



Empfehlungen zur Bestimmung des HIV-1-Korezeptor-Gebrauchs

**Anhang zu den deutsch-österreichischen
Leitlinien zur antiretroviralen Therapie
der HIV-Infektion**

Version 1.0 vom 13.05.2014

Empfehlungen zur Bestimmung des HIV-1-Korezeptor-Gebrauchs

Maraviroc (MVC, Celsentri™, ViiV Healthcare), bislang das einzig zugelassene Medikament der Klasse der CCR5-Antagonisten, hat sich bei der Behandlung Therapie-naiver und Therapie-erfahrener Patienten als wirksam erwiesen, bei denen vor Therapiebeginn CCR5-trope (R5-) Viren und keine relevanten Mengen an CXCR4-tropen (X4-) Viren nachgewiesen wurden [1-6]. Die Voraussetzung der Verordnung von MVC ist nach Vorgabe der FDA und der EMA die Prüfung des Tropismus der HI-Viren in einer Patientenprobe zeitnah vor der Verordnung. Um die Gabe von CCR5-Antagonisten zu ermöglichen, sind daher Methoden zur schnellen und sicheren Bestimmung des HIV-1-Korezeptorgebrauchs unerlässlich. Es stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die zu vergleichbaren Ergebnissen führen [7]. In den Zulassungsstudien für Maraviroc wurde die erste Version des Trofile Assays (OTA) verwendet. Dieser ist ein phänotypischer Test der Firma Labcorp (Monogram), bei dem mit rekombinanten Viren die Infizierbarkeit von CXCR4- bzw. CCR5-exprimierenden Zellen geprüft wird. Alternativ stehen genotypische Verfahren [8] zur Verfügung, die eine Vorhersage des Tropismus aufgrund der Sequenzanalyse des V3-Loops im viralen Hüllprotein mit einem oder mehreren Interpretationssystem(en) analog dem Vorgehen bei der HIV-Resistenztestung erlauben.

Eine weitere Variante bildet das XTrack System der Firma InPheno, welches zunächst eine Hybridisierung von Nukleinsäuren mit nachfolgender Analyse in einer HPLC darstellt. Bei nicht eindeutigen Analysen wird eine Sequenzanalyse mit nachfolgender Interpretation durchgeführt. Zusätzlich steht eine phänotypische Analyse im InPheno-eigenen rekombinanten Zellkultur-system zur Verfügung, die im Rahmen von Kooperationsprojekten genutzt wird [9]. Auch hier kann durch die erwähnten Labore HIV-GRADE e.V. vermittelt werden (www.hiv-grade.de).

In einer Kooperation der Labore des HIV-GRADE e.V. wurden Ergebnisse von parallel durchgeführten genotypischen und phänotypischen (Trofile) Analysen in Deutschland gesammelt, sowie ausschließlich genotypische Daten zur Bestimmung der Häufigkeit von R5- und X4-Viren in Bezug auf Viruslast, CD4-Zellzahl und HIV-1 Subtypen [10]. Die Analysen und Ausarbeitung der Empfehlung wurden in enger Kooperation von HIV-GRADE e.V. und dem MPI für Informatik in Saarbrücken durchgeführt. Es stehen mittlerweile mehr retrospektive und prospektive Daten zum Therapieansprechen nach genotypischer Testung zur Verfügung [11-15, 2, 16, 3], so dass eine Aktualisierung der deutsch-österreichischen Leitlinien notwendig wurde. Anhand dieser Vergleiche ist die konventionelle HIV-Sequenzanalyse aus Plasma mit nachfolgender Interpretation (genotypische Tropismusbestimmung) methodisch und klinisch als gleichwertig zum phänotypischen Verfahren anzusehen.

Wie bei den genotypischen Resistenzanalysen bedürfen genotypische Tropismus Analysen einer Interpretation, welche die ermittelte Aminosäuresequenz deutet. Mehrere solche Systeme zur Bestimmung des Tropismus aus der Sequenzinformation sind frei über das Internet zugänglich:

Wetcat: <http://genomiac2.ucsd.edu:8080/wetcat/tropism.html>;
WebPSSM: <http://ubik.microbiol.washington.edu/computing/pssm>;
geno2pheno_[coreceptor]: <http://coreceptor.bioinf.mpi-inf.mpg.de/index.php>.

Es gibt weitere Systeme, die aber nicht frei verfügbar sind.

Phänotypische Tropismus Testung

Hier steht der Trofile ES (ESTA) Assay zu Verfügung. Er ist der Nachfolger des OTA, mit dem die Maraviroc-Zulassungsstudien durchgeführt wurden. Um diesen Test zu nutzen, muss eine Plasmaprobe des Patienten zur Firma Monogram (LabCorp) in San Francisco (USA) auf Trockeneis versendet werden. Dabei sind spezielle Anforderungen in Bezug auf Probenvolumen und Viruslast zu beachten. Die zehn erwähnten Labore sind in dieser Kooperation mit Monogram erfahren und könnten im Bedarfsfall eine Probe an Monogram weiterleiten. Alternativ kann eine Probe an InPheno zur Phänotypisierung geschickt werden.

Genotypische Tropismus Testung

Mittlerweile hat sich die genotypische Testung in Europa durchgesetzt und ist weltweit verbreitet. Bei der genotypischen Tropismusbestimmung wird die V3-Schleife im viralen Hüllprotein der Virusvariante des Patienten amplifiziert und sequenziert. Diese Testung kann aus dem freien, im Plasma zirkulierenden HI-Virus oder aus dem in den Zellen abgelegten Provirus durchgeführt werden. Dies ist besonders im Hinblick auf Therapieumstellungen bei Patienten wichtig, die unter erfolgreicher antiretroviraler Therapie sind (<50 Kopien/ml HIV).

Nach der Sequenzanalyse erfolgt eine Auswertung durch ein Interpretationssystem. Anhand der Daten der zehn beteiligten Labore bietet das System geno2pheno_[coreceptor] durch seinen differenzierten Interpretationsansatz verlässliche Resultate in Bezug auf den Ausschluss von X4-Varianten nach einfacher Sequenzanalyse. Eine Mehrfachtestung erscheint nicht notwendig. Das Interpretationssystem gibt in der aktuellen Version als Ergebnis einen quantitativen Wert (die falsch positive Rate der Vorhersage für X4-Viren, FPR) an. Die FPR ist das Maß der Spezifität der Vorhersage und so gilt: Je höher die FPR, desto sicherer ist die exklusive Benutzung des CCR5-Korezeptors für dieses Virus und desto sicherer ist die Gabe des CCR5-Blockers. Gleichzeitig wird bei Wahl eines hohen FPR einem größeren Anteil an Patienten die Gabe von CCR5-Antagonisten vorenthalten, die möglicherweise hätten profitieren können (höhere falsch negative Rate der Vorhersage). Deshalb empfiehlt es sich, die Interpretation bzw. die damit verbundene Therapieentscheidung individuell auf die jeweilige Patientensituation anzupassen.

Es gibt zwei genotypische Analysemethoden:

1. Sanger (population-based) Sequencing: eine Konsensus-Sequenz wo nur Virusvarianten mit einem Anteil $\geq 10\%$ in der Viruspopulation berücksichtigt werden können (technical limitation)
2. Next generation sequencing (NGS): diese Sequenzierung Technik erlaubt Virusvariante einzeln zu analysieren.

Tropismusbestimmung mittels Sanger Sequenzierung

Testung aus viraler RNA

Die vorliegenden Leitlinien berücksichtigen die neuesten Daten aus der Literatur und von wissenschaftlichen Kongressen [11, 9, 17, 12, 15, 2].

- Liegt die FPR unter 5% (roter Bereich in der Einstellung „German Recommendations“ in `geno2pheno[coreceptor]`), ist wegen des hohen Risikos einer falschen negativen Vorhersage eine Behandlung mit einem CCR5-Antagonisten generell nicht zu empfehlen. Die Nicht-Erkennung von CXCR4-tropen Viren bei einer FPR von 5% kommt in etwa bei einem Drittel der Vorhersagen vor.
- Für Patienten mit limitierten Therapieoptionen, kann die Gabe eines CCR5-Antagonisten bei einer FPR zwischen 5% und 15% in Betracht gezogen werden. Ergebnisse zwischen 5% und 15% werden im `geno2pheno[coreceptor]` Tool mit der Einstellung „German Recommendations“ rot –gelb für den Bereich 5% -10% (eingeschränkter Empfindlichkeit) bzw. grün – gelb für den Bereich 10% -15% (möglicherweise bereits eingeschränkte Empfindlichkeit) dargestellt. In diesem Bereich von FPR 5% bis 15% sollte ein Korezeptorantagonist nur nach sorgfältiger Prüfung möglicher Alternativen eingesetzt werden.
- Der Einsatz von CCR5-Antagonisten ist ohne Einschränkung zu empfehlen, wenn die FPR über 15% liegt.

Für diese Abwägung zur individualisierten Therapieauswahl ist ein besonders intensiver Austausch zwischen Klinikern und Virologen dringend empfohlen. Gegebenenfalls kann zusätzlich eine phänotypische Analyse erfolgen. Damit ergibt sich ein leichter Unterschied zu den European Guidelines [18], die ebenfalls die genotypische Bestimmung und Interpretation mit `geno2pheno[coreceptor]` empfehlen. Aufgrund der Datenlage, die zur Zeit der Entscheidung über die European Guidelines zur Verfügung stand, entschied man sich dort für einen einheitlichen Cut-off von 10% bei Dreifachtestung (triplicate testing) der Proben. Falls nur eine Einfachtestung der Proben erfolgt, wird dort ein Cut-off von 20% empfohlen.

Unabhängig von der Routinediagnostik ist es auch weiterhin notwendig, genotypische und ggf. auch phänotypische Analysen zusammen mit nachfolgenden klinischen Verlaufsdaten zu sammeln und zu analysieren, um die genotypischen Interpretationssysteme kontinuierlich weiter zu entwickeln.

Testung aus proviraler DNA

Klinisch stellt sich neben dem virologischen Versagen recht häufig die Frage nach einer Umstellung der Therapie auf ein Regime mit einem CCR5-Antagonisten aus Gründen der Medikamentenunverträglichkeit und/oder von Nebenwirkungen. Bei niedriger oder nicht nachweisbarer Viruslast kann der Korezeptorgebrauch durch die Analyse der Erbgut von HIV, das in das Genom

infizierter Zellen integriert ist (provirale DNA) untersucht. Analog zur Validierung der Analysen aus freien Viren im Plasma, wurden durch mehrere Labore international und in Deutschland Daten und Erfahrungen gesammelt. Aus diesen resultiert die Empfehlung, auch Analysen aus proviralen DNA-Sequenzen für die Therapieentscheidung zu verwenden. Die Kriterien für die CCR5-Antagonisten Therapieempfehlung bei proviraler DNA sind identisch zu denen für RNA:

- Eine Behandlung mit einem CCR5-Antagonisten ist generell nicht zu empfehlen, wenn der FPR Wert unter 5% liegt (roter Bereich in der Einstellung „German Recommendations“ in geno2pheno_(coreceptor)).
- Wenn aufgrund der Therapievorgeschichte für einen Wechsel nur noch sehr wenige Alternativen bestehen, kann auch bei einer FPR zwischen 10% und 15% (grün-gelber Bereich) bzw. 5% - 10% (rot-gelber Bereich) bei intensiver Berücksichtigung der klinischen und diagnostischen Umstände die CCR5-Antagonisten Therapieempfehlung akzeptiert werden. Zusätzliche Sicherheit ergibt sich bei der Tropismustestung aus proviraler DNA aus der Tatsache, dass hier häufiger X4-trope Viren als im korrespondierenden Plasmavirus (bei Patienten mit nachweisbarer Virämie) gefunden werden [19, 20].
- Der Einsatz von CCR5-Antagonisten wird ohne Einschränkung dann empfohlen, wenn die FPR über 15% liegt.

Im Gegensatz dazu geben die European Guidelines aufgrund der damaligen Datenlage ebenfalls die Empfehlung einen Cut-off von 20 % zu benutzen. Die neuen Daten [9, 17, 12, 15, 2] sprechen aber für die Verwendung der Cut-offs in dieser Leitlinie (German Recommendations).

Das Wissen um die Bedeutung der CXCR4-tropen Viren für die Behandlung mit CCR5-Antagonisten steigt derzeit stetig an. Daher werden diese Empfehlungen kontinuierlich aktualisiert und sind unter den Therapieleitlinien der Deutschen AIDS-Gesellschaft (www.daignet.de), und anderen Foren (www.genafor.org unter AREVIR) in der jeweils aktuellen Version erhältlich.

Tropismusbestimmung mittels next generation sequencing

Next Generation Sequencing (NGS) ist eine neue Technik der Sequenzanalyse, die neben der bislang gebräuchlichen Sanger-Sequenzierung zunehmend eingesetzt wird. Im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung wird jede Virusvariante einzeln analysiert. Dabei wird anstatt einer einzigen Vorhersage pro Probe, eine FPR für jede einzelne Virusvariante in der Probe generiert, hieraus wird der prozentuale Anteil an X4 Viren an der Gesamtzahl der analysierten Virusvarianten bestimmt (% X4).

Klinisch wurden die NGS-Methoden unter anderem mit Hilfe der beiden Celsentri-Zulassungsstudien (MERIT und MOTIVATE) an virale RNA sowohl als provirale DNA von therapie-naiven und therapie-erfahrenen Patienten validiert [21-23].

Testung aus viraler RNA

Zur Bestimmung des Korezeptorgebrauchs wird folgende Empfehlung gegeben:

Virusvarianten mit einer FPR über 3.5% werden als R5 klassifiziert, während die Sequenzen mit einer FPR $\leq 3.5\%$ als X4 klassifiziert werden. Liegt der Anteil an X4-Viren einer Probe höher als 2%, wird die Gabe eines CCR5-Antagonisten nicht empfohlen.

Der Nachweis der Anteile X4-troper Virusvarianten mittels NGS ist mit abnehmender Viruslast in seiner Aussagekraft eingeschränkt. Deshalb sollte bei RNA Analysen von Proben mit Viruslasten <1000 RNA-Kopien/mL eine Konsensus-Sequenz erzeugt werden, in der nur Minoritäten mit einem Anteil $\geq 10\%$ berücksichtigt werden sollten. Diese wird nach den Kriterien für Sanger-Sequenzen interpretiert.

Testung aus proviraler DNA

Bei Proben mit Viruslasten <1000 HIV-1-RNA-Kopien/mL kann alternativ eine Testung aus proviraler DNA durchgeführt werden.

Die Kriterien für die CCR5-Antagonisten Therapieempfehlung bei proviraler DNA sind identisch zu denen für RNA: Virusvarianten mit einer FPR über 3.5% werden als R5 klassifiziert, während die Sequenzen mit einer FPR $\leq 3.5\%$ als X4 klassifiziert werden. Liegt der Anteil an X4-Viren einer Probe höher als 2%, wird die Gabe eines CCR5-Antagonisten nicht empfohlen.

Erstattung der Tropismusbestimmung

Die Erstattung ist auch im Rahmen der gesetzlichen Krankenversicherung seit 01.01.2013 möglich. Der Umfang der Leistung entspricht der einer genotypischen Tropismusbestimmung.

Erstellt unter Mitarbeit von:

Josef Eberle (München), Christian Noah (Hamburg), Eva Wolf (München), Martin Stürmer (Frankfurt/M), Patrick Braun (Aachen), Klaus Korn (Erlangen), Martin Däumer und Alexander Thielen (Kaiserslautern), Thomas Berg, Martin Obermeier, Robert Ehret und Hauke Walter (Berlin), Thomas Lengauer (Saarbrücken), Jens Verheyen (Essen), Saleta Sierra und Rolf Kaiser (Köln).

Literatur

1. Cooper DA, Heera J, Goodrich J, Tawadrous M, Saag M, DeJesus E, Clumeck N, Walmsley S, Ting N, Coakley E, Reeves JD, Reyes-Teran G, Westby M, Van Der Ryst E, Ive P, Mohapi L, Mingrone H, Horban A, Hackman F, Sullivan J, and Mayer H. Maraviroc versus efavirenz, both in combination with zidovudine-lamivudine, for the treatment of antiretroviral-naïve subjects with CCR5-tropic HIV-1 infection. *J Infect Dis.* 2010. **201(6)**: 803-813.
2. Reuter S, Braken P, Jensen B, Sierra-Aragon S, Oette M, Balduin M, Kaiser R, and Haussinger D. Maraviroc in treatment-experienced patients with HIV-1 infection - experience from routine clinical practice. *Eur J Med Res.* 2010. **15(6)**: 231-237.
3. Harrigan PR, McGovern R, Dong W, Swenson L, Thielen A, Jensen M, Mo T, Chapman D, Lewis M, James I, Heera J, Ellery S, and Valdez H. Screening for HIV tropism using population-based V3 genotypic analysis: a retrospective virological outcome analysis using stored plasma screening samples from MOTIVATE-1 *HIV Med.* 2009. **10(s2)**: 71.
4. Fatkenheuer G, Nelson M, Lazzarin A, Konourina I, Hoepelman AI, Lampiris H, Hirschel B, Tebas P, Raffi F, Trottier B, Bellos N, Saag M, Cooper DA, Westby M, Tawadrous M, Sullivan JF, Ridgway C, Dunne MW, Felstead S, Mayer H, and van der Ryst E. Subgroup analyses of maraviroc in previously treated R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med.* 2008. **359(14)**: 1442-1455.
5. Gulick RM, Lalezari J, Goodrich J, Clumeck N, DeJesus E, Horban A, Nadler J, Clotet B, Karlsson A, Wohlfeiler M, Montana JB, McHale M, Sullivan J, Ridgway C, Felstead S, Dunne MW, van der Ryst E, and Mayer H. Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med.* 2008. **359(14)**: 1429-1441.
6. Heera J, Saag M, Ive P, Whitcomb J, Lewis M, McFadyen L, Goodrich J, Mayer H, van der Ryst E, and Westby M. *Virological Correlates Associated with Treatment Failure at Week 48 in the Phase 3 Study of Maraviroc in Treatment-naïve Patients.* in *15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.* 2008. Boston, MA, USA.
7. Skrabal K, Low AJ, Dong W, Sing T, Cheung PK, Mammano F, and Harrigan PR. Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model. *J Clin Microbiol.* 2007. **45(2)**: 279-284.
8. Lengauer T, Sander O, Sierra S, Thielen T, and Kaiser R. Bioinformatic prediction of HIV coreceptor usage. *Nature Biotech.* 2007. **25(12)**: 1407-1410.
9. Klimkait T. The XTrack System: Application and Advantage. *Intervirology.* 2012. **55(2)**: 118-122.
10. Obermeier M, Berg T, Braun P, Däumer M, Eberle J, Ehret R, Kaiser R, Kächerer C, Müller H, Noah C, Thielen A, Walter H, Korn K, Wolf E, and Stürmer M. Genotypic HIV-coreceptor tropism testing with geno2pheno_[coreceptor]: differences in prediction depending on HIV subtype. *Reviews in Antiviral Therapy & Infectious Diseases.* 2012. **2**: 82-83.
11. Stellbrink HJ, Pulik P, Szlavik J, Murphy D, Lazzarin A, Portilla J, Rinehart A, Le Fevre E, Fang A, Valluri S, Mukwaya G, and Heera J. *Maraviroc (MVC) dosed once daily with darunavir/ritonavir (DRV/r) in a 2 drug-regimen compared to emtricitabine/tenofovir (TDF/FTC) with DRV/r; 48-week results from MODERN (Study A4001095).* in *20th International AIDS Conference.* 2014. Melbourne, Australia.
12. McGovern R, Dong W, Zhong X, Knapp D, Thielen A, Chapman D, Lewis M, James I, Valdez H, and Harrigan PR. *Population-based Sequencing of the V3-loop Is Comparable to the Enhanced Sensitivity Trofile Assay in Predicting Virologic Response to Maraviroc of Treatment-naïve Patients in the MERIT Trial.* in *17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.* 2010. San Francisco, CA, USA.
13. Obermeier M, Carganico A, Bieniek B, Schleeauf D, Dupke S, Fischer K, Freiwald M, Neifer S, Schuler C, Mayr C, Klausen G, Köppe S, Wünsche T, Berg T, and Baumgarten A. Tropism testing from proviral DNA - analysis of a subgroup from the Berlin Maraviroc cohort. *Reviews in Antiviral.* 2010. **1**: 23.

14. Portsmouth S, Valluri s, Daeumer M, Thiele B, Valdez H, Lewis M, Craig C, Thielen a, James I, Demarest, and Heera J. *Population and ultra-deep sequencing for tropism determination are correlated with Trofile ES: genotypic re-analysis of the A4001078 maraviroc study.* in *10th International Congress on Drug Therapy in HIV Infection.* 2010. Glasgow, UK: Journal of the International AIDS Society 13: Suppl. 4, P128.
15. Recordon-Pinson P, Soulie C, Flandre P, Descamps D, Lazrek M, Charpentier C, Montes B, Trabaud MA, Cottalorda J, Schneider V, Morand-Joubert L, Tamalet C, Desbois D, Mace M, Ferre V, Vabret A, Ruffault A, Pallier C, Raymond S, Izopet J, Reynes J, Marcelin AG, and Masquelier B. Evaluation of the genotypic prediction of HIV-1 coreceptor use versus a phenotypic assay and correlation with the virological response to maraviroc: the ANRS GenoTropism study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010. **54(8)**: 3335-3340.
16. Svicher V, D'Arrigo R, Alteri C, Andreoni M, Angarano G, Antinori A, Antonelli G, Bagnarelli P, Baldanti F, Bertoli A, Borderi M, Boeri E, Bonn I, Bruzzone B, Callegaro AP, Cammarota R, Canducci F, Ceccherini-Silberstein F, Clementi M, Monforte AD, De Luca A, Di Biagio A, Di Gianbenedetto S, Di Perri G, Di Pietro M, Fabeni L, Fadda G, Galli M, Gennari W, Ghisetti V, Giacometti A, Gori A, Leoncini F, Maggiolo F, Maserati R, Mazzotta F, Micheli V, Meini G, Monno L, Mussini C, Nozza S, Paolucci S, Parisi S, Pecorari M, Pizzi D, Quirino T, Re MC, Rizzardini G, Santangelo R, Soria A, Stazi F, Sterrantino G, Turriziani O, Viscoli C, Vullo V, Lazzarin A, and Perno CF. Performance of genotypic tropism testing in clinical practice using the enhanced sensitivity version of Trofile as reference assay: results from the OSCAR Study Group. *New Microbiol.* 2010. **33(3)**: 195-206.
17. Sierra S, Dybowski JN, Pironti A, Güney L, Thielen A, Reuter S, Esser S, Fätkenheuer G, Lengauer T, Heider D, Hoffmann D, Pfister H, Jansen B, and Kaiser R. Optimisation of baseline genotypic testing for safe and efficient maraviroc administration. *J Int AIDS Soc.* 2012. **15(Suppl. 4)**: 101.
18. Vandekerckhove LP, Wensing AM, Kaiser R, Brun-Vezinet F, Clotet B, De Luca A, Dressler S, Garcia F, Geretti AM, Klimkait T, Korn K, Masquelier B, Perno CF, Schapiro JM, Soriano V, Sonnerborg A, Vandamme AM, Verhofstede C, Walter H, Zazzi M, and Boucher CA. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. *Lancet Infect Dis.* 2011. **11(5)**: 394-407.
19. Verhofstede C, Vandekerckhove L, Eygen VV, Demecheleer E, Vandenbroucke I, Winters B, Plum J, Vogelaers D, and Stuyver L. CXCR4-using HIV type 1 variants are more commonly found in peripheral blood mononuclear cell DNA than in plasma RNA. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009. **50(2)**: 126-136.
20. Obermeier M. Tropismustest bei nicht nachweisbarer Viruslast. *HIV]more.* 2008. **3**: 16-17.
21. Daeumer M, Kaiser R, Klein R, Lengauer T, Thiele B, and Thielen A. Genotypic tropism testing by massively parallel sequencing: qualitative and quantitative analysis. *BMC Med Inform Decis Mak.* 2011. **11**: 30.
22. Swenson LC, Mo T, Dong WW, Zhong X, Woods CK, Jensen MA, Thielen A, Chapman D, Lewis M, James I, Heera J, Valdez H, and Harrigan PR. Deep sequencing to infer HIV-1 co-receptor usage: application to three clinical trials of maraviroc in treatment-experienced patients. *J Infect Dis.* 2011. **203(2)**: 237-245.
23. Swenson LC, Mo T, Dong WW, Zhong X, Woods CK, Thielen A, Jensen MA, Knapp DJ, Chapman D, Portsmouth S, Lewis M, James I, Heera J, Valdez H, and Harrigan PR. Deep V3 sequencing for HIV type 1 tropism in treatment-naive patients: a reanalysis of the MERIT trial of maraviroc. *Clin Infect Dis.* 2011. **53(7)**: 732-742.