

出國報告（出國類別：研習）

赴日本 NIID 研習 A 型肝炎病毒及愛滋病毒抗藥性相關檢驗技術

服務機關：衛生福利部疾病管制署

姓名職稱：廖郁昕 技士

派赴國家：日本

出國期間：民國 105 年 11 月 6 日至 11 月 20 日

報告日期：106 年 1 月 10 日

摘要

經由疾管署統計國內急性病毒性 A 型肝炎疫情自 104 年 6 月起上升，確診病例數已超過歷年同期紀錄，確定病例中合併愛滋病毒（HIV）感染者的個案數也異常增加，因此，為有效預防及控制疫情，持續監測病毒以掌握其流行特徵並評估該病毒可能之致力及傳播力極為重要，同時依據世界衛生組織指引，應加強監測 HIV 之抗藥性，其結果可作為防治政策擬定之參考依據。

本次赴日本國立感染症研究所(NIID)研習，即是學習日方關於 A 型肝炎病毒及 HIV 抗藥性相關的檢驗技術，期望能將所學應用於傳染病防治業務，以強化本署實驗室對於 A 型肝炎病毒及 HIV 病毒之分子流行病學監測技術。

目次

摘	要.....	2
目	的.....	4
過	程.....	6
心得及建議	16
附	錄.....	18

目的

急性病毒性 A 型肝炎主要為糞口途徑傳染，透過人與人的接觸，受污染的水源和食物例如貝類、水果和沙拉；A 型肝炎病毒(HAV)為約 27nm 大小，無外衣的單股核糖核酸（RNA）病毒，於腸道複製後透過血液傳到肝臟。目前有七種基因型。其中 I 到 III 型可感染人類，全球超過 90%之感染主要是 Genotype I 所造成，還可次分型為 I-A 與 I-B。依據 WHO 報導，HAV 最大的疫情可能發生於 1991 年中國大陸，因蛤蜊受 HAV 污染而影響約 30 萬人；而國內於 2014 年 10 月發生一起因馬蹄蛤污染的急性病毒性 A 型肝炎群聚事件，除此之外，依據文獻中也發現，在 MSM 族群的口肛直接或間接接觸也是感染急性 A 型肝炎的來源之一。經由疾管署統計國內急性病毒性 A 型肝炎疫情自 104 年 6 月起上升，主要流行 Genotype IA，確定病例中合併愛滋病毒（HIV）感染者的個案數異常增加，迄今疫情仍持續且通報個案持續增加中。預防 A 型肝炎最有效的措施為接種疫苗，接種 1 劑疫苗後，約有 95%以上的個體可產生保護抗體，而按期完成兩次疫苗接種，產生的免疫力可維持 20 年以上，目前國內 A 肝公費疫苗接種對象包含：設籍山地鄉、9 個鄰近山地鄉之平地鄉鎮、金馬地區兒童。同時，為了阻斷 A 型肝炎疫情傳播與因應近期國內 A 型肝炎合併 HIV 感染者有增加的趨勢，疾管署擴大公費疫苗接種對象，針對 A 型肝炎確定病例之接觸者及確診 HIV 感染者或新確診梅毒、淋病者提供 1 劑公費 A 型肝炎疫苗，並要求個案自費施打第 2 劑，若免疫功能不足，經醫師評估，有需要者應自費接種第 3 劑，以建立長期免疫力。

此外，因急性病毒性 A 型肝炎確定病例中合併愛滋病毒（HIV）感染者的個案數異常增加，感染人類 HIV-1 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，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，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，因此以分子流行病學方法，監測 HIV-1 抗藥性之流行趨勢是必要的，同時依據世界衛生組織指引中也強調應加強監測 HIV 之抗藥性。本署為我國傳染病防治之最高主管機關，為達擴大監測之目的，除目前以食品藥物管理署核准之體外診斷試劑執行之 HIV 抗藥性基因檢測外，應發展合乎國際規範之 HIV in-house 抗藥性檢測方法。

本次赴日研習的目的共有兩項：首先經由 HAV 基因分型發現，日本流行的型別與台灣同為 Genotype IA，因此研習與討論「HAV 的檢驗方法及演化分析」為第一項目的，期望了解不同國家對於 HAV 分子流行病學的監測方式；其次，由於本署實驗室建立 HIV in-house 抗藥性檢測方法尚未完備，經查日本 NIID 已具備合乎國際規範之該項檢驗方法，因此學習「HIV 抗藥性檢測方法」為第二項目的，藉此達擴大監測 HIV 抗藥性之目的。此外，我們亦期望可藉此機會建立與日本 NIID 暢通之聯繫管道，拓展本署國際人脈，俾利台日雙方未來對於 HAV 及 HIV 抗藥性相關資訊之分享與交流。

過程

一、行程

此次奉派赴日本研習地點為國立感染症研究所 (National Institute of Infectious Diseases, Japan) Department of Virology II 及 AIDS Research Center 兩個部門。研習期間自民國 105 年 11 月 6 日起至 11 月 20 日止，含路程共計 15 天。相關時間、地點及行程內容詳述如下：

日期	工作日誌	地 點	行 程 內 容
105/11/6	啟程、抵達	台北→東京	路程
105/11/7~ 105/11/12	研習	東京	HAV 相關檢驗
105/11/13~ 105/11/18	研習	東京	HIV 抗藥性相關檢驗
105/11/19	研習	東京	綜合討論
105/11/20	返程	東京→台北	返程

(一) 日本國立感染症研究所 Department of Virology II 研習

本次 HAV 相關檢驗技術研習主要前往日本 NIID Department of Virology II，此部門位於國立感染症研究所之 Murayama Branch，有 5 個實驗室，由第五室室長石井孝司博士(Dr. Koji Ishii)親自安排本次 HAV 相關檢驗技術並全程指導。該室主要負責 A 型肝炎及 E 型肝炎病毒的研究，同時在疑似群聚感染時，經由分子流行病學的方式分析病毒基因序列，以釐清可能的感染源。



圖 1. NIID Murayama Branch

(二) 日本國立感染症研究所 AIDS Research Center 研習

本次 HIV 抗藥性相關檢驗研習主要前往位於 NIID Toyama, Tokyo 的 AIDS Research Center，由 AIDS Research Center Division I 室長吉村和久博士(Dr. Kazuhisa Yoshimura)安排 HIV 抗藥性相關檢測技術研習，AIDS Research Center Division I 主要負責分析全球 HIV 及其他反轉錄病毒的流行趨勢、病毒基因的演化及抗藥性的監測。本次研習主要由 Dr. Kazuhisa Yoshimura 與 Dr. Shigeru Kusagawa、Dr. Teiichiro Shiino 及 Dr. Shigeyoshi Harada 一同研習 HIV 相關檢測技術及生物資訊相關知識。



圖 2. NIID Toyama, Tokyo

二、研習內容

(一) A 型肝炎病毒相關檢驗技術

本次研習的內容包含 HAV 確診個案檢體的病毒核酸萃取、引子選擇、聚合酶連鎖反應(RT-PCR)、定序分析、Phylogenetic analysis。研習的方式主要以實際操作實驗為主，與室長討論實驗流程之後，獨立完成實驗步驟，之後的 Phylogenetic analysis 則採共同討論的方式進行，藉由不同來源參考病毒株的選取、台灣及日本流行的病毒株序列分析比較，共同討論 Phylogenetic analysis 分析方式。

病毒核酸萃取

將糞便檢體與 phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.2)震盪混和後，1000g 離心 10 分鐘，製備成 10%糞便懸浮液，利用此糞便懸浮液或血清檢體利用 QIAamp Viral RNA Kit 試劑組(Qiagen, Germany) 進行核酸萃取。

利用 A 型肝炎病毒專一性引子組增幅 A 型肝炎病毒基因

此 A 型肝炎病毒專一性引子是由 Dr. Koji Ishii 設計的 degenerated primer，可以增幅 A 型肝炎病毒 VP1/2A 區域，其序列及基因相對位置如下圖 3 所示，利用 SuperScriptIII cDNA Synthesis Kit 試劑組(Invitrogen , CA)及 EX-Taq 試劑組 (Takara, Japan)進行病毒基因反轉錄聚合酶反應，將 A 型肝炎病毒 RNA 反轉錄成為 cDNA，反應結束後，再以首次反應產物執行 nested-PCR，相關反應試劑配置方法及反應條件詳如下圖 4、下圖 5。最後取 3 μ l nested PCR 產物於 1.5% agarose gel 進行膠體電泳。

Amplified Region of HAV for Phylogenetic Tree Analysis

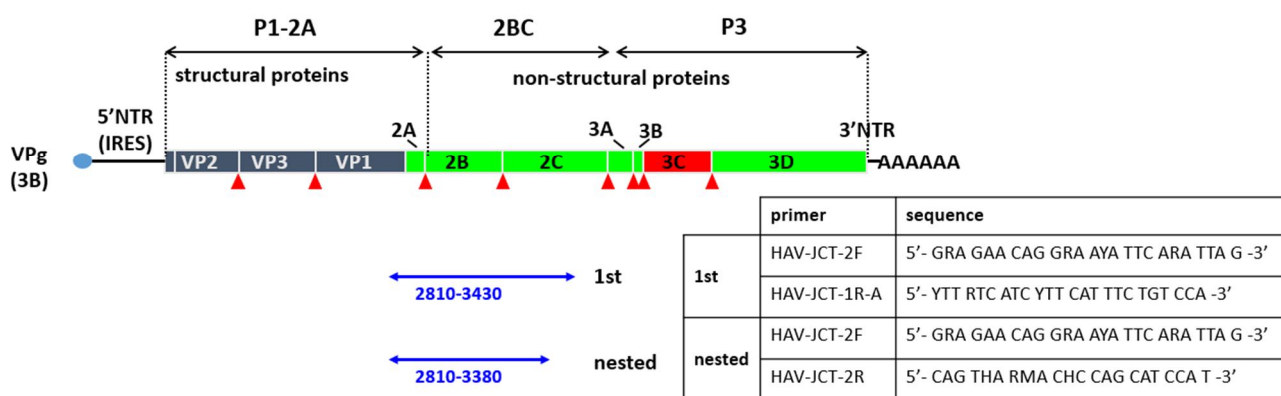


圖 3. A 型肝炎病毒 VP1/2A 區域基因相對位置及引子序列

First-Strand Synthesis Using Random Primers

Starting material: 1 ng–5 µg total RNA or 50–500 ng poly(A)⁺ RNA

Control reactions: Use 1 µl of Control RNA (50 ng/µl)

- Mix and briefly centrifuge each component before use.
- For each reaction, combine the following in a sterile 0.5-ml tube:

Component	Amount
RNA	<i>n</i> µl
10 mM dNTP mix	1 µl
Random hexamers (50 ng/µl)	1–5 µl
DEPC-treated water	to 10 µl

- Incubate the RNA/primer mixture at 65°C for 5 minutes, then place on ice for at least 1 minute.
- In a separate tube, prepare the following 2X reaction mix, adding each component in the indicated order.

Component	1 Rxn	10 Rxns
10X RT buffer	2 µl	20 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl	40 µl
0.1 M DTT	2 µl	20 µl
RNaseOUT™ (40 U/µl)	1 µl	10 µl

- Add 9 µl of the 2X reaction mix to each RNA/primer mixture from step 3, mix gently, and collect by brief centrifugation.
- Incubate at room temperature (~25°C) for 2 minutes.
- Add 1 µl of SuperScript™ II RT to each tube. **Minus RT Control:** Add 1 µl DEPC-treated water instead of the RT.
- Incubate at room temperature for 10 minutes.
- Incubate at 42°C for 50 minutes.
- Terminate the reaction at 70°C for 15 minutes. Chill on ice.
- Collect the reaction by brief centrifugation. Add 1 µl of RNase H to each tube and incubate for 20 minutes at 37°C.

The reaction can be stored at -20°C or used for PCR immediately.

圖 4. cDNA 合成試劑配置方法及反應條件

Reaction mix	For 1 reaction	Reaction temperature	time
dNTP mix	4	98 °C	10sec
10X Ex Taq buffer	2.5	55 °C	20sec
10pmole Forward Primer	1	72 °C	2min
10pmole Reverse primer	1	72 °C	7 min
Ex Taq	0.5		
DEPC water	16		
cDNA	2		

} → 45 cycle
 → 1 cycle

圖 5. PCR 及 Nested PCR 試劑配置方法及反應條件

Phylogenetic analysis

使用 MEGA 軟體分析 A 型肝炎病毒基因序列，使用 neighbor-joining 方法，並用 Kimura two-parameter distance matrix、bootstrap values=1000 (from 1000 bootstrap re-samplings of the original data)。所有的參考序列皆來自 GenBank。

(二) HIV 抗藥性相關檢驗技術

本次 HIV 相關研習的內容包含 HIV 確診個案檢體的病毒核酸萃取、引子選擇、聚合酶連鎖反應(RT-PCR)、Nested-PCR、PCR 產物純化、定序分析、Phylogenetic analysis 及 Drug Resistance Analysis。

病毒核酸萃取

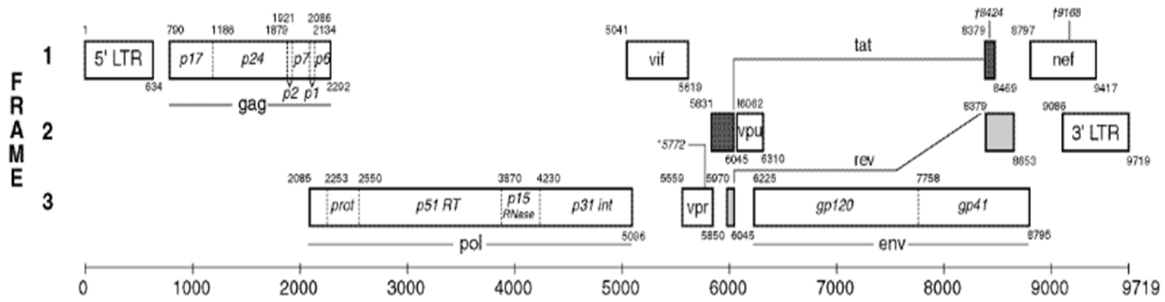
使用 High Pure Viral RNA Kit 試劑組 (Roche)進行核酸萃取，詳細步驟如下:

1. 200 μ l 血清或血漿檢體加入內含 1/100 Poly(A)的 Binding Buffer 400 μ l
2. 震盪混和均勻，並加至 High Pure filter column tube
3. 8000g 離心 15 秒鐘
4. 更換新的 collection tube
5. 加入 500 μ l Inhibitor removal buffer
6. 8000g 離心 1 分鐘
7. 更換新的 collection tube
8. 加入 450 μ l Wash buffer
9. 8000g 離心 1 分鐘
10. 更換新的 collection tube
11. 加入 450 μ l Wash buffer
12. 8000g 離心 1 分鐘，再用最高速離心 10 秒鐘
13. 更換 1.5ml snap-capped tube
14. 加入 50 μ l Elution buffer
15. 8000g 離心 1 分鐘

16. 得到 Purified viral RNA

HIV 專一性引子組

此 HIV 專一性引子可以增幅 HIV PR、RT 兩個區域，其序列及基因相對位置如下圖 6 所示



Primer name	Sequence	HXB2 NO.
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
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
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

圖 6.HIV PR/RT 區域基因相對位置及引子序列

利用 HIV 專一性引子組增幅 HIV PR、RT 基因

首先利用 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 試劑組(TaKaRa)進行病毒基因反轉錄聚合酶反應，以下為試劑配置方式及反應條件：

(a) Preparation of RT-PCR mixture

RNase-free dH ₂ O	6.4μL
2x 1-step buffer	10.0μL
20μM Forward primer	0.4μL
20μM Reverse primer	0.4μL
PrimeScript 1-step Enzyme Mix	0.8μL
	18.0μL
RNA Sample	2.0μL
Total	20.0μL

(b) RT-PCR reaction cycle

Reverse Transcription	50°C	30 min.	} 30-50 Cycles
Heat Denaturation	95°C	5 min.	
Denaturation	94°C	30 sec.	
Annealing	55°C	30 sec.	
Extension	72°C	90 sec.	
Additional Extension	72°C	7 min.	
Store	4°C	∞	

接著利用 Primix Taq™ Hot Start Version Kit 試劑組(TaKaRa)進行病毒基因聚合酶反應，以下為試劑配置方式及反應條件：

(c) Preparation of Nested-PCR mixture

RNase-free dH ₂ O	18.0μL
2x PCR premix	25.0μL
20μM Forward primer	1.0μL
20μM Reverse primer	1.0μL
	45.0μL
RT-PCR product	5.0μL
Total	50.0μL

(d) Nested-PCR reaction cycle

Heat Denaturation	94°C	2 min.	} 30-40 Cycles
Denaturation	94°C	30 sec.	
Annealing	55°C	30 sec.	
Extension	72°C	60 sec.	
Additional Extension	72°C	7 min.	
Store	4°C	∞	

PCR 產物純化

先使用 2% agarose gel 進行膠體電泳，確認產物後進行 PCR 產物純化。使用 High Pure PCR Product purification Kit 試劑組(Roche)進行純化步驟，首先混合 50µL PCR 產物及 250µL Binding buffer，將混和液放入 High Pure filter tube(column)內，接著離心 13000xg 1 分鐘，更換新的 collection tube。接續兩次 500µL 及 200µL Wash buffer 清洗步驟並離心 13000xg 1 分鐘，最後使用 50µL Elution buffer 完成產物純化。

定序分析

1. 將純化完成的 PCR 產物使用 BigDye Terminator Cycle Sequencing kit ver.3.1(Applied Biosystems)進行定序反應，最後利用定序儀器(如下圖 7)進行訊號之讀取，以下為試劑配置方式及反應條件：

dH ₂ O	2.5µL
BigDye Sequencing buffer	2.0µL
BigDye Ready Reaction Mix	2.0µL
1.6µM primer	1.0µL
Purified PCR	2.5µL
	10.0µL

<cycle>

Denaturation	95°C	20 sec.	} 25 Cycles
Annealing	50°C	15 sec.	
Extension	60°C	60 sec.	



圖 7. NIID 使用之定序儀器：Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer

Phylogenetic and Drug Resistance Analysis

1. Check a sequencing Quality

檢查定序訊號品質，去掉 3'端及 5'端訊號雜亂的序列

2. Edit Polymorphic site in the sequence file

使用 MEGA 程式，當執行 Phylogenetic analysis 時，應該選擇訊號最強的 peak；當執行 Drug Resistance Analysis 時則應考慮有雙重 peak 時，nucleotide code 可能出現 polymorphism。

3. Make an alignment file with references

使用 HIV Sequence database (<http://www.hiv.lanl.gov/>)，使用 Sequence Locator 找到序列對應 HIV 標準病毒株 HXB2 coordinates，並搜尋相對的參考株序列

4. Multiple alignment

5. Inferring phylogeny

使用 Neighbor Joining method 或 Maximum Likelihood method，並鍵入 bootstrap value。當使用 Neighbor Joining method 時，Substitution model 選擇 Tamura & Nei；當使用 Maximum Likelihood method，Substitution model 選擇 GR+G+I

6. Make alignment for drug resistance(DR)test

使用 MEGA 程式將 PR gene 及 RT gene 序列合在一起，搜尋 RT 基因 5'端 (CCCATTAGCC)或 PR 基因 5'端(CCTCAGGTCA)將兩基因串接一起，選擇參考病毒株時，僅選擇 REF.B.83.HXB2.LAI.IIIB，進行 alignment。

7. Resistance test using Stanford database

使用 Stanford database 網站(<http://hivdb.stanford.edu>) drug resistance database 進行分析。

心得及建議

本次奉派赴日本 NIID 研習 A 型肝炎病毒及 HIV 抗藥性相關檢驗技術獲益良多。首先感謝本署長官給予研習的寶貴機會，使職利用兩個星期的時間，同時前往兩個研究室學習不同的檢驗技術操作，瞭解如何將這些技術應用於改善本署相關檢驗技術之流程，並藉由互相討論學習對方專業上的經驗，這對我們實務上有很大的幫助。由於本次研習同時前往 NIID 位於東京的兩個不同研究室，因此也有機會與不同研究室之研究人員接觸討論，例如與 Virology II 室長石井孝司博士對於台灣自 2015 年開始大幅上升的急性 A 型肝炎確診個案之流行狀況進行討論，並交換台灣及日本對於急性 A 型肝炎流行病學及相關的防治措施；與 AIDS Research Center 之室長 Dr. Kazuhisa Yoshimura 討論 HIV 盛行率、不同的危險因子感染者的病毒亞型分布及抗藥性監測的策略；與 Dr. Shigeyoshi Harada 討論愛滋病藥物的使用現況及開發中的愛滋病治療藥物等，除了學到許多新觀念及了解不同國家之疾病流行現況外，對於本署拓展國際人脈亦有很大的幫助。

急性 A 型肝炎確診病例在日本每年約 150 至 200 件，在流行病學調查上 NIID 扮演一個舉足輕重的角色，當感染個案數超過閾值時，NIID 就會啟動一個非常仔細的流行病學調查可能的感染源，並以 phylogenetic analysis 分析，因此如何以實驗室角度選擇病毒基因分析片段並以流行病學、生物資訊等兩方面同步進行分析，是本次學習的一大收穫。

此外，因應 WHO 提出的愛滋病毒 90-90-90 全球目標，意即 90%的感染者知道自己病況、90%知道病況的感染者持續服用藥物、90%服用藥物者其病毒量成功被抑制，更進一步的可於 2030 年完成終結愛滋病的目標。為避免原生抗藥性 HIV 的傳播，使得抗愛滋病毒藥物的治療效果大打折扣，抗藥性監測更是需持續地進行的，透過本次的研習過程將可強化本署 HIV 抗藥性的檢測技術，同時期望能透過發展合乎國際規範之 HIV in-house 抗藥性檢測方法，達到擴大監測之目的。要完成抗藥性監測的關鍵為 primer selection、sequence analysis 及

phylogenetic analysis, 首先針對 primer selection 部分, 由於 HIV 很容易產生變異, 因此需要不斷的去更新相關的資料庫, 適時的修改或重新設計 primer 已順利偵測出 HIV; 第二部分為 sequence analysis 及 phylogenetic analysis, 此部分透過主任研究官 Dr. Teiichiro Shiino 仔細的教學及指導, 學習了許多生物資訊相關的軟體操作, 思考模式及 HIV 序列之分析方法, 主任研究官 Dr. Teiichiro Shiino 為生物資訊專長的研究人員, 對於序列的比對有很豐富的經驗, 藉由他本人一對一深入淺出逐步教學與討論, 對於學習效率的提升很有幫助, 也是本次研習很大的收穫。

總結研習心得, 憑藉本次赴日所學之技術與觀念, 期許未來可強化本署實驗室之技術平台, 使 A 型肝炎及 HIV 相關檢驗可搭配生物資訊相關概念而能提供更為豐富的實驗室資訊, 達協助防疫之目的。除透過持續精進專業知識外, 亦須藉由持續的技術交流促進同仁的國際觀, 使同仁有機會藉由了解雙方檢驗相關技術之差異後, 吸收對方的優點, 將更有助於提升本署實驗室之能力。

附錄



附圖 1、職與 NIID Virology II 成員之合照。



附圖 2、職與 NIID Virology II 第五室室長石井孝司博士(Dr. Koji Ishii)合照。



附圖 3、職與 NIID AIDS Research center 成員之合照。由左而右分別為 Dr. Shigeru Kusagawa、AIDS Research center 主任 Dr. Tetsuro Matano、室長 Dr. Kazuhisa Yoshimura 及 Dr. Shigeyoshi Harada。



附圖 4、職與 NIID AIDS Research center 主任研究官 Dr. Teiichiro Shiino 合照。