

Documento de consenso de GESIDA sobre la utilización de los estudios de resistencias en la práctica clínica

J. M. Gatell^a, J. L. Blanco^a, J. Alcamí^b, A. Antela^c, J. Arrizabalaga^d, J. L. Casado^e, B. Clotet^e, R. Delgado^f, A. Erice^g, L. Guerra^h, A. Guerreroⁱ, J. A. Iribarren^d, M. Leal^f, J. C. López^k, L. Menéndez-Arias^l, J. M. Miró^a, S. Moreno^c, J. L. Pérez^m, T. Pumarola^a, R. Rubio^f, L. Ruiz^e, J. M. Santamaríaⁿ, V. Sorianoⁿ, A. Telenti^o y P. Vicianáⁱ

^aHospital Clínic. Barcelona. ^bCentro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid.

^cHospital Ramón y Cajal. Madrid. ^dHospital Nuestra Señora de Aránzazu. San Sebastián.

^eHospital Germans Trias i Pujol. Badalona. ^fHospital 12 de Octubre. Madrid. ^gUniversity of Minnesota. Minneapolis. Minnesota. EE. UU. ^hPlan Nacional del SIDA. ⁱHospital Juan Canalejo. La Coruña.

^jHospital Virgen del Rocío. Sevilla. ^kHospital Gregorio Marañón. Madrid. ^lCentro de Biología

Molecular Severo Ochoa. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Universidad Autónoma de Madrid. ^mHospital de Bellvitge. Barcelona. ⁿHospital de Basurto. Bilbao.

^oHospital Carlos III. Madrid. ^oHospital Universitario de Vaud. Lausana. Suiza*.

Introducción

El empleo actual de terapias potentes frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (terapia antirretroviral de gran actividad [TARGA]) ha permitido obtener un excelente control virológico en un importante porcentaje de pacientes. Ello se asocia a una mejoría inmunológica y a una importante reducción de la morbilidad y mortalidad¹.

Si bien los primeros trabajos realizados con inhibidores de la proteasa (IP) en monoterapia^{2,5} sugerían que la selección de resistencia farmacológica era la única vía responsable del fracaso virológico, en la actualidad es bien conocido^{4,5} que son numerosos los factores que pueden contribuir al fracaso de la terapia antirretroviral: mala adherencia, potencia insuficiente, interacciones farmacológicas y problemas farmacocinéticos entre otros.

El VIH ha desarrollado distintos mecanismos para escapar tanto de la presión del sistema inmunológico como de la presión farmacológica. La escasa fidelidad de la transcriptasa inversa (TI) en su labor de replicación del ARN viral, unida a la elevada población de viriones existentes (en torno a 10^{12}) y a la extraordinaria cinética de replicación del VIH (con una vida media plasmática inferior a 6 horas)⁶, favorecen la aparición espontánea de múltiples variantes genómicas denominadas *cuasiespecies*⁷. Así, cuando se ejerce una presión selectiva sobre las distintas *cuasiespecies* de una persona infectada, las poblaciones menores preexistentes resistentes a esta presión serán seleccionadas, adquiriendo una ventaja replicativa que las convertirá, con el tiempo, en la población viral predominante.

La resistencia farmacológica constituye, por tanto, no el único, pero sí un factor de gran importancia para explicar el fracaso virológico de un determinado tratamiento antirretroviral. En la actualidad disponemos de varios tipos de estudios que nos permiten determinar la resistencia de la población viral mayoritaria a uno o más fármacos. Estos estudios, de reciente aparición nos pueden proporcionar una importante ayuda, pero persisten to-

*El borrador de este documento fue preparado por los doctores José M. Gatell y José Luis Blanco. En la elaboración final del documento han participado el resto de los autores que figuran por orden alfabético.

davía problemas técnicos, de coste y de interpretación de los mismos.

El Grupo de Estudio de SIDA (GESIDA) de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) en una reunión de expertos celebrada en marzo de este año y en un simposio monográfico celebrado en mayo durante el Congreso de la SEIMC, ha examinado numerosos estudios relacionados con el tema y ha valorado las recomendaciones existentes de diversos organismos y agencias, elaborando unas recomendaciones propias que se exponen a continuación. Al hablar de pruebas de resistencias, y mientras no se especifique lo contrario, nos referimos exclusivamente a las pruebas genotípicas, esto es, a la secuenciación de los genes de la TI y de la proteasa (PRT).

En las tablas 1 y 2 se presenta una comparación de las recomendaciones de diferentes organismos para la realización de estudios de resistencias genotípicas en distintas situaciones.

Indicaciones potenciales

Pacientes sin tratamiento antirretroviral previo

Actualmente se ha descrito la transmisión de mutantes del VIH resistentes a todos los fármacos empleados en el tratamiento antirretroviral^{8,9}. La prevalencia de resistencias primarias –aquéllas detectadas en pacientes que nunca han recibido tratamiento antirretroviral– oscila según los estudios entre un 1% y un 26%, explicándose la amplitud del intervalo por las diferencias metodológicas entre los estudios: análisis de diferentes grupos farmacológicos, distintas regiones geográficas y diferentes tipos de estudios de re-

TABLA 1. Comparación de recomendaciones en pacientes sin tratamiento antirretroviral previo

	Naives			
	<6 meses	>6 meses	PEP	Embarazadas
GESIDA	R	C*	C*	R
SPNS	R	NC	C*	R
IAS	C	C	NC	R

R: recomendado; C: considerar; NC: no comentado; C*: según contexto. SPNS: Secretaría Plan Nacional sobre el Sida; GESIDA: Grupo de Estudio de Sida de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; PEP: profilaxis postexposición; IAS: *International AIDS Society USA*.

TABLA 2. Comparación de recomendaciones en pacientes pretratados

	Pretratados			
	1 ^{er} . fracasos	2. ^º -5 ^{er} . fracasos	> 5 fracasos	Embarazadas
GESIDA	R	R	C*	R
SPNS	C	R	NC	R
IAS	R	R	R(ç)	R

R: recomendado; C: considerar; NC: no comentado; C*: según contexto. SPNS: Secretaría Plan Nacional sobre el Sida; GESIDA: Grupo de Estudio de Sida de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; IAS: *International AIDS Society USA*.

sistencia, así como diversos puntos de corte como definitorios de resistencia⁹⁻¹¹. Sin embargo, es lógico pensar que la actual generalización de la terapia antirretroviral conllevará un incremento en la transmisión de virus resistentes y, por tanto, un incremento en la prevalencia de las resistencias primarias¹².

También es motivo de debate en el momento actual el punto de corte a partir del cual la prevalencia de resistencias primarias detectada en una región concreta justificaría la determinación rutinaria de estudios de resistencias en los pacientes que fuesen a iniciar tratamiento antirretroviral. En las últimas directrices de consenso del Panel de la *International AIDS Society-USA* publicadas recientemente en la revista JAMA¹⁵ se propuso la determinación de resistencias previa al inicio del tratamiento antirretroviral en regiones cuya prevalencia de resistencias primarias estuviese entre un 5% y un 10%.

Finalmente, otro aspecto a decidir en este grupo de pacientes sería la posibilidad de valorar la indicación de la determinación de resistencias en función de la fecha probable en que tuvo lugar la infección por el VIH. No sería lo mismo valorar la determinación de resistencias en pacientes en los que la infección se produjo recientemente que en aquéllos en los que tuvo lugar antes de la aparición de los IP, de los inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (ITINN) o en los que no se conoce la antigüedad de la infección por el VIH.

Infección primaria e infección reciente

Se considera infección primaria el período comprendido entre el momento de la infección y la seroconversión completa, e infección reciente, los tres primeros meses tras el contagio^{8,14}. Los argumentos que apoyan el inicio

del tratamiento en esta fase de la infección son exclusivamente biológicos, no estando basados en estudios clínicos, y entre ellos podemos citar: a) la disminución del número de células infectadas; b) el facilitar la restauración casi completa del sistema inmunológico¹⁵, y c) la disminución de la carga viral con la potencial mejora del pronóstico de la enfermedad¹⁴. En la actualidad el inicio de tratamiento en este momento de la infección es un tema controvertido. En aquellos casos en que se decida iniciar terapia antirretroviral es recomendable que se haga a través de estudios controlados que permitan responder a cuestiones aún por resolver como el posible beneficio clínico a largo plazo¹⁴.

Un problema a la hora de valorar los estudios de prevalencia de resistencias primarias en pacientes con primoinfección o infección reciente es que en algunos de estos estudios se incluyen pacientes con una infección de hasta un año de evolución, sin distinguir los pacientes que cumplen los criterios de infección primaria, según hemos definido anteriormente.

El estudio más amplio recogido en la literatura que valora, de forma exclusiva, pacientes que se encuentran en los 3 primeros meses de la infección por el VIH ha sido realizado en Suiza por el grupo del doctor Perrin. En él, en 82 pacientes reclutados entre 1996 y 1998 la incidencia de resistencias genotípicas observada fue del 10% para los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN), del 1% para los ITINN y del 4% para los IP. Este estudio asoció la existencia de resistencias genotípicas o fenotípicas basales a una pobre respuesta virológica, con lo que concluyen que es necesario implementar estos estudios en este grupo de pacientes⁸.

El grupo del doctor Markowitz determinó una prevalencia de mutaciones primarias del 16,3% frente a ITIAN, del 7,5% frente a ITINN, del 2,5% frente a IP y del 3,8% frente a múltiples fármacos (MDR) en un estudio realizado en 80 pacientes con infección primaria, principalmente en el área de Nueva York. La concordancia entre el estudio genotípico y fenotípico fue del 85%, encontrándose las discordancias (salvo en un paciente con resistencia fenotípica al 3TC y sin la mutación M184V, que posteriormente fue detectada en dilución límite de PCR) en los pacientes con un patrón fenotípico de resistencia intermedia¹¹.

El grupo del doctor Richman incluyó 141 pacientes en un estudio de prevalencia de

resistencias primarias, de los que sólo 62 fueron reclutados dentro de la fase de infección primaria. Los resultados finales no fueron estratificados por grupos según el tiempo de infección. La tasa de resistencias fenotípicas (considerando como tal una disminución de la sensibilidad al fármaco >10 veces) fue del 2% para los ITIAN, del 1% para los ITINN y del 1% también para los IP¹⁰. En dos pacientes se confirmó la utilidad del estudio de resistencias a la hora de diseñar el tratamiento antirretroviral.

El grupo de la doctora Miller presentó en San Diego en junio del pasado año datos de la prevalencia de resistencias primarias en 46 pacientes con infección aguda incluidos en el estudio QUEST. El 8% presentaron mutaciones primarias frente a los ITIAN, el 4,3% frente a los ITINN y ninguno frente a los IP, con un 43% de mutaciones secundarias¹⁶. Tamalet et al presentaron, también en San Diego, datos de prevalencia de mutaciones primarias y secundarias en 53 pacientes con infección primaria por el VIH en Francia. La prevalencia de resistencia a AZT fue del 10%, 2% al 3TC, 0% a ITINN y un 4% a IP, con un 75% de mutaciones secundarias. No se encontraron diferencias en la respuesta al tratamiento entre los pacientes que presentaron mutaciones primarias y los que no las presentaron, por lo que sugirieron que la existencia de resistencia genotípica en pacientes con infección primaria no predecía necesariamente un fallo terapéutico¹⁷.

En nuestro país se han realizado recientemente dos estudios que valoran la prevalencia de resistencias primarias en pacientes con primoinfección por el VIH. Briones et al publicarán próximamente datos de prevalencia de resistencias primarias en 30 pacientes (70% homosexuales) de Madrid seleccionados entre 1997 y 1999 con infección documentada de menos de 6 meses de duración; en el 26,7% detectaron mutaciones primarias que confieren resistencia a algún antirretroviral; el 23,3% tenían mutaciones de resistencia a algún ITIAN (85% a AZT, 15% a 3TC), el 6,7% a IP y un 3,3% presentaban un patrón de resistencias a varios fármacos. No detectaron mutaciones de resistencias a ITINN. En el estudio fenotípico, un 23% de los pacientes presentaron algún nivel de resistencia¹⁸. En datos que han sido presentados en Durban en la XIII Conferencia Mundial del SIDA, Miró et al han estudiado la prevalencia de mutaciones primarias en 25 pacientes con infección primaria (< 3 meses)

(60% homosexuales) del área de Barcelona. Detectaron mutaciones primarias en cuatro de los pacientes (16%); uno presentó la mutación K70R para el AZT (4%), dos presentaron mutaciones (V106A y V108I) para ITINN (8%) y finalmente otro (4%) presentó una mutación en posición 82 que confiere resistencia a IDV y RTV¹⁹.

En las recomendaciones de la *International AIDS-Society USA*¹⁵, publicadas recientemente en la revista *JAMA*, la indicación de la determinación de resistencias en este grupo de pacientes se plantea como una opción a considerar.

En la Reunión de Consenso de Resistencias de GESIDA hubo unanimidad en considerar esta situación como una indicación para la determinación de resistencias genotípicas previas al inicio del tratamiento, si se considera indicado iniciarlo. Se consideró la posibilidad de ampliar el período a pacientes que fueran a iniciar tratamiento dentro de los 6 primeros meses la infección. Se consideró importante insistir en que la determinación de resistencias en estos casos no debe en ningún momento retrasar el inicio del tratamiento, pudiéndose realizar los cambios oportunos una vez recibidos los resultados y en función de la respuesta terapéutica. Asimismo se consideró que en los casos en los que no se pueda disponer de dicho estudio sería aconsejable antes del inicio del tratamiento guardar una muestra de plasma para posibles estudios futuros.

La determinación de resistencias en pacientes con infección primaria ha sido también recomendada por la Secretaría del Plan Nacional sobre el SIDA (SPNS), según consta en su informe «Las resistencias a los fármacos antirretrovirales: utilización de los estudios en la práctica clínica» de marzo del 2000 (<http://www.msc.es/sida/asistencia/home.html>).

Por último, en otra reunión de un grupo de expertos celebrada en Madrid en marzo del 2000 también se recomendó la realización de pruebas de resistencias en pacientes con infección reciente por VIH antes de iniciar terapia HAART²⁰.

Infección crónica (superior a 6 meses)

Tras considerarse la posibilidad de estratificar las indicaciones de la determinación de resistencias en pacientes sin tratamiento antirretroviral previo, en función del tiempo de evolución de la infección (6-12 meses; > 12 meses), finalmente se decidió no hacer dife-

rencias en lo referente a la indicación del estudio de resistencias para guiar la pauta de tratamiento inicial, una vez pasados los 6 primeros meses de la infección.

La población viral predominante es similar a la del caso fuente durante las primeras semanas tras la infección, presentando el mismo patrón de resistencias que éste. En las semanas posteriores, al no existir una presión farmacológica que seleccione y mantenga la cepa mutante transmitida, la cepa salvaje (*wild-type*), al tener una mayor capacidad replicativa o *fitness*, pasará gradualmente a constituir la población predominante²¹⁻²⁵, «diluyéndose» el patrón de mutaciones que existiese inicialmente. La «pérdida» de mutaciones que se produce con el tiempo, cuando no hay presión farmacológica, varía en función de los fármacos. Recientemente, un estudio ha demostrado la desaparición de la mayoría de las mutaciones en un plazo de 13 semanas²⁵. En un estudio llevado a cabo en Francia en pacientes sin tratamiento antirretroviral previo, Descamps et al concluyeron que la mayoría de los pacientes que acumulaban mutaciones genotípicas habían sido infectados hacía menos de un año²⁴, lo que podría plantear la posibilidad de ampliar al primer año de infección, en lugar de los 6 primeros meses, el margen de tiempo considerado para indicar la realización del estudio de resistencia en pacientes sin tratamiento antirretroviral previo.

El estudio ERASE-2, realizado en 1998 en nuestro país, valoró la prevalencia de mutaciones primarias en 52 pacientes sin tratamiento antirretroviral previo; el 17% presentaron mutaciones primarias para ITIAN y el 6% a IP. No se valoraron mutaciones para ITINN. Las principales mutaciones seleccionadas para los ITIAN fueron la mutación K70R aislada en un 66%, la M184V en un 44%, la T215Y en un 35% y la M41L en un 11%. La mutación detectada con mayor frecuencia del gen de la proteasa fue la 82 en un 16%²⁵.

En un estudio presentado en San Diego²⁶ se valoró la prevalencia de resistencias genotípicas y fenotípicas en 250 pacientes sin tratamiento antirretroviral previo reclutados en nueve centros de EE.UU. En el estudio genotípico se aislaron mutaciones primarias para ITIAN en un 2% y secundarias en un 5%. Para los ITINN la prevalencia de mutaciones primarias fue de un 6% y secundarias de un 42,2%; finalmente para los IP se detectaron mutaciones prima-

rias en un 2% y secundarias en un 38,2%. En el estudio fenotípico, la prevalencia de resistencias de alto nivel fue de un 1,6% para ITIAN e IP y de un 7,3% para los ITINN, mientras que la prevalencia de resistencias de nivel intermedio fue de un 4% para ITIAN, de un 21,9% para ITINN y de un 3,1% para IP. En el mismo congreso fue presentado el año pasado un estudio británico de prevalencia de resistencias genotípicas realizado en 54 pacientes sin tratamiento antirretroviral previo²⁷. No se detectaron mutaciones primarias para ITIAN ni para IP, mientras que en un 37% se detectaron mutaciones secundarias.

Las opciones que se plantearon en la reunión de consenso fueron:

1. La determinación de resistencias a todos los pacientes.
2. La determinación de resistencias sólo a aquellos que se infectaron después de 1996, ya que en los estudios de prevalencia previos a esta fecha las tasas eran muy bajas para los ITIAN y nulas para los IP y ITINN.
3. No realizar estudios de resistencias a ningún paciente con más de 6 meses de infección.

En nuestro medio, en el momento actual, la prevalencia de mutaciones con impacto clínico que confieran resistencia a los ITIAN es de aproximadamente un 8% y para los IP de un 6%²⁵. Según las directrices de consenso del panel de la *International AIDS Society-USA* publicadas recientemente se recomienda la realización de estos estudios en regiones donde la prevalencia de resistencias estuviese por encima del 5%-10%. Por ello no creemos que deba considerarse en el momento actual como una indicación rutinaria la realización de estudios de resistencias en este grupo de pacientes. Sin embargo, estamos convencidos de la importancia de la realización de estudios de vigilancia epidemiológica que nos proporcionen una más detallada información de la situación actual sobre la prevalencia de resistencias primarias en nuestra población de pacientes seropositivos. Un aumento significativo en la prevalencia de éstas podría obligar a recomendar la determinación de resistencias previas al tratamiento en todos los pacientes, independientemente de la duración de la infección por VIH.

GESIDA, al igual que la *International AIDS Society USA*¹⁵, cree que la determinación de

resistencias en estos pacientes se debe considerar, pero no recomendar, en todos los casos. Si no se realiza debería guardarse una muestra de plasma para poder determinarla de forma retrospectiva en caso de fracaso terapéutico.

Mujer embarazada

En las últimas «Directrices para el empleo de fármacos antirretrovirales en adultos y adolescentes VIH+» elaboradas por el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos y publicadas en enero del presente año se considera que «en general las recomendaciones sobre la realización de estudios de resistencias durante el embarazo son idénticas a las de las personas no embarazadas; es decir, las indicaciones adecuadas para la realización de estos estudios son una infección aguda por VIH, un fracaso virológico a un régimen antirretroviral o una supresión subóptima de la carga viral tras el inicio del tratamiento antirretroviral²⁸».

Un factor más a favor de la importancia del control virológico –carga viral (CV) indetectable– en este grupo de pacientes es la profilaxis de la transmisión vertical. Son numerosos los estudios que han demostrado que la existencia de una CV indetectable en la madre constituye uno de los principales factores predictivos de ausencia de transmisión vertical²⁹. Por este motivo se consideró oportuno recomendar la práctica rutinaria de los estudios de resistencias en mujeres embarazadas sin tratamiento antirretroviral previo, independientemente de la fecha de la infección. Hay que destacar que ésta es también una indicación aceptada por la SPNS.

Profilaxis postexposición

Esta indicación es también objeto de debate. Puede no tener mucho sentido realizar una prueba que puede tardar entre 2 y 3 semanas a la hora de diseñar un tratamiento urgente. Su eficacia radica en la rapidez de su instauración y en el mecanismo de acción de los fármacos empleados más que en tener un estudio de resistencias del caso fuente.

En la 7th *Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections* Cheingsong et al³⁰ presentaron un estudio de prevalencia de resistencias genotípicas en 42 casos fuentes de accidentes laborales. La prevalencia de resistencias para ITIAN fue de un 14% (88% para AZT y/o 3TC), 5% para ITINN (muta-

ción 105N), 5% para IP y 21% resistencias a múltiples fármacos (RMF), con una concordancia genotipo/fenotipo del 85% (6 de 7).

Consideramos que en este supuesto hay que insistir en la enorme importancia de la rapidez de instauración del tratamiento y en el empleo de fármacos que no requieran metabolización intracelular. También habría que considerar el historial farmacológico del caso fuente, de forma que si existe un buen control virológico (CV indetectable) el tratamiento será el mismo que el del caso fuente, y si no es así se realizará un estudio de resistencia al caso fuente modificando la pauta inicialmente instaurada en función de su resultado. Ésta es también una indicación aceptada por la SPNS.

Niños

La realización de estudios de resistencias en niños nacidos de madres seropositivas y con PCR positiva para el VIH constituye otra indicación aceptada. El estudio se realizará independientemente de la carga viral de la madre (incluso aunque ésta sea indetectable).

En casos de diagnóstico tardío se consideró igualmente la indicación de estudios de resistencia en el niño. En un estudio de prevalencia de resistencias primarias en niños presentado por Ruiz en Lago Maggiore en 1998 (ERASIN) la prevalencia de resistencias primarias detectada fue <5%-10%⁵¹.

Pacientes pretratados

Buena respuesta virológica (carga viral indetectable)

El concepto «clásico» de la imposibilidad de desarrollar mutaciones que confieran resistencia al tratamiento en pacientes que han conseguido un buen control virológico y que se recoge en 2 estudios publicados en *Science* en 1997^{52,53} ha sido recientemente rebatido en estudios que demuestran la aparición de mutaciones nuevas a pesar de un aparente buen control virológico. Así, Martínez-Picado et al presentaron en San Francisco (CROI-2000) los resultados de un estudio en el que en cuatro de cinco pacientes con CV <50 copias/ml que sufrieron rebrotes transitorios de la CV (*blips*), se identificaron nuevas mutaciones no existentes previamente⁵⁴.

Se desconoce el significado clínico de las nuevas mutaciones que aparecen en esta situación y su posible traducción en un fracaso del tratamiento a medio o largo plazo. Además existe una gran complejidad técnica en la determinación de mutaciones en pacientes con

cargas virales tan bajas. Por todo ello, en el momento actual esta situación no constituye una indicación de determinación de resistencias.

Primer fracaso terapéutico

Los pacientes con un primer fracaso virológico constituyen una de las potenciales indicaciones del empleo de los estudios de resistencias para diseñar la terapia antirretroviral de rescate. Son numerosos los trabajos que han valorado la utilidad de estos estudios en pacientes que han fracasado al tratamiento; sin embargo, hay que destacar que en la mayoría de los estudios publicados no se especifica el número de tratamientos previos, mezclándose pacientes con uno o más fracasos terapéuticos en el mismo estudio.

De entre los estudios retrospectivos destacaremos el realizado por Deeks et al que valoró 18 pacientes que fracasaron a una pauta con indinavir (IDV). La existencia de sensibilidad fenotípica a dos o más fármacos en el tratamiento de rescate se asoció a una mejor respuesta virológica que cuando era sensible a uno o ningún fármaco⁵⁵. Harrigan et al observaron, también de forma retrospectiva, en 84 pacientes pretratados con ITIAN que una pauta de rescate con fármacos sensibles aumentaba 12 veces la posibilidad de respuesta al tratamiento frente a una pauta con fármacos resistentes⁵⁶.

Son escasos los estudios prospectivos que valoran la utilidad de los estudios de resistencias en terapias de rescate. El estudio VIRADAPT realizado en 108 pacientes, que comparó el empleo de un estudio de resistencia genotípica (65 pacientes) frente al SOC (*standard of care*) (43 pacientes) en el diseño de la terapia de rescate, demostró la mayor efectividad del primero con un descenso medio de la CV a las 24 semanas de 1,15 logs frente a sólo 0,67 logs en la rama de SOC; y de un porcentaje de pacientes con CV <200 copias/ml del 32% en la rama de genotipo frente a un 14% en la rama de SOC⁵⁷. Sólo en el 46,2% de los pacientes incluidos en la rama de genotipado y el 32,1% de los de la rama clínica se trataba del primer régimen terapéutico, no valorándose la respuesta final en función de este parámetro. En el otro estudio publicado con un diseño similar al anterior, el estudio GART⁵⁸, los resultados obtenidos fueron similares, siendo el porcentaje de pacientes con CV <200 copias/ml del 29% en la rama de genotipo frente

a un 17% en la rama clínica. Por último hay que destacar los resultados preliminares del primer estudio que comparó el empleo del estudio de resistencia fenotípica frente al SOC en el diseño del tratamiento de rescate en pacientes que fracasaron a su primer régimen de tratamiento con IP (VIRA 3001). A las 16 semanas el 62% de los pacientes de la rama fenotípica alcanzaron una CV < 400 copias/ml frente a sólo el 33% en la rama clínica⁵⁹.

Recientemente se han presentado los resultados del estudio Havanna, el cual se diseñó en parte para determinar si el consejo de expertos mejora la interpretación clínica de los datos genotípicos. Se trata de un estudio prospectivo que incluyó a 315 pacientes previamente en tratamiento antirretroviral estable al menos durante 6 meses y que presentaban un fracaso virológico (CV > 1.000 copias/ml). A los pacientes se les aleatorizó a cambiar de tratamiento de acuerdo a 4 estrategias: a) no genotipo, sin consejo de expertos; b) no genotipo, con consejo de expertos; c) sí genotipo, sin consejo de expertos, y d) sí genotipo, con consejo de expertos. La ventaja del genotipo sobre el no genotipo se observó mediante intención de tratamiento a los 3 y 6 meses. El papel del consejo de expertos siguió el mismo patrón. Al cabo de 3 y 6 meses el grupo de pacientes con consejo de expertos (con o sin genotipo) tuvo mejor evolución virológica que el grupo que no recibió dicho consejo (independientemente de si tuvieron o no genotipo). Asimismo en el grupo con fracaso virológico al tercer tratamiento el genotipo con consejo de expertos fue superior al genotipo aislado. Este estudio confirma los hallazgos de trabajos previos como el VIRA-DAPT y coincide con el estudio GART, en el cual a pesar de un menor seguimiento de los pacientes también se demostraba que tanto el genotipo como el consejo de expertos contribuían a las diferencias observadas⁴⁰.

Dos estudios recientemente publicados que pretendían valorar la efectividad de las pautas de inducción-mantenimiento en la terapia antirretroviral (estudios ACTG 343 y TRILÈGE)⁴⁴¹ han demostrado de forma indirecta que el fracaso virológico es secundario en muchas ocasiones a problemas de adherencia o farmacocinéticos y no a la aparición de resistencias. De esta manera la realización de estudios de resistencia de forma precoz tras detectar el fracaso al tratamiento permitiría diseñar nuevas terapias rescatando fármacos utilizados previamente, así como detectar y corregir problemas

tanto de adherencia como de interacciones farmacocinéticas o de absorción existentes. Por todo ello creemos oportuno considerar esta situación como una indicación para la realización de un estudio de resistencias genotípicas, aunque consideramos fundamental prestar especial atención a otras razones evidentes de fracaso (mala adherencia, interacciones farmacológicas, niveles de los fármacos antirretrovirales subterapéuticos) y, en caso de ser detectadas, corregirlas.

En las recomendaciones de la *International AIDS-Society USA* Panel del 2000¹³ se recomienda la determinación de resistencias en estos pacientes y la SPNS acepta que se considere esta posibilidad.

Más de un fracaso terapéutico

Los estudios realizados hasta la fecha no especifican los resultados en función del número de fracasos terapéuticos previos.

Patrick et al valoraron la utilidad de conocer las mutaciones seleccionadas en 28 pacientes, de los que un 80% habían fracasado a dos pautas de un IP, y concluyeron que existía una relación significativa entre el número de mutaciones y la respuesta virológica⁴². Zolopa et al valoraron los factores predictivos de respuesta en 54 pacientes que habían fracasado a tratamientos con IP y estaban en rescate con una pauta con SQV-RTV. El principal predictor de una buena respuesta fue la existencia de mutaciones previas al tratamiento de rescate, concluyendo que la utilización de los estudios de resistencias mejorarían el poder predictivo de buena respuesta en un 70%⁴³. De los estudios prospectivos realizados volvemos a destacar el VIRADAPT³⁷ y el GART⁵⁸, comentados anteriormente, y que incluyen pacientes con más de un fracaso.

Girard et al presentaron recientemente en Sitges durante la 4th *International Workshop on HIV Drug Resistance and Treatment Strategies* los resultados preliminares del estudio NARVAL que compara de forma prospectiva la eficacia de un tratamiento de rescate según sea diseñado por valoración clínica (SOC), estudio genotípico o fenotípico. El estudio incluye 541 pacientes que acababan de fracasar a un tratamiento que contenía IP (media de fármacos utilizados previamente 7) y que presentaban una media de linfocitos CD4 de 280 y de CV de 4,3 logs. En la semana duodécima el porcentaje de pacientes con CV < 200 copias/ml fue del 34% en la rama de decisión

clínica, del 41% en la rama en la que el cambio se realizó en base a los resultados del estudio de resistencias genotípicas y del 53% en el grupo en el que el cambio se hizo según el estudio fenotípico. Se observó un descenso en la CV superior a 1 log en el 51%, 59% y 55%, respectivamente. Los resultados sobre 427 pacientes valorados en la semana vigésimo cuarta fueron parecidos, con un porcentaje de pacientes con CV < 200 copias/ml del 27%, 36% y 26% en las ramas clínica, genotípica y fenotípica, respectivamente⁴⁴.

La cuestión que se puede plantear en el grupo de pacientes que ha fracasado a más de una pauta de tratamiento es a partir de qué número de fracasos puede no tener sentido realizar nuevos estudios genotípicos mientras no pueda disponerse de nuevos medicamentos. La conclusión final es que no tendría sentido realizar nuevos estudios de resistencia siempre y cuando se hubiese realizado al menos uno o dos estudios previos en pacientes que ya hubiesen fracasado a 2-5 regímenes de TARGA y no quedasen fármacos utilizables, según las mutaciones que apareciesen en el estudio genotípico realizado. Por ejemplo, si un paciente inició tratamiento antirretroviral con tres ITIAN, tras un primer fracaso se rescató con dos ITIAN y un ITINN, y tras un nuevo fracaso se pasa a una tercera pauta con dos ITIAN y un IP, no se debería descartar la realización de un estudio de resistencias por el hecho de haber realizado ya tres pautas de TARGA. Estaría indicada la realización de un estudio de resistencias genotípico para diseñar un nuevo tratamiento de rescate al poder existir fármacos eficaces, especialmente ITINN e IP. Ahora bien, si el paciente ha recibido más de tres pautas de TARGA y los estudios de resistencias realizados (al menos uno) no demuestran la existencia de otros medicamentos potencialmente eficaces, no tendría sentido continuar realizando nuevos estudios de resistencias genotípicas. Por tanto, hubo consenso en que estaría indicado, en la situación de dos o más fracasos, al menos un estudio de resistencias, y más de uno en caso de que potencialmente todavía puedan existir medicamentos alternativos sin resistencias cruzadas.

En las recomendaciones correspondientes al año 2000 de la *International AIDS-Society USA Panel*¹⁵ se recomienda la determinación de resistencias en estos pacientes sin especificar el número de fracasos previos. Esta indicación está también aceptada por la SPNS.

No tendría sentido realizar más de uno o dos estudios de resistencias genotípicos si no han variado las circunstancias.

Mujeres embarazadas

A pesar de que en las últimas «Directrices para el empleo de fármacos antirretrovirales en adultos y adolescentes VIH+» elaboradas por el Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos²⁸ se considera que las indicaciones de la realización de los estudios de resistencias en la mujer embarazada no deben diferir de los de la mujer no embarazada, consideramos que independientemente del número de tratamientos previos realizados por la mujer, en el caso del embarazo deberían buscarse todas las herramientas disponibles para conseguir el mejor control virológico y que, por tanto, la determinación de resistencias puede contribuir a este propósito, por lo que debe ser recomendada, opinión que es compartida por la SPNS.

Metodología

En el momento actual disponemos de distintos métodos para la determinación de resistencias a los fármacos antirretrovirales: los genotípicos y los fenotípicos.

Métodos genotípicos

Determinan la existencia de mutaciones en el genoma viral (genes de la TI y de la proteasa) que han demostrado asociarse con resistencia fenotípica. Los cambios fenotípicos, asociados a determinadas mutaciones pueden consultarse en la revista *International Medical Press* 2000⁴⁵ y en distintas bases de datos a las que podemos acceder a través de Internet⁴⁶⁻⁴⁸.

Todas las técnicas genotípicas utilizan la reacción en cadena de polimerasa, aunque hay tres formas de identificar la población mutante:

1. La hibridación del producto amplificado con sondas específicas que identifican mutaciones en posiciones específicas (LiPA[®]), lo que permite una mayor rapidez en la técnica y una mayor sensibilidad para detectar poblaciones menores⁴⁹, aunque tiene el inconveniente de que no se pueden determinar todas las mutaciones.

2. La secuenciación mediante la utilización de chips de hibridación múltiple (por ejemplo, Affimetrix®), no disponibles en nuestro país.
3. La secuenciación automática (mediante sistemas de secuenciadores como los de Perkin-Elmer o Visible Genetics), que son los más empleados y permiten secuenciar la totalidad o la práctica totalidad de la TI y proteasa, tanto a partir del ARN plasmático como del ADN proviral.

El principal problema que plantean estos estudios es la dificultad en la interpretación de los resultados debido al gran número de posibles combinaciones de mutaciones, a la aparición y dificultad en la interpretación de nuevas mutaciones y a las posibles interacciones entre las mismas (resistencias cruzadas, fenómenos de resensibilización fenotípica o fenómenos de hipersensibilización). En el momento actual se están empleando en distintos estudios programas de ordenador que ayudan a interpretar los resultados (por ejemplo, Retrogram®); sin embargo, aún no existe una validación de los mismos. Por este motivo en la reunión de consenso se insistió en la necesidad de la interpretación de los resultados por un especialista, así como la importancia de una comunicación fluida entre el clínico y el virólogo para el máximo aprovechamiento de los resultados.

Otros inconvenientes de los métodos genotípicos son:

1. La imposibilidad de valorar mutaciones en subpoblaciones virales poco prevalentes (se requerirían múltiples diluciones de la muestra inicial, lo que plantea importantes problemas técnicos y encarecería tremendamente la técnica).
2. La ausencia de mutaciones para un fármaco determinado no garantiza su efectividad.
3. Se precisa una CV superior a 1.000 copias/ml para asegurar la correcta amplificación y posterior secuenciación del genoma.
4. La necesidad de que el paciente esté en tratamiento en el momento de la realización de la prueba ya que de no ser así algunas mutaciones pueden revertir rápidamente²⁵. Del mismo modo, salvo problemas importantes de toxicidad, no se debe retirar el tratamiento mientras

se espera el resultado del estudio de resistencias.

Un aspecto que despertó una gran preocupación en la reunión de consenso fue la necesidad de la validación de la técnica de secuenciación (por ejemplo, a través del panel ENVA-2/3). En un estudio presentado por Schuurman et al en el ICAAC del pasado año se valoró la técnica de secuenciación mediante el panel ENVA-2 en 33 laboratorios. En las cepas 100% salvajes la concordancia fue para la TI del 100% y para la proteasa (PRT) del 94%. Para las cepas 100% mutantes del 66% para la TI y del 71% para la proteasa y en la cepa mezcla 1:1 (cinco mutaciones RT/5 mut PRT) de sólo un 37% para la TI y del 49% para la proteasa, lo que subraya la incorrecta realización de la técnica en bastantes casos.

El envío de la muestra, si es sangre total, se puede hacer a temperatura ambiente; si la muestra se recibe en el laboratorio de referencia en un plazo de unas 6-8 horas. El plasma extraído debe ser posteriormente conservado a -70°C . Si el envío que se hace es de plasma debe ser convenientemente realizado, como mínimo, a -20°C . El tiempo requerido para la realización de la técnica y la obtención de los resultados del laboratorio no debería ser más 2-3 semanas. Finalmente consideramos importante insistir en la necesidad de confirmar la existencia de un fracaso virológico antes de realizar un estudio de resistencias.

Métodos fenotípicos

Estos estudios determinan el grado de sensibilidad a un fármaco en un cultivo celular, en términos de concentración del fármaco necesaria para inhibir el 50%, 90% ó 95% del crecimiento viral, o bien en términos de incremento de concentración requerida para inhibir la cepa problema respecto a una cepa salvaje de referencia sin dar valores absolutos.

Fenotipo real

Valora de forma objetiva el grado de resistencia del fármaco frente al virus. Este análisis puede hacerse a partir del aislamiento de virus del paciente en un cocultivo con linfocitos de donante o bien en una línea linfocítica de laboratorio. Recientemente se ha desarrollado una técnica que utiliza virus recombinantes, obtenidos tras integrar fragmentos de la TI o PRT en un genoma viral defectivo de esas regiones del gen pol⁵⁰, lo que va a permitir evitar la variabilidad de los resulta-

dos obtenidos en función de la línea celular utilizada⁵¹. En la actualidad hay disponibles dos pruebas comerciales que utilizan virus recombinantes en la determinación del fenotipo real, Virco[®] y ViroLogic[®].

Los estudios fenotípicos tienen la ventaja de valorar con mayor fidelidad la sensibilidad del virus frente a cada fármaco, y según ese grado de sensibilidad se podría valorar en un futuro la posibilidad de sobrepasar la resistencia aumentando los niveles plasmáticos del fármaco. Entre los inconvenientes destacan una falta ocasional de correlación entre el nivel de sensibilidad reflejado por el estudio y la eficacia real del fármaco en la clínica y principalmente la complejidad y laboriosidad de la técnica.

Por todo ello, los estudios de resistencias fenotípicas en el contexto clínico rutinario deben considerarse por el momento como poco viables.

Fenotipo virtual

Se compara la secuencia obtenida del paciente con las de una base de datos muy amplia en la que se conocen los fenotipos reales para la mayoría de las alteraciones genotípicas individuales o colectivas. El año pasado en San Diego Larder et al de Virco[®] presentaron una base de datos realizada con un total de 7.000 muestras⁵².

Recientemente han sido presentados durante la 4th *International Workshop on HIV Drug Resistance and Treatment Strategies* celebrada en Sitges, los resultados de la obtención de un fenotipo virtual a partir de la interpretación, mediante un sistema de análisis de datos (DAP; «*data analysis plan*»), de las mutaciones seleccionadas en el estudio genotípico, utilizando para ello una base de datos basada en 27.000 genotipos y 40.000 fenotipos. Los resultados obtenidos⁵³ demuestran un alto grado de concordancia entre el fenotipo virtual obtenido a partir de la interpretación del genotipo por un sistema de análisis de datos DAP y el fenotipo real.

Bibliografía

1. Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV outpatients study investigator. *N Engl J Med* 1998;338:855-60.
2. Condra JH, Schleif WA, Blahy OM, Gabryelski LJ, Graham DJ, Quintero JC, et al. *In vivo* emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature* 1995; 374:569-71.
3. Molla A, Korneyeva M, Gao Q, Vasavanonda S, Schipper PJ, Mo HM, et al. Ordered accumulations of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nat Med* 1996;2:760-6.
4. Descamps D, Flandre P, Calvez V, Peytavin G, Meiffredy V, Collin G, et al. Mechanism of virologic failure in previously untreated HIV-infected patients from a trial of induction-maintenance therapy. *JAMA* 2000;295:205-11.
5. Havlir DV, Hellmann NS, Petropoulos CJ, Whitcomb JM, Collier AC, Hirsch MS, et al. Drug susceptibility in HIV infection after viral rebound in patients receiving indinavir-containing regimens. *JAMA* 2000;295:229-54.
6. Hellerstein MK, McCune JM. T cell turnover in HIV disease. *Immunity* 1997;7:585-9.
7. Eigen M. Viral quasispecies. *Sci Am* 1995;269:42-9.
8. Yerly S, Kaiser L, Race E, Bru JP, Clavel F, Perrin L. Transmission of antiretroviral-drug resistant HIV-1 variants. *Lancet* 1999;354:729-35.
9. Salomon H, Wainberg M, Brenner B, Quan Y, Rouleau D, Cote P, et al. Prevalence of HIV-1 resistant to antiretroviral drugs in 81 individuals newly infected by sexual contact or injection drug use. *AIDS* 2000;14:F17-F25.
10. Little SJ, Daar ES, D'Aquila RT, Keiser PH, Connick E, Whitcomb JM, et al. Reduced antiretroviral drug susceptibility among patients with primary HIV infection. *JAMA* 1999; 282:1.142-1.149.
11. Boden D, Hurlley A, Zhang L, Cao Y, Guo Y, Jones E, et al. HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *JAMA* 1999;282:1.135-41.
12. Cohen OJ, Fauci AS. Transmission of multidrug-resistant human immunodeficiency virus—the wake-up call. *N Engl J Med* 1998;359:541-5.
13. Hirsch MS, Brun-Vezinet F, D'Aquila RT, Hammer SM, Johnson VA, Kuritzkes DR, et al. Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adult HIV-1 Infection: Recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* 2000; 285:2417-26.
14. Carpenter CC, Cooper DA, Fischl MA, Gatell JM, Gazzard BG, Hammer SM, et al. Antiretroviral therapy in adults. Update recommendations of the international AIDS Society-USA Panel. *JAMA* 2000;285:581-90.
15. Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Saz PE, Kalams SA, Walker BD. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell response associated with control of viremia. *Science* 1997;278:1447-50.
16. Miller V, Perrin L, Modai J. Prevalence of baseline drug resistance mutations in primary HIV infection patients from the QUEST study (Abs. 141) 3^{er} International Workshop on Drug Resistance. San Diego 1999.
17. Tamalet C, Izopet J, Gastaut JA. Prevalence of drug-resistant mutants and virological response to combination therapy in patients with primary HIV-1 infection. (Abs. 146) 3^{er} International Workshop on Drug Resistance. San Diego 1999.
18. Briones C, Pérez-Olmeda M, Rodríguez C, Romero J, Hertogs K, Soriano V. Primary genotypic and phenotypic HIV-1 drug resistance in recent seroconverters in Madrid. *J AIDS* 2000 (en prensa).
19. Miró JM, Pumarola T, García F, Arnedo M, Vidal C, Lozano L, et al. Prevalence of transmission of HIV-1 drug-resistant mutations in patients with primary HIV-1 infection in Barcelona, Spain (Abstract). XIII Int AIDS Conf, Durban, Julio 2000.
20. Soriano V, Ledesma E, and the Spanish Drug resistance Panel, et al. Second spanish consensus on the use of drug resistance testing in clinical practice. *AIDS Rev* 2000;2: 111-8.
21. Koffin JM. HIV populations dynamics *in vivo*: implications for genetic variations, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995;267:485-9.

22. Back NK, Nijhuis M, Keulen W, Boucher CA, Oude Essink BO, van Kuilenburg AB, et al. Reduced replications of 5TC-resistant HIV-1 variants in primary cells due to a processivity defect of the reverse transcriptase enzyme. *EMBO J* 1996;15:4.040-9.
23. Devereux HL, Youle M, Johnson MA, Loveday C. Rapid decline in detectability of HIV-1 drug resistance mutations after stopping therapy. *AIDS* 1999;13:F125-7.
24. Descamps D, Costagliola D, Glaude G, Buffet-Janvresse C, Calvez V, Collin G. Prevalence of resistance mutations in antiretroviral-naïve patients: french national study. (Abs 125). 5^{er} International Workshop on Drug Resistance. San Diego; 1999.
25. Puig T, Pérez-Olmeda M, Rubio A, Ruiz L, Briones C, Franco JM, et al. Prevalence of genotypic resistance to nucleoside analogues and protease inhibitors in Spain The ERASE-2 Study Group. *AIDS* 2000;14(6):727-52.
26. Verbiest W, Schel P, Conant M, van der Broeck R, Bloor S, Alcorn T, et al. An epidemiological prospective survey assessing the prevalence of HIV-1 drug resistance in 250 HIV-1 positive antiretroviral-naïve patients from the USA. (Abs. 122) 5^{er} International Workshop on Drug Resistance. San Diego; 1999.
27. Loveday C, Devereux H, Hukett L, Gunolanch T, Johnson M. High prevalence of genotypic changes in antiretroviral drug-naïve patients in de UK. (Abs. 144) 5^{er} International Workshop on Drug Resistance. San Diego; 1999.
28. Panel on clinical practices for the treatment of HIV infections. Guidelines for the use of antiretroviral therapy in HIV-infected adults and adolescents. DHHS January 2000.
29. Mofenson LM, Lambert JS, Stiehm ER, Bethel J, Meyer WA 5rd, Whitehouse J, et al. Risk factors for perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in women treated with zidovudine. *Pediatrics AIDS Clinicals Trials Group Study 185 Team. N Engl J Med* 1999;341:385-95.
30. Cheingsong R, Beltrami E, Respass R, Cardo D, and the Occupational HIV exposure Study Group. Prevalence of drug-resistant HIV-1 in patients who are the source of occupational exposures to health care workers. 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. (Abs. 496) San Francisco 2000.
31. Ruiz L, Fortuny C, Ferrer, et al. Resistance to nucleoside analogues in pediatric patients in Spain. 2th International Workshop on HIV Drug Resistance and Treatment Strategies. (Abs. 119) Lake Maggiore, Italy 24-27, June 1998.
32. Wong JK, Hezareh M, Gunthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, Richman DD. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 1997; 278: 1.291-5.
33. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, et al. Identification of reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997;278:1.295-500.
34. Martínez-Picado J, DePascuale MP, Kartsonis NA, Hanna G, Wong J, Finzi D, et al. Selection of antiretroviral resistance in the latent reservoir of human immunodeficiency virus type 1 doing successful therapy. 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. (Abs. 258). San Francisco; 2000.
35. Deeks SG, Parkin N, Petropoulos C, et al. Correlation of baseline phenotypic drug susceptibility with 16 week virologic response in a pilote combination therapy study in HIV-infected patients who failed indinavir therapy (Abs. 53). *Antiviral Therapy* 1998;5(Suppl):56.
36. Harrigan P, Montaner JM, Hogg R, et al. Baseline resistance profile predicts response to rtinavir/saquinavir therapy in a community setting (Abs. 55). *Antiviral Therapy* 1998; 5(Suppl):58.
37. Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, Delguidice P, Porsin S, Simonet P, et al. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. *The Lancet* 1999;345:2.195-200.
38. Baxter J, Mayers D, Wentworth D, Neaton JD, Merigan TC, et al. Final results of CPCRA 046: a pilot study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing (GART) in patients failing antiretroviral therapy (Abs. 61). 5^{er} International Workshop on Drug Resistance. San Diego; 1999.
39. Cohen C, Hunt S, Sension C, Farthing C, Conart M, Jacobson S, et al. Phenotypic resistance testing significantly improves response to therapy: a randomized trial (VIRA 5001), (Abs. 257). 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. (Abs. 496). San Francisco; 2000.
40. Tural C, Ruiz L, Holtzer C. The potential role of resistance decision support software with or without expert advice in a trial of HIV genotyping versus standard of care-the Havana Trial. Program and abstracts of the 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemo-therapy. Toronto, Ontario, Canada, September 17-20, 2000. Abstract L-10.
41. Havlir DV, Marschner IC, Hirsch MS, Collier AC, Tebas, P, Bassett RL, et al. Maintenance antiretroviral therapies in HIV-infected subjects with undetectable plasma HIV-RNA after triple-drug therapy. *N Engl J Med* 1998;359:1.261-8.
42. Patrick A, Zhang M, Hertogs K, et al. Correlation of virological response with genotype and phenotype of plasma HIV-1 variants in patients treated with nelfinavir in the US expanded access program (Abs 57). *Antiviral Therapy* 1998;5(Suppl):59.
43. Zolopa AR, Shafer RW, Warford A, Montoya JG, Hsu P, Katzenstein D, et al. HIV-1 genotypic resistance patterns predict response to saquinavir-ritonavir therapy in patients in whom previous protease inhibitor therapy had failed. *Ann Intern Med* 1999;131:815-22.
44. Meynard JL, Vray M, Morand-Joubert, Natheron G, Peytavin G, Clavel F, et al. Impact of treatment guided by phenotypic or genotypic resistance studies on the response to antiretroviral therapy: a randomized trial (NARVAL, ANRS 088). (Abs. 85). *Antiviral therapy* 2000;5(suppl 5):67.
45. Schinazi RF, Larder BA, Mellors TJ. Mutations in retroviral genes associated with drug resistance: 2000-2001 update. International Medical Press 2000;65-91.
46. <http://hiv-web.lanl.gov>
47. <http://viral-resistance.com>
48. <http://hivresistance.com>
49. Van Leatham et al. 5th European Conference on Experimental AIDS Research 1998.
50. Hertogs K, de Bethune MP, Miller V, Ivens T, Schel P, Van Cauwenberge A, et al. A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and RT in recombinant HIV-1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 269-76.
51. Rodríguez-Rosado R, Briones C, Soriano V. Introduction of HIV drug-resistance testing in clinical practice. *AIDS* 1999; 15: 1007-14.
52. Larder B, De Vroey V, Dehertogh P, Kemp S, de urdey V, Hertogs K. et al. Predicting HIV-1 phenotypic resistance from genotype using a large phenotype-genotype relational database. (Abs. 59). 5^{er} International Workshop on Drug Resistance. San Diego; 1999.
53. Larder BA, Kemp SD, Hertogs K. Quantitative prediction of HIV-1 phenotypic drug resistance from genotypes: the virtual phenotype (Virtual Phenotype). (Abs. 65). *Antiviral Therapy* 2000;5(Suppl. 5):49.