

Kommerzielle Systeme zur Genotypisierung von humanen Immundefizienzviren Typ 1: Vergleich von ViroSeq (Abbott) und TruGene (Bayer)

Commercially available assays for genotyping of human immunodeficiency virus type 1: Comparison of ViroSeq (Abbott) and TruGene (Bayer)

Martin Stürmer*, Annemarie Berger, Wolfgang Preiser und Hans Wilhelm Doerr

Institut für Medizinische Virologie, Universitätsklinik
Frankfurt, Frankfurt am Main, Deutschland

Zusammenfassung

Die HIV-1-Resistenztestung wird ein immer bedeutenderer Bestandteil des Monitorings der antiretroviralen Therapie und erfolgt in der Regel mittels Genotypisierung. Zur Zeit sind zwei Systeme kommerziell erhältlich und obwohl diese technisch nicht zu den einfach durchführbaren Methoden gehören, haben sie doch einen hohen Grad an Qualität erreicht. Modifikationen der Standardprotokolle sind für bestimmte Fragestellungen durchaus von Vorteil. Obwohl beide Systeme auf Entscheidungsregeln basierende Resistenz-Reports beinhalten, braucht es das zusätzliche Wissen und die Erfahrung des Anwenders, um die detektierten Mutationsmuster in klinisch brauchbare Resultate überführen zu können. Beide der hier detailliert beschriebenen Systeme haben ihre Vor- und Nachteile. Die Entscheidung für das eine oder andere System muss aufgrund der individuellen Bedürfnisse getroffen werden. Microarray-Systemen könnte der Markt der Zukunft gehören.

Schlüsselwörter: HIV-1 Genotypisierung; Resistenztestung; Therapiemonitoring; TruGene; ViroSeq.

Abstract

HIV-1 resistance testing has become an increasingly important feature in antiretroviral treatment and is commonly performed by genotyping. Currently, two different systems are being marketed, and despite being far from easy to use, they have achieved a high degree of quality. Modifications of the standard kit protocols may be

advantageous in certain situations. Although resistance reports issued by these systems are based on decision rules, they nevertheless require considerable knowledge and skills by the user to draw useful clinical data out of detected resistance patterns. Both systems described here in detail have their advantages and disadvantages; a decision in favor of one or the other needs to be based on individual requirements. In the future, Microarray systems may achieve a leading position on the market.

Keywords: HIV-1 genotyping; resistance testing; therapy monitoring; TruGene; ViroSeq.

Einleitung

Das Auftreten von Medikamenten-resistenten Humanen Immundefizienzvirus Typ-1 (HIV-1)-Varianten wurde erstmalig bei Patienten beobachtet, deren Zidovudin (AZT)-Monotherapie erfolglos war [1]. Viren, die aus diesen Patienten isoliert wurden, wiesen eine phänotypische Medikamenten-Resistenz in vitro auf. Kurze Zeit später konnte diese Beobachtung mit spezifischen Mutationen im Reversen Transkriptase (RT)-Gen [2] korreliert werden. Auch nach der Zulassung weiterer Nukleosidaler (NRTIs) und Nicht-Nukleosidaler (NNRTIs) Reverse Transkriptase-Inhibitoren zur HIV-1-Behandlung konnte im Rahmen der Zweifach-Kombinationstherapie keine länger andauernde Virus-Suppression erreicht werden. Mit der Einführung der Protease-Inhibitoren (PIs) im Jahre 1996 wurden Dreifach-Kombinationstherapien als therapeutische Optionen in Erwägung gezogen; die Kombination von zwei NRTIs mit entweder einem PI oder einem NNRTI ermöglichte es, die Virusmenge über einen längeren Zeitpunkt zu unterdrücken, was eine grundlegende Bedingung für eine dauerhaft erfolgreiche antiretrovirale Therapie darstellt [3–6]. Die Virusvermehrung so weit wie möglich zu unterdrücken ist sehr wichtig, um das Entstehen und die Selektion von Virusvarianten mit Resistenz-assoziierten Mutationen (RAMs) zu vermeiden. Die Bildung neuer Varianten ist aufgrund der hohen Mutationsrate von HIV nicht ungewöhnlich: die RT von HIV hat keine Reparatur-

*Korrespondenz: Dr. phil. nat. Martin Stürmer, Institut für Medizinische Virologie, Universitätsklinik Frankfurt, Paul-Ehrlich-Str. 40, 60596 Frankfurt, Deutschland
Tel.: +49 (0)69 6301 6454 Fax: +49 (0)69 6301 6477,
E-mail: M.Stuermer@em.uni-frankfurt.de

Funktion ("proof-reading") und produziert durchschnittlich einen Fehler pro 1.000 bis 10.000 Basen [7–9], und das bei einer Neubildung von 10^9 Viren pro Tag in unbehandelten Patienten [10, 11]. Die so genannte hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) beinhaltet mindestens zwei NRTIs in Kombination mit einem PI (bis auf Nelfinavir mit Ritonavir geboostert) oder einem NNRTI als "Goldstandard" und hat die Mortalität sowie das Auftreten AIDS-definierender Krankheiten signifikant reduziert [12–14]. Trotz dieser Erfolge sprechen einige Patienten nicht oder nur unzureichend auf HAART an [15–17]. Faktoren wie mangelnde Compliance, Adsorptionsstörungen, andere pharmakogenetische Wechselwirkungen oder fehlende Potenz der Therapie im jeweiligen Patienten (hohe initiale Viruslast, möglicherweise vorhandene Resistenz resultierend aus vorherigen Therapieversuchen) können insuffiziente Medikamentenspiegel verursachen, die eine Virusreplikation in Anwesenheit von Medikamenten ermöglichen. In der Folge können Medikamenten-resistente Viren entstehen und selektiert werden, die dann für ein Therapieversagen verantwortlich sind [18, 19]. Es ist ziemlich sicher, daß die Entstehung und Selektion solcher resistenter Viren nicht auf antiretrovirale Monotherapien beschränkt, sondern auch unter HAART möglich ist [20–23]. Zusätzlich wurde die Transmission von resistenten Viren im Zusammenhang mit der primären HIV-Infektion beobachtet [24–29]. Für alle anti-HIV-1-Medikamente, die zur Zeit zugelassen sind, wurden RAMs im RT-, im Protease (PR)- und im gp41-Gen beschrieben [30, 31].

Zahlreiche prospektive Studien haben die genotypische HIV-1-Resistenztestung mit dem "standard of care" in Patienten verglichen, deren antiretrovirale Therapie aufgrund von virologischem Versagen geändert werden musste [32–37]. In den meisten Fällen war die Entwicklung der virologischen Parameter (beurteilt durch Bestimmung der Viruslast) signifikant besser; die genotypische Resistenztestung wurde daher in aktuelle nationale und internationale Behandlungsrichtlinien implementiert [38–41]. In Deutschland kann die Genotypisierung zusätzlich seit dem 01. April 2004 als Kassenleistung gemäß einheitlichem Bewertungsmaßstab (EBM) abgerechnet werden (Ziffer 4828). Trotz dieser insgesamt positiven Ergebnisse zeigen diese Studien aber auch, dass nicht alle Patienten von einem Resistenztest profitieren [32–36]. Damit wird klar, dass die Genotypisierung nur einen Teil im Puzzlespiel der erfolgreichen Behandlung HIV-infizierter Patienten darstellt.

Ein elementarer und entscheidender Punkt bei der genotypischen Resistenztestung sind die Präzision des eingesetzten Testsystems bei der Detektion von RAMs sowie die darauf folgende Interpretation der gefundenen Mutationsmuster. Zur Zeit sind zwei kommerzielle Systeme auf dem Markt erhältlich, die im eigenen Labor durchgeführt werden können: das ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System Version 2 (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und das TruGene HIV-1 Genotyping Kit (Bayer Diagnostics, Fernwald, Deutschland) [42]; beide Systeme

haben Interpretationsprogramme implementiert, die auf "rule-based"-Algorithmen basieren. Obwohl zusätzliche Firmen- bzw. Service-basierende Assays existieren, beschränkt sich diese Übersichtsarbeit auf die beiden oben erwähnten Assays und vergleicht den aktuellen Stand dieser Systeme bezüglich Durchführung und Präzision.

Allgemeine Daten zu den Systemen

Sowohl das ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System Version 2 (ViroSeq) als auch das TruGene HIV-1 Genotyping Kit (TruGene) sind von der FDA zur HIV-1-Genotypisierung zugelassen. Sie beinhalten Module zur Extraktion der Nukleinsäure, zur reversen Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und zur Sequenzier-Reaktion sowie Software für das Sequenz-Alignment und die Interpretation der Mutationsmuster [42]. Ein automatisierter Sequenzer zur Analyse der Sequenz-Produkte muss separat erworben werden; für ViroSeq sind die Kapillar- oder Gelsequenzer der Firma Applied Biosystems, Foster City, USA, einsetzbar, die TruGene Sequenz-Produkte werden auf dem Gel-basierenden Opengene™ DNA sequencing system (Opengene) analysiert, das ebenfalls von Bayer erhältlich ist [42].

Testdurchführung

Das Standard-Testprotokoll für beide Testsysteme ist in Tabelle 1 zusammengefasst und wird im Detail zusammen mit sinnvollen Modifikationen in den folgenden Abschnitten diskutiert.

Nukleinsäure-Extraktion

Beide Systeme werden mit unterschiedlichen Extraktionsmodulen ausgeliefert. Die TruGene-Extraktion (TruPrep™) basiert auf dem QIAamp Viral RNA Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) unter nicht-exklusiver Lizenz durch Qiagen. Zu 140 µL Patientenplasma werden 560 µL AVL-Puffer hinzugegeben und die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 560 µL Ethanol und intensivem Mischen der Proben werden 630 µL dieser Lösung auf die Silika-Membran-Säulen gegeben, die im TruPrep-Modul enthalten sind. Die Bindung der Nukleinsäure wird durch die Selektivität der Silika-Gel-basierenden Membran unter speziellen Pufferkonditionen ermöglicht. Die Proben werden für eine Minute mit $6000 \times g$ zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Filtrats werden die übrigen 630 µL der Lösung auf die Säulen gegeben und wie zuvor zentrifugiert. Die Säulen werden mit 500 µL Puffer AW1 und anschließend mit 500 µL Puffer AW2 gewaschen, anschließend jeweils für eine Minute mit $6000 \times g$ zentrifugiert und das Filtrat wird verworfen. Um den restlichen

Tabelle 1 Überblick des Arbeitsablaufes für ViroSeq und TruGene.

| Schritt | ViroSeq detaillierte Beschreibung | TruGene detaillierte Beschreibung |
|---|---|---|
| Nukleinsäure-Extraktion | Zentrifugation zur Aufkonzentrierung 500 µL Probe Isopropanol-Präzipitation 2 h | keine Aufkonzentrierung (optional) 140 µL Probe Silika-basierende Extraktion 1 h |
| RT-PCR | “Two-enzyme, two step” Kontaminationskontrolle 5 h | “Two-enzyme, one step” keine Kontaminationskontrolle 5,5 h |
| PCR Produkt-Aufreinigung | Säulenaufreinigung Agarose-Gel-Quantifizierung Verdünnung der PCR-Produkte 1 h | nicht benötigt – |
| Sequenzier-Reaktion | Big Dye Terminator-Chemie Sechs Primer (5' und 3' in verschiedenen Ansätzen; Abb. 1) Terminatoren mit vier Farbstoffen markiert (ein Ansatz) Sechs Reaktionen pro Patient 3,5 h | CLIP Dye Primer-Chemie Drei Primerpaare (5' und 3' im gleichen Ansatz; Abb. 2) Verschiedene Ansätze je Terminator; Primer mit zwei Farbstoffen markiert 12 Reaktionen pro Patient 4 h |
| Sequenzier-Produkt-Aufreinigung Elektrophorese | Natriumacetat-Ethanol-Fällung oder Säulenaufreinigung 1 h oder 0,5 h Abhängig vom Sequenzer ABI377-96 als Beispiel: 96 Spuren/Gel \cong 16 Patienten/Gel 8 h | nicht benötigt – 16 Spuren/Gel \cong 1 1/3 Patienten/Gel 1 h |
| Analyse | Spurzuordnung für Gelsequenzen HIV Genotyping-Software Macintosh Window OS 15 oder 10 min/Probe | keine Spurzuordnung nötig GeneObjects-Software OpenStep OS 10 min/Probe |

Waschpuffer nach dem zweiten Waschschrift vollständig zu entfernen, werden die Säulen abschließend für zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die virale RNA wird mit 60 µL Puffer AVE durch Zentrifugation für eine Minute mit $6000\times g$ eluiert. Mit Hilfe dieses Protokolls sollte es möglich sein, Proben mit einer Viruslast von mindestens 1000 Kopien/mL erfolgreich zu genotypisieren. Eine Modifikation, die schon im TruPrep-Protokoll erwähnt ist, wird wie folgt durchgeführt: 1 mL EDTA-Plasma wird für 60 Minuten mit $25.000\times g$ zentrifugiert, um die Viruspartikel vor der Extraktion zu pelletieren. 860 µL des Überstandes werden nach der Zentrifugation verworfen und die restlichen 140 µL für die RNA-Extraktion eingesetzt. Mit Hilfe dieser Modifikation kann die Nachweisgrenze für die Genotypisierung mittels TruGene auf 500 bis 750 Kopien/mL gesenkt werden [42, 43].

Das RNA-Extraktionsmodul von ViroSeq basiert auf der Isopropanol-Präzipitierung. 500 µL Plasma werden für 60 Minuten mit $25.000\times g$ zur Aufkonzentrierung der Viruspartikel zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand entfernt und 600 µL Viral Lysis-Puffer werden zum Viruspellet hinzugegeben. Die Proben werden für

10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 600 µL Isopropanol hinzugegeben und die Proben für 15 Minuten mit $15.000\times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und 1 mL 70%iges kaltes Ethanol (4°C) hinzugefügt. Die Proben werden für fünf Minuten mit $15.000\times g$ zentrifugiert. Nachdem der Überstand und das restliche Ethanol vollständig entfernt wurden, wird das Pellet in 50 µL RNA-Diluent resuspendiert. Die Nachweisgrenze beim Gebrauch dieser Extraktionsmethode liegt bei 1000 Kopien im Testansatz, was einer Viruslast von 2000 Kopien/ml entspricht. In einer Studie bei pädiatrischen Patienten war es mit diesem Protokoll sogar möglich, bei sieben von acht Proben mit im Median 742 Kopien im Testansatz eine Genotypisierung erfolgreich durchzuführen [44]. Zwei Modifikationen der ViroSeq-Extraktion sind beschrieben worden. Das Verdoppeln der Plasmamenge von 0,5 mL auf 1,0 mL hat die Sensitivität von ViroSeq auf 500–750 Kopien/ml gesteigert [42]. Zusammen mit dieser erhöhten Plasmamenge von 1,0 mL und dem Einsatz des QIAamp Viral RNA Kit anstelle der Isopropanol-Präzipitation ist es möglich, eine Nachweisgrenze von 250 Kopien/mL zu erreichen [45]. Die Extraktion wird wie für TruPrep beschrieben durch-

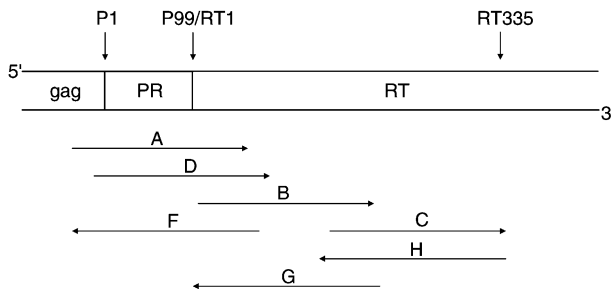


Abbildung 1 Lage der Sequenzier-Primer des ViroSeq. Das gesamte Protease-Gen (PR) und das Reverse Transkriptase-Gen (RT) bis Aminosäure 335 werden abgedeckt. Primer D ist ein Backup-Primer für den Fall, daß Primer A ausfällt; wir empfehlen den Einsatz auch nur in diesem Fall.

geführt, nur wird das Elutionsvolumen von 60 µL auf 50 µL reduziert.

Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

Beide Systeme benutzen zwei Enzyme für die reverse Transkription (RT) der RNA in cDNA und die anschließende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für die Amplifikation der Zielsequenz. Das ViroSeq-Modul basiert auf separaten Reaktionen für RT und PCR. Die extrahierte RNA wird mit einem ready-to-use RT-Mix (welcher einen einzelnen spezifischen Primer, dNTPs, Puffer, MgCl₂ und Wasser beinhaltet), Dithiothreitol (dTT), RNase-Inhibitor und MuLV Reverse Transkriptase für 60 Minuten bei 42°C für die RT inkubiert. Der komplette Reaktionsansatz wird zum PCR-Mastermix hinzugefügt, der aus einem ready-to-use PCR-Mix (welcher zwei spezifische Primer, dNTPs mit dUTP anstelle von dTTP, Puffer, MgCl₂ und Wasser beinhaltet), Uracil N-Glykosylase (UNG) und AmpliTaq Gold besteht. Dieser Mix wird für 10 Minuten bei 50°C (Verdau möglicher dUTP-haltiger PCR-Kontaminationen), 12 Minuten bei 93°C (Denaturierung der UNG), gefolgt von 40 Zyklen mit 93°C für 20 Sekunden, 64°C für 45 Sekunden und 66°C für 180 Sekunden (PCR) und einem finalen Elongations-Schritt bei 72°C für 10 Minuten inkubiert. Die PCR-Produkte müssen in einem weiteren Schritt mit Microcon-100 Gel-filtrations-Säulen aufgereinigt werden, um nicht eingebaute dNTPs und Primer zu entfernen. Anschließend werden diese Produkte auf einem Agarose-Gel mittels Massen- und Größenstandards visualisiert und quantifiziert und entsprechend der vorhandenen Menge verdünnt. Eine Modifikation des PCR-Protokolls an dieser Stelle ermöglicht eine Genotypisierung bei einigen Patienten mit einer Viruslast zwischen 50 und 300 Kopien/mL [46] bzw. unter 50 Kopien/mL [47]. Es wird ein Nested-PCR-Protokoll mit zwei Primern (A und H) aus dem Sequenzierungs-Modul (Abbildung 1) verwendet. Three bis 5 µL Produkt aus der ersten PCR werden mit der AmpliTaq Gold-Polymerase, dem dazugehörigen

Reaktionspuffer II (1 × konzentriert), MgCl₂, den Primern A und H sowie den vier Standard-dNTPs unter den selben Bedingungen wie oben erwähnt inkubiert. Damit liegt die Rate an amplifizierbaren Proben zwischen 50 und 300 Kopien/mL bei 84% und zwischen 300 und 1000 Kopien/mL bei 95% [46] bzw. wird von 59% auf 86% zwischen 50–999 Kopien/mL und von 24% auf 88% in Proben unter 50 Kopien/mL erhöht [47].

Das TruGene System verwendet eine so genannte "two-enzyme one-tube" RT-PCR-Reaktion. Die extrahierte RNA wird zu einem Mastermix hinzugefügt, der RT-PCR-Primer, dNTPs, dTT und einen RNase-Inhibitor enthält, und bei 90°C für 120 Sekunden und bei 50°C für mindestens fünf Minuten inkubiert wird. Während die Temperatur bei 50°C gehalten wird, wird ein zweiter Mastermix hinzugefügt, der RT-PCR-Puffer, RNase-Inhibitor, das RT-Enzym und die DNA-Polymerase enthält. Dieses Gemisch wird weiter bei 50°C für insgesamt 60 Minuten und 94°C für 120 Sekunden inkubiert, gefolgt von 20 Zyklen mit 94°C für 30 Sekunden, 57°C für 30 Sekunden und 68°C für 120 Sekunden, 17 Zyklen mit 94°C für 30 Sekunden, 60°C für 30 Sekunden und 68°C für 150 Sekunden sowie einem finalen Elongations-Schritt mit 68°C für sieben Minuten. Keine weiteren Schritte sind notwendig. Bis dato wurden für die TruGene RT-PCR keine Modifikationen beschrieben.

Sequenzier-Reaktion und Detektion

Die Sequenzier-Reaktionen in beiden Systemen basieren auf der Kettenabbruchmethode von Sanger [48], nutzen aber eine unterschiedliche Chemie. Das ViroSeq-System benutzt Fluoreszenz-markierte Terminatoren, jeder mit einem anderen Farbstoff markiert. In Verbindung mit einem automatisierten Sequenzer, der die vier unterschiedlichen Farbstoffe detektieren kann, ist es möglich, jede Probe in einem Reaktionsansatz zu sequenzieren. Sieben Primer (A-D 5'-Richtung, F-H 3'-Richtung) sind im ViroSeq für die Analyse der kompletten PR und dem größten Teil der RT (Aminosäure 1-335, Abbildung 1) enthalten. Der D-Primer dient als Backup-Primer für den Fall, daß der A-Primer keine brauchbare Sequenz liefert. Er besitzt aber insgesamt eine sehr schlechte Erfolgsquote [49–51], daher empfehlen wir den Einsatz dieses Primers für die initiale Testung nicht. Die Zusammenfassung in Tabelle 1 basiert auf dem Einsatz der übrigen sechs Primer. Das aufgereinigte und verdünnte PCR-Produkt wird mit dem entsprechenden Primer-Mix (welcher Puffer, dNTPs, Fluoreszenz-markierte Terminatoren, den Sequenzier-Primer und das Sequenzier-Enzym beinhaltet) bei 96°C für 60 Sekunden gefolgt von 30 Zyklen mit 96°C für 10 Sekunden, 50°C für 5 Sekunden und 60°C für vier Minuten inkubiert. Die Sequenzier-Produkte müssen zur Entfernung der nicht eingebauten Fluoreszenz-markierten Terminatoren aufgereinigt werden. Das Originalprotokoll empfiehlt den Gebrauch der Natriumacetat/Ethanol-Methode zur Fällung der Sequenzier-Pro-

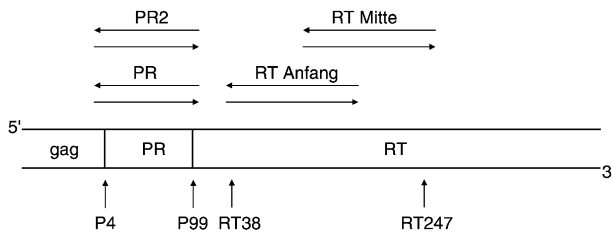


Abbildung 2 Lage der Sequenzier-Primer des TruGene. Das Protease-Gen (PR) von Aminosäure 4-99 und das Reverse Transkriptase-Gen (RT) von Aminosäure 38-247 werden abgedeckt. Wir empfehlen für die Analyse der PR nur das Primerpaar PR2.

dukte, allerdings wird auch eine Gelfiltrations-Methode vorgeschlagen. Wir setzen das Qiagen DyeEx 96 Kit ein, weil es schneller, einfacher und reproduzierbarer als die Fällung ist. Dieses Kit beinhaltet eine einzelne Platte mit 96 Gelsäulen. Die Platte wird für 1 Minute bei $1000 \times g$ zentrifugiert, um den Säulenpuffer zu entfernen. Anschließend werden $300 \mu\text{L}$ Wasser auf die Säulen gegeben, gefolgt von einer Zentrifugation für 3 Minuten mit $1000 \times g$. Die komplette Sequenzier-Reaktion wird auf die Säulen gegeben und die Abfallplatte durch Reaktionsgefäße ersetzt, in denen die aufgereinigten Sequenzier-Produkte nach einer Zentrifugation für drei Minuten mit $1000 \times g$ aufgefangen werden. Die Produkte werden bei 80°C getrocknet und in dem für den entsprechenden Sequenzer vorgesehenen Ladepuffer resuspendiert. Sowohl Gel- als auch Kapillar-Sequenzer, die in der Lage sind, die im ViroSeq verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe zu detektieren, können für die Analyse der Sequenzier-Produkte eingesetzt werden, in der Regel die ABI 310, 3100 oder 3700 Kapillar-Sequenzer, bzw. die ABI 373, 377 oder 377-96 Gel-Sequenzer der Firma Applied Biosystems. Wir nutzen in unserem Labor zur Zeit noch den ABI 377-96-Sequenzer, der 16 Patienten auf einmal in ungefähr 7 Stunden analysiert.

Im TruGene-System werden Fluoreszenz-markierte Primer eingesetzt. Wie in Abbildung 2 gezeigt, werden die komplette PR und ein Teil der RT (Aminosäuren 38-247) mit vier Primerpaaren (PR bzw. PR2 für die PR, RT Anfang und RT Mitte für die RT) abgedeckt, wobei die Hin- und Rückprimer unterschiedlich markiert sind. Sequenzierung in 5'- und 3'-Richtung können in einer Reaktion durchgeführt werden, allerdings wird jedes Nukleotid einzeln angesetzt, was in vier Reaktionen je Primerpaar resultiert. Nach unserer Erfahrung liefert das Primerpaar PR2 stabilere Ergebnisse als das Primerpaar PR, was mit anderen Daten übereinstimmt [49]. Daher basiert die Zusammenfassung in Tabelle 1 auf dem Gebrauch der übrigen drei Primerpaare, was letztendlich in 12 Reaktionen pro Patient resultiert. Das PCR-Produkt wird mit dem entsprechenden Sequenzier-Mix, der den Sequenzier-Primer, den CLIP™-Reaktionspuffer und das Sequenzier-Enzym AmpliTaq FS enthält, direkt sequenziert. Dieser Reaktionsmix wird bei 94°C für fünf Minuten inkubiert, gefolgt von 30 Zyklen mit 94°C für 20 Sekunden, 56°C für 20 Sekunden und 70°C für 90 Sekunden,

sowie einem finalen Elongations-Schritt bei 70°C für fünf Minuten. Es sind keine weiteren Aufreinigungsschritte nötig, und der Gel-Ladepuffer kann unmittelbar nach Beendigung der Sequenzier-Reaktion hinzugegeben werden. Das Opengene-System ist für die Detektion der Sequenzier-Produkte vorgesehen. Vier Fragmente können in einem Lauf in ca. 60 Minuten analysiert werden, d. h. Daten für vier Patienten sind nach 3 Stunden verfügbar.

Sequenz-Zusammenführung und Dateninterpretation

Die Qualität der Sequenzen sollte in beiden Systemen überprüft werden. Für ViroSeq sollte gewährleistet sein, dass der Hintergrund minimal und die Peakhöhe der detektierten Fluoreszenz für die Datenanalyse ausreichend ist. Bei Benutzung eines Gelsequenzers muß zusätzlich die Zuordnung der einzelnen Spuren manuell überprüft werden, da keine fixierte Spur-Anordnung auf den Glasplatten vorhanden ist. Beim Gebrauch von TruGene ist es ebenfalls notwendig, Hintergrund und Peakhöhe zu überprüfen. Die Zuordnung der Spuren muß nicht überprüft werden, da die Opengene-Glasplatten eine fixierte Spur-Anordnung besitzen. Weil vier verschiedene Spuren entsprechend den jeweiligen Nukleotiden für eine Sequenz gebraucht werden, ist es jedoch nötig, das Alignment dieser vier einzelnen Nukleotid-Spuren in eine Kompletsequenz zu überprüfen.

In beiden Systemen ist eine Sequenz-Analysesoftware enthalten, die alle Teilsequenzen eines Patienten in ein Projekt zusammenführt. In diesem Projekt wird die gewonnene Sequenz mit einem Medikamenten-empfindlichen Wildtyp-Virus verglichen, die Konsensus-Sequenz wird editiert und abschließend ein Resistenz-Report erstellt, der die Aktivität der anti-HIV-Medikamente bewertet. Die ViroSeq HIV-1 Genotyping System-Software (HGS) besteht aus einem Navigations- und einem Editier-Fenster (Abbildung 3). Das Navigationsfenster vermittelt einen Überblick über das Primer-Alignment und die Sequenzqualität. Im Editierfenster sind alle Teilsequenzen sichtbar, die in der entsprechenden Region präsent sind, dazu die Wildtyp- und Konsensus-Sequenzen. Die Basen können bei Bedarf einzeln überprüft und editiert werden, die Software ist zur Vereinfachung aber auch so einstellbar, dass nur wichtige und nicht eindeutige Positionen zum Editieren bzw. Überprüfen angesteuert werden. Mischungen von Basen auf einer Position werden von der Software nur angezeigt, wenn eine minoritäre Variante einen Mindestanteil von 30% aufweist. Der direkte Vergleich von Wildtyp- und Konsensus-Sequenz ist möglich, ab der 2.5-Version auch auf dem Aminosäurelevel. Im Anschluss an die Editierung erstellt die Software einen Resistenz-Report, der auf Entscheidungsregeln basiert, die von einem Expertengremium entwickelt und überprüft werden (Abbildung 4). Die bekannten RAMs werden den entsprechenden Medika-

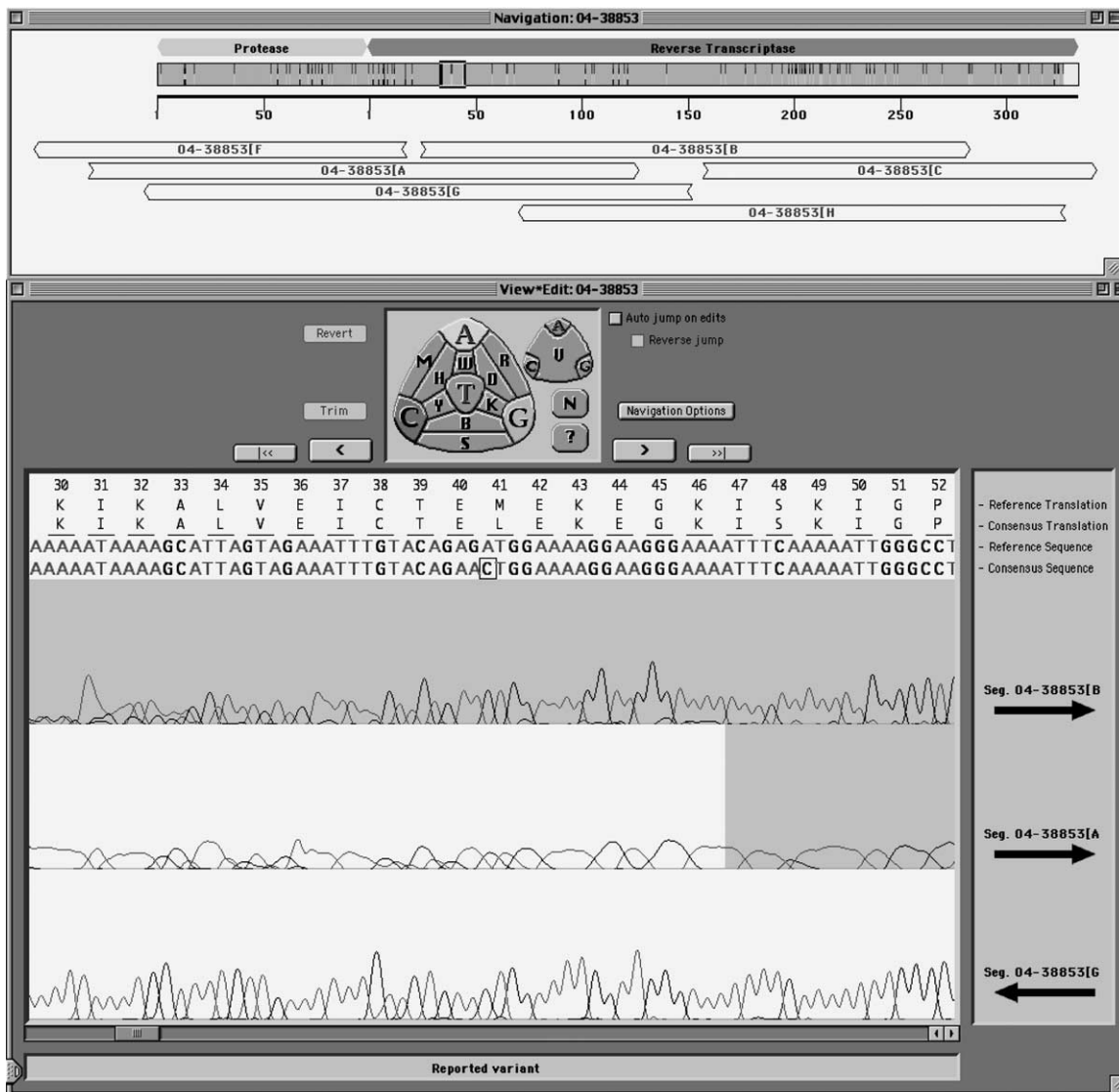


Abbildung 3 Beispiel für das Navigations- (oberer Teil) und Editierfenster (unterer Teil) der ViroSeq HIV-1 Genotyping System-Software; grau unterlegte Sequenzbereiche werden für die Erstellung der Konsensussequenz nicht berücksichtigt.

menten zugeordnet und ihr Einfluss auf die Aktivität des Medikaments mittels einer Farbkodierung dargestellt. Dabei kommen drei Graduierungen zum Einsatz: “high”, “intermediate” und “none”. Der komplette Report besteht aus vier Seiten. Seite 1 beinhaltet die Interpretation für die NRTIs und Seite 2 diejenige für die NNRTIs und PIs (siehe Abbildung 4). Variationen zwischen Konsensus- und Wildtyp-Sequenz, die nicht mit einer Resistenz assoziiert sind, werden auf Seite 3 zusammengefasst. Auf der letzten Seite sind die Entscheidungsregeln aufgelistet, die zur Erstellung dieses Reports herangezogen wurden. Mischungen von Wildtyp und Mutanten werden nur als Mutanten dargestellt. Bei Bedarf müssen diese Mischpopulationen manuell dokumentiert werden. Die Qualität der Interpretation wird weiter unten in diesem Kapitel diskutiert.

Die GeneObjects-Software, die mit dem TruGene-System mitgeliefert wird, besteht aus einem “curve view”-

und einem Editier-Fenster (Abbildung 5). Das “curve view”-Fenster zeigt das Alignment aller Sequenzen in der selektierten Region an, mit Hilfe des Editier-Fensters können alle Basen überprüft und gegebenenfalls editiert werden. Es können, wie für HGS beschrieben, definierte Einstellungen zur Ansteuerung einzelner Basen vorgenommen werden, mit denen die Überprüfung jeder einzelnen Base vermieden werden kann. Im Gegensatz zur HGS-Software, die ein nicht veränderbares Limit für die Detektion von Mischungen besitzt, ermöglicht die GeneObjects-Software diverse Einstellungen. Der Anteil an Mischungen, der von der Software angezeigt werden soll, kann auf mindestens 15%, auf mindestens 20%, auf ungefähr 50% und auf 100% gesetzt werden. Die letzten beiden Einstellungen sind für die HIV-1-Genotypisierung nutzlos, und der 15%-Level sollte nur bei Sequenzen mit einem sehr niedrigen Hintergrundsignal benutzt werden. Wir empfehlen den Gebrauch des 20%-Levels, der einen

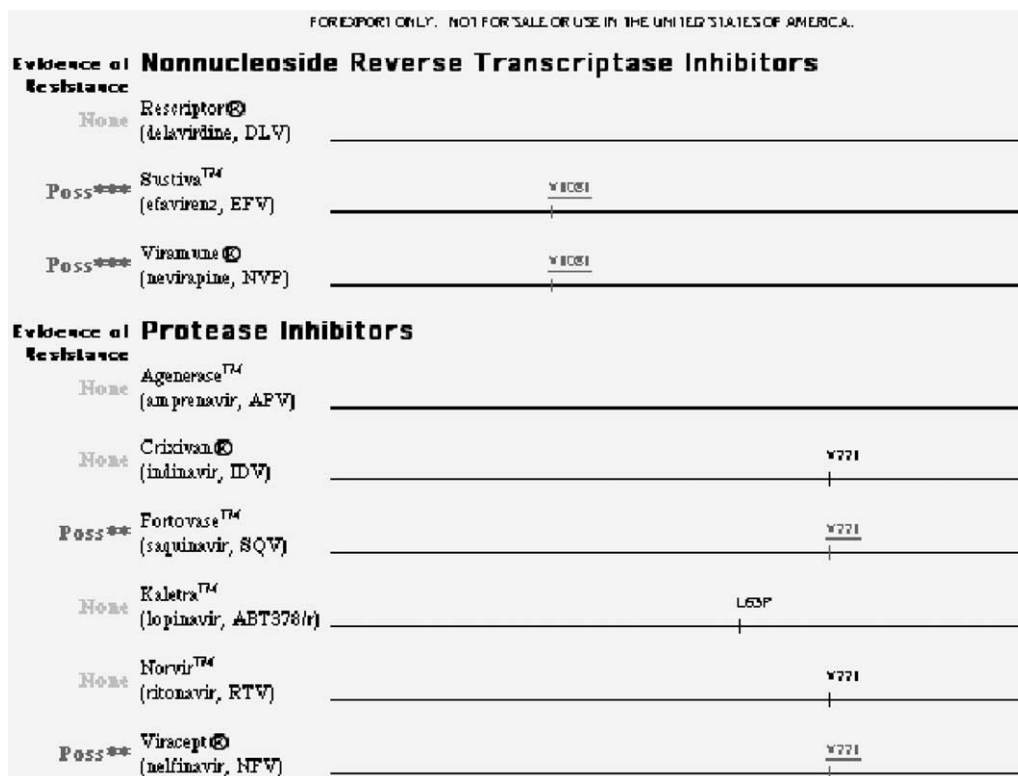


Abbildung 4 Beispiel für den Resistenz-Report von ViroSeq.

akzeptablen Kompromiss zwischen Sensitivität und zusätzlichem Editier-Aufwand darstellt. Die Konsensus-Sequenz kann mit dem Wildtyp-Laborstamm verglichen werden und die Aminosäure-Abfolge der Konsensus-Sequenz wird dargestellt. Insertions- und Deletionsmutanten müssen mit der entsprechenden Funktion markiert werden, um in den Reports vermerkt und ausgedruckt zu werden. Im Anschluss an die Editierung können zwei Reports generiert werden. Der erste Report (nicht gezeigt) fasst alle detektierten Mutationen auf einer Seite in vier Spalten zusammen. In der ersten Spalte sind alle RAMs aufgelistet, in der zweiten alle stillen Mutationen, die nicht zu einem Aminosäurewechsel führen, die dritte Spalte beinhaltet Aminosäurewechsel auf Positionen, die nicht mit Medikamentenresistenz korreliert sind und die vierte Spalte ungewöhnliche Mutationen auf den Positionen, die mit einer Medikamentenresistenz korreliert sind. Mischungen von Wildtyp und Mutante werden angezeigt. Der zweite Report ist der TruGene HIV-1-Resistenz-Report, der alle relevanten RAMs für die drei Medikamentengruppen auflistet und die Daten mit Hilfe von Entscheidungsregeln interpretiert, die von einem Expertengremium entwickelt worden sind (Abbildung 6). Analog zum HGS-Resistenz-Report wird eine dreistufige Farbkodierung für die Interpretation der Medikamenteneffizienz benutzt ("resistance", "partial resistance" und "no evidence of resistance"). Mischungen werden in diesem Report nicht angezeigt, sondern nur die entsprechende Mutante.

Wie bereits erwähnt, ist die Interpretation von RAMs ein elementarer Bestandteil in der klinischen Anwendung von genotypischen Resistenztests. Es wurde gezeigt, dass man zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen kommt, wenn verschiedene Interpretationssysteme die gleiche Sequenz analysieren [52]. In einer Studie wurde der ViroSeq-Resistenz-Report mit acht anderen Algorithmen verglichen [53]. Obwohl insgesamt eine hohe Abweichung der Ergebnisse innerhalb der getesteten Algorithmen bestand, war der ViroSeq-Report nicht mit schwerwiegenden Fehlern in der Interpretation assoziiert. Leider wurde der ViroSeq-Report die letzten zwei Jahre nicht aktualisiert, daher fehlt die Interpretation neuerer Medikamente wie Tenofovir, Atazanavir, Fos-Amprenavir oder Emtricitabin. Glücklicherweise ist ein Update kürzlich im Rahmen einer Studie getestet worden [54] und wird demnächst erhältlich sein. In dieser Studie zeigte die neue Version Ergebnisse, die vergleichbar sind mit der Stanford-Datenbank, die als Online-Service für die Interpretation von HIV-Genotypisierungen unter der Webadresse <http://hivdb.stanford.edu/> kostenfrei zur Verfügung steht [55–57]. Die Stanford-Datenbank war in anderen Vergleichsstudien nicht mit größeren Fehlern in der Interpretation assoziiert [53, 58–60]. Eine ähnlich hohe Anzahl von diskordanten Ergebnissen zwischen verschiedenen Interpretationssystemen wurde in zwei anderen Studien beobachtet, die den TruGene HIV-1-Resistenz-Report anderen Algorithmen gegenüber gestellt hatten [59, 61]. Wie schon für den ViroSeq-

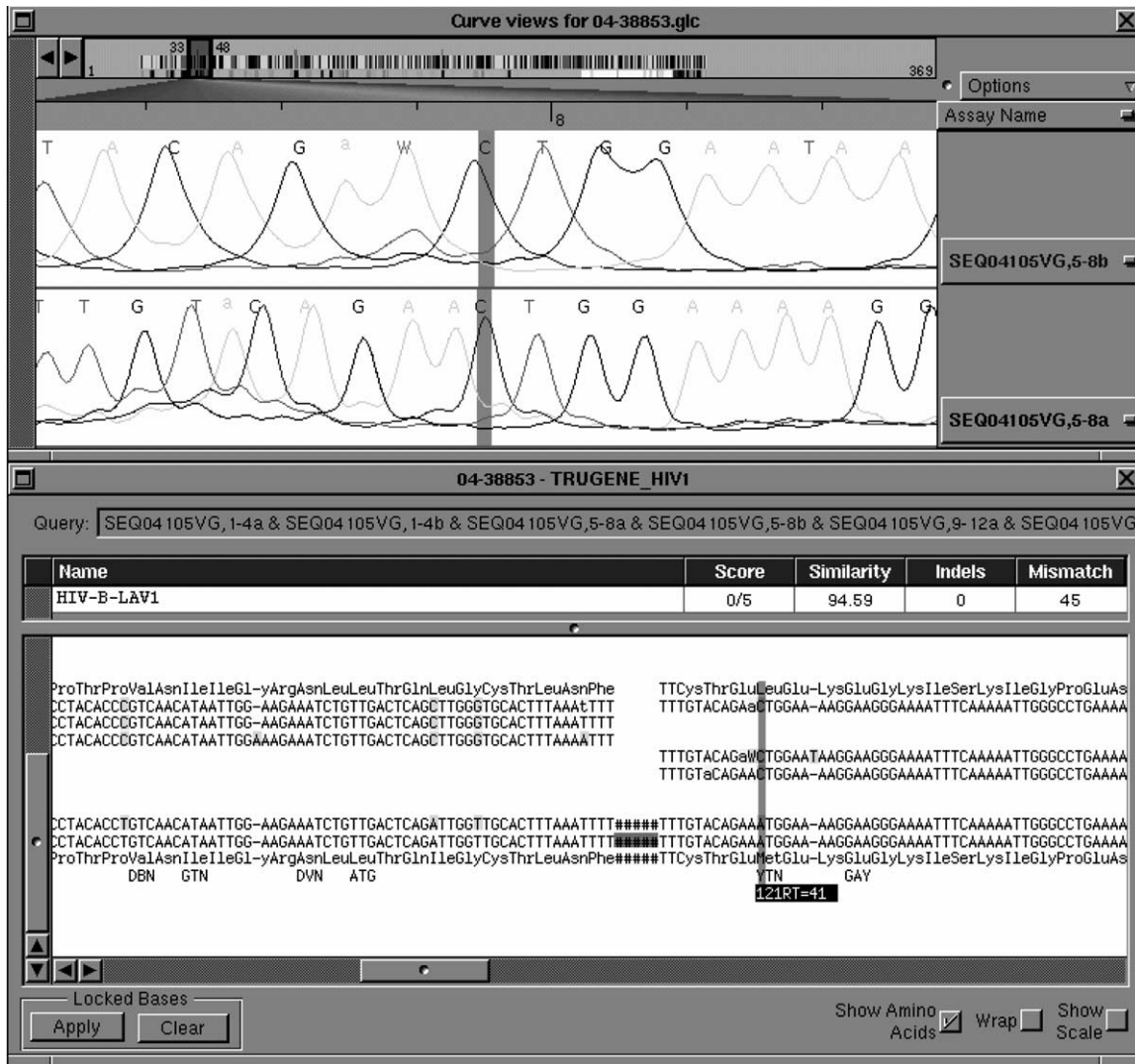


Abbildung 5 Beispiel für das “curve view”- (oberer Teil) und Editierfenster (unterer Teil) der TruGene GeneObjects-Software.

Relevante Protease-Mutationen: M46L, L63P

Proteaseinhibitoren

- Saquinavir
- Indinavir
- Ritonavir
- Nelfinavir
- Ampronavir
- Lopinavir + Ritonavir
- Atazanavir

Resistenzinterpretation

- Kein Nachweis von Resistenz
- Mögliche Resistenz*
- Mögliche Resistenz*
- Kein Nachweis von Resistenz
- Mögliche Resistenz*
- Kein Nachweis von Resistenz
- Unzureichende Daten

Geebteste Proteaseinhibitoren: Die Anwendung von niedrig dosiertem Ritonavir kombiniert mit erhöhten Spiegeln von Saquinavir, Ampronavir oder Indinavir kann zu einer reichender antiviraler Aktivität führen, um einige gegen Proteaseinhibitoren resistente Virusvarianten zum inderteilweise zu supprimieren.

Die Resistenzinterpretation ist basierend auf der Interpretation von in vitro- und in vivo-Daten strukturell, phänotypischer und virologischer Eigenschaften durch ein internationales Expertengremium, wie es im April 2003 für die Korrelation von Protease- und RT-Sequenzen mit Resistenz gegen antiretrovirale Arzneimittel verfügbar waren. Diese beruht auf den primären und sekundären Mutationen.

* Mit einem Sternchen markierte Kodons sind in den Abschnitten zu den Mutationsdetails kursiv kommentiert.

Abbildung 6 Beispiel für den Resistenz-Report von TruGene.

Report erwähnt, ist auch der TruGene-Report nicht mit außergewöhnlichen Interpretationsfehlern assoziiert. Der TruGene-Report wird alle sechs Monate aktualisiert und beinhaltet die Interpretation für alle zur Zeit in Deutschland zugelassenen Medikamente, außer für Emtricitabin und Fos-Amprenavir, die erst kürzlich zugelassen wurden.

Präzision der Assays

Beide Assays wurden sehr intensiv hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit beim Einsatz unterschiedlicher Blutabnahmesysteme [43] und verschiedener Extraktionsprotokolle [43, 45], bei der Detektion aller Gruppe M-Subtypen [49–51, 62] und ungewöhnlicher Insertionsmutanten [63, 64] sowie auf generelle Übereinstimmung [42, 65] getestet.

Eine Studie hat sich mit der Leistungsfähigkeit von TruGene befasst, wenn unterschiedliche Blutabnahmesysteme in An- bzw. Abwesenheit möglicher interferierender Substanzen sowie verschiedene Extraktionsprotokolle eingesetzt wurden [43]. Die durchschnittliche Übereinstimmung aller getesteten Parameter betrug $\geq 97,5\%$ für Proben mit einer Viruslast über der Nachweisgrenze, die der Hersteller vorgegeben hatte (>1000 Kopien/mL). Eine andere Studie, die verschiedene Extraktionsprotokolle für ViroSeq testete, konnte keine signifikanten Unterschiede in parallel getesteten Proben detektieren [45].

In zwei Studien, die sich mit der Analyse unterschiedlicher Subtypen befassten (Gruppe M, Subtypen A-H, 34 Proben [51] und Gruppe M, Subtypen A-J, 22 Proben [49]), konnten alle Proben von beiden Systemen analysiert werden, sofern die jeweils aktuelle Version eingesetzt wurde (TruGene Version 1.5 and ViroSeq Version 2.0). In einer weiteren Studie konnten mit dem ViroSeq 26/31 (84%) Gruppe M-Proben mit Subtypen A-J erfolgreich analysiert werden, während im Vergleich nur 16/30 (53%) Proben mit TruGene auswertbar waren [62]. Einschränkend muß gesagt werden, daß in dieser Studie die TruGene Version 1.0 benutzt wurde. Eine afrikanische Studie zeigte, daß mit ViroSeq 112/130 (86%) Proben mit den Subtypen A, C, D und A/D-Rekombinanten [50] erfolgreich genotypisiert werden konnten. Sowohl der ViroSeq- als auch der TruGene-Report liefern keine Informationen über den vorliegenden Subtyp.

Eine andere Studie hat sich mit der Fähigkeit beider Assays zur Detektion von Insertionsmutanten in der RT-Region befasst [63]. ViroSeq war in der Lage, 8/8 (100%) Insertionen zu detektieren, während TruGene bei einer Probe scheiterte (7/8, 87,5%). Für ViroSeq konnte in einer Falldarstellung auch gezeigt werden, daß das System Insertionen in der PR-Region detektiert [64]. Insertionsmutanten werden auf dem ViroSeq-Report automatisch angegeben, während man mit der OpenGene-Software einen weiteren Schritt zur Bestätigung der Insertion aus-

führen muß, ohne den die Insertion nicht auf dem Resistenz-Report erscheint.

Die generelle Assayperformance wurde in zwei Studien verglichen. Die eine Studie hat sich mit der Intra-assay-Variation von TruGene befasst und zeigt eine Übereinstimmung von 98,7% [65]. In der anderen Studie wurde die Inter-assay-Konkordanz zwischen TruGene und ViroSeq untersucht und eine Übereinstimmung von 99% gefunden [42].

Synopsis

Die HIV-1-Genotypisierung ist inzwischen ein sehr wichtiger Bestandteil des Therapiemonitorings HIV-infizierter Patienten. Zur Zeit sind zwei kommerzielle Systeme zur Genotypisierung erhältlich, das ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System Version 2 (Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und das TruGene HIV-1 Genotyping Kit (Bayer Diagnostics, Fernwald, Deutschland). Beide Systeme beinhalten Module für Probenextraktion, RT-PCR, Sequenzier-Reaktion, Sequenz-Alignment sowie Interpretation der detektierten RAMs. In einem direkten Vergleich sind beide Assays ähnlich hinsichtlich ihrer Komplexität, aber unterschiedlich in der Durchführung. Obwohl wir kein System dem anderen vorziehen würden, sollten dennoch ein paar Unterschiede hervorgehoben werden.

Das Extraktionsmodul basiert entweder auf der Isopropanol-Präzipitation (ViroSeq) oder auf Silika-basierenden Gelsäulen (TruGene), die effektiver zu sein scheinen. Auch wenn das ViroSeq-Extraktionsmodul in der CE-gekennzeichneten Version nicht mehr separat erhältlich ist, empfehlen wir dennoch, die Isopropanol-Extraktion durch eine Silika-basierende Methode zu ersetzen.

Die RT-PCR-Module sind vergleichbar, jedoch entfallen beim Einsatz von TruGene die für ViroSeq notwendige Aufreinigung der PCR-Produkte und die anschließende Quantifizierung im Agarose-Gel.

Ein großer Unterschied besteht bei den beiden Systemen hinsichtlich der Sequenzier-Chemie. ViroSeq benutzt ein System mit vier Dye-Terminatoren, das robuster ist als das von TruGene benutzte Dye-Primer-System und eine verbesserte Sequenzqualität aufweist. Dazu kommt, daß für die Untersuchung eines Patienten im ViroSeq sechs Analysen nötig sind, im Gegensatz zu 12 Analysen im TruGene. Andererseits ist es mit TruGene nicht notwendig, die überschüssigen Dye-Primer nach der Sequenzier-Reaktion zu entfernen, während die Entfernung der überschüssigen Dye-Terminatoren bei ViroSeq für eine gute Sequenzqualität elementar ist.

Ein weiterer sehr wichtiger Punkt ist der Probendurchsatz. Abhängig vom Sequenzer, der für die Analyse der ViroSeq-Sequenzier-Produkte eingesetzt wird, kann ein entsprechend hoher Probendurchsatz erzielt werden. Mit dem ABI 377-96, den wir zur Zeit noch in unserem Labor einsetzen, können wir 16 Patientenproben innerhalb von sieben Stunden ohne zwischenzeitliches Nachladen ana-

lysieren. Das Opengene-System für die Detektion der TruGene Sequenzier-Produkte analysiert vier Patienten in ungefähr drei Stunden in drei getrennten Läufen.

Beide Resistenz-Reports sind im Vergleich mit anderen Interpretationssystemen nicht mit schwerwiegenden Fehlern bei der Interpretation assoziiert. Das ist sehr wichtig, wenn man bedenkt, dass eine fehlerhafte Einstufung von Medikamenten zu einer weniger wirksamen antiviralen Therapie führen kann.

Wie bereits erwähnt, würden wir kein System dem anderen vorziehen. Die Auswahl des Systems sollte neben anderen Gründen auch den Probendurchsatz sowie möglicherweise schon vorhandene Laborausstattung berücksichtigen. Unabhängig vom letztendlich eingesetzten System darf nie außer Acht gelassen werden, dass alle genotypischen Daten von einem Expertenurteil begleitet sein sollten und diese Daten unbedingt im Kontext aller individuellen Patientenparameter inklusive Therapiehistorie zu sehen sind.

Ausblick

Die genotypische HIV-1-Resistenztestung als diagnostisches Tool für das Monitoring der antiretroviralen Therapie ist inzwischen in nationalen und internationalen Behandlungsrichtlinien implementiert [38–41]. Darüber hinaus existiert in Deutschland seit dem 01. April 2004 eine Abrechnungsziffer im EBM. Daher erwarten wir, dass der Markt für Testsysteme, die den HIV-1-Genotyp bestimmen, anwächst. Die zur Zeit erhältlichen kommerziellen Systeme, TruGene und ViroSeq, sind beide von der FDA zugelassen und besitzen die CE-Markierung. Beide Assays basieren auf dem Cycle-Sequencing-Prinzip, in Verbindung mit einem automatisierten Sequenzer für die Analyse der Sequenzier-Produkte. Sie sind in der Lage, vergleichbare Resultate für die HIV-1 Gruppe M-Isolate mit den Subtypen A-J sowie für verschiedene zirkulierende rekombinante Varianten zu liefern. Beide Systeme sind mit einem Resistenz-Reportsystem ausgestattet, das die detektierten RAMs in klinisch relevante Informationen translatiert. Der TruGene-Report wird im Unterschied zu ViroSeq regelmäßig durch ein Experten-gremium aktualisiert. Nach unserem Kenntnisstand plant Abbott jedoch ein regelmäßiges Update der ViroSeq-Software, und eine neue Version wird in Kürze erhältlich sein.

Die Voraussetzungen dafür, dass diese Systeme in der Zukunft von vielen Anwendern eingesetzt werden, sind regelmäßige Aktualisierungen der Interpretations-Software, klinische Validierung der Resistenz-Reports und hohe Effektivität bei der Detektion aller non-B-Subtypen, deren Prävalenz in Europa und den USA im Steigen begriffen ist [66–71]. Sie sollten zusätzlich das Potential haben, auch Proben mit niedriger Viruslast unter 1000 Kopien/mL zu analysieren.

Ein anderer Ansatz für die Detektion von RAMs sind Methoden, die auf einer Hybridisierung basieren. Ein

Assay, genannt "line probe assay" (LiPA), wurde zur Detektion von Schlüsselmutationen in der RT- und PR-Region etabliert und kommerziell verfügbar gemacht [72]. Diverse Oligonukleotidsonden, die die entsprechenden RAM und die umgebenden Kodons inklusive verschiedener bekannter Polymorphismen abdecken, wurden entwickelt und auf einem Nitrozellulosestreifen immobilisiert. Allerdings hat dieses System aufgrund der extrem ausgeprägten Variabilität von HIV-1 Probleme damit, alle Virusvarianten zu detektieren [73, 74], und ist darüber hinaus auch auf die festgelegten Aminosäurepositionen limitiert. Um die Limitierung des LiPA in Bezug auf die Polymorphismen zu umgehen, hat man Oligonukleotidsonden in einer um ein Vielfaches größeren Anzahl auf einem Microarray-Chip platziert [75]. Dieses System wird Affymetrix HIV-1 GeneChip genannt und zeigt vergleichbare Resultate zu klassischen Sequenz-basierenden Assays [76–78]. Der Einsatz von Microarrays anstelle der Sequenzierung resultiert in einem vollautomatisierten Assay mit einer kurzen Abarbeitungszeit. Jedoch ist es zur Zeit noch immer ein Problem, alle natürlich vorkommenden Polymorphismen abzudecken. Für jeden Subtyp muß ein anderer Chip benutzt werden, und die Detektion von Insertions- und Deletionsmutanten dürfte kompliziert werden. Jede Mutation oder jeder Polymorphismus, der von den Chipherstellern nicht berücksichtigt oder erwartet worden ist, kann nicht detektiert werden. Zusätzlich sind die Fragen bezüglich der Produktionskosten eines entsprechend optimierten HIV-1 Genotypisierung-Chips sowie der Sensitivität und Spezifität zu klären. Nur wenn alle diese Probleme gelöst werden können, haben Microarray-Chips eine Chance, in Zukunft die Methode der Wahl für die Detektion von RAMs bei HIV zu werden.

References

1. Larder BA, Darby G, Richman DD. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* 1989;243:1731–4.
2. Larder BA, Kemp SD. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* 1989;246:1155–8.
3. Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Gonzalez C, McMahon D, et al. Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1997;337:734–9.
4. Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, Grimes JM, Demeter LM, Currier JS, et al. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med* 1997;337:725–33.
5. Staszewski S, Morales-Ramirez J, Tashima KT, Rachlis A, Skiest D, Stanford J, et al. Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. Study 006 Team. *N Engl J Med* 1999; 341:1865–73.

6. Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, Eron JJ, Meibohm A, Condra JH, et al. 3-year suppression of HIV viremia with indinavir, zidovudine, and lamivudine. *Ann Intern Med* 2000;133:35–9.
7. Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1988;242:1168–71.
8. Mansky LM, Temin HM. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* 1995;69:5087–94.
9. Preston BD. Reverse transcriptase fidelity and HIV-1 variation. *Science* 1997;275:228–9.
10. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995;373:123–6.
11. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995;373:117–22.
12. Egger M, Hirschel B, Francioli P, Sudre P, Wirz M, Flepp M, et al. Impact of new antiretroviral combination therapies in HIV infected patients in Switzerland: prospective multi-centre study. *Swiss HIV Cohort Study. BMJ* 1997;315:1194–9.
13. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1998;338:853–60.
14. Mocroft A, Ledergerber B, Katlama C, Kirk O, Reiss P, d'Arminio MA, et al. Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. *Lancet* 2003;362:22–9.
15. d'Arminio MA, Testa L, Adorni F, Chiesa E, Bini T, Moscattelli GC, et al. Clinical outcome and predictive factors of failure of highly active antiretroviral therapy in antiretroviral-experienced patients in advanced stages of HIV-1 infection. *AIDS* 1998;12:1631–7.
16. van Roon EN, Verzijl JM, Juttman JR, Lenderink AW, Blans MJ, Egberts AC. Incidence of discontinuation of highly active antiretroviral combination therapy (HAART) and its determinants. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999;20:290–4.
17. Wit FW, van Leeuwen R, Weverling GJ, Jurriaans S, Nauta K, Steingrover R, et al. Outcome and predictors of failure of highly active antiretroviral therapy: one-year follow-up of a cohort of human immunodeficiency virus type 1-infected persons. *J Infect Dis* 1999;179:790–8.
18. Perrin L, Telenti A. HIV treatment failure: testing for HIV resistance in clinical practice. *Science* 1998;280:1871–3.
19. Gallego O, Ruiz L, Vallejo A, Clotet B, Leal M, Soriano V. Rate of Virological Treatment Failure and Frequencies of Drug Resistance Genotypes among Human Immunodeficiency Virus-Positive Subjects on Antiretroviral Therapy in Spain. *J Clin Microbiol* 2002;40:3865–6.
20. Martinez-Picado J, DePasquale MP, Kartsonis N, Hanna GJ, Wong J, Finzi D, et al. Antiretroviral resistance during successful therapy of HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10948–53.
21. Hermankova M, Ray SC, Ruff C, Powell-Davis M, Ingersoll R, D'Aquila RT, et al. HIV-1 drug resistance profiles in children and adults with viral load of <50 copies/ml receiving combination therapy. *Am Med Assoc* 2001;286:196–207.
22. Rousseau MN, Vergne L, Montes B, Peeters M, Reynes J, Delaporte E, et al. Patterns of resistance mutations to antiretroviral drugs in extensively treated HIV-1-infected patients with failure of highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001;26:36–43.
23. Aleman S, Soderberg K, Visco-Comandini U, Sitbon G, Sonnerborg A. Drug resistance at low viraemia in HIV-1-infected patients with antiretroviral combination therapy. *AIDS* 2002;16:1039–44.
24. Alexander CS, Dong W, Schechter MT, O'Shaughnessy MV, Strathdee SA, Mo T, et al. Prevalence of primary HIV drug resistance among seroconverters during an explosive outbreak of HIV infection among injecting drug users. *AIDS* 1999;13:981–5.
25. Boden D, Hurley A, Zhang L, Cao Y, Guo Y, Jones E, et al. HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *Ann Med Assoc* 1999;282:1135–41.
26. Yerly S, Kaiser L, Race E, Bru JP, Clavel F, Perrin L. Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants. *Lancet* 1999;354:729–33.
27. Duwe S, Brunn M, Altmann D, Hamouda O, Schmidt B, Walter H, et al. Frequency of genotypic and phenotypic drug-resistant HIV-1 among therapy-naive patients of the German Seroconverter Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001;26:266–73.
28. Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 2002;347:385–94.
29. Wensing AM, Boucher CA. Worldwide transmission of drug-resistant HIV. *AIDS Rev* 2003;5:140–55.
30. D'Aquila RT, Schapiro JM, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Demeter LM, et al. Drug resistance mutations in HIV-1. *Top HIV Med* 2003;11:215–21.
31. Hirsch MS, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, D'Aquila RT, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin Infect Dis* 2003;37:113–28.
32. Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, Delgiudice P, Porsin S, Simonet P, et al. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* 1999;353:2195–9.
33. Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, Neaton JD, Hoover ML, Winters MA, et al. A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *AIDS* 2000;14:F83–F93.
34. Cingolani A, Antinori A, Rizzo MG, Murri R, Ammassari A, Baldini F, et al. Usefulness of monitoring HIV drug resistance and adherence in individuals failing highly active antiretroviral therapy: a randomized study (ARGENTA). *AIDS* 2002;16:369–79.
35. Meynard JL, Vray M, Morand-Joubert L, Race E, Descamps D, Peytavin G, et al. Phenotypic or genotypic resistance testing for choosing antiretroviral therapy after treatment failure: a randomized trial. *AIDS* 2002;16:727–36.
36. Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Schapiro J, Viciano P, Gonzalez J, et al. Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. *AIDS* 2002;16:209–18.
37. Haupts S, Ledergerber B, Boni J, Schupbach J, Kronenberg A, Opravil M, et al. Impact of genotypic resistance testing on selection of salvage regimen in clinical practice. *Antivir Ther* 2003;8:443–54.
38. Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV. Guidelines for using antiretroviral agents among HIV-infected adults and adolescents. Recommendations of the Panel on Clinical Practices for Treatment of HIV. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51:1–55.

39. Deutsche AIDS Gesellschaft (DAIG), Österreichische AIDS Gesellschaft (ÖAG). [Antiretroviral therapy of HIV infection. German-Austrian guidelines]. *Dtsch Med Wochenschr* 2003;128 Suppl 1:S7–S18.
40. Pozniak A, Gazzard B, Anderson J, Babiker A, Churchill D, Collins S, et al. British HIV Association (BHIVA) guidelines for the treatment of HIV-infected adults with antiretroviral therapy. *HIV Med* 2003;4 Suppl 1:1–41.
41. The EuroGuidelines Group for HIV resistance. European guidelines for the clinical management and treatment of HIV-infected adults in Europe. *AIDS* 2003;17 Suppl 2:S3–26.
42. Erali M, Page S, Reimer LG, Hillyard DR. Human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing: a comparison of three sequence-based methods. *J Clin Microbiol* 2001;39:2157–65.
43. Kuritzkes DR, Grant RM, Feorino P, Griswold M, Hoover M, Young R, et al. Performance characteristics of the TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit and the Opengene DNA Sequencing System. *J Clin Microbiol* 2003;41:1594–9.
44. Cunningham S, Ank B, Lewis D, Lu W, Wantman M, Dileanis JA, 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;39:1254–7.
45. Stürmer M, Berger A, Doerr HW. Modifications and substitutions of the RNA extraction module in the ViroSeq HIV-1 genotyping system version 2: effects on sensitivity and complexity of the assay. *J Med Virol* 2003;71:475–9.
46. Mackie N, Dustan S, McClure MO, Weber JN, Clarke JR. Detection of HIV-1 antiretroviral resistance from patients with persistently low but detectable viraemia. *J Virol Methods* 2004;119:73–8.
47. Elbeik T, Hoo BS, Campodonico ME, Dileanis J, Fay FF, Bortolozzi RL, et al. In vivo emergence of drug-resistant mutations at less than 50 HIV-1 RNA copies/mL that are maintained at viral rebound in longitudinal plasma samples from human immunodeficiency virus type-1-infected patients on highly active antiretroviral therapy. *J Hum Virol* 2001;4:317–28.
48. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:5463–7.
49. Fontaine E, Riva C, Peeters M, Schmit JC, Delaporte E, Van Laethem K, et al. Evaluation of two commercial kits for the detection of genotypic drug resistance on a panel of HIV type 1 subtypes A through J. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001;28:254–8.
50. Mracna M, Becker-Pergola G, Dileanis J, Guay LA, Cunningham S, Jackson JB, et al. Performance of Applied Biosystems ViroSeq HIV-1 Genotyping System for sequence-based analysis of non-subtype B human immunodeficiency virus type 1 from Uganda. *J Clin Microbiol* 2001;39:4323–7.
51. Jagodzinski LL, Cooley JD, Weber M, Michael NL. Performance characteristics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping systems in sequence-based analysis of subtypes other than HIV-1 subtype B. *J Clin Microbiol* 2003;41:998–1003.
52. Stürmer M, Doerr HW, Preiser W. Variety of interpretation systems for human immunodeficiency virus type 1 genotyping: confirmatory information or additional confusion? *Curr Drug Targets Infect Disord* 2003;3:373–82.
53. Stürmer M, Doerr HW, Staszewski S, Preiser W. Comparison of nine resistance interpretation systems for HIV-1 genotyping. *Antivir Ther* 2003;8:239–44.
54. Marlowe N, Shafer R, Leong H, Liu T, Shulze E, Zoccoli M. Comparative evaluation of the ViroSeq v2.6 interpretation algorithm for prediction of HIV-1 drug resistance from viral genotype. *HIV Med* 2004;5:239–40.
55. Shafer RW, Jung DR, Betts BJ, Xi Y, Gonzales MJ. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res* 2000;28:346–8.
56. Shafer RW, Jung DR, Betts BJ. Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and protease mutation search engine for queries. *Nat Med* 2000;6:1290–2.
57. Rhee SY, Gonzales MJ, Kantor R, Betts BJ, Ravela J, Shafer RW. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res* 2003;31:298–303.
58. De Luca A, Cingolani A, Di Giambenedetto S, Trotta MP, Baldini F, Rizzo MG, et al. Variable prediction of antiretroviral treatment outcome by different systems for interpreting genotypic human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *J Infect Dis* 2003;187:1934–43.
59. Kijak GH, Rubio AE, Pampuro SE, Zala C, Cahn P, Galli R, et al. Discrepant results in the interpretation of HIV-1 drug-resistance genotypic data among widely used algorithms. *HIV Med* 2003;4:72–8.
60. Ravela J, Betts BJ, Brun-Vezinet F, Vandamme AM, Descamps D, Van Laethem K, et al. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutation patterns responsible for discordances between genotypic drug resistance interpretation algorithms. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;33:8–14.
61. Torti C, Quiros-Roldan E, Keulen W, Scudeller L, Lo CS, Boucher C, et al. Comparison between Rules-Based Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genotype Interpretations and Real or Virtual Phenotype: Concordance Analysis and Correlation with Clinical Outcome in Heavily Treated Patients. *J Infect Dis* 2003;188:194–201.
62. Beddows S, Galpin S, Kazmi SH, Ashraf A, Johargy A, Frater AJ, et al. Performance of two commercially available sequence-based HIV-1 genotyping systems for the detection of drug resistance against HIV type 1 group M subtypes. *J Med Virol* 2003;70:337–42.
63. Koch N, Tamalet C, Tivoli N, Fantini J, Yahi N. Comparison of two commercial assays for the detection of insertion mutations of HIV-1 reverse transcriptase. *J Clin Virol* 2001;21:153–62.
64. Stürmer M, Staszewski S, Doerr HW, Hertogs K. A 6-base pair insertion in the protease gene of HIV type 1 detected in a protease inhibitor-naive patient is not associated with indinavir treatment failure. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:967–8.
65. Grant RM, Kuritzkes DR, Johnson VA, Mellors JW, Sullivan JL, Swanstrom R, et al. Accuracy of the TRUGENE HIV-1 genotyping kit. *J Clin Microbiol* 2003;41:1586–93.
66. Boni J, Pyra H, Gebhardt M, Perrin L, Burgisser P, Matter L, et al. High frequency of non-B subtypes in newly diagnosed HIV-1 infections in Switzerland. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;22:174–9.
67. Brodine SK, Starkey MJ, Shaffer RA, Ito SI, Tasker SA, Barile AJ, et al. Diverse HIV-1 subtypes and clinical, laboratory and behavioral factors in a recently infected US military cohort. *AIDS* 2003;17:2521–7.
68. Chaix ML, Descamps D, Harzic M, Schneider V, Deveau C, Tamalet C, et al. Stable prevalence of genotypic drug resistance mutations but increase in non-B virus among patients with primary HIV-1 infection in France. *AIDS* 2003;17:2635–43.

69. Hanna GJ, Balaguera HU, Freedberg KA, Werner BG, Steger Craven KA, Craven DE, et al. Drug-selected resistance mutations and non-B subtypes in antiretroviral-naive adults with established human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 2003;188:986–91.
70. Jorgensen LB, Christensen MB, Gerstoft J, Mathiesen LR, Obel N, Pedersen C, et al. Prevalence of drug resistance mutations and non-B subtypes in newly diagnosed HIV-1 patients in Denmark. *Scand J Infect Dis* 2003;35:800–7.
71. Perez-Alvarez L, Carmona R, Munoz M, Delgado E, Thomson MM, Contreras G, et al. High incidence of non-B and recombinant HIV-1 strains in newly diagnosed patients in Galicia, Spain: study of genotypic resistance. *Antivir Ther* 2003;8:355–60.
72. Stuyver L, Wyseur A, Rombout A, Louwagie J, Scarcez T, Verhofstede C, et al. Line probe assay for rapid detection of drug-selected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:284–91.
73. Stürmer M, Morgenstern B, Staszewski S, Doerr HW. Evaluation of the LiPA HIV-1 RT assay version 1: comparison of sequence and hybridization based genotyping systems. *J Clin Virol* 2002;25 Suppl 3:S65–S72.
74. Derdelinckx I, Van Laethem K, Maes B, Schrooten Y, De Schouwer K, De Wit S, et al. Performance of the VERSANT HIV-1 resistance assays (LiPA) for detecting drug resistance in therapy-naive patients infected with different HIV-1 subtypes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;39:119–24.
75. Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan TC, et al. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Med* 1996;2:753–9.
76. Gunthard HF, Wong JK, Ignacio CC, Havlir DV, Richman DD. Comparative performance of high-density oligonucleotide sequencing and dideoxynucleotide sequencing of HIV type 1 pol from clinical samples. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998;14:869–76.
77. Hanna GJ, Johnson VA, Kuritzkes DR, Richman DD, Martinez-Picado J, Sutton L, et al. Comparison of sequencing by hybridization and cycle sequencing for genotyping of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Clin Microbiol* 2000;38:2715–21.
78. Wilson JW, Bean P, Robins T, Graziano F, Persing DH. Comparative evaluation of three human immunodeficiency virus genotyping systems: the HIV-GenotypR method, the HIV PRT GeneChip assay, and the HIV-1 RT line probe assay. *J Clin Microbiol* 2000;38:3022–8.