

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

巨細胞病毒臨床分離株對 ganciclovir 感受性及抗藥性之研究(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-002-154-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院醫事技術學系暨研究所

計畫主持人：高全良

計畫參與人員：何玉屏、范萬鴻

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 11 月 6 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

巨細胞病毒臨床分離株對 ganciclovir 感受性及抗藥性之研究(2/2)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC 91 - 2320 - B - 002 - 046 -
執行期間： 91 年 8 月 1 日 至 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：高全良
共同主持人：
計畫參與人員：范萬鴻、何玉屏

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢
涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查
詢

執行單位：國立台灣大學醫學院醫事技術學系

中文摘要

巨細胞病毒在臨床上會造成多樣性感染。在免疫機能不正常之患者如愛滋病患者、器官移植或骨髓移植患者，則更易引起感染嚴重者甚至致死。目前用於治療巨細胞病毒之抗病毒藥物已有多種被開發出來，其中仍以 ganciclovir 最被廣泛使用。近年來國外已有抗藥性病毒株之報告。國內巨細胞病毒之感染亦非常普遍，且臨床上亦以 ganciclovir 為治療上之第一選擇，但國內之巨細胞病毒臨床分離株對 ganciclovir 之感受性如何並不清楚。因此本計畫擬針對此問題進行相關之研究，首先先建立一可行且可靠之巨細胞病毒對藥物敏感性篩檢法，然後針對臨床分離株進行篩檢。在方法之建立經比較分析後選定 flowcytometry 做為藥物感受性測試方法。本研究收集由台大醫院病毒室於 2001 年至 2003 年之巨細胞臨床分離株共 130 株進行對 ganciclovir 感受性分析。研究結果顯示對 ganciclovir 具抗藥性之比率在 2001、2002 及 2003 年分別為 14.29%(1/7), 6.56%(4/61) and 6.45%(4/62)。我們由 9 株抗藥株中選擇抗藥性較強之 4 株病毒進一步分析其 UL97 及 UL54 之基因序列。4 株中有 1 株(032315)其 UL97 之 460 氨基酸位置產生變異由 met 變成 val，此變異與抗藥性產生之相關性在國外亦有類似之發現。而其他 3 株抗藥株與參考敏感株及其他臨床分離敏感株相較並無特殊之變異情形存在。其抗藥性產生之機制，仍有待進一步探討。

關鍵詞：巨細胞病毒、ganciclovir 感受性、ganciclovir 抗藥性

Abstract

Cytomegalovirus (CMV) infections are a major cause of morbidity and mortality among immunocompromised patients, especially recipients of bone marrow and solid-organ transplants and patients with AIDS. Antiviral agents currently licensed for the treatment of CMV infections include ganciclovir, foscarnet and cidofovir. Among them ganciclovir is the most popular used antiviral agent. A potential risk associated with prolonged used of antiviral compounds in the emergence of resistance viruses. CMV isolates resistant to ganciclovir have been reported in other countries within recent few years. CMV infections are very common in Taiwan. Ganciclovir is also the first choice of antiviral agent for the treatment of CMV infections. The susceptibility and resistance of CMV clinical isolates to ganciclovir in Taiwan has never been report. In order to elucidate the spectrum of susceptibility of CMV isolates to ganciclovir in Taiwan, the proposal of this study is raised. The aim of first year is to set up the drug susceptibility assay method and collect CMV clinical isolates. After comparing different methods, the flow cytometry is chosen as the antiviral susceptibility screening method. 130 CMV strains collected during the period from 2001 to 2003 were screened for the susceptibility against ganciclovir (GCV). The resistant strains ($ID_{50} > 12 \mu M$) prevalence rate were 14.29%(1/7), 6.56%(4/61) and 6.45%(4/62). UL97 and UL54 genes of 4 resistant strains with higher ID_{50} were analyzed. One point mutation of UL97 gene (M460V) was found in strain 032315, whereas no difference of amino-acid sequence between other 3 resistant strains and reference susceptible strain AD169 and other sensitive strains. The mechanisms of drug resistance of these strains are needed further characterization.

Keywords: cytomegalovirus, ganciclovir susceptibility, ganciclovir-resistance

目錄

1. 中文摘要	I
2. 英文摘要	II
3. 前言	1
4. 研究目的	2
5. 材料與方法	2
6. 結果與討論	5
7. 參考文獻	6
8. 計畫成果自評	8

報告內容

前言

巨細胞病毒 (Cytomegalovirus, CMV) 屬 *herpesviridae*。為 double stranded DNA 病毒。CMV 之感染與其他泡疹病毒相似，在初次感染後均會在宿主身上造成終身之潛伏感染，當宿主之免疫力下降時常被活化造成感染⁽¹⁾。CMV 感染時雖然大部份為非顯性感染，但部份則在在臨床上會引起不同症狀之感染。先天性之胎兒感染時之臨床之表現，有小腦症、腦內硬化、視網膜炎、肝脾腫大、黃膽、血小板減少等。此類感染容易造成死產或胎兒畸形^(2,3)。新生兒感染之臨床症狀有間質性肺炎、肝炎等⁽⁴⁾。在兒童期之感染則會引起類似流行性感冒之發燒、血小板減少、白血球數目下降等類似感染性單核白血球症⁽⁵⁾。在成年人之感染，如為免疫功能正常者，則症狀均輕微如喉頭炎、發燒、淋巴病變、脾臟腫大、肝功能異常等，發生併發症之比率極少⁽⁵⁾。孕婦如有 CMV 感染如為初次感染則容易引起胎兒之感染而引起嚴重之併發症，如為二次感染則症狀輕微⁽³⁾。免疫功能有缺失之患者常伴隨有 CMV 之感染，此些感染常因此造成致死。近年來 CMV 常成為骨髓移植、器官移植及愛滋病患者感染之主要病原且常會造成嚴重之症狀甚至死亡⁽⁶⁻¹⁰⁾。如在感染早期施以抗病毒藥物則可以控制併發症之產生進而降低死亡率⁽¹¹⁾。

目前臨床上用於治療 CMV 感染之抗病毒藥物主要有 ganciclovir, foscarnet 及 cidofovir 等。但其中以 ganciclovir 最被廣泛使用⁽¹²⁾。此情況國內亦復如此。雖然 ganciclovir 在臨床上可產生很好之療效，但近年來國外之報告指出實驗室適應之 CMV 病毒株，在 ganciclovir 之存在下進行培養，可選殖出抗藥性之病毒株⁽¹³⁾。而由臨床檢體得到之分離株中，對 ganciclovir 具有抗藥性之 CMV 也陸續於近幾年在國外被發現⁽¹²⁻¹⁸⁾。研究此些抗藥株之抗藥機制發現主要與二個 CMV 之基因變異有關。一為病毒之 UL97 gene (phosphotransferase gene) 發生突變，使得所形成之蛋白無法順利將進入細胞內之 ganciclovir 磷化成 ganciclovir monophosphate 進而無法形成 ganciclovir 之 active form (ganciclovir triphosphate)，因此產生了抗藥性。UL gene 之突變可能為 point mutation 或 deletion。國外之研究顯示，UL97 gene 突變產生之抗藥性以 point mutation 最常見。而最常見之突變位置為 codon 460, 594, 595⁽¹⁸⁾，而其他位置 codon 520, 591, 592, 603, 607, 665 等亦被報告過^(15, 18-19)。另一為 DNA polymerase gene (UL54) 發生基因變異所致。UL54 gene 突變結果使得 ganciclovir 之 active form (ganciclovir triphosphate) 無法有效抑制 DNA polymerase gene 之作用，因而產生了抗藥性。對 ganciclovir 具抗藥性之 CMV 其 UL54 gene 主要之突變位置為 region IV, V, delta-region C 發生 point mutation^(18, 20, 21) 或 deletion^(18, 22)。部份抗藥性 CMV 也發現同時有 UL97 及 UL54 gene 發生 double mutation 之情形。此 double mutation 可能導致更高之抗藥性^(18, 20)。

國內 CMV 之感染非常普遍^(23, 24)，免疫機能缺失之愛滋病^(25, 26)、器官移植^(27, 28) 患者發生 CMV 感染也很常見。而國內亦以使用 ganciclovir 抗病毒藥物為治療 CMV 感染之首要考量。但國內有關 CMV 臨床分離株對 ganciclovir 之藥物感受性之研究一直非常缺乏，也未見諸文獻報告，而是否有抗藥性病毒株之存在也完全不清確。有鑒於此，本計畫擬針對 CMV 臨床分離株進行 ganciclovir 藥物感受性及抗藥性之研究。臨床分離株將包括來自免疫機能較差之患者如愛滋病、器官移植、骨髓移植等患者及一般 CMV 感染之患者。如

有可能將收集同一患者不同時間分離出之病毒株一起納入分析。由初步感受性測試分析發現有抗藥株存在時，將再進一步探討其對 ganciclovir 抗藥性之機制。此研究結果，除可提供國內 CMV 對 ganciclovir 之感受性及抗藥性之狀態之基礎資料，而國內抗藥性病毒株之抗藥機制與國外之抗藥株病毒基因之突變報告之異同，將有進一步之了解。而研究之結果對臨床上 CMV 感染之治療及使用抗病毒藥物上亦可提供重要之參考。

研究目的

- 1、建立 CMV 對 ganciclovir 敏感性測試法，以供日後此方面之研究工具亦可供臨床上使用
- 2、瞭解國內不同來源之 CMV 臨床分離株對 ganciclovir 感受性之狀況。
- 3、找尋國內是否有對 ganciclovir 具抗藥性之 CMV 分離株之存在。
- 4、瞭解對 ganciclovir 抗藥性之 CMV 分離株之抗藥機制

材料與方法

1、巨細胞病毒臨床分離株之收集

將自台大病毒檢驗室 2001~2003 年由各種來源所培養出之巨細胞病毒，經 human embryonic fibroblast cell(HEL)細胞增殖後，以 2-sucrose phosphate buffer 保存於-80℃，以供分析研究用。病毒來源將包含來自一般性之感染者以及免疫功能有缺失之患者(如愛滋病、器官移植、骨髓移植等患者)所分離之巨細胞病毒。共收集 72 株臨床病毒株進行分析。

2、Ganciclovir susceptibility assay by flow cytometry⁽³³⁾

首先先將 HEL 在 25-cm² 長成 monolayer 後，再接種病毒(laboratory adapted strain, AD169 之 MOI 為 0.005; clinical isolate 則先任意選擇兩株接種 10⁵ HCMV-infected cells) 經 37℃ 吸收 2 小時，再分別加上含有 0 或 6、12、24、48、96 μM ganciclovir 之 EMEM with 10%FBS 培養基。經 37℃ 培養 96 小時後，將細胞取下使用 90 % methanol 加穿孔劑 0.002 % Triton X-100 的固定穿孔法固定。然後加入抗 HCMV immediate early antigen 的單株抗體 20 μl，混合均勻，置於 37℃ 水浴中，作用 1 小時。1 ml PBS 潤洗二次，再加入山羊抗老鼠 IgG 螢光共軛抗體 (Fluorescein-labeled affinity purified antibody to mouse IgG (H+L), Cat. # 172-1806, KPL, USA) 20 μl，混合均勻，置於 37℃ 水浴中，避光作用 1 小時。以 1 ml PBS 潤洗二次，最後加入 200 μl PBS，混合均勻，即可使用於流式細胞分析儀 (FACSCalibur Becton Dickinson, BD, USA)。未經病毒感染 HEL 細胞，同上述步驟一起作用，當作 mock。

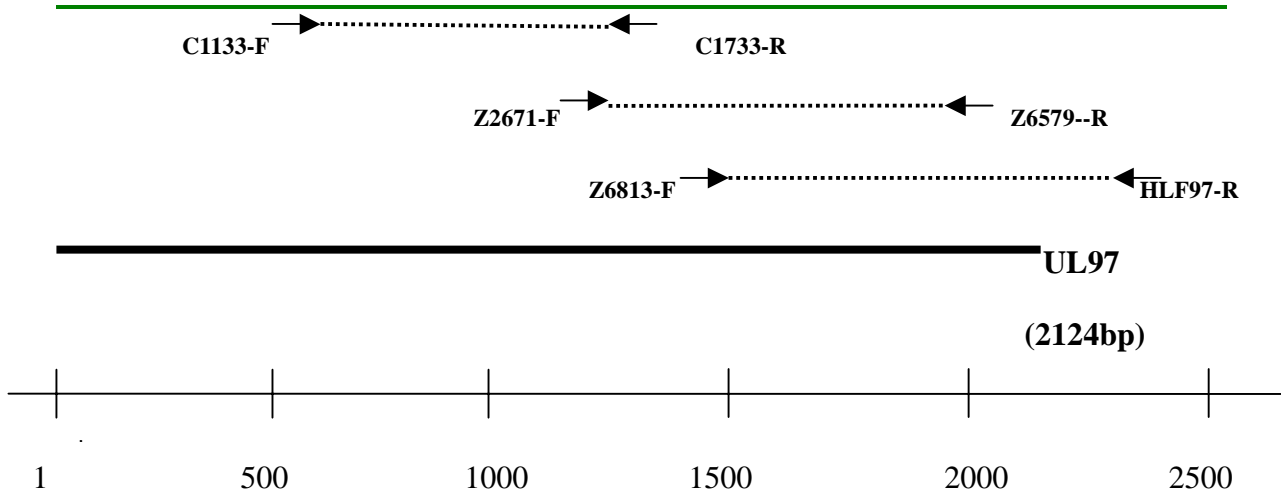
以流式細胞分析儀偵測受 HCMV 感染的陽性細胞率。先以細胞大小 (Forward scatter, FSC) 與細胞顆粒性 (Side scatter, SSC), 調取適當的 Detectors/Amps , 分出 HEL 細胞群, 每次收取的細胞數為 10,000 顆細胞, 之後使用 CELL Quest 軟體分析。以不含 GCV 的病毒控制組其陽性細胞率為 100 % , 即可求出可抑制 50 % 的藥物濃度 ID₅₀。 ID₅₀ < 6 uM : ganciclovir sensitive; ID₅₀ > 6 uM and < 12 uM : ganciclovir partially resistant; ID₅₀ > 12 uM : ganciclovir resistant^{6,28}。

3、 UL97 gene 及 UL54 gene 之核酸序列分析

首先將具抗藥性病毒株得到之病毒株經核酸萃取(QiaGene)後, 分別進行病毒之 DNA UL97 及 DNA UL54 之核酸序列分析。

UL97 primers

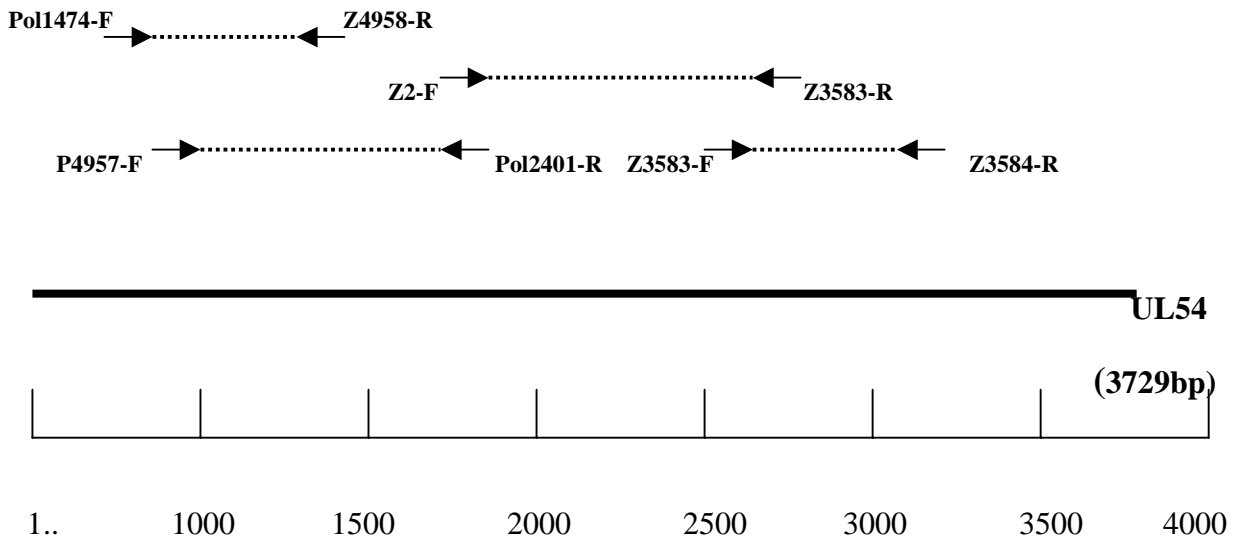
名稱	核酸序列	產物長度 (核酸位置)
C1133-F	5`-TGGACGCGGTGCTCGAAGAA-3`	601 bp
C1733-R ³⁵	5`-TCTGTGTGGAAACGTCGATGTACC-3`	(650 - 1250)
Z2671-F ³⁶	5`-CATCGACGTTTCCACACAGAC-3`	693 bp
Z6579-R ³⁶	5`-CATCTTGGCCTCCACAAAGC-3`	(1231 - 1923)
Z6813-F ³⁶	5`-GCACCGTCTGCGCGAATGTTA-3`	724 bp
HLF97-R ³⁷	5`-CTCCTCATCGTCGTCGTAGTCC-3`	(1536 - 2259)



HCMV UL54 (Polymerase) 基因

所使用之核酸引子為引用已發表論文^{5,38}之設計。

名稱	核酸序列	產物長度 (核酸位置)
Pol1474-F ³⁸	5`-GTGATATCGAGGTAGACTGCGATG-3`	550 bp
Z4958-R ³⁸	5`-TGCCGCTTAAAACCCACGGCG-3`	(815 - 1364)
P4957-F ³⁸	5`-GCTGCACTTCGGAGGGTGTG-3`	716 bp
PolP2401-R ³⁸	5`-CAGCAGCGAGGTGTAGATACGG-3`	(1046 - 1761)
Z2-F ⁵	5`-TAACAGTAGTAGCAGCGTCG-3`	705 bp
Z3583-R ³⁸	5`-CCTGACGATGTTTCGAGCCC-3`	(1980 - 2684)
Z3583-F ³⁸	5`-GGGCTCGAAACATCGTCAGG-3`	425 bp
Z3584-R ³⁸	5`-CGTGGCACGCCGTACTTCTT-3`	(2665 - 3089)



將 UL97 gene 或 UL54 gene 之 PCR 產物純化後,以 ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, USA) 進行核酸定序反應, 之後使用 PCR Clean up-M (VIOGENE, Taiwan) 純化核酸定序反應產物, 即可利用自動核酸定序儀(ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer 或 ABI 3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems, USA) 分析核酸序列。

4、核酸序列之分析比較

使用電腦軟體 GeneWorks 2.01 (IntelliGentics) 進行由自動核酸定序儀所得核酸序列之連結，並與 AD169 病毒株基因序列 (EMBL accession no. X17403) 進行基因比對和轉譯之胺基酸序列比對。

結果與討論

1. 巨細胞病毒對抗病毒感受方法之建立

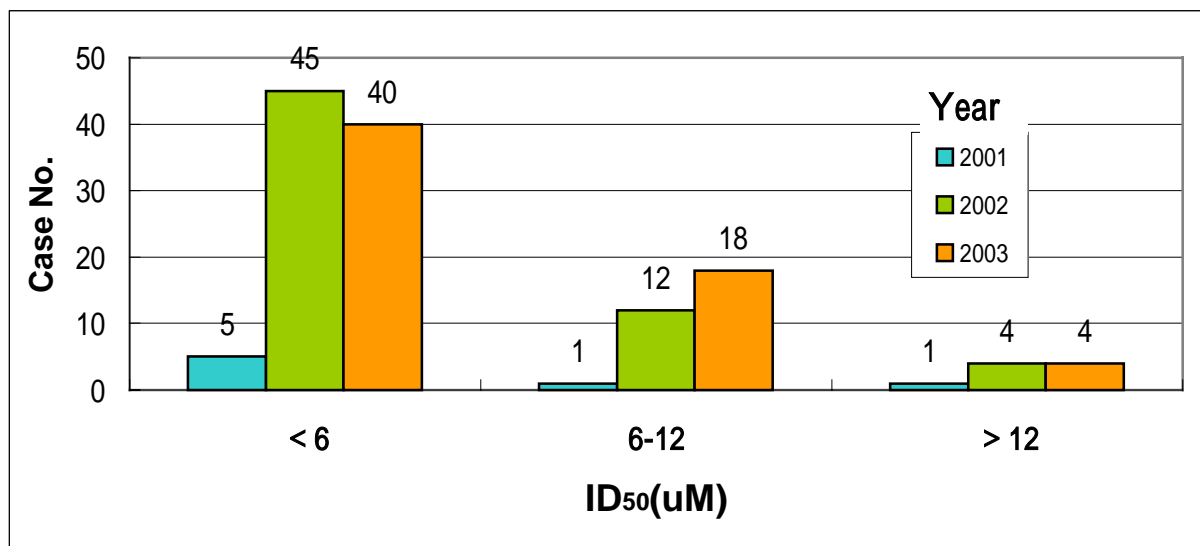
首先我們先以 Flow cytometry 為主要方法。以巨細胞病毒參考株 AD169 為測試之對象。由於 HEL (Human embryonic lung fibroblast) 為巨細胞病毒在 in vitro 培養時最常用之宿主。細胞非常脆弱。因此在固定及穿孔時容易受到破壞，因此嚐試用了幾個常用之固定及穿孔方法 (methanol、methanol-Triton X100、 paraformaldehyde-Tween20 等)。結果以 methanol-Triton X100 法可得較理想之結果，同時所需之時間亦較短。因此以此種固定穿孔法作為藥物感受性分析用。以此方法檢測 CMV169 參考株，其 ID₅₀ < 6 μ M 屬於敏感株。另一抗病毒藥物分析法 (Immunofluorescence foci reduction) 亦被嚐試，雖可得到類似之結果。但因所需之單株抗體量大，成本太高，因此將最後以 flow cytometry 為藥物感受性篩檢之主要方法。

2. 巨細胞病毒株對 ganciclovir 感受性之分析

由於巨細胞病毒繁殖不易，但經努力已至少已有 141 株繁殖完成。此些繁殖出之病毒已完成藥物篩檢。其結果如表一及 Fig.1。

表一、2001 年-2003 年 HCMV 對 GCV 之 ID₅₀ 統計結果

ID ₅₀ 年份	< 6 μ m	6 μ m << 12 μ m	> 12 μ m	無法歸類	合計 (不含無法歸類)	合計
2001 年	5	1	1	0	7	7
2002 年	45	12	4	10	61	71
2003 年	40	18	4	1	62	63



由表一及 Fig.1 可知巨細胞病毒株對 ganciclovir 大多具有感受性 93.08% (121/130)。抗藥性只有 9 株，佔所有臨床測試株之 6.92% (9/130)。

3. 巨細胞病毒株對 ganciclovir 抗藥性之 UL97 及 UL54 之核酸序列分析

在 9 株抗藥株中對其中 4 株之 UL97 及 1 株之 UL54 基因之序列分析結果如表二所示

表二、巨細胞病毒對 ganciclovir 抗藥株之 UL97 及 UL54 基因/氨基酸變異分析

病毒株	(μM)	氨基酸變異位置						
		UL97-A	UL97-B	UL-97C	UL97-D	UL54-1	UL54-2	UL-54-3
021878	> 24	D605E	I244V	NA	-	-	-	-
030953	20.6	D605E	I244V	-	NA	NA	NA	NA
031610	21.3	D605E	I244V	-	NA	NA	NA	NA
032315	23.1	D605E; M460V	NA	NA	NA	NA	NA	NA

在 9 株抗藥株中因病毒之繁殖不易僅先就 ID₅₀ 較高者共 4 株進行核酸序列分析。首先針對國外抗藥株常見之變異基因 thymidine kinase 基因(UL97)分析。其中 3 株雖然分別在 0 氨基酸 605 位置由 D E, 244 位置由 I V。但此兩位置之改變在其他敏感株亦有同樣之變異存在，因此此些位置之變異無法解釋抗藥性之產生。為進一步瞭解是否其他位置有所變異因此再對 021878 株之其他位置 UL97D 及 UL54 之序列分析，其序列與敏感株並無不同。因此此一株病毒之抗藥性與核酸變異之相關性仍有待進一步分析。其他 2 株(030953 及 031610)之 UL54 基因序列並未分析是否 UL54 基因序列之變異與此兩株之抗藥性有關亦有待進一步證明。在 4 株分析之病毒中只有 032315 株在其氨基酸 460 位置有變異存在(M V)，此一變異導致病毒產生抗藥性在國外之研究亦有同樣之發縣。

參考文獻

1. Pass RF. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. *J Infect Dis* 152; 243-8, 1985.
2. Hanshaw J. Cytomegalovirus . In: *Infectious disease of the fetus and newborn*. Remington, J, Klein J. (eds) 2nd edition Saunders, Philadelphia, 104-142, 1983.
3. Yow MD, Demmler GJ. Congenital cytomegalovirus disease-twenty years is long enough. *N Engl J med* 326; 702-703, 1992.
4. Chang MH, Hsu HC, Lee CY, Wang TR, Kao CL. Neonatal hepatitis: a follow-up study. *J Pediatr Gastroentero Nut* 6; 203-7, 1987.
5. Jordan MC. Cytomegalovirus infection. In: *Infectious disease* 4th ed., eds, PD Hoeprieh , Jordan MC, Lippincott Company, Philadelphia, USA., 1989.

6. Peckham CS, Chin KS, Coleman JC, Henderson K, Hurley R, Preece PM. Cytomegalovirus infection in pregnancy: preliminary findings from a prospective study. *Lancet* 2; 1352-1355, 1983.
7. Hokeberg I, Eriksson BM, Zwegberg-Wirtgart B, Tufvesson G, Olding-Stenkvis E, Grillner L. Diagnostic markers and risk factors of cytomegalovirus infection and disease in renal allograft recipients. *Scandinavian J Infect Dis* 27;435-440,1995.
8. Schooley RT. Cytomegalovirus in the setting of infection with human immunodeficiency virus. *Rev Infect Dis* 12; s811-s819, 1990.
9. Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Non-bacterial pneumonia after allogeneic marrow transplantation: a review of 10 year experience . *Rev Infect Dis* 4; 1119-1132, 1984.
10. Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis* 153; 478-488, 1986.
11. Drew WL. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *Clinical Infect Dis* 14; 608-615, 1992.
12. Emmanuel D, Cunningham I, Jules-Elysee K, et al. Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation successfully treated with the combination of ganciclovir and high dose intravenous immune globulin. *Ann Intern Med* 109; 777-782, 1988.
13. Hammer SM, Inouye RT. Antiviral agents. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG eds. *Clinical Virology*. New York: Churchill Livingstone, 1997: 185-250.
14. Biron KK, Fyfe JA, Stanat SC, Leslie LK, Sorrell JB, Lambe CU, Coen DM. A human cytomegalovirus mutant resistant to the nucleoside analog 9-[[2-hydroxy-1-(methyl)ethoxy]methyl]guanine(BW B759U) induced level of BW B759U triphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83; 8796-8773, 1986.
15. Drew WL, Miner RC, Busch DF, Follansbee SE et. A. Prevalence of resistance inpatients receiving ganciclovir for serious cytomegalovirus infections. *J Infect Dis* 163; 716-719, 1991.
16. Liu W, Shum C, Martin DF, Kuppermann BD, Hall AJ, Margolis TP. Prevalence of antiviral drug resistance in untreated patients with cytomegalovirus retinitis. *J Infect Dis* 182; 1234-1238, 2000.
17. Limaye AP, Corey L, Koelle DM, Davis CL, Boeckh M. Emergenc of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid-organ transplants. *Lancet* 356; 645-649, 2000.
18. Bienvenu B, Thervet E, Bedrossian J, Scieux C, Mazon MC, Thouvenot D, Legendre C. Development of cytomegalovirus resistance to ganciclovir after or maintenance treatment in a renal transplant recipient. *Transplantation* 69; 182-184, 2000.
19. Erice A. Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin Microbiol Rv* 12; 286-297, 1999.
20. Wolf DG, Smith IL, Lee DJ, Freman WR, Flores-Aguilar M, Spector SA. Mutations in human cytomegalovirus UL97 gene confer clinical resistance to ganciclovir and can be detectd directly in patient plasma. *J Clin Investig* 95; 257-273, 1995.
21. Smith IL, Cherrington JM, Jiles RE, Fuller MD, Freman WR, Spector SA. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alternations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J Infect Dis* 176; 69-77, 1997.
22. Kariya M, Mori S, Eizuru Y. Comparison of human cytomegalovirus DNA polymerase

- activity for ganciclovir-resistant and –sensitive clinical strains. *Antiviral Res* 45; 115-122, 2000.
23. Chou S, Miner RC, Drew WL. A deletion mutation in region V of the cytomegalovirus DNA polymerase sequence confers multidrug resistance. *J Infect Dis* 182; 1765-1768, 2000.
 24. Wu CW, Wu Felicia YH, Yuo CY, Shen CY. Molecular biological and epidemiological studies of human cytomegalovirus infection in Taiwan. *J Genet Mol Biol* 2; 43-51, 1991.
 25. Lu SC, Chin LT, Wu FM, Hsieh GJ, Huang SP, Chen JC, Chang AC, Hsieh WK, Chen BH. Seroprevalence of CMV antibodies in a blood donor population and premature neonates in the south-central Taiwan. *Kao Hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih*. 10-603-610, 1999.
 26. Hun CC, Chen MY, Hsieh SM, Sheng WH, Chang SC. Clinical spectrum, morbidity, and mortality of acquired immunodeficiency syndrome in Taiwan: a 5-year prospective study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 24; 378-385, 2000.
 27. Chiou SH, Liu CY, Hsu WM, Chan YJ, Chou CK, Chung YM, Liu JH, Liu WT, Chen SC, Wong WW. Ophthalmic findings in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Microbiol Immunol Infect* 33; 45-48, 2000.
 28. Chen CL, Wang KL, Hui YL, Shieh WB. Liver transplantation in Taiwan: the Chang Gung experience. *Cancer Chemother Pharmacol* 31 suppl: S162-165, 1992.
 29. Hsu RB, Chu SH, Wang SS, Ko WJ, Chou NK, Lee CM, Chen MF, Lee YT. Low incidence of transplant coronary artery disease in Chinese heart recipients. *J Am Coll Cardiol* 33; 1573-1577, 1999.
 30. Eric A, Borrell N, Li W, Miller WJ, Balfour Jr, HH. Ganciclovir susceptibility and analysis of UL97 region in cytomegalovirus (CMV) isolates from bone recipients with CMV disease after antiviral prophylaxis. *J Inf Dis* 178: 531-534, 1998.
 31. Eric A, Gil-Roda C, Perez JL, Balfour Jr, HH, Sannerud KJ, Hanson MN, Boivin G, Chou S. Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients. *J Inf Dis* 175: 1087-1092, 1997.
 32. Baldanti F, Underwood MR, Stanat SC, Biron KK, Chou S, Sarasini A, Silini E, Gerna G. Single amino acid changes in the DNA polymerase confer phenotypic resistance and slow growth phenotype, while mutations in the UL97-encoded phosphotransferase confer ganciclovir resistance in three double-resistant human cytomegalovirus strains recovered from patients with AIDS. *J Virol* 70: 1390-1395, 1996.
 33. McSharry J, Lurain NS, Drusano GL, Landy A, Notka M, O’Gorman MRG, Weinberg A, Shapiro HM, Reichelderfer PS, Crumpacker C. Rapid ganciclovir susceptibility assay using flow cytometry for human cytomegalovirus clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2326-2331, 1998.

計畫進度成果自評

整體計畫均依預定進度執行。已完成方法之建立。共收集 130 病毒株並完成藥物感受性之分析。其中有 9 株抗藥株被發現，抗藥性較強之 4 株抗藥株其 UL97 與 UL54 之部份核酸序列已經完成。雖然 3 株抗藥株尚未發現其基因變異與抗藥性產生之相關性，但有 1 株抗藥株在 UL97 氨基酸位置發生變異由 methionine 變成 valine。此變異與抗藥性產生之相關性在國外亦有相同之報告。除研究之初步成果對國內巨細胞病毒對 ganciclovir 感受性及抗藥性之瞭解有所幫助外亦因方法建立及參與人員之培育對科技人才之養成亦有幫助。

中 華 民 國 92 年 10 月 31 日

可供推廣之研發成果資料表

可申請專利

可技術移轉

日期：__年__月__日

國科會補助計畫	計畫名稱： 計畫主持人： 計畫編號： 學門領域：
技術/創作名稱	
發明人/創作人	
技術說明	中文： (100~500 字)
	英文：
可利用之產業 及 可開發之產品	
技術特點	
推廣及運用的價值	

1. 每項研發成果請填寫一式二份，一份隨成果報告送繳本會，一份送 貴單位研發成果推廣單位（如技術移轉中心）。
2. 本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。
3. 本表若不敷使用，請自行影印使用。