

計畫編號：DOH96-DC-1303

行政院衛生署疾病管制局 96 年度科技研究委託計畫

愛滋病病毒抗藥性菌株監測計畫

研究報告

執行機構：財團法人國家衛生研究院/國立成功大學

計畫主持人：王憲威

研究人員：林錫勳，柯文謙，李欣純，柯乃熒，曾凡真，王瑞菁，林怡菁

執行期間：96 年 8 月 16 日至 97 年 8 月 15 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

	頁 碼
封面	
目錄	
摘要	
中文摘要	3
英文摘要	6
本文	
壹 前言	9
貳 方法及材料	14
參 結果與討論	19
肆 結論與建議	30
伍 參考文獻	38
陸 圖表	43

## 中文摘要 關鍵詞：愛滋病毒、抗病毒藥物抗藥性、基因序列定序與突變

本計畫針對南台灣愛滋病毒 (HIV-1) 帶原者對抗反轉錄病毒藥物 (anti-retroviral drugs) 的抗藥性 (resistance)，進行流行病學研究。於台南成大及高雄義大醫院，尚未使用此藥物者 101 人，或是已用藥但控制不佳者 10 人，使用 Bayer Trugene system 對病毒蛋白酶 (protease) 及反轉錄酶基因 (reverse transcriptase) 定序列 (nucleotide and amino acid sequences) 作病毒抗藥性基因型檢測 (genotyping)，並分析病毒基因亞型。

在尚未用藥的 101 病人中，49(48.51%)位是經靜脈藥物注射，35 人 (34.65%)是男同性戀者，15 人(14.85%)經異性戀性行為，男同性戀比起另兩組，明顯年紀小 7-12 歲( $p \leq 0.007$ )。43 位是 B 亞型，8 位是 CRF01\_AE，50 位是 CRF07\_BC。三亞型於三個感染途徑上有接近完全區隔(exclusive)的分佈，chi-square exact test  $p < 0.0001$ ：所有 35 位男同性戀都是 B，所有 49 位靜脈藥物注射者都是 CRF07\_BC，而全部 8 株 CRF01\_AE 都出現在異性戀者，只有異性戀一群三種亞型都有，但以 CRF01\_AE 佔多數 (53%)，顯示三危險群間的交差感染傳播還不算嚴重，但要繼續監測此分佈以早期發現危險群之交叉混合。代表臨床上嚴重程度的 CD4 counts/ml 與  $\log_{10}$  (HIV copies/ml) 平均值，都是在異性戀最不好，男同性戀次之，

靜脈藥物注射者較佳(all  $p \leq 0.01$ )。101 人中有 14 人=5+9(13.9%)至少對任何一個藥有抗藥性(resistance R, n=5)或可能抗藥性(probable resistance PR, n=9)；這數字 13.9%比起我們團隊的林錫勳之前所作類似的研究，2004 年在高雄幾家教學醫院所發現的 10.9% (23/195 treatment-naïve HIV-1 patients)，略為升高。若單就以有抗藥性(resistance n=5)，101 人中有 5%，這又比林錫勳之 2002-2005 年在高雄、台南所發現的 6.1%略低。三類藥中，以 NNRTI 有 4 人 resistance 最多，PI 有 7 人 probable resistance 最多，而有 2 人對 NRTI、NNRTI 同時有 R+PR。分別就三亞型中至少對一種藥有抗性(R+PR)，NRTI 有 1(2%) CRF07\_BC 是 R 及 2(4.7%) B 是 PR；NNRTI 有 2(4.7%)B 及 2(4%)CRF07\_BC 是 R，1(2.3%) B 有 PR；PI 有 1(2.3%) B 是 R，2(4.7%)B、4(50%)CRF01\_AE 及 1(2%)CRF07\_BC 有 PR。以有至少一抗藥性(resistance)，三亞型中，B 頻率 3/47 最高，CRF07\_BC 次之 2/50。

在已用藥的 10 病人中，7 位是 B 亞型，3 位是 CRF01\_AE。至少對任何一個藥的抗性分析，7 人有 resistance，包括 5(5/7=71.4%)B 與 2(2/3=66.7%)CRF01\_AE 亞型的人；另有 1CRF01\_AE 的人有 probable resistance。3 人對 NNRTI 單一類有 resistance，2 人對 NNRTI 與 NRTI 兩類有 resistance，1 人對三類藥皆有 resistance/probable resistance。三類藥

中，以 NNRTI 的抗藥性比例 7/10 最高，NRTI 的抗藥性比例 3/10 次之。在全部 111 人中，也發現在非 B 亞型的 protease gene 似乎存在一些被 Trugene system 判為“次要突變”(secondary mutations)導至可能抗藥性(probable resistance)，但有可能是基因多型性(genetic polymorphisms)。

總括來看我們的結果顯示 B 亞型與 NNRTI 似乎會有較高頻率的抗藥性，建議這類的病人需要更頻繁的被監測抗藥性的突變。病毒抗藥性、基因分析與病患特徵結合分析，可及早發現感染危險途徑、特定族群有較高抗藥性等的流行病學關聯性。定期監測相關趨勢與資料，可為防疫政策之參考。

## **ABSTRACT**

**Keyword: HIV-1, resistance to anti-retroviral drugs, gene sequences and mutations.**

In 2 HIV treatment centers in southern Taiwan, NCKU-H and EDa-H, our project studied 101 treatment-naïve HIV-1 infected and 10 ART-treated patients but with suboptimal viral suppressions for the pattern of antiretroviral drug resistance. HIV-1 RNA in plasma was tested for genotypic mutations and resistance with TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit and OpenGene DNA Sequencing System (Bayer, USA). With the protease and reverse transcriptase gene sequences from results by this kit/system, each patient's major HIV-1 geno-subgroup can also be identified.

Based on self-identified HIV infection routes among the 101, 35 (34.7%) were through MSM- and 15 (14.9%) were through hetero-sexual behaviors, and 49 (48.5%) were through IDU. The MSM group in average is 7-12 year younger than the other 2 risk groups ( $p \leq 0.007$ ). The distribution of the subtypes among the 101 was 43 B, 8 CRF01\_AE and 50 CRF07\_BC, and it is highly correlated with the distribution of the risk-group: all 35 MSM were B subtype, all 49 IDU were CRF07\_BC, and all CRF01\_AE were detected in the heterosexual group. Such almost exclusive distribution ( $p < 0.0001$  by  $X^2$  exact test) implied that one subtype is predominant or prevalent in each risk-group except in the heterosexual and the cross-group spread probably is not yet severe. However, such distribution and trend should to be monitored continuously for the early detection of the inter-mixture and cross-transmission among different risk populations. Averages of two clinical parameters, CD4 counts/ml and log<sub>10</sub>

(HIV copies/ml), as the surrogate for the HIV-1 disease progression, were both the worse among the heterosexual, second in the MSM and the best in the IDU (all  $p \leq 0.01$ ). For the drug resistance pattern among the 101 treatment-naïve persons, 5 and 9 harbored mutations that conferred resistance (R) and probable resistance (PR) to at least one NRTI, NNRTI or PI, respectively. When analyzed by 3 categories of drugs, 1 R and 2 PR to any NRTI, 4R and 1PR to any NNRTI, and 1R and 7PR to any PI were found. A total of 4 naïve persons (4%) showed resistance to at least one NNRTI, which gave the highest resistance rate among the 3 drug categories, and 2 persons had R or PR to both NRTI and NNRT. In each subtype, 7/43 (16.3%) B, 4/8(50%) CRF01\_AE and 3/50 (6%) CRF07\_BC were R or PR to any drugs. When stratified by drug categories and subtypes, 1 (2%) CRF07\_BC was R and 2 (4.7%) B were PR to any NRTI; 2 (4.7%) B and 2 (4%) CRF07\_BC were R as well as 1 (2.3%) B was PR to any NNRTI; 1 (2.3%) B was R as well as 2 (4.7%) B, 4 (50%) CRF01\_AE and 1 (2%) CRF07\_BC were PR to any PI. Among the 3 HIV-1 sub-genotype, B subtype has the highest percentage, 3/47=6.4%, of resistance-related mutations as to any drug, followed by CRF07\_BC, 2/50=4%.

Among the 10 treated patients with suboptimal virological control, 7 were B subtype and 3, CRF01\_AE. Seven of them showed resistance to at least one ARV drug, including 5 patients (5/7=71.4% with this subtype) with B subtype and 2 with CRF01\_AE (2/3=66.7%). One with CRF01\_AE had probable resistance to one drug. Three had resistance to only NNRTI, 2 to both NNRTI and NRTI, and 1 to all 3 categories of ARV. Among the 3 drug categories, NNRTI had the highest percentage of resistance, 7/10, followed by 3/10 for NRTI. When all 111 treated or naïve HIV-1 patients analyzed together, we found

that in the Protease gene for HIV-1 of the non-B subtypes, there may exist some genetic polymorphisms that were considered as secondary mutations when the drug resistance definition of the B subtype was the only algorithm considered. We therefore suggest to expand the current investigation to clarify whether these B-type secondary mutations also confer any probable resistance to PI for the 2 endemic subtypes in Taiwan, CRF01\_AE and CRF07\_BC, by clinical studies or in vitro tests

Overall, our data suggested that B subtype and NNRTIs were associated with higher percentage of drug resistance as compared to other subtypes or other categories of drug. We therefore recommend that patients of these characteristics should be monitored more often for the emergence of resistance-related mutations. We provided the first-line information to the magnitude of problems and associated factors on HIV-1 drug resistance. Continual surveillance and epidemiology will be essential to the prevention of HIV transmission and good health care of the HIV infected population.



# 本文

## (壹) 前言

### 背景及現況

愛滋病毒 (HIV-1) 感染在台灣有越來越嚴重的趨式(Chen and Kuo 2007)，但抗病毒藥物治療 (antiretroviral therapies) 已有機會控制愛滋病毒帶原者的免疫不全和相關疾病，並延長其壽命，相對地患者必需長期的接受藥物治療(May, Sterne et al. 2006; Simon, Ho et al. 2006)。對於使用抗病毒藥物相關的深入檢驗，如定基因亞型、抗藥性基因突變分析(drug resistance genotyping) 等，由於技術的困難度以及所需設備成本昂貴，許多都是沒有分析，或等到採檢時間已過數年後，才在研究型實驗室完成，但已失去了幫助防疫甚至臨床治療的重要時效性(Chen, Huang et al. 2001)。複合式抗愛滋病毒藥物 (combined antiretroviral drugs) 或雞尾酒療法 (highly active antiretroviral therapies, HAART) 雖可有效降低病毒量並控制病情、避免快速惡化(d'Arminio Monforte, Sabin et al. 2005; May, Sterne et al. 2006; Simon, Ho et al. 2006; Zolopa 2006; NIAID 2007)，但研究報告指出約只有半數的病人能達到理想的病毒量控制 (optimal virological suppression)，另外半數病人的 HIV-1 在不完全抑制的情形下，可能因為藥物所造成的壓力，逐漸篩選出有抗藥性 (drug resistance) 的株群。

而在病人病毒株群的篩檢方面，目前臨床上的共識是在開始使用抗病毒藥物前，必需要先檢驗出病人病毒株已存在抗藥性基因突變的情況，以選擇最有效的藥物，避免無謂用藥(Dybul, Fauci et al. 2002; DHHS 2007)。並且在已使用抗病毒藥物的病人，需追蹤其血中病毒量，如有控制不佳情形，可檢驗 HIV-1 的抗藥性基因，臨床醫師才能根據每個案例及時調整給予有效的藥物。事實上，根據美國健康部最新公佈的“抗愛滋病毒藥物成年人使用準則”，就已經建議在新感染的案例，要考慮作抗藥性突變的檢驗(DHHS guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents, Oct 6, 2006)。這項建議的部份原因是在於帶有抗藥性突變的 HIV-1 株之傳播力(infectivity)與沒抗藥性株的感染傳播能力是一樣(Zolopa 2006; DHHS 2007; Smith, Moini et al. 2007)，早期發現帶有抗藥株的感染案例，將對公衛防疫及持續密集追蹤治療這些病人有所幫助。

在台灣地區有限資料顯示，於民國九十三年台南、高雄地區約有 9% 的未用藥的愛滋帶原者，已存在至少一個抗藥性的高風險基因突變(Lin, Liu et al. 2005)；在已使用抗病毒藥物的病人身上情形就不清楚了。但抗藥性基因檢驗在台灣並不是常規項目，所以醫師通常沒有病毒株檢驗數據來作為給藥的依據。尤其台灣目前雞尾酒療法由政府以全部免費的方式提供給愛滋病人，平均每個病人一年的藥物費是三十五萬台幣，花費極為昂貴，如果

沒有配套地檢測病毒株的抗藥性，醫師在使用藥物上將無法有清楚的實驗數據來作正確判斷。誤用病毒已有抗藥性的藥物不但浪費，病毒株的抗藥性情形也可能因此更加惡化。另外，不同基因亞型或株的 HIV-1 病毒對於各種抗病毒藥物的有效感受性（susceptibility）和會發生抗藥突變的情形存在著差異(Mascolini, Boucher et al. 2007；NIAID, 2007 #171; UCSF 2007)，目前已知基因突變與抗藥性表現型（phenotype）的資料庫大多是根據在西歐、北美所盛行的 B 亞型所建立出來的(Stanford University HIV Drug Resistance Database, <http://hivdb.stanford.edu/index.htm>)，而在亞洲地區特別流行或新發現的重組株 CRF01\_AE，CRF07\_BC，CRF08\_BC 等，其基因型與表現型關聯的資料非常有限(StanfordUniversity 2007)。在 B 亞型所確認之抗藥突變點，未必能全部同理適用到其他亞型上。因此我們也有必要開始收集並建立台灣本土 HIV-1 株群的抗藥性基因突變的資料庫。

近年來發現南台灣地區愛滋病的盛行率有上升的趨勢，可能與注射藥癮（injection drug users）間病毒的快速傳播有關(Chang, Sheng et al. 2006; Chen, Lan et al. 2006; Lin, Shih et al. 2006; Lin, Lan et al. 2007)。抗愛滋病毒藥物（anti-retroviral drugs）是目前控制病毒量並延緩病情最佳醫療方式(d'Arminio Monforte, Sabin et al. 2005; May, Sterne et al. 2006)，但病毒抗藥性（drug resistance）的分佈情形與發生早晚為此治療的成敗關鍵(WHO

2007)。因此有必要監測對不同抗病毒藥物的抗藥性情形(Zolopa 2006)，在病患個人層面可助於選用正確藥物，在公共衛生或人群層面可了解病毒株抗藥性盛行情形，以幫助發展防疫政策或開發新藥。

## 研究問題

本計劃書將與南台灣兩個愛滋病指定醫院，台南成大醫院及高雄義大醫院，由民國九十六年下半年開始這幾項愛滋病毒實驗檢驗，包括抗病毒藥物之抗藥性基因突變定型、基因序列分析（sequence relationship analysis）、新感染發生情形等，目的是藉這兩大醫院的情況對南台灣地區的愛滋病毒的抗藥性分佈、嚴重程度及相關流行病學（如危險因子之特徵、趨勢等）有所了解。

## 目的

針對這些議題，本計劃目的在探討南台灣地區的愛滋病毒相關流行病學。尤其是抗藥性的檢驗及監測，以了解其特徵、趨勢等，工作及研究目標可分為

1. 在南台灣的兩個愛滋病指定治療院所，台南成大醫院及高雄義大醫院開始收集檢驗愛滋病毒（HIV-1）帶原者的血液檢體，以研究愛滋病毒下列的相關資料，包括病毒株抗藥性的基因型分析（genotyping）與及流

2. 即時提供愛滋病毒抗藥性檢驗結果給臨床醫師，以幫助選擇正確抗病毒藥物。
3. 將通報上述檢驗之結果與提供被測試病人之資料和檢體給疾病管制局，瞭解台灣人口或季節性之感染新發生率和流行概況，以幫助疾病管建立相關資料和檢體庫，以達成監控疫情之目的。
4. 收集南台灣本土愛滋病毒株，建立當地病毒株庫，並發現特殊之本土株與建立其抗藥相關突變基因資料庫。

## (貳)方法及材料：

### 感染個案來源

(一) 檢體來源：已確認愛滋病感染（經 ELISA 發現及 western blot 確認者）病患，並符合下列情形之一的病人，將採其血清

- a. 考慮第一次開始使用抗病毒藥物（treatment-naive）的病人
- b. 已用抗病毒藥物但病毒量控制不佳的病人

因首次將用病的病人身上病毒株的分佈與生態較能代表在一般與新感染個案的情形，在收案時會以第一項為優先。

(二) 收案地點：成大醫院、義大醫院的愛滋病毒感染病患，合乎臨床採檢定義者

(三) 實驗室採檢件數：總共 110 件/年

1. 新開始使用（treatment-naive）抗病毒藥物的病人：100 件
2. 已開始使用藥物一段時間，但未達理想病毒量控制且醫師考慮換藥的病人：10 件

根據過去的幾年的經驗，這兩家醫院收的案例在台南、高雄、屏東等南台灣縣市，約佔半數。再以檢測 110 人次來算，預估本次計畫的採樣人口代表性約可

佔南台灣愛滋病毒新近感染病患的 25%。詳細計算請見 (參)結果與討論中之採樣之代表性一段。

## 實驗室檢測方法

### (一) 抗藥性檢測方法

方法介紹及簡述：我們採用 Bayer 公司的 TRUGENE HIV-1 Genotyping，這組系統包含 TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit 和 OpenGene DNA Sequencing System。內容包括有試劑，儀器和軟體，軟體除了可以將病毒的反轉錄酶及蛋白酶基因序列讀出，還包含一套標準化判讀系統，可以將所有目前藥物的抗藥性判讀(Grant, Kuritzkes et al. 2003; Kuritzkes, Grant et al. 2003; Germer, Vandenameele et al. 2004)。這個系統在 2001 年 9 月通過美國食品藥物管理局核准，成為第一個通過核准的抗反轉錄病毒基因型抗藥性試劑。通過美國食品藥物管理局核准的意義代表肯定這個方法的正確性及穩定性，同時將來也可以使基因型抗藥性的判讀更標準化。它的報告包含蛋白酶(protease)及反轉錄酶(reverse transcriptase)兩段基因序列突變的位置以及對 FDA-approved 三類藥物的抗藥性報告：核苷類反轉錄酶抑制劑(nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NRTI)，非核苷類反轉錄酶抑制劑(non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NNRTI)，與蛋白

酶抑制劑 (protease inhibitor, PI)。抗藥性的判斷建立在法則基礎 (rules-based), 所謂的法則基礎則依據 1) 人體的病毒量上的反應 (virological response), 即臨床表現 (clinical response) 及 2) 體外細胞培養 (in vitro culture system) 時病毒對藥的敏感度, 即表現型 (phenotype) 的試驗結果。

因一直有抗反轉錄病毒新的基因突變的發現, 而突變造成的後果如病毒對藥的敏感度與臨床上使用藥物的失敗率等, 此類相關的研究非常大量且改變迅速。因此判讀突變抗藥的程度是非常重要的, 需要一群有經驗專家討論整合後的共識才能作為判讀標準。而本套 TRUGENE HIV-1 Genotyping 系統定期修訂判讀軟體, 可以解決這方面問題 (Gale, Kan et al. 2006; Ribas, Heyndrickx et al. 2006)。這套系統的判讀軟體約每經過六個月更新以基因型判讀抗藥性的標準流程, 此乃由一個獨立的有相關領域的專家組成的委員會根據最新的研究結果作修訂。

### **TRUGENE 實驗步驟敘述如下**

1. 使用 QIAamp blood kit (Qiagen, Chatsworth, CA) 或 Roche High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) 由 100-300ul 血清或血漿中抽 HIV 病毒 **RNA extraction**。
2. 以反轉錄與聚合酶聯鎖反應 (**RT-PCR**) 複製病毒兩段基因: 將使用 the TruGene HIV-1 genotyping assay (version 1.5 kit) (Bayer Diagnostics) 所



3. 作 PR 及 RT 兩段基因的定序，CLIP reaction，sequencing: 包括膠的製作及以類似 ABI Prism Big Dye method 作 PR 及 RT 的基因定序。

Cycle sequencing of two noncontiguous regions of this 1.3 Kb fragment is performed, generating a 288-bp sequence of the PR gene (codons 4 to 99) and a 630-bp sequence of the RT gene (codons 36 to 247). In the sequencing reaction, the forward and reverse primers are labeled with Cy5.0 and Cy5.5, separately, and mixed with distinct dideoxynucleotides in a single tube. The sequencing products are analyzed in a MicroCel cassette gel for rapid electrophoresis on a Long-Read Tower sequencer. ◦

4. 判讀抗藥性基因突變結果：OpenGene DNA Sequencing System 連結所

產生的基因與標準基因做比較讀出突變位置在經由軟體判讀結果；

The OpenGene (Bayer Diagnostics) software system edits and aligns the resultant data, generates a protein translation of the sequence, and determines the presence of antiretroviral resistance-conferring

polymorphisms. 已經 OpenGene software system 所判讀包括的每一個

胺基酸序列突變位置也一併顯示在結果中，以便對每一點再另作統計分析。

## (二) 其它實驗步驟

對於部份血清或血漿的體積較為大量的檢體，我們也嘗試使用自家設計的引子，看是否也能偵測到與 **TRUGENE kit** 同樣的 PR 及 RT 兩段基因 RT-PCR 產物。本實驗利用 High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Applied Science) 萃取 HIV-1 病毒核酸，利用專一性病毒基因引子和 MMLV 反轉錄酶 (Invitrogen) 於 37°C 反應 50 分鐘，合成 HIV-1 第一股的 cDNA，接著以巢式聚合酵素連鎖反應 (Nested-PCR) 方式分析，選用 GenTaq Plus™ DNA polymerase (GeneMark)。第一次 PCR 的引子組 (Outer Primer)，反應 25 個循環：94°C/40sec；50°C/40sec；72°C/3min。第二次 PCR 引子組 (Inner Primer) 反應 30 個循環：94°C/40sec；53°C/40sec；72°C/1min 40sec。

相同地，由此所得之胺基酸序列會與由 **TRUGENE kit** 所得之序列作比較。

Primer list	
Reverse Transcription Primer	5-CACCTGCCATCTGTTTTCCAT-3
Outer Primer	5-ATGATGACAGCATGTCAGGGAGT-3
	5-GAATACTGCCATTTGTACTGCTGTC-3
Inner Primer:	5-CCCTCARATCACTCTTTGGCA-3
	5-GTCTTTCCCATATTACTATGCTTTC-3

## (參)結果與討論

此次於成大醫院、義大醫院收案的愛滋病毒感染病患，其中 101 位尚未使用抗反轉錄病毒藥，10 位已使用抗反轉錄病毒藥並於病毒量上呈現控制不良的病人。兩群的結果不適合併，分述如下。

### (一) 尚未使用抗反轉錄病毒藥的病人

#### 收案病人之背景與臨床資料分析

101 位年齡分佈平均為 34.49 歲，中數為 33 歲，25%-75% quartile (interquartile range, IQR) 為 27-41 歲；男 95 人，女 6 人。行為與感染源之調查是以病人被診斷出感染後門診時，醫師、護理師口述”是否使用非法注射藥物”以及“性行為模式、對象與傾向”等相關問題，試圖了解病人之最可能感染途徑，excel 檔所附的”risk factor”即為訪談得到的綜合結果；僅有少部份病人詳細回憶危險源與行為，無法有效進一步分析傳染源。在判定危險因子時，是先確定有無注射行為，無者再判斷性傾向與模式。其中注射者多由特定管道如監所、勒戒所轉介到我們門診，外加觀察四肢上有無經常注射的痕跡，於我們採樣病人中有此特徵者，符合”有使用非法注射藥物”問題的正確度為 100%；同性戀性行為是配合病人外型舉止與回答性傾向等來變識，無者並堅決否認同性性行為者最後再考慮異性戀性行為。部份病人還經個管護理師再次訪談衛教才較為確認其危險因子，但仍無法變識全部 111 人中的 3 人 (=2.7%)

的”最可能感染 HIV 途徑”。可能感染愛滋病毒途徑：49 位(48.51%)是靜脈藥物注射，35 人(34.65%)判斷為是男同性戀者，15 人(14.85%)歸為是經異性戀性行為，兩人拒答或無法判斷 (Table 1)。此三組感染途徑的年歲分佈平均分別為男同性戀 (men who have sex with men, MSM)28.85，異性戀 (heterosex) 41.2，靜脈藥物注射者 (injection drug users, IDU) 36.42 歲；年歲 IQR 分別為男同性戀 23-32，異性戀 27-53，靜脈藥物注射者 31-43。若以 T-test 兩兩比較組間的平均值，男同性戀比起異性戀或靜脈藥物注射者，都明顯的年紀較小 ( $p=0.007$  for MSM vs. heterosex;  $p<0.0001$  for MSM vs. IDU)，而異性戀與靜脈藥物注射者的年紀差別未達統計顯著 ( $p=0.1$ )。因大多數本次研究病人抽血當次都是距離初次被診斷 (first been diagnosed) 為愛滋病毒感染一年內，年齡分佈於不同感染途徑群組(risk group)間有明顯高低不同，男同性戀感染愛滋病毒比其它兩組平均年輕 7-12 歲，暗示這些人將來要使用抗反轉錄病毒藥及相關醫療照顧的時間可能會長，而且這些 20-30 歲正值生產力的感染者若未及時就醫，也對社會造成損失。

在常規會檢測的臨床資料上，本次研究有病人抽血當次的 CD4 cell (CD4 counts/ml) 與 HIV 於血清的病毒量 (viral copies/ml)，病毒量轉換成以 log10 為單位，得正常分佈以利統計分析 (Table 1)。這 101 位的 CD4 counts/ml 平均為 418.95，25%-75% quartile (interquartile range, IQR) 為 286-555；log10 (HIV

copies/ml) 平均為 4.35, IQR 為 3.89-4.81。當 CD4 counts/ml 與 log<sub>10</sub> (HIV copies/ml) 依照前述三組感染途徑分別分析並每兩組比較, 皆可發現統計上明顯的差異。CD4 counts/ml 平均值與 IQR 於男同性戀為 352.09 與 191-454, 異性戀為 185.75 與 22-417, 靜脈藥物注射者為 529.67 與 390-577; 每任意兩組以 T-test 比較平均值所得的 p-value 都是有統計顯著 (p=0.0001 to 0.01)。log<sub>10</sub> (HIV copies/ml) 平均值與 IQR 於男同性戀為 4.51 與 4-4.84, 異性戀為 5.13 與 4.79-5.36, 靜脈藥物注射者為 3.97 與 3.51-4.35; 以 T-test 每任意兩組比較平均值所得的 p-value 也都是有統計上顯著的差別 (p=0.0001 to 0.013)。此二數據以臨床觀點來說, 都是在異性戀中最不好, 男同性戀次之, 靜脈藥物注射者較佳。於不同可能感染途徑群組(risk group)間的 CD4 cells 和 HIV 病毒量高低可暗示可能是因三組一開始感染病毒量的高低與基因亞型, 病人年齡差距或是初次被感染後(first been infected), 到確診為愛滋病毒感染的時間間隔 (interval between first infected to first diagnosed)長短不同所造成的。

### 病毒基因型別分析

使用 TRUGENE kit 所得的 PR 及 RT 兩段基因的核酸序列, 與幾個愛滋病毒相關網站基因資料庫相比, 可得知每一病人血清中所測到最主要的 HIV-1 基因型別以作分析。網站有 HIV 基因資料庫 <http://www.hiv.lanl.gov/content/index> 和 <http://www.bioafrica.net/virus-genotype/html/index.html>, HIV 抗藥資料庫

<http://hivdb.stanford.edu/index.html> 和 <http://www.hivfrenchresistance.org>。於

101 位尚未用藥的病人中，43 位是B亞型，8 位是CRF01\_AE亞型，50 位是CRF07\_BC亞型。三種不同亞型於三個感染愛滋病毒危險途徑分佈上有接近完全區隔(exclusive)的關係(Table 1)：所有 35 位男同性戀都是B，所有 49 位靜脈藥物注射者都是CRF07\_BC，而全部 8 株CRF01\_AE都出現在異性戀者，三種危險組群中只有異性戀一群三種亞型都出現過，但CRF01\_AE佔多數(53.33%)。以chi-square exact test統計分析危險途徑與亞型的分佈，得到 $p < 0.0001$  非常顯著的關聯性。這個區隔性分佈的結果暗示，目前在南台灣的愛滋病毒傳播感染的危險途徑或族群與主要病毒亞型應該還是個別分開的，除了在異性戀的性行為者可能有多重傳播感染源，而另兩大危險族群都各自由單一種的亞型所至，三組間應無明顯的交叉感染傳播。而異性戀中所看到的多種亞型可能有另外的解釋，其中可能有男同性戀及靜脈藥物注射者因忌諱社會觀感，謊報自己由異性性行為感染，所以多種亞型分佈的狀況可能並不如所見的高。所發現的區隔性分佈還算是可接受的，但將來仍需持續監測傳播感染的途徑、族群與病毒亞型間的關聯性，尤其如果發現有男同性戀及靜脈藥物注射者兩族群交叉感染傳播，或異性戀者多型分佈提高時。

### 抗藥性結果分析

OpenGene reading System 所讀出的對每一個藥結果分成‘抗藥’resistance

(於檔案中標 R)，‘可能抗藥’ probable resistance (PR)，與‘無抗藥’ neutral(N)；抗藥性相關的胺基酸序列突變分成‘主要’ major or primary mutations (於檔案中標紅色) 與‘次要’ minor or secondary mutations (白色)。對抗藥性的定義是約每 3 至 6 個月更新的，有些藥的判讀抗藥性會因此在測試時間前後而改變，有時還會有舊款藥的移除或新藥的加入等，所以每個病人並不一定有全部的新舊藥)抗藥性結果，所附資料庫(於檔案中 attached excel file)中是以測試當時 OpenGene reading System 所給的結果彙整而成。

於 101 位尚未用藥的病人中，有 14 人=5+9(13.9%)至少對任何一個藥有抗藥性(5 人)或可能抗藥性(9 人)(自此後簡稱“抗性”，i.e. resistance R+ probable resistance PR)。如分成所抗的藥類來看，有 3 人=1R+PR2(2.97%)、5 人=4R+1PR(4.95%)、或 8 人=1R+7PR(7.92%)分別對至少一種屬於 NRTI、NNRTI、或 PI 類的藥物有抗性。三類藥中，以 NNRTIs 的抗藥性(resistance)人數 4 人最多，這與已知的 NNRTIs 最易產生抗藥性是相符合，如果將抗藥性(resistance)或可能抗藥性(probable resistance)合併，則以 PIs 的 8 人最多。因有單純有抗藥性或可能抗藥性的人數分別都不高，以下的分析將把抗藥性或可能抗藥性兩者合併稱“抗性”(R+PR)。14 人中有 2 人是對兩類的藥- NRTI、NNRTI-同時有抗性，12 人是對單一類的藥有抗性。在每一類藥物中，因作用機制類似，某些單點突變能造成對那一類型多種的藥產生抗性，例如 M41L、D67N、

K70R 等的 thymidine-associated mutations (TAMs) 對多種 NRTIs 有抗性；14 人中有 9 人是對至少兩種的藥有抗性，只有 5 人的突變是對單一藥物產生抗性。如果以病毒基因亞型分別分析，至少對一種藥有抗性(R+PR)的結果為：43 位 B 亞型中 7 個(16.28%)有、8 位 CRF01\_AE 亞型中 4 個(50%)有、50 位 CRF07\_BC 亞型中 3 個(6%) 有，此分佈是有統計上的不同  $p=0.003$ 。如果將抗藥性與可能抗藥性分別看，有 3 位 B(6.98%) 與 2 位 CRF07\_BC(4%)對一類藥有抗藥性；另外有 4 位 B(9.3%)、1 位 CRF07\_BC(2%)與 4 位 CRF01\_AE(50%)對一類藥有可能抗藥性。三類藥物分別分析，就 NRTIs 來看，1 位(2%) CRF07\_BC 有抗藥性及 2 位(4.65%) B 有可能抗藥性；就 NNRTIs 來看，2 位 B(4.65%) 及 2 位 CRF07\_BC(4%) 有抗藥性，另有 1 位(2.3%) B 有可能抗藥性；就 PIs 來看，1 位(2.3%) B 有抗藥性，另有 2 位 B(4.65%)、4 位 CRF01\_AE(50%) 及 1 位有 CRF07\_BC(2%) 有可能抗藥性。從三類型藥中各亞型的抗藥性與可能抗藥性 (R+PR) 合計比例，PIs 類藥在 CRF01\_AE 比起另兩個亞型有較高比例的 R+PR 且達統計上有意義  $p=0.02$ ，而 NRTIs 或 NNRTIs 類藥在三亞型的 R+PR 比例並無明顯不同( $p>0.6$ )。再把有至少一抗性(R+PR to any drug vs. N to all drugs) 與病人其他因子作關聯分析，年齡與 CD4 count/ml 在此二組都無差異( $p=0.5$  and  $0.6$  by T-test)，而  $\log_{10}$ (HIV copies/ml)在有抗性的 14 人平均值(4.64)比起無抗性之 87 人平均值(4.3)稍微高，但差別尚未達統計明顯  $p=0.15$  by T-test。



## 採樣之代表性

我們採樣病人於南台灣 HIV 病人母族群之代表性:若以疾管局公佈的 2006 全年度新通報 HIV 感染病人數資料來作比較分析，南台灣五個縣市(台南縣市、高雄縣市、屏東縣)的人數 832 當作母群體，overall 我們一年間採樣 101 件占 832 之 12.14%；以三種可能感染危險因子進一步分析，我們樣本占 2006 年南台灣此相對危險因子 HIV 新病人的比例分別是：MSM, 41.67%; IDU, 8.36%; heterosexual, 9.74%；同樣地若以 2007 年的 data 作估算，但是當年公佈的資料並無各縣市分別危險因子的確實數字，只能假設全國每縣市各危險因子的比例都不變來算；2007 年南台灣五縣市共 525 件，我們樣本占 525 之 19.24%；以三種感染危險因子作推算，我們樣本占 2007 南台灣分別是：MSM, 21.5%; IDU, 28.8%; heterosexual, 15.5%。據此估算 MSM 採樣比例似乎稍微高。原因可能是部份新感染者是由篩檢出來的主管機關（例如 IDU 由監所、勒戒所，heterosexual 由性防單位）直接通報，並未到醫院門診故無法採樣。以我們抗藥性檢驗累積結果(year 2002-2005 之 297 人 與 year 2006-2008 之 101 人)來看，B 型的確定抗藥性比例 (8.15%)比 CRF07\_BC (3.8%) or CRF01\_AE (1.96%) 為高，而 MSM 中多是 B 型，因此可能導致在我們的採樣中抗藥性比例顯得比較高。

## 抗藥性相關胺基酸突變分析

由三類型藥分別分析 101 位尚未用藥的病人，在 Reverse Transcriptase (RT) 基因對 NRTIs 類藥有抗性的主要突變有 M41L (n=1, 0.99%)，M184I/V (n=1, 0.99%)，T215D/S (n=2, 1.98%)。在 RT 基因對 NNRTIs 類藥有抗性的主要突變有 K103N (n=2, 1.98%)，V179D/E (n=4, 3.96%)，Y188C/L/H (n=1, 0.99%)，G190S/A (n=1, 0.99%)，P225H (n=2, 1.98%)。除了這八個突變點，在 RT 基因部份，未觀察到其它次要突變。

在 Protease 基因部份，僅發現一處主要突變 L90M (n=1, 0.99%)，但有許多處其它次要突變，而且大部份在三個基因亞型中分佈明顯不同 (below % = No. with mutation / No. of subtype, distribution in 3 subtypes by chi-square exact test)。

L10F/I/R/V，CRF01\_AE (n=3, 37.5%)，CRF07\_BC (n=1, 2%)，B (n=3, 6.98%)，p=0.004。

I13V，CRF01\_AE (n=4, 50%)，CRF07\_BC (n=7, 14%)，B (n=2, 4.65%)，p=0.02。

I15V，CRF01\_AE (n=4, 50%)，CRF07\_BC (n=0) ，B (n=5, 11.63%)，p=0.0001。

G16E，CRF01\_AE (n=4, 50%)，CRF07\_BC (n=0) ，B (n=3, 6.98%)，p=0.0001。

K20M/R，CRF01\_AE (n=4, 50%)，CRF07\_BC (n=1, 2%)，B (n=1, 2.33%)，p=0.0001。

M36I，CRF01\_AE (n=8, 100%)，CRF07\_BC (n=47, 94%)，B (n=14, 32.56%)，p=0.0001。

D60E，CRF01\_AE (n=1, 12.5%)，CRF07\_BC (n=38, 76%)，B (n=3, 6.98%)，p=0.0001。

I62V，CRF01\_AE (n=1, 12.5%)，CRF07\_BC (n=2, 4%)，B (n=10, 23.26%)，p=0.02。

L63P，CRF01\_AE (n=3, 37.5%)，CRF07\_BC (n=50, 100%)，B (n=34, 79.07%)，p=0.0001。

H69K，CRF01\_AE (n=8, 100%)，CRF07\_BC (n=0) ，B (n=0) ，p=0.0001。

A71V/T，CRF01\_AE (n=0) ，CRF07\_BC (n=0) ，B (n=7, 16.28%)，p=0.01。

V77I，CRF01\_AE (n=1, 12.5%)，CRF07\_BC (n=20, 46.51%)，B (n=0) ，p=0.0001。

L89M，CRF01\_AE (n=7, 87.5%)，CRF07\_BC (n=0) ，B (n=0) ，p=0.0001。

I93L, CRF01\_AE (n=3, 37.5%), CRF07\_BC (n=39, 78%), B (n=25, 58.14%), p=0.02。

這 14 個次要突變中，有的是在某一基因亞型中的出現頻率比其它兩種基因亞型來的高，包括 7 個在 CRF01\_AE 較高，L10F/I/R/V, I13V, I15V, G16E, K20M/R, H69K, L89M；3 個在 CRF07\_BC 較高，D60E, V77I, I93L；1 個在 B 較高，A71V/T。另外的是出現頻率在兩種基因亞型較高，包括 M36I 在 CRF01\_AE 和 CRF07\_BC 較高；I62V 在 CRF01\_AE 和 B 較高；L63P 在 CRF07\_BC 和 B 較高。因為目前公開可搜尋的抗藥性突變資料庫大多是根據 B 基因亞型，Trugene System 所列出的突變也多只針對 B 型，但同一個突變點可能在別種亞型是表現成基因多型性(genetic polymorphisms)，不一定會影響到抗藥性。此處看到 7+3 個次要突變是分別在 CRF01\_AE 與 CRF07\_BC 的出現頻率較高，需要再從該病人在臨床上是否真的對 PI 藥物產生抗藥性，和實驗室以細胞測試該病毒株或帶有該突變點之基因重組株對 PI 藥物的敏感性 (susceptibility) 等，來證實該突變點在此二個非 B 之基因亞型是多型性或是抗藥相關突變。

## (二) 已使用抗反轉錄病毒藥病人中

10 位年齡分佈平均為 39.8 歲，中數為 40 歲；男 9 人，女 1 人。自述可能感染愛滋病毒途徑與病毒亞型分佈為，4 人自認為是男同性戀，皆為 B；3 人自認為是異性戀，2 位是 CRF01\_AE，1 位是 B；1 位自認為是雙性戀，為 B；

1 位是垂直感染，為 CRF01\_AE；1 人不/未回答，為 B。平均年歲上，男同性戀為 36.8，異性戀為 46.3；B 病毒亞型為 44.1，CRF01\_AE 亞型為 30.3。抽血當次的 CD4 cell (CD4 counts/ml) 的值範圍為 4-853，中數為 192.5；血清的 log<sub>10</sub> HIV (viral copies/ml) 的值範圍為 3.28-5.62，中數為 4.85，顯示當時病毒量控制不佳。

10 位中有 7 人至少對任何一個藥有抗藥性，另有 1 人至少對任何一個藥有可能抗藥性。3 人對 NNRTI 單一類藥有抗藥性，2 人對 NNRTI 與 NRTI 兩類藥有抗藥性，1 人對 PI 單一類藥有可能抗藥性，1 人對 NNRTI 與 PI 兩類藥有抗藥性或可能抗藥性，1 人對三類藥皆有抗藥性或可能抗藥性。7 位 B 亞型中有 5 人至少對任何一個藥有抗藥性，分別是 2 人對 NNRTI 單一類藥有抗藥性，2 人對 NNRTI 與 NRTI 兩類藥有抗藥性，1 人對三類藥皆有抗藥性或可能抗藥性。3 位 CRF01\_AE 亞型中，1 人對 NNRTI 單一類藥有抗藥性，1 人對 NNRTI 與 PI 兩類藥有抗藥性或可能抗藥性，1 人對 PI 單一類藥有可能抗藥性。三類藥中，以 NNRTI 類的抗藥性比例 7/10 最高，NRTI 類的抗藥性比例 3/10 次之，PI 類的抗藥性比例 1/10 與可能抗藥性 2/10。三位對 NRTI 類有抗藥性的人，也同時對 NNRTI 類有抗藥性，且其中一人是對三類藥皆有抗藥性。七個在 NNRTI 藥類中有抗藥性的人都是對 nevirapine 與 efavirenz 兩個藥，三個在 NRTI 藥類中有抗藥性的人都是對 3TC。三個在 PI 藥類中有抗性的人，2 人對

tipranavir+ritonavir 有可能抗藥性，另 1 人對多種藥有抗性，包括對 indinavir 及 amprenavir/fosamprenavir 有抗藥性，與對 IDV/r，APV/r or FPV/r，atazanavir，nelfinavir，tipranavir+ritonavir 有可能抗藥性。

抗藥性相關胺基酸突變中，三個對 NRTI 藥類中的 3TC 有抗藥性都是因 M184V/I，無發現其它 NRTI 類相關主要或次要突變。對 NNRTI 類相關之主要突變中，K103N/S 出現在 5 人中為最高比例的突變，包括 4 位 B 與 1 位 CRF01\_AE 亞型，次高比例為 P225H 出現在 1 位 B 與 1 位 CRF01\_AE 亞型人中，另有 V106A/M，Y181C/Y/I，Y188C/L/H，G190S/A，各出現過 1 次；對 NNRTI 類相關之次要突變中，K101E/Q 與 V179D/E 各出現過 2 次，V108I 出現過 1 次。對 PI 類相關之主要突變中，M46I/L 造成 1 位 B 亞型的抗藥性；另外有許多次要突變，出現頻率最高的是在 B 亞型中的 L63P 有 4 人與 V77I 有 3 人。如同在未用藥中的結果，因 PI 類相關之次要突變多是根據 B 亞型定的，在我們的 CRF01\_AE 亞型所見的一些“次要突變”可能是多型性；根據 Trugene System 所給的抗藥性判讀，兩位 CRF01\_AE 亞型以用藥病人被標示為對 tipranavir+ritonavir 有可能抗藥性(probable resistance)，分析可能是和 I13V，M36I，H69K，L89M/I 四個次要突變有關。

## (肆) 結論與建議

由我們的結果，可建議下列對於防止愛滋病感染傳播的一般性事項。**第一**、男同性戀感染愛滋病毒平均都較年輕，暗示這些人將來要使用抗反轉錄病毒藥及相關醫療照顧的時間會平均長 10 年，而且這些 20-30 歲正值生產力的感染者若未及時就醫，也對社會造成損失。這趨示需要更多的外展式計劃(outreach prevention programs among the high risk populations)加以控制，在男同性戀的高危險場所，如男同性戀三溫暖、酒吧、同性戀出現的學校社團等，必須加強作 HIV 感染篩檢，宣導安全性行為，如不與不認識者、避免出血、一定使用保險套等。**第二**、於不同可能感染途徑群組(risk group)間的 CD4 cells 和 HIV 病毒量高低暗示，病人初次被感染後(first been infected)，到確診為愛滋病毒感染的時間間隔 (interval between first infected to first diagnosed)長短不同，以毒癮者因易被補入看守所或監獄，所以最易被及早篩檢出感染愛滋病毒，間隔(interval between first infected to first diagnosed)最短；男同性戀間隔居中，而異性戀可能很少主動懷疑被感染，間隔最長。顯示在後兩個高危險群，仍存在高比例的不自認為危險群(not perceive self risks)或不願主動經常篩檢(no frequent screening)的大問題。除了上述男同性戀者間的外展式計劃，在其它的性交易場所，或許也應該開始更多類似的免費篩檢衛教等計劃，來防止愛滋病毒傳播。**第三**、三種不同

亞型於三個自述感染愛滋病毒危險途徑分佈上有接近完全區隔(exclusive)的關係，暗示目前在南台灣的愛滋病毒傳播感染的危險途徑或族群與主要病毒亞型應該還是個別分開的，除了在異性戀的性行為者可能有多重傳播感染源，而另兩大危險族群都各自由單一種的亞型所至，三組間應無明顯的交叉感染傳播。雖然所發現的區隔性分佈還算是可接受的，但將來仍需持續監測傳播感染的途徑、族群與病毒亞型間的關聯性，尤其如果發現有男同性戀及靜脈藥物注射者兩族群交叉感染傳播，或異性戀者多型分佈提高時。

關於病毒抗藥性分析結果，因為人數只有 101+10 人，加上藥類、藥品、突變點、病毒基因亞型等多重因素交叉限制，比較難在任何單一因子的組別分析下，達到統計上顯著的差別，建議須要在更多人數中，證實我們所觀察到的趨式或特殊現象，目前我們可作下列初步建議。**第一**、不管在未用藥或以用藥者身上，都發現非核苷反錄酶抑制劑(NNRTIs)最易產生抗藥性，這符合之前已知的 NNRTIs 抗藥門檻較低，在 reverse transcriptase gene 上約有 9 到 11 個胺基酸位點，任一個突變都足夠造成對 nevirapine 或/與 efavirenz 抗藥性。因此我們建議以 NNRTIs 為第一線藥物治療的病人，應該定期做抗藥性檢查；三亞型中對 NNRTIs 抗藥性的比例，看到的是 B 最高、CRF07\_BC 次之、CRF01\_AE 最低，此順序如果在更多人數中證實，或許

可提供醫師選藥時列入考慮的一個訊息。**第二**、感染 B 亞型者比另外兩個亞型，似乎有較高比例的抗藥性，這可有兩個解釋。B 亞型是三型中出現最早、流行最久最廣的、也可能被用藥最多的，也因此累積最多的抗藥性相關突變在愛滋病毒群中，如同我們病人中所見的亞型 B 有較高抗藥性，如果屬實，B 亞型的病人更須要被監測抗藥性突變。但另一可能是，目前全球的抗藥性基因庫主要是收集亞型 B 的資料，其他型尤其是近年於東南亞新興的基因重組型（例如 CRF07\_BC 等），其抗藥基因的分佈資料尚有待累積建立。我們必須在感染非 B 亞型病人中仔細追蹤研究臨床表現，例如用該類藥或該種藥後能否有效壓抑病毒量、回復免疫指標等，來判別某個突變點會在非 B 亞型導致抗藥性。**第三**、在 protease gene 有許多在 B 亞型標示為次要突變(secondary or minor mutations)的點，我們懷疑對 CRF01\_AE and CRF07\_BC 可能不算是抗藥性相關的突變，因為總共有 7 個和 3 個次要突變點，分別在未用藥的 CRF01\_AE 與 CRF07\_BC 的出現頻率較 B 型統計上明顯的高。如同上一點建議，因為 Trugene System 所列出的抗藥性突變資料庫也多只針對 B 型，但同一個突變點可能在別種亞型是表現成基因多型性(genetic polymorphisms)，不一定會影響到抗藥性。需要再從該病人在臨床上是否真的對 PI 藥物產生抗藥性，和實驗室以細胞測試該病毒株或帶有該突變點之基因重組株對 PI 藥物的敏感性(susceptibility)等，來證實該突



變點在此二個非 B 之基因亞型是多型性或是抗藥相關突變。針對第二及第三點，我們建議愛滋病毒抗藥性的監測必須持續在南台灣進行，除了能了解抗藥性問題的嚴重度是否有升高的趨式，也才能藉累積更多的病人數，尤其是 CRF01\_AE and CRF07\_BC 兩個亞型，進一步分析這些本土株/亞型不同於歐美盛行株/亞型的抗藥性相關突變位點。

我們在台南高雄作出抗藥性的盛行率(5-6%)比疾管局在北部得到(2-3%)之監測資料高，原因可能有 1)採樣人數 101 仍太少，所以單點值(point estimate)不穩定且變異性(standard variation)較大，以 95%信賴區間(95% confidence interval=95% C.I.)來看 prevalence 值落在哪個範圍，即可說明採樣人數少所造成的不確定性。以我們這次 2006-2008 年 101 未用藥病人中有 5 人對至少一個藥有確定抗藥性，point estimate=0.0495，95% C.I.=(0.0072-0.0918)，意思是在  $p=0.05$  的  $\alpha$  value，以 101 人所得 5% prevalence 之信賴區間下限為 0.7%、上限為 9%，此範圍包含了 2%-3%，故在  $p=0.05$  下，無法斷定與疾管局 2-3%有顯注不同。又以林錫勳醫師 2002-2005 年在高雄 297 初次感染者中測到 18 人有抗藥性=0.0606，將近三倍的採樣人數讓信賴區間較為緊密，95% C.I.=(0.0335-0.0877)，下限比 2-3%略高所以是有不同，但上限 0.0877 也括過了這次 2006-2008 年的 0.0495 故無明顯不同。總括來說必需要更多採樣與更長時間監測，才能知道未用

藥者中抗藥性的確實盛行率與趨式；2)所採用之偵測實驗方法不同，我們報告中的 excel 檔有標示出所有每個病人以 TruGene System 所得的主要(primary)與次要(secondary)突變位點之結果，應可針對每個位點與 ViroSeq System 的突變比例作逐一的比對分析，以釐清兩種方法間是否真有判讀的不同；3)或許真的因為不同人群、地區造成的差異，所以應該要持續監測以證實南部的盛行率是否一直比其他地區高，以及進一步研究造成較高抗藥性的原因；4)如果對照南台灣五個縣市 2006 與 2007 年新通報案例數，我們採樣約占其 12.14%-19.24%，MSM 採樣比例似乎稍高，MSM 又多為 B 型，而 Subtype B 的病人較容易有抗藥性。

比較之前在南台灣的趨式，這次結果看到抗藥性於未用藥者的盛行率似乎稍微昇高一點。在 2004 年我們團隊的義守大學醫院感染科主任林錫勳醫師做了 195 個愛滋病感染者且尚未曾服藥過的病人；包括 103 位男同性戀，71 位異性戀，18 位注射藥癮者，及 3 位其它危險因子者。由研究結果發現對任何一種藥物有抗藥性的盛行率為 10.9% (23 例在 195 例中)，對非核苷類反轉錄酶抑制劑抗藥性最高，有 19 例 (9.74%)，對蛋白酶抑制劑抗藥性有 10 例 (5.13%)，對核苷類反轉錄酶抑制劑抗藥性有 7 例 (3.59%)。有 2 例 (1.02%) 對 3 類藥物都有抗藥性。在核苷類反轉錄酶抑制劑的抗藥突變基因主要在 T215Y/F/S (2.07%)、M41L (1.55%)、D67N (1.04%)、及

M184V (1.04%)；在非核苷類反轉錄酶抑制劑的抗藥突變基因主要為 V179D/E (3.11%)，K103N (2.59%)；在蛋白酶抑制劑的抗藥突變基因主要在 L90M (1.04%)，I84V (1.04%)及 M46I/L (1.04%)。進一步分析得到抗藥性的危險因子，發現 Subtype B 的病人較容易有抗藥性，對任何一種藥物有抗藥性的盛行率為 12.0% (16 例在 133 例中)。另外在蛋白酶抑制劑最常見的基因多型性突變是 L63P (52.2%) 及 M36I (41.3%)，CRF01\_AE 97.5% 有 M36I，而在亞型 B 有 73.3%L63P (Lin, Liu et al. 2005)。我們初步的研究結果，在台灣地區愛滋病毒感染者在治療前抗藥性的盛行率為 10.9%，在亞型 B 達 12.0%，最常見的是非核苷類反轉錄酶抑制劑 9.74%。

對於未用藥者實際治療時真正 resistant 的比率：1998 年國外在新感染者(recent or primary infected，類似未用藥者)的大型追蹤式研究(longitudinal study)，發現多個在 RT、PR genes 上的 amino acid 突變點會導致之後病人對不同類別藥物的病毒量控制不佳(suboptimal virological response)、感受性變差(reduced susceptibility)、甚至用藥失敗(Little et al, 1999; Little et al, 2002)；把帶有該突變點的病毒分離、細胞培養後，再用該藥測試病毒的 50% inhibitory concentration (log<sub>10</sub> IC<sub>50</sub>)，發現需增高 2.5 倍到 10 倍藥量才能抑制該突變病毒，證實抗藥性與該突變點之關聯性。目前都是先以臨床上觀察用藥失敗案例的突變點，少數有設備經費實驗室確認突變序列與 in vitro

drug sensitivity test 的關係。因此種 phenotypic test for drug resistance 需在生物安全 3 級以上操作且耗費耗時，所以才會發展定基因序列 genotypic tests 檢測抗藥性，並且有 USA FDA 認可的 diagnostic kits 上市 (Fontaine et al, 2001; Erali et al, 2001; Kuritzkes et al, 2003)。這些 kits 定期證實 drug sensitivity 並修正抗藥 mutation definitions，是以歐美盛行的 B 型為主，現今台灣有 CRF07\_BC 盛行與 CRF01\_AE，位點改變與表現出的抗藥 phenotypes 不見得與 B 型的法則完全相同，這部份才是我們需自行累積樣本資料作 phenotypic tests，以證實 genotyping kits 在非 B 型是否也有可信賴的正確度。在我們合作的醫師的經驗上，若抗藥檢測結果已顯示對某個藥有”resistant” 確定抗藥性時，就會避免對病人使用此藥；而有”probable resistant” 可能抗藥性 (PI 類藥物除外) 時，曾經有醫師仍然使用此藥，但用後六月左右一般會有病毒量控制不佳、抗藥性產生。這也支持使用 genotypic 抗藥檢測在臨床上，是可以幫助篩選出每個病人不適合用的藥。

根據有限的觀察經驗，在所感染愛滋病毒的亞型為非 B 型者 (e.g. CRF01\_AE, CRF07\_BC)，對抗病毒藥物的耐受性似乎與傳統常見 B 亞型的情形不同。我們也想要了解過去三年在南台灣藥癮注射者中，所爆發的大量感染愛滋病毒基因重組型 (例如 CRF07\_BC)，對抗病毒藥物之抗藥性衝擊為何並了解問題的嚴重程度。盼望能得到疾管局等相關單位對此問題

的持續資源與經費支持，讓我們能繼續監測研究愛滋病毒抗藥性的流行病學。研究結果將提供台灣地區抗病毒治療及公共衛生重要的相關訊息。

## (伍) 參考文獻

- Bertley, F. M., P. A. Kozlowski, et al. (2004). "Control of simian/human immunodeficiency virus viremia and disease progression after IL-2-augmented DNA-modified vaccinia virus Ankara nasal vaccination in nonhuman primates." J Immunol **172**(6): 3745-57.
- Chang, S. Y., W. H. Sheng, et al. (2006). "Molecular epidemiology of HIV type 1 subtypes in Taiwan: outbreak of HIV type 1 CRF07\_BC infection in intravenous drug users." AIDS Res Hum Retroviruses **22**(11): 1055-66.
- 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. and S. H. Kuo (2007). "HIV-1 in Taiwan." Lancet **369**(9562): 623-5.
- Chen, Y. M., Y. C. Lan, et al. (2006). "HIV-1 CRF07\_BC infections, injecting drug users, Taiwan." Emerg Infect Dis **12**(4): 703-5.
- d'Arminio Monforte, A., C. A. Sabin, et al. (2005). "The changing incidence of AIDS events in patients receiving highly active antiretroviral therapy." Arch Intern Med **165**(4): 416-23.
- DHHS (2007). AIDSinfo: offering information on HIV/AIDS treatment prevention and research. U.S. Department of Health and Human Services: Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents - updated on October 10, 2006.  
<http://aidsinfo.nih.gov/Guidelines>.
- Dybul, M., A. S. Fauci, et al. (2002). "Guidelines for using antiretroviral agents

- among HIV-infected adults and adolescents. Recommendations of the Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV." MMWR Recomm Rep **51**(RR-7): 1-55.
- Erali M, Page S, Reimer LG, et al. (2001) Human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing: a comparison of three sequence-based methods. J Clin Microbiol. 39(6):2157-65.
- Fontaine E, Riva, et al. (2001). Evaluation of two commercial kits for the detection of genotypic drug resistance on a panel of HIV type 1 subtypes A through J. J Acquir Immune Defic Syndr 28(3):254-8.
- Gale, H. B., V. L. Kan, et al. (2006). "Performance of the TruGene human immunodeficiency virus type 1 genotyping kit and OpenGene DNA sequencing system on clinical samples diluted to approximately 100 copies per milliliter." Clin Vaccine Immunol **13**(2): 235-8.
- Germer, J. J., J. N. Vandenameele, et al. (2004). "Automated sample preparation for the TRUGENE HIV-1 genotyping kit using the MagNA pure LC instrument." Diagn Microbiol Infect Dis **49**(1): 59-61.
- Grant, R. M., D. R. Kuritzkes, et al. (2003). "Accuracy of the TRUGENE HIV-1 genotyping kit." J Clin Microbiol **41**(4): 1586-93.
- Ko, N. Y., H. C. Lee, et al. (2006). "Prevalence of human immunodeficiency virus and sexually transmitted infections and risky sexual behaviors among men visiting gay bathhouses in taiwan." Sex Transm Dis **33**(8): 467-73.
- Ko, N. Y. and M. A. Muecke (2006). "Prevailing discourses among AIDS care professionals about childbearing by couples with HIV in Taiwan." AIDS Care **18**(1): 82-6.

- Kuritzkes, D. R., R. M. Grant, et al. (2003). "Performance characteristics of the TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit and the Opengene DNA Sequencing System." J Clin Microbiol **41**(4): 1594-9.
- Lin, H. H., Y. C. Liu, et al. (2005). Genotyping study of antiretroviral drug resistance in Taiwan, unpublished work.
- Lin, H. H., Y. L. Shih, et al. (2006). "An epidemic of HIV type I CRF07\_BC infection among injection drug users in Taiwan." J Acquir Immune Defic Syndr **42**(2): 248-55.
- Lin, Y. T., Y. C. Lan, et al. (2007). "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 **195**(9): 1283-93.
- Little SJ, Daar ES, et al. (1999) Reduced antiretroviral drug susceptibility among patients with primary HIV infection. JAMA 282(12):1142-9.
- Little SJ, Holte S, et al. (2002). Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. N Engl J Med. 347(6):385-94
- Mascolini, M., C. Boucher, et al. (2007). "Key reports from the XV International HIV Drug Resistance Workshop 2006." Antivir Ther **12**(1): 131-45.
- May, M. T., J. A. Sterne, et al. (2006). "HIV treatment response and prognosis in Europe and North America in the first decade of highly active antiretroviral therapy: a collaborative analysis." Lancet **368**(9534): 451-8.
- National Institute of Allergy and Infectious Diseases (2007). International Epidemiologic Databases to Evaluate AIDS. I. <http://www.iedea-hiv.org/>.
- Patel, J., S. W. Wang, et al. (2003). "The simian immunodeficiency virus 5' untranslated leader sequence plays a role in intracellular viral protein



- accumulation and in RNA packaging." J Virol **77**(11): 6284-92.
- Ribas, S. G., L. Heyndrickx, et al. (2006). "Performance evaluation of the two protease sequencing primers of the Trugene HIV-1 genotyping kit." J Virol Methods **135**(2): 137-42.
- Simon, V., D. D. Ho, et al. (2006). "HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment." Lancet **368**(9534): 489-504.
- Smith, D., N. Moini, et al. (2007). "Clinical utility of HIV standard genotyping among antiretroviral-naive individuals with unknown duration of infection." Clin Infect Dis **44**(3): 456-8.
- Stanford University (2007). HIV Drug Resistance Database. <http://hivdb.stanford.edu/index.html>.
- University of California at San Francisco (2007). HIV InSite. UCSF Center for HIV Information: HIV InSite Gateway to HIV and AIDS Knowledge. <http://hivinsite.ucsf.edu>.
- Wang, S. W. and A. Aldovini (2002). "RNA incorporation is critical for retroviral particle integrity after cell membrane assembly of Gag complexes." J Virol **76**(23): 11853-65.
- Wang, S. W., F. M. Bertley, et al. (2004). "An SHIV DNA/MVA rectal vaccination in macaques provides systemic and mucosal virus-specific responses and protection against AIDS." AIDS Res Hum Retroviruses **20**(8): 846-59.
- Wang, S. W., K. Noonan, et al. (2004). "Nucleocapsid-RNA interactions are essential to structural stability but not to assembly of retroviruses." J Virol **78**(2): 716-23.
- World Health Organization (2007). WHO HIV Drug Resistance: WHO Global

Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance

<http://www.who.int/hiv/drugresistance/en/>.

Zolopa, A. R. (2006). "Incorporating drug-resistance measurements into the clinical management of HIV-1 infection." J Infect Dis **194 Suppl 1**: S59-64.

**Table 1. Characteristics of 101 HIV-1 infected patients who have not been treated with antiretroviral therapy, 2006-2008 southern Taiwan**

Self-identified risk group	No of patients	Male n=95	age	CD4/ml	log10 (HIV copies/ml)	B n=41	Subtype CRF01_AE n=8	CRF07_BC n=50
	Count	%		Mean± SD			Row %	
MSM	35	100	28.85±6.73	352.09±182.85	4.51±0.84	100	0	0
Heterosex	15	86.67	41.2±14.74	185.75±203.95	5.13±0.61	40	53.33	6.67
IDU	49	91.84	36.42±7.45	529.66±204.91	3.97±0.6	0	0	100
		%		value			%	
Not answered	2	100	23, 39	582, 669	5.13, 5.17	100	0	0

aMSM: men who have sex with men; IDU: injection drug users

Numbers may not add up to 101 due to missing values or round-off