

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-000126

衛生福利部疾病管制署 106 年署內科技研究計畫

計畫名稱：全國 HIV 抗藥性監測與評估策略  
(WHO HIVDR 監測指標)

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、沈容均

執行期間：106 年 1 月 1 日至 106 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

封面

目錄

壹、計畫中文摘要 ..... 3

貳、計畫英文摘要 ..... 4

參、計劃內容：

一、研究簡介 ..... 5

二、材料與方法 ..... 8

三、結果與討論 ..... 14

四、圖表..... 16

五、參考文獻 ..... 20

共(21)頁

## 壹、計畫中文摘要：

關鍵字：人類免疫不全病毒， 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。同時，聯合國及 WHO 已明確宣示於 2020 年達成 HIV/AIDS 90-90-90 目標，而 HIV 抗藥性的出現勢必使終結 HIV/AIDS 疫情計畫受阻，病患感染抗藥性 HIV，將使其臨床症狀更加嚴峻甚至造成死亡，同時也將耗費更多醫療與公衛防治之資源，因此 WHO 強力建議所有國家應有長期有代表性的 HIV DR 監控計畫並建議策略目標。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疾病管制署各區管制中心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。

在感染 HIV-1 的新通報個案的抗藥性實驗計畫，根據 2016 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，並進行抗藥性分析，共完成 343 件檢測，抗藥性有 40 件(11.7%)，多重抗藥性有 7 件(2.0%)；此外，台灣已引進嵌入酶抑制劑(integrase inhibitor)當作臨床治療藥物，因此也進行其抗藥性檢測共 263 件，其中僅有 6 件有抗藥性(2.3%)。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，共收集檢體 80 件，其中有 60 件(75%)具有抗藥性相關之突變位點，較 2015 年增加(67.4%)，多重抗藥性有 46 件(57.5%)。針對近兩年具有多重抗藥性的個案以及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. This study will focus on the survey of primary HIV-1 drug-resistance prevalence (transmitted HIV DR). We will use methods of molecular epidemiology 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 second part will focus on acquired HIV DR, the patients who treat failure with highly active anti-retroviral therapy (HAART).

The distribution of the subtype among patients of naive HIV-1 infection was 343 in 2016. Among these 343 cases, 40 (11.7%) are drug-resistance, 7(2.0%) are multidrug-resistance, and the result is similar to 2015. The number of acquired HIV DR that patients who treat failure with highly active anti-retroviral therapy (HAART) was 80 cases in 2016, and the result is higher than 2015.

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，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)，嵌入酶(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。HIV-1 分成三大群: 主群 M(Major group)、局外群 O (outlier)、N 群(New group)，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 及新群 N 尚未分亞型。此三大群 M, O, N 其間差異達 50%以上。

#### \*愛滋病毒亞型

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<sup>4,5</sup>，而臺灣和泰國以 B 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>6</sup>。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，而不同亞型病毒遺傳因子的重組，將使病毒量測定更加複雜化，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>3,7</sup>。所以，研究追蹤台灣地區不同亞型病毒株的分布及抗藥性情形對於未來人類免疫不全病毒的診斷與治療有其重要性。

#### **\*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>8,9</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>10,11</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以下幾類：第一類主要是抑制病毒蛋白酶活性(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)、第四類是抑制嵌入酶活性(integrase inhibitors, INIs)。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:**

到 2017 年 11 月，依據衛生福利部疾病管制署的疫情調查資料顯示，台灣本國籍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 35,758 人，AIDS 發病人數為 16,687 人，因而致死的人數為 5,955 人。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。

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：男男間不安全性行為(MSM)、異性間不安全性行為及靜脈藥癮者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、異性間不安全性行為與靜脈藥癮者分別佔總數(至 2017 年 11 月底, TCDC 統計資料)之 81.73%，10.16%，1.84%。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 HIV-1 CRF07\_BC，而異性戀病患則是為 HIV-1 CRF01\_AE。因此對於不同亞型是否會因為危險行為之改變或是彼此間有交叉聚集，例如為了吸毒而去從事性交易，等因素，可能使得 HIV-1 基因亞型在不同危險族群之分佈變得複雜化，如此一來，使得依據其危險行為採取適當的防治措施，以避免 HIV-1 之擴散，故有必要在不同危險族群進行 HIV 基因亞型及抗藥性監測。在 HIV-1 的許多亞型中，最常出現抗藥性的是 subtype B 型 (約 11.4%)，而 subtype B 型正好是台灣新通報 HIV-1 感染比率最高的 subtype。藉此，從了解病人血液中 HIV-1 突變株對照參考病毒株所分析出來的抗藥性病毒基因序列，便是制定出新治療策略的關鍵因素<sup>12</sup>

## 二、材料與方法：

### 檢體的收集：

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 陽性檢體根據 2016 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 500 件，收集之個案必需為 2016 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)。



## 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>13</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 1μL 加入 2x one step Buffer 25 μL、PrimeScript one step Enzyme Mix 2 μL、10μM forward primer- 1-CV-F-44F (5'-ACAGTRCARTGYACACATGG-3') 和 reverse primer1-CV-R-35R (5'-CACTTCTCCAATTGTCCITCA-3')各 1 μL 的混合物中，並加入 RNase Free dH<sub>2</sub>O 至 50 μL，以 PCR machine 進行 50°C 30 分鐘，再 95°C 5 分鐘後，以 94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 90 秒，進行 50 次反應，最後在 72°C 作用 7 分鐘。
2. 巢式聚合酶連鎖反應：Nest-PCR：使用 TaKaRa 公司 SapphireAmp® Fast PCR Master Mix 將第一次 PCR 的產物取 2μL 當模板(template)加入 forward primer- 2-CV-F-33F (5'-CTGTTIAATGGCAGICTAGC-3')和 reverse primer 2-CV-R-48R (5'-RATGGGAGGRGYATACAT-3') (10 pmol/ul)各 1μL、ddH<sub>2</sub>O 6μL 至 2x PCR premix 中，以 PCR machine 進行 94°C 2 分鐘裂解後，以 94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 60 秒，進行 40 次反應，最後在 72°C 作用 7 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以 ETBR 染色後預期可見到約 525bp 的基因片段，再以 ABI 3730 定序儀作定序分析。

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>14</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™ HIV-1 Genotyping System (Celera Diagnostic, Abbott Laboratories, US)<sup>15</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™ 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>16,17</sup>，提供從血漿中分離病毒 RNA、進行反轉錄聚合酶鏈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  $\mu$ L 萃取出來的人類免疫不全病毒的 RNA，以莫洛尼鼠類白血病毒(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>18</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

根據HIV-1 pol基因設計引子<sup>19</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，再進行序列分析。

1. 反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)：針對 PR 及 RT 區域使用 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 2 $\mu$ L 加入 2x one step Buffer 10 $\mu$ L、PrimeScript one step Enzyme Mix 0.8  $\mu$ L、20 $\mu$ M primers 各 0.4  $\mu$ L 的混合物中，並加入 RNase Free dH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L，以 PCR machine 進行 50 $^{\circ}$ C for 30 分鐘、95 $^{\circ}$ C 5 分鐘；並以 94 $^{\circ}$ C 30 秒、55  $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 90 秒進行 50 次反應，最後在 72 $^{\circ}$ C 作用 7 分鐘。
2. 巢式聚合酶連鎖反應：Nest-PCR：使用 TaKaRa 公司 SapphireAmp<sup>®</sup> Fast PCR Master Mix 將第一次 PCR 的產物取 5 $\mu$ L 當模板(template)加入 forward primer 和 reverse primer (20 pmol/ul)各 1 $\mu$ L、2x PCR premix 25 $\mu$ L 並加入 RNase Free ddH<sub>2</sub>O 至 50 $\mu$ L，以 PCR machine 進行 94 $^{\circ}$ C 2 分鐘裂解後，以 94 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 60 秒，進行 40 次反應，最後在 72 $^{\circ}$ C 作用 7 分鐘。
3. 基因定序：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 464bp(PR region)及 888bp(RT region)的基因片段，再以 ABI 3730 定序

儀作定序分析,再以 MolecuLar Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 6.0 軟體進行基因序列 assemble。

4. 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/>) 之 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>14</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>20</sup>，對於 INIs 抗藥性則依據 Stanford University HIV DRUG RESISTANCE DATABASE。

HIV-1 RT and Protease Mutations for Drug-Resistance Surveillance*					
NRTIs		NNRTIs		PIs	
M41	L	L100	I	L23	I
K65	R	K101	E,P	L24	I
D67	N,G,E	K103	N,S	D30	N
T69	D,Ins	V106	M,A	V32	I
K70	R,E	V179	F	M46	I,L
L74	V,I	Y181	C,I,V	I47	V,A
V75	M,T,A,S	Y188	L,H,C	G48	V,M
F77	L	G190	A,S,E	I50	V,L
Y115	F	P225	H	F53	F,Y
F116	Y	M230	L	I54	V,L,M,A,T,S
Q151	M			G73	S,T,C,A
M184	V,I			L76	V
L210	W			V82	A,T,F,S,C,M,L
T215	Y,F,I,S,C,D,V,E			N83	D
K219	Q,E,N,R			I84	V,A,C
				I85	V
				N88	D,S
				L90	M

\*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:e4724.

Reference: [hivdb.stanford.edu/page/who-resistance-list/](http://hivdb.stanford.edu/page/who-resistance-list/)

Major Integrase Inhibitor (INI) Resistance Mutations									
	66	92	138	140	143	147	148	155	263
Cons	T	E	E	G	Y	S	Q	N	R
RAL	<b>AIK</b>	<b>Q</b>	<b>KAT</b>	<b>SAC</b>	<b>RCH</b>		<b>HRK</b>	<b>H</b>	K
EVG	<b>AIK</b>	<b>Q</b>	<b>KAT</b>	<b>SAC</b>		<b>G</b>	<b>HRK</b>	<b>H</b>	K
DTG	K	Q	KAT	SAC			<b>HRK</b>	H	K

**Bold underline:** High-level reduced susceptibility or virological response.

**Bold:** Low-level reduced susceptibility or reduced susceptibility or virological response.

Plain text: Reduced susceptibility in combination with other INI-resistance mutations.

**Abbreviations:** Dolutegravir (DTG), elvitegravir (EVG), raltegravir (RAL).

**Additional mutations:** H51Y, L74M, T97A, S153YF, Q15C, G163RK, and S230R are relatively nonpolymorphic RAL and/or EVG-selected accessory resistance mutations. E92GV, G118R, F121Y, Y143KSGA, P145S, Q146P, and N155ST are rare nonpolymorphic IN mutations that reduce RAL and/or EVG susceptibility.

**References:** [hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/INSTI/](http://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/INSTI/)

### 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，2016 年新通報個案，完成 343 件血漿或血清檢體的 HIV-1 型別分析。有 314 件(91.55%)為 B 亞型，為主要流行之病毒亞型，另有 22 件(6.41%)為 CRF01\_AE 亞型、6 件(1.75%)為 CRF07\_BC 亞型，1 件(0.29%)為 C 亞型(表二)。

目前我國感染 HIV-1 陽性患者的治療(Antiretroviral Therapy,ART)多採用複方藥，亦即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，而隨著藥物發展，含有嵌合酶抑制劑(Integrase Inhibitor, INI)的複方藥也列為我國一線推薦處方中<sup>21</sup>。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 ART 輕度到重度的抗藥性。

HIV-1 原生抗藥性盛行率之監測方面，主要以實驗室自行設計 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；共分析 343 件 2016 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 40 件具有抗藥性(11.7%)(表三)，較 2015 年(10.7%)增加。其中 NRTIs 抗藥性為 3.5%(12 件)、NNRTIs 為 9.9% (34 件)，而 PIs 為 0.9%(3 件)。分析 2012-2016 年抗藥性分析趨勢(圖二)，可發現具有任一抗藥性及對 NNRTIs 抗藥性的百分比皆較 2015 年上升，可能原因除本年度分析件數較往年高之外，仍須注意後續變化。根據 WHO 發表之文獻指出，當感染者有 NNRTI 抗藥性出現時較難成功達到病毒量抑制、藥物治療失敗、中斷治療、甚至產生新的 acquire HIV DR 抗藥性位點，因此若要達到 WHO 設定的 90-90-90 目標時，HIV 抗藥性監測就顯得相對重要<sup>22</sup>。此外，由於 INIs 也已列為我國一線推薦處方中，因此也進行 INIs 的抗藥性分析，共完成 263 件分析，其中抗藥性為 7 件(2.7%)，未來也將會持續監測 INIs 的抗藥性，以了解此類藥物抗藥性的嚴重程度，藉此提供給權責疾病組評估推薦處方。

依據 WHO 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>23</sup>。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<sup>24</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 HART 藥物治療失敗之 HIV-1 病患之抗藥性分析方面，以亞培廠商所提供 ViroSeq™ HIV-1 Genotyping system kit (FDA、CE、衛福部 IVD) 進行分析。2016 年共收集檢體 113 件，然而其中有 33 件(29.2%)之病患病毒量太低無法進行後續分析。可以完整進行抗藥性分析的共 80 件，其中有 60 件(75%)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 70%，61.3%)，PIs 類別偵測案例最少(2.5%)(表四)；而其中仍有 20 件(%)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 2012-2016 治療失敗抗藥性趨勢(圖三)，可觀察到除了 PIs 類別之抗藥性有下降外，NRTIs 與 NNRTIs 抗藥性比例皆較 2015 年上升。這些數據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。

另外，由於亞培廠商的 ViroSeq™ HIV-1 Genotyping system kit 套裝試劑所費不貲，因此實驗室參考日本 NIID In-House 的實驗方法進行 HIV-1 原生抗藥性監測，由於日本主要流行的 HIV-1 亞型為 B 亞型與台灣相似，同時並已利用此方法在日本國內進行抗藥性監測，因此期望透過其他國家已累積的經驗改善現有實驗條件，進行 HIV-1 原生抗藥性監測，而今年原生抗藥性分析的數量已達 343 件，佔所有當年通報人數 14.3%，較去年 8.9% 多，也代表此 In-House 的實驗方法可在有限的計畫經費下進行更具有整體代表性的抗藥性監測。



四、圖表

圖一、愛滋病毒結構與感染史(infection cycle)

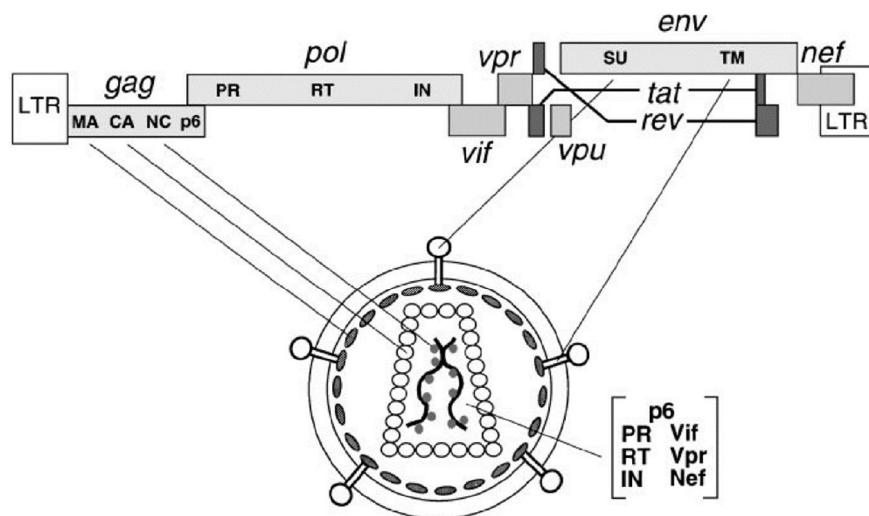
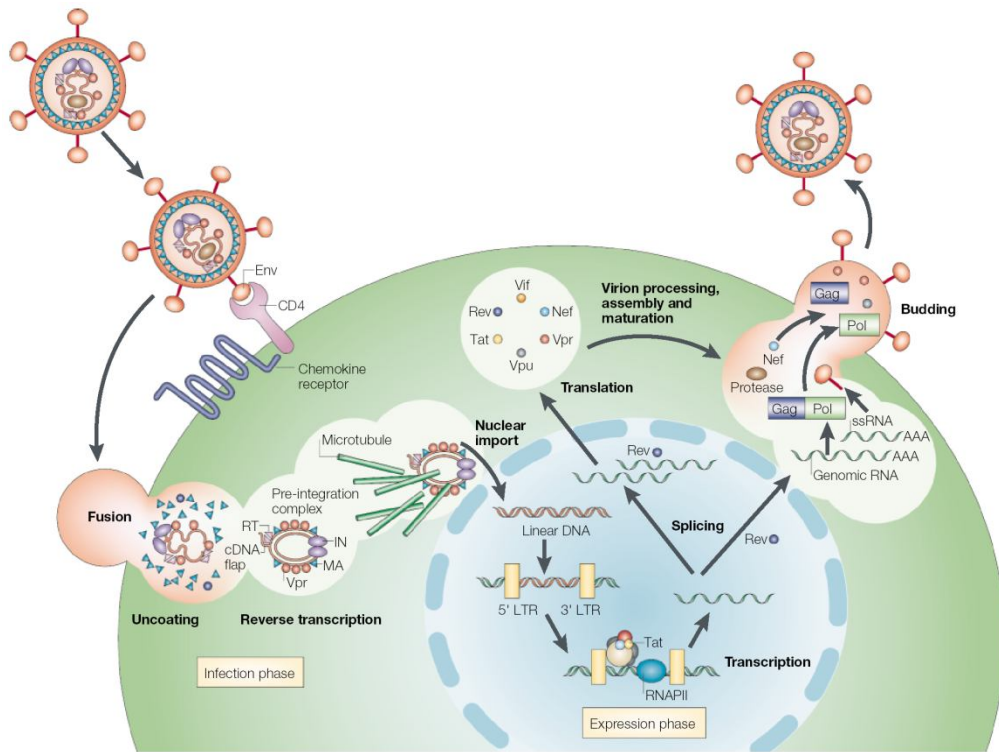


Figure 1 Organization of the HIV-1 genome and virion.



表一、2016年抽樣之新通報 HIV-1 感染者(Naïve)抗藥性相關基本資料

年度	2016年 (新通報個案 N=2396)	
	抽樣樣本	實際檢測樣本
檢驗數, 占全年新通報個案百分比(%)	500 (20.87%)	343 (14.31%)
年齡(HIV診斷年齡)		
平均值 ± 標準差	31.0± 9.6	31.1± 9.9
性別		
男性	485 (97.0%)	334 (97.3%)
女性	15 (3.0%)	9 (2.6%)
地區(居住縣市)		
北部	270 (54.0%)	193 (56.27%)
中部	103 (20.6%)	58 (16.91%)
南部	117 (23.4%)	82 (23.91%)
東部	10 (2.0%)	10 (2.91%)
危險行為		
男男間性行為	422 (84.4%)	296 (86.3%)
異性間性行為	47 (9.4%)	35 (10.2%)
注射藥癮	17 (3.4%)	3 (0.9%)
不詳	14 (2.8%)	9 (2.6%)

表二、2015年檢測新通報 HIV-1 感染者(Naïve)病毒型別分佈

subtype	件數 (%)
B	314 (91.55%)
01_AE	22 (6.41%)
07_BC	6 (1.75%)
C	1 (0.29%)
Total	343 (100%)

表三、2016 年新通報 HIV-1 感染者(Naïve)抗藥性比例

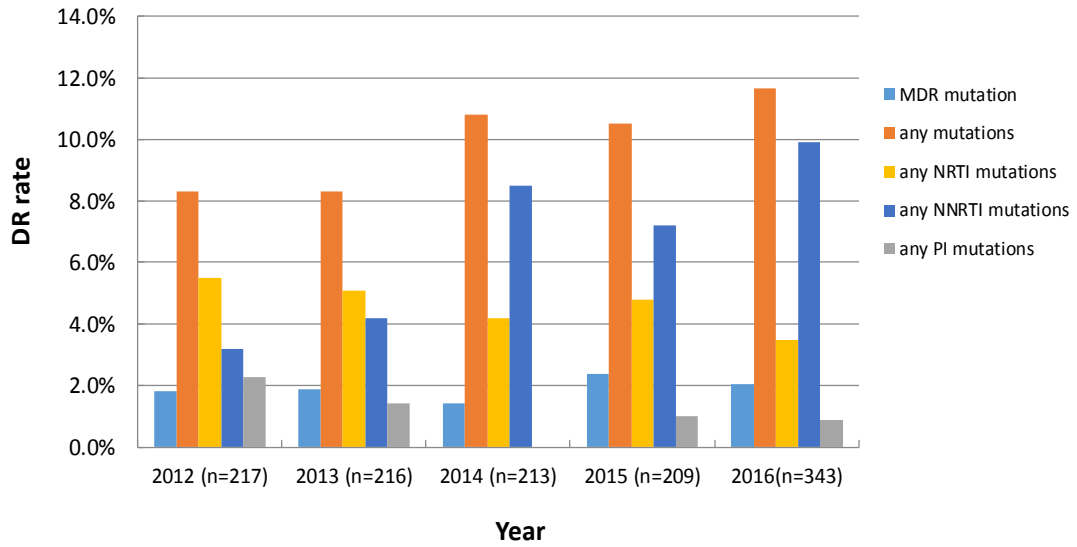
抗藥性分類	Resistance		Possible Resistance		Total Resistance	
	n	%	n	%	n	%
<b>Total:</b> 343						
MDR mutation	7	2.0	4	1.2	7	2.0
any mutation	25	7.3	15	4.4	40	11.7
any <b>NRTI</b> mutation	2	0.6	10	2.9	12	3.5
any <b>NNRTI</b> mutation	25	7.3	9	2.6	34	9.9
any <b>PI</b> mutation	1	0.3	2	0.6	3	0.9

表四、2016 年 HIV-1 感染者治療失敗(Treatment failure)抗藥性統計

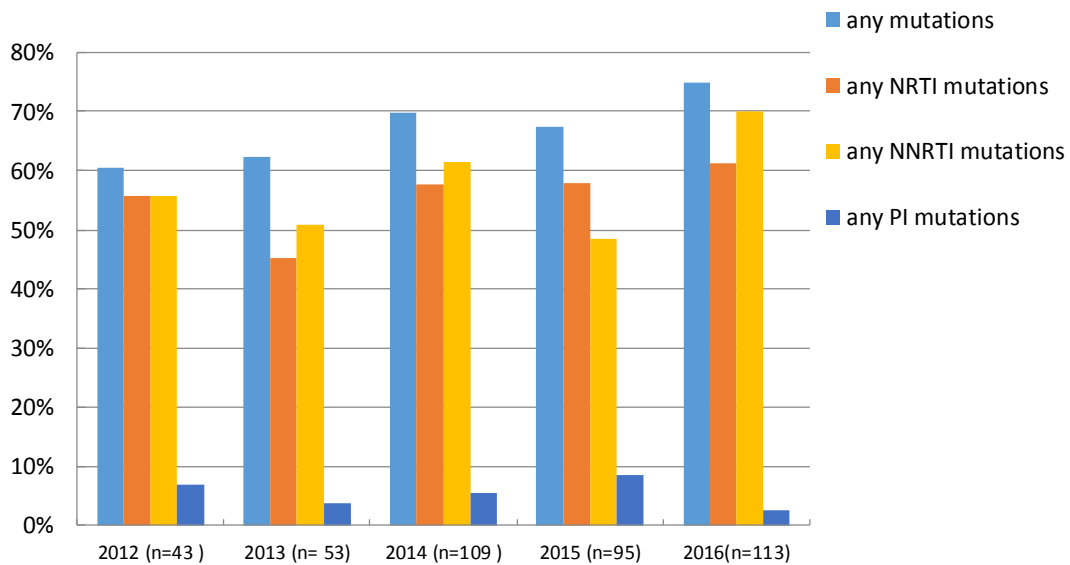
抗藥性分類	Resistance		Possible Resistance		Total Resistance	
	n	%	n	%	n	%
Total: 113						
Virus not detected:33 (29.2%)						
MDR mutation	46	57.5	0	0.0	46	57.5
any mutation	58	72.5	2	2.5	60	75.0
any <b>NRTI</b> mutation	48	60.0	1	1.3	49	61.3
any <b>NNRTI</b> mutation	54	67.5	2	2.5	56	70.0
any <b>PI</b> mutation	2	2.5	0	0.0	2	2.5

(資料庫: Viroseq v3.0, Abbott, 2016)

圖二、2012-2016 新通報 HIV-1 感染者(Naïve)抗藥性趨勢



圖三、2012-2016 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. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N Engl J Med.* 2008;358(15):1590-1602.
5. Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *Journal of virology.* 2007;81(19):10209-10219.
6. Dillner L. HIV subtype may explain sexual transmission. *BMJ.* 1996;312(7030):530-531.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Yadav PN, Yadav JS, Modak MJ. Nucleoside drug resistance in HIV-1 reverse transcriptase. *Nat Struct Biol.* 1995;2(3):193-195.
12. Hirsch MS, Gunthard HF, Schapiro JM, et al. Antiretroviral drug resistance

- testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *Clin Infect Dis*. 2008;47(2):266-285.
13. 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.
  14. 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.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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.
  18. Kuiken C, Korber B, Shafer RW. HIV sequence databases. *AIDS Rev*. 2003;5(1):52-61.
  19. 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.
  20. 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.
  21. 衛生福利部疾病管制署. 抗人類免疫缺乏病毒藥品處方使用規範. 2017; <http://www.cdc.gov.tw/professional/info.aspx?treeid=7B56E6F932B49B90&nowntreeid=67CCCCD371D8DD79&tid=E101D8EABB1B7AB7>.
  22. Organization WH. *HIV drug resistance report 2017*. 2017.
  23. 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.
  24. 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.