

· 基础论著 ·

# Stanford HIVDB 和 ViroSeq V2.8 对 HIV-1 基因型耐药解释一致性评价

周海卫 宋川 冯鑫 郝禹 赵红心 李兴旺 王玉光 张福杰 曾辉

**【摘要】 目的** 比较 Stanford HIVDB 耐药数据库和 ViroSeq V2.8 系统对 HIV-1 基因型耐药结果解释的一致性。**方法** 对 2008 至 2010 年本课题组所收集的 47 例 HIV-1 耐药检测质控品的基因型耐药结果分别使用 Stanford HIVDB 耐药数据库和 ViroSeq V2.8 系统进行耐药解释,解释结果分为 3 个水平:耐药、可能耐药及敏感。对两种耐药解释结果进行加权 *Kappa* 一致性检验,评价两种方法在基因型耐药结果解释方面的一致性。**结果** 除药物 ETR 的两种解释结果一致性为极弱外(加权 *Kappa* 系数为 0.17),其余药物为高度一致(加权 *Kappa* 系数为 0.61~0.80)或一致性极强(加权 *Kappa* 系数为 > 0.80)。**结论** 两种方法对我国正在使用的 11 种抗病毒药物耐药解释具有较好的一致性,可以将 In-house 方法作为对我国资源有限地区抗病毒治疗人群耐药监测的手段。

**【关键词】** 人免疫缺陷病毒;基因型;抗药性;数据说明,统计

**Comparative evaluation of two interpretation algorithms for genotypic drug resistance of human immunodeficiency virus-1: Stanford HIVDB and ViroSeq V2.8** ZHOU Hai-wei, SONG Chuan, FENG Xin, HAO Yu, ZHAO Hong-xin, LI Xing-wang, WANG Yu-guang, ZHANG Fu-jie, ZENG Hui. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China  
Corresponding author: ZENG Hui, Email: huizeng@ccmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To evaluate the concordance in predicting genotypic drug resistance between two interpretation algorithms (HIVDB and ViroSeq V2.8). **Methods** Total of 47 HIV-1 plasma samples collected from 2008 to 2010 were analyzed. Two available algorithms were applied on each of the sequences: Stanford HIVDB and ViroSeq V2.8. Genotypic interpretations were normalized to a three-level output: resistance, possible resistance and none. The concordance among the genotypic interpretation algorithms was analyzed by a weighted *Kappa* statistic. **Results** The

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2011.03.002

基金项目:中医药防治艾滋病临床科研基地建设(2009ZX10005-014)

作者单位:100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所(周海卫、宋川、冯鑫、郝禹、曾辉);首都医科大学附属北京地坛医院感染中心(赵红心、李兴旺);首都医科大学附属北京地坛医院中西医结合科(王玉光);中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心(张福杰)

通讯作者:曾辉,Email:huizeng@ccmu.edu.cn

weighted *Kappa* values for drugs between two interpretation algorithms ranged from 0.70 to 1.00 (substantial agreement or almost perfect agreement), except for ETR (the weighted *Kappa* value = 0.17, slight agreement). **Conclusions** Stanford HIVDB provided comparable results to those of ViroSeq V2.8 for drugs used in China. The In-house assay is applicable for resource-limited settings in China due to its lower cost.

**【Key words】** Human immunodeficiency virus-1; Genotypic; Drug resistance; Data interpretation, statistical

HIV 产生耐药性是导致抗病毒治疗失败的主要原因<sup>[1-2]</sup>。基因型耐药检测可有效监测耐药的产生<sup>[3]</sup>。基于测序技术的 TRUGENE<sup>®</sup>和 ViroSeq<sup>®</sup>是两种应用比较广泛的商业基因型耐药检测方法<sup>[4]</sup>。但高昂的检测成本阻碍了这两种方法在发展中国家的大规模应用。相比而言, In-house 方法成本低, 扩增成功率高<sup>[5]</sup>, 但检测过程难以规范。此外, 其与商业方法在基因型耐药结果解释方面的差别也是临床关注的问题<sup>[6-9]</sup>。为此, 本研究比较了 In-house 方法最常用的基因型耐药解释系统 Stanford HIVDB (斯坦福大学 HIV 耐药数据库, <http://hivdb.stanford.edu/>) 与 ViroSeq V2.8 系统的一致性。

## 材料与方法

### 一、研究对象

入组标本为 2008 年 1 月至 2010 年 12 月间, 澳大利亚国家血清学参比实验室( $n=35$ )及中国疾病预防控制中心性艾中心( $n=12$ )下发的 HIV-1 基因型耐药检测质控品血浆共 47 份。所有标本病毒载量为 1500 ~ 500 000 拷贝/ml, 分别属于 6 种不同亚型(B 亚型  $n=30$ , C 亚型  $n=5$ , CRF01\_AE 重组型  $n=5$ , CRF07\_BC 重组型  $n=4$ , G 亚型  $n=1$ , F 亚型  $n=2$ )。

### 二、方法

血浆标本采用 ViroSeq<sup>™</sup> HIV-1 基因型耐药检测试剂盒(版本 1.5, 美国 Abbott 公司)进行 RNA 提取, 经 RT-PCR 得到 HIV-1 *Pol* 基因片段(1.8 kb)。利用 ABI3100(美国 AB 公司)进行序列测定。

得到的序列经 Vector NTI10 拼接、Bioedit 7.0 比对后, 使用 Mega4 构建 Neighbour-joining 进化树, 结合 Stanford HIVDB 的亚型结果确定其亚型。分别利用 ViroSeq V2.8 分析软件及 Stanford HIVDB 对标本序列进行分析, 获得其耐药解释结果。

本文比较了 19 种药物基因型耐药解释结果的一致性。包括 NRTIs(核苷类逆转录酶抑制剂)类药物 7 种: 拉米夫定(lamivudine, LAM)、恩曲他滨(emtricitabine, FTC)、齐多夫定(zidovudine, AZT)、去羟基苷(didanosine, ddI)、司他夫定(stavudine, d4T)、阿巴卡韦(abacavir, ABC)和替诺福韦酯(tenofovir disoproxil fumarate, TDF); 非核苷类逆转录酶抑制剂(NNRTIs)类药物 4 种: 地拉韦定(Dela-

viridine, DLV)、依非韦仑(Efavirenz, EFV)、奈韦拉平(Nevirapine, NVP)和依曲韦林(etravirine, ETR);蛋白酶抑制剂(PIs)类药物 8 种:福沙那韦(fosamprenavir, FOS)、茚地那韦(indinavir, IDV)、沙奎那韦(saquinavir, SQV)、洛匹那韦 lopinavir, LPV)、地瑞那韦(darunavir, DRV)、奈非那韦(nelfinavir, NFV)、阿扎那韦(atazanavir, ATV)和替拉那韦(tipranavir, TPV)。

由 ViroSeq V2.8 分析软件获得的耐药解释结果包括 3 个水平:耐药(resistance)、可能耐药(possible resistance)和敏感(none),而由斯坦福大学的 HIV 耐药数据库获得的耐药解释结果包括 5 个水平:高度耐药(high-level resistance)、中度耐药(intermediate resistance)、低度耐药(low-level resistance)、潜在低度耐药(potential low-level resistance)和敏感(susceptible)。为便于进行比较,本研究将由 Stanford HIVDB 获得的耐药解释结果合并为与 ViroSeq V2.8 一致的 3 个水平:耐药(resistance,包括高度耐药和中度耐药)、可能耐药(possible resistance,低度耐药)及敏感(none,包括潜在低度耐药和敏感)<sup>[10]</sup>。

### 三、统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计学软件对修正后的数据进行加权 Kappa 一致性检验<sup>[5-6]</sup>,以  $P < 0.01$  为两种解释结果具有一致性。

## 结 果

### 一、Stanford HIVDB 与 ViroSeq V2.8 耐药解释结果一致性评价

两种方法获得的耐药解释结果的一致性比较结果见表 1。NNRTIs 类药物 ETR 的耐药解释结果一致性极弱(加权 Kappa 系数 = 0.17,  $P = 0.08$ );NRTIs 类药物 ddI、ABC、TDF 的耐药解释结果高度一致(加权 Kappa 系数分别为 0.70、0.70、0.77,  $P < 0.01$ );而 NRTIs 类药物 3TC、FTC、AZT、d4T, NNRTIs 类药物 DLV、EFV、NVP 及所有 PIs 类药物的耐药解释结果一致性极强(加权 Kappa 系数  $> 0.80$ ,  $P < 0.01$ )。

### 二、影响两种耐药解释结果一致性的主要耐药突变形式

对于两种解释方法一致性较低(加权 Kappa 系数  $\leq 0.80$ )的药物,本研究总结了影响其一致性的耐药突变形式(表 2)。

对 NRTIs 类(主要是 ddI、ABC 和 TDF)药物,影响其解释结果一致性的主要原因为胸苷相关突变(TAMs,包括 M41L、D67N、K70R、L210W、T215F/Y 及 K219E/Q),其突变组合导致了 71% (15/21) 的解释差异;剩余 29% (6/21) 的差异由 K65R、L74V 及 V75I/M/T 等突变所致。

对 NNRTIs 类药物 ETR,影响其耐药解释一致性的突变主要包括 Y181C (39%, 9/23)、K101P + G190A (13%, 3/23), L100I、K101Q、K103N、V106M/A、E138A、V179D、P225H、L234I 及 Y318F 等突变构成的组合(48%, 11/23),见表 2。

表 1 Stanford HIVDB 与 ViroSeq V2.8 耐药解释结果一致性比较

药物类别 <sup>a</sup>	药物 <sup>b</sup>	加权 <i>Kappa</i> 系数 <sup>c</sup>	<i>P</i> <sup>d</sup>
NRTIs	3TC	0.97	< 0.01
	FTC	0.97	< 0.01
	AZT	0.91	< 0.01
	ddI	0.70	< 0.01
	d4T	0.88	< 0.01
	ABC	0.70	< 0.01
	TDF	0.77	< 0.01
NNRTIs	DLV	0.86	< 0.01
	EFV	0.91	< 0.01
	NVP	1.00	< 0.01
	ETR	0.17	0.08
PIs	FOS	0.85	< 0.01
	IDV	0.85	< 0.01
	SQV	0.81	< 0.01
	LPV	0.84	< 0.01
	DRV	0.88	< 0.01
	NFV	0.88	< 0.01
	ATV	0.80	< 0.01
	TPV	0.82	< 0.01

注: <sup>a</sup>: NRTIs, 核苷类逆转录酶抑制剂; NNRTIs, 非核苷类逆转录酶抑制剂; PIs, 蛋白酶抑制剂。 <sup>b</sup>: 包括 7 种 NRTIs, 4 种 NNRTIs 及 8 种 PIs 共 19 种抗病毒药物。 <sup>c</sup>: 加权 *Kappa* 系数为 0.81 ~ 1.00 为一致性极强; 0.61 ~ 0.80 为高度一致; 0.41 ~ 0.60 为中度一致; 0.21 ~ 0.40 为具有弱一致性; 0 ~ 0.20 为一致性极弱<sup>[12]</sup>。 <sup>d</sup>: *P* < 0.01 定义为具有一致性

表 2 影响两种耐药解释结果一致性的耐药突变形式

药物	解释结果	导致差异的耐药突变
ddI	ViroSeq: 可能耐药; Stanford: 耐药	TAMs <sup>a</sup>
	ViroSeq: 敏感; Stanford: 可能耐药	V75I/M + M184V
	ViroSeq: 可能耐药; Stanford: 耐药	K65R + M184I/V
ABC	ViroSeq: 可能耐药; Stanford: 耐药	TAMs
	ViroSeq: 可能耐药; Stanford: 耐药	L74V
	ViroSeq: 敏感; Stanford: 可能耐药	V75I/M + M184V
	ViroSeq: 敏感; Stanford: 可能耐药	M41L + V75T
TDF	ViroSeq: 可能耐药; Stanford: 耐药	TAMs
	ViroSeq: 可能耐药; Stanford: 耐药	K65R + T69N + M184V + K219E/G
	ViroSeq: 可能耐药; Stanford: 耐药	K65R + M184I/V
	ViroSeq: 敏感; Stanford: 可能耐药	M41L + V75T
ETR	ViroSeq: 可能耐药; Stanford: 耐药	Y181C
	ViroSeq: 可能耐药; Stanford: 耐药	K101P + G190A
	ViroSeq: 敏感; Stanford: 可能耐药	V106M + V179D
	ViroSeq: 敏感; Stanford: 可能耐药	K103N + L100I/P225H/L234I/Y318F

注: <sup>a</sup>: TAMs(胸苷相关突变, thymidine analog mutations), 包括 RT 基因区第 41、67、70、210、215 和 219 位点的突变<sup>[13]</sup>

## 讨 论

我国自 2003 年开始对艾滋病患者进行免费抗病毒治疗,至 2010 年 12 月累积治疗患者 10 万例<sup>[14]</sup>,这意味着有大量患者存在耐药检测的需求。In-house 方法的成本约为商业化方法的 1/3<sup>[4]</sup>,更适合在资源有限的国家开展。有研究证实,In-house 与 ViroSeq 方法检测到的突变差别低于 0.5%,且多为次要突变及亚型间的基因多态性<sup>[5]</sup>。之前有研究证实,Stanford HIVDB、the Visible Genetics Guidelines 6.0(VGI, Trugene 基因型耐药检测解释系统)及 AntiRetroScan(ARS)三种解释方法间的加权 *Kappa* 一致性系数为 0.76~0.84<sup>[11]</sup>。

本研究利用 Stanford HIVDB 和 ViroSeq V2.8 系统两种解释方法对 47 例标本的耐药检测结果进行加权 *Kappa* 一致性检验后发现,两种解释方法间的加权 *Kappa* 一致性系数 ETR 最低,为 0.17;其余药物均为 0.70~1.00。目前我国用于免费抗病毒治疗的药物有 9 种,分别为 NRTIs 类 AZT、D4T、ddI、3TC 和 TDF, NNRTIs 类 NVP 和 EFV,以及 PIs 类 IDV 和 LPV;自费药物有 2 种,为 NRTIs 类 ABC 和 PIs 类 ATV<sup>[15]</sup>。本研究对以上 11 种药物耐药解释结果的加权 *Kappa* 一致性系数为 0.70~1.00。其中,对药物 ddI、ABC 和 TDF 的加权 *Kappa* 一致性系数分别为 0.70、0.70 和 0.77,两种结果高度一致;其余药物均在 0.80 以上,为一致性极强。以上药物两种解释结果间的一致性与之前报道的其他结果类似<sup>[11]</sup>。

对 NNRTIs 类药物 ETR,两种方法的加权 *Kappa* 一致性系数仅为 0.17,导致其差别的耐药突变多样,Y181C 是其中比较常见的突变。当突变 Y181C 单独出现时,ViroSeq V2.8 系统将其解释为可能耐药,而 Stanford HIVDB 则解释为耐药。对 NRTIs 类药物 ddI、ABC 和 TDF,影响其解释一致性的主要为胸苷相关突变(TAMs,包括 M41L、D67N、K70R、L210W、T215F/Y 及 K219E/Q)<sup>[13]</sup>。例如当出现 M41L + E44D + V118I + M184V + L210W + T215Y 突变组合时,对药物 ddI 和 TDF,ViroSeq V2.8 系统会解释为可能耐药,而 Stanford HIVDB 解释为耐药。由表 2 可以看出,同样作为基因型耐药解释系统,同样以表型耐药等数据作为判断依据,两种解释方法的差异表现为 ViroSeq V2.8 系统较 Stanford HIVDB 的解释更为保守。其原因可能是经过 FDA 认证的商业化 ViroSeq V2.8 系统在参考各种表型及临床研究数据时更为谨慎。

总之,对我国目前使用的药物 Stanford HIVDB 的耐药解释结果与 ViroSeq V2.8 系统具有较高的一致性。已有研究证实 Stanford HIVDB 与国际上另一种商业化的 TRUGENE 系统具有很好的一致性<sup>[16]</sup>。考虑到 In-house 方法价格较低,可以将其作为对我国资源有限地区抗病毒治疗人群耐药监测的手段。但临床医生在使用 In-house 方法得出耐药结果时,尤其是涉及 ddI、ABC 和 TDF 的两种方法解释一致性稍低的药物时,应更加谨慎地得出结论。

## 参 考 文 献

- 1 Hirsch MS, Günthard HF, Schapiro JM, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *Clin Infect Dis*, 2008, 47(2):266-285.
- 2 Ruel TD, Kamya MR, Li P, et al. Early virologic failure and the development of antiretroviral drug resistance mutations in HIV-infected Ugandan children. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2011, 56(1):44-50.
- 3 Bansi L, Smith C, Phillips A, et al. The impact of HIV drug resistance testing on changes to treatment. *AIDS*, 2011, 25(5):603-610.
- 4 Wallis CL, Papathanasopoulos MA, Lakhi S, et al. Affordable in-house antiretroviral drug resistance assay with good performance in non-subtype B HIV-1. *J Virol Methods*, 2010, 163(2):505-508.
- 5 Saravanan S, Vidya M, Balakrishnan P, et al. Evaluation of two human immunodeficiency virus-1 genotyping systems: ViroSeq 2.0 and an in-house method. *J Virol Methods*, 2009, 159(2):211-216.
- 6 Kandathil AJ, Kannangai R, Abraham OC, et al. A comparison of interpretation by three different HIV type 1 genotypic drug resistance algorithms using sequences from non-clade B HIV type 1 strains. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2009, 25(3):315-318.
- 7 Frentz D, Boucher CA, Assel M, et al. Comparison of HIV-1 genotypic resistance test interpretation systems in predicting virological outcomes over time. *PLoS One*, 2010, 5(7):e11505.
- 8 Zazzi M, Prosperi M, Vicenti I, et al. Rules-based HIV-1 genotypic resistance interpretation systems predict 8 week and 24 week virological antiretroviral treatment outcome and benefit from drug potency weighting. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 64(3):616-624.
- 9 Van Laethem K, Vandamme AM. Interpreting resistance data for HIV-1 therapy management--know the limitations. *AIDS Rev*, 2006, 8(1):37-43.
- 10 Snoeck J, Kantor R, Shafer RW, et al. Discordances between interpretation algorithms for genotypic resistance to protease and reverse transcriptase inhibitors of human immunodeficiency virus are subtype dependent. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(2):694-701.
- 11 Zazzi M, Romano L, Venturi G, et al. Comparative evaluation of three computerized algorithms for prediction of antiretroviral susceptibility from HIV type 1 genotype. *J Antimicrob Chemother*, 2004, 53(2):356-360.
- 12 夏邦世, 吴金华. *Kappa* 一致性检验在检验医学研究中的应用. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(1):83-84.
- 13 Acosta-Hoyos AJ, Scott WA. The role of nucleotide excision by reverse transcriptase in HIV drug resistance. *Viruses*, 2010, 2(2):372-394.
- 14 中国疾病预防控制中心. 全国抗病毒治疗病人特征及其变化. 2010.
- 15 中国疾病预防控制中心. 国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册. 第 2 版. 2007.
- 16 Poonpiriya V, Sungkanuparph S, Leechanachai P, et al. A study of seven rule-based algorithms for the interpretation of HIV-1 genotypic resistance data in Thailand. *J Virol Methods*, 2008, 151(1):79-86.

(收稿日期:2011-03-31)

(本文编辑:孙荣华)

周海卫, 宋川, 冯鑫, 等. Stanford HIVDB 和 ViroSeq V2.8 对 HIV-1 基因型耐药解释一致性评价[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2011, 5(3):265-270.