

計劃編號：DOH90-DC-1018

行政院衛生署九十年度科技研究計劃

在長期藥物治療下愛滋病毒  
彈回之研究

成果報告

執行機構：國立陽明大學-醫學技術暨工程學院

研究主持人：劉武哲

研究人員：劉正義、王永衛、詹宇鈞

研究助理：趙文豪

研究生：戴康育

執行期間：90年1月1日至90年12月31日

# 目 錄

(1)摘要 .....	3
(2)前言： .....	4
(3)材料與方法及進行步驟.....	6
(4)結果： .....	10
(5)結論： ... <b>錯誤! 尚未定義書籤。</b>	
(6)參考文獻 .....	17
(7)圖表 .....	20

## (1)摘要 (結論)

台北榮民總醫院在過去持續追蹤 136 位以高效抗 HIV 治療法 (HAART) 治療感染 HIV-1 的病人。有 127 人在 3-6 個月內，降到測不出病毒 RNA (undetectable)，表示其病毒載量 (viral load) 已降至  $<400$  copies/mL 的程度。而在一年期的治療過程中，有 9.44% (12/127) 的病患之 viral load 有彈回 (rebound) 的現象。此時病毒大都已產生變異：在反轉錄酶 (reverse transcriptase, RT) 區段已出現變異者有 45.5% (62/136)。基因型分析發現有下列的耐藥性基因型變異：T215Y (53.2%, 33/62) 出現頻率最高，M41L (30%, 18/62) 次之，M184V 與 L210W (14.5%, 9/62) 相同，其餘則為 D67N (9.6%, 6/62)，T69D (3.2%, 2/62)，K70R (4.8%, 3/62)，K219Q/E (12.9%, 8/62)。在蛋白酶 (protease) 區段基因型分析方面，已出現變異者有 53.6% (73/136)。目前發現的基因型變異有：L63P (89.0%, 65/73) 為最高，M36I (47.9%, 40/73) 其次，接者為 A71V/T (34.2%, 25/73)，其餘為 L10I (24.6%, 18/73)，K20M (20.5%, 15/73)，I54V/L (6.8%, 5/73)，V77I (27.4%, 20/73)，V82A (9.58%, 7/73)，I84V (1.36%, 1/73)，L90M (2.7%, 2/73)。研判可能與 AZT/ddC/d4T/3TC 合併使用 SQV/IDV 治療有關。有幾位病患顯示有 3-6 個基因變異點與服藥順從性的配合度，值得進一步做研究。

## (2)前言：

長期使用高效抗病毒治療（ HAART ）事實上引發不少問題，尤其大半的病人雖然看來病情有改善，但病毒一直不知能否消除是一個問題。有些人還因抗藥性病毒的產生，在醫療處理上產生了藥物順從（Adherence）的問題。在病毒突變性分析（Genotyping）上或許可以提供往後治療的參考。但新的病例，如果一開始就有抗藥性的變異則是本研究計劃的旨趣之一，可以提供初學治療用藥的參考。

本計畫擬就目前長期服藥且已發現 viral load 有彈回的現象做深入的探討。包括彈回的原因是否是人為的因素？例如：服藥的順從性（adherence）、病患因藥物副作用產生情況之了解；另外，也進一步做彈回 HIV-1 的耐藥性基因型分析（drug-resistance genotyping）、已變異 HIV-1 在試管內（in vitro）的反轉錄酶活性 RT-activity）分析，以及深入探討 HIV-1 複製適應性（replicative fitness）的研究。如果能檢討耐藥性 HIV-1 所產生的公共衛生問題則更好。在早期藥物治療 HIV-1 感染時，除了對病毒載量（Viral load）或病毒量的測定外，就是病毒基因型分析。這個分析也可能提供相互耐藥性（cross-resistance）的變異，及其與免疫相容抗原 HLA Class I 的細胞反應的關係等。

我們擬在研究中設計服從服藥的問卷 (questionnaire)，由社工及護理人員協助進行病患之輔導，並在問卷中加入可能影響病毒傳播的因素，包括：母子間垂直感染、性行為、藥癮傳染、輸血傳染等等...。我們要檢討過去二、三年來經藥物治療，最後還是死亡或發現預後不良的病例，逐一檢討其耐藥性病毒基因的分析，變異型病毒的複製能力以及 CD4 細胞計數的情況等。在實驗室方面擬建立耐藥性基因型分析的品質管制。在計畫進行期間，每月參與研究人員包括護理及社工人員做病例檢討及舉辦不定期病友會或團體治療的可行性，以提高治療的效果。

### **(3)材料與方法及進行步驟**

#### **一、 臨床檢體之準備(clinical samples and preparation):**

Whole blood was collected with EDTA anticoagulant tubes obtained from 136 HIV-1 infected patients (134 patients had received more than 3 months of antiretroviral therapy regimens, and 2 patients have received no antiretroviral drug treatments as a negative control set.) at the Section of Infectious Diseases-Department of Medicine, Veterans General Hospital, Taipei. All patients were tested positive twice for HIV-1 antibody by enzyme immunoassay (Wellcozyme HIV-1+2; Murex Corporation, Dartford, England) and confirmed by Western blot assay (New Lav-Blot II) for the detection of antibody to HIV-1 and/or HIV-2 (Sanofi-Diagnostics Pasteur S.A.). Absolute CD4<sup>+</sup> cell count determination were performed by flow cytometry (Becton-Dickinson, FACScan) using 100  $\mu$  L of blood from HIV-1 seropositive patients within 24 hours of blood collection. The plasma was usually separated by centrifugation at 1,000 x *g* for 10 minutes within 4 hr of collection. 500  $\mu$  L of fresh plasma was dispensed into the 1.5mL tube which was then capped with a high-speed centrifugation screw cap tube (AxyGen, Inc) and frozen at -70°C immediately for further RNA extraction.

#### **二、 細胞珠之培養(Culture of mammalian cell lines) :**

(Lambotte., et al.2000; 23:114-9)

- 1>. Mammalian cell lines were cultured in flask at 37°C in RPMI 1640 medium with 10% fetal calf serum (or DMEM).
- 2>. Retrovirus were inoculated onto cell lines, incubate 37°C, 90 min and fed with RPMI 1640, maintained 2-5 passages and supernatants harvested 2-5 days post culture.
- 3>. Filtered through 0.45  $\mu$ M filter, numbers of retrovirus were quantified by measuring the copies of virus RNA (by RT-PCR).
- 4>. Appropriated volumes and dilutions of virus stocks and cell lines supernatants was usually clarified by centrifugation 11,000xg, 10 min.
- 5>. This sample was then passed through a 0.45 $\mu$ M sterile filter, centrifugation

1000,000xg, 60 min.

- 6>. Retrovirus was usually concentrated from supernatants, each pellet was resuspended in disruption buffer (40 mM Tris-HCl pH 8.1; 50mM KCl; 20mM dithiothreitol; 0.2% NP-40.(Sigma))

### 三、 螢光式反轉錄酶產物增量分析法(**fluorescent**

**product-enhanced reverse transcriptase [PERT] assay):** (Lovatt et al, 1999)

- 1>. Cell lysate was washed in 200  $\mu$ L disruption buffer containing a complete EDTA-free protease inhibitor cocktail.( Boehringer Mannheim)
- 2>. Annealed primer/template was prepared for each test or control sample by mixing 0.3 $\mu$ g of MS2 RNA (Boehringer Mannheim) with 10 pmol antisense-primer A10 (5'-CACAGGTCAAACCGCC TAGGAATG-3') in 5  $\mu$ L final volume water, heating 95  $^{\circ}$ C for 5 min, annealing at 37  $^{\circ}$ C, 30 min and incubating on ice for 5 min.
- 3>. The primer/template was added to 40 $\mu$ L of master mixture in a 0.2 ml MicroAmp<sup>TM</sup> optical tube(PE). [ Taqman buffer A, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 300  $\mu$ M of dATP, dCTP, dGTP; 600  $\mu$ M dUTP; 50 nM sense primer all (5'-TCCTGCTCAACT TCCTGTGAG-3'); 50 nM antisense-primer A10, 200 nM fluorescent PERT probe (5'(FAM)-TCTTTAGCGAGACGCTACCATG GCTA-(TRMRA)p3'), 20 U RNase inhibitor and 1.25 U AmpliTaq Gold.
- 4>. 5  $\mu$ L of diluted sample or control was added to each tube.
- 5>. Analysis RT-PCR amplification by ABI-7700 Sequence Detection System. (Parameter: 42  $^{\circ}$ C, 30 min for RT; 95  $^{\circ}$ C, 10 min to activate the Taq DNA polymerase; 30 s  $\rightarrow$  64  $^{\circ}$ C, 1 min for 35 to 40 cycles, and then 25  $^{\circ}$ C, 2 min.).

### 四、 病毒載量測定(**Viral load assay**):

HIV-1 particles were concentrated from 500  $\mu$ L of plasma for determination of RNA levels with the AMPLICOR HIV-1 MONITOR<sup>TM</sup> 1.5 assay (Amplicor-1.5, Roche Corp.,) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 500  $\mu$ L of plasma was first centrifuged at 23,600 x g for 2 hr at 4 $^{\circ}$ C. After discarding the supernatant,

the pellet was removed, then the HIV-1 RNA was extracted with a working lysis buffer containing a known number of Quantitation Standard (QS) RNA molecules. Under the RT-PCR-based assay, a single enzyme *rTth* DNA polymerase is promoting both reverse transcription and PCR amplification in the same reaction mixture. The primers, SK145 and SKCC1B were generally used for target selection to define a sequence of 155 nucleotides within the highly conserved region of the HIV-1 *gag* gene. In addition, AmpErase<sup>TM</sup> was used in the reaction mixtures to ensure that any carryover of DNA from previous amplifications does not compromise the quantification, this also enhance the specificity and reliability of the test results. Detection of PCR amplification products was then carried out on microtiter plates with an enzyme-linked immunosorbent assay format. For both the target and the QS, the dilution that yielded a signal within the linear range of the spectrophotometer was identified. The optical density (OD) for this dilution was corrected by subtracting the background OD ( $A_{450}$ , 0.07), and the corrected OD is multiplied by the dilution factor to determine the total signal generated. The input HIV-1RNA concentration was calculated by comparing the total OD for HIV-1 in the sample to the total OD for the QS in the sample as follows: number of RNA copies per milliliter of plasma = (total target OD/total QS OD) × QS copies per reaction × a factor to convert copies per PCR to copies per mL of plasma, where the factor is 40 for the standard test and 4 for the ultrasensitive test.

## 五、 基因型分析(genotyping of drug-resistance mutant):

### (A)、反轉錄-聚合酶鏈反應(first round of RT-PCR):

The directly extracted viral RNA from HIV-1 infected patients was used in the RT genotyping assay. The first round of single-tube RT-PCR was performed as follows. Briefly, 18  $\mu$ L of RNA was add to a total volume of 50  $\mu$ L of a reaction mixture containing 1 X reaction buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.75 mM MnSO<sub>4</sub>, 200  $\mu$ M of each dNTP (Promega), 2 X Enhancer buffer (Epicentre Technologies), 20 units of Rnasin (Promega), 5 units of *Tth* thermostable DNA polymerase (Epicentre Technologies), and 20 pmole of the primer pairs (RT1: 5'-GTTGACTCAGATTGGTTGCAC-3' and RT2:5'-GTATGTCATTGACAGTCCAGC-3'). The RT-PCR was performed in a single- tube. The profile was performed as follows: 1 cycle of 55°C for 5 min, 60°C for 25 min, 94°C for 2 min; then 30 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1.5 min; and then 72°C for 10 min. The 10 X diluted first round RT-PCR amplicon ( 5  $\mu$ L) was then used to process the second round of specific nested-PCR.

### (B)、特異性套式-PCR(Specific differential nested-PCR):



**(i). Reverse transcriptase (RT) region:**

For RT region, the specific differential nested-PCR reaction mixtures were set in a total volume of 50  $\mu$ L contained 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.9), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M of each dNTP (Promega), 2.5 U of *Taq* polymerase (Promega), and 20 pmole

of FPB primer (5'-GGATGGAAAGGATCACCC-3') with the 215W primer. (5'-ATGT TTTTGTCTGGTGTGGT-3'). Next, 5  $\mu$ L of the 10 X diluted first round RT-PCR products was added to the reaction mixtures. The cycling profile for reactions was as follows: 94°C for 3 min; 25 cycles of 94°C for 1 min, 48°C for 30 s, and 72°C for 30 s, and then 72°C for 10 min.

**(ii). Protease (PR) region:**

For PR region, the PCR reaction mixtures in a total volume of 50  $\mu$ L contained 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.9), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M of each dNTP (Promega), 2.5 U of *Taq* polymerase (Promega), and 20 pmole of Nest-F:(5'-CAACTCCCCCTC AGAAGCAGGAGCCGATAGACAA-3') and Nest-R:(5'-CATCCATTCCTGGCTT TAATTTTACTGGTACAGT-3'). The cycling profile for reactions was as follows: 94 °C for 3 min; 35 cycles of 94°C for 1 min, 55°C for 1 min, and 72°C for 1 min, and then 72°C for 10 min. The PCR product was analyzed on a 2% ethidium- bromide containing agarose gel under UV light of a scanning densitometer to determine the presence or absence of the specific product. Results were scored as wild type, mutant or mixture of both, depending on the presence of PCR product in the wild type or mutant reactions.

## **六、 自動化測序分析(autosequence analysis):**

For autosequence analysis, Five microliters of the PCR product for each sample was first checked in a 2% agarose gel. Then, the PCR product fragments were purified through a QIAquick silica gel membrane (QIAGEN.). Then, the nucleotide sequence of the PCR amplicon was determined by a direct automated ABI 377 DNA sequenator (version 3.2) and the Taq Dye Primer Cycle Sequencing Kit (ABI). Sequences were analyzed using Sequencher (Gene Codes Corp.) and Microgene (Beckman) software packages, and base-pair mixtures were quantified by measuring relative peak-on-peak heights.

#### (4)結果與討論

在本年度計劃中，我們分析了 136 位病人，包括完成 124 人的藥物順從問卷，也做了他們 136 人的病毒亞型分析與長期追蹤基因型的變化，結果報告如下：

##### (一)、病人愛滋病毒的亞型分析結果：

分析台北榮總 136 位愛滋病患當中，其中有 101 位為 B 亞型 (74.26%)，31 位為 E 亞型 (22.79%)，其餘 4 位則為 C 亞型 (2.94%)。而在男性族群當中，B 亞型佔了 98 位 (81.66%)，E 亞型為 19 位 (15.83%)，C 亞型則有 3 位 (2.50%)。女性族群方面，則有 3 位 (18.75%) B 亞型，12 位 (75.00%) E 亞型以及 1 位 (6.25%) 的 C 亞型 (表 1)。根據相關研究報告，B 亞型易在同性戀者與靜脈注射毒癮者間傳播，而 E 亞型多為異性戀者 (Dillner *et al*, 1996)。所以男同性戀者佔了整體族群較大的比例，但 E 型則為異性戀者。愛滋病毒基因的亞型鑑定非常重要，因為可以知道該病毒全球性的演化複雜度以及傳播區域的路徑 (Sonnerborg *et al*, 1997)，並且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，因此有可能同一種處方

的藥物治療下，不同亞型所傾向的突變點會有不同(Ernest et al, 1993)。

## (二)、愛滋病毒反轉錄酶的基因型分析：

我們分析 136 位台北榮總的愛滋病患，其中有 2 人未服用藥物，其餘皆接受 highly active antiretroviral therapy (HAART) 的治療，進而分析其耐藥性病毒基因分析。在反轉錄酶基因方面，有 74 位(54.41%)沒有耐藥性突變點的產生，該族群最近一次平均 viral load 為 958 copies/ml，平均服藥期間為 3.8 個月。帶有一個突變點的有 39 位(28.67%)，平均服藥期間為 7.6 個月。形成兩個耐藥性突變點的則有 14 位(10.29%)，有三個耐藥性突變點有 5 位(3.67%)，而大於三個耐藥性突變點則有 4 位(2.94%)。在出現突變點的族群中 (n=62)，T215Y(53.2%，33/62)出現頻率最高(Fig-1)，M41L(30%，18/62)次之，M184V 與 L210W (14.5%，9/62)相同，其餘則為 D67N(9.6%，6/62)，T69D(3.2%，2/62)，K70R(4.8%，3/62)，K219Q/E(12.9%，8/62)(表二)。由於此族群有高頻率 T215Y 與 M41L 的產生，其同樣對 Abacavir (ABC)、Stavudine (D4T)、Zidovudine (AZT)這 3 種藥物有數倍的抗藥性(Christos J et al, 2000)以及 M184V 也對於 Lamivudine(3TC)有大於 150 倍的抗藥性，因此可能會有病毒反彈機

率提昇的情況發生，故便將產生耐藥性突變點較多的病患作時間點與病毒量關係圖，並配合該病患服藥順從性，進而研究病毒彈回的情形。

### (三)、愛滋病毒蛋白質酶的基因型分析：

同樣台北榮總 136 愛滋病患中，2 位未接受 HAART 治療以外，其餘皆有藥物治療的紀錄。利用 RT-PCR 的方式，由病人血漿的病毒 RNA 增幅出蛋白質酶的基因片段，在經由定序分析，其中有 63 位 (46.32%) 在此基因片段沒有耐藥性突變點的產生，此族群最近一次的平均 viral load 為 537 copies/ml，平均服藥期間為 4.8 個月。帶有一個突變點的人數為 48 人 (35.29%)，平均服藥期間為 6.2 個月，而兩個突變點有 15 人 (11.02%)，三個突變點有 3 人 (2.20%)，而大於 3 個突變點則有 7 個人 (5.14%)。此族群耐藥性突變點基因型出現機率以 L63P (89.0%，65/73) 為最高 (Fig2)，M36I (47.9%，40/73) 其次，接者為 A71V/T (34.2%，25/73)，其餘為 L10I (24.6%，18/73)，K20M (20.5%，15/73)，I54V/L (6.8%，5/73)，V77I (27.4%，20/73)，V82A (9.58%，7/73)，I84V (1.36%，1/73)，L90M (2.7%，2/73) (表三)。在其中同時帶有蛋白質酶與反轉錄酶突變點且大於 3 點以上的共 3 位 (2.20%，3/136)，因此耐藥性突變點的產生與病毒彈回關係在下列以個案研究討論之。

#### (四)、愛滋病毒彈回因素分析：

在 136 位愛滋病患當中，曾接受過 HAART 藥物治療有 134 位。此群體中曾因藥物而使病毒量降至  $>400$  copies/ml 的有 127 位 (94.77%, 127/134)，而其中有 12 位 (11.16%, 12/134) 出現明顯病毒彈回的現象 (Fig3-Fig14)。進一步分析，12 位當中使用 HAART 治療大於兩年的有 11 位，另一位也有一年多。在反轉錄酶區域出現耐藥性突變點大於等於 3 點的有 7 位 (58.33%, 7/12)，有 2 點的有 2 位 (16.6%, 2/12)，只有一點的有 1 位 (8.33%, 1/12)，無突變點的有 2 位 (16.6%, 2/12)。而蛋白質酶方面，出現耐藥性突變點大於等於 3 點同樣的有 7 位 (58.33%, 7/12)，有 2 點的有 2 位 (16.6%, 2/12)，有一點的有 2 位 (16.6%, 2/12)，無突變點的有 1 位 (8.33%, 1/12)。同時在反轉錄酶與蛋白質酶區域出現 3 點或 3 點以上的有 6 位 (50%, 6/12)。配合問卷調查，此 12 人當中服藥順從性良好的有 3 位 (25%, 3/12)，且此 3 位的 CD4 計數也仍在上升當中。另外二位無接受 HAART 治療的病患 (Fig16-Fig17)，我們發現到病人的病毒量也有來回震盪的趨勢，但其 CD4 計數仍可保持 400 c u m m 左右。而進一步調查該二人 CD8 指數，發現兩人的指數有在上升趨勢，約維持在 1000 左右。

在長期藥物下愛滋病毒彈回機率的發生，與病毒出現耐藥性突變

點的多寡，有密切關係。在 3 位反轉錄酶與蛋白質酶區域出現 3 點以上的病患，皆有病毒反彈的情況。且發生反彈現象的 12 位病患當中，兩段區域突變點總和大於 3 點的佔了 11 位 (91.6%)，加上服藥順從性調查，此反彈現象的群體只有四分之一的良好配合度。而此群體出現突變點機率分別為 P I : L 1 0 I (33%，4/12)，K 2 0 R (41.6%，5/12)，M36I(58.3%，7/12)，I54V(16.6%，2/12)，L63P(83.3%，10/12)，A71V((58.3%，7/12)，V82A(16.6%，2/12)，I84V 與 L 9 0 M (8.3%，1/12)。RTI : M41L (41.6%，5/12)，D67N(16.6%，2/12)，A62V 與 V 7 5 M (8.3%，1/12)，M 1 8 4 V (41.6%，5/12)，L 2 1 0 W(58.3%，7/12)，T 2 1 5 Y(58.3%，7/12)，K 2 1 9 Q (33%，4/12)。

我們繼而追蹤分析此個案一~三等的 3 位病患 CD4 數量與病毒量的變化，首先我們先觀察其病毒量的變化，發現這 3 位病患都有病毒反彈(viral rebound)的現象，而且在病毒反彈後突變點都有增加的趨勢，可能是在病人換藥後使病毒量下降但是經過 1~3 個月後，病人體內經藥物選擇壓力產生新的類種進而又有抗藥性突變株出現，許多病毒反彈的現象是由於病人不順從服藥所產生。至於反彈的病毒是從哪裡來，在過去都是認為從淺伏在 CD4 淋巴球中的病毒，目前也有不同的說法出現因此我們也分析了 12 位有反彈現象的愛滋病患其血漿

中的病毒與潛伏在 CD4 淋巴球中的病毒蛋白酶基因型是否一樣，結果發現只有 3/12 的病患是一樣的，9 /12 的病患是不一樣的。根據文獻我們知道 Chun 等人分析 6 位愛滋病患發現 2/6 反彈病毒與潛伏在 CD4 淋巴球中的病毒基因型一樣，4/6 則不同；Ho 跟 Zhang 等人分析 8 位愛滋病患發現 5/8 反彈病毒與潛伏在 CD4 淋巴球中的病毒基因型一樣，3/8 則不同。所以我們可以推測潛伏在 CD4 淋巴球中的病毒是造成病毒反彈的重要來源，但不是唯一，在人體可能有其它病毒的保留宿主( viral reservoirs)包括：大腦細胞、內臟相關的淋巴結組織、生殖道細胞等。

另外，本研究問卷調查個案總數共 124 人，男性共 115 人(92.74%)，女性共 9 人(7.25%)。其中 11-20 歲者有 3 人(2.41%)，21-30 歲者有 35 人(28.22%)，31-40 歲者有 61 人(49.19%)，41-50 歲者有 19 人(15.32%)，51-60 歲者有 3 人(2.41%)，61-70 歲者 2 人(1.61%)，71-80 歲者 0 人(0%)，81-90 歲者 1 人(0.80%)。之中服藥有引起副作用的人有這 38 人(30.64%)，有使用另類療法的人有 22 人(17.74%)。對於病人對自己目前的健康狀況而言，非常好的有 22 人(17.74%)，普通的有 98 人(79.03%)，不良的有 4 人(3.22%)。對於愛滋病毒的了解程度，非常清楚的有 15 人(12.09%)，大致上了解的有 83 人(66.93%)，只有一點了解的有 4 人(3.22%)，完全不清楚的有 6 人

(4.83%)。在對藥物抗藥性及其重要性方面，非常了解的有 20 人 (16.12%)，大致上了解的有 89 人(71.77%)，只有一點了解的有 10 人 (8.06%)，完全不清楚的有 5 人(4.03%)。而在服藥順從性方面，遵照指示吞下所有的藥丸的有 80 人(64.51%)，有時會忘了服藥的有 33 人 (26.61%)，按時吃但自行減少藥量的有 2 人(1.61%)，不關心吃藥問題的有 2 人(1.61%)，不確定的有 4 人(3.22%)。在是否依照指示飯後服藥或空腹服藥方面，遵照指示服用的有 81 人(65.32%)，大部分時間遵守的有 30 人(24.19%)，偶爾的有 4 人(3.22%)，沒關係的有 4 人 (3.22%)人。而在是否計劃懷孕方面，是的有 5 人(4.03%)人，否的有 119 人。同時感染 B 型肝炎有 3 人，C 型肝炎 1 人，病毒量皆在>400 copies/ml 下。

臨床上有些病人以雞尾酒療法治療，其病毒反彈時 CD4 淋巴球並沒有下降，稱為不協調反應者(discordant responder)，如個案一在第二次病毒反彈時，其 CD4 淋巴球並未減少。根據文獻推測可知蛋白質酶抑制劑抗藥性病毒(PI-resistance)在胸腺細胞中複製能力較差，而在 PBMC 中複製能力與野生型相同。可能是因為周邊血液中的 CD4 淋巴球其細胞表面的 T 細胞接受器容易與 anti-CD3 抗體結合，刺激細胞激素的產生(如:IL-2)進而刺激 T 淋巴球的分裂，故使抗藥性病毒能在 CD4 淋巴球中複製的很好；但是在胸腺中的 CD4 胸腺



細胞的 TCR 與 anti-CD3 抗體結合反而會負調控 IL-2 細胞激素的產生，可大大減少抗藥性病毒複製能力，由此可知胸腺或許能對 HIV 複製產生負調節作用。

## (5) 參考文獻

1. Back NK, *et al.* Reduced replication of 3TC-resistant HIV-1 variants in primary cells due to a processivity defect of the reverse transcriptase enzyme. *EMBO J* 1996; 15:4040-49.
2. Benjamin Young, *et al.* Resistance mutations in protease and reverse transcriptase genes of human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients with combination antiretroviral therapy failure. *J Infect Dis.* 1998; 178:1497-1501.
3. Brun-Vezinet F., *et al.* HIV-1 viral load, phenotype, and resistance in a subset of drug-naïve participants from the delta trial. *Lancet.* 1997; 350:983-9.
4. Cabana M, *et al.* Emergence and genetic evolution of HIV-1 variants with mutations conferring resistance to multiple reverse transcriptase and protease inhibitors. *J Med Virol* 1999; 59:480-90.
5. Carlo F. Perno, *et al.* Secondary mutations in the protease region of Human Immunodeficiency Virus and virologic failure in drug-naïve patients treated with protease inhibitor-based therapy. *J Infect Dis.* 2001; 184:983-91.
6. Carpenter CCJ., *et al.* Antiretroviral therapy in adults. *JAMA.* 2000; 283:381-91.
7. Christos J. *et al.* A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrobial Agent Chemotherapy.* 2000; 44: 920-928.
8. Deeks SG, *et al.* Novel four-drug salvage treatment regimens after failure of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor containing regimen: antiviral activity and correlation of baseline phenotypic drug susceptibility with virologic outcome. *J Infect Dis.* 1999; 179:1375-81.
9. Dillner, L. *et al.* 1996. HIV subtype may explain sexual transmission. *Bmj.* 312: 530-1.
10. Dornadula G, *et al.* Residual HIV-1 RNA in blood plasma of patients taking suppressive highly active antiretroviral therapy. *JAMA.* 1999; 282:1627-32.
11. Ernest, I., I. Alexandre, N. Zammateo, M. Herman, A. Houbion, F. De Leener, K. Franssen, G. van der Groen, and J. Remacle 2001. Quantitative assay for group M (subtype A-H) and group O HIV-1 RNA detection in plasma. *J Virol Methods.* 93:1-14

12. Furtado MR., *et al.* Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N Engl J Med.* 1999; 340:1614-22.
13. Gilbert Croteau *et al.* Impaired fitness of human immunodeficiency virus type 1 variants with high-level resistance to protease inhibitors. *J Virol.* 1997; 1089-1096.
14. Gong YF., *et al.* Susceptibilities of zidovudine-resistant variants of human immunodeficiency virus type 1 to inhibition by acyclic nucleoside phosphonates. *Antimicrobial Agent Chemotherapy.* 1994; 38:1683-87.
15. Harrer E., *et al.* Recognition of the highly conserved YMDD region in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocytes from an asymptomatic long-term nonprogressor. *JID.* 1996; 173:476-9.
16. Hecht FM., *et al.* Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse transcriptase and protease inhibitors. *N Engl J Med.* 1998; 339:307-11.
17. Hertogs K., *et al.* A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* 1998; 42:269-76.
18. Holodniy M., *et al.* Measurement of HIV virus load and genotypic resistance by gene amplification in asymptomatic subject treated with combination therapy. *J AIDS.* 1993; 6:366-9.
19. Keulen W., *et al.* Increased polymerase fidelity of lamivudine-resistant HIV-1 variants does not limit their evolutionary potential. *AIDS.* 1999; 13:1343-49.
20. Kozal MJ, *et al.* Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Med* 1996; 2:753-9.
21. Kully C., *et al.* Codon 215 mutations in human immunodeficiency virus-infected pregnant women. *J Infect Dis.* 1999; 179:705-8.
22. Lambotte O., *et al.* Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy. *J AIDS.* 2000; 23:114-9.
23. Laura Monno, *et al.* Highly active antiretroviral therapy failure and protease and reverse transcriptase human immunodeficiency virus type 1 gene mutations. *J Infect Dis.* 1999; 180:568-71.
24. Lawrence J., *et al.* Clinical resistance patterns and responses to two sequential protease inhibitor regimens in zidovudine and reverse transcriptase inhibitor-experienced persons. *J Infect Dis.* 1999; 179:1356-64.
25. Lee CN, *et al.* Determination of human immunodeficiency virus type 1 subtype in

- Taiwan by *vpu* gene analysis. *J Clin Microbio*. 2000; 38:2468-74.
26. Leigh Brown AJ., *et al*. Sequence clusters in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase are associated with subsequent virological response to antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 1999;180:1043-9.
  27. Lin JH, Siwak EB, Lauder IJ. Single-strand conformation polymorphism study of human immunodeficiency virus type 1 RNA and DNA in plasma, peripheral blood mononuclear cells, and their virologic culture. *J infect Dis* 1995; 171:1619-22.
  28. Martinez-Picado J., *et al*. Replication fitness of protease inhibitor-resistant mutants of resistant human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 1999; 73:3744-52.
  29. Monno L, *et al*. Highly active antiretroviral therapy failure and protease and reverse transcriptase human immunodeficiency virus type 1 gene mutations. *J Infect Dis*. 1999; 180:568-71.
  30. Moyle GJ. Resistance to antiretroviral compounds: implications for the clinical management of HIV infection. *Immuno & Infect Dis* 1995; 5:170-82.
  31. Moyle GJ. Viral resistance patterns selected by antiretroviral drugs and their potential to guide treatment choice. *Exp Opin Invest Drugs*. 1997; 6:943-64.
  32. Ramratnam B., *et al*. The decay of the latent reservoir of replication competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nature Medicine*. 2000; 6:82-5.
  33. Shulman NS., *et al*. Efavirenz- and adefovir dipivoxil-based salvage therapy in highly treatment-experienced patients: clinical and genotypic predictors of virologic response. *J AIDS*. 2000; 23:221-6.
  34. Smaglik P. Reservoirs dog AIDS therapy. *Nature* 2000; 405:270-2.
  35. Sonnerborg, A., S. Durdevic, J. Giesecke, and M. Sallberg 1997. Dynamics of the HIV-1 subtype distribution in the Swedish HIV-1 epidemic during the period 1980 to 1993. *AIDS Res Hum Retroviruses*.13:343-5.
  36. Tamalet C, *et al*. Stable rearrangements of the  $\beta$  3-  $\beta$  4 hairpin loop of the HIV-1 reverse transcriptase in plasma viruses from patients receiving combination therapy. *AIDS* 1998; 12:F161-6.
  37. Wainbeg MA., *et al*. Public health implications of antiretroviral therapy and HIV drug resistance. *JAMA*. 1998; 279:1977-83.
  38. Winters MA, *et al*. A 6-basepair insert in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1 confers resistance to multiple nucleoside inhibitors. *J Clin Invest* 1998; 102:1769-75.
  39. Wu H., *et al*. Characterization of viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1-infected patients treated with combination antiretroviral therapy: relationships to host factors, cellular restoration, and virologic end points. *J Infect Dis*. 1999;179:799-807.

40. Yahi N., *et al.* Mutation patterns of the reverse transcriptase and protease gene in human immunodeficiency virus type 1-infected patients undergoing combination therapy: survey of 787 sequences. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:4099-4106.

## (6)圖表

表一、亞型分析結果

	Male	Female	Total
B	98	3	101
E	19	12	31
C	3	1	4
Total	120	16	136

◎B subtype 佔 74.26% , E subtype 佔 22.79% , C subtype 佔 2.94%。

◎男性方面：B 有 81.66% , E 有 15.83% , C 有 2.50%。

◎女性方面：B 有 18.75% , E 有 75.00% , C 有 6.25%。

◎Fisher's Exact Test :  $P < 0.0001$

表二、 Frequency of RT-drug resistance mutations.

---

	<b>RT codon</b>							
<b>Allele</b>	<b>41</b>	<b>67</b>	<b>69</b>	<b>70</b>	<b>184</b>	<b>210</b>	<b>215</b>	<b>219</b>
Wild-type	118	130	134	133	127	127	103	128
Mutant	18	6	2	3	9	9	33	8

---

Note: Data are no. of isolates carrying wild-type or mutant alleles.

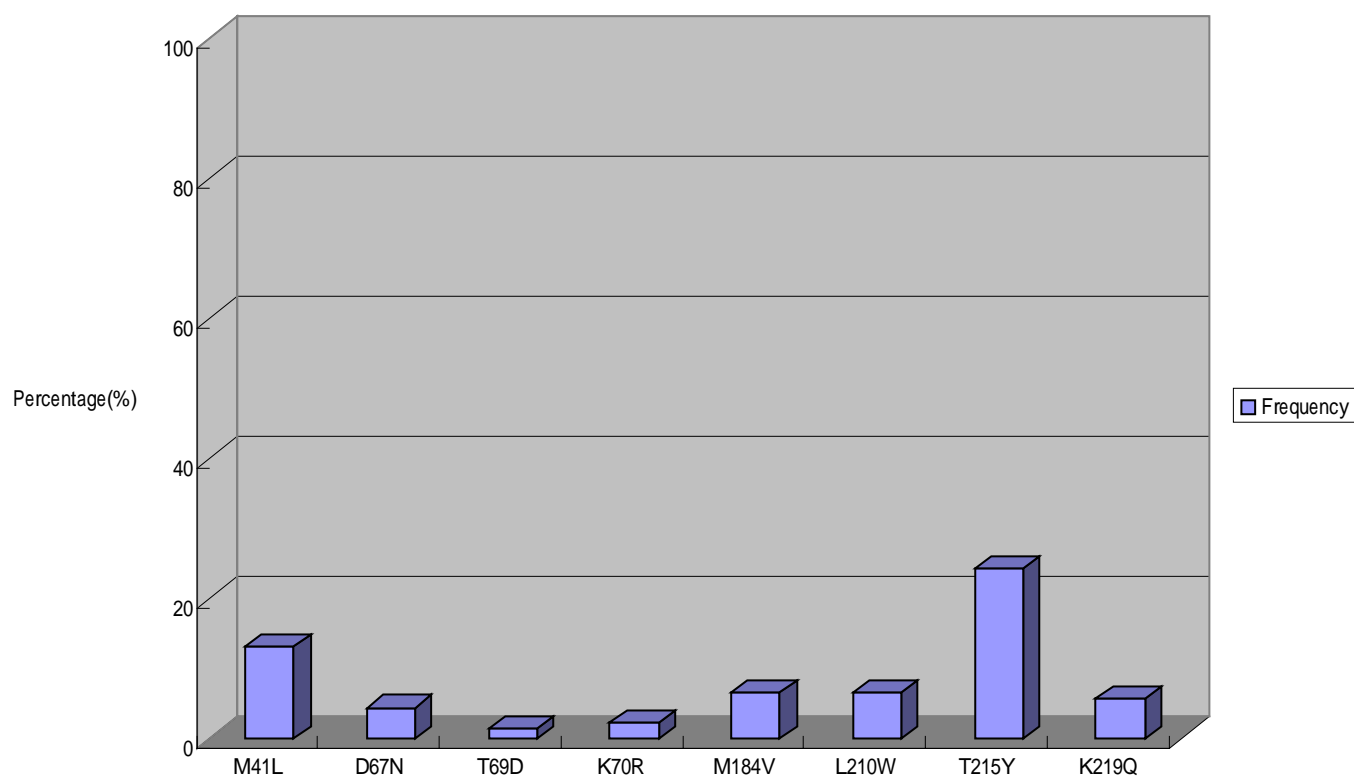


Fig 1. RT drug Resistance Frequency (n=136)

表三. Frequency of PR-drug resistance mutations.

Allele	PR codon(n=136)									
	10	20	36	54	63	71	77	82	84	90
Wild-type	118	121	96	131	71	111	116	119	135	134
Mutant	18	15	40	5	65	25	20	7	1	2

Note: Data are no. of isolates carrying wild-type or mutant alleles.

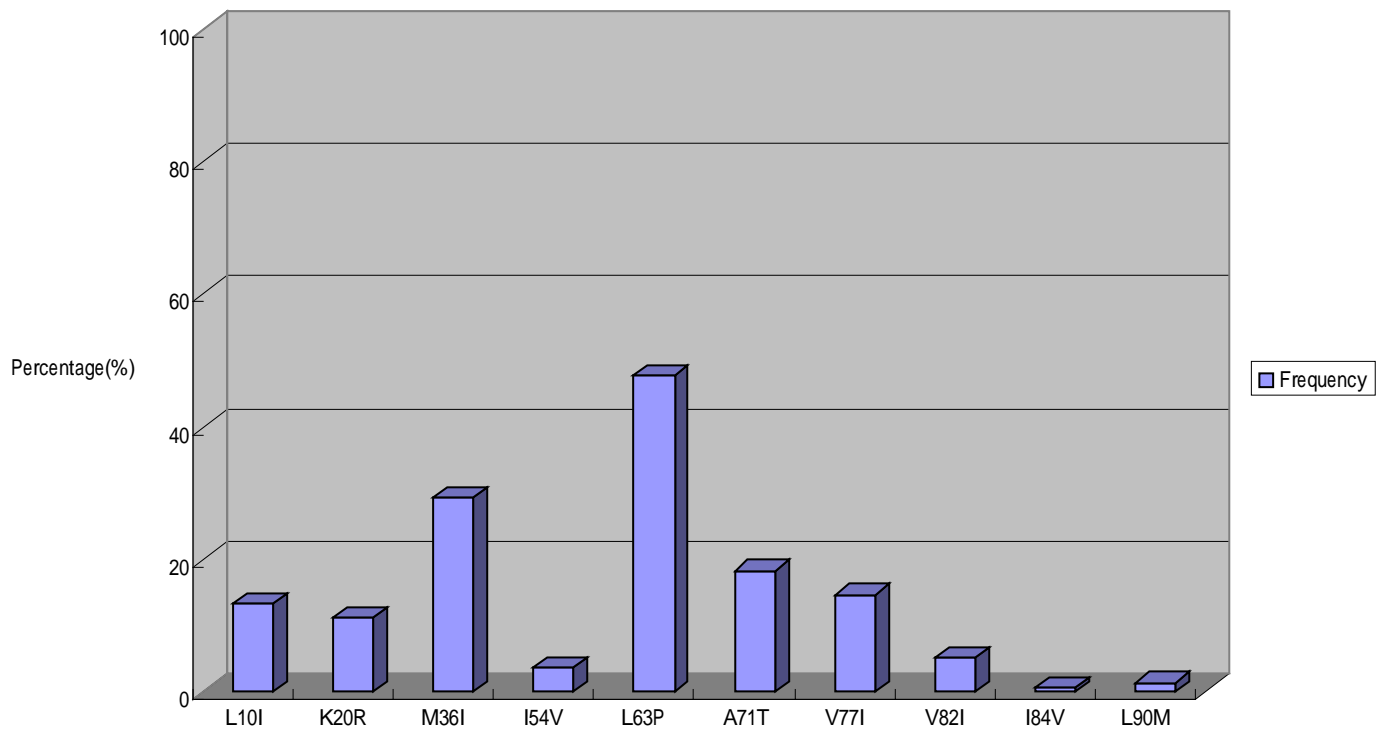


Fig 2.PR drug Resistance Frequency (n=136)

[Fig3-Fig16](#)