

Presente y futuro del laboratorio de microbiología en el control de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana

Santiago Moreno y Fernando Dronda

Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. España.

Hasta muy recientemente, la función del laboratorio de microbiología se había limitado en relación con la infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) al diagnóstico serológico, si no se considera el papel capital en el diagnóstico de las infecciones oportunistas que complican la evolución de la enfermedad. El seguimiento de la evolución y la monitorización de la respuesta al tratamiento antirretroviral se realizaba mediante el recuento de los linfocitos CD4+, en el laboratorio de inmunología. En los últimos años se incorporaría al laboratorio de microbiología otras técnicas importantes en el cuidado clínico de los pacientes: la medición de la carga viral del VIH en plasma, que se establecería como el principal parámetro para monitorizar la respuesta al tratamiento y tomar decisiones respecto a su inicio y modificaciones, la detección de resistencia a fármacos antirretrovirales, cuya implantación todavía no es completa en nuestros laboratorios, y la medición de niveles plasmáticos de fármacos, cuyo papel está por decidirse. En el futuro inmediato, se esperan herramientas que, por un lado, supongan mejorar las ya existentes (mayor sensibilidad para la detección de carga viral, mayor facilidad y capacidad de interpretación de los estudios genotípicos de resistencias, acceso universal a los estudios fenotípicos) y, por otro, nuevas herramientas que permitan un cuidado más personalizado de los pacientes (monitorización de algunos efectos tóxicos, farmacogenómica e inmunogenómica).

Palabras clave: VIH. Resistencias. Fenotipo. Genotipo. Carga viral. Capacidad replicativa.

The present and future of the microbiology laboratory in the control of human immunodeficiency virus (HIV) infection

Until recently, the role of the Microbiology Laboratory with regard to HIV infection was limited to the serological diagnosis, if the contribution to the management of opportunistic infections that complicate the evolution of the

disease is excluded. The follow-up of the outcome and monitoring of the response to antiretroviral therapy has been done through CD4 + lymphocyte counts at the Immunology laboratory. In recent years, other important techniques for the clinical care of HIV-infected patients have been incorporated to the laboratory of Microbiology: measurement of plasma HIV RNA levels, which has become the main parameter to monitor the response to therapy and for the taking of decisions regarding the beginning and changes of treatment; resistance testing to antiretroviral drugs, not yet fully implemented in our laboratories; and therapeutic drug monitoring, with a role still to be defined. For the near future, new tools will come that, firstly, will improve the existing ones (greater sensitivity to detect HIV RNA in plasma, greater ease of interpretation of the results of genotypic resistance testing, wide access to phenotypic studies) and, secondly, new tools that will allow a more individualized care of the patients (monitoring of some toxic side effects, pharmacogenomics, immunogenomics).

Key words: HIV. Resistance. Phenotype. Genotype. Viral load. Viral fitness.

Introducción

Desde el inicio de la epidemia del síndrome de la inmunodeficiencia humana (SIDA), el laboratorio de microbiología ha desempeñado un papel decisivo en el control de la enfermedad. Antes de que se descubriera el agente causal, el SIDA se definía por el desarrollo de, fundamentalmente, infecciones oportunistas en pacientes con una inmunodeficiencia celular de causa no aparente. El laboratorio de microbiología fue crucial entonces en el diagnóstico de las infecciones, frecuentes o raras, que definían el síndrome, lo que permitió elaborar la lista de enfermedades que definían la enfermedad. El conocimiento de los agentes causales y su respuesta a diferentes tratamientos y profilaxis, sobre los que se fue adquiriendo experiencia progresiva, supusieron las primeras herramientas para mejorar el pronóstico de los pacientes infectados.

El descubrimiento del agente causal conllevó un nuevo papel para el laboratorio de microbiología. Éste ha sido el encargado del diagnóstico de la infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), mediante pruebas serológicas, tanto con fines eminentemente asistenciales

Correspondencia: Dr. S. Moreno.
Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Ramón y Cajal.
Ctra. Colmenar Viejo, km 9,100. 28034 Madrid. España.
Correo electrónico: smoreno.hrc@salud.madrid.org

como en el cribado de la infección en donantes de sangre. Durante años, hasta mediados de la década de 1990, ésta ha sido la única función que el laboratorio de microbiología ha tenido en relación con el control de la enfermedad. La monitorización de parámetros de evolución o de respuesta a los escasos fármacos antirretrovirales existentes se realizaba a través del recuento de linfocitos CD4+, en los laboratorios de inmunología.

Desde bien avanzada la década pasada hasta el momento actual, el laboratorio de microbiología ha incorporado a su rutina nuevas técnicas que contribuyen de modo importante en el cuidado de los pacientes infectados por VIH. Y parece que la demanda existente y los progresos que se están realizando permitirán la introducción de nuevas técnicas que repercutirán de modo positivo en seguir mejorando las perspectivas de cantidad y calidad de vida de nuestros pacientes. A unas y otras técnicas está dedicada esta revisión.

Medición de la viremia plasmática

La viremia plasmática sigue siendo el parámetro de elección para monitorizar la respuesta al tratamiento antirretroviral. Si bien en el momento presente el recuento de linfocitos CD4 ha desplazado a la carga viral como criterio para decidir el inicio de la terapia, la eficacia del tratamiento se sigue midiendo por su efecto sobre la viremia. De hecho, la definición de fracaso virológico sigue siendo estrictamente virológica (presentar carga viral detectable durante la administración de tratamiento antirretroviral)¹.

Actualmente, la medición de la carga viral del VIH en plasma u otros fluidos se basa en una de las tres técnicas disponibles (reacción en cadena de la polimerasa [PCR], b-DNA [*branched-DNA*] o NASBA [*nucleic acid sequence based analysis*]), cada una de las cuales aporta ventajas y tiene inconvenientes. Un punto de inflexión importante en la historia del tratamiento antirretroviral vino marcado por el conocimiento de que el nivel máximo de supresión a que se llegaba con el tratamiento era un marcador importante de la evolución virológica de un paciente y del posible fracaso virológico^{2,3}. Quedó bien establecido que los pacientes que alcanzaban con el tratamiento antirretroviral valores de viremia plasmática inferiores a 20 copias/ml tenían menos fracasos que aquellos que se encontraban entre 20 y 200 copias/ml. Esto obligó a que la sensibilidad de detección de la viremia (nivel de detectabilidad de copias de ARN del VIH) se redujera por debajo de las 200-500 copias/ml que eran capaces de detectar los sistemas comerciales. Las denominadas técnicas de detección ultrasensibles tienen capacidad para medir entre 20 y 80 copias/ml, según el método en que se basen.

Se desconoce en qué medida pueden impactar en el cuidado y la evolución de los pacientes los sistemas de medición de viremia plasmática cuyo nivel de detección se sitúe por debajo de las cifras actuales. Algunos estudios se están realizando en la actualidad con sistemas "caseros" que permiten detección de hasta 5 copias de ARN del VIH/ml. Los resultados se limitan al estricto campo de la investigación y no existe ningún sistema comercializado. Tampoco se han esgrimido razones o evidencias que hagan aconsejable la utilización sistemática de estos métodos. Por el contrario, es muy probable que estos métodos de

cuantificación ultra-ultrasensibles exageren los inconvenientes que ya tienen los métodos ultrasensibles actuales. No debe infravalorarse la amplia variabilidad de los métodos que llega a alcanzar niveles de 35% de variabilidad interensayo y de 40% intraensayo⁴. Además, una mayor sensibilidad podría aumentar el riesgo de contaminación de la PCR y la sensibilidad a la presencia de inhibidores de amplificación plasmáticos.

En un campo distinto de la asistencia clínica, el laboratorio de microbiología debe tener capacidad para detectar concentraciones bajas de viremia (por debajo de los actuales) e incluso la viremia que resulta de la replicación viral residual. Está bien descrito que la replicación del VIH puede persistir en células mononucleares de sangre periférica de sujetos que tienen menos de 50 copias de ARN/ml en plasma. Esta replicación persistente puede asociarse con evolución genética del virus y, posiblemente, con la selección de mutantes resistentes.

Estudios de resistencia

La utilización de los estudios de resistencias para guiar el tratamiento de las enfermedades infecciosas es un hecho bien establecido en infecciones causadas por todos los grupos de microorganismos. No sorprende, por tanto, el interés por los estudios de resistencia en la infección por VIH. Desde que en 1989 se describiera la disminución de sensibilidad a zidovudina (AZT), se han hecho esfuerzos por conocer el significado clínico de las resistencias a antirretrovirales, primero, y por trasladar el conocimiento a la asistencia clínica, después.

Actualmente existen 2 métodos de medición de la resistencia del VIH a fármacos antirretrovirales. Los *métodos genotípicos* detectan mutaciones que se asocian con resistencia a los fármacos. En documentos de consenso^{1,5-7} y en Internet (<http://www.viral-resistance.com>; <http://www.hiv-web.lanl.gov>; <http://www.ias.com>) pueden consultarse las mutaciones conocidas hasta ahora que confieren resistencia a los antirretrovirales. Por su parte, los *métodos fenotípicos* miden el crecimiento del virus en presencia de diferentes concentraciones del fármaco. El denominado fenotipo virtual no es más que un sistema de interpretación del genotipo, basado en la correlación del genotipo y fenotipo de un amplio número de aislados (más de 40.000) introducidos en una base de datos.

Entre los métodos genotípicos, se han desarrollado para la detección de mutaciones la secuenciación y la detección de mutaciones puntuales mediante PCR, la tecnología *chip* o la hibridación con sondas específicas⁸. La hibridación con sondas LiPA es un método muy sencillo, automatizado, y que como principal ventaja presenta la capacidad de detectar con gran sensibilidad subpoblaciones virales⁹. Esta sensibilidad, detectada en ensayos con plásmidos, disminuye al trabajar con muestras clínicas. La tecnología *chip*, también basada en la hibridación con miles de sondas que son integradas en el *chip*, aporta información prácticamente similar a la obtenida con la secuenciación. Aunque su desarrollo se encuentra bastante avanzado, este método aún no se encuentra disponible comercialmente.

Los sistemas comercializados en la actualidad para la determinación de la resistencia del VIH-1 por secuenciación automática son HIV Genotyping System (Applied

TABLA 1. Ventajas e inconvenientes de los estudios genotípicos

Ventajas	Inconvenientes
Disponibilidad	Medida indirecta de sensibilidad
Facilidad de realización, relativa	Precisa carga viral > 1.000 copias/ml
Menor coste temporal y material	Dificultad de predicción en interacción entre diversas mutaciones
Identificación de mutaciones generadoras de resistencia fenotípica	No detección de poblaciones virales minoritarias (< 20%)
Sensibilidad para detección de mutaciones primarias, antes de originar resistencia fenotípica	Mutaciones detectadas pueden no correlacionarse con fenotipo
Permite diseño de terapias con mayores opciones de éxito	Posibilidad de falsos positivos por contaminaciones intralaboratorio
	Precisa interpretación de los resultados por expertos

Biosystems, California; <http://www.appliedbiosystems.com>) y TruGene HIV-1 Genotyping System (Visible Genetics, Canadá; <http://www.visgen.com>)¹⁰. Las principales diferencias entre ambos son las reacciones necesarias en el procesamiento de cada muestra, así como los diferentes pasos de purificación y precipitación¹¹.

La mayoría de los métodos fenotípicos utilizados se realizan en laboratorios comerciales, y actualmente están disponibles Antivirogram® [Virco (Bélgica)], Phenosense® [ViroLogic (EE.UU.)] y Phenoscript® [VIRalliance (Francia)]. Están basados en el ensayo de virus recombinante, por lo que, aunque son muy similares, se diferencian en el método de detección de crecimiento de estas variantes recombinantes, así como en los puntos de corte empleados. Proporcionan una medida directa de la sensibilidad del VIH-1 a los diferentes fármacos. Por ello, se puede evidenciar la influencia de todas las mutaciones en la sensibilidad global del virus. Proporcionan información sobre resistencias cruzadas y la interpretación de los resultados es más sencilla a la hora de elegir el tratamiento de rescate. Otra ventaja adicional es que pueden adaptarse con facilidad al estudio de nuevos fármacos.

A pesar de los enormes avances en los últimos años, los estudios de resistencia se encuentran todavía en una fase de desarrollo limitado. Cada método asocia importantes inconvenientes que determinan que su utilización en la práctica clínica no esté todavía bien definida (tablas 1 y 2). El genotipo tiene como problema más importante las dificultades de interpretación, mientras que el fenotipo está sólo al alcance de unos pocos laboratorios, es muy laborioso y tremendamente caro. En cuanto a su utilidad clínica, los estudios realizados han mostrado que la elección del tratamiento antirretroviral de rescate mediante el genotipo se asocia con mejores resultados que el simple uso de la historia medicamentosa del paciente¹²⁻¹⁴. Sin embargo, no se ha demostrado, de forma definitiva que los estudios fenotípicos sean mejores que el estándar o que los estudios genotípicos en la mayoría de estudios^{15,16}.

Sin duda, los estudios de resistencias es una de las áreas en que queda más por definir. Sería deseable la mejora de las pruebas de resistencia fenotípicas de tal modo que se permitiera su incorporación al laboratorio asistencial, de modo similar a los antibacterianos. En ese sentido, se deben orientar muchos de los esfuerzos que se deben realizar. En ausencia de éstas, se hace urgente la interpretación adecuada de los estudios de resistencia genotípicos. Resulta llamativa la diferencia existente en la interpretación realizada por diferentes "expertos" y, sobre todo, por

TABLA 2. Ventajas e inconvenientes de los estudios fenotípicos

Ventajas	Inconvenientes
Medición directa de la sensibilidad	Disponibilidad restringida
Identificación resistencias cruzadas	Dificultad técnica
Resultados interpretables por el clínico	Tiempo realización: demora resultados
Medición del efecto de las interacciones de mutaciones sobre fenotipo	No detección de bajas concentraciones virales
Utilidad con fármacos en investigación	Correlación clínico-viroológica: "puntos de corte"
	Mayor coste

diferentes sistemas comerciales. La responsabilidad de la interpretación no debe dejarse al clínico, ya que constituye una obligación y un derecho del microbiólogo o virólogo. El trabajo conjunto de microbiólogos y médicos clínicos es capital para lograr este objetivo tan necesitado y reclamado.

Medición de niveles plasmáticos de fármacos

No existe acuerdo unánime acerca de la utilidad de la medición de niveles plasmáticos de fármacos antirretrovirales para mejorar la evolución de los pacientes infectados por VIH que reciben tratamiento antirretroviral¹⁷. La atención se limita por el momento a los inhibidores de proteasa y en los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos. No se plantea, por el contrario, la medición de los valores plasmáticos de análogos de nucleósidos, ya que éstos sufren una fosforilación intracelular y no existe buena correlación entre los niveles plasmáticos y los niveles intracelulares de fármaco activo.

Para medir los niveles plasmáticos de fármacos se utilizan técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Parece haber acuerdo unánime acerca de la amplia variabilidad interpaciente de los valores plasmáticos y la más limitada variación intrapaciente. La monitorización terapéutica de niveles de fármacos puede ser importante en ciertas subpoblaciones (niños, mujeres embarazadas, pacientes con hepatopatía crónica o nefropatía) que presentan una mayor variabilidad y con las que existe menor experiencia farmacocinética con los nuevos fármacos. Los pacientes con niveles subóptimos presentan un mayor riesgo de fracaso virológico¹⁸⁻²². Algunos estudios han mostrado que

el ajuste de las dosis mediante la monitorización de los valores plasmáticos de fármacos podrían contribuir a mejorar la respuesta virológica o a disminuir la toxicidad de éstos²³, aunque otros estudios han llegado a conclusiones diferentes²⁴.

Recientemente, se ha introducido en el tratamiento de la infección por VIH el concepto de cociente inhibitorio (IQ), previamente utilizado en el tratamiento antibacteriano. En él se relacionan datos farmacocinéticos (C_{min}) con datos de resistencia virológica (IC_{50}). Conceptualmente, un mayor cociente inhibitorio se debería asociar con menor tasa de fracaso virológico, tanto en el caso de virus salvajes como resistentes a fármacos antirretrovirales. La relación entre cociente inhibitorio y respuesta se ha mostrado en algunos estudios, aunque los datos son demasiados preliminares para su utilización sistemática en la práctica clínica^{25,26}. El laboratorio de microbiología tiene, por tanto, la posibilidad de proporcionar una información integrada que pudiera constituir una herramienta útil para garantizar la mejor respuesta virológica posible.

Capacidad replicativa del virus (*fitness viral*)

La selección de mutaciones de resistencia bajo presión farmacológica se asocia con una menor capacidad replicativa del virus. De hecho, esta alteración de la capacidad de replicación ha servido para explicar el mantenimiento de una buena respuesta virológica en pacientes con virus resistentes que reciben fármacos presumiblemente no activos^{27,28}. Estos datos clínicos y algunos datos adicionales de laboratorio han servido de base para proponer la medición de la *fitness viral* como uno de los parámetros que se deben considerar para seleccionar o mantener un tratamiento.

Hay varios métodos de laboratorio para medir la capacidad replicativa. Puede realizarse mediante comparación de las actividades catalíticas de enzimas de virus mutantes y sensible, análisis de infectividad, análisis de cinética replicativa, competición *in vitro* entre dos variantes de virus mezcladas en un solo cultivo, así como mediante la observación *in vivo* de los patrones de recrecimiento de virus salvaje tras interrumpir el tratamiento en un paciente²⁹.

En cualquier caso, la medición de la capacidad replicativa es una técnica todavía situada en los ambientes de investigación. Su trascendencia en la práctica clínica no ha sido firmemente establecida y, menos aún, que su medición pueda ayudar en el cuidado de los pacientes. Si bien el concepto parece atractivo, no se encuentra entre los parámetros cuya introducción en el laboratorio asistencial de Microbiología es más urgente.

Otros parámetros para el futuro

Además de su labor diagnóstica, los parámetros mencionados conceden al laboratorio de microbiología un lugar decisivo en el tratamiento de la infección por VIH. Las decisiones de cuándo iniciar y modificar el tratamiento (medición de carga viral), la elección de fármacos para el tratamiento de rescate (estudios de resistencias del virus y de la capacidad replicativa) o el ajuste de dosis (medición de valores plasmáticos) pueden condicionarse por la información proporcionada desde el laboratorio de microbiología.

Los parámetros que deben monitorizarse que se ha comentado están relacionados de un modo u otro con la respuesta viral. Formando parte de la respuesta al tratamiento antirretroviral, tiene extraordinaria importancia la reconstitución inmunológica, principal predictor de la estabilidad clínica. Su evaluación en profundidad será seguramente tenido en cuenta en el futuro. Del mismo modo, el estudio de factores genéticos no sólo del propio huésped sino también del VIH pueden ser importantes para predecir la evolución de los pacientes²⁹. Entre los factores genéticos dependientes del paciente se ha citado la diferente predisposición al desarrollo de efectos tóxicos o el diferente metabolismo de los medicamentos que condicionarían variación en las concentraciones plasmáticas. Por parte del virus, la diferente capacidad infectiva, la velocidad de progresión o el subtipo se han puesto en relación con algunos determinantes genéticos del virus.

Es posible que el laboratorio de microbiología no pueda o no quiera asumir una o más de las nuevas áreas de investigación con proyección clínica que se están abriendo. Entre otras cuestiones de competencia de laboratorios de diferentes disciplinas pueden impedir asumirlas. Si la infección por el VIH sigue constituyendo una enfermedad de importancia sanitaria y social como hasta ahora, tendría más sentido que ofrecer desde un solo laboratorio la atención asistencial integrada que los pacientes necesitan.

Bibliografía

1. Rubio R, editor Recomendaciones de GESIDA/Plan Nacional sobre el SIDA respecto al tratamiento antirretroviral en pacientes adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana en el año 2002. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;24:244-303.
2. Kempf D, Rode R, Xu Y, Sun E, Health-Chiozzi ME, Hsu H, et al. Duration of viral suppression during protease inhibitor therapy for HIV-1 infection is predicted by plasma HIV-1 RNA at the nadir. *AIDS* 1998;12:F9-F14.
3. Raboud JM, Montaner JS, Conway B, Rae S, Reiss P, Vella S, et al. Suppression of plasma viral load below 20 copies/mL is required to achieve a long-term response to therapy. *AIDS* 1998;12:1619-24.
4. Schockmel GA, Yerly S, Perrin L. Detection of low HIV-1 RNA levels in plasma. *J AIDS* 1997;14:179-83.
5. Hirsch MS, Brun-Vézinet F, D'Aquila R, Hammer SM, Johnson VA, Kuritzkes DR, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection. *JAMA* 2000;283:2417-26.
6. The EuroGuidelines Group for HIV Resistance. Clinical and laboratory guidelines for the use of HIV-1 drug resistance testing as part of treatment management: Recommendations for the European setting. *AIDS* 2001;15:309-20.
7. International AIDS Society-USA Resistance Mutations Project Panel. Update on drug resistance mutations in HIV-1. *Topics in HIV Medicine* 2001;9:31-3.
8. Wilson JW, Bean P, Robins T, Graciano F, Persing DH. Comparative evaluation of three Human Immunodeficiency Virus genotyping systems: The HIV-GenotypR method, the HIV PRT genechip assay, and the HIV-1 RT line probe assay. *J Clin Microbiol* 2001;38:3022-8.
9. Van de Velde H, Gorteman K, Maertens G, De Smet K. INNO-LiPA can detect HIV-1 mutants at levels of 4% or less of the total viral population. *Antiviral Ther* 2001;6(Suppl 1):124.
10. Erall M, Page S, Reimer LG, Hillyard DR. Human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing: A comparison of three sequence-based methods. *J Clin Microbiol* 2001;39:2157-65.
11. Lee S-Y, Griswold M, Shaker-Irwin L, Scarsella A, Rogolsky E, Stryker R. Reproducibility, precision, and turn-around-times of results generated by laboratory-developed "home-brew" genotypic HIV-1 drug resistance assays vary dramatically when compared to results generated by a kit-based genotyping assay. 17th Ann Clin Virol Symposium, Florida, Abril 2001.
12. Durant J, Clevenberg P, Halfon P, Delgiudice P, Porsin S, Simonet P, et al. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: The VIRADAPT randomized controlled trial. *Lancet* 1999;353:2195-9.
13. Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Schapiro J, Viciano P, González J, et al. Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: The Havana Trial. *AIDS* 2002;16:209-18.

14. Cingolani A, Antinori A, Rizzo MG, Murri R, Ammassari A, Baldini F, et al. Usefulness of monitoring HIV drug resistance and adherence in individuals failing highly active antiretroviral therapy: A randomized study (ARGENTA). *AIDS* 2002;16:369-79.
15. Pérez-Eliás MJ, Lanier R, Muñoz V, García-Arata I, Casado JL, Martí-Belda P, et al. Phenotypic testing predicts virological response in successive protease inhibitor-based regimens. *AIDS* 2000;14:F95-F101.
16. Cohen C, Hunt S, Sension M, Farthing C, Conant M, Jacobson S, et al. A randomized trial assessing the impact of phenotypic resistance testing on antiretroviral therapy. *AIDS* 2002;16:579-88.
17. Khoo SH, Gibbons SE, Back DJ. Therapeutic drug monitoring as a tool in treating HIV infection. *AIDS* 2001;15(Suppl 5):S171-S81.
18. Burger DM, Hoetelmans RM, Hugen PW, Mulder JW, Meenhorst PL, Koopmans PP, et al. Low plasma concentrations of indinavir are related to virological treatment failure in HIV-1-infected patients on indinavir-containing triple therapy. *Antivir Ther* 1998;3:215-20.
19. Casado JL, Moreno S, Hertogs K, Dronda F, Antela A, Dehertogh P, et al. Plasma drug levels, genotypic resistance, and virological response to a nelfinavir plus saquinavir-containing regimen. *AIDS* 2002;16:47-52.
20. Veldkamp AI, Weverling GJ, Lange JM, Montaner JS, Reiss P, Cooper DA, et al. High exposure to nevirapine in plasma is associated with an improved virological response in HIV-1-infected individuals. *AIDS* 2001;15: 1089-95.
21. Dieleman JP, Gyssens IC, Van der Ende ME, De Marie S, Burger DM. Urological complaints in relation to indinavir plasma concentrations in HIV-infected patients. *AIDS* 1999;13:473-8.
22. Marzolini C, Telenti A, Decosterd LA, Greub G, Biollaz J, Buclin T. Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. *AIDS* 2001;15:71-5.
23. Burger D, Hugen P, Droste J, Huitema A. Therapeutic drug monitoring of nelfinavir and indinavir in treatment-naïve patients improves after 1 year: Results from ATHENA. The 1st IAS Conference on HIV pathogenesis and treatment. Julio 2001. Buenos Aires. Abstract 30.
24. Clevenbergh P, Durant J, Garraffo R, Kirstetter M, Daures JP, Dellamonica P, et al. Usefulness of protease inhibitor therapeutic drug monitoring? Pharma Adapt. A prospective multicentric randomised controlled trial: 12 weeks results. 8th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections. Chicago. Febrero 2001. Abstract 260B.
25. Kempf D, Hsu A, Jiang P, Rode R, Hertogs K, Larder B, et al. Response to ritonavir intensification in indinavir recipients is highly correlated with virtual inhibitory quotient. 8th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections. Chicago. Febrero 2001. Abstract 523.
26. Duval X, Lamotte C, Race E, Descamps D, Damond F, Clavel F, et al. Amprenavir inhibitory quotient and virological response in human immunodeficiency virus-infected patients on an amprenavir-containing salvage regimen without or with ritonavir. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:570-4.
27. Kaufmann DE, Pantaleo G, Sudre P, Telenti A. CD4-cell count in HIV-1 infected individuals remaining viraemic with highly active antiretroviral therapy. *Lancet* 1998;351:723-4.
28. Deeks SG, Wrin T, Liegler T, Hoh R, Hayden M, Barbour JD, et al. Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral drug-therapy in HIV infected patients with detectable viremia. *N Engl J Med* 2001;544:472-80.
29. Telenti A. New developments in laboratory monitoring of HIV-1 infection. *Clin Microbiol Infect* 2002;8.