yerly, Kaiser et al. 1999; Descamps, Calvez et al. 2001)。由於這些抗藥性病毒株的傳播與感染，將會影響藥物治療的效果，繼而造成醫療資源的浪費。因此，本計劃將藉由分析蛋白酶及反轉錄酶這兩個基因上與抗藥性相關的基因變異，來了解台灣地區原生抗藥性人類免疫不全病毒的盛行率。希望研究成果未來能幫助節省醫療成本，並提高個案的有效治療。至於不同亞型或重組病毒株內，與抗藥性相關的基因變異，是否將異於目前根據 B 亞型所知的基因變異，也將被列入分析範圍之內。(Doyon, Croteau et al. 1996; Cote, Brumme et al. 2001; Gatanaga, Suzuki et al. 2002)

## II. 材料與方法

### 研究對象與檢體

人類免疫不全病毒 (HIV) 的血清型陽性檢體，主要是從台北市立性病防治所及國立台灣大學附設醫院取得。血液檢體由含 EDTA 抗凝劑的無菌管收集，離心所得之病人血漿將先行分裝，並保存於-80°C 冰箱中，以為進一步分離病毒顆粒，並做萃取病毒 RNA 之用。血液檢體中所剩的血球部分，將利用 Ficoll-Hypaque gradient 的方法來分離週邊血液單核細胞 (PBMC)。一部份的週邊血液單核細胞，將被用來培養臨床病毒株，以為日後研究人類免疫不全病毒抗藥性表現型所用；另一部份的週邊血液單核細胞，將被儲存在-80°C 冰箱中，已備日後當病人血漿中沒有足夠的病毒顆粒以萃取病毒 RNA 時，可用來萃取血球細胞中病毒 DNA，以為進一步的基因序列分析所用。

符合下列任一條件的受感染者，且尚未開始服藥或檢體的採集在服藥的七天內者，其檢體將被拿來做人類免疫不全病毒原生 (primary) 抗藥性分析：

1. 血漿中可偵測到人類免疫不全病毒的 RNA、或是 p24 抗原陽性反應，且利用西方墨點法偵測 anti-HIV 抗體，其結果為陰性或是無法判定，而之後有抗體陽轉的現象者。
2. 最近西方墨點法呈陽性結果，但在過去 12 個月內，病例報告被判定

HIV-1 抗體為陰性結果者。

3. 西方墨點法呈陽性，且有最近感染 HIV 的病史或可能性，且病人 CD4 細胞數目大於  $200/\mu\text{l}$  者。

### 萃取人類免疫不全病毒 RNA

我們採用 QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) 商用試劑組，抽取檢體中的人類免疫不全病毒 RNA。首先，將收集到的血清檢體混勻後，取出  $140\mu\text{l}$  血清，再加入  $560\mu\text{l}$  AVL 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  $560\mu\text{l}$  100% 乙醇，再以震盪器充份混勻後，分次加入含矽膠膜之管柱 (QIAamp spin column) 中，以轉速 8,000 rpm 離心 1 分鐘，去除過濾液。如此反覆數次，直到所有檢體液都過濾完全。再加入  $500\mu\text{l}$  AW1 清洗緩衝液，以轉速 8,000 rpm 離心 1 分鐘。除去濾液之後，加入  $500\mu\text{l}$  AW2 清洗緩衝液，以轉速 14,000 rpm 離心 3 分鐘。去除過濾液之後，再以轉速 14,000 rpm 離心 3 分鐘，以完全去除殘留於矽膠膜管柱中的酒精。再將此矽膠膜管柱移至新的微量離心管中，最後加入  $40\mu\text{l}$  AVE 緩衝液，室溫靜置 1 分鐘，以轉速 8000 rpm 離心 1 分鐘，再收集含 RNA 之濾出液，保存於  $-20^{\circ}\text{C}$ 。

### 萃取人類 DNA

在分離出的週邊血液單核細胞 (PBMCs) 中加入 200  $\mu$ l 的紅血球溶解緩衝液(0.32M 蔗糖溶液, 10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 5 mM 氯化鎂溶液及 1% Triton X-100)。當大多數紅血球溶解後, 離心並去除上清液。再加入 200  $\mu$ l 含有 Proteinase K 的紅血球溶解緩衝液 (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM 氯化鉀溶液, 2.5 mM 氯化鎂溶液, 0.45% Nonidet P-40 及 0.45% Tween 20), 在 55°C 水浴槽中水浴一小時。之後用酚-氯仿溶液萃取出 DNA, 再用酒精沈澱, 最後溶於 100  $\mu$ l 的二次水中, 並在 260 nm 波長下測其吸光度以決定 DNA 濃度。

### 反轉錄酶反應

萃取自人類免疫不全病毒的 RNA, 須先經由反轉錄酶反應, 做成 cDNA 後, 再經由聚合酶連鎖反應 (PCR) 來放大 *env* 和 *gag-RT* 可轉錄區域。首先, 取 10  $\mu$ l 萃取自人類免疫不全病毒的 RNA, 加入 1  $\mu$ l oligo dT (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l), 在 70°C 作用 5 分鐘。再加入適當的反轉錄酶緩衝液、dNTP、及反轉錄酶, 在 40°C 作用一小時。之後, 在 70°C 作用 15 分鐘, 使反應停止後即可。所得之 cDNA 可接著做聚合酶連鎖反應, 或者保存於 -20°C。

### 聚合酶連鎖反應 (PCR) 放大

我們利用聚合酶連鎖反應 (PCR) 來放大 *gag-RT* 可轉錄區域 (coding

regions)。針對 *gag-RT* 基因，第一次 PCR 所用的引子對為 Gag1 (5' ATG CCA GAA ATA GCA GGG CCC 3' ) 和 Pol1A (5' CTA GGT ACT ATG TCT GTT AGT GCT 3' )，而第二次 PCR 所用的引子對為 Gag2 (5' AGC AGA GCC AAC AGC CCC ACC A 3' ) 和 RT1 (5' CTA AAT CCC TGG ATA AAT CTG A 3' )。在 50  $\mu$ l 的 PCR 標準反應溶液中 (10mM Tris-HCl [pH9.0]，50mM 氯化鉀溶液，1.5mM 氯化鎂溶液，0.1%(w/v) gelatin，1% Triton X-100，0.25mM dNTPs，每個 primer 10 pmol 及 1 單位的 Taq DNA 聚合酶)，約加入 1  $\mu$ l 的 cDNA。PCR 放大反應的溫度及條件為 95° C/3 分鐘，再跑 35 個循環：95° C/1 分鐘，62° C/1 分鐘，72° C/1 分鐘。接著將初次的 PCR 產物稀釋 50 倍，用 Gag2 (5' AGC AGA GCC AAC AGC CCC ACC A 3' ) 和 RT1 (5' CTA AAT CCC TGG ATA AAT CTG A 3' ) 這兩個引子來進行第二次 PCR 放大反應。溫度的設定和初次的 PCR 相同，也跑 35 個循環。最後預期的 PCR 產物大小約為 1200bp。所有的 PCR 反應產物，都將藉由電泳及 Ethidium bromide 染色確定其純度。

### 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經由電泳分離出單一產物，再經由玻璃纖維基質 (Gel-M<sup>TM</sup> Gel Extraction System, Viogene) 以去除反應鹽類及引子，進而純化之。首先，將 PCR 反應產物進行一次電

泳。之後，將基因片段所在位置之洋菜膠以刀片切下來，切下之洋菜膠裝在 1.5ml 微量離心管中，稱重，加入洋菜膠重量 1000 倍體積的 GEX 緩衝液，再將微量離心管置於 60°C 水浴 10 分鐘。待洋菜膠完全溶於 GEX 緩衝液後，再把所有液體移到玻璃纖維基質微量離心管柱 (Gel-M™ Column) 中，在室溫下靜置 5 分鐘。再以 13,000 rpm 離心 30 秒，丟棄濾出液。如此反覆數次，直到所有檢體液都過濾完全。再加入 500  $\mu$ l WF 清洗緩衝液，以轉速 13,000 rpm 離心 1 分鐘。除去濾液之後，加入 500  $\mu$ l WS 清洗緩衝液，以轉速 13,000 rpm 離心 1 分鐘。去除過濾液之後，再以轉速 13,000 rpm 離心 3 分鐘，以完全去除 WS 清洗緩衝液中的酒精成分。再將玻璃纖維基質管柱移到新的 1.5 ml 微量離心管中，在玻璃纖維基質的中央加入 30-50  $\mu$ l E 析出緩衝液，在室溫下靜置 5 分鐘，再以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，收集含有 DNA 之濾出液。取 3  $\mu$ l 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，待日後 DNA 定序所用。

## DNA 定序

PCR 純化的產物將利用 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) 來作定序。針對 *gag-RT* PCR 產物，Gag2 (5' AGC AGA GCC AAC AGC CCC ACC A 3') 和 RT1 (5' CTA AAT CCC TGG ATA AAT CTG A 3') 將被用作 *gag-RT* 區域的定序。模擬兩可的

序列可用另兩個引子 Gag3 (5' CCA GGA ATG GAT GGC CCA AAG 3' ) 和 RT2 (5' ATT GTT TAT ACT AGG TAT GGT ATA 3' ) 作定序來解決。每一個產物的核酸序列都由產物的五端及三端各定序一次，以確求基因序列的正確性。373A DNA 定序儀 (Applied Biosystems) 將被用來作核酸序列的定序，其操作方法完全依照操作手冊的敘述來作。所得到的 DNA 序列將利用 Sequencher 3.1 電腦軟體來作初步基因序列的整理。

### 資料分析

所有的核苷酸序列將利用電腦程式 PHYLIP, version 3.573 (Phylogeny Inference Package) 來作基因系統樹分析(phylogenetic analysis), 所得到的種系樹狀圖將被用來決定病毒株之亞型(Felsenstein 1985; Saitou and Nei 1987; Felsenstein 1993)。各種亞型之參考序列將自美國 Los Alamos Laboratory 的人類免疫不全病毒基因序列資料庫取得 (HIV sequence database, [http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/SUBTYPE\\_REF/align.html](http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/SUBTYPE_REF/align.html))。至於無法直接由基因系統樹分析決定病毒株之亞型者，則使用電腦程式 BLAST 2.0 program(National Center For Biotechnology Information, USA)先行篩選，看是否與之前人類免疫不全病毒基因序列資料庫 ([http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/SUBTYPE\\_REF/align.html](http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/SUBTYPE_REF/align.html))中已知的重組病毒株的序列有相關性。同時，電腦程式 Simplot 2.5 將會被用來決定是

否有不同亞型病毒基因重組的現象，並決定其基因重組的接點  
(recombination breakpoints)(Ray 1999)。



## 結果

- 一、 分析單一的聚合酶連鎖反應 (PCR) 產物即可作為人類免疫不全病毒株亞型及'流通性重組病毒株'(circulating recombinant form,CRF)的判斷。

本實驗室針對第一型人類免疫不全病毒 (HIV-1) 的 *gag-RT* 病毒基因序列，設計兩對特殊的聚合酶連鎖反應引子，經由兩次的聚合酶連鎖反應作用可複製出一段 1.2kb 長的產物 (詳見方法)。這段 1.2kb 的聚合酶連鎖反應產物包含我們所欲分析的病毒蛋白酶(protease)及部分反轉錄酶 (reverse transcriptase, RT) 基因。經由種系樹狀圖分析網路資料庫所有的病毒基因序列(<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db>)，我們發現這段產物不只可作為人類免疫不全病毒不同亞型的分析，同時也適用於分析一些特殊重組病毒株，特別是大陸地區盛行的 B/C\_07 及 B/C\_08 亞型重組病毒株 (見圖一)。因此，我們可以藉由此段基因序列做不同亞型或亞型重組病毒株的分析，而不必像以前，必須同時分析病毒基因上不同基因 (如 *gag*、*pol*、*env*、或 *vpu*) 的序列，或者以 PCR 的方法增幅全長人類免疫不全病毒基因體，以決定其重組病毒株的亞型。

- 二、 台灣地區新近感染人類免疫不全病毒的亞型分析。

這部份將首先分析不同病人的 *gag-RT* 病毒基因序列，並從中了解不同亞型及特殊重組病毒株在台灣分布情形。我們藉由計畫第一部分所設計出的聚合酶連鎖反應引子及實驗條件，來分析所收集的臨床檢體。我們一共收集有 268 個新近感染人類免疫不全病毒的病人檢體。其中 155 件來自台北市立性病防治所，收集時間為民國九十一年一月至民國九十二年八月。113 件來自臺大醫院，收集時間為民國九十一年一月至民國九十二年一月。首先，我們自病人的血漿中分離病毒顆粒，並萃取其中

的病毒核糖核酸。經由反轉錄酶作用後，再將所得的 cDNA 經由聚合酶連鎖反應複製放大出一段含 *gag-RT* 的 1.2kb 長的產物。在經過基因定序後，再將檢體利用 MEGA 電腦軟體做種系樹狀圖分析。

經由分析檢體的 *gag-RT* 病毒基因序列，我們發現台灣地區流行的人類免疫不全病毒仍以 B 亞型病毒株最為盛行，約佔台灣感染總人數的百分之八十九，較往常的百分之七十高出十九個百分比（見圖二）。而另一株人類免疫不全病毒之 E 亞型病毒株，則佔台灣感染人數的百分之九點三，較往年下降十六個百分比。其它分離之病毒株則包括三株 G 亞型、一株 C 亞型、及一株 B/C\_07 亞型重組病毒株（見表一）。研究結果顯示，第一、由於使用本實驗室的方法確可鑑定出一株 B/C\_07 亞型重組病毒株，因此可證明，我們所設計的聚合酶連鎖反應引子確可用來快速鑑定亞型重組病毒株。第二、由實驗結果可知，B 及 E 亞型病毒仍為台灣地區流行的人類免疫不全病毒株，而 B 亞型病毒株的盛行率有迅速爬升的趨勢。

### 三、 台灣地區新近感染抗藥性人類免疫不全病毒株的基因分析。

這部份則藉由分析不同病人的 *gag-RT* 病毒基因序列，並從中分析蛋白酶(protease)及反轉錄酶(reverse transcriptase, RT)這兩個基因上與抗藥性相關的基因變異，以用來了解台灣地區原生抗藥性人類免疫不全病毒的盛行率。同樣地，我們藉由計畫第一部分所設計出的聚合酶連鎖反應引子及實驗條件，來分析所收集的臨床檢體。我們一共收集有 268 個新近感染人類免疫不全病毒，且尚未服藥的病人檢體，其中 155 件來自台北市立性病防治所，113 件來自臺大醫院。我們自病人的血漿中分離病毒顆粒，並萃取其中的病毒核糖核酸。經由反轉錄酶作用後，所得的 cDNA

再經由聚合酶連鎖反應複製出一段含 *gag-RT* 的 1.2kb 長的產物。在經過基因定序後，再與 B 亞型病毒株 HxB2 做序列的比對、分析，以決定其與抗藥性相關的基因變異。

我們所分析的治療藥物包括目前最常用的三類藥物：擬似核苷酸衍生物的反轉錄酶抑制藥物(nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTIs)，非擬似核苷酸衍生物的反轉錄酶抑制藥物(non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs)，及蛋白酶抑制藥物(protease inhibitors, PI)。根據文獻記載，共有 18 個在病毒反轉錄酶基因上的首發性與續發性胺基酸變異與擬似核苷酸衍生物的反轉錄酶抑制藥物的抗藥性有關（見圖四）。根據我們的研究結果顯示，台灣地區對於這一類藥物有單一抗藥性的病毒盛行率為 2.6%。其中最常見的胺基酸變異為反轉錄酶基因上的 T215SCDN。對於非擬似核苷酸衍生物的反轉錄酶抑制藥物，根據研究指出，共有 12 個在病毒反轉錄酶基因上的胺基酸變異與其抗藥性有關（見圖五）。而我們的研究結果顯示，對這一類藥物產生單一抗藥性的病毒盛行率為 2.2%。其中最常見的胺基酸變異為反轉錄酶基因上的 K103N。最後，根據之前的研究指出，與蛋白酶抑制藥物的抗藥性有關的胺基酸變異，共有 21 個（見圖六）。在我們的檢體中，有 0.3% 的檢體對於這類藥物具有單一抗藥性。較出人意外的是，一些與蛋白酶抑制藥物的抗藥性有關的胺基酸變異在台灣檢體的出現率普遍性地較高。L10F/I/R/V、M36I、L63P、A71V/T、V77I 這些氨基酸變異在檢體出現率分別為 12%、31%、63%、11%、及 39%（見圖六）。尤其是 L63P 變異在台灣檢體出現率為 63%，甚至超過一半。由此可知，一些本土的病毒株已衍生出特殊的基因變異。這些變異與抗藥性的關聯性及後續影響，需要持續的追蹤與研究。

## 討論

在我們所收集的 268 個新近感染人類免疫不全病毒的病人檢體，其中 155 件來自台北市立性病防治所，113 件來自臺大醫院。感染者有 257 人為男性，而女性只有 11 人。整個來說，男女的性別比例為 23.4 比 1，較以往的 12 比 1 高出許多。第一個解釋為，我們所的檢體數不夠多，無法反映出實際狀況。第二個解釋為，新近受人類免疫不全病毒感染的病人以男性居多。第三個解釋為，一些新近受感染的女性未接受篩檢。其可能原因為本身不自知或排拒接受篩檢。在受到人類免疫不全病毒感染的男性中，有 92% 受到 B 亞型病毒株的感染，6.6% 受到 E 亞型病毒株的感染（見圖三）。而女性遭受 B 及 E 亞型病毒株的比率分別為 27% 及 73%。由此可知，受感染的男性絕大多數是由 B 亞型病毒株所感染，而女性則主要由 E 亞型病毒株所感染。這與之前調查，不同亞型病毒株在男女感染比例的調查結果，相去不遠。由此可知，由我們研究結果所反映出，B 亞型病毒株的盛行率高出以往十九個百分比，可能是因為我們檢體的來源大多是男性。

此外，我們在所收集的檢體中，分離到一株 B/C\_07 亞型重組病毒株。經由背景資料分析，知道這名受感染者具有本國國籍。由於近年來，兩株特殊的 B/C 亞型重組病毒株(CRF07\_BC 及 CRF08\_BC)陸續在中國大陸被分離及鑑定，並已在當地毒物注射的族群中造成大流行(Piyasirisilp, McCutchan et al. 2000; Su, Graf et al. 2000)。除了了解此名受感染者可能的感染途徑，我們應詳細調查、追蹤此一 B/C\_07 亞型重組病毒株是否已在台灣傳播。而在此計畫中，由本實驗室所發展出的方法，不只可作為人類免疫不全病毒不同亞型的分析，同時也適用於分析這些特殊重組病毒株。

根據國外的研究結果顯示，毒癮者及男同性戀族群為主要傳播抗藥性病毒株的族群(Bozzette, Berry et al. 1998)。而在台灣，雖然毒癮者在遭受人類免疫不全病毒感染者所佔比例很小，只有 1.03%。但是，經由同性戀及異性戀途徑感染到人類免疫不全病毒的，占 48.2%，是台灣受感染者主要的傳染途徑。此外，自從三合一雞尾酒療法普遍實施以來，已有許多研究學者指出，抗藥性病毒株的產生與傳播，將會是愛滋病治療的下一波挑戰。因此，在可預見的將來，原生性抗藥性病毒株在台灣盛行率可能會快速增加。根據本計劃研究結果顯示，台灣地區對於這三類藥物 NRTIs、NNRTIs、及 PI 有單一抗藥性的病毒盛行率分別為 2.6%、2.2%、及 0.3%。相較起來，台灣地區抗藥性病毒株的盛行率較日前歐美所報導的 1-11%，相對地較低。其可能原因為：第一、台灣地區抗藥性的病毒盛行率確實較低。第二、我們所收集的檢體主要為早期受感染 (early infection) 或慢性受感染 (chronic infection) 的檢體，而非急性受感染 (acute infection) 的檢體。所謂早期受感染，指的是受感染者在過去的十二個月中曾觀察到有血清陽轉 (sero-conversion) 的現象。急性受感染，指的是在受感染者身上有偵測到病毒抗原，但尚未測到病毒抗體。而慢性受感染，指的是在病人可能受感染已超過一段時間。雖然，我們所收集的病人尚未有接受治療或服藥。但是，隨著受感染時間的增加，病人體內可能存在的抗藥性病毒株，很可能

不表達或潛伏在傳染窩 (reservoir)。於是，使得我們所偵測到的抗藥性病毒株的盛行率，較預期為低。第三、本計劃所使用偵測抗藥性病毒株的方法為基因定型法 (genotyping)。一般偵測抗藥性病毒株的方法，分為基因定型法 (genotyping) 及表現型定型法 (phenotyping)。基因定型法是藉由所萃取到的病毒核糖核酸或去核糖核酸，偵測是否有與抗藥性相關的胺基酸變化。其優點為較方便且快速，且其基因定序的結果可作為設計快速診斷試劑的根據。缺點為一些胺基酸變化與抗藥性的相關性較不明顯，易高估或低估抗藥性病毒株的存在。表現型定型法則是，直接偵測病毒株本身對藥物的感受性，來決定其是否具有抗藥性。其優點為與抗藥性的相關性較強且直接。缺點為不易操作且須較多的時間。由於我們藉由比較國外的基因定序結果，來決定是否有與抗藥性相關的胺基酸變化。而國外與台灣人類免疫不全病毒株之間的一些變異可能會影響一些結果的判讀。例如，一些與蛋白酶抑制藥物的抗藥性有關的胺基酸變異在台灣檢體的出現率普遍性地較高。特別是，L10F/I/R/V、M36I、L63P、A71V/T、V77I 這些胺基酸變異在檢體出現率分別為 12%、31%、63%、11%、及 39% (見圖六)。尤其是 L63P 變異在台灣檢體出現率為 63%，甚至超過一半。由此可知，一些本土的病毒株已衍生出特殊的基因變異。這些變異與抗藥性的關聯性可能與國外的研究結果相異。因此，持續的追蹤及一些分子生物學方面的

研究，以了解這些改變的影響是必須的。

結論與建議。

- 一、 本計劃藉由分析所特殊設計的單一的聚合酶連鎖反應(PCR)產物，即可作為人類免疫不全病毒株亞型及'流通性重組病毒株'(circulating recombinant form,CRF)的判斷。此方法可快速判斷病毒株或重組病毒株的亞型。
- 二、 B 及 E 亞型病毒仍為台灣地區流行的人類免疫不全病毒株，而 B 亞型病毒株的盛行率有迅速爬升的趨勢。其結果是否是由於男女受感染比例的影響，值得有關單位持續深入的調查。
- 三、 在所收集的檢體中，我們分離到一株本土的 B/C\_07 亞型重組病毒株。我們應詳細調查、追蹤此一 B/C\_07 亞型重組病毒株是否屬個案或者此一病毒株已在台灣傳播開來。
- 四、 台灣地區對於治療愛滋病的三類藥物 NRTIs、NNRTIs、及 PI 有單一抗藥性的病毒盛行率分別為 2.6%、2.2%、及 0.3%。此外，有一位病人的病毒株同時對於 NRTIs 及 PI 這兩類藥物產生抗藥性。由此可知，

抗藥性病毒株將可能成為愛滋病治療上，一個不可忽略的問題。建議有關當局能持續追蹤調查抗藥性病毒株在台灣的盛行率，以期早期有因應之策。此外，如能在病人接受藥物治療前、或治療期間，偵測是否有抗藥性病毒株的存在，不僅可供臨床醫師選擇適當的藥物加以治療，也可避免醫療資源的浪費。

五、 除了一株抗藥性病毒株屬於E亞型外，其餘在本計劃中所偵測到的抗藥性病毒株均為B亞型。此種差異較可能是反映自這兩種亞型在台灣的分布比例，而非導致於病毒本身基因上的差異。



## 參考文獻

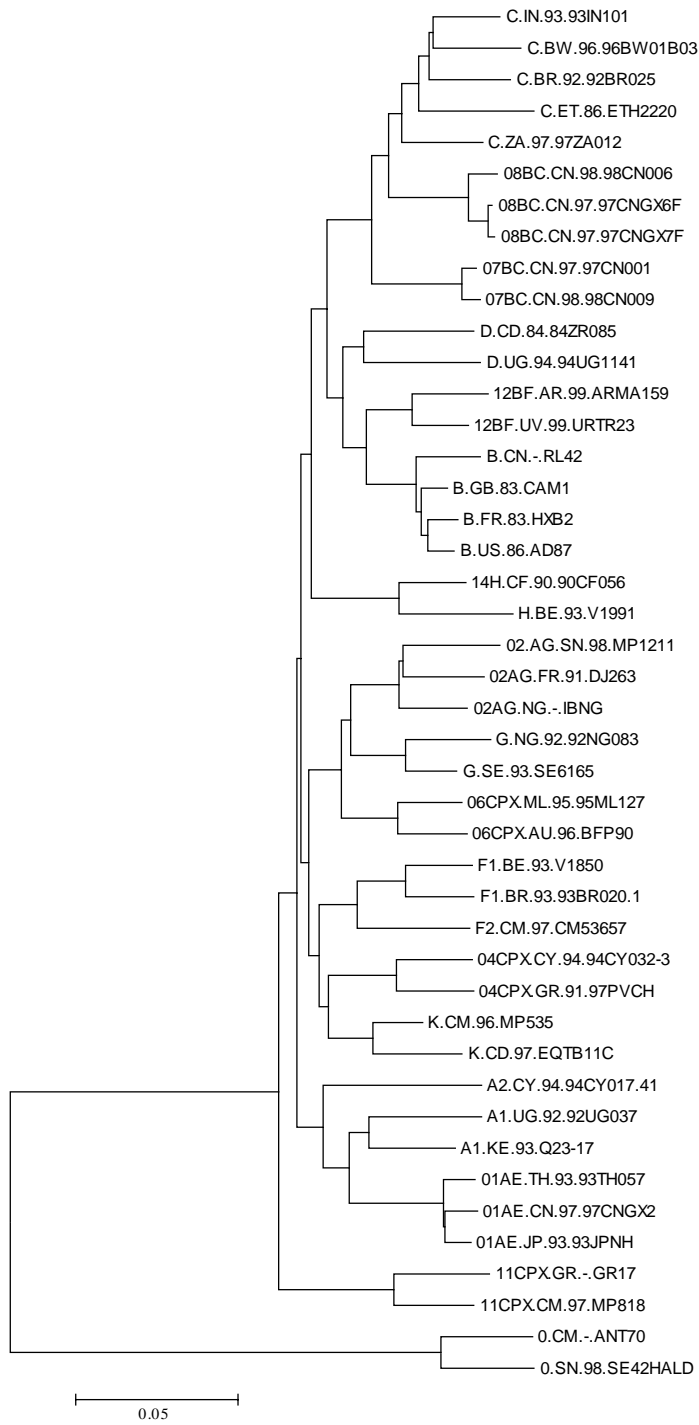
- (2001). "Analysis of prevalence of HIV-1 drug resistance in primary infections in the United Kingdom." *Bmj* **322**(7294): 1087-8.
- Balotta, C., A. Berlusconi, et al. (2000). "Prevalence of transmitted nucleoside analogue-resistant HIV-1 strains and pre-existing mutations in pol reverse transcriptase and protease region: outcome after treatment in recently infected individuals." *Antivir Ther* **5**(1): 7-14.
- Boden, D., A. Hurley, et al. (1999). "HIV-1 drug resistance in newly infected individuals." *Jama* **282**(12): 1135-41.
- Bozzette, S. A., S. H. Berry, et al. (1998). "The care of HIV-infected adults in the United States. HIV Cost and Services Utilization Study Consortium." *N Engl J Med* **339**(26): 1897-904.
- Chen, Y. M., K. L. Huang, et al. (2001). "Temporal trends and molecular epidemiology of HIV-1 infection in Taiwan from 1988 to 1998." *J Acquir Immune Defic Syndr* **26**(3): 274-82.
- Chen, Y. M., C. M. Lee, et al. (1998). "Molecular epidemiology and trends of HIV-1 subtypes in Taiwan." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **19**(4): 393-402.
- Cheng, H., J. Zhang, et al. (1994). "HIV-1 subtype E in Yunnan, China." *Lancet* **344**(8927): 953-4.
- Chuang, C. Y., P. Y. Chang, et al. (1993). "AIDS in the Republic of China, 1992." *Clin Infect Dis* **17 Suppl 2**: S337-40.
- Cohen, O. J. and A. S. Fauci (2001). *Pathogenesis and Medical Aspects of HIV Infection. Fields Virology*. D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins. **2**: 2043.
- Coombs, R. W., S. L. Welles, et al. (1996). "Association of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA level with risk of clinical progression in patients with advanced infection. AIDS Clinical Trials Group (ACTG) 116B/117 Study Team. ACTG Virology Committee Resistance and HIV-1 RNA Working Groups." *J Infect Dis* **174**(4): 704-12.
- Cote, H. C., Z. L. Brumme, et al. (2001). "Human immunodeficiency virus type 1 protease cleavage site mutations associated with protease inhibitor cross-resistance selected by indinavir, ritonavir, and/or saquinavir." *J Virol* **75**(2): 589-94.
- Descamps, D., V. Calvez, et al. (2001). "Prevalence of resistance mutations in antiretroviral-naive chronically HIV-infected patients in 1998: a French nationwide study." *Aids* **15**(14): 1777-82.
- Doyon, L., G. Croteau, et al. (1996). "Second locus involved in human immunodeficiency

- virus type 1 resistance to protease inhibitors." J Virol **70**(6): 3763-9.
- Eastman, P. S., J. Mittler, et al. (1998). "Genotypic changes in human immunodeficiency virus type 1 associated with loss of suppression of plasma viral RNA levels in subjects treated with zidovudine (ZDV) monotherapy." J Virol **72**(6): 5154-64.
- Felsenstein, J. (1985). "Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap." Evolution **39**: 783-791.
- Felsenstein, J. (1993). PHYLIP(Phylogeny Inference Package). Seattle, Department of Genetics, University of Washington.
- Freed, E. O. and M. A. Martin (2001). HIVs and Their Replication. Fields Virology. D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins. **2**: 1971.
- Gao, F., D. L. Robertson, et al. (1998). "A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1." J Virol **72**(7): 5680-98.
- Gao, F., D. L. Robertson, et al. (1996). "The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin." J Virol **70**(10): 7013-29.
- Gatanaga, H., Y. Suzuki, et al. (2002). "Amino acid substitutions in Gag protein at non-cleavage sites are indispensable for the development of a high multitude of HIV-1 resistance against protease inhibitors." J Biol Chem **277**(8): 5952-61.
- Graf, M., Y. Shao, et al. (1998). "Cloning and characterization of a virtually full-length HIV type 1 genome from a subtype B'-Thai strain representing the most prevalent B-clade isolate in China." AIDS Res Hum Retroviruses **14**(3): 285-8.
- Grant, R. M., F. M. Hecht, et al. (2002). "Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons." Jama **288**(2): 181-8.
- Hanna, G. J. and R. T. D'Aquila (1999). "Antiretroviral Drug Resistance in HIV-1." Curr Infect Dis Rep **1**(3): 289-297.
- Hecht, F. M., R. M. Grant, et al. (1998). "Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse-transcriptase and protease inhibitors." N Engl J Med **339**(5): 307-11.
- Hirsch, M. S., F. Brun-Vezinet, et al. (2000). "Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel." Jama **283**(18): 2417-26.
- Japour, A. J., S. Welles, et al. (1995). "Prevalence and clinical significance of zidovudine resistance mutations in human immunodeficiency virus isolated from patients after long-term zidovudine treatment. AIDS Clinical Trials Group 116B/117 Study Team and the Virology Committee Resistance Working Group." J Infect Dis **171**(5): 1172-9.
- Kato, K., T. Shiino, et al. (1999). "Genetic similarity of HIV type 1 subtype E in a recent outbreak among injecting drug users in northern Vietnam to strains in Guangxi

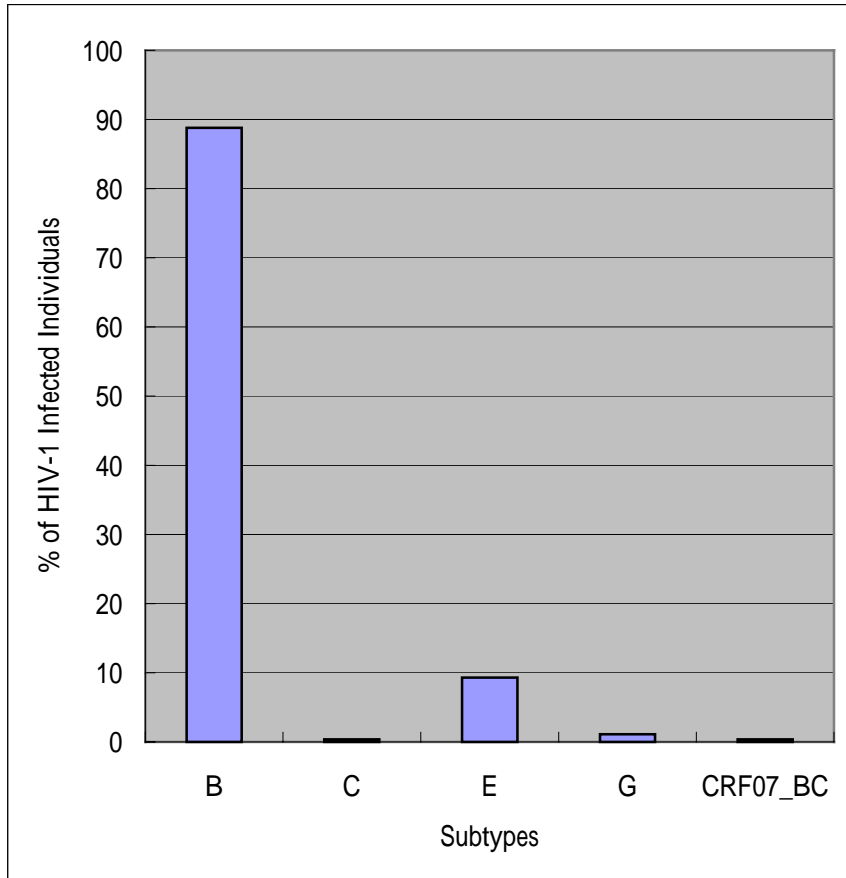
- Province of southern China." *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**(13): 1157-68.
- Lee, C. N., M. Y. Chen, et al. (1999). "Domestic transmission of HIV type 1 subtype G strains in Taiwan." *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**(12): 1137-40.
- Lee, C. N., M. Y. Chen, et al. (1998). "HIV type 1 env subtype A variants in Taiwan." *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**(9): 807-9.
- Lee, C. N., W. K. Wang, et al. (2000). "Determination of human immunodeficiency virus type 1 subtypes in Taiwan by vpu gene analysis." *J Clin Microbiol* **38**(7): 2468-74.
- Little, S. J., E. S. Daar, et al. (1999). "Reduced antiretroviral drug susceptibility among patients with primary HIV infection." *Jama* **282**(12): 1142-9.
- Lorenzi, P., M. Opravil, et al. (1999). "Impact of drug resistance mutations on virologic response to salvage therapy. Swiss HIV Cohort Study." *Aids* **13**(2): F17-21.
- Luo, C. C., C. Tian, et al. (1995). "HIV-1 subtype C in China." *Lancet* **345**(8956): 1051-2.
- Mason, C. J., S. Kitsiripornchai, et al. (1998). "Nationwide surveillance of HIV-1 prevalence and subtype in young Thai men." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **19**(2): 165-73.
- Nerurkar, V. R., H. T. Nguyen, et al. (1996). "HIV type 1 subtype E in commercial sex workers and injection drug users in southern Vietnam." *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**(9): 841-3.
- Normile, D. (2000). "Infectious diseases. China awakens to fight projected AIDS crisis." *Science* **288**(5475): 2312-3.
- O'Brien, W. A., P. M. Hartigan, et al. (1996). "Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS." *N Engl J Med* **334**(7): 426-31.
- Parekh, B., S. Phillips, et al. (1999). "Impact of HIV type 1 subtype variation on viral RNA quantitation." *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**(2): 133-42.
- Piyasirisilp, S., F. E. McCutchan, et al. (2000). "A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant." *J Virol* **74**(23): 11286-95.
- Puchhammer-Stockl, E., C. Steininger, et al. (2002). "Comparison of virtual phenotype and HIV-SEQ program (Stanford) interpretation for predicting drug resistance of HIV strains." *HIV Med* **3**(3): 200-6.
- Ray, S. C. (1999). *Simplot for Windows*. Baltimore, Johns Hopkins Medical Institutes.
- Robertson, D. L., J. P. Anderson, et al. (1999). *The Human Retroviruses and AIDS 1999 Compendium*. Los Alamos, Los Alamos National Laboratory.
- Robertson, D. L., J. P. Anderson, et al. (2000). "HIV-1 nomenclature proposal." *Science* **288**(5463): 55-6.

- Saitou, N. and M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." Mol Biol Evol **4**(4): 406-25.
- Salomon, H., M. A. Wainberg, et al. (2000). "Prevalence of HIV-1 resistant to antiretroviral drugs in 81 individuals newly infected by sexual contact or injecting drug use. Investigators of the Quebec Primary Infection Study." Aids **14**(2): F17-23.
- Schuurman, R., M. Nijhuis, et al. (1995). "Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC)." J Infect Dis **171**(6): 1411-9.
- Su, L., M. Graf, et al. (2000). "Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China." J Virol **74**(23): 11367-76.
- Todd, J., C. Pahl, et al. (1995). "Performance characteristics for the quantitation of plasma HIV-1 RNA using branched DNA signal amplification technology." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **10 Suppl 2**: S35-44.
- Wagner, R., L. Deml, et al. (1996). "A recombinant HIV-1 virus-like particle vaccine: from concepts to a field study." Antibiot Chemother **48**: 68-83.
- Weniger, B. G., Y. Takebe, et al. (1994). "The molecular epidemiology of HIV in Asia." Aids **8 Suppl 2**: S13-28.
- Xia, M., J. K. Kreiss, et al. (1994). "Risk factors for HIV infection among drug users in Yunnan province, China: association with intravenous drug use and protective effect of boiling reusable needles and syringes." Aids **8**(12): 1701-6.
- Yang, R., X. Xia, et al. (2002). "On-going generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in the Yunnan Province of China." Aids **16**(10): 1401-7.
- Yerly, S., L. Kaiser, et al. (1999). "Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants." Lancet **354**(9180): 729-33.
- Yu, X. F., J. Chen, et al. (1999). "Emerging HIV infections with distinct subtypes of HIV-1 infection among injection drug users from geographically separate locations in Guangxi Province, China." J Acquir Immune Defic Syndr **22**(2): 180-8.
- Yu, X. F., W. Liu, et al. (2001). "Rapid dissemination of a novel B/C recombinant HIV-1 among injection drug users in southern China." Aids **15**(4): 523-5.

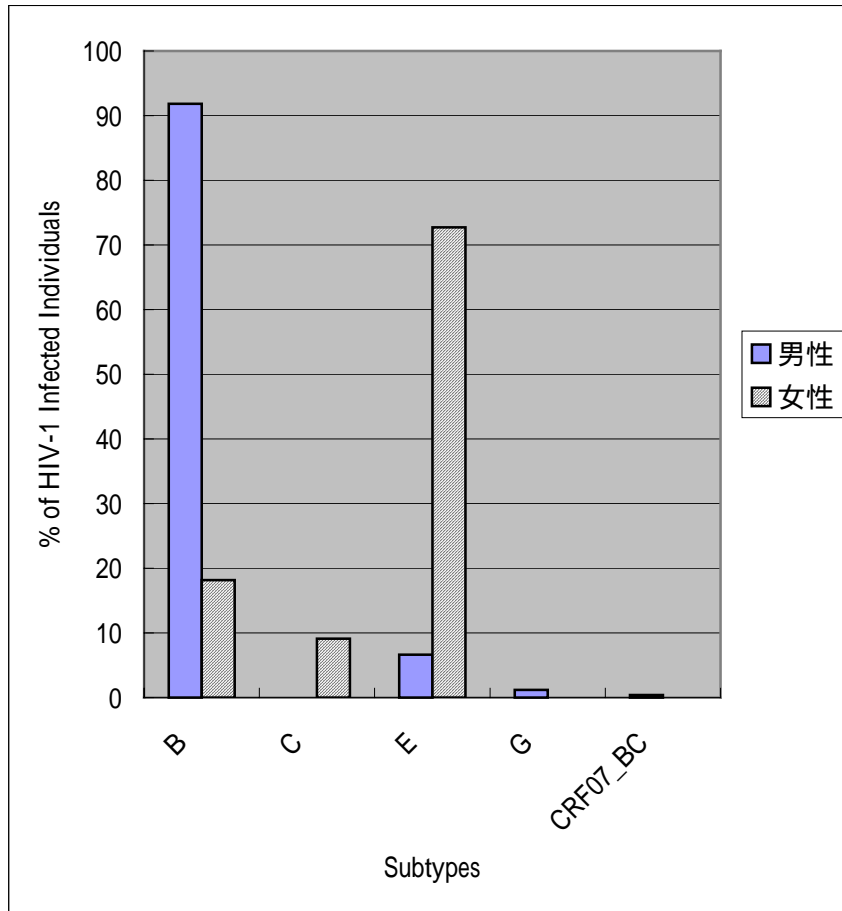
圖一、種系樹狀圖



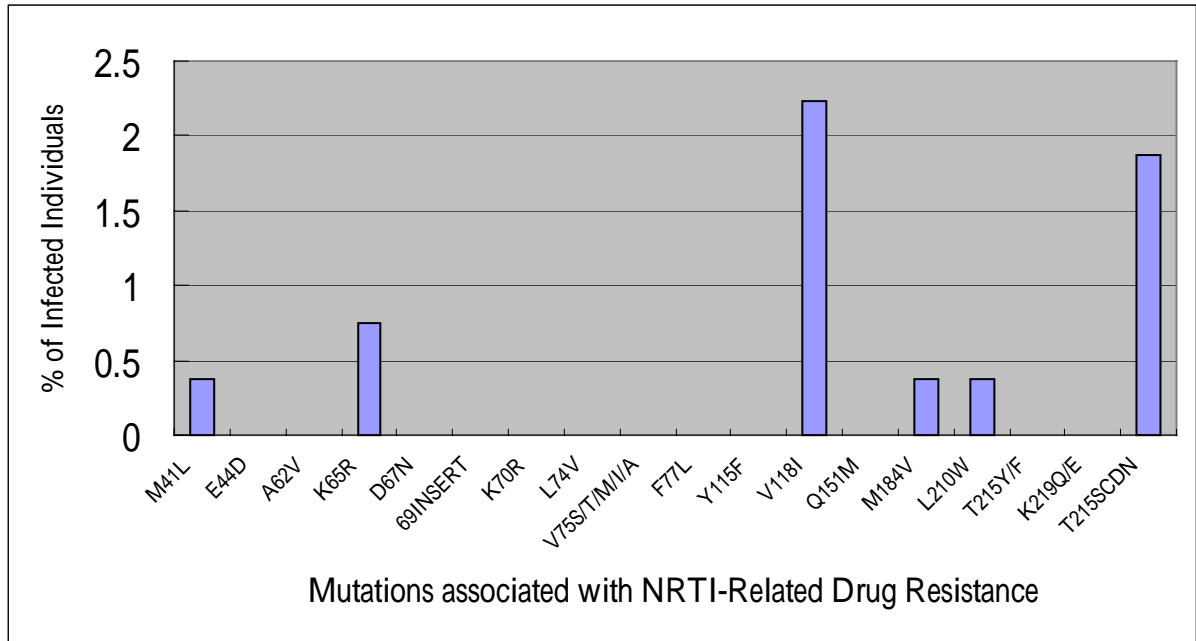
圖二、台灣地區新近受人類免疫不全病毒感染的亞型分布圖



圖三、台灣地區新近受人類免疫不全病毒感染的性別與亞型分布圖

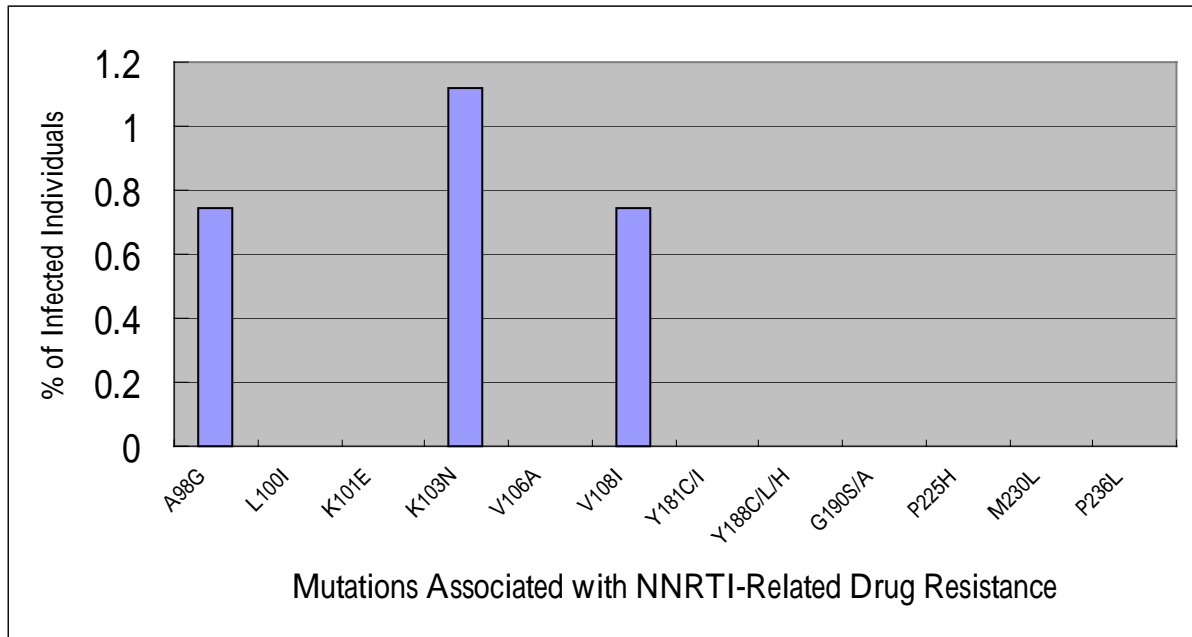


圖四、台灣地區人類免疫不全病毒株所含與 NRTIs 抗藥性相關的胺基酸變異分布圖

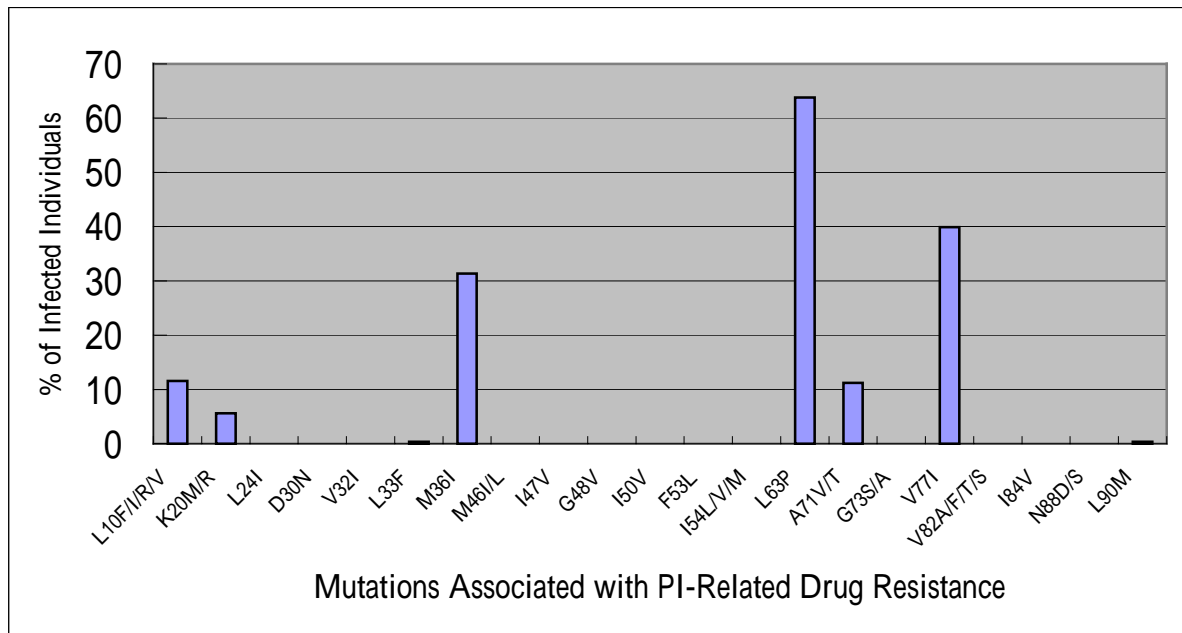




圖五、台灣地區人類免疫不全病毒株所含與 NNRTIs 抗藥性相關的胺基酸變異分布圖



圖六、台灣地區人類免疫不全病毒株所含與 PIs 抗藥性相關的胺基酸變異分布圖



表一、台灣地區新近受不同亞型人類免疫不全病毒感染的人數與性別分布

	B 亞型	C 亞型	E 亞型	G 亞型	CRF07_BC 亞型	總數
男性	236	0	17	3	1	257
女性	2	1	8	0	0	11