計畫編號：MOHW104-CDC-C-315-000301

衛生福利部疾病管制署 104 年署內科技研究計畫

計畫名稱：HIV 抗藥性及異性戀 HIV 基因型別研究

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：陳昶勳、高振峰

執行期間：104 年 1 月 1 日至 104 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

中文摘要：..... 3

英文摘要：..... 5

計劃內容:..... 6

一、研究簡介:..... 6

二、材料與方法:..... 9

三、結果與討論..... 18

四、圖表..... 20

圖一、愛滋病毒結構與感染史(infection cycle)..... 20

表一、2014 年 檢測愛滋新感染病患抗藥性相關基本資料..... 21

表二、2014 年 檢測愛滋新感染病患抗藥性型別分佈..... 22

表三、2014 年 檢測愛滋新感染病患近期感染率分析..... 22

表四、2014 年愛滋 naive 病患抗藥性..... 23

表五、2010-2014 新通報 HIV-1 感染者(Naïve)抗藥性趨勢..... 24

表六、2014 愛滋治療失敗抗藥性統計..... 25

表七、2010-2014 HIV-1 感染者治療失敗(Treatment failure)抗藥性趨勢..... 25

五、參考文獻..... 27

中文摘要：

關鍵字：HIV,　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。因此，本項研究計畫第一部份將着力於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 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，此外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,便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 基因亞型監測！。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。

計畫第二部份將針對國內之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(Acquired HIV DR)做探討，藉由針對第一線 HAART 藥物治療失敗病患之抗藥性監測及建立資料庫，並且將檢測結果提供給臨床醫師參考，也可作為本局第二線用藥審查通過與否之重要參考數據。藉本計劃的執行，研究結果將有助於了解 HIV-1 抗藥性在臺灣之嚴重程度，以及 HIV 抗藥性之造成因素及其所帶來之衝擊和影響。並探討何種策略能有效解決抗藥性升高之問題。我們能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 2014 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 213 件檢測，抗藥性有 23 件(10.8%)，多重抗藥性有 3 件(1.4)，較 2013 年增加。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 109 件，較 2013 年 89 件增加，其中有 76 件(69.7%)具有抗藥性相關之突變位點，也較 2013 年增加(56.6%)。多重抗藥性有 57 件(52.3%)。針對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。

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 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 213 in 2014. Among the 213 cases, 23 (10.8%) are drug-resistance, 3(1.4%) are multidrug-resistance. The number of patients who treat failure with highly active anti-retroviral therapy (HAART) was 109 cases in 2014. Both of the transmitted HIV DR and acquired HIV DR are all higher than 2013.

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

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 [1]；*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(recepter)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[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脢的活性(Protease inhibitor, PI)。第二類是以擬似核苷酸衍生物的方式，來抑制反轉錄脢的活性(nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTIs)。第三類是以非擬似核苷酸衍生物的形式，來抑制反轉錄脢的活性(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:**

到 2015 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 31,644 人，發病人數為 13,876 人，因而致死的人數為 4,946 人。而 2014 年感染 HIV-1 的主要危險行為為同性間性行為(MSM)有 1,717 人(76.8%)、異性間性行為 251 人(11.2%)，雙性間性行為 185 人(8.3%)，以及注射藥癮者 54 人(2.4%)。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：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 2014 年 7 月底, TCDC 統計資料)之 46.42%，18.82%，24.46%。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，便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 基因亞型監測！然而因為過去幾年在異性戀患者發現有 B 亞型(MSM 盛行之型別)之出現，為調查此一族群感染其他基因亞型是否有升高之趨勢，將對可回收之異性戀患者皆進行 Genotyping。

二、材料與方法:

檢體的收集:

2013 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 217 件，收集之個案必需為 2013 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

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€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蔭乾後黏貼。

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 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˚C15 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 10 uM 各 1.5 uL 的混合物中，補水至 50 uL，以 ABI 9700 PCR machine 進行 94˚C5 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ViroSeqTM 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 ViroSeqTM 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，ViroSeqTM 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，須先經由反轉錄脢作用，反轉錄成 cDNA 後，再經由聚合脢連鎖反應(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，進行反轉錄脢反應(65℃ for 30 seconds, 42℃

for 65 min., 99℃ for 5 min.)，完成後所得之 cDNA 可接著進行聚合脢連鎖反應，或保存於-20˚C 冷凍櫃。

3. 聚合酶鏈鎖反應

將所有反轉錄作用所獲得之 cDNA 以 AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, Calif.)進行聚合脢連鎖反應(50℃ for 10 min., 93℃ for 12 min., 93℃ for 20 seconds, 64℃ for 45 seconds, 66℃ for 3 min., 72℃ 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 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。

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[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/)分析，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%[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]。

發生率實驗

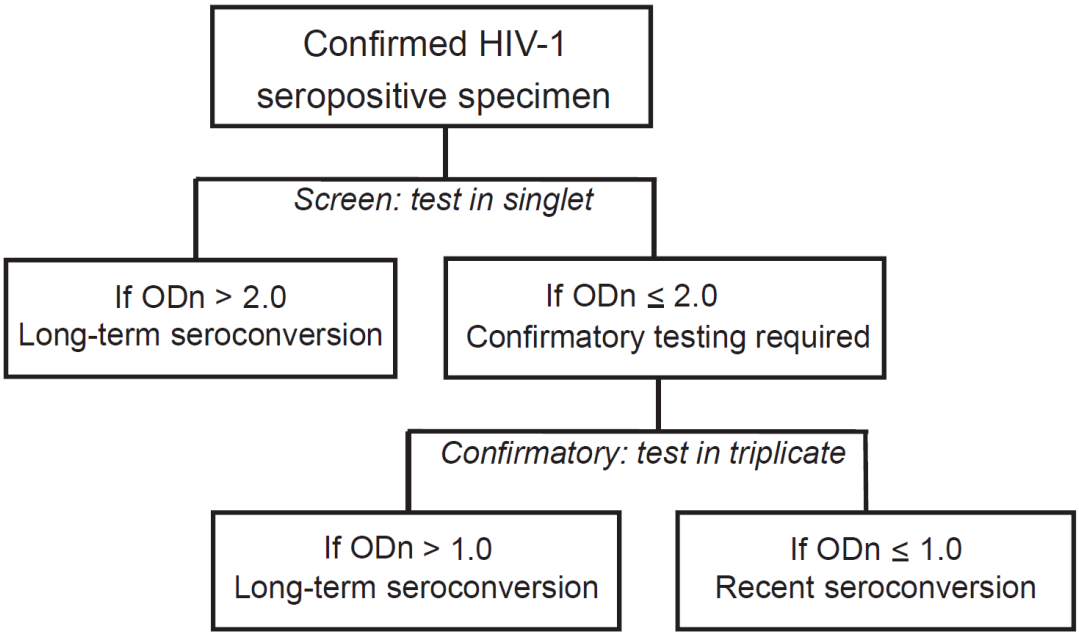
使用Sedia™ HIV-1 LAg-Avidity EIA進行發生率分析。將待測檢體與對照組檢體1：101倍稀釋，將以稀釋過之100 μl檢體及對照組移至反應盤，放進37℃溫箱，1小時。反應1小時後，以自動清洗機清洗兩次，反轉後再清洗兩次，每孔以300 μl清洗，每次間隔10秒，最後一次以拭手祇包住反應盤翻轉，用力拍打以移去多餘水分。使用多管分注器加入200 μDissociation Buffer到每反應孔，37℃靜置15分鐘。以上述方法清洗反應盤，再用多管分注器加入100 μl稀釋過之anti-Human IgG-HRP(1:1001稀釋)至每一反應孔，靜置37℃ 時間30分鐘。反應完成後，再以上述方法清洗反應盤，洗後加入100 μl TMB受質於每一反應孔，25℃靜置15分鐘，再以分注器加入100 μl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) ÷ (ODcalibrator之中位數)

ODn 檢體1= (ODn 檢體1) ÷ (ODcalibrator之中位數)

檢體一開始只做one well，如果ODn >2.0，檢體來源就判定是long-term seroconversion。若檢體ODn≦2.0就需要做三重複來確認其值。在確認的試驗中，檢體ODn≦1.0就會被認定是recent seroconversion。如果ODn >1.0，檢體來源就判定是long-term seroconversion。



發生率分析

依據U.S. Centers for Disease Control and Prevention, the Office of the Global AIDS Coordinator and the UNAIDS/WHO Working Group on Global HIV/AIDS and STI Surveillance建議的公式計算 HIV-1年藥癮者以及同性間性行為族群發生率。使用下列的公式來計算該年發生率(incidence)：

$$I_F = \frac{R - (FRR * P)}{(1-FRR)\,\omega N} \times 100$$

I_F = annual HIV incidence rate
N = number of HIV-negative samples in the survey
P = number of HIV-positive samples in the survey
R = number of HIV-positive samples testing as recent on the test
ω = mean duration of recency for the test specified in years
FRR = false recent rate for the test

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，2014 年新通報個案，完成 213 件血漿或血清檢體的 HIV-1 型別分析。有 192 件(90.1%)為 B 亞型，為主要流行之病毒亞型，另有 12 件(5.6%)為 CRF01_AE 亞型、7 件(3.3%)為 CRF07_BC 亞型，2 件(0.9%)CRF01_AE/B(表二)。另外也進行 HIV-1 LAg-Avidity EIA，其中有 60.6%屬於 long-term infection(表三)，顯示部份個案已感染 HIV-1 一段時間，到去年才檢驗出陽性而納入通報。要如何讓這些個案儘早通報，接受治療與教育，是重要的議題。

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)，與非核甘酸反轉錄酶抑制劑(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。實驗以亞培廠商所提供 ViroSeq™ HIV-1 Genotyping system kit (FDA、CE、衛福部 IVD) 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 213 件 2014 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 23 件具有抗藥性(10.8%)(表四)，與 2013 年(8.3%)相比，有上升趨勢。其中 NRTIs 為 4.2%(9 件)、NNRTIs 為 8.5%(18 件)，而 PIs 則未檢測出有抗藥性。未能有 PI 抗藥性的原因可能為具有此類藥物抗藥性的個案本來就不多，可能因為採樣的誤差，而未能檢測到。分析 2010-2014 年抗藥性分析趨勢，可發現整體抗藥性以及 NNRTIs 較 2013 年上升，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

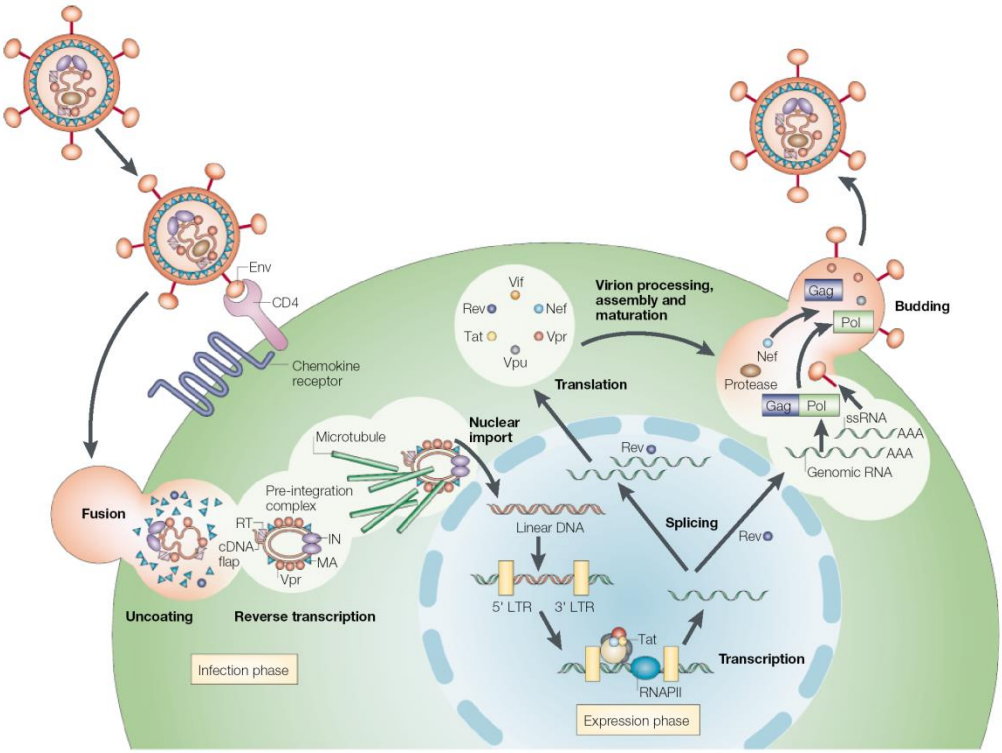
藥性檢測，以節省愛滋治療藥物支出[18]。而也有一些論文認為針對資源充足的高收入國家建議將 10%的原生抗藥性盛行率做為服藥前是否必須進行抗藥性檢測之標準門檻[19]。建議持續進行 HIV-1 抗藥性盛行率之監測，以了解本土之抗藥性流行趨勢。

關於 HARRT 藥物治療失敗之 HIV-1 病患之抗藥性分析方面， 2014 年共收集檢體 109 件，較 2013 年增加(83 件)，其中有 76 件(69.7%)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 61.5%，57.8%)， 而 PIs 類別偵測案例最少(5.5%)(表六)。然其中有 33 件(30.3%)之病患沒有發現任何 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 2010-2014 治療失敗抗藥性趨勢，可觀察到抗藥性比例較 2013 年上升，且 NNRTIs 及 NRTIs 也較 2013 年上升，與 naive 個案的抗藥性趨勢類似。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，本計畫為了對於當年度 HIV-1 抗藥性有初步的了解，進行了 23 件個案之抗藥性分析，有 3 件(13.0%)具有一個以上的抗藥性，較 2014 年升高，NNRTIs 及 NRTIs 之抗藥性突變分別為 13.0%，4.3%，但由於檢體規模不夠大，尚未具有代表性，將持續進行分析，以評估 2015 年整體之抗藥性變化。

四、圖表

圖一、愛滋病毒結構與感染史(infection cycle)



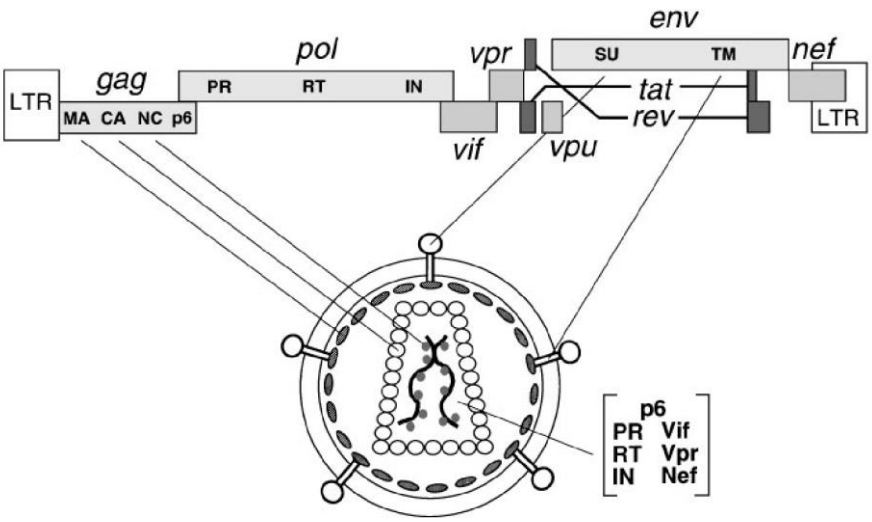


Figure 1 Organization of the HIV-1 genome and virion.

表一、2014 年 檢測愛滋新感染病患抗藥性相關基本資料

全年新通報個案		2,300	
檢驗數, 占全年新通報個案百分比(%)		213	(9.3%)
年齡			
	平均值±標準差	32.1± 9.9	
性別			
	男性	205	(96.2%)
	女性	8	(3.8%)
地區			
	北部	142	(66.7%)
	中部	31	(14.6%)
	南部	39	(18.3%)
	東部	1	(0.5%)
危險行為			
	男男間性行為	158	(74.2%)
	異性間性行為	21	(9.9%)
	雙性戀	17	(8.0%)
	注射藥癮	4	(1.9%)
	不詳	12	(5.6%)

表二、2014 年 檢測愛滋新感染病患抗藥性型別分佈

subtype	件數**(n,%)**
01_AE	12 (5.6%)
01_AE/B	2 (0.9%)
07_BC	7 (3.3%)
B	192 (90.1%)
Total	213(100%)

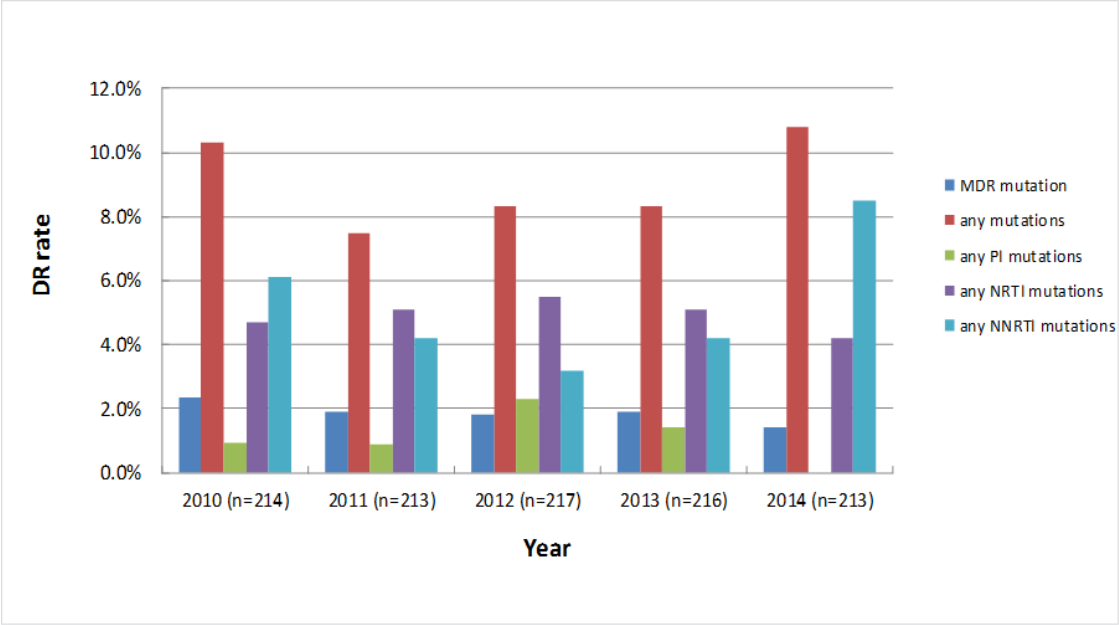
表三、2014 年 檢測愛滋新感染病患近期感染率分析

LAg-Avidity EIA	件數(n,%)
Long-term infection	129 (60.6%)
Recent infection	84 (39.4%)
Total	213(100%)

表四、2014 年愛滋 naive 病患抗藥性

Reported case: 2300						
	Resistance		**Possible resistance**		**Total resistance**	
Acquired data, coverage: 213, (9.26%)	n	%	n	%	n	%
MDR mutation	2	0.9%	1	0.5%	3	1.4%
any mutation	16	7.5%	7	3.3%	23	10.8%
any **NRTI** mutation	2	0.9%	7	0.0%	9	4.2%
any **NNRTI** mutation	15	7.0%	3	1.4%	18	8.5%
any **PI** mutation	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%

表五、2010-2014 新通報 HIV-1 感染者(Naïve)抗藥性趨勢

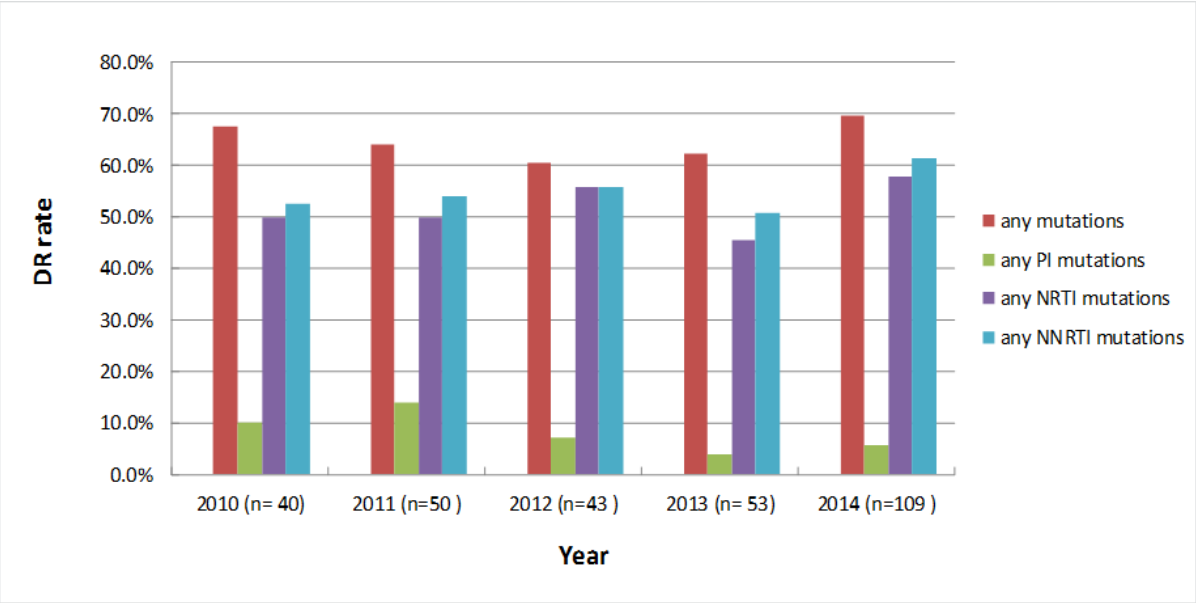


表六、2014 愛滋治療失敗抗藥性統計

Drug resistance among treatment failure Patients with HIV-1 Infection in Taiwan, 2014.

	Resistance		Possible Resistance		Total Resistance	
Acquired data: 109	n	%	n	%	n	%
MDR mutation	57	52.3%	0	0.0%	57	52.3%
any mutation	70	64.2%	6	5.5%	76	69.7%
any **NRTI** mutation	60	55.0%	3	2.8%	63	57.8%
any **NNRTI** mutation	61	56.0%	6	5.5%	67	61.5%
any **PI** mutation	5	4.6%	1	0.9%	6	5.5%
Virus not detected: 38 (25.9%)						

表七、2010-2014 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. Mauclere 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. 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.

13. 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.
14. 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.
15. Kuiken C, Korber B, Shafer RW. HIV sequence databases. *AIDS Rev.* 2003;5(1):52-61.
16. de Oliveira T, Deforche K, Cassol S, et al. An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics.* 2005;21(19):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(14):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, 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.