計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-000104

衛生福利部疾病管制署 108 年署內科技研究計畫

計畫名稱：HIV 新感染者抗藥性長期追蹤調查

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、林雨頡

執行期間：108 年 1 月 1 日至 108 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

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 10

三、結果與討論 19

四、圖表 21

五、參考文獻 25

共(28)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 2018 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 401 件檢測，基因亞型仍以 B 亞型為主(89.5%)，其次分別為 CRF 07_BC (5.2%)及 CRF01_AE (4.2%)。進一步進行抗藥性分析：抗藥性有 53 件(13.2%)，較去年 12.7%有些微上升、多重抗藥性有 9 件(2.2%)，同時檢測 360 件 Integrase Inhibitors 分析，其中有 12 件(3.0%)有抗藥性，相較去年的抗藥性(0.89%)比例，今年有明顯增加。整體而言，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 401 in 2018. Among the 401 cases, subtype B is most common subtype in Taiwan (89.5%), 53 (13.2%) are drug-resistance, 9(2.2%) are multidrug-resistance. According to our previous data, the transmitted HIV DR are higher than 2017.

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[1,2]。HIV 之 RNA 兩端各有一段 LTR(long terminal repeats)，共有 9 個基因，全長約為 9.2kb，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能夠組成 Capsid 的 p24、組成 Matrix 的 p17、組成 nucleocapsid 的 p7、p6、p2 及 p1[3]；*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，為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。

愛滋病毒的基因型別可分為第一型 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(SIVcpz)較為相似。HIV-1 又可再分成主群 M (Major group)及局外群 O (outlier)、N 群 (non-M, non-N)、以及 P 群 (putative)。近年在西非喀美隆(Cameroon)發現的新型別暗示 HIV 有可能源自於 SIV[4]：1995 年 5 月一名喀美隆婦女因腸胃症狀住院，亦帶有大腸黴菌感染，其檢體送到巴黎作病毒培養發現 non-M/non-N 的新型(群)病毒，命名為 N[5]；隨後，在喀美隆又在一名感染 HIV 的婦女身上發現一與大猩猩的免疫缺陷病毒(SIVgor)相近的新型別，於 2009 年發表命名為 P[4,6]。三大群 M、O、N 其間差異達 50%以上。

愛滋病毒亞型：

HIV 病毒在反轉錄酶作用下進行大量病毒複製，缺乏 proof-reading 的複製機制造成高機率的病毒核酸變異及重組，使得 HIV 病毒亞型有著高度多樣性。在 HIV-1 各群之下，主群 M 根據 *env* 基因的差異又分為十個亞型 A 至 K[7]，其彼此差異約在 20%以上 [3,8]；局外群 O 尚未分亞型。此外亦存在有 M 群與 O 群間或 M 群不同亞型間基因重組 URFs (unique recombinant forms)，當 URFs 型別達到一定的流行程度，該型別便提升成為 CRFs (circulating recombinant forms)；而 CRFs 和不同亞型或不同 CRFs 之間亦有可能進一步重組，成為 SGRs (second generation recombinants)[9-12]。

目前全球各個亞型的流行分布跟地區有關，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，不同亞型亦盛行於不同的族群，而且跟性別、性行為的模式與傳染途徑對愛滋病毒型別多樣性有所影響 [11,13]。

藉由 HIV-1 基因的亞型鑑定分析，可得知 HIV-1 全球性的演化複雜性以及分佈的區域，HIV 基因亞型個別流行的型態可能緊鄰而存在。HIV-1 亞型與感染的途徑、傳播的方式有關，且不同 HIV-1 亞型在人體中產生的自然突變點以及對於藥物耐受性也有差異 [8,14]，因此對於疫苗的研發也尤其重要。目前病毒亞型的鑑定分析對於 HIV 相關研究，包含愛滋疾病的治療用藥以及公衛方面的疾病預防監測是非常重要的一環。

愛滋病毒蛋白質酶 (Viral protease)：

愛滋病毒蛋白質酶全長為 297 bp，由 99 個胺基酸所組成的單體(monomer)分子量為約 11 kD，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 [15,16]。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 (66 kDa)和 p51 (51 kDa)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[17,18]。

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 inhibitors, PIs)；第二類是以類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)；第三類是以非類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。台灣目前已核准引進了包括 NRTIs、NNRTIs、PIs、嵌入酶抑制劑(integrase inhibitors, IIs)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。一如前述，因 HIV 病毒的高度變異性影響使基因亞型有著高度多樣性，而這些抗藥性病毒株的產生會促使病人體內

的病毒量快速增加、患者體內的病毒無法被藥物完全地抑制，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。

抗藥性與暴露愛滋病毒前預防性投藥(Pre-exposure Prophylaxis, PrEP)：

美國 FDA 於 2012 年核准能夠預防性感染 HIV 的口服藥物，以 Tenofovir Disoproxil Fumarate (TDF)合併 Emtricitabine (FTC)使用於暴露愛滋病毒前預防性用藥(Truvada®)，提供尚未感染 HIV 的高風險行為族群每日服用，並建議使用者每 3 個月定期追蹤是否感染[19]。尚未感染 HIV 者在正確使用 PrEP 的情況下並不會造成愛滋病毒抗藥性的增加。然而預防性投藥的成效仍有賴於個案遵從醫囑服用，且 PrEP 無法預防其他同樣以體液傳染之疾病或因親密接觸而感染的性病，因此在性傳染病防治部分仍建議每 6 個月進行篩檢[20]，搭配適當的安全防護措施已達到最好的疾病預防成效。

另一方面，雖然服用 PrEP 藥物可預防 HIV 感染，並不會造成 HIV 抗藥性廣泛的增加，然而全球仍有極少數案例分析顯示具有原生抗藥性的 HIV 病毒，例如在 M184V、K65R、K103N、K103S 等位點有突變的病毒株，仍有機率造成 PrEP 服用者受感染[21-25]。目前亦觀察到已感染 HIV 患者如再繼續使用預防性投藥，可能會使人體抗體陽轉進程變慢、病毒量較低，影響實驗室數據及臨床上的判斷[26-28]。基於以上幾點，一旦服用 PreP 藥物的個案感染 HIV 後，應立即停止使用 PreP 藥物，並經醫師評估進行雞尾酒療法；而對於臨床數據上難以判定是否已感染的感染者，建議在持續服用 PrEP 的同時進行進一步的 HIV 檢測、或是開始抗病毒藥物治療並進行確認試驗、或是停止用藥一段時間以釐清個案體內愛滋病毒感染情形[29]。

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：

過去國外的研究指出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分析其體內病毒原生抗藥性之情形，除了可以瞭解病毒於宿主體內自然變異性亦可瞭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。

截至 2019 年 10 月底，依據衛生福利部疾病管制署的愛滋病統計資料 HIV 月報顯示，臺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 39,422 人，AIDS 發病人數為 18,789 人，因而致死的人數為 6,722 人。而 2018 年當年度感染 HIV-1 個案中，主要危險行為為男男間性行為(MSM)有 1,712 人(85.99%)、異性間性行為有 209 人(10.5%)，以及注射藥癮者(IDU)有 43 人(2.16%)。

臺灣歷年累積個案依感染 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，分別佔總數之 64.84%，15.8%，17.98%（截至 2019 年 10 月底，TCDC 統計資料）。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，IDU 主要為 CRF07_BC，而異性戀病患則主要感染 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，必須透過一定期間的廣泛分析才能綜觀瞭解，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。

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 基因型別及原生抗藥性是否出現變化，甚至是否出現外來之病毒基因型別。

二、材料與方法:

(一) 檢體的收集：

2018 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 401 件，收集之個案必需為 2018 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)。

(二) HIV 血清學檢測－西方墨點法：

由於發生率實驗所需檢體必須是血清學陽性且未經抗反轉錄病毒藥物治療(ART)才可進行[30]，故必須進行西方墨點法以確認個案檢體中是否存在抗 HIV 抗體。此方法使用的是 Mikrogen 公司製造之 *recom*Line HIV-1 & HIV-2 IgG 套組，原理為利用電泳原理，將高度純化的愛滋病病毒蛋白質抗原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固定至硝化纖維膜試紙，當檢體中含有抗 HIV 抗體時，便會與試紙上的抗原以及結合液中以 HRP 標記的抗人類免疫球蛋白抗體(anti-human immunoglobulin antibodies, IgG)結合，當以呈色劑培養後即呈現對應不同 HIV 抗原的色帶，表示存在有與之相對應存於人體血清或血漿中的抗體。詳細方法步驟如下：

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 μL 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。

(三) 發生率實驗：

使用 Sedia™ HIV-1 LAg-Avidity EIA 試劑對已確認為血清學陽性且未經 ART 的個案檢體進行發生率分析，此試劑為美國疾病管制中心將此產品授權給 Sedia Biosciences 製造生產。試驗原理是建立在對人體暴露於愛滋病毒後所產生反應的觀察，在感染愛滋病毒初期，免疫系統會產生對愛滋病毒低親和力抗體(low avidity HIV-1 antibodies)，隨著感染時間增長，免疫系統趨於成熟並會產生對愛滋病毒高親和力抗體，因此，藉由此抗體在人體內的表現量，可加以推斷該個案屬於近期或長期感染 [31,32]。詳細步驟如下：

1. 將待測血清或血漿與對照組檢體以稀釋液 1:101 倍稀釋，取 100μL 稀釋後的檢體及對照組至反應盤，放進 37°C溫箱，反應 1 小時。
2. 使用自動清洗機以配製完成的清洗液清洗兩次，反轉後再清洗兩次，每孔以

300μL 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。

3. 使用多管分注器加入 200μL Dissociation Buffer 到每反應孔，37°C靜置 15 分鐘。
4. 以第 2 點步驟清洗反應盤，洗後使用多管分注器取 100μL 稀釋過之 anti-Human IgG-HRP(以稀釋液 1:1001 稀釋)加至每一反應孔，靜置 37°C 時間 30 分鐘。
5. 以第 2 點步驟清洗反應盤，洗後加入 100μL TMB 受質於每一反應孔，25°C靜置 15 分鐘。
6. 以分注器加入 100μL 終止溶液，停止反應之呈色。
7. 以 450 nm 波長，參考波長 620-650 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)，當檢體 ODn≦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。ODn 計算方法為：

$$ODn = \frac{(\text{OD of sample, Control, or Calibrator})}{(\text{median OD of Calibrator})}$$

OD 允收範圍	NC	CAL	LPC	HPC
Minimum	0.000	0.400	0.190	0.830
Maximum	0.175	0.950	0.520	1.820

ODn 允收範圍	NC	CAL	LPC	HPC
Minimum	0.000	1.000	0.370	1.500
Maximum	0.240	1.000	0.700	2.400

(四) 病毒 RNA 的萃取：

為進行後續感染者 HIV 序列分析，首先需先進行病毒 RNA 的純化，使用試劑為 QIAGEN® QIAmp Viral RNA Mini Kit (Cat. No. 52906)及 TANBead Nucleic Acid Extraction Kit (Cat. No. 665A46)。製備的病毒 RNA 可用於反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應(RT-PCR)。萃取步驟分別如下：

1. QIAmp Viral RNA Mini Kit 步驟：取處理過之檢體上清液 140uL 加入 560μL Lysis Buffer AVL 於室溫下作用 10 分鐘，再加入 560 μL 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 50μL AVE buffer (RNase Free elution buffer)將 RNA 溶出，置於-80°C待用。

2. TANBead Nucleic Acid Extraction Kit 步驟：取處理過之檢體上清液 300μL 及 proteinase K 10μL，加入試劑 column 位置 1 號，以 SLA-16/32、SLA-E132 系列機台萃取病毒 RNA，最後萃取出 80μL RNA，置於-80℃待用。

(五) HIV-1 亞型分析：

根據 HIV-1 C2V3(env)基因設計引子用於亞型分析，將以萃取好的病毒 RNA 以 RT-PCR 與 Nest-PCR 的方法來增幅引子[33]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-44F 和 reverse primer-35R 各 1 μL 的混合物中，並加入 RNase Free dH_2O 至 50 μL，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 分鐘，進行 45 次反應。

RNase-free dH_2O	20.0 μL
2x one-step buffer	25.0 μL
20μM Forward primer	1.0 μL
20μM Reverse primer	1.0 μL
PrimeScript one-step Enzyme Mix	2.0 μL
RNA	1.0 μL
total	**50 μL**

Reverse Transcription	55℃	30 min.	
Heat Denaturation	94℃	2 min.	
Denaturation	94℃	30 sec.	45 cycles
Annealing	50℃	30 sec.	
Extension	72℃	1 min.	
Storage	4℃	∞	

2. 巢式聚合酶連鎖反應(Nested-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)與 2x PCR premix 10μL、10μM forward primer-33F 和 reverse primer-48R 各 1μL 及 ddH_2O 6μL 混和均勻，以 PCR machine 進行 94˚C 3 分鐘裂解後，以 94˚C 30 秒、50˚C 30 秒、72˚C 1 分鐘，進行 35 次反應，最後在 72˚C 作用 7 分鐘。

RNase-free dH_2O	18.0 μL
2x PCR premix	25.0 μL
20μM Forward primer	1.0 μL
20μM Reverse primer	1.0 μL
RNA	2.0 μL
total	**50 μL**

Heat Denaturation	94°C	3 min.	
Denaturation	94°C	30 sec.	35 cycles
Annealing	50°C	30 sec.	
Extension	72°C	1 min.	
Additional Extension	72°C	7 min.	
Storage	4°C	∞	

3. 基因定序與演化樹分析：將 Nested-PCR 的產物以洋菜膠電泳分析預期可見到的基因片段(約 526bp)，委外完成核酸序列定序。再以 HIV-1 病毒分型工具資料庫 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%[34]。

(六) 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)[35] 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[36,37]，能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。以 7 個引子進行反應後得到約 1.3kb 的序列，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。

須注意 ViroSeq™ 系統僅能分析以 EDTA 抗凝劑處理的血漿檢體，並建議在採集全血 2 小時內離心分裝(1000-2000 x g 15min.)，分裝後 24 小時內可存放 2-8℃x 冷藏，之後應儲存於-80°C 備用。

1. 檢體 RNA 的萃取

將 0.5mL 的血漿以 2-8℃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(2-8℃)，再以震盪器充份混勻後，離心(15,000 x g for 5min.)，去除上清液，乾燥後加入冰的 50 uL RNA 稀釋液(2-8℃)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.)。在 RNA 進行反轉錄反應至 42°C 5 分鐘時，立刻手動暫停反應，並加入 10 μL RT Mastermix 混和均勻，再接續反應。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 與 30 μL AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, Calif.)混和均勻進行聚合酶連鎖反應(50°C for 10 min., 93°C for 12 min., 接著以 93°C for 20 seconds, 64°C for 45 seconds, 66°C for 3 min.反應 40 循環, 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電泳及純化

為了之後進行核酸定序反應，聚合酶連鎖反應之產物需先定量產物濃度並去除反應鹽類及引子，進而純化之。首先以含有 0.5μL/mL EtBr 的 1X TBE 配置電泳膠，

跑膠時定量用 DNA Mass Ladder 分別加入 6μL(lane 1)及 3μL(lane 2)作為參考值，檢體以 Agarose Gel Loading Buffer 稀釋(1:1)取 10μL 一起進行電泳，條件設置為 10V/cm。電泳結束後以紫外光照射確認目標產物含量至少達到 20ng，以確保後續定序結果的品質。

Bands		6 μL Lane (ng)	3 μL Lane (ng)
Location	Size (kb)		
Top	2.0	100	50
Second	1.2	60	30
Third	0.8	40	20

純化部分使用 Ex-S-Pure™ Enzymatic PCR Cleanup Kit，降解掉聚合酶鏈鎖反應產物中所含多餘的引子及核苷酸。以 5μL 產物+2μL ExS-Pure 的比例混和均勻後，以 37 ˚C 反應 4 分鐘，之後再反應 90 ˚C 1 min.，最後 hold at 4 ˚C，即完成純化步驟。純化後可存放-20 ˚C 保存備用。

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[38] 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。

(七) 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[39]用於基因序列

分析，將萃取好的病毒RNA以RT-PCR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)：將萃取出檢體中的人類免疫不全病毒的 RNA，經由 One-Step RT-PCR 反轉錄酶聚合酶連鎖反應作用(50℃ for 30 minutes; 95℃ for 5 minutes; 45 cycles of 94℃ for 30 seconds, 55 ℃ for 30 seconds, 72℃ for 1.5 minutes; 72℃ for 7 minutes and the final hold . at 4℃) 產生 cDNA 產物。

RNase-free dH_2O	6.4 μL
2x one-step buffer	10.0 μL
20μM Forward primer	0.4 μL
20μM Reverse primer	0.4 μL
PrimeScript one-step Enzyme Mix	0.8 μL
RNA	2.0 μL
total	**20 μL**

Reverse Transcription	50°C	30 min.	
Heat Denaturation	95°C	5 min.	
Denaturation	94°C	30 sec.	45 cycles
Annealing	55°C	30 sec.	
Extension	72°C	90 sec.	
Additional Extension	72°C	7 min.	
Storage	4°C	∞	

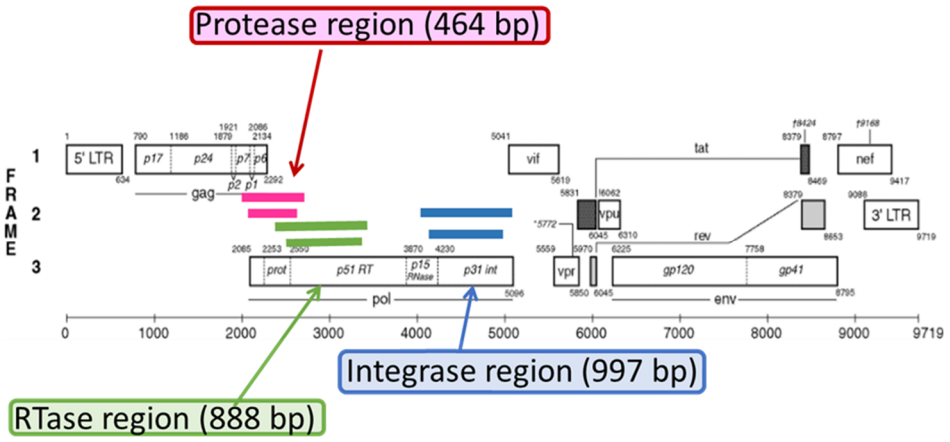
2. 巢式聚合酶連鎖反應(Nested-PCR)：將所有反轉錄作用所獲得之片段再以 DNA polymerase 進行巢式聚合酶連鎖反應（94℃ for 2 minutes; 40 cycles of 94℃ for 30 seconds, 55℃ for 30 seconds, 72 ℃ for 1 minutes; 72℃ for 7 minutes and the final hold at 4℃.)。接著以委外核酸序列分析完成定序自動偵測。

RNase-free dH_2O	18.0 μL
2x PCR premix	25.0 μL
20μM Forward primer	1.0 μL
20μM Reverse primer	1.0 μL
RNA	5.0 μL
total	**50 μL**

Heat Denaturation	94°C	2 min.	
Denaturation	94°C	30 sec.	45 cycles
Annealing	55°C	30 sec.	
Extension	72°C	1 min.	
Addition Extension	72°C	7 min.	
Storage	4°C	∞	

3. 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%[34]。抗藥性盛行率則依據 WHO 公布的抗藥性位點進行計算[40]，對於 INIs 抗藥性則依據上述序列分析使用的資料庫進行。此外，我們亦加計 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。

4. 定序用引子



Primer name	Sequence	HXB2 NO.
PR region (464 bp)		
DRPRO5	5’-AGA CAG GYT AAT TTT TTA GGG A-3’	2074-2095
DRPRO2Lv2	5’-TAT GGA TTT TCA GGC CCA ATT TTT G-3’	2716-2693
DRPRO1M	5’-AGA GCC AAC AGC CCC ACC AG-3’	2148-2167
DRPRO6	5’-ACT TTT GGG CCA TCC ATT CC-3’	2611-2592
RT region		
DRRT1L	5’-ATG ATA GGG GGA ATT GGA GGT TT-3’	2388-2410
DRRT29	5’-GGC TCT AAG ATT TTT GTC-3’	3058-3041
DRRT7L	5’-GAC CTA CAC CTG TCA ACA TAA TTG G-3’	2485-2509
DRRT28	5’-TGG AAT ATT GCT GGT GAT CC-3’	3031-3012
RT region		
DRRT26	5’-CAA AAA TTG GGC CTG AAA ATC C-3’	2692-2713
DRRT4L	5’-TAC TTC TGT TAG TGC TTT GGT TCC-3’	3425-3402
DRRT27	5’-AAC TCA AGA CTT CTG GCA AGT-3’	2798-2818
DRRT6L	5’-TAA TCC CTG CAT AAA TCT GAC TTG C-3’	3372-3348
ENV region (525bp)		
CV-F-44F	5’-ACAGTRCARTGYACACATGG-3’	6954-6973
CV-R-35R	5’-CACTTCTCCAATTGTCCITCA-3’	7648-7668
CV-F-33F	5’-CTGTTIAATGGCAGICTAGC-3’	7002-7021
CV-R-48R	5’-RATGGGAGGRGYATACAT-3’	7524-7541
INT region (998bp)		
Int597A	5'-CAG ACT CAC ART ATG CAT TAG G-3'	4039-4060
Int598B	5'-CCT GTC TAC YTG CCA CAC AA-3'	5085-5066
Int599A	5'-ATC ATT CAR GCA CAA CCA GA-3'	4062-4081
Int600B	5'-CCT GCC ATC TGT TTT CCA T-3'	5059-5041

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，2018 年新通報個案，完成 401 件血漿或血清檢體的 HIV-1 型別分析。有 359 件(89.5%)為 B 亞型，為主要流行之病毒亞型，另有 21 件(5.2%)為 CRF07_BC 亞型、17 件(4.2%)為 CRF01_AE 亞型、2 件(0.5%)為 CRF55_01B 亞型、1 件(0.3%)為 CRF02_AG 亞型、1 件(0.3%)為 CRF08_BC 亞型(表二)，其中 CRF55_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 [41,42]，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 CRF55_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 CRF02_AG 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 [11]，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。

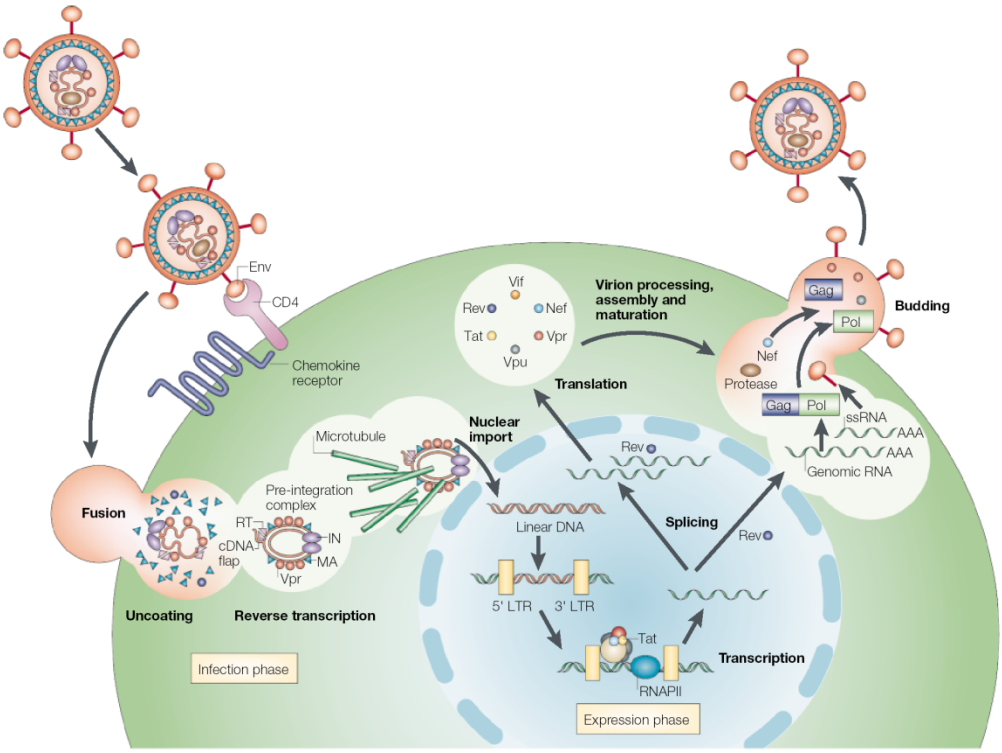
在愛滋病毒抗藥性分析方面，目前感染 HIV-1 陽性患者的治療方式多採用高效能抗反轉錄酶(Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART)，為結合蛋白質酶抑制劑、反轉錄酶抑制劑(Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, NRTI)，與非核苷酸反轉錄酶抑制劑(Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, NNRTI)，同時抑制愛滋病毒複製時所需要的兩個重要的酵素，然而一旦病患的服藥順從性不佳或同一種藥物服用時間太長，或是因為病毒複製過程中反轉錄(Reverse transcription)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。目前參考日本 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，因此也會加以分析 INIs 類藥物之抗藥性突變位點。同時根據 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以上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 401 件 2018 年未服用抗反轉錄病毒藥物之新通報個案 HIV-1 之基因序列，有 53 件具有抗藥性(13.2%)(表三)，相較過去幾年有逐年增加的趨勢 (2017 年為 12.7%、2016 年為 11.7%及 2015 年為 10.5%)。

其中 NRTIs 抗藥性為 3.5% (14 件)、NNRTIs 為 11.7% (47 件)、PIs 為 0.2% (1 件)，而 INI 為 3.0% (12 件)，與去年的 Integrase Inhibitors 抗藥性相比，今年 Integrase Inhibitors 抗藥性明顯上升 2.1%，針對近兩年分析 INIs 抗藥性比例皆有上升趨勢；分析 2014-2018 年抗藥性分析趨勢(圖二)，可發現整體抗藥性較 2017 年些微上升，後續是否持續上升，仍需持續觀察。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[43]，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%[44,45]、德國約 10.8%[46]、英國約 7.5%[47]。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[48]。此外，WHO 於 2017 年發表的 HIV 服藥前抗藥性指引中也指出，以 NNRTI 類藥物 efavirenz(EFV)及 nevirapine(NVP)的抗藥性盛行率是否大於 10%為標準來決定第一線用藥是否需調整[49]，由於 NVP 非我國第一線推薦處方，因此僅單純計算 EFV 抗藥性盛行率為 9%(圖三)建議持續進行 HIV-1 抗藥性盛行率之監測，以了解台灣之抗藥性流行趨勢。

關於 HARRT 藥物治療失敗之 HIV-1 病患之抗藥性分析方面， 2018 年共收集檢體 104 件，其中有 53 件(58.2%)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 50.5%，45.1%)，而 PIs 類別偵測案例最少(1.1%)(表四)。然其中有 13 件(12.5%)檢體病毒量太低無法檢測、38 件(36.5%)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 2014-2018 治療失敗抗藥性趨勢(圖四)，可觀察到抗藥性整體趨勢較 2017 年稍微上升，與篩選 naïve 的檢體個案抗藥性整體趨勢相符。這些 HIV-1 抗藥性監測數據皆持續觀察，並提供權責組擬定防疫政策之參考。

四、圖表



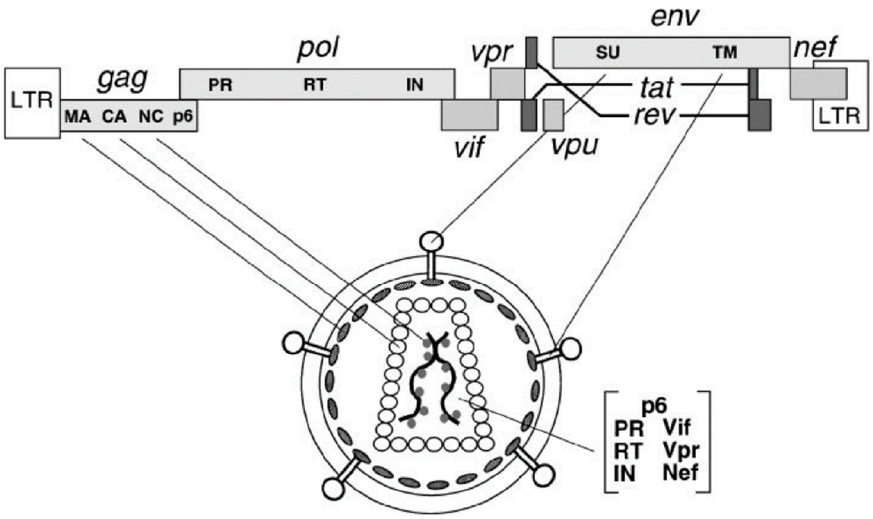


Figure 1 Organization of the HIV-1 genome and virion.

圖一、愛滋病毒結構與感染史(infection cycle)

表一、2018 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	1993	
檢驗數，占全年新通報個案百分比		401(20.1%)
年齡（診斷年齡）		
平均值 ± 標準差	31.6±9.7	31.9±9.8
性別		
男	1950 (97.8%)	395 (98.5%)
女	43 (2.2%)	6 (1.5%)
地區(管理縣市)		
北	1091 (54.7%)	218 (54.4%)
中	330 (16.6%)	71 (17.7%)
南	530 (26.6%)	102 (25.4%)
東	42 (2.1%)	10 (2.5%)
危險因子		
同性間不安全性行為	1631 (81.8%)	338 (84.3%)
異性間不安全性行為	203 (10.2%)	42 (10.5%)
注射藥癮者	42 (2.1%)	12 (3.0%)
不詳	117 (5.9%)	9 (2.2%)
母子垂直	0 (0.0%)	0 (0.0%)

表二、2018 年檢測愛滋新感染病患抗藥性行別分佈

subtype	件數	(%)
B	359	(89.5)
CRF01_AE	17	(4.2)
CRF 07_BC	21	(5.2)
CRF 55_01B	2	(0.5)
CRF 02_AG	**1**	(0.3)
CRF 08_BC	1	(0.3)
Total	401	(100)

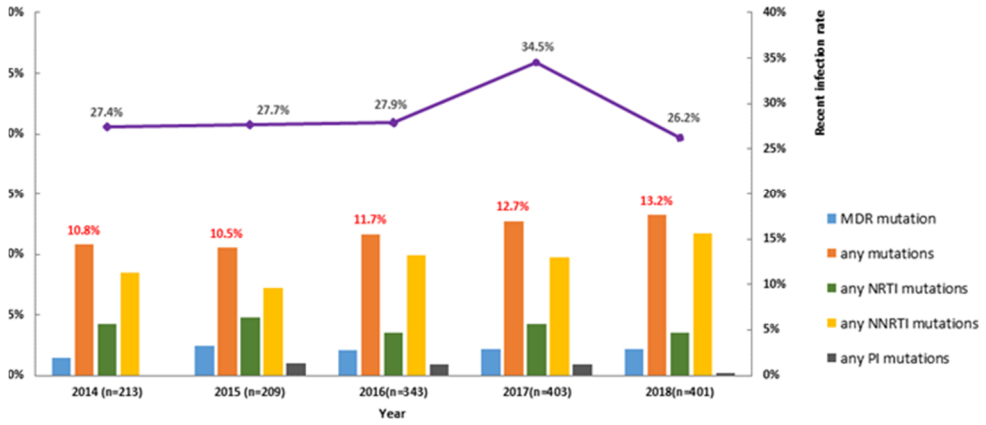
表三、2018 年新通報 HIV-1 感染者(Naïve)抗藥性統計

抗藥性分類	Resistance n	Resistance (%)	Possible Resistance n	Possible Resistance (%)	Total Resistance n	Total Resistance (%)
Total: 401						
MDR mutation	0	(0.0)	9	(2.2)	9	(2.2)
any mutation	26	(6.5)	46	(10.8)	53	(13.2)
any **NRTI** mutation	2	(0.5)	14	(3.5)	14	(3.5)
any **NNRTI** mutation	23	(5.7)	41	(10.2)	47	(11.7)
any **PI** mutation	1	(0.2)	0	(0.0)	1	(0.2)
Any **INI** mutation	1	(0.2)	11	(2.7)	12	(3.0)

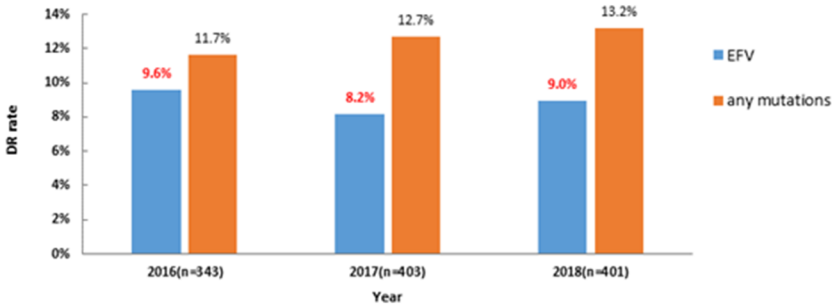
＊：INI mutation 檢測件數為 360 件

表四、2018 年 HIV-1 感染者治療失敗(Treatment failure)抗藥性統計

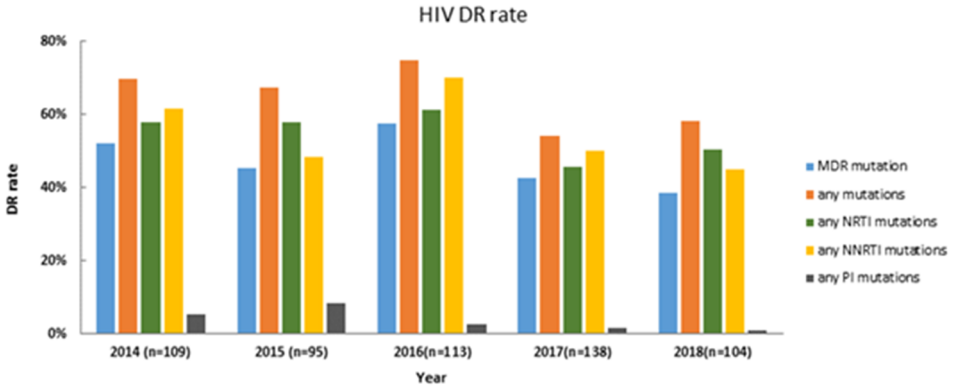
抗藥性分類	Resistance n	Resistance (%)	Possible Resistance n	Possible Resistance (%)	Total Resistance n	Total Resistance (%)
Total: 104						
Virus not detected:13 (12.5%)						
MDR mutation	32	(35.2)	7	(7.70)	35	(38.5)
any mutation	47	(51.6)	35	(38.5)	53	(58.2)
any **NRTI** mutation	40	(44.0)	22	(24.2)	46	(50.5)
any **NNRTI** mutation	38	(41.8)	19	(20.9)	41	(45.1)
any **PI** mutation	1	(1.10)	1	(1.10)	1	(1.10)



圖二、2014-2018 年新通報 HIV-1 感染者(Naïve)抗藥性趨勢



圖三、2016-2018 年新通報 HIV-1 感染者(Naïve)NNRTI 類藥物 EFV 抗藥性趨勢



圖四、2014-2018 年 HIV-1 感染者治療失敗(Treatment failure)抗藥性趨勢

五、參考文獻

1. Gelderblom HR, Hausmann EH, Ozel M, Pauli G, Koch MA. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology.* 1987;156(1):171-176.
2. Nakai M, Goto T, Imura S. Ultrastructural features of the AIDS virus (HIV) and its morphogenesis. *J Electron Microsc Tech.* 1989;12(2):95-100.
3. 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.
4. Vallari A, Holzmayer V, Harris B, et al. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *J Virol.* 2011;85(3):1403-1407.
5. Mauclere P. [HIV-1 group N in Cameroon and apparent viruses in the chimpanzee]. *Bull Soc Pathol Exot.* 2000;93(3):162.
6. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med.* 2009;15(8):871-872.
7. 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.
8. 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.
9. Peeters M, Liegeois F, Torimiro N, et al. Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient. *J Virol.* 1999;73(9):7368-7375.
10. Rousseau CM, Learn GH, Bhattacharya T, et al. Extensive intrasubtype recombination in South African human immunodeficiency virus type 1 subtype C infections. *J Virol.* 2007;81(9):4492-4500.
11. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med.* 2012;18(3):182-192.
12. Aldrich C, Hemelaar J. Global HIV-1 diversity surveillance. *Trends Mol Med.* 2012;18(12):691-694.
13. Dillner L. HIV subtype may explain sexual transmission. *BMJ.* 1996;312(7030):530-531.
14. 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.

15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Yadav PN, Yadav JS, Modak MJ. Nucleoside drug resistance in HIV-1 reverse transcriptase. *Nat Struct Biol.* 1995;2(3):193-195.
19. Zucker J, Carnevale C, Rai AJ, Gordon P, Sobieszczyk ME. Positive or Not, That Is the Question: HIV Testing for Individuals on Pre-exposure Prophylaxis. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2018;78(2):e11-e13.
20. Marcus JL, Hurley LB, Hare CB, et al. Preexposure Prophylaxis for HIV Prevention in a Large Integrated Health Care System: Adherence, Renal Safety, and Discontinuation. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2016;73(5):540-546.
21. Knox DC, Anderson PL, Harrigan PR, Tan DH. Multidrug-Resistant HIV-1 Infection despite Preexposure Prophylaxis. *N Engl J Med.* 2017;376(5):501-502.
22. Markowitz M, Grossman H, Anderson PL, et al. Newly Acquired Infection With Multidrug-Resistant HIV-1 in a Patient Adherent to Preexposure Prophylaxis. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2017;76(4):e104-e106.
23. Streeck H, Verheyen J, Storim J, et al. Pre-exposure prophylaxis failure with tenofovir disoproxil. *AIDS.* 2017;31(1):176-177.
24. Thaden JT, Gandhi M, Okochi H, Hurt CB, McKellar MS. Seroconversion on preexposure prophylaxis: a case report with segmental hair analysis for timed adherence determination. *AIDS.* 2018;32(9):F1-F4.
25. Colby DJ, Kroon E, Sacdalan C, et al. Acquisition of Multidrug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection in a Patient Taking Preexposure Prophylaxis. *Clin Infect Dis.* 2018;67(6):962-964.
26. Laeyendecker O, Redd AD, Nason M, et al. Antibody Maturation in Women Who Acquire HIV Infection While Using Antiretroviral Preexposure Prophylaxis. *J Infect Dis.* 2015;212(5):754-759.
27. Donnell D, Ramos E, Celum C, et al. The effect of oral preexposure prophylaxis on the progression of HIV-1 seroconversion. *AIDS.* 2017;31(14):2007-2016.

28. Sivay MV, Li M, Piwowar-Manning E, et al. Characterization of HIV Seroconverters in a TDF/FTC PrEP Study: HPTN 067/ADAPT. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2017;75(3):271-279.
29. Smith DK, Switzer WM, Peters P, et al. A Strategy for PrEP Clinicians to Manage Ambiguous HIV Test Results During Follow-up Visits. *Open Forum Infect Dis.* 2018;5(8):ofy180.
30. Corporation SB. Sedia HIV-1 LAg-Avidity EIA (for Serum or Plasma Specimens) package insert. 2016.
31. Duong YT, Qiu M, De AK, et al. Detection of recent HIV-1 infection using a new limiting-antigen avidity assay: potential for HIV-1 incidence estimates and avidity maturation studies. *PloS one.* 2012;7(3):e33328.
32. Wei X, Liu X, Dobbs T, et al. Development of two avidity-based assays to detect recent HIV type 1 seroconversion using a multisubtype gp41 recombinant protein. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2010;26(1):61-71.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Kuiken C, Korber B, Shafer RW. HIV sequence databases. *AIDS Rev.* 2003;5(1):52-61.
39. 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.
40. 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.
41. 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.

42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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).
47. 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.
48. 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.
49. who. *Guidelines on the public health response to pretreatment HIV drug resistance: July 2017.* 2017.

疾病管制署 108 年度科技研究計畫期末報告審查意見回復表

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-000104

計畫名稱：HIV 新感染者抗藥性長期追蹤調查

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)
CRF07_BC 基因型在異性戀女性中比率有增加之趨勢，建議可連結疫調資料，以了解其可能影響因子。	感謝委員建議,後續將基因型別資料提供給權責疾病組，以連結疫調資料。	
CRF07_BC 基因型出現在異性戀及 MSM 值得進一步探討。	感謝委員建議,後續將持續進行基因型別分析,以分析台灣的基因型別分布是否已有變化	
整合酶抑制劑之抗藥性在未治療病人出現，宜持續追蹤後續趨勢之變化。	感謝委員建議,已將未治療前已有整合酶抑制劑之抗藥性個案提供給權責疾病組以進行後續追蹤。	