

総 説

HIV-1 薬剤耐性検査の標準化

Standardization of HIV-1 Genotypic Drug-Resistance Test

吉 田 繁

Shigeru YOSHIDA

北海道医療大学

Health Sciences University of Hokkaido

キーワード：HIV-1 薬剤耐性検査, 標準化, 外部精度評価

日本エイズ学会誌 20: 1-7, 2018

はじめに

標準化とは、簡単に言うと「いつ、どこでも同じ結果が得られる状況を作ること」であり、臨床検査では生化学検査をはじめとしてさまざまな検査項目において「標準化」が積極的に進められている。HIV-1 薬剤耐性遺伝子検査（以下、genotype 検査）は治療の開始や変更時に適切な薬剤を選択するための貴重な情報を提供する重要な検査であるが、難度も高く現時点では標準化はなされていない。本総説では genotype 検査の標準化に焦点をあて、その必要性と現状や課題について述べる。

薬剤耐性 HIV の変遷

致死的病であった HIV/AIDS は、1986 年に世界で初めて開発された抗 HIV 薬剤（antiretroviral drugs: ARVs）である核酸系アナログ逆転写酵素阻害剤 zidovudine の登場、さらに 1995 年に登場したプロテアーゼ阻害剤との多剤併用療法（combination antiretroviral therapy: cART）の導入により、病態進行を抑えることに成功し、その死亡率が初めて減少した。その劇的な治療効果は HIV 感染症の治癒の可能性をも期待させたが、導入から 20 年を経た今日も cART によって体内から HIV を完全に排除することは実現していない。cART 開始以前もしくは初期には、服薬アドヒアランスの低下による獲得性薬剤耐性 HIV の出現が治療継続の大きな障害となっていた。そのため、治療変更時には薬剤耐性検査に基づいた効果の期待される ARVs の選択が推奨され、実際に本検査の実施が変更後の治療成績の向上につながる事が報告されている¹⁻³⁾。近年では、インテグラーゼ阻害剤などの新しいカテゴリーの ARVs の登場に

よって、獲得性薬剤耐性 HIV の出現による治療失敗症例は減少し、多くの症例で血中 HIV RNA コピー数が検出限界以下（20 copies/mL）にコントロールされている。しかしながら、新しい ARVs が開発された現在においても HIV 感染者は AIDS への進行を防ぐために、ARVs を一生服用しなければいけない状況に変わりはない。獲得性薬剤耐性 HIV 出現症例が減少する一方、2000 年頃より先進諸国において新規未治療 HIV/AIDS 症例から薬剤耐性関連変異を有する HIV が検出されている。このことは現在 cART を受けている、もしくは過去に受けていた HIV 感染者からの新たな感染を示しており、これらの耐性変異は感染源となった患者の HIV に由来することから、伝播性薬剤耐性変異（transmitted drug resistance: TDR）と呼ばれている。わが国における新規 HIV/AIDS 症例を対象とした TDR の疫学調査はエイズ対策研究事業「国内流行 HIV 及びその薬剤耐性株の長期的動向把握に関する研究」（責任者 吉村和久、前責任者 杉浦互）において、2003 年から現在まで継続的に実施されている。調査開始当初の TDR の検出率は 4.0% であったが、その後、年により増減はあるものの徐々に増加しており、現在では約 8~9% の新規感染者から何らかの薬剤耐性関連変異が検出されている⁴⁻⁶⁾。また、世界的にみると数%~24.1% と地域によって大きく異なるが、当該地域における治療の状況、調査方法、薬剤耐性関連変異の定義が調査ごとに異なっていることも影響していると考えられる⁷⁻¹³⁾。検出される薬剤耐性関連変異は年によって変化しているが、過去に使用されていた ARVs に関連する耐性変異が高頻度に検出されており、主な変異は zidovudine 耐性変異の復帰変異である T215X、非核酸系逆転写酵素阻害剤耐性の K103N、プロテアーゼ阻害剤耐性の M46I/L である。また、近年の調査では現在キードラッグとして使用されているインテグラーゼ阻害剤に関連する耐性変異の T66I も低頻度であるが検出されていることから、

著者連絡先：吉田 繁（〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢 1757 北海道医療大学）

2017 年 12 月 13 日受付

今後の動向を注視する必要がある。

薬剤耐性検査とその変遷

HIV-1は感染者体内で活発に増殖している ($10^9\sim 10^{11}$ /日) が、逆転写の精度が低い (3×10^{-5} と推測されている) ことから未治療下においても何らかの変異を有する HIV 株が日々生み出されている。このなかには薬剤耐性変異を持つ株も潜在しており ARVs の投与により選択されて顕在化する。薬剤耐性検査は生体内 (主には血液中) に存在する HIV の薬剤感受性を推測する検査である。本検査は HIV 遺伝子配列から薬剤感受性を判定する genotype 検査と phenotype 検査 (感受性検査) があるが、現在では genotype 検査が主流である。本総説で述べる薬剤耐性検査も genotype 検査のことである。本検査手法を簡単に述べると、血液中のウイルス粒子より抽出した HIV RNA を鋳型として RT-nested PCR にてプロテアーゼ、逆転写酵素 (RT)、インテグラーゼ領域を増幅後、ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定し、薬剤耐性に関連する特定のアミノ酸配列の変異から耐性アルゴリズムにて ARVs の有効性を推測する。なお、本総説では侵入阻害剤の耐性検査は含まない。わが国での genotype 検査は 1996 年に国立感染症研究所の杉浦らがプロテアーゼ/RT 領域を対象とした方法を確立 (感染研法) し、それ以降、国内のエイズ拠点病院や衛生研究所、検査関連施設など十数施設で研究として実施され、2006 年に保険収載 (6,000 点) されている。また、本検査は医療目的だけでなく疫学調査目的としても実施されている。Genotype 検査には認可された市販キットが存在しないため、藤崎らが国内実施施設を対象に検査手法に関する調査を行ったところ、多くの施設が感染研法を原法として、プライマーやその組合せを一部変更した方法を実施しており、数施設は感染研法とはまったく異なる施設独自の方法を実施していることが明らかになった^{14, 15)}。つまり国内ではさまざまな方法による genotype 検査が実施されていることになる。また、藤崎らの調査時にはプロテアーゼと RT 領域を別々に増幅する 2 産物法が主流であったが、現在ではほとんどの施設がプロテアーゼから RT までを 1 つの産物として増幅する方法を採用している。この理由はいくつかあるが、新しい ARVs に関連する耐性変異が増えていったことで、それらの変異を避けて、プロテアーゼや RT 遺伝子配列内にプライマーを設定することが難しくなったこと、増幅に用いる逆転写酵素や DNA ポリメラーゼの増幅性能と正確性が格段に向上したことで比較的長いフラグメントを高感度に増幅することが可能になったこと、DNA シーケンサーの解析性能が向上したことなどがあげられる。なお、インテグラーゼの薬剤耐性検査で使用されているプライマーは、国内実施施設のほとんどが同じプライ

マーを使用している。薬剤感受性を評価するアルゴリズムには、1) スタンフォード薬剤耐性データベース (<https://hivdb.stanford.edu/>)、2) International Antiviral Society-USA、3) The Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS) 薬剤耐性評価 (<http://www.hivfrenchresistance.org/>)、4) RegaDB (<https://rega.kuleuven.be/cev/avd/software/rega-algorithm>) などが公開されており、わが国では 1) と 2) を使用している施設が多い。使用するアルゴリズムの違いによって薬剤感受性の判定に齟齬が生じることがあるものの、おおむね一致することが報告されている¹⁶⁾。わが国では薬剤耐性 HIV インフォメーションセンター (<http://www.hiv-resistance.jp/>) にて耐性変異の読み方が公開されている。

薬剤耐性検査の課題

Genotype 検査は前述のように複数のステップを組み合わせたきわめて高度な検査技術だが、使用する試薬や機器は指定されておらず、また自動化もされていない。したがって、使う試薬や機器の種類とその管理、検査担当者の熟練度などさまざまな要因が最終結果に反映されてくる。国内施設で使用されている試薬を調べると、多種多様であるものの、RNA 抽出にはカラム法、RT-PCR はワンステップ法、PCR 酵素は high fidelity 酵素、シーケンス反応は BigDye terminator cycle sequencing kit (Thermo Fisher) と、いずれの施設においても原理や性能が類似している試薬が使用されており、これらが検査結果に及ぼす影響は小さいと推測される。しかしながら、前述したようにプロテアーゼ/RT 領域の増幅プライマーが施設間で異なることは、施設により genotype 検査結果の相違に繋がるのが危惧される。われわれを含め今まで国内外で多数の外部精度評価 (external quality assessment : EQA)^{14, 17~22)} が行われてきたが、これらの結果に共通することは mixture となる塩基 (以下、mix 塩基) の判定が施設により異なることである。つまり、野生型 HIV の中に薬剤耐性 HIV が微少集団 (minor variant) として潜在していた場合は施設によっては薬剤耐性 HIV を検出できずに見落とす可能性がある。本検査での塩基配列の決定には gold standard であるサンガー法が用いられているが、実際に捉えているのはサンプル中に優位に存在する major variant であり、存在比が 20~25% 以下の minor variant を検出することは難しいとされている²³⁾。Minor variant が将来的に治療失敗の原因になるか否かについてはさまざまな報告があり^{24~32)}、どこまで minor variant を検出すべきかについては議論の余地が残される。しかしながら、その議論の前提としてあるのは、管理された検査法によって minor variant の存在と薬剤耐性の有無を把握できていることである。Minor variant の検出力にはエレクトロフェログラムの質や PCR 過程での増幅の均一性が影響し、それにはづ

ライマーを含め、さまざまな要因が結果に影響を与える。したがって、どの施設においても臨床的に許容できる同質同等な検査結果となるために、各施設が己の genotype 検査の性能を熟知して、検査の質を維持向上させること、いわゆる「標準化」に取り組むことが喫緊の課題といえよう。

臨床検査における標準化

「標準化」とはその言葉どおり「標準」を設定し、これを活用する組織的行為のことである。工業や産業の分野では規格の確立や仕様の統一などがよく知られている。「臨床検査の標準化」とは、一言で言えば、「いつ、どこの施設で検査をしても同じ結果になるように調整すること」であり、それにより 1) 正確な診断に結びつく、2) 正確な解析が可能となる、3) 無駄な再検査がなくなる。そのためには検査法や検査値の標準化はもちろんのこと、臨床検査室の標準化（国際認定）も必要である。現在、わが国では多くの臨床検査室が国際規格の認定取得に取り組んでいる。ISO15189（臨床検査室-品質と能力に関する特定要求事項）は国際標準化機構（International Organization for Standardization : ISO）が作成した臨床検査室の国際規格である。2005年8月より公益社団法人日本適合性協会（Japan Accreditation Board : JAB）が審査、認定を開始し、2005年9月には北海道大学病院検査・輸血部が病院検査室としてわが国ではじめて認定を取得し、現在（2017年10月）までに国内140施設が認定を取得するまでに至っている。これ以外の国際認定にはCAP-LAP認定やCLIA認定があるが、国内の主な認定施設は衛生検査所であり、その施設数はISO15189認定施設数に比べると少ない。認定取得の利点は臨床検査室と検査結果の国際的な評価であるが、平成25年には厚生労働省の「治験における臨床検査等の精度管理に関する基本的な考え方について」の中で「国際共同治験や医師主導治験をはじめとした治験又は臨床研究を積極的に実施している医療機関では、当該医療機関の検査精度を確保するためISO15189等の外部評価による認定を取得すること」が基本的な考えとして示されている。そして、平成28年度診療報酬書改定では、質の高い診療検査の適切な評価として「国際標準検査管理加算」が新設された。これは「国際標準化機構が定めた臨床検査に関する国際規格に基づく技術能力の認定を受けている施設が対象であり、具体的にはISO15189に基づく臨床検査室の認定を取得していることが必要である。このようなことからISO15189の認定は臨床検査室の高い技術的能力と高い検査品質の評価だけにとどまらず、認定施設の収益増にもつながるため、今後、認定取得施設はさらに増加すると考えられる。一方、検査法や検査値の標準化はJCTLM（Joint Committee

on Traceability in Laboratory Medicine : 臨床検査医学におけるトレーサビリティ合同委員会）が中心となり国際的な標準化を進めており³³⁾、わが国の窓口は特定非営利活動法人日本臨床検査標準協議会（Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards : JCCLS）が行っている³⁴⁾。臨床検査の標準化には「標準物質」と「基準測定操作法（標準測定操作法）」が整備されていることが重要である^{35~37)}。臨床検査室で行われている検査、いわゆる日常測定操作法は、通常、メーカーが提供する検査試薬やキットであるが、このキットの性能、いわゆる結果の信頼性はキットに添付もしくは市販の実用標準物質を介して、より上位の標準物質、測定操作法につながり、最終的には最上位の一次標準物質、一次基準測定操作法にたどりつく、これをトレーサビリティ体系という（図1）。このトレーサビリティ体系が確立されていることにより信頼性の高い検査結果の提供が可能となるが、同時に、各施設内でコントロールを用いて精度を管理する内部精度管理およびEQAによって検査結果の品質を継続的に維持・向上させることが重要である。臨床検査の中でも標準化は生化学検査で最もさかに行われており、近年、それらの検査項目においては施設間差が非常に小さくなったことから共用基準範囲が設定され、異なる検査法・試薬・機器を使用している施設であっても共通の基準範囲が利用できるまでに至っている。しかしながら、「標準物質」や「標準測定操作法」が存在せず標準化できない臨床検査項目も多く存在する。そのような検査であっても各検査室の結果を臨床的に意味のある範囲内で一致させなければ誤った診断と治療につながる可能性がある。「調和化（ハーモナイゼーション）」とは上位の「標準物質」および「標準測定操作法」は存在しないが、各施設で行われている検査の結果を臨床的に意味のある範囲で一致させることである^{35,36,38)}。

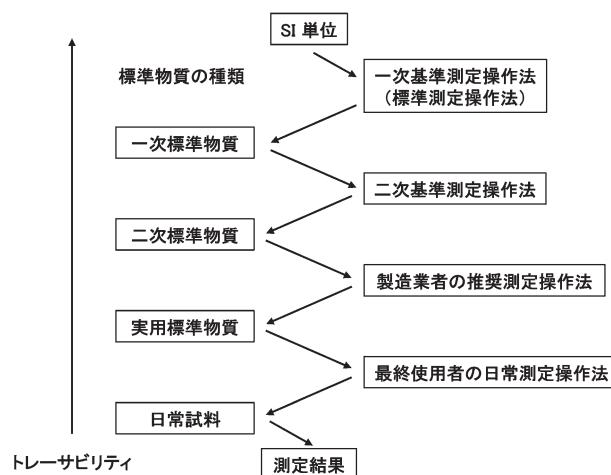


図1 臨床検査におけるトレーサビリティ体系図

Genotype 検査の標準化の現状：JEQS の取り組み

臨床検査における標準化やハーモナイゼーションは数値を結果とする定量的検査を主な対象としているため、genotype 検査のような塩基配列を結果とする検査、つまり定性的な「情報」を取り扱う検査に対しては、標準化の考えが当てはまらない部分もある。現状として本検査には「標準物質」や「標準測定操作法」は存在しないためトレーサビリティ体系の形成が困難であり、実現されていない。そのため、現時点では施設間差是正のための EQA の実施が必須である。国内での臨床検査に関する EQA は日本臨床衛生検査技師会、日本医師会など、各種学術団体や機器・試薬メーカーが行っているが、本検査は現状対象外である。また、米国病理学会（College of American Pathologists : CAP）が主催する EQA に genotype 検査が設定されているが国内の本検査実施施設の参加は少ない。このことからエイズ対策研究事業「国内流行 HIV 及びその薬剤耐性株の長期的動向把握に関する研究」の標準化ワーキンググループでは標準化を目的として EQA の実施と推奨法の確立を行ってきた^{14,15)}。2003 年に国内施設を対象とした EQA プログラムである JEQS（Japanese external quality assessment program to standardize HIV genotyping in Japan）を開始し、現在（2017 年 10 月）までに 6 回実施している。2003 年に実施した初めての EQA では薬剤耐性変異を有する感染性 HIV-1 クローンから抽出した RNA を評価サンプルとして国内 15 施設に配布し、薬剤耐性関連および非関連アミノ酸変異を含む 42 アミノ酸を対象とした全施設の平均一致率が 97.3% と非常に高い結果であったことを報告した。不一致の原因としてはサンプルと配列が合わないプライマーの使用、エレクトロフェログラムの乱れ、レポートの記載ミス、アミノ酸への翻訳ミスなどがあげられた¹⁵⁾。その後、2010 年の EQA ではプロテアーゼと RT 遺伝子を組み込んだプラスミドから転写させた合成 RNA を評価サンプルとして 11 施設に配布したところ、単一の合成 RNA で構成されたサンプルにおいては、塩基配列の平均一致率は薬剤耐性変異の有無によらず 99.7% 以上であったが、野生型と耐性変異型の 2 種類の合成 RNA を 7:3 に混合したサンプルでは mix 塩基の検出率、すなわち minor variant の検出率は平均 71.3%（標準偏差 32.7%）と施設間差が確認された。それは 1:1 に混合したサンプルでは平均検出率 77.3%（標準偏差 31.9%）と検出率は高いものの、施設間差は同程度に確認されている¹⁴⁾。2011 年より解析対象にインテグラーゼ遺伝子を追加し 2011 年、2012 年と EQA を実施したところ 2010 年 EQA と同じく mix 塩基検出率に施設間差が確認されており、その原因としてプライマー配列のミスマッチが考えられた。2014 年には施設間差の是正を

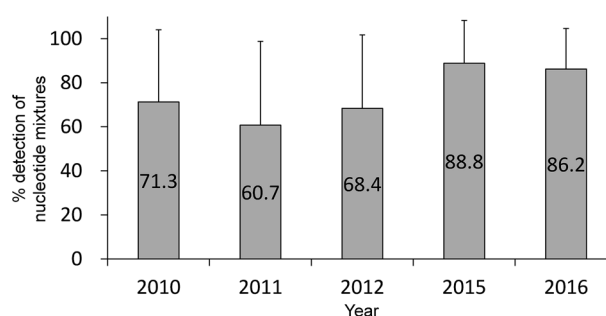


図 2 Mix 塩基の平均検出率の推移
参加施設数は 2010～2012 年、2016 年が 11 施設、
2015 年は 12 施設。エラーバーは標準偏差。

目的に、EQA の結果が好成績であった施設で使用されているプライマーをもとに、プロテアーゼ/RT 領域の増幅プライマーの組み合わせ 2 方法を確立し、それらを推奨法として参加施設に公開した。プロテアーゼ/RT の mix 塩基の平均検出率をまとめると 2010、2011、2012 年の EQA では 71.3%、60.7%、68.4% であったが、2015 年、2016 年では 88.8%、86.2% と改善傾向が確認され、genotype 検査の標準化に近づいたと考えている（図 2）。

Genotype 検査の標準化の課題

前述のように、臨床検査を標準化する上で「標準物質」の設定は重要である。標準物質の存在によりトレーサビリティ体系の形成が可能になるだけでなく、測定方法の妥当性確認（バリデーション）や検証（ベリフィケーション）、そして EQA の評価サンプルとしても利用可能である。標準物質の特性として求められることがコミュニティ（互換性）であり、それは患者試料と標準物質を 2 つ以上の測定方法で測定し、方法間で患者試料と標準物質が臨床的に意味のある範囲内で同様の数値関係を示すこととなっている^{39,40)}。Genotype 検査においてはこの数値関係を示すことは難しいが、コミュニティにはマトリクスや測定対象物との類似性が影響することから、実サンプルもしくはそれに類似したものを標準物質や評価サンプルとして採用することが望ましいことになる。実際に国内外で実施された EQA の評価サンプルをみても HIV-1 感染者血漿^{19~21,41,42)}、HIV-1 培養上清⁴¹⁾、感染性クローン・リコンビナント^{18,20,21)}、プラスミド¹⁷⁾、抽出した HIV-1 RNA¹⁵⁾、合成 RNA¹⁴⁾、dried blood spot⁴³⁾、dried tube specimens⁴²⁾ などさまざまである。これらのうち最も理想的な評価サンプルは実サンプルである血漿であるが、適切な質（保存状態、輸送環境、薬剤耐性変異）と十分な量の入手が難しいサンプルでもある。また、体内の HIV-1 は多様な集団（quasi-species）を形成しているため、血漿サンプルの解析結果は

2種類以上の塩基配列の混在、いわゆる mixture という結果になる可能性がある。しかしながら、quasi-speciesであったとしてもおのおのの比率は不明なため、mixtureがquasi-speciesによるのかエラーによるのか判定することが困難である。つまり、血漿を評価サンプルとした場合は確定した回答がないことから、結果の「正しさ」は評価できず、それをするためには、上位の測定方法で値付けされた評価サンプルもしくは純物質が必要となる。国内で実施されているEQAでは「正しさ」を評価するために評価サンプルとして合成RNAを採用しているが¹⁴⁾、マトリクス効果とquasi-speciesが加味されないことから必ずしも理想的なサンプルではない。アジアのEQAプログラムであるTAQAS (TREAT Asia Quality Assessment Scheme) は、mix塩基検出率(論文では同定率と表記)と評価サンプルの複雑さがgenotype検査の質の評価に関係し、mix塩基検出率が本検査の質の指標となることを報告している^{19,44)}。したがって、値付けされた血漿、つまり、含まれる全HIV-1の配列と比率が明確な血漿を評価サンプルとしたEQAが理想となる。

近年、次世代シーケンサー (NGS) の登場によりサンガー法よりも高感度かつ定量的に塩基配列を決定することが可能となった^{45~48)}。サンガー法とNGSによって検出した薬剤耐性変異を比較した報告では、いずれもNGSでより多くの種類の耐性変異が検出されている^{48~50)}。したがって、NGSをgenotype検査の上位測定操作法として血漿の値付けを行うことが考えられるが、NGSにもいくつかの課題1) プラットフォームによりエラー率が異なる、2) PCR産物からライブラリ作製を行うため、プライマーによる増幅バイアスの可能性を排除できない、3) ライブラリ調整の不均一、4) シーケンス反応時のエラー、5) マッピングエラー、6) 配列断片の集合体であることによる情報の質的限界などがあげられる^{51,52)}。NGSによる値付けは完全ではないものの日常測定操作法であるサンガー法とは原理が異なり、かつ感度が高いことから、より正確な評価を行うための手段の1つとして期待している。

おわりに

診断や治療のガイドラインは臨床検査の結果によってその方針が決められることが多い。そして、ガイドラインの多くは「どこの施設でも同じ検査結果であること」を前提に作られている。したがって、検査法が標準化もハーモナイゼーションもされていないこと、そしてその認識の欠如は誤った診断や治療に繋がる可能性があり、結果的にガイドラインの効果的な使用の妨げとなる。それは医療分野に限らず研究分野においても同様で、他研究との比較ができない、多施設研究のデータの信頼性に影響する。このこと

は薬剤耐性検査と限らず、多くの臨床検査で標準化が検査実用化の後追いになってきたことが問題である。平成29年3月の第193回通常国会に「ゲノム医療の実用化に向けた遺伝子関連検査の精度の確保」として精度管理の基準の明確化が記載された医療法等の一部を改正する法律案が提出されている。標準化には「標準物質」と「標準測定操作法」の存在が重要であるが、それができたからといって急に標準化が成されるわけではない。それらを利用して爾々と精度管理を継続することで標準化が達成できるのである。今後、多くの検査項目で標準化作業が推進されると思われるが、genotype検査のように実施施設数が少なく、市販キットもない検査は標準化の波から取り残される可能性が高い。国際的な標準化、完全な標準化とはいかないまでも、それに向かった取り組みを継続的に実施することが品質の高いgenotype検査の提供に重要であり、それには本検査を利用する医療関係者の理解そして関連学会や行政当局等からの支援が必要である。

謝辞

本総説を執筆するにあたりたいへんお世話になりました吉村和久先生、杉浦互先生をはじめ、「国内流行HIV及びその薬剤耐性株の長期的動向把握に関する研究」研究班ならびにHIV薬剤耐性検査標準化ワーキンググループの皆様へ感謝申し上げます。また、本研究に多大な支援をしていただいた北海道大学病院検査・輸血部 佐藤かおり先生ならびに藤澤真一先生にこの場をお借りしまして深謝致します。

利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Durant J, *et al* : Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy : the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* 353 : 2195-2199, 1999.
- 2) Tural C, *et al* : Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice : the Havana trial. *AIDS* 16 : 209-218, 2002.
- 3) Meynard JL, *et al* : Phenotypic or genotypic resistance testing for choosing antiretroviral therapy after treatment failure : a randomized trial. *AIDS* 16 : 727-736, 2002.
- 4) Gatanaga H, *et al* : Drug-resistant HIV-1 prevalence in patients newly diagnosed with HIV/AIDS in Japan. *Antiviral Res* 75 : 75-82, 2007. doi : 10.1016/j.antiviral.2006.11.012
- 5) Hattori J, *et al* : Trends in transmitted drug-resistant HIV-1 and demographic characteristics of newly diagnosed patients : Nationwide surveillance from 2003 to 2008 in Japan. *Antiviral Res* 88 : 72-79, 2010. doi : 10.1016/j.antiviral.

- 2010.07.008
- 6) Hattori J, *et al* : Characteristics of transmitted drug-resistant HIV-1 in recently infected treatment-naive patients in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr* 71 : 367–373, 2016. doi : 10.1097/qai.0000000000000861
 - 7) Wensing AM, *et al* : Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe : Implications for clinical management. *J Infect Dis* 192 : 958–966, 2005. doi : 10.1086/432916
 - 8) Booth CL, *et al* : Prevalence and predictors of antiretroviral drug resistance in newly diagnosed HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother* 59 : 517–524, 2007. doi : 10.1093/jac/dkl501
 - 9) Alteri C, *et al* : Characterization of the patterns of drug-resistance mutations in newly diagnosed HIV-1 infected patients naive to the antiretroviral drugs. *BMC Infect Dis* 9 : 111, 2009. doi : 10.1186/1471-2334-9-111
 - 10) Shet A, *et al* : Tracking the prevalence of transmitted antiretroviral drug-resistant HIV-1 : a decade of experience. *J Acquir Immune Defic Syndr* 41 : 439–446, 2006. doi : 10.1097/01.qai.0000219290.49152.6a
 - 11) Kim CO, *et al* : Low prevalence of drug-resistant HIV-1 in patients newly diagnosed with early stage of HIV infection in Korea. *Tohoku J Exp Med* 216 : 259–265, 2008.
 - 12) Ndembi N, *et al* : Transmitted antiretroviral drug resistance surveillance among newly HIV type 1-diagnosed women attending an antenatal clinic in Entebbe, Uganda. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24 : 889–895, 2008. doi : 10.1089/aid.2007.0317
 - 13) Rodriguez-Rodriguez N, *et al* : Increasing trends in primary NNRTI resistance among newly HIV-1-diagnosed individuals in Buenos Aires, Argentina. *J Internat AIDS Soc* 16 : 18519, 2013. doi : 10.7448/ias.16.1.18519
 - 14) Yoshida S, *et al* : Japanese external quality assessment program to standardize HIV-1 drug-resistance testing (JEQS2010 program) using *in vitro* transcribed RNA as reference material. *AIDS Res Hum Retroviruses* 31 : 318–325, 2015. doi : 10.1089/aid.2014.0059
 - 15) Fujisaki S, *et al* : Performance and quality assurance of genotypic drug-resistance testing for human immunodeficiency virus type 1 in Japan. *Jpn J Infect Dis* 60 : 113–117, 2007.
 - 16) Ravela J, *et al* : HIV-1 protease and reverse transcriptase mutation patterns responsible for discordances between genotypic drug resistance interpretation algorithms. *J Acquir Immune Defic Syndr* 33 : 8–14, 2003.
 - 17) Schuurman R, *et al* : Worldwide evaluation of DNA sequencing approaches for identification of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Clin Microbiol* 37 : 2291–2296, 1999.
 - 18) Schuurman R, *et al* : Underestimation of HIV type 1 drug resistance mutations : Results from the ENVA-2 genotyping proficiency program. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18 : 243–248, 2002. doi : 10.1089/088922202753472801
 - 19) Sayer DC, *et al* : Quality assessment program for genotypic antiretroviral testing improves detection of drug resistance mutations. *J Clin Microbiol* 41 : 227–236, 2003. doi : 10.1128/jcm.41.1.227-236.2003
 - 20) Pandit A, *et al* : HIV-1 drug resistance genotyping quality assessment : Results of the ENVA7 genotyping proficiency programme. *J Clin Virol* 43 : 401–406, 2008. doi : 10.1016/j.jcv.2008.08.021
 - 21) Souza DC, *et al* : The Brazilian network for HIV-1 genotyping external quality control assurance programme. *J Intern AIDS Soc* 14 : 45, 2011. doi : 10.1186/1758-2652-14-45
 - 22) Parkin N, *et al* : Genotyping external quality assurance in the world health organization HIV drug resistance laboratory network during 2007–2010. *Clin Infect Dis* 54 (Suppl 4) : S266–272, 2012. doi : 10.1093/cid/cir992
 - 23) Vandamme A, *et al* : Laboratory guidelines for the practical use of HIV drug resistance tests in patient follow-up. *Antivir Ther* 6 : 21–39, 2001.
 - 24) Balduin M, *et al* : Prevalence of minor variants of HIV strains at reverse transcriptase position 103 in therapy-naive patients and their impact on the virological failure. *J Clin Virol* 45 : 34–38, 2009. doi : 10.1016/j.jcv.2009.03.002
 - 25) Geretti AM, *et al* : Low-frequency K103N strengthens the impact of transmitted drug resistance on virologic responses to first-line efavirenz or nevirapine-based highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 52 : 569–573, 2009. doi : 10.1097/QAI.0b013e3181ba11e8
 - 26) Goodman DD, *et al* : Low level of the K103N HIV-1 above a threshold is associated with virological failure in treatment-naive individuals undergoing efavirenz-containing therapy. *AIDS* 25 : 325–333, 2011. doi : 10.1097/QAD.0b013e3283427dcb
 - 27) Johnson JA, *et al* : Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naive populations and associate with reduced treatment efficacy. *PLoS Med* 5 : e158, 2008. doi : 10.1371/journal.pmed.0050158
 - 28) Metzner KJ, *et al* : Minority quasispecies of drug-resistant HIV-1 that lead to early therapy failure in treatment-naive

- and -adherent patients. *Clin Infect Dis* 48 : 239–247, 2009. doi : 10.1086/595703
- 29) Paredes R, *et al* : Pre-existing minority drug-resistant HIV-1 variants, adherence, and risk of antiretroviral treatment failure. *J Infect Dis* 201 : 662–671, 2010. doi : 10.1086/650543
- 30) Simen BB, *et al* : Low-abundance drug-resistant viral variants in chronically HIV-infected, antiretroviral treatment-naive patients significantly impact treatment outcomes. *J Infect Dis* 199 : 693–701, 2009. doi : 10.1086/596736
- 31) Metzner KJ, *et al* : Prevalence of key resistance mutations K65R, K103N, and M184V as minority HIV-1 variants in chronically HIV-1 infected, treatment-naive patients. *J Clin Virol* 50 : 156–161, 2011. doi : 10.1016/j.jcv.2010.10.001
- 32) Peuchant O, *et al* : Transmission of HIV-1 minority-resistant variants and response to first-line antiretroviral therapy. *AIDS* 22 : 1417–1423, 2008. doi : 10.1097/QAD.0b013e3283034953
- 33) Jones GR, Jackson C : The joint committee for traceability in laboratory medicine (JCTLM)—its history and operation. *Clin Chim Acta* 453 : 86–94, 2016. doi : 10.1016/j.cca.2015.11.016
- 34) Hamasaki N : Activities of Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards (JCCLS) toward standardization of laboratory medicine. *Rinsho Byori* 57 : 894–899, 2009.
- 35) Vesper HW, *et al* : Current practices and challenges in the standardization and harmonization of clinical laboratory tests. *Am J Clin Nutr* 104 (Suppl 3) : 907S–912S, 2016. doi : 10.3945/ajcn.115.110387
- 36) Greenberg N : Update on current concepts and meanings in laboratory medicine—standardization, traceability and harmonization. *Clin Chim Acta* 432 : 49–54, 2014. doi : 10.1016/j.cca.2013.12.045
- 37) Kuwa K : Establishment of working reference materials in laboratory medicine. *Rinsho Byori* 54 : 940–946, 2006.
- 38) Greg Miller W, *et al* : Roadmap for harmonization of clinical laboratory measurement procedures. *Clin Chem* 57 : 1108–1117, 2011. doi : 10.1373/clinchem.2011.164012
- 39) Rej R : Accurate enzyme activity measurements. Two decades of development in the commutability of enzyme quality control materials. *Arch Pathol Lab Med* 117 : 352–364, 1993.
- 40) Miller WG, *et al* : Why commutability matters. *Clin Chem* 52 : 553–554, 2006. doi : 10.1373/clinchem.2005.063511
- 41) Land S, *et al* : TREAT Asia Quality Assessment Scheme (TAQAS) to standardize the outcome of HIV genotypic resistance testing in a group of Asian laboratories. *J Virol Methods* 159 : 185–193, 2009. doi : 10.1016/j.jviromet.2009.03.016
- 42) Louis FJ, *et al* : Evaluation of an external quality assessment program for HIV testing in Haiti, 2006–2011. *Am J Clin Pathol* 140 : 867–871, 2013. doi : 10.1309/ajcpsywx49izsqkfs
- 43) Parkin N, *et al* : Evaluation of in-house genotyping assay performance using dried blood spot specimens in the global world health organization laboratory network. *Clin Infect Dis* 54 (Suppl 4) : S273–279, 2012. doi : 10.1093/cid/cir982
- 44) Land S, *et al* : Capacity building and predictors of success for HIV-1 drug resistance testing in the Asia-Pacific region and Africa. *J Intern AIDS Soc* 16 : 18580, 2013. doi : 10.7448/ias.16.1.18580
- 45) D’Aquila RT, *et al* : Tenofovir (TDF)-selected or abacavir (ABC)-selected low-frequency HIV type 1 subpopulations during failure with persistent viremia as detected by ultradeep pyrosequencing. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27 : 201–209, 2011. doi : 10.1089/aid.2010.0077
- 46) Le T, *et al* : Low-abundance HIV drug-resistant viral variants in treatment-experienced persons correlate with historical antiretroviral use. *PLoS One* 4 : e6079, 2009. doi : 10.1371/journal.pone.0006079
- 47) Varghese V, *et al* : Minority variants associated with transmitted and acquired HIV-1 nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance : implications for the use of second-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 52 : 309–315, 2009. doi : 10.1097/QAI.0b013e3181bca669
- 48) Moscona R, *et al* : Comparison between next-generation and sanger-based sequencing for the detection of transmitted drug-resistance mutations among recently infected HIV-1 patients in Israel, 2000–2014. *J Intern AIDS Soc* 20 : 1–9, 2017. doi : 10.7448/ias.20.1.21846
- 49) Fisher RG, *et al* : Next generation sequencing improves detection of drug resistance mutations in infants after PMTCT failure. *J Clin Virol* 62 : 48–53, 2015. doi : 10.1016/j.jcv.2014.11.014
- 50) Trabaud MA, *et al* : Comparison of HIV-1 drug-resistance genotyping by ultra-deep sequencing and sanger sequencing using clinical samples. *J Med Virol*, 2017. doi : 10.1002/jmv.24872
- 51) Brumme CJ, Poon AFY : Promises and pitfalls of illumina sequencing for HIV resistance genotyping. *Virus Res* 239 : 97–105, 2017. doi : 10.1016/j.virusres.2016.12.008
- 52) Vrancken B, *et al* : Quantifying next generation sequencing sample pre-processing bias in HIV-1 complete genome sequencing. *Viruses* 8, 2016. doi : 10.3390/v8010012