

行政院衛生署疾病管制局九十九年度科技研究發展計畫

計畫名稱： 建立愛滋病毒/B型肝炎病毒/C型肝炎病毒之不同族群
基因序列資料庫

研究報告

執行機構：疾病管制局

計畫主持人：楊志元 研究員

研究人員： 楊志元、傅子祐、高振峰、林思鳳、徐秋菊、張淑媛、洪健
清、盛望徽、楊靖慧

執行期間： 99年1月1日至99年12月31日

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	(13)
三、結 果	(28)
四、討 論	(35)
五、表 圖	(42)
六、參考文獻	(53)
	共 (55) 頁

中文摘要：

關鍵字：HIV, HBV, HCV, 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局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，提供臨床醫生及本局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(2010)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 214 件檢測，成功率為 80% (214/270)，結果統計有 185 件(86.4%)為 B 亞型為主要流行之病毒亞型，另有 13 件(6.1%)為 CRF01_AE 亞型、15 件(7.0%)為 CRF07_BC 亞型及 D 亞型一件(0.5%)[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，佔了 93.3%，其次一件為異性性行為者，佔了 6.7%，在 B 亞型中以同性性行為者所佔之比例最高(85.4%)，其次是異性性行(14.6%)[表二]。

而統計 2010 年新通報之 HIV-1 陽性個案之抗藥性盛行率監測共分析了 214 件檢體，具有抗藥性之主要突變點共有 21 件，抗藥性盛行率為 9.8% (21/214)，與前年相比結果類似(9.2%)。其中 PIs 為 0.9%(2 件)、NRTIs 為 4.2%(9 件)、NNRTIs 為 6.1%(13 件)，2007 至 2010 年之抗藥性監測皆無發現於新通報個案中具二線抗愛滋藥物之抗藥性位點[表四]。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 2009 年十一月至 2010 年十月共收集檢體 40 件，其中有 27 件(67.5%)具有一個以上之抗藥性相關之突變位點，其中以 RTIs 類別之抗藥性突變位點最普遍(52.5%)，而 PIs 類別則只有 4 件(10.0%)最低，此外 17.5%之個案在未開始使用第二線 HAART 藥物治療時，便具抗藥性，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。

依據統計臺灣自 2004 年藥癮者躍居感染 HIV-1 最主要高危險族群，分析其危險行為發現最主要原因為共用針頭、針具和稀釋液之危險行為，因此本項研究計畫第二部份將初步進行 HIV/HBV/HCV 血清學檢定，以了解其陽性率之分布情形；此外，也會進行 HIV/HBV/HCV 之基因分型，主要將以基因定序方法，探討其來源差異與分佈情形。本計劃由疾病管制局病毒實驗室、縣市衛生局與愛滋病指定醫院，收集西元 2010 年通報之 HIV-1 感染確認為陽性之檢體共 391 件，將其背景資料按照危險因子、居住地區與通報時間作整理，同時測定 HBV、HCV 之血清學，HBsAg 陽性為 12.5%(49/391)及 anti-HCV 陽性為 13.6%(53/391)，合併感染 HBsAg 及 anti-HCV 雙陽性者有 4.0%(16/391)；依危險因子區分為 39 名注射藥癮者(不含搖頭族)檢測 HBsAg 陽性有 10 名 (25.6%) 及 anti-HCV 陽性約 35 名 (89.7%)，合併感染 HBsAg 及 anti-HCV 雙陽性者有 9 名(23%)； 234 名同性間性行為者中檢測出

HBsAg 陽性有 29 名 (12.3%) 及 anti-HCV 陽性有 11 名 (4.7%)，合併感染 HBsAg 及 anti-HCV 雙陽性者有 5 名(2.1%)；77 名異性間性行為者中檢測出 HBsAg 陽性有 8 名 (10.3%) 及 anti-HCV 陽性有 6 名 (7.8%)，合併感染 HBsAg 及 anti-HCV 雙陽性者有 2 名(2.5%)；雙性戀性行為者佔 41 名檢測出 HBsAg 陽性有 2 名 (4.8%)及 anti-HCV 陽性 2 名 (4.8%)(表七)，由此得知危險因子以靜脈藥癮者及同性戀行為等感染肝炎病毒發生率較高，顯見 HIV 患者合併感染 HCV 情況將仍是嚴重狀況。

在被動監測 HIV(+)案例的檢體中，採直接萃取 viral RNA 後，以 RT-PCR 針對 HCV core region 進行基因亞型分析，經 PCR 實驗成功分析共 36 件，包括基因亞型為單一型別有 32 件中，包括異性戀者 2 件(5.5%)、注射藥癮者族群 23 件(63.8%)及同性戀 7 件(19.4%)；多重型別共計有 4 件中包括異性戀者 1 件(2.7%)、注射藥癮者族群 3 件(8.3%)。HBV 分析萃取 viral DNA 後根據 pre-S1 到 S gene 的固定序列進行基因亞型分析，經 PCR 實驗成功分析共 34 件，成功率為 70%(34/49)，包括基因亞型為 B 有 29 件中包括同性戀 18 件(52.9%)、異性戀者 4 件(11.8%)、雙性戀者 2 件(5.9%)、注射藥癮者族群 5 件(14.7%)；基因亞型為 C 有 4 件中包括同性戀 1 件(2.9%)、異性戀者 2 件(5.9%)、注射藥癮者族群 1 件(2.9%)；基因亞型為 D 有 1 件危險因子為注射藥癮者族群(表八)。顯示 HIV 陽性患者感染 B 型肝炎及 C 型肝炎將逐漸演變為慢性肝炎，而臺灣是 B 型肝炎病毒感染的高盛行區，未來處理合併感染 HIV 與 HBV 及 HCV 的患者必然是公共衛生及臨床醫療照護上極為重要的問題。期望藉由本研究能了解藥癮族群 HIV 合併 HBV 及 HCV 感染病患之血清學盛行率及基因型別分析之本土資料，以提供防疫政策上之參考。

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，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:**

根據疾病管制局統計累積到 99 年 10 月底，目前我國的本國籍愛滋病感染人數已達 20,094 人，就 99 年 1 月至 11 月中為止，本國籍新增感染愛滋病毒者則為 1,601 人，預估到全年度至 12 月底約在 1,700 人以下；相較於 94 年 3399 人、95 年 2,931 人、96 年 1964 人及 97 年 1779 人，則有持續下降後趨於穩定之勢(圖二)。2010 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 20-29 歲佔了 46%；其次為 30-39 歲則佔了 30%，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，同性間性行為者佔 78%；異性間性行為佔 14%；另外靜脈藥癮者(injecting drug user；IDU)佔 8%。主要在 93、94 年間因靜脈毒癮者爆發大流行，使得靜脈毒癮者已超越其他危險因子，佔了最大比例。但最新統計資料顯示，99 年至 11 月初 47 週，1601 名新感染個案，其中藥癮者為 326 人，佔 22%；相較於 94 年 66%、95 年 60.4%、96 年 36%，有下降的趨勢，代表政府推動針具清潔交換計畫有明顯的成效(圖三)。

臺灣病毒肝炎統計資料:

依據疾病管制局法定傳染病通報資料顯示，各項急性病毒性肝炎確定病例及境外移入個案數如下，其中急性病毒性 B 型肝炎，2007-2009 年每十萬人口發生率分別為 0.88、0.97、0.67。年齡層分佈，以 25-39 歲個案為最多。根據全國預防接種資訊系統(NIIS)孕產婦 B 型肝炎登錄表統計資料顯示，自 1984 年起，孕

婦 B 型肝炎表面抗原(HBsAg)陽性率由 13-17%下降至 10.3%；孕婦 B 型肝炎 e 抗原(HBeAg)陽性率，則由 7%逐漸下降至 2.3%。相關研究發現母親為 B 型肝炎 e 抗原陽性者，其所生小孩於接種 B 型肝炎免疫球蛋白及三劑 B 型肝炎疫苗後，B 型肝炎帶原比例雖較未接種疫苗之 90%大幅降低，但仍可能有 10%之帶原機會，該族群未來可能有罹患慢性肝病、肝硬化及肝癌之高度風險。依據疾病管制局法定傳染病通報資料顯示，急性病毒性 C 型肝炎確定病例及境外移入個案數如下，2007-2009 年每十萬人口發生率分別為 0.66、0.56、0.57。年齡層分佈，以 20-34 歲個案為最多。

慢性肝炎主要是經由肝炎病毒感染所造成，研究顯示臺灣地區慢性病毒性肝炎之主要致病原為 B 型肝炎病毒其次可說是 C 型肝炎。目前臺灣地區的成年人是 B 型肝炎帶原者約三百萬人，B 型肝炎帶原率高達 15—20%的比例，故 B 型肝炎帶原率偏高是造成我國肝病猖獗的主要原因，慢性 B 型肝炎病毒感染之後遺症如肝硬化和肝細胞癌仍舊是國人健康的大敵。至目前為止，對慢性肝炎患者而言，我們仍無法有效預測患者未來的過程演變，只能被動地觀察。至於 C 型肝炎病毒感染亦是一個全球性的健康課題，據世界衛生組織評估，全世界約有 1 億 7 千萬人為 C 型肝炎病毒帶原者，尤其以 HIV 患者與靜脈毒癮者最常見。依據估計，臺灣地區約有百分之二至四的人口感染 C 型肝炎，急性 C 型肝炎感染者約有 60-80%會變成慢性 C 型肝炎，而慢性 C 型肝炎約有百分之二十會變成肝硬化，肝硬化患者每年約有 3-5%轉變成肝癌，C 型肝炎病毒感染在歐美國家遠較 B 型肝炎病毒感染來得重要，是其慢性肝病和肝臟移植的最主要原因，目前並無有效疫苗加以預防，故亦為我國民重視之健康問題。

***HBV、HCV 與 HIV 共同感染:**

國內從 2004 年起毒癮者 IDU 成為 HIV 感染患者中的最大族群,往往也因其共用針頭、針具和稀釋液之行為,同時感染 HBV 或 HCV。由過去的研究顯示臺灣 HIV 感染者之慢性 HBs Ag 帶原率約為 16%,與一般非 HIV 感染族群的 B 型肝炎流行病學極為相似,可能的原因是歐美國家 HBV 感染主要來自於青少年至成年時期經由污染針具的血液交換或同性戀與異性戀的性行為為主要 HBV 感染途徑,而臺灣的 HBV 傳染以母子間垂直感染與嬰幼兒時期水平感染為主,HBsAg 慢性帶原率較高。國外的研究顯示愛滋病患感染 C 型肝炎時會加速 C 型肝炎相關之慢性肝病如肝硬化及肝癌進行,另外合併感染 HIV 及 HCV 的患者對於抗 HIV 藥物之反應亦比較差,因此容易進展成 AIDS。依據本實驗室與其他實驗室之報告指出,盛行於臺灣 IDU 族群之 HIV-1,絕大部分是感染了 HIV-1 CRF07_BC,此一基因亞型是緣自於大陸雲南地區之毒癮者,而 B/C 肝炎是否也會出現一些特殊型別,原先並不常在一般 B/C 肝炎患者發現,我們實驗室之前結果顯示 C 肝方面確實找到為數不少的 HCV 基因亞型 3 或 6,而這些特殊基因型別幾乎是不存在原先之 C 肝族群,應該是與其吸毒行為有關而受到感染。

聯合國曾提出警告說明當愛滋病在靜脈毒癮族群中流行時,會透過性行為方式傳到一般族群,將使愛滋病疫情面臨爆炸性的增加。臺灣地區愛滋病的防治面臨的挑戰,不單是靜脈毒癮族群大幅增加,還加上 C 型肝炎合併感染,或以性交易換取毒品的威脅,這些危險因子會讓愛滋病由特殊族群擴散到一般的社會族群,讓已經捉襟見肘的醫療照護資源出現更多的負擔。政府單位積極宣導推廣減害計畫防治愛滋病與靜脈毒癮的流行,冀望藉由靜脈毒癮針頭交換計畫,宣傳共用針頭與危險性行為的威脅,減少共用針頭感染愛滋病的風險,期望能減低愛滋病在靜脈毒癮族群的散布機

會，減少對國人的威脅。

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感染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 2010 年度由疾病管制局病毒實驗室、縣市衛生局與愛滋病指定醫院所收集的 HIV-1 陽性檢體共 270 件，收集之個案必需為 2010 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。

HBsAg 血清學檢測

此檢驗方法為 ARCHITECT HBsAg 分析，使用化學冷光微粒免疫分析法（CMIA）及彈性分析程序（Chemiflex），定量測試人類血清及血漿中之 B 型肝炎表面抗原（HBsAg）。在第一步驟，樣本、覆被 anti-HBs 的磁性微粒混合，存於樣本中的 HBsAg 會與覆被 anti-HBs 之微粒結合，經

清洗後，標示 acridinium 的 anti-HBs 偶合物於第二步驟加入，經另一次清洗循環後，加入啟動前溶液及啟動溶液於反應混合物中，以相對光線單位 (RLUs) 測量最終化學冷光反應，樣本中 HBsAg 含量與 ARCHITECT i-1000 光學系統所測得 RLUs 有直接相關性。檢體中 B 型肝炎表面抗原濃度經由先前產生之 ARCHITECT HBsAg 校正曲線來測得。若檢體濃度大於或等於 0.05 IU/mL，則檢體視為 HBsAg 有反應性。檢驗步驟如下：

1. 血清及血漿檢體應不含纖維、紅血球或其他微粒。第一次 HBsAg 測試所需最小樣本體積為 150uL 每增加一次 HBsAg 測試再加上 75uL。
2. 將 ARCHITECT HBsAg 校正液及品管液於使用前翻轉混合，垂直握住瓶子各滴下 10 滴校正液及 6 滴品管液於各代表樣本杯中。
3. 於 ARCHITECT i-1000 系統主畫面點選 Calibrator order 及 Control Order。輸入校正液及品管液放置的檢體架號碼、位置，點選測試項目 HBsAg，點取 Add order。將放有校正液及品管液樣本杯之檢體架放置於 load queue 上即開始分析測試。
4. 於 ARCHITECT i-1000 系統主畫面點選 Patient order。輸入檢體放置的檢體架號碼、位置及檢體編號，點選測試項目 HBsAg，點取 Add order。將放有檢體之檢體架放置於 load queue 上即開始分析測試。
5. ARCHITECT HBsAg 分析利用 4 參數對數曲線適當資料減少法 (4PLC, Y 加權) 來產生校正曲線。結果解釋：檢體濃度值 < 0.05 IU/mL 視為無反應性，≥ 0.05 IU/mL 視為有反應性。

Anti-HBs 血清學檢測

此檢驗方法為 ARCHITECT anti-HBs 分析，利用化學冷光微粒免疫分析法 (CMIA) 及彈性分析程序 (Chemiflex)，定量測試人類血清及血漿中之 B 型肝炎表面抗原抗體 (anti-HBs)。在第一步驟，樣本與覆被有重

組 HBsAg (rHBsAg) 的磁性微粒混合，存於樣本中的 anti-HBs 會與覆被 rHBsAg 之微粒結合，經清洗後，標示 acridinium 的 rHBsAg 偶合物於第二步驟加入，經另一次清洗循環後，加入啟動前溶液及啟動溶液於反應混合物中，以相對光線單位(RLU)測量最終化學冷光反應，樣本中 anti-HBs 含量與 ARCHITECT i-1000 光學系統所測得 RLU 有直接相關性。檢體中 B 型肝炎表面抗原濃度經由先前產生之 ARCHITECT anti-HBs 校正曲線來測得。若檢體濃度大於或等於 10.0 mIU/mL，則檢體為 anti-HBs 有反應性。檢驗步驟如下：

1. 血清及血漿檢體應不含纖維、紅血球或其他微粒。第一次 anti-HBs 測試所需最小樣本體積為 150uL 每增加一次 HBsAg 測試再加上 75uL。
2. 將 ARCHITECT anti-HBs 校正液及品管液於使用前翻轉混合，垂直握住瓶子各滴下 7 滴校正液及 5 滴品管液於各代表樣本杯中。
3. 於 ARCHITECT i-1000 系統主畫面點選 Calibrator order 及 Control Order。輸入校正液及品管液放置的檢體架號碼、位置，點選測試項目 anti-HBs，點取 Add order。將放有校正液及品管液樣本杯之檢體架放置於 load queue 上即開始分析測試。
4. 於 ARCHITECT i-1000 系統主畫面點選 Patient order。輸入檢體放置的檢體架號碼、位置及檢體編號，點選測試項目 anti-HBs，點取 Add order。將放有檢體之檢體架放置於 load queue 上即開始分析測試。
5. ARCHITECT anti-HBs 分析利用 4 參數對數曲線配適數據簡化法 (4PLC, Y 加權) 來產生校正曲線。結果解釋: 檢體濃度值 <10.0 mIU/mL 視為無反應性，≥10.0 mIU/mL 視為有反應性。

Anti-HBc 血清學檢測

此檢驗方法為 ARCHITECT anti-HBc 分析，利用化學冷光微粒免疫分

析法，定量測試人類血清及血漿中之 B 型肝炎核心抗原抗體 (anti-HBc)。在第一步驟，樣本與覆被有 HBc 抗原的磁性微粒混合，存於樣本中的 anti-HBc 會與覆被 HBc 抗原之微粒結合，經清洗後，標示 acridinium 之抗人類偶合物於第二步驟加入，經另一次清洗循環後，加入啟動前溶液及啟動溶液於反應混合物中，以相對光線單位(RLU)測量最終化學冷光反應，樣本中 anti-HBc 含量與 ARCHITECT i-1000 光學系統所測得 RLU 有直接相關性。檢體中 B 型肝炎表面抗原濃度經由先前產生之 ARCHITECT anti-HBc 校正曲線來測得。若檢體濃度大於或等於臨界值，則檢體為 anti-HBs 有反應性。檢驗步驟如下：

1. 血清及血漿檢體應不含纖維、紅血球或其他微粒。第一次 anti-HBc 測試所需最小樣本體積為 150uL 每增加一次 anti-HBc 測試再加上 25uL。
2. 將 ARCHITECT anti-HBc 校正液及品管液於使用前翻轉混合，垂直握住瓶子各滴下 5 滴校正液及 4 滴品管液於各代表樣本杯中。
3. 於 ARCHITECT i-1000 系統主畫面點選 Calibrator order 及 Control Order。輸入校正液及品管液放置的檢體架號碼、位置，點選測試項目 anti-HBc，點取 Add order。將放有校正液及品管液樣本杯之檢體架放置於 load queue 上即開始分析測試。
4. 於 ARCHITECT i-1000 系統主畫面點選 Patient order。輸入檢體放置的檢體架號碼、位置及檢體編號，點選測試項目 anti-HBc，點取 Add order。將放有檢體之檢體架放置於 load queue 上即開始分析測試。
5. ARCHITECT 系統計算利用 ARCHITECT anti-HBc 校正液 1 三次測試結果之平均化學冷光訊號並儲存結果。

臨界值計算：校正液平均 RLU 值 x1.1 = 臨界值 RLU

S/CO = 樣本 RLU / 臨界值 RLU

結果解釋：ARCHITECT anti-HBc 分析檢體 S/CO 值 <1.00 ，視為無反應性，檢體 S/CO 值 ≥ 1.00 ，視為有反應性。

Anti- HCV 血清學檢測

此檢驗方法為 ARCHITECT anti-HCV 分析，利用化學冷光微粒免疫分析技術，定性測試人類血清及血漿中之 anti-HCV。在第一步驟，樣本、覆被重組 HCV 抗原的磁性微粒和分析稀釋液混合，存於樣本中的 anti-HCV 會與覆被 HCV 抗原之微粒結合，經清洗後，標示 Acridinium 的抗人類抗體偶合物於第二步驟加入，經另一次清洗循環後，加入啟動前溶液及啟動溶液於反應混合物中，以相對光線單位(RLUs)測量最終化學冷光反應，樣本中 anti-HCV 含量與 ARCHITECT i-1000 光學系統所測得 RLUs 有直接相關性。檢體中 anti-HCV 存在與否，經由比較反應化學冷光訊號及由 ARCHITECT anti-HCV 校正液測得之臨界值來判定。若檢體之化學冷光訊號值大於或等於臨界值，則檢體為 anti-HCV 有反應性。檢驗步驟如下：

1. 血清及血漿檢體應不含纖維、紅血球或其他微粒。第一次 anti-HCV 測試所需最小樣本體積為 150uL 每增加一次 anti-HCV 測試再加上 20uL。
2. 將 ARCHITECT anti-HCV 校正液及品管液於使用前翻轉混合，垂直握住瓶子各滴下 5 滴校正液及 6 滴品管液於各代表樣本杯中。
3. 於 ARCHITECT i-1000 系統主畫面點選 Calibrator order 及 Control Order。輸入校正液及品管液放置的檢體架號碼、位置，點選測試項目 anti-HCV，點取 Add order。將放有校正液及品管液樣本杯之檢體架放置於 load queue 上即開始分析測試。
4. 於 ARCHITECT i-1000 系統主畫面點選 Patient order。輸入檢體放置的檢體架號碼、位置及檢體編號，點選測試項目 anti-HCV，點取 Add

order。將放有檢體之檢體架放置於 load queue 上即開始分析測試。

5. ARCHITECT 系統自三次 ARCHITECT anti-HCV 校正液 1 測試結果計算平均化學冷光訊號並儲存結果。

臨界值計算：校正液 1 平均 RLU 值 $\times 0.074 =$ 臨界值 RLU

$S/CO =$ 樣本 RLU / 臨界值 RLU

結果解釋：以 ARCHITECT anti-HCV 分析檢體 S/CO 值 < 1.00 ，視為無反應性，檢體 S/CO 值 ≥ 1.00 ，視為有反應性。

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酵素鏈鎖反應 (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 及本局 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、進行反轉錄聚合酶連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。

反轉錄酶聚合酶鏈鎖反應

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 µL 200mM KCl 緊接著在加入 50 µL 的 PCR 反應產物，離心 (800 x g for 15min.)，再加入 300 µL 的二次水，離心 (800 x g for 15min.)，再加入 35 µL 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 uL 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]。

病毒 DNA 的萃取

使用 QIAGEN 公司的 QIAamp MinElute Virus Spin kit 進行 DNA 的純化。取血清 200uL 與 25uL QIAGEN protease 混合後加入 200 uL Buffer AL

(28ug/ml of carrier RNA) 完全混合(vortexing)於 56°C 下作用 15 分鐘，再加入 250 uL 絕對酒精混合完全並於室溫下作用 5 分鐘，上述混合液通過 QIAamp MinElute column，再以 Buffer AW1、AW2 與絕對酒精分別各清洗一次 column 後，用 50uL AVE buffer 將 DNA 溶出。製備的病毒 DNA 可用於聚合酵素鏈鎖反應 (PCR)。

HBV 基因型分析

將萃取好的 HBV DNA sample 進行聚合酵素鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction)，根據 pre-S1 到 S gene 的固定序列設計一組 P1 和 S1-2 的 outer primers，以 viral DNA 為 template 做 PCR 增幅。之後再以 PCR 產物當 template 做 nested PCR，用兩組不同的混合 type-specific inner primers 作特定片段的增幅。

a. 聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction):

使用 QIAGEN 公司的 Hotstar Taq Master mix kit 進行聚合酶連鎖反應。取 viral DNA 5uL，加入各 1uL 的 10μM outer primers(P1 和 S1-2)(表九)和 12.5uL 的 2X Hotstar taq master mix，5.5uL 的 ddH₂O，以 95°C15 分鐘後，再以 94°C20 秒，55°C20 秒，72°C1 分鐘的循環進行 40 次反應，最後在 72°C 下作用 7 分鐘。

b. 巢式聚合酶連鎖反應：Nest-PCR

將第一次 PCR 的產物取 0.5uL 當模板(template)加入 2x PCR Master Mix 12.5uL，再加入 mixtures inner primers mixA(B2,BA1R,BB1R,BC1R) 和 mixB(BD1,BE1,BF1,B2R) (表九)4uL(10μM)，補水至 25uL。以 95°C15 分鐘後，再以 94°C20 秒，58°C20 秒，72°C30 秒的循環進行 20 次反應，94°C20 秒，

60°C20秒，72°C30秒的循環進行20次反應，最後在72°C下作用7分鐘。

c. 跑電泳膠片確定型別:

HBV 型別分作六型(A,B,C,D,E,F)，六種型別的片段大小分別是，在 Mix A 中有 Type A:68bp、Type B:281bp、Type C:122bp，在 Mix B 中有 Type D:119bp、Type E:167bp、Type F:97bp。

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酵素鏈鎖反應 (RT-PCR)。

HCV 基因型分析

將反轉錄酶產生的HCV cDNA進行初步的PCR，根據HCV core region設計Sc2和Ac2當outer primers。以viral RNA為template做RT-PCR增幅。之後再以RT-PCR產物當template做nested PCR，用兩組不同的混合type-specific inner primers作特定片段的增幅。

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 5uL、5x Q-solution 5uL、dNTP Mix 1uL、QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix 1uL、各1uL 10μM的Sc2和Ac2(表十)，再補RNase-free water 至25uL，以50°C 30分鐘，再95°C15分鐘後，以94°C30秒、63°C 30秒、

72°C 45秒，進行20次反應，94°C30秒、60°C 30秒、72°C 45秒，，進行20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 0.5uL 當模板(template)加入 2x PCR Master Mix 12.5uL、

各2uL的mixtures inner primers mix1(S7,S2a,G1b,G2a,G2b,G3b) 、mix2(S7,G1a, G4,G5a) 和mix3(S7, G3b, G3A, ,G6a)(表十)，補水至25 uL，進行 95°C15分鐘後，以94°C30秒、62°C30秒、72°C45秒，進行30次反應，最後在72°C作用7分鐘。

c. 跑電泳膠片確定型別:

HCV 主要分成六種型別，六種型別中又各有數種不同的亞型，所使用的方法中，可分出的型別及片段大小如下所列:在 Mix 1 中有 1b(234bp)、2a(139bp 和 190bp)、2b(337bp)、，在 Mix 2 中有 1a(208bp)、4(99bp)、5a(320bp)，在 Mix 3 中有 3a(232bp)、3b(176bp) 、6a(336bp)。

三、研究結果

HIV 研究

本研究計畫監測每年新通報之 HIV-1 陽性病患，2010 年新通報個案已分析了 214 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，成功率為 80% (214/270)。結果發現有 185 件(86.4%)為 B 亞型為主要流行之病毒亞型，另有 13 件(6.1%)為 CRF01_AE 亞型、15 件(7.0%)為 CRF07_BC 亞型及 D 亞型一件(0.5%)[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，佔了 93.3%，其次是異性性行為者，佔了 6.7%(1/15)，由於靜脈藥癮者中 HCV 傳染率高達九成以上，以往發現這類非靜脈藥癮者感染 CRF07_BC 之個案，檢測其 anti-HCV 皆顯示為陽性(2009 年 4 件)，因此這些個案很有可能由於害怕刑責而謊報危險因子，拒絕透露有施打藥品之行為，但今年這件個案其 HBC、HCV 皆為陰性，顯示 CRF07_BC 可能已開始轉移至異性性行為族群中，針對這些 CRF07_BC 異性戀之個案，實驗室將轉達權責疾病組進行合作調查病例並追蹤。在 B 亞型中以同性性行為者所佔比例最高(85.4%)，其次是異性性行(14.6%)[表二]，自 2007 到 2010 年的 HIV-1 亞型分析中，可以發現 B 亞型所佔之比例越來越高，相反地，CRF07_BC 佔比例則是逐年下降，而近期感染率也有相同之趨勢[圖三]，代表針對 CRF07_BC 所屬之靜脈藥癮者族群所實施的減害計畫成效卓越[表四]。

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。監測以亞培廠商所提供 ViroSeq™ HIV-1 Genotyping system kit (FDA. CE 認證、衛生署 IVD 認證) 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。

HIV-1 原生抗藥性盛行率之監測方面，共分析 214 件 2010 年未服用抗反轉錄病毒藥物之新通報個案之 PR 與 RT 基因序列，監測 2010 年之原生 HIV-1 抗藥性之盛行率統計為 9.8%[表一]，與 2009 年相比結果類似 (9.2%)，其中 PIs 為 0.9%(2 件)、NRTIs 為 4.2%(9 件)、NNRTIs 為 6.1%(13 件)，2007 至 2010 年之抗藥性監測皆無發現於新通報個案中具二線抗愛滋藥物之抗藥性位點[表四]。而針對各種族群所作之 Odd rate 分析中，目前並無具明顯差異的因子[表一]。在蛋白質酶基因突變位點統計，共在 2 件檢體中，發現主要突變點(Primary mutation)皆為 L90M 突變位點，主要導致對 Atazanavir、Fosamprenavir、Indinvir、Nelfinavir、與 Ritonavir 等 PIs 藥物產生嚴重的抗藥性反應。而在反轉錄酶基因突變位點統計，共在 9 件檢體中發現 NRTIs 之主要突變點，其中 K65R、L74I、F77L 位點各 1 件(1.2%) 及 T215DS、K219QR 各 3 件；NNRTIs 之主要突變點為 13 件，其中 3 件 K101EP、9 件 K103NS、1 件 Y181C、2 件 G190A 及 1 件 P225H 位點[表三]。

由於分析臺灣本土 2010 年新通報個案之抗藥性盛行率為 9.8%，與前年(9.2%)結果相似，建議持續進行 HIV-1 抗藥性盛行率之監測，以了解本

土之抗藥性流行趨勢，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]。

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，本研究自 2009 年十一月至 2010 年十月共收集檢體 40 件，其中有 27 件(67.5%)具有一個以上之抗藥性相關之突變位點，其中以 RTIs 類別之抗藥性突變位點最普遍(52.5%)，而 PIs 類別則只有 4 件(10.0%)最低，然其中有 32.5% 之病患沒有發現任何 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[表五]。統計分析各類抗反轉錄病毒藥物之抗藥性盛行率，RTI 類別最為嚴重(52.5%)。其中 Lamivudine(3TC)、Emtricitabine(FTC)及所有的 NNRTI 類之抗藥性最為嚴重(48.8%~53.5%)。此 17.5% 之個案在未開始使用第二線 HAART 藥物治療時，便具抗藥性，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[表六]。

HBV、HCV 血清學研究：

本研究之主動監測檢體來源取自三組減害計畫委託各縣市衛生局協助採集警方查獲之藥癮族群及國內各監獄、看守所之藥癮者檢體及成大醫院於台中、高雄地區配合三溫暖營業場所採集之男同志族群匿名者檢體等。HBV/HCV 血清學檢測採用亞培 Architect 檢驗試劑，進行 HBsAg、anti-HBs、anti-HBc、anti-HCV 等四項標誌檢測，以了解國內藥癮族群之 B 型肝炎病毒標誌及 C 型肝炎抗體盛行率調查。

主動監測目前已收集 2470 名減害藥癮族群檢體及成大醫院於台中、高雄地區配合三溫暖營業場所採集之同志族群匿名者檢體約 822 名，合計 3292 件檢體。進行血清學檢測後結果，將其區分為 2165 名 HIV(-) 藥癮者中 HBsAg 陽性約 358 名 (16.5%)、anti-HBs 陽性約 1308 名 (60.4%)、anti-HBc 陽性約 1795 名 (82.9%) 及 anti-HCV 陽性約 1765 名 (81.5%)，合併感染 HBsAg、anti-HCV 陽性者約 301 名(13.9%)。至於 305 名 HIV(+)藥癮者之血清學顯示 HBsAg 陽性約 69 名 (23.6%)、anti-HBs 陽性約 165 名 (54%)、anti-HBc 陽性約 250 名 (81.9%)及 anti-HCV 陽性約 300 名 (98.3%)，合併感染 HBsAg、anti-HCV 陽性者約 69 名(22.6%)。至於匿名的三溫暖男同志族群中 HIV(-)佔 766 名，血清學顯示 HBsAg 陽性約 84 名 (11%)、anti-HBs 陽性約 382 名 (49.9%)、anti-HBc 陽性約 296 名 (38.6%)及 anti-HCV 陽性約 10 名 (1.3%)，合併感染 HBsAg、anti-HCV 陽性者約 3 名(0.4%)；同志族群中 HIV(+)佔 56 名，血清學顯示 HBsAg 陽性約 2 名 (3.6%)、anti-HBs 陽性約 37 名(66.1%)、anti-HBc 陽性約 31 名(55.4%)及 anti-HCV 陽性約 3 名 (5.4%)。藉由主動監測可發現 HIV(+)靜脈藥癮者藉由血液感染或共用針具、稀釋液等行為感染 anti-HCV 明顯偏高於 HIV(-)靜脈藥癮者(表七)。分析 HBV 病毒標誌檢測 HBsAg、anti-HBs、anti-HBc 等三項臨床意義，發現 HIV 陰性者 HBsAg(-)/anti-HBs(+)/ anti-HBc(+)感染 B 型肝炎後產生免疫效應 B 型肝炎表面抗體 50.4 % 高於 HIV 陽性者的 41.3 %，HIV 陽性者 HBsAg(+)/anti-HBs(-)/ anti-HBc(+)B 型肝炎帶原率 22.6 高於 HIV 陰性者的 15.9 %。若以居住地區分析則以北部地區靜脈藥癮者 HBsAg(+)/anti-HBs(-)/ anti-HBc(+)B 型肝炎帶原率 15.4%低於其他區域(表十二)。

本計畫被動監測檢體來自 HIV-1 陽性檢體，收集 2010 年通報之 HIV-1 感染確認為陽性之檢體共 391 件，將其背景資料按照危險因子、居住地區與通報時間作整理，因收集個案之血清檢體常有不足量現象，故血清學檢測僅測 HBsAg、anti-HCV 兩項，結果顯示 HBsAg 陽性為 12.5%(49/391)及 anti-HCV 陽性為 13.6%(53/391)，合併感染 HBsAg 及 anti-HCV 雙陽性者有 4.0%(16/391)；依危險因子區分為 39 名注射藥癮者(不含搖頭族)檢測 HBsAg 陽性有 10 名 (25.6%) 及 anti-HCV 陽性約 35 名 (89.7%)，合併感染 HBsAg 及 anti-HCV 雙陽性者有 9 名(23%)；234 名同性間性行為者中檢測出 HBsAg 陽性有 29 名 (12.3%) 及 anti-HCV 陽性有 11 名 (4.7%)，合併感染 HBsAg 及 anti-HCV 雙陽性者有 5 名(2.1%)；77 名異性間性行為者中檢測出 HBsAg 陽性有 8 名 (10.3%) 及 anti-HCV 陽性有 6 名 (7.8%)，合併感染 HBsAg 及 anti-HCV 雙陽性者有 2 名(2.5%)；雙性戀性行為者佔 41 名檢測出 HBsAg 陽性有 2 名 (4.8%)及 anti-HCV 陽性 2 名 (4.8%)，由此得知危險因子以靜脈藥癮者及同性戀行為等感染肝炎病毒發生率較高，可見 HIV 患者合併感染 HCV 情況將仍是嚴重狀況(表八)。

HBV、HCV 基因分型研究：

在主動監測(減刑計畫)靜脈藥癮檢體基因分型：

以 99 年檢出 anti-HCV 陽性案例相對於 97 年、98 年 anti-HCV 陽性勾稽新增之個案，經 PCR 實驗成功分析共 112 件，區分各種不同的 HCV 基因亞型，分別為包括基因亞型為單一型別共有 101 件分別為 1a 的有 34 件、1b 有 10 件、2a 有 4 件、2b 有 5 件、3a 有 11 件、6a 有 35 件、6n 有 1 件，其餘皆為混合型共有 7 件，分別是 1 件 1a1b、1 件 1a2a、1 件 1a2b、2 件 1a6a、1 件 2a3a、1 件 2b6a 等。

相同以 99 年檢出 HBsAg 陽性案例相對於 97 年、98 年 HBsAg 陽性勾稽新增之個案，經 PCR 實驗成功分析共 47 件，包括基因亞型為 B 有 38 件，基因亞型 C 有 9 件。

主動監測計畫檢出 HBsAg 及 anti-HCV 合併感染雙陽性者約 370 人，勾稽新增之個案抽樣約 60 人，區分各種不同的 HBV、HCV 基因亞型，經 PCR 實驗成功分析，HBV 基因亞型共計 37 件分別為基因亞型為 B 有 29 件，C 有 8 件；HCV 基因亞型為單一型別共有 34 件分別為 1a 的有 9 件、1b 有 2 件、2a 有 2 件、2b 有 1 件、3a 有 5 件、6a 有 14 件、6n 有 1 件，其餘皆為混合型共有 3 件，分別是 1 件 1a1b、1a2b 有 1 件、1a6a 有 1 件等(表十)。

在被動監測 HIV 陽性的檢體基因分型：

自檢測 HIV(+) 案例的檢體中，採直接萃取 viral RNA 後，以 RT-PCR 針對 HCV core region 進行基因亞型分析，經 PCR 實驗成功分析共 36 件，成功率為 67%(36/54)，包括基因亞型為單一型別有 32 件中，包括異性戀者 2 件(5.5%)、注射藥癮者族群 23 件(63.8%)及同性戀 7 件(19.4%)；多重型別共計有 4 件中包括異性戀者 1 件(2.7%)、注射藥癮者族群 3 件(8.3%)。HBV 分析萃取 viral DNA 後根據 pre-S1 到 S gene 的固定序列進行基因亞型分析，經 PCR 實驗成功分析共 34 件，成功率為 70%(34/49)，包括基因亞型為 B 有 29 件中包括同性戀 18 件(52.9%)、異性戀者 4 件(11.8%)、雙性戀者 2 件(5.9%)、注射藥癮者族群 5 件(14.7%)；基因亞型為 C 有 4 件中包括同性戀 1 件(2.9%)、異性戀者 2 件(5.9%)、注射藥癮者族群 1 件(2.9%)；基因亞型為 D 有 1 件危險因子為注射藥癮者族群，為本局首次發現基因亞型 D，顯示經由藥物濫用針具污染感染感染非臺灣常見基因亞型 B 或 C 之情況將日趨浮現(表十一)。

若將 HBV 和 HCV 傳染途徑皆相似，主要的危險因子與血液，體液接觸有相關，依危險因子區分基因亞型，在 B 肝方面大部分為 B 亞型感染；C 肝方面則大部分為亞型 1a 或 6a 感染為主要型別，其中亞型 6a 大多發現於東南亞國家，在藥物成癮者以靜脈注射 5 年後感染 C 型肝炎的比率為 50%~90%，推測近年感染人數增加可能是藉由靜脈藥癮共用針具、稀釋液所快速傳播導致(表九)。

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 HAART 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，從目前的研究可以肯定的說，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 214 件檢體，NRTIs 類別之抗藥性突變位點主要有 K65R、L74I、F77L 位點各 1 件(1.2%)及 T215DS、K219QR 各 3 件，從 HAART 治療方面來分析，在這些未服藥的病人在 K65R 與 F77L 突變位點對大部分 NRTI 藥物皆會產生抗藥性，L74I 對 ABC、DDI 以及 T215、K219 對 D4T、AZT 產生嚴重之抗藥性；NNRTIs 類別之抗藥性突變位點主要有 3 件 K101EP、9 件 K103NS、1 件 Y181C、2 件 G190A 及 1 件 P225H 位點，其中 K101EP、K103NS、Y181C 會對 EFV、ETR、NVP 產生嚴重之抗藥性(表三)。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]，而主要抗藥性突變點則有 2 件 L90M，可導致對大部分 PIs 藥物產生抗藥性。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。

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、1.1% 為 C 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%，直到今年 2010 年則已下降至 7%，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(2010)年的 7.0%(圖四)。

臺灣地區本國籍新增感染 HIV-1 之病患於今年 2010 年相較於去年 2009 年呈現下降趨緩之情況，預估今年整年度新增感染 HIV-1 人數在 1700 左右，但相較於 2006 年有 2,969 人，經由政府實施針具交換、替代療法政策，使得愛滋病疫情已退燒而有所控制；而分析感染 HIV-1 之危險因子，靜脈毒癮者所佔的比例從 2005 年高達 72.3%，到 2006 年 60.4%，去年 2007 年已下降至 36%，而今(2010)年 10 月底前則為 7%。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(86.4%)，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]。

從演化樹分析中得知臺灣的 HIV-1 CRF07_BC 重組病毒是接近大陸型的重組病毒。在近期感染且亞型為 CRF07_BC 中依照危險因子做區分，前幾年幾乎侷限於靜脈毒癮患者，但今年在其他族群發現，在 15 件 CRF07_BC 件數當中，發現有 1 件為異性戀，為了釐清 CRF07_BC 從原本僅在 IDU 族群中流行，是否經透過其他方式(如：性交易)散佈在其他族群中，必須與權責疾病進行詳細的流行病學資料分析，同時藉由觀察這些異性戀之 HCV 血清學部分，以往發現這類非靜脈藥癮者感染 CRF07_BC 之個案，檢測其 anti-HCV 皆顯示為陽性(2009 年 4 件)，因此這些個案很有可能由於害怕刑責而謊報危險因子，拒絕透露有施打藥品之行為，但今年這件 CRF07_BC 異性戀個案其 HBC、HCV 皆為陰性，顯示 CRF07_BC 可能已開始轉移至異性性行為族群中，針對這些個案，實驗室將轉達權責疾病組進行合作調查病例並追蹤。

由於靜脈藥癮者也往往得到其他體液傳染疾病，本實驗室被動監測收集之 391 名 HIV 陽性檢體中，同時分析 HCV 和 HBV 血清學，顯示今年相較於 2008 年、2009 年陽性率已呈現下降趨勢，在 HCV 方面發現危險因子為靜脈毒癮族群，其陽性率為 89.7%、危險因子為同性性行為族群，其陽性率為 4.7%、在危險因子為異性性行為，其陽性率為 7.8%、在危險因子為雙性戀行為，其陽性率為 4.9%；相對在 HBV 方面發現在危險因子為靜脈毒癮族群，其陽性率為 25.6%、危險因子為同性性行為族群，其 HBsAg 陽性率為 12.3%、在危險因子為異性性行為，其 HBsAg 陽性率為 10.3%、在危險因子為雙性戀行為，其陽性率為 4.9%；另發現靜脈毒癮族

群合併感染 HCV 和 HBV 陽性率為 23%，明顯比異性性行為陽性率為 2.5% 或同性性行為族群陽性率為 2.13 % 來得高。從 HBV 的結果發現無論危險因子是由靜脈藥癮或是性行為散佈，其陽性率並沒有差異很大；但是在 HCV 方面，藉由靜脈注射散佈的 HCV 陽性比率則高達 89.7%，而同性性行為散佈的 HCV 陽性比率卻僅 4.7%，但異性性行為間的陽性率卻又達到 7.8%。先前本實驗室以 PCR 定序去分析 IDU 患者中感染 C 型肝炎之亞型，結果發現在 IDU 族群中感染 C 型肝炎之亞型除了原本在臺灣地區常見的 1a、1b、2a、2b 外，近幾年尚發現過去不曾在臺灣出現之亞型 3a、6a 或多重型別，以 HIV 陽性者 IDU 族群比例居多數，這是在非靜脈毒癮族群感染 C 型肝炎所沒有之亞型，表示此亞型目前是透過共用針頭、針具、稀釋液之行為在散佈，倘若我們在這些異性戀族群中發現其 HCV 基因亞型有 3、6 亞型，更可解釋此族群危險因子其實是靜脈藥癮途徑。

臺灣自 1984 年 7 月對 B 型肝炎帶原高危險群孕婦的新生兒施打 B 型肝炎疫苗，並再於 1986 年 7 月對全國孕婦之新生兒開始大規模施打 B 型肝炎疫苗已經大約有 22 年，B 型肝炎疫苗有效地阻斷了母子垂直傳染，幼兒帶原率已由未實施 B 型肝炎疫苗前之 10.5% 下降至 0.84% (台大張美惠等, 2005 年)。在本篇被動監測檢體若以 1984 年 7 月以後出生之後分析，有 8 名 HBsAg 呈陽性，經檢測基因型別分析 6 名，其中 B 亞型有 4 名，危險因子分別為 1 名雙性戀族群及同性戀族群有 3 名；C 亞型有 2 名，危險因子皆為異性戀族群。主動監測減刑計畫檢體於 1984 年 7 月以後出生有 1 名藥癮者 HBsAg 呈陽性，因本案非今年新增個案例，未進行檢測基因型別。這 8 名慢性 B 型肝炎帶原者究竟是 B 型肝炎疫苗抗體已消失抑或當年未施打 B 型肝炎疫苗，都尚需再調查。

由於 HIV 與 HBV 的傳染途徑相同，因此 HIV 感染者自然也容易同時

感染 HBV。經統計發現臺灣 HIV 患者有 21.4% 為血清 HBs Ag 表面抗原陽性，而慢性 HBs Ag 帶原率為 16.4%。由於 HIV 患者罹患慢性 B 型肝炎的比例與臺灣地區一般之盛行率（15%-20%）相近，顯見本土 HIV 患者的 B 型肝炎感染途徑，與一般族群相同，仍以母子垂直感染為主。HIV 與 HBV 彼此之間有無交互作用，患者同時感染 HIV 與 HBV 是否會影響病毒彼此的病程治療，在國外的研究並沒有一致的結論。過去愛滋病毒感染者的存活時間很短，而 HBV 感染後到發生併發症可能需要 20 年至 30 年。因此，兩者間相互影響的程度在短時間內很難觀察出來。因此唯有依賴長期的追蹤病患之臨床表現、肝功能、HBV 之病毒量、愛滋病感染之免疫狀況，才能有助於釐清此問題。眾所週知，臺灣感染 HBV 的患者大多數是經由母子間垂直感染或嬰幼兒時期感染，而歐美國家的 HBV 患者大多數是成年期的水平傳染。因此，兩者 HBV 感染後的潛伏期間並不同，自然對宿主的影響不同。近年來在臺灣因靜脈藥癮行為，感染 HIV 的人數急速增加，而臺灣又是 B 型肝炎病毒感染的高盛行區，未來處理合併感染 HIV 與 HBV 的患者必然是公共衛生及臨床醫療照護上極為重要的問題。

C 型肝炎基因亞型的分析中，由於使用的方法是利用 primer 去放大各型別特定的基因片段，所以在 HCV 出現多重感染的時候，又加上有些型別的片段大小很相近，會增加判斷時的困難程度，未來將想辦法解決此問題。而在本次實驗 HIV 陽性族群 C 型肝炎基因亞型的分析中，單一型別中感染 6a 亞型佔了 36% (13/36)，其次為 1b 佔了 22% (8/36)，1a 亞型佔了 14% (5/36)。之前我們實驗室以 PCR 定序去分析 IDU 患者中感染 C 型肝炎之亞型，結果發現在 IDU 族群中感染 C 型肝炎之亞型除了原本在臺灣地區常見的 1a、1b、2a、2b 外，近年陸續發現過去不曾在臺灣出現之亞型 3a、6a，相較於去年，今年皆出現在靜脈藥癮族群，藉由靜脈注射感染

到 6a 亞型。然而在 4 件多重亞型感染中，靜脈藥癮者族群有 3 件，異性戀有 1 件，表示多重感染 HCV 不同亞型絕大多數是藉由靜脈藥癮共用針具所快速傳播，由於亞型不同會導致治療上的成效差異，故減少共用針具行為仍是需再多加強衛教宣導。

近年來在臺灣，感染 HIV 的人數急速增加，而臺灣又是 B 型及 C 型肝炎病毒感染的高盛行區，藥癮族群因共用針具感染 HIV 與 HBV、HCV 的患者必然是公共衛生及臨床醫療照護上極為重要的問題，未來政府除了要負擔 HIV 雞尾酒療法之醫療成本，防止患者進展至 AIDS 病程外，需要面臨更龐大 HCV 陽性患者最後所造成的疾病，因此政府推動針具清潔交換計畫與美沙侖替代療法來阻斷此情況發生，方能避免嚴重之社會問題產生與減少國家經濟之負擔。

五、圖表

圖一、愛滋病毒結構與感染史(infection cycle)

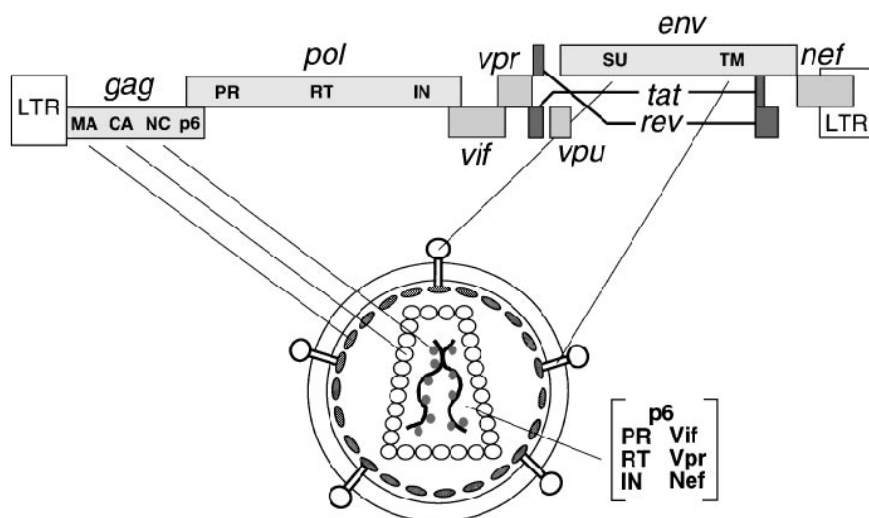
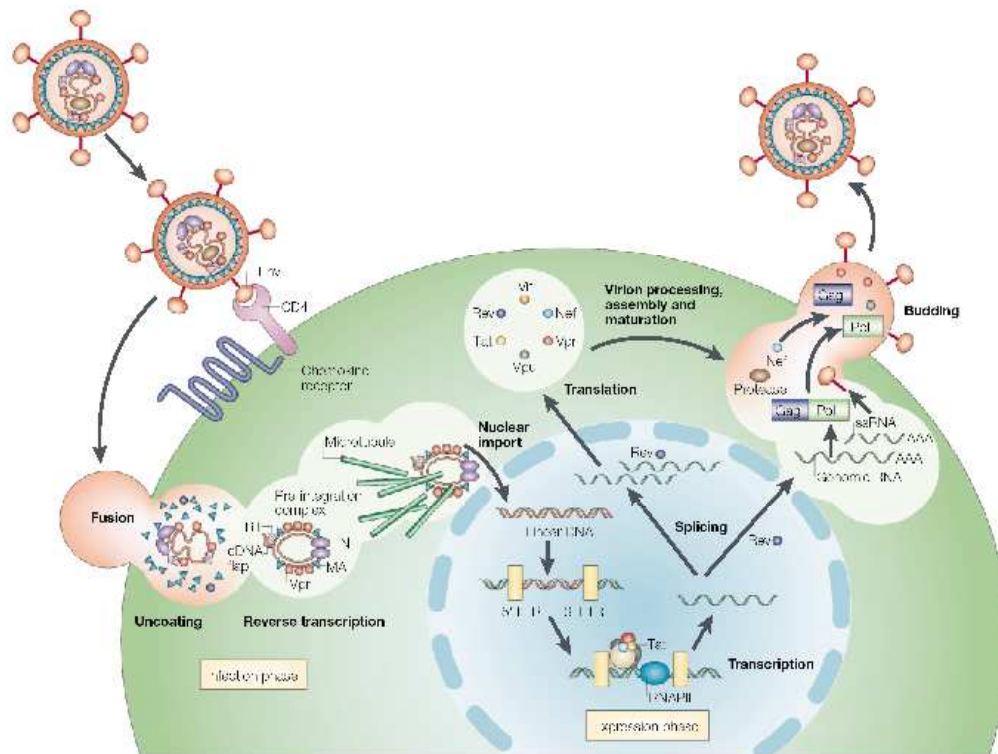
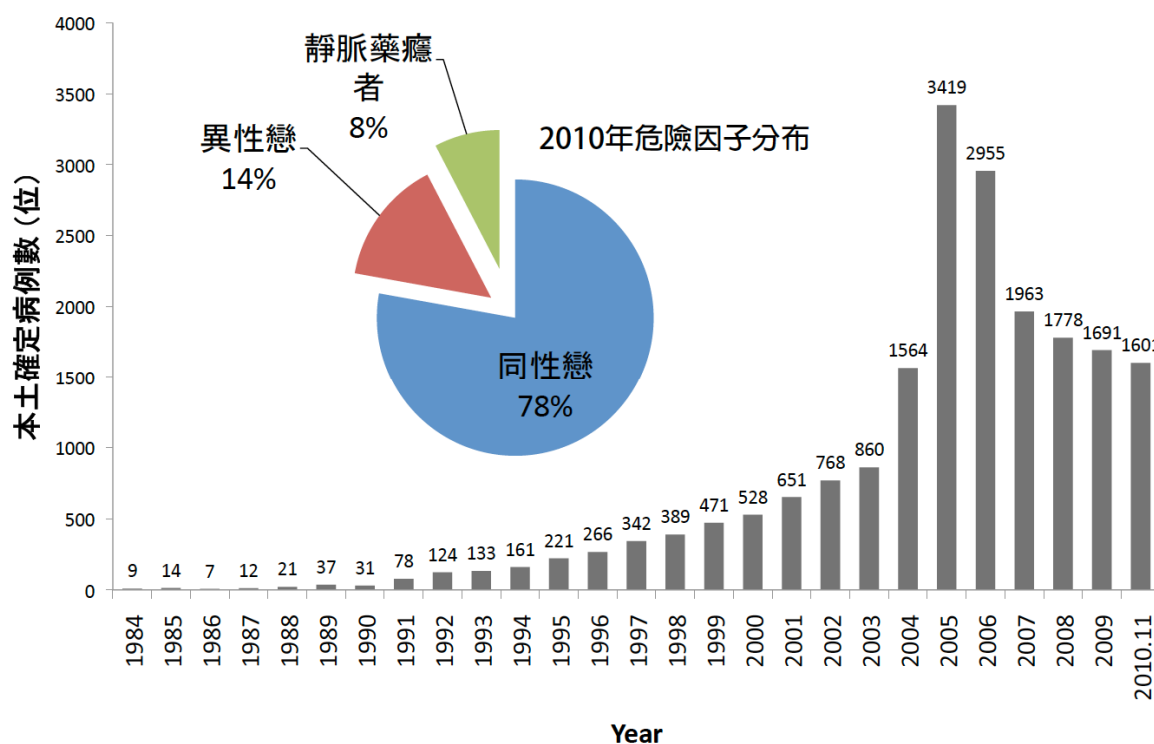
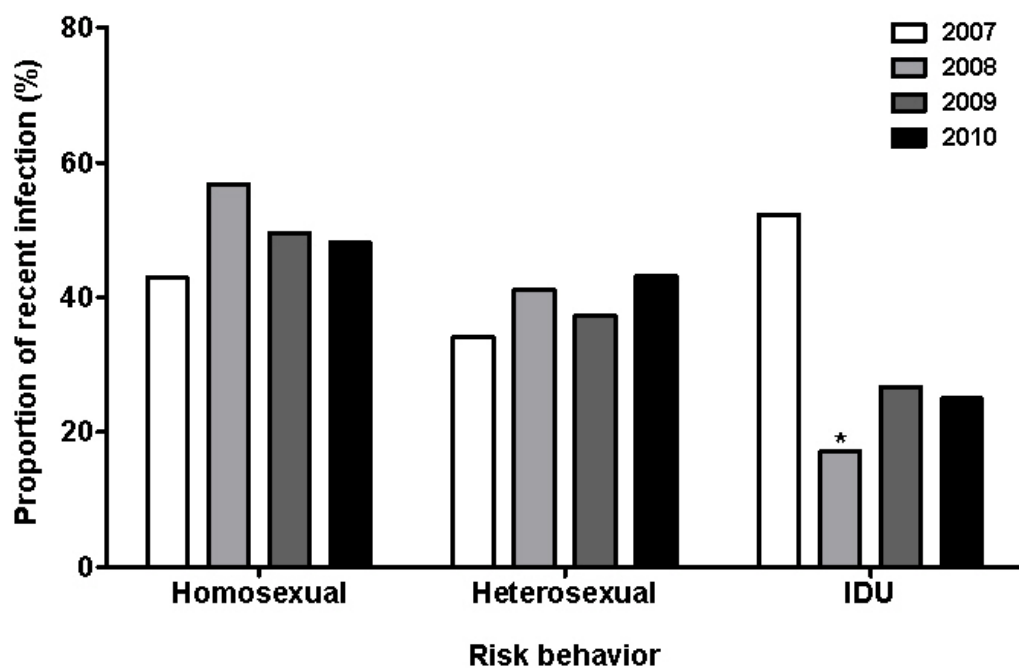


Figure 1 Organization of the HIV-1 genome and virion.

圖二、臺灣地區本國籍愛滋感染者歷年通報數及 2010 年危險因子分布



圖三、2007 至 2010 年臺灣新通報 HIV-1 感染者之不同危險族群之近期感染比例



表一、2010 新通報 HIV-1 感染者(Naïve)具抗藥性突變位點之個案之統計
分析與 odds ratio 分析

Table 1. Comparison of Characteristics between Patients Infected with HIV-1 Harboring Drug Resistance and Patients Infected with Wild-Type Virus in Taiwan, 2010

Characteristic	Total	SDRM*	Wild type	OR	95% CI
Patients	214	21 (9.8%)	193		
Age, mean years ± SD	31.0 ± 10.9	30.7 ± 13.7	31.7 ± 9.3		
Sex					
Male	209 (97.7%)	20 (95.2%)	189 (97.9%)	2.4	0.25-22.19
Female	5 (2.3%)	1 (4.8%)	4 (2.1%)		
Sociodemographic					
Northern	136 (63.6%)	15 (71.4%)	121 (62.7%)	0.7	0.27-1.95
Central	34 (15.9%)	2 (9.5%)	32 (16.6%)	1.9	0.43-8.78
Southern	37 (17.3%)	4 (19.0%)	33 (17.1%)	0.9	0.29-2.87
Eastern	2 (0.9%)	0 (0.0%)	2 (1.0%)		
Route of transmission					
MSM	161 (75.2%)	18 (85.7%)	143 (74.1%)	0.5	0.13-1.69
Heterosexual	39 (18.2%)	2 (9.5%)	37 (19.2%)	2.3	0.50-10.11
IDU	14 (6.5%)	1 (4.8%)	13 (6.7%)	1.4	0.18-11.63
Recent infection					
Recent	94 (43.9%)	8 (38.1%)	86 (44.6%)	1.3	0.52-3.30
Longterm (>155 days)	120 (56.1%)	13 (61.9%)	107 (55.4%)		
HIV-1 subtyping					
B	185 (86.4%)	19 (90.5%)	166 (86.0%)	0.6	0.14-2.94
CRF01_AE	13 (6.1%)	1 (4.8%)	12 (6.2%)	1.3	0.16-10.74
CRF07_BC	15 (7.0%)	1 (4.8%)	14 (7.3%)	1.6	0.20-12.54
D	1 (0.5%)	0 (0.0%)	1 (0.5%)		

*SDRM: Surveillance Drug Resistance Mutations

表二、2010 新通報 HIV-1 感染者(Naïve)之流病資料與亞型分析

Patients, N	Total 214	B 185	CRF01_AE 13	CRF07_BC 15	D 1	*P
Age, years						
Mean ± SD	31.0 ± 10.9	28.9 ± 8.4	48.3 ± 19.6	40.7 ± 9.6	39	**P<0.001
<25	69 (32.2%)	67 (36.2%)	1 (7.7%)	1 (6.7%)	0	
25-35	88 (41.1%)	81 (43.8%)	4 (30.8%)	3 (20.0%)	0	
36-45	40 (18.7%)	28 (15.1%)	2 (15.4%)	9 (60.0%)	1	
>45	17 (7.9%)	9 (4.9%)	6 (46.2%)	2 (13.3%)	0	
Sex						
Male	209 (97.7%)	185 (100.0%)	11 (84.6%)	13 (86.7%)	0	P<0.001
Female	5 (2.3%)	0 (0.0%)	2 (15.4%)	2 (13.3%)	1	
Sociodemographic						
Northern	139 (65.0%)	126 (68.1%)	5 (38.5%)	7 (46.7%)	1	0.019
Central	36 (16.8%)	27 (14.6%)	7 (53.8%)	2 (13.3%)	0	
Southern	37 (17.3%)	30 (16.2%)	1 (7.7%)	6 (40.0%)	0	
Eastern	2 (0.9%)	2 (1.1%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0	
Route of transmission						
MSM	161 (75.2%)	158 (85.4%)	3 (23.1%)	0 (0.0%)	0	P<0.001
Heterosexual	39 (18.2%)	27 (14.6%)	10 (76.9%)	1 (6.7%)	1	
IDU	14 (6.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	14 (93.3%)	0	

* Chi-square test, **ANOVA test.

表三、2010 新通報 HIV-1 感染者(Naïve)之抗藥性主要突變點統計

N = 214		
Mutation	Prevalence, N (%)	Drug affected
NRTI		
K65R	1 (0.5%)	ABC, DDI, FTC, 3TC, TDF
L74I	1 (0.5%)	ABC, DDI
F77L	1 (0.5%)	All, except TDF
T215DS	3 (1.4%)	D4T, AZT
K219QR	3 (1.4%)	D4T, AZT
NNRTI		
K101EP	3 (1.4%)	EFV, ETR, NVP
K103NS	9 (4.2%)	EFV, ETR, NVP
Y181C	1 (0.5%)	EFV, ETR, NVP
G190A	2 (0.9%)	EFV, NVP
P225H	1 (0.5%)	EFV
PI		
L90M	2 (0.9%)	All

*NRTI: nucleosidic inhibitor of reverse transcriptase; NNRTI: non-nucleosidic inhibitor of reverse transcriptase; PI: protease inhibitor;

3TC: lamivudine; ABC: Abacavir; ZDV: Zidovudine; d4T: stavudine; TDF: Tenofovir; ddi: Didanosine; DLV: Delavirdine;

EFV: Efavirenz; NVP: Nevirapine; NFV: Nelfinavir; SQV:

Saquinavir; RTV: Ritonavir; ATZ: Atazanavir.

表四、2007 至 2010 年臺灣新通報 HIV-1 感染者(Naïve)之抗藥性盛行率與亞型變化

Table 4. Time trends of transmitted drug resistance among patients with newly diagnosed HIV-1 infection in Taiwan, 2007-2010					
Characteristic	Total	2007	2008	2009	2010
Diagnoses newly, N	7033	1963	1778	1691	1601
Coverage by project, N (%)	651 (9.3%)	73 (3.7%)	169 (9.5%)	195 (11.5%)	214 (13.4%)
Drug resistance mutations					
any mutation	47 (7.2%)	5 (6.8%)	3 (1.8%)	18 (9.2%)	21 (9.8%)
any PI mutation	5 (0.8%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	3 (1.5%)	2 (0.9%)
any NRTI mutation	25 (3.8%)	3 (4.1%)	3 (1.8%)	10 (5.1%)	9 (4.2%)
any NNRTI mutation	24 (3.7%)	3 (4.1%)	0 (0.0%)	8 (4.1%)	13 (6.1%)
second line HAART drug	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Coverage by project, N (%)	897 (12.8%)	229 (11.7%)	259 (14.6%)	195 (11.5%)	214 (13.4%)
Subtyping					
B	579 (64.5%)	86 (37.6%)	162 (62.5%)	146 (74.9%)	185 (86.4%)
CRF01_AE	39 (3.4%)	8 (3.5%)	6 (2.3%)	12 (6.2%)	13 (6.1%)
CRF07_BC	275 (30.7%)	134 (58.5%)	91 (35.1%)	35 (17.9%)	15 (7.0%)
Other	4 (0.3%)	1 (0.4%)	0 (0.0%)	2 (1.0%)	1 (0.5%)

表五、第一線 HART 藥物治療失敗個案之抗藥性分析

Table 5. Patients failing HAART in Taiwan, 2009/11-2010/10	
Characteristic	2009/11-2010/10
Patients, N	40
HIV-1 Subtyping	
B	27 (67.5%)
CRF01_AE	7 (17.5%)
CRF07_BC	4 (10.0%)
C	1 (2.5%)
G	1 (2.5%)
Sample with resistance mutations	
any mutation	27 (67.5%)
any PI mutation	4 (10.0%)
any NRTI mutation	20 (50.0%)
any NNRTI mutation	21 (52.5%)
second line HAART drug	7 (17.5%)

表六、一線 HARRT 藥物治療失敗個案之各類抗反轉錄藥物之抗藥性盛行率

N = 40			
Table 6. Prevalence of resistance to antiretroviral drugs among Patients failing HAART in Taiwan, 2009/11-2010/10			
Drug Class	Prevalence, N		
NRTIs	20 (46.5%)	PIs	4 (9.3%)
3TC	19 (51.2%)	ATV	2 (2.3%)
ABC	11 (32.6%)	DRV**	2 (2.3%)
AZT	5 (11.6%)	FPV	3 (4.7%)
D4T	5 (11.6%)	IDV	2 (2.3%)
DDI	11 (32.6%)	LPV	1 (0.0%)
FTC	19 (51.2%)	NFV	3 (4.7%)
TDF**	5 (11.6%)	SQV	1 (0.0%)
		TPV**	2 (2.3%)
NNRTIs	21 (48.8%)		
DLV	20 (51.2%)	**second line HAART	
EFV	21 (53.5%)	drug in Taiwan	
ETR	18 (48.8%)		
NVP	21 (53.5%)		

表七、主動監測及被動監測檢體 HBV、HCV 血清學分析

	Total	主動監測		被動監測	同志族群	
		HIV(-)	HIV(+)	HIV(+)	HIV(-)	HIV(+)
No.	3683	2165	305	391	766	56
HBsAg (+)	562	358 (16.5%)	69 (22.6%)	49 (12.5%)	84 (11.0%)	2 (3.6%)
anti-HBs (+)	1892	1308 (60.4%)	165 (54.0%)		382 (49.9%)	37 (66.1%)
anti-HBc (+)	2372	1795 (82.9%)	250 (81.9%)		296 (38.6%)	31 (55.4%)
anti-HCV (+)	2131	1765 (81.5%)	300 (98.3%)	53 (13.6%)	10 (1.3%)	3 (5.4%)
HBsAg and anti-HCV Co- infection	389	301 (13.9%)	69 (22.6%)	16 (4.1%)	3 (0.4%)	0 (0%)

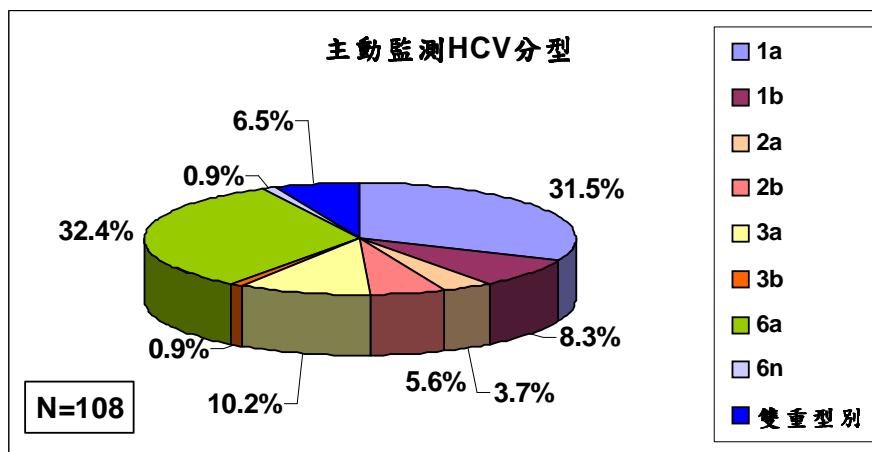
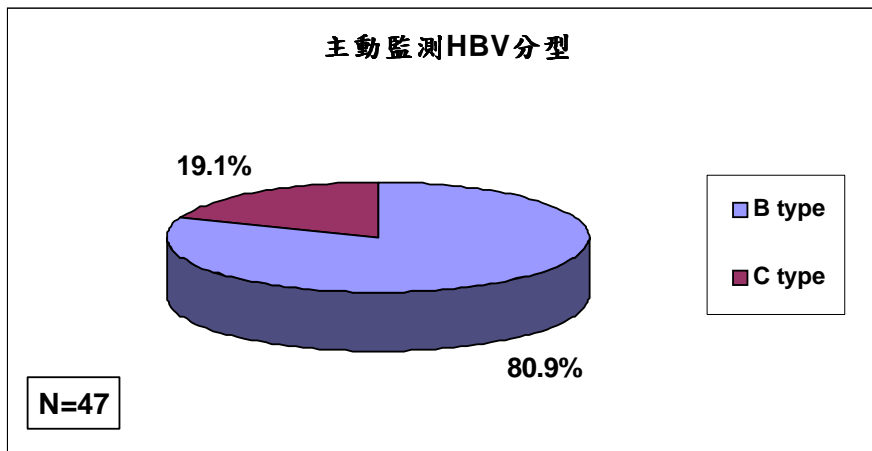
表八、被動監測 HIV(+)族群檢體 HBV、HCV 流行病學分析

	同性戀	異性戀	雙性戀	靜脈藥癮者	總計
總人數	234	77	41	39	391
性別					
男	234	67	41	35	377
女	0	10	0	4	14
年齡					
<30歲	154	43	27	10	234
31-50歲	76	21	12	28	137
>50歲	4	13	2	1	20
serology test					
HBsAg (+)	29(12.3%)	8(10.3%)	2(4.87%)	10(25.6%)	49
genotype B	18	4	2	5	29
genotype C	1	2	0	1	4
genotype D	0	0	0	1	1
anti-HCV (+)	11(4.7%)	6(7.8%)	2(4.87%)	35(89.7%)	54
單一亞型	7	2	0	23	32
多重亞型	0	1	0	3	4
Both (+)	5	2	0	9	16

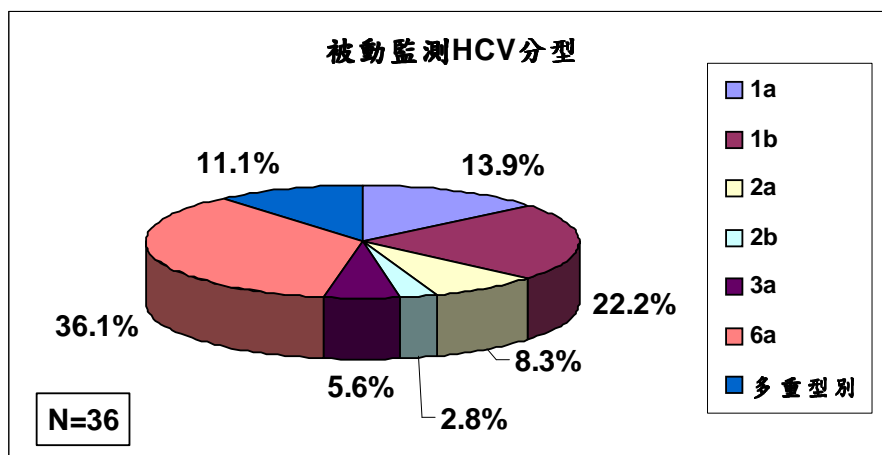
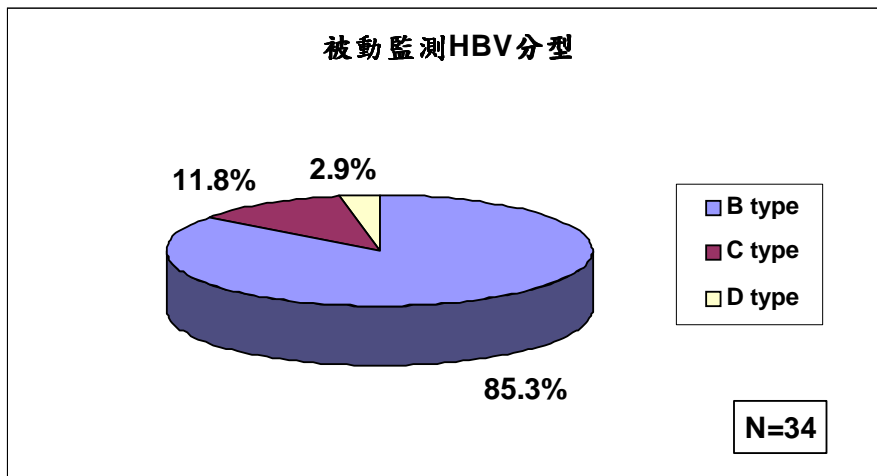
表九、2008年~2010年 HIV 陽性族群 HBV HCV 流行病學資料

		同性戀	異性戀	雙性戀	靜脈藥癮者	其他	總計
2008年	總人數	128	66	24	100	1	319
Serology & Genotype	HBsAg (+)	16(12.5%)	16(24.2%)	2(8.3%)	12(12%)	0	46
	type B	14	12	2	3		31
	type C	2	2	1	0		5
	anti-HCV (+)	18(14.1%)	35(53%)	1(4.2%)	96(96%)	0	150
	單一亞型	5	21	0	45		71
	多重亞型	2	1	0	18		21
	Both (+)	4(3.1%)	7(10.6%)	0	12(12%)	0	23
2009年	總人數	107	62	15	52	3	239
Serology & Genotype	HBsAg (+)	12(11.2%)	10(16.3%)	1(6.7%)	9(17.3%)	0	32
	type B	6	6	1	4		17
	type C	3	2	0	1		6
	anti-HCV (+)	3(2.8%)	10(16.3%)	0	47(90.4%)	1(33.3%)	61
	單一亞型	0	3	0	11	0	14
	多重亞型	2	3	0	27	1	33
	Both (+)	1(0.9%)	2(3.2%)	0	9(17.3%)	0	12
2010年	總人數	234	77	41	39	0	391
Serology & Genotype	HBsAg (+)	29(12.3%)	8(10.3%)	2(4.87%)	10(25.6%)	0	49
	type B	18	4	2	5		29
	type C	1	2	0	1		4
	anti-HCV (+)	11(4.7%)	6(7.8%)	2(4.87%)	35(89.7%)	0	54
	單一亞型	7	2	0	23		32
	多重亞型	0	1	0	3		4
	Both (+)	5(2.1%)	2(2.6%)	0	9(23%)	0	16

表十、主動監測 HBV、HCV 基因亞型



表十一、被動監測 HBV、HCV 基因亞型



表十二、主動監測 HBV 感染情況與地理區域分佈

主動監測B型肝炎感染情況

HBsAg	anti-HBs	anti-HBc	HIV(-) No. 2165	HIV(+) No. 305	Total No. 2470
N	N	N	162 (7.5%)	17 (5.6%)	179 (7.2%)
N	P	P	1092 (50.4%)	126 (41.3%)	1218 (49.3%)
N	P	N	203 (9.4%)	37 (12.1%)	240 (9.7%)
P	N	P	345 (15.9%)	69 (22.6%)	414 (16.8%)
N	N	P	346 (13.9%)	55 (18%)	401 (16.2%)

主動監測B型肝炎感染情況依地理區域分佈

HBsAg	anti-HBs	anti-HBc	北 No. 622	中 No. 720	南 No. 858	東 No. 245	離島 No. 25	Total No. 2470
N	N	N	56 (9.0%)	52 (7.2%)	55 (6.4%)	14 (5.7%)	2 (8.0%)	179 (7.3%)
N	P	P	297 (47.7%)	375 (52.1%)	410 (47.8%)	120 (49.0%)	16 (64%)	1218 (49.3%)
N	P	N	66 (10.6%)	68 (9.4%)	78 (9.1%)	26 (10.6%)	2 (8.0%)	240 (9.7%)
P	N	P	96 (15.4%)	123 (17.1%)	149 (17.4%)	43 (17.6%)	3 (12.0%)	414 (16.8%)
N	N	P	107 (17.2%)	98 (13.6%)	154 (18.0%)	40 (16.3%)	2 (8.0%)	401 (16.2%)

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.