

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-000121

衛生福利部疾病管制署 107 年署內科技研究計畫

計畫名稱：全國 HIV 抗藥性及基因型監測與評估策略

年度研究報告

執行單位：疾病管制署

計畫主持人：楊志元 研究員

研究人員：廖郁昕、蔡汶真

執行期間：107 年 1 月 1 日至 107 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意

# 目 錄

## 目錄

壹、計畫中文摘要 .....	3
貳、計畫英文摘要 .....	4
參、計畫內容:	
一、研究簡介 .....	5
二、材料與方法 .....	9
三、結果與討論 .....	15
四、圖表 .....	17
五、參考文獻 .....	22

共(24)頁

## 壹、計畫中文摘要：

關鍵字：人類免疫不全病毒， 抗藥性

聯合國及世界衛生組織(WHO)已明確宣示於 2020 年達成愛滋防治 90-90-90 目標，但服藥所產生的抗藥性病毒株將會影響藥物治療的效果，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，而抗藥性的出現勢必使終結愛滋疫情計畫受阻。針對此問題 WHO 也對於有提供支持大規模抗愛滋病藥物給予病患的國家提出建議，應該進行人類免疫缺乏病毒抗藥性早期警示指標之監測。目前，感染人類免疫缺乏病毒第一型之本國籍病患，經醫生評估後皆可接受健保給付之抗反轉錄病毒藥物治療，藉由完善的醫療照顧與藥物治療已能有效地控制病毒而延長這些病患的壽命；針對 WHO 建議，將持續監測人類免疫缺乏病毒新感染者抗藥性。本項研究計畫分析國內新進感染原生抗藥性人類免疫不全病毒株之盛行率(transmitted HIV DR)，利用全國愛滋病指定醫院及縣市衛生局收集我國愛滋感染者檢體，以分子流行病學方法，監測 HIV-1 抗藥性之流行趨勢，以及 HIV 病患感染之亞型分布情形，探討是否有外來亞型引入，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，獲得更完整台灣地區愛滋病毒抗藥性的流行病學藍圖，並提供政府及醫療單位制定政策之參考依據。

本項研究計畫根據 2017 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，共完成 403 件檢測，基因亞型仍以 B 亞型為主(89.3%)，其次分別為 CRF\_01AE(6.7%)及 CRF07\_BC(3.2%)。進一步進行抗藥性分析：抗藥性有 52 件(12.7%)，較去年 11.7%有些微上升、多重抗藥性有 9 件(2.2%)，同時檢測 338 件 Integrase Inhibitors 分析，其中有 3 件(0.89%)有抗藥性。針對近兩年具抗藥性比例有上升趨勢，後續是否持續上升，仍需持續觀察。

## 貳、計畫英文摘要：

All Human Immunodeficiency Virus type-1 (HIV-1) infected patients are eligible for anti-retroviral therapy covered by government budget in Taiwan. The comprehensive medical care and the pharmacological treatment lengthened effectively the life of these HIV(+) patients, but due to the nature of HIV and selection pressure, viral drug-resistant from a long time pharmacological treatment would be inevitable. The HIV-1 virus of drug-resistant might widespread transmission of primary HIV-1 drug-resistant to others, and could reduce and influence the efficiency of the anti-HIV therapy. The first part of this study will focus on the survey of primary HIV-1 drug-resistance prevalence (transmitted HIV DR). We will use molecular epidemiology methods to survey the trend of HIV-1 drug-resistant and the distribution of HIV-1 subtype among different risk group. The National database will also show us the parameters for evaluation the HIV DR surveillance program in Taiwan.

The distribution of the sampling among patients of naive HIV-1 infection was 403 in 2017. Among the 403 cases, subtype B is most common subtype in Taiwan (89.3%), 51 (12.7%) are drug-resistance, 9(2.2%) are multidrug-resistance. According to our previous data, the transmitted HIV DR are higher than 2016.

In conclusion, the trend of drug resistance of HIV-1 should be monitored continually and obtain more complete blueprint of epidemiology of HIV-1 drug-resistant. In conjunction with other prevention measures, hopefully we can bring the HIV epidemic in Taiwan under control.

Keywords: HIV-1 ; Genotyping ; Drug-resistant

## 參、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，具有醣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<sup>1</sup>；*pol* 基因轉譯出來的的產物有反轉錄酶、蛋白質酶以及嵌入酵素；*env* 基因的產物則是病毒的外套膜醣蛋白，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<sup>2</sup>，其彼此差異約在 20%以上<sup>1,3</sup>；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<sup>4</sup>。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<sup>5</sup>。

### \*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<sup>3,6</sup>。

### \*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<sup>7,8</sup>。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複體(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<sup>9,10</sup>。

### **\*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的酶活性(Protease inhibitor, PI)。第二類是以類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)。第三類是以非類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，台灣目前已核准引進了包括 NRTIs, NNRTIs, PIs、嵌入酶抑制劑 (integrase inhibitor) 及 chemokine co-receptor antagonist 共 5 大類計 33 種藥物。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。

### **\*全球 HIV 原生抗藥性(transmitted HIV DR)監測**

聯合國及世界衛生組織(WHO)已明確宣示於 2020 年達成愛滋防治 90-90-90 目標，但服藥所產生的抗藥性病毒株將會影響藥物治療的效果，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，而抗藥性的出現勢必使終結愛滋疫情計畫受阻。針對此問題 WHO 也對於有提供支持大規模抗愛滋病藥物給予病患的國家提出建議，應該進行人類免疫缺乏病毒抗藥性早期警示指標之監測。WHO 與 HIV Res Net 共同合作於 2016 年更新 HIV 抗藥性監測與監視(HIV DR) 全球策略，其主要分為:

1. Monitoring of HIVDR early warning indicators, EWI
2. Surveillance of pre-treatment HIV drug resistance (PDR) in population initiating ART
3. Surveillance of acquired HIV drug resistance (ADR) in population receiving ART

**\*臺灣愛滋病統計資料:**

到 2018 年 10 月，依據衛生福利部疾病管制署的疫情調查資料顯示，台灣感染人類免疫不全病毒第一型(Human immunodeficiency virus type I, HIV-1)的人數已經達到 37,602 人，AIDS 發病人數為 17,700 人，因而致死的人數為 6,351 人。而 2017 年感染 HIV-1 個案中，主要危險行為為同性間性行為(MSM)有 2,163 人(86.07%)、異性間性行為 262 人(10.43%)，以及注射藥癮者 44 人(1.75%)。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。

本計畫探討 transmitted HIV DR 在各個高危險族群，新通報 HIV 感染者之基因亞型分布情形，這些族群依危險因子選定對象為：靜脈藥癮者、異性戀、及 MSM 等不同危險因子族群，以了解目前流行在各族群之 HIV 基因型別是否出現變化，甚至是否出現外來之病毒基因型別。依感染 HIV 之危險因子統計分析，發現 MSM、異性戀與靜脈藥癮者為最主要受感染族群，分別佔總數(至 2018 年 10 月底, TCDC 統計資料)之 63.54%，16.27%，18.8%。依據先前之研究調查顯示，在不同危險族群間所感染盛行之 HIV 基因亞型亦有所差別，在台灣 MSM 主要是感染 B 亞型，靜脈毒藥癮者主要為 CRF07\_BC，而異性戀病患則是為 CRF01\_AE。對於不同亞型是否會因為危險行為改變或是彼此間有交叉聚集，使得 HIV-1 基因亞型在不同危險族群之分佈變得複雜化，故有必要在不同危險族群進行 HIV 基因亞型監測，並依據其危險行為採取適當的防治措施，以避免 HIV-1 之擴散。



## 二、材料與方法:

### 檢體的收集:

2017 年度由疾病管制署病毒實驗室、縣市衛生局與愛滋病指定醫院所收集的 HIV-1 陽性檢體共 403 件，收集之個案必需為 2017 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(表一)。

### HIV 血清學檢測-西方墨點法:

主要是利用 Mikrogen 公司製造之 recomLine HIV-1 & HIV-2 IgG 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 Wash buffer 後，放入 strips，開始震盪搖 2 分鐘
4. 吸乾各反應槽內之液體後加入 2 mL Blotting buffer。
5. 分別加入各 20  $\mu$ L 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 3 個小時。
6. 以負壓抽吸器吸乾各反應槽內之液體。
7. 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。
8. 各注入 2 mL 的結合液，加蓋後在室溫中搖擺作用一小時。
9. 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。
10. 各注入 2 mL 之呈色液，搖擺作用約 5 分鐘使之呈色。
11. 以負壓抽吸器吸乾反應槽內液體並以二次蒸餾水清洗三次，以停止反應。
12. 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。

13. 抽吸管尖則以 10%漂白水消毒後再以清水沖洗。
14. 比對呈色反應判讀後發報告，反應後之試紙條則遮光蔭乾後黏貼。

#### **發生率實驗:**

使用 Sedia™ HIV-1 LAg-Avidity EIA 進行發生率分析。將待測檢體與對照組檢體 1:101 倍稀釋，將以稀釋過之 100  $\mu$ l 檢體及對照組移至反應盤，放進 37°C 溫箱，1 小時。反應 1 小時後，以自動清洗機清洗兩次，反轉後再清洗兩次，每孔以 300  $\mu$ l 清洗，每次間隔 10 秒，最後一次以拭手紙包住反應盤翻轉，用力拍打以移去多餘水分。使用多管分注器加入 200  $\mu$ l Dissociation Buffer 到每反應孔，37°C 靜置 15 分鐘。以上述方法清洗反應盤，再用多管分注器加入 100  $\mu$ l 稀釋過之 anti-Human IgG-HRP(1:1001 稀釋)至每一反應孔，靜置 37°C 時間 30 分鐘。反應完成後，再以上述方法清洗反應盤，洗後加入 100  $\mu$ l TMB 受質於每一反應孔，25°C 靜置 15 分鐘，再以分注器加入 100  $\mu$ l 終止溶液，停止反應之呈色。以 450 nm 波長，參考波長 630-650 nm，測量其 OD 值(optical density, OD)。為降低每一次反應間之變異性與維持再現性，將計算 ODn 值(normalized OD)，其計算方法為：

$ODn\ control = (OD\ control\ 之\ 平均值) \div (OD\ calibrator\ 之\ 中位數)$

$ODn\ 檢體\ 1 = (ODn\ 檢體\ 1) \div (OD\ calibrator\ 之\ 中位數)$

當檢體  $ODn \leq 1.5$  就會被認定是 recent seroconversion。如果  $ODn > 1.5$ ，檢體來源就判定是 long-term seroconversion。

#### **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<sup>11</sup>所結合之特定片段，再定序分析。

1. 反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)：使用 TaKaRa 公司的 PrimeScript One Step RT-PCR Kit 進行 RNA 反轉錄聚合酶連鎖反應。取病毒 RNA 1 $\mu$ L 加入 2x one step Buffer 25  $\mu$ L、PrimeScript one step Enzyme Mix 2  $\mu$ L、10 $\mu$ M forward primer-44F 和 reverse primer-35R 各 1  $\mu$ L 的混合物中，並加入 RNase Free dH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu$ L，以 PCR machine 進行 55°C 30 分鐘，再 94°C 2 分鐘後，以 94°C 30 秒、50 或 55°C 30 秒、72°C 1 分，進行 45 次反應，最後在 72°C 作用 1 分鐘。
2. 巢式聚合酶連鎖反應：Nest-PCR：使用 TaKaRa 公司 PCR PreMix Kit 將第一次 PCR 的產物取 2 $\mu$ L 當模板(template)加入 forward primer-33F 和 reverse primer-48R (10 pmol/ $\mu$ l)各 1 $\mu$ L 及 ddH<sub>2</sub>O 16 $\mu$ L 至 Maxime PCR PreMix tubes 中，以 PCR machine 進行 94°C 2 分鐘裂解後，以 94°C 30 秒、55°C 30 秒、68°C 1.5 分鐘，進行 35 次反應，最後在 68°C 作用 5 分鐘。
3. 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預期可見到約 526bp 的基因片段，再委外核酸序列分析完成定序分析。再以 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%<sup>12</sup>。

### **ViroSeq 抗藥性基因序列分析：**

使用符合 FDA、CE 及本署 IVD (In vitro Diagnostics)規範的 ViroSeq<sup>TM</sup> HIV-1 Genotyping System (Celera Diagnostic, Abbott Laboratories, US)<sup>13</sup>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<sup>TM</sup> 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<sup>14,15</sup>，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。

### 1. 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。

### 2. 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。

### 3. 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。

#### 4. 聚合酶連鎖反應產物純化

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

#### 5. 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。

#### 6. 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<sup>16</sup> 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。

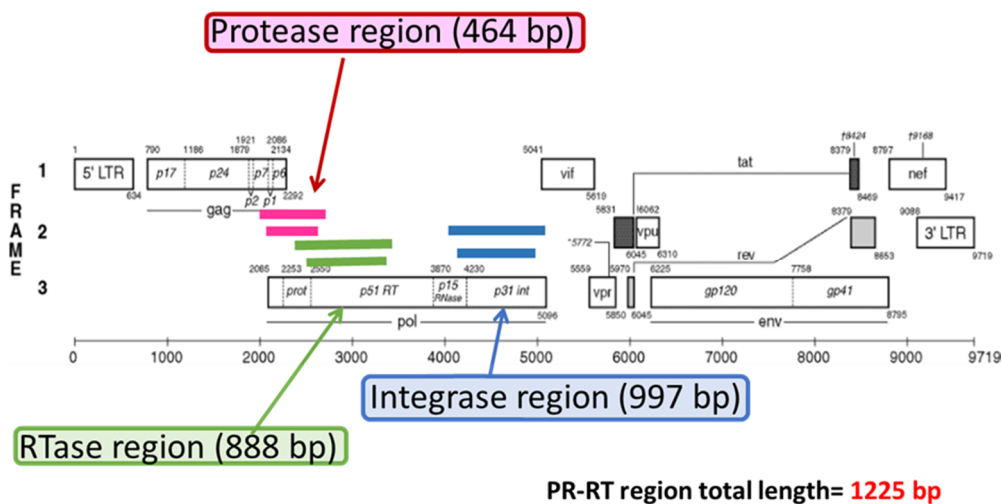
#### 抗藥性分析in-house 檢測方法

參考日本國立感染症研究所(NIID)針對HIV-1 pol基因設計引子<sup>17</sup>用於基因序列分析，將以Qiagen ViralAmp試劑萃取好的病毒RNA以RT-PCR與Nest-PCR的方法來增幅引子所結合之特定片段，再使用不同的定序引子進行序列分析。

##### 1. 反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction): 萃取出

檢體中的人類免疫不全病毒的 RNA，再經由 One-Step RT-PCR 反轉錄酶聚合酶連鎖反應作用(50°C for 30 minutes; 94°C for 2 minutes; 30 cycles of 94°C for 15 seconds, 55 °C for 30 seconds, 68°C for 1.5 minutes; 68°C for 5 minutes and the final hold . at 4°C) cDNA 後，將所有反轉錄作用所獲得之片段再以 DNA polymerase 進行巢式聚合酶連鎖反應 (94°C for 2 minutes; 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, 68 °C for 1.5 minutes; 68°C for 5 minutes and the final hold at 4°C.)。接著以委外核酸序列分析完成定序自動偵測。

2. 抗藥性分析：將完成的序列輸入至 Stanford University HIV DRUG RESISTANCE DATABASE (<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences/>)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%<sup>12</sup>。而抗藥性盛行率則依據 WHO 公布的抗藥性位點進行計算<sup>18</sup>，對於 INIs 抗藥性則依據 Stanford University HIV DRUG RESISTANCE DATABASE。此外，我們也會加計 Abbott Viroseq v3.0 軟體所判定 Possible Resistance，目前二資料庫並無明顯差異，需要繼續進行觀察是否有其他差異。
3. 定序用引子



### 三、結果與討論

本研究計畫監測每年新通報之 HIV-1 陽性個案之抗藥性，2017 年新通報個案，完成 403 件血漿或血清檢體的 HIV-1 型別分析。有 360 件(89.32%)為 B 亞型，為主要流行之病毒亞型，另有 27 件(6.7%)為 CRF01\_AE 亞型、9 件(4.4%)為 CRF07\_BC 亞型，2 件(0.5%)為 CRF51\_01B 亞型，1 件(0.25%)為 G 亞型(表二)，其中 CRF51\_01B 亞型為 CRF01\_AE 及 B 亞型的重組型，此重組型於 2011 年在新加坡被分離<sup>19,20</sup>，之後陸續出現在其他亞洲國家。台灣地區於 2014 年開始陸續發現有零星的 CRF51\_01B 亞型，之後仍會持續監測此重組型在台灣是否有增加的趨勢；此外 G 亞型並非台灣常見的亞型，此亞型首先被發現於西非及中非地區<sup>21</sup>，因此也會針對此個案的疫調資料及檢體進行進一步的分析。

在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、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。主要參考日本 NIID In-House 的實驗方法分析進行 HIV-1 抗藥性監測，主要皆是看 *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。此外，自 2016 年開始 Integrase Inhibitors (INIs)類藥物亦為健保給付之一線推薦處方，因此同時也根據 STANFORD HIV DRUG RESISTANCE DATABASE (<https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/INSTI/>)的抗藥性位點監測分析對於此類藥物是否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 403 件 2017 年未服用抗反轉錄病毒藥物之新通報個案之 HIV-1 基因序列，有 51 件具有抗藥性(12.7%)(表三)，較 2016 及 2015 年稍有增加(11.7%及 10.5%)。其中 NRTIs 抗藥性為 4.2%(17 件)、NNRTIs 為 9.7% (39 件)，而 PIs 為 0.9%(4 件)；另外，HIV-1 抗藥性在不同的亞型、地區及危險因子並無明顯差異(表四)，分析 2013-2017 年抗藥性分析趨勢(圖二)，可發現整

體抗藥性較 2016 年些微上升，須注意後續變化。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，以節省愛滋治療藥物支出<sup>22</sup>，許多國家也有針對 HIV-1 原生抗藥性進行監測：如美國約 17.8%-21.3%<sup>23,24</sup>、德國約 10.8%<sup>25</sup>、英國約 7.5%<sup>26</sup>。而國外也有學者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<sup>27</sup>。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。

關於 HARRT 藥物治療失敗之 HIV-1 病患之抗藥性分析方面，2017 年共收集檢體 138 件，其中有 75 件(54.3%)具有一個以上之抗藥性相關之突變位點，其中以 NNRTIs 與 NRTIs 類別之抗藥性突變位點最普遍(分別為 50.0%，45.7%)，而 PIs 類別偵測案例最少(1.4%)(表四)。然其中有 12 件(8.7%)檢體病毒量太低無法檢測、51 件(37%)之檢體沒有發現任何 HIV-1 抗藥性突變位點，代表臨床判斷個案是否具抗藥性，仍需審慎評估。分析 2013-2017 治療失敗抗藥性趨勢(圖三)，可觀察到抗藥性比例較 2016 年下降，與 naive 個案的抗藥性趨勢結果不太相同，可能此 HARRT 藥物治療失敗的個案並無依危險因子與居住地區分佈為基準來篩選檢體，所以造成相關的結果不同。這些數據皆可提供權責組擬定防疫政策之參考，並持續進行 HIV-1 抗藥性監測。



四、圖表

圖一、愛滋病毒結構與感染史(infection cycle)

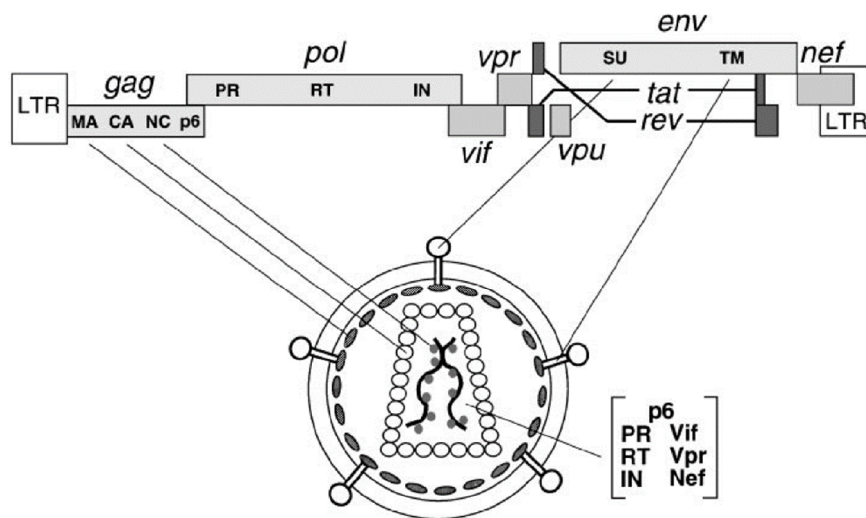
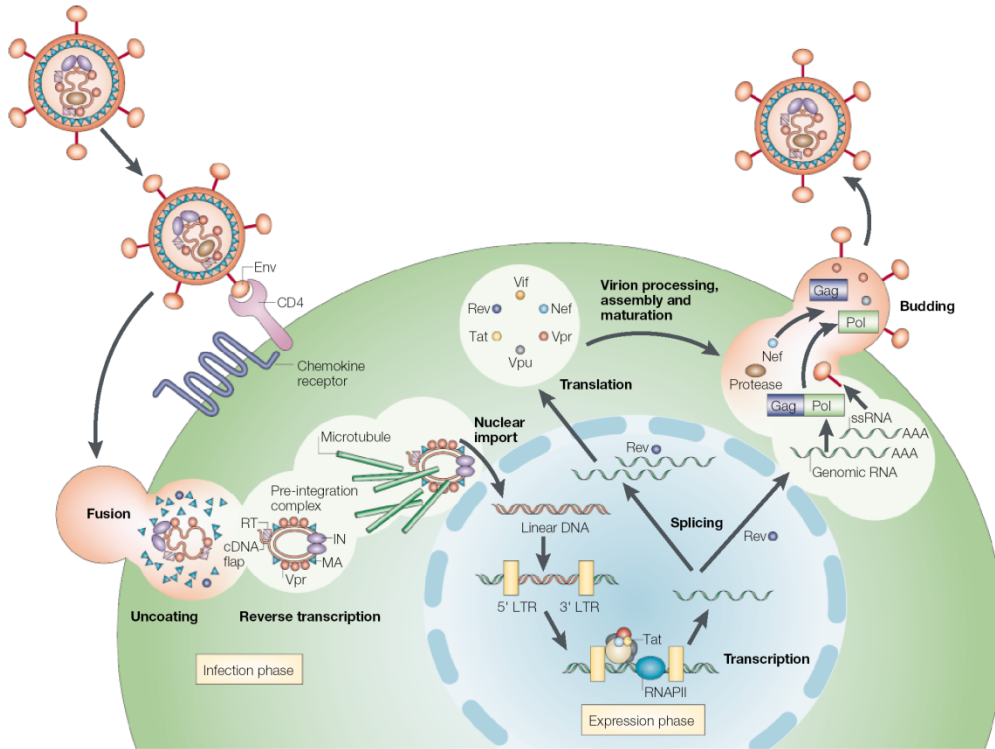


Figure 1 Organization of the HIV-1 genome and virion.

表一、2017 年 檢測愛滋新感染病患抗藥性相關基本資料

年度	2017年	
全年新通報個案	2514	
檢驗數, 占全年新通報個案百分比	403	(16.03%)
年齡(HIV診斷年齡)		
平均值 ± 標準差	31.2±10.0	31.3±10.3
性別		
男性	2446 (97.3%)	392 (97.3%)
女性	68 (2.7%)	11 (2.7%)
地區(管理縣市)		
北部	1449 (57.6%)	240 (59.6%)
中部	395 (15.7%)	62 (15.4%)
南部	612 (24.3%)	92 (22.8%)
東部	58 (2.3%)	9 (2.2%)
危險行為		
同性戀	2150 (85.5%)	333 (82.6%)
異性戀	265 (10.54%)	39 (9.7%)
注射藥癮	44 (1.75%)	6 (1.5%)
不詳	54 (2.15%)	25 (6.2%)
母子	1 (0.04%)	0 (0.0%)

表二、2017 年 檢測愛滋新感染病患抗藥性型別分佈

subtype	件數 (%)
B	360 (89.32)
CRF01_AE	27 (6.7)
CRF 07_BC	13 (3.23)
CRF 51_01B	2 (0.5)
G	1 (0.25)
Total	403 (100)

表三、2017年新通報 HIV-1 感染者(Naïve)抗藥性統計

抗藥性分類	Resistance		Possible Resistance		Total Resistance	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<b>Total: 403</b>						
MDR mutation	0	(0.0)	6	(1.5)	9	(2.2)
<b>any mutation</b>	<b>24</b>	<b>(6.0)</b>	<b>43</b>	<b>(10.7)</b>	<b>51</b>	<b>(12.7)</b>
any <b>NRTI</b> mutation	1	(0.2)	17	(4.2)	17	(4.2)
any <b>NNRTI</b> mutation	23	(5.7)	28	(6.9)	39	(9.7)
any <b>PI</b> mutation	0	(0.0)	4	(0.9)	4	(0.9)
any <b>INI</b> mutation*	0	(0.0)	3	(0.89)*	3	(0.89)*

\* : INI mutation 檢測件數為 338 件

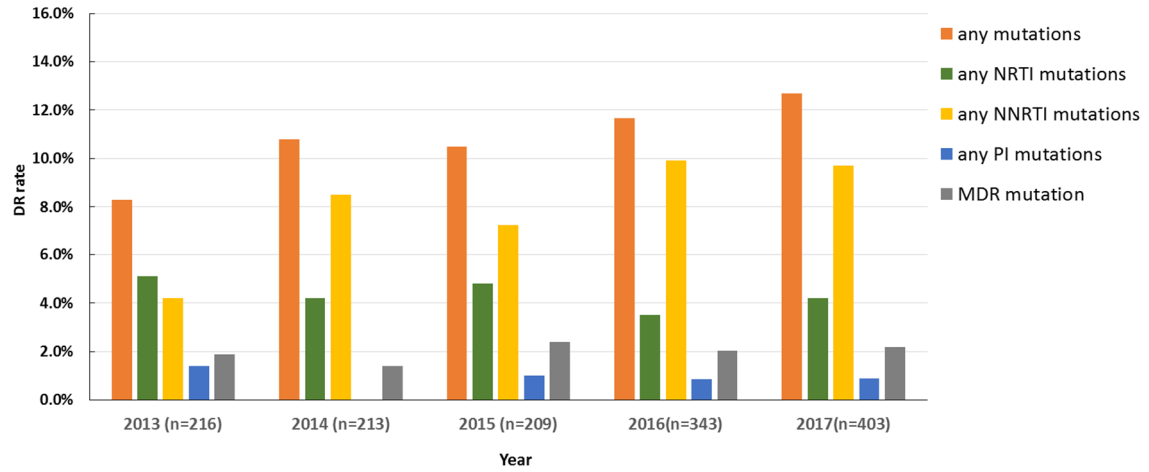
表四、2017年新通報 HIV-1 感染者(Naïve)抗藥性分布

	any mutation N=51	susceptible N=352	total N=403
<b>性別</b>			
男性	49 (96.08%)	343 (97.44%)	392 (97.3%)
女性	2 (3.92%)	9 (2.56%)	11 (2.7%)
<b>居住縣市</b>			
北	30 (58.82%)	210 (59.66%)	240 (59.6%)
中	9 (17.65%)	53 (15.06%)	62 (15.4%)
南	11 (21.57%)	81 (23.01%)	92 (22.8%)
東	1 (1.96%)	8 (2.27%)	9 (2.2%)
<b>危險因子</b>			
同性間不安全性行為	43 (84.31%)	290 (82.39%)	333 (82.6%)
異性間不安全性行為	6 (11.76%)	33 (9.38%)	39 (9.7%)
藥癮者	1 (1.96%)	5 (1.42%)	6 (1.5%)
不詳	1 (1.96%)	24 (6.82%)	25 (6.2%)
<b>基因亞型</b>			
Subtype B	46 (90.2%)	314 (89.2%)	360 (89.32%)
CRF01_AE	4 (7.84%)	23 (6.53%)	27 (6.7%)
CRF07_BC	1 (1.96%)	12 (3.41%)	13 (3.23%)
其他	0 (0%)	3 (0.85%)	3 (0.75%)
<b>近期感染分析</b>			
Recent infection	19 (37.25%)	125 (35.51%)	144 (35.73%)
Long-term infection	32 (62.75%)	227 (64.49%)	259 (64.27%)

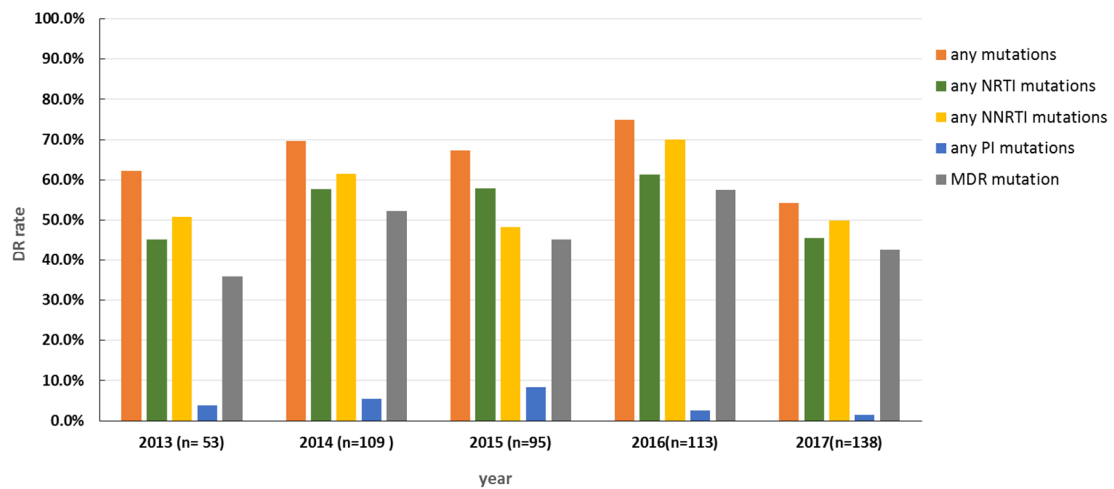
表五、2017 年 HIV-1 感染者治療失敗(Treatment failure)抗藥性統計

抗藥性分類	Resistance		Possible Resistance		Total Resistance	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
<b>Total: 138</b>						
Virus not detected:12 (8.7%)						
MDR mutation	70	(50.7)	17	(12.3)	59	(42.8)
any mutation	74	(53.6)	38	(27.5)	75	(54.3)
any <b>NRTI</b> mutation	61	(44.2)	22	(15.9)	63	(45.7)
any <b>NNRTI</b> mutation	68	(49.3)	31	(13.0)	69	(50.0)
any <b>PI</b> mutation	1	(0.72)	2	(1.45)	2	(1.45)

圖二、2013-2017 年新通報 HIV-1 感染者(Naïve)抗藥性趨勢



圖三、2013-2017 年 HIV-1 感染者治療失敗(Treatment failure)抗藥性趨勢



## 五、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(4):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(1):685-695.
3. Chen YM, Huang KL, Jen I, et al. Temporal trends and molecular epidemiology of HIV-1 infection in Taiwan from 1988 to 1998. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001;26(3):274-282.
4. Mauclore P. [HIV-1 group N in Cameroon and apparent viruses in the chimpanzee]. *Bull Soc Pathol Exot.* 2000;93(3):162.
5. Dillner L. HIV subtype may explain sexual transmission. *BMJ.* 1996;312(7030):530-531.
6. Lee CN, Wang WK, Fan WS, et al. Determination of human immunodeficiency virus type 1 subtypes in Taiwan by vpu gene analysis. *J Clin Microbiol.* 2000;38(7):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(4):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(10):1898-1904.
9. Tantillo C, Ding J, Jacobo-Molina A, 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(3):369-387.
10. Yadav PN, Yadav JS, Modak MJ. Nucleoside drug resistance in HIV-1 reverse transcriptase. *Nat Struct Biol.* 1995;2(3):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(2):89-100.
12. 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(14):1744-1752.
13. Maes B, Schrooten Y, Snoeck J, et al. Performance of ViroSeq HIV-1 Genotyping System in routine practice at a Belgian clinical laboratory. *J Virol Methods*. 2004;119(1):45-49.
  14. Mukaide M, Sugiura W, Matuda M, et al. Evaluation of Viroseq-HIV version 2 for HIV drug resistance. *Jpn J Infect Dis*. 2000;53(5):203-205.
  15. Cunningham S, Ank B, Lewis D, 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(4):1254-1257.
  16. Kuiken C, Korber B, Shafer RW. HIV sequence databases. *AIDS Rev*. 2003;5(1):52-61.
  17. Fujisaki S, Fujisaki S, Ibe S, et al. Performance and quality assurance of genotypic drug-resistance testing for human immunodeficiency virus type 1 in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2007;60(2-3):113-117.
  18. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PloS one*. 2009;4(3):e4724.
  19. Ng OT, Eyzaguirre LM, Carr JK, et al. Identification of new CRF51\_01B in Singapore using full genome analysis of three HIV type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(5):527-530.
  20. Ng OT, Munshaw S, Lamers SL, et al. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Singapore and identification of novel CRF01\_AE/B recombinant forms. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011;27(10):1135-1137.
  21. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med*. 2012;18(3):182-192.
  22. 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.
  23. Hurt CB, McCoy SI, Kuruc J, et al. Transmitted antiretroviral drug resistance among acute and recent HIV infections in North Carolina from 1998 to 2007. *Antivir Ther*. 2009;14(5):673-678.
  24. Grant RM, Hecht FM, Warmerdam M, et al. Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. *JAMA*. 2002;288(2):181-188.
  25. Hauser A, Hofmann A, Hanke K, et al. National molecular surveillance of recently acquired HIV infections in Germany, 2013 to 2014. *Euro Surveill*. 2017;22(2).
  26. Tostevin A, White E, Dunn D, et al. Recent trends and patterns in HIV-1

transmitted drug resistance in the United Kingdom. *HIV Med.* 2017;18(3):204-213.

27. Weinstein MC, Goldie SJ, Losina E, et al. Use of Genotypic Resistance Testing To Guide HIV Therapy: Clinical Impact and Cost-Effectiveness. *Annals of Internal Medicine.* 2001;134(6):440-450.



## 疾病管制署 107 年度科技研究計畫期末報告審查意見回復表

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-000121

計畫名稱：全國 HIV 抗藥性監測與評估策略

計畫單位：疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：楊志元

審查意見	意見回復	報告修正內容 (頁數)
無		