

Resistencia primaria a terapia antirretroviral en pacientes con infección por VIH/SIDA en Chile

Alejandro Afani S¹, Marisol Ayala C¹, Andrea Meyer K¹, Roy Cabrera C², William Acevedo M^{1a}.

Primary resistance to antiretroviral therapy in patients with HIV/AIDS in Chile

Background: Resistance to antiretroviral therapy is a determining factor for therapeutic failure in HIV/AIDS. The prevalence of primary resistance (i.e. in those patients that have not received treatment) varies in different parts of the world. **Aim:** To study the prevalence of primary resistance to antiretroviral drugs in patients living in Northern Santiago.

Patients and methods: Viral load, lymphocyte subpopulations by flow cytometry and genotypic resistance testing were assessed in blood samples from 60 HIV-1 infected patients (mean age 37 years, 54 male). **Results:** Mean CD4 cell count and viral load was 200 cells/ml and 142,840 RNA copies/ml respectively. Ten mutations were identified: V179D, L101V, M36I, L63P, A71T/V, Y115F, V118I and K20R. None of these mutations is associated to a high degree of resistance to reverse transcriptase inhibitors, nucleoside analogs (NRTI), non nucleoside analogs (NNRTI) or viral protease inhibitors. **Conclusions:** This is a first approach to study antiretroviral resistance in Chilean patients. This study must be amplified, since the prevalence of resistance may experience changes with time (Rev Méd Chile 2005; 133: 295-301).

(Key Words: Acquired immunodeficiency syndrome; Antiretroviral therapy, highly active; HIV infections)

Recibido el 13 de agosto, 2004. Aceptado en versión corregida el 6 de diciembre, 2004. Proyecto financiado por Concurso Apertus. Laboratorio Andrómaco y Hospital Clínico Universidad de Chile.

¹Sección de Inmunología, Departamento de Medicina, Hospital Clínico Universidad de Chile.

²Hospital San José. Area Norte de Santiago, Chile.

^aBioquímico.

Correspondencia a: Alejandro Afani S. Dirección: Santos Dumont 999, 5° Piso, Sector E, Oficina 517. Fax: 7375916. E-mail: aafani@vtr.net

La epidemia de infección por el virus de Inmunodeficiencia humana (VIH/SIDA) ha cobrado gran relevancia mundial, siendo declarada, en junio de 2001, una "emergencia de seguridad mundial", por la Asamblea General de la Organización de las Naciones Unidas (ONU)¹.

La pandemia ha crecido invariablemente desde el primer caso descrito hace ya 20 años, con 25 millones de individuos fallecidos desde 1981¹. Actualmente, más de 40 millones de personas en el mundo están infectadas con el virus. En el año 2003 hubo 5 millones de nuevas infecciones y se estima que 3 millones de personas murieron por causas asociadas a la infección VIH/SIDA, representando la cuarta causa de muerte en el mundo. Se estiman 14.000 nuevos casos al día, de los cuales, 95% ocurre en países en vías de desarrollo¹.

En Chile, el primer caso fue reportado en 1984 y hasta el 31 de diciembre de 2003 se han notificado 6.060 infectados y 6.514 pacientes en etapa SIDA². Se ha informado el fallecimiento de 3.860 personas. La tasa de incidencia acumulada en Chile es de 43,7 casos por 100.000 habitantes².

La terapia antirretroviral altamente activa (TAR) ha cambiado la historia natural de la infección VIH/SIDA, al retardar la evolución de la enfermedad y mejorar la calidad de vida de los individuos infectados³⁻⁵. En Chile se entrega triterapia como único tratamiento desde el año 2002, con una cobertura actual de 100%².

Uno de los principales problemas en la actualidad es el fracaso terapéutico y, dentro de éste, el aumento de resistencia a drogas antirretrovirales^{6,7}. Este problema se origina por la asociación de las características propias del virus (variabilidad genética, latencia y reactivación, adaptación a puertas de entrada, infección de reservorios), junto a una inadecuada supresión viral (adherencia, farmacocinética) y uso de monoterapia y biterapia previos^{6,7}. La menor susceptibilidad del virus a las drogas está asociada a mutaciones en los genes que codifican para las enzimas transcriptasa reversa y proteasa viral. La resistencia viral que aparece bajo la presión de las drogas antirretrovirales en una persona en tratamiento, se ha denominado resistencia secundaria. La resistencia primaria se observa en los pacientes vírgenes a tratamiento como resultado de la transmisión de virus resistente⁶.

La prevención, caracterización y manejo clínico de la resistencia viral determinaron el rápido

desarrollo de nuevas tecnologías para su estudio. Hoy se dispone de dos metodologías diferentes de aproximación a la resistencia del virus a las drogas: los ensayos de resistencia genotípicos y fenotípicos. Los tests genotípicos detectan mutaciones en el genoma viral asociadas a la aparición de resistencia, mientras que los tests fenotípicos miden la concentración de fármaco necesaria para poder inhibir la replicación viral *in vitro*⁸.

El test de genotipificación es un ensayo basado en la amplificación genética mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de las regiones del genoma del virus implicadas en el desarrollo de resistencia (*gen pol*), para luego analizar su secuencia nucleotídica. La resistencia genotípica es el término utilizado para describir la presencia de mutaciones que se traducen en una reducción de la sensibilidad a uno o más fármacos. Esta técnica consta de dos etapas: la amplificación de la región específica por PCR común a los test disponibles y la detección de mutaciones que se realiza por tres técnicas diferentes: secuenciación de ADN, hibridización y *line probe assay*. La secuenciación de ADN es el método de referencia. Se determina la secuencia de nucleótidos de las regiones del genoma amplificado y se comparan con secuencias de referencia del VIH-1 para determinar la presencia de las diferentes mutaciones. El test HIV-1 TrueGene™ (Bayer S.A.) utiliza esta técnica y fue aprobado por la *Food and Drugs Administration* (FDA) de Estados Unidos de Norteamérica (EE.UU), el año 2000, para uso clínico^{7,8}.

Diferentes grupos de expertos europeos y norteamericanos evidencian que la máxima utilidad de los tests de resistencia radica en la elección de una nueva terapia frente a fracaso virológico o respuesta virológica subóptima^{9,10}. La mayoría de las recomendaciones de estos tests concuerdan en indicar su uso frente a fracaso virológico, respuesta virológica subóptima, embarazadas con los mismos criterios anteriores, accidentes laborales y primoinfección^{9,10}. La indicación del test en pacientes crónicos, vírgenes a tratamiento ha generado controversia. Aún no existe consenso entre los grupos; la recomendación depende de la prevalencia local de resistencia primaria. Se ha sugerido su aplicación con prevalencia de resistencia primaria igual o mayor a 5%¹¹ en la población de referencia.

En Chile, se reconoce la importancia del test de resistencia genotípica en elección de terapia en pacientes con falla terapéutica, el que se realiza a contar de fines de 2001. En la guía clínica elaborada por el Ministerio de Salud se recomienda el uso del test de genotipificación en pacientes con fracaso terapéutico o con respuesta virológica subóptima¹².

Para estimar la real utilidad en el paciente virgen a terapia antirretroviral se debe conocer la prevalencia de resistencia en la población chilena, datos actualmente no disponibles. El objetivo de este trabajo es establecer, en forma preliminar, la prevalencia de resistencia primaria en la población de pacientes VIH positivos del área norte de Santiago.

MATERIAL Y MÉTODO

Entre noviembre de 2001 y diciembre de 2002 se reclutaron 60 pacientes con infección VIH/SIDA, controlados en hospitales del área norte de Santiago, para realizar un estudio descriptivo de prevalencia de resistencia a antirretrovirales en pacientes con infección VIH/SIDA previo a TAR.

Se incluyeron pacientes mayores de 18 años, con infección por VIH-1 confirmada en el Centro Nacional de Referencia para el VIH del Instituto de Salud Pública, con indicación de tratamiento según recomendaciones internacionales del *Centers for Disease Control* (CDC) febrero 2001¹³ y que no hubieran recibido antes drogas antirretrovirales. Se excluyeron pacientes con recuentos de linfocitos CD4⁺ inferiores a 50 células/mL, carga viral inferior a 1.000 copias/mL o con alguna condición indicadora de SIDA que se estimó irrecuperable a corto plazo (6 meses). Todos los pacientes ingresados al estudio firmaron previamente un consentimiento informado.

Antes de iniciar TAR se extrajeron 10 ml de sangre venosa en tubo con EDTA y se realizaron los siguientes estudios:

1. Carga Viral (CV). Se determinó por técnica Amplicor 1.5TM (Roche Diagnostics), disponible en el Laboratorio de Medicina Molecular del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.
2. Cuantificación de linfocitos TCD4⁺ por citometría de flujo de dos colores. Se realizó mediante protocolo Simultest, diseñado especialmente

para lectura en citómetro de flujo Becton-Dickinson, disponible en la Sección de Inmunología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

3. Genotipificación. Se realizó mediante el Ensayo Genotípico TRUGENETM HIV-1 (Bayer S.A.), disponible en el Laboratorio de Medicina Molecular del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Este ensayo identifica mutaciones en los genes de las enzimas transcriptasa reversa y proteasa virales, mediante su secuenciación.

Análisis estadístico: se utilizó el programa "Sample", considerando una prevalencia aproximada de resistencia primaria de 4%, exactitud (error tipo 1 o alfa) de 5% e intervalo de confianza de 95%.

RESULTADOS

Características de los pacientes. De un total de 60 pacientes estudiados, la edad promedio fue 37,1 años (23-60 años), 90% (54) sexo masculino. El 68,3% (41) de los pacientes presentaba conducta homosexual o biesexual. Todos los pacientes asistían a control médico en hospitales del área norte de Santiago. Toda la población en estudio presentaba infección VIH/SIDA crónica y no habían recibido drogas antirretrovirales. El 56,7% (34) se encontraba en etapa SIDA de la Clasificación CDC 1993¹. El recuento promedio de CD4 fue de 200,1 células/mL (52-520 células/mL) y la carga viral promedio fue de 142.840 copias RNA/mL (6.100-800.000 copias ARN/mL) (Tabla 1).

Análisis genotípico de resistencia. Se identificaron un total de 10 mutaciones: V179D, L10I/V, M36I, L63P, A71T/V, Y115F, V118I y K20R.

Ninguna de las mutaciones encontradas se asocia a un alto grado de resistencia a inhibidores de la transcriptasa reversa análogos de nucleósidos (ITRN), no análogos de nucleósidos (ITRnN) o inhibidores de la proteasa viral (IP).

Todas las mutaciones encontradas en el gen de la proteasa corresponden a mutaciones secundarias asociadas a los IP. La mutación V179D en el gen de la transcriptasa reversa, identificada en tres pacientes (Tabla 2), se asocia a un bajo nivel de resistencia a los no análogos de nucleósidos. La

mutación Y115F, encontrada en el paciente 32 (Tabla 2), se asocia a bajo nivel de resistencia a abacavir y la presencia de la mutación V118I en el paciente 34 (Tabla 2), puede contribuir a la resistencia a los ITRN.

La mutación más frecuente fue L63P (33 pacientes), seguida por L10I/V (19 pacientes), M36I (17 pacientes) y A71T/V (8 pacientes) (Tabla 3 y Figura 1).

En 9 pacientes (15%) no se encontraron mutaciones y en 51 (85%) se encontró una o más mutaciones (Tabla 4). En 25 de los 60 pacientes (41,7%) se encontró una mutación aislada, en 20 (33,3%) dos mutaciones y en 6 (10%) tres o más mutaciones.

Análisis estadísticos evidencian que los pacientes con mutaciones no presentan mayor riesgo de estar en etapa SIDA, de tener linfocitos CD4 bajo

Tabla 1. Características generales de los pacientes

| Característica | Pacientes (n=60) | |
|------------------------------------|------------------|--------------------------|
| Edad | | |
| Promedio | 37,1 | años |
| Rango | 23-60 | años |
| Género | | |
| Masculino | 54 | (90%) |
| Femenino | 6 | (10%) |
| Conducta de riesgo | | |
| Sexo homo/bisexual | 41 | (68,3%) |
| Sexo heterosexual | 16 | (26,7%) |
| Uso drogas endovenosas | 1 | (1,7%) |
| Otra o desconocida | 3 | (5%) |
| Clasificación CDC | | |
| A1-2 | 9 | (15%) |
| B1-2 | 17 | (28,3%) |
| SIDA | 34 | (56,7%) |
| Carga viral | | |
| Promedio | 142.840 | copias/ml* |
| Mediana | 64.000 | copias/ml |
| Rango | 6.100-800.000 | copias/ml |
| Recuento LT CD4⁺ | | |
| Promedio | 200,05 | células/mm ^{3†} |
| Mediana | 170,50 | células/mm ³ |
| Rango | 52-520 | células/mm ³ |

Tabla 2. Mutaciones en pacientes VIH/SIDA previo a terapia antirretroviral

| Paciente | TR | Mutación Proteasa |
|----------|-------|-------------------|
| 1 | - | L63P |
| 2 | - | L63P |
| 3 | - | L63P |
| 4 | - | M36I, L63P, A71T |
| 5 | - | L10I, L63P |
| 6 | - | L63P, A71V |
| 7 | - | A71T |
| 8 | - | L10I, L63P |
| 9 | V179D | L10I, M36I |
| 10 | - | - |
| 11 | - | L10I, L63P |
| 12 | - | - |
| 13 | - | K20R, M36I |
| 14 | - | M36I, L63P |
| 15 | - | L63P |
| 16 | - | L10V, M36I |
| 17 | - | L63P |
| 18 | - | L63P |
| 19 | - | L63P, A71T |
| 20 | - | M36I, L63P |
| 21 | - | L10V, L63P, A71T |
| 22 | - | - |
| 23 | - | L10V |
| 24 | - | M36I, L63P |
| 25 | - | L10I |
| 26 | - | - |
| 27 | - | M36I |
| 28 | - | - |
| 29 | - | - |
| 30 | - | L63P |
| 31 | - | L10I |
| 32 | Y115F | - |
| 33 | - | L63P, A71V |
| 34 | - | M36I |
| 35 | - | L10I, M36I |
| 36 | - | M36I |
| 37 | - | L63P, A71T |
| 38 | - | L10I, L63P |
| 39 | - | L10V, L63P |
| 40 | - | L10I, L63P |
| 41 | - | L10I, L63P |
| 42 | - | M36I |
| 43 | V179D | L10I, M36I, A71T |
| 44 | V118I | M36I, L63P |
| 45 | - | - |
| 46 | - | - |
| 47 | - | M36I |
| 48 | - | L63P |
| 49 | - | K20R, L63P |
| 50 | - | M36I, L63P |
| 51 | - | L63P |
| 52 | - | L63P |
| 53 | V179D | L10I |
| 54 | - | L10I |
| 55 | - | L63P |
| 56 | - | - |
| 57 | - | L10I, M36I, L63P |
| 58 | - | L63P |
| 59 | - | L10I |
| 60 | - | L63P |

TR: transcriptasa reversa

Tabla 3. Frecuencia de mutaciones detectadas en pacientes VIH/SIDA previo a terapia antirretroviral

| Mutaciones | Pacientes (n=60) |
|----------------------------------|------------------|
| Gen Transcriptasa Reversa | |
| V179D | 3 (5%) |
| Y115F | 1 (1,7%) |
| V118I | 1 (1,7%) |
| Gen Proteasa | |
| L10I/V | 19 (31,7%) |
| M36I | 17 (28,3%) |
| L63P | 33 (55,0%) |
| A71T/V | 8 (13,3%) |
| K20R | 2 (3,3%) |

200 células/mm³ o de presentar CV sobre 100.000 copias/ml, en relación a los que no tuvieron mutaciones (Tabla 4).

DISCUSIÓN

La historia natural de la infección VIH/SIDA ha cambiado radicalmente desde la introducción de la TAR. Este éxito ha tenido, sin embargo, consecuencias: una alta frecuencia de efectos tóxicos asociado a los esquemas de tratamiento y resistencia a las drogas antirretrovirales. Esta última es una de las principales barreras para lograr una supresión mantenida del virus durante la terapia.

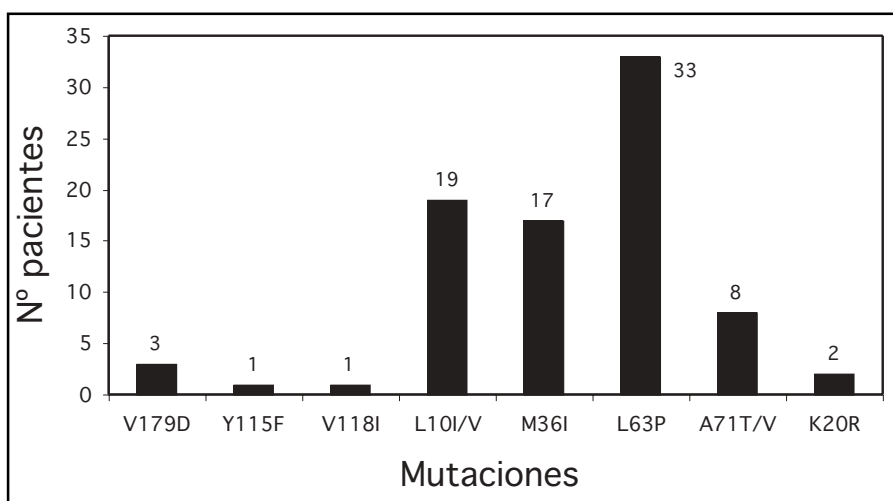


FIGURA 1. Frecuencia de mutaciones detectadas en pacientes VIH/SIDA previo a terapia antirretroviral.

Tabla 4. Comparación entre pacientes con y sin mutaciones

| Característica | Mutaciones | | p |
|----------------------------------|------------|------------|---------------|
| | 0 | ≥1 | |
| Número de pacientes | 9 (15%) | 51 (85%) | |
| Clasificación CDC | | | |
| A1 - 2/B1 - 2 | 6 (66,6%) | 20 (39,2%) | <i>p=0,2</i> |
| SIDA | 3 (33,3%) | 31 (60,8%) | |
| Recuento CD4 | | | |
| CD4 <200 células/mm ³ | 4 (44,4%) | 32 (62,7%) | <i>p=0,5</i> |
| CD4 ≥200 células/mm ³ | 5 (66,6%) | 19 (37,3%) | |
| Carga viral | | | |
| CV <100.000 copias/ml | 7 (88,8%) | 30 (58,8%) | <i>p=0,48</i> |
| CV ≥100.000 copias/ml | 2 (22,2%) | 21 (41,2%) | |

El aumento de la resistencia primaria obedece a la transmisión de virus resistente a drogas antirretrovirales. A pesar de que muchos factores influyen en las diferencias regionales de resistencia primaria, la tasa de transmisión de virus resistente estaría asociada inversamente a la disponibilidad de tratamientos antirretrovirales óptimos y a la adherencia a ellos. La transmisión de estos virus se ha reportado por diferentes grupos de investigadores¹⁴⁻¹⁷. Recientes estudios internacionales, incluso, han detectado la transmisión de virus con resistencia a más de una familia de drogas (multiresistencia a antirretrovirales)¹⁸.

En los pacientes analizados no se encontraron mutaciones primarias en el gen de la proteasa viral ni mutaciones asociadas a un alto nivel de resistencia en el gen de la transcriptasa reversa. Sin embargo, en 85% de ellos se evidenció, a lo menos, una mutación y en 5,8% se detectó una mutación (V179D) asociada a bajo nivel de resistencia a los ITRnN. Dentro de las mutaciones secundarias detectadas, las más frecuentes corresponden a L63P (55,0%), L10I/V (31,7%), M36I (28,3%) y A71T/V (13,3%). Chile no cuenta con datos de prevalencia de resistencia primaria ni de frecuencia de mutaciones secundarias; éste es el primer trabajo que reporta alguna información al respecto.

En otros países latinoamericanos, los estudios también son escasos y con grupos pequeños de pacientes. En Argentina se ha encontrado una prevalencia entre 2,4 y 15,4%, con una frecuencia de mutaciones secundarias de hasta 90%¹⁹. Estudios, en Brasil, han demostrado una prevalencia de hasta 2,2% de resistencia a IP, 2,4% a ITRN y 2,1% a ITRnN²⁰. Las mutaciones secundarias reportadas más frecuentemente en los trabajos mencionados, no difieren a las encontradas por nosotros, siendo L63P la más frecuente¹⁹⁻²¹, presente en aproximadamente 50% de los pacientes.

Es importante considerar que la prevalencia de resistencia primaria varía dependiendo del momento en que se realiza el test de resistencia²². A pesar de que las mutaciones asociadas a resisten-

cia pueden persistir por meses, la ausencia de presión selectiva por las drogas genera la repoblación de cepas salvajes con mayor capacidad replicativa. Cuando esto ocurre, las mutaciones transmitidas no pueden ser detectadas. Sin embargo, se ha demostrado una rápida reaparición de las cepas resistentes frente a la reintroducción de la terapia. Es así como los valores de prevalencia son más elevados al estudiar pacientes con infección aguda o con infección reciente (<12 meses) que al estudiar pacientes crónicos. En nuestro trabajo no contamos con datos confiables del tiempo transcurrido entre el momento de la infección y la realización del test de genotipificación, por lo que se debe considerar que los datos obtenidos pueden estar subvalorados. Además, se cuenta, por ahora, con un grupo muy pequeño de pacientes como para extrapolar los resultados a la población VIH chilena.

Sería de gran interés ampliar el grupo de estudio y complementar la información con datos del tiempo desde el contagio. Además, realizar un seguimiento de los pacientes sería muy interesante, ya que al contar con un estudio de genotipificación previo al inicio de TAR, se podría evaluar los cambios en el perfil de resistencia viral determinados por el uso de drogas antirretrovirales.

El estudio de resistencia tiene utilidad individual para el manejo terapéutico óptimo de cada paciente y además un beneficio colectivo, en términos de salud pública, al incidir directamente en la mejor utilización del tratamiento antirretroviral, disminuyendo probablemente la aparición de resistencias potencialmente transmisibles.

En Europa, la resistencia primaria ha alcanzado cifras sobre 15%, por lo que las recomendaciones actuales incorporan el estudio de genotipificación previo a TAR. En Chile, es probable que frente al aumento de fracaso terapéutico, y transmisión de cepas resistentes, exista con el tiempo una mayor prevalencia de resistencia primaria que determine cambios en las indicaciones actuales.

REFERENCIAS

1. UNAIDS. ONUSIDA. AIDS epidemic update: Julio 2004 <http://www.who.int/hiv>
2. CONASIDA. Caracterización epidemiológica del VIH/SIDA en Chile a diciembre de 2003. <http://www.conasida.cl> ; <http://www.minsal.cl/iniciativas/Conasida/conasida.htm> (Agosto 2004).
3. SCHNEIDER M, BORLEFFS J, STOLK R, JASPERS C, HOEPELMAN A. Discontinuation of prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1 infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *Lancet* 1999; 353: 201-3.
4. MUSSINI C, PEZZOTTI P, GOVORI A, BORGHI V, ANTINORI A, D'ARMINO M ET AL. Discontinuation of primary prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia and toxoplasmic encephalitis in human immunodeficiency virus type-1 infected patients: the changes in opportunistic prophylaxis study. *J Infect Dis* 2000; 181: 1635-42.
5. DE QUIROZ J, MIRO J, PENA J, PODZAMCZER D, ALBERDI JC, MARTINEZ E ET AL. A randomized trial of the discontinuation of primary and secondary prophylaxis against *pneumocystis carinii* pneumonia after highly active antiretroviral therapy in patients with HIV infection. *N Engl J Med* 2001; 344: 159-67.
6. KURITZKES D. Clinical Implications of Antiretroviral Resistance. *Medscape CME Circle*, 2001.
7. HOFFMANN C, KAMPS S. HIV Resistance Testing. *HIV Medicine* 2003. <http://hivmedicine.com>.
8. D'AQUILA R. Incorporating Antiretroviral Resistance Testing Into Clinical Practice. *Medscape CME Circle* 2002-2003.
9. HIRSCH M, CONWAY B, D'AQUILA R, JOHNSON V, BRUNVEZINET F, CLOTET B ET AL. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection. Recommendations of an International AIDS Society - USA Panel. *JAMA* 2000; 283: 2417-26.
10. 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.
11. WEINSTEIN M, GOLDIE S, LOSINA E, COHEN C, BAXTER J, ZHANG H ET AL. Use of genotypic resistance testing to guide HIV therapy: Clinical impact and cost-effectiveness. *Ann Intern Med* 2001; 134: 440-50.
12. Comité Científico Asesor Para Las Personas Que Viven Con VIH/SIDA, Comité De SIDA de la Sociedad Chilena de Infectología. Guía clínica para la atención de las personas adultas que viven con VIH/SIDA. 2001 www.minsal.cl/conasida (Agosto 2004).
13. CDC MMWR, Recommendations and Reports. 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. December, 1992.
14. RONDE A, SCHUURMAN R, GOUDSMIT J, VAN DEN HOEK A, BOUCHER C. First case of new infection with zidovudine-resistant HIV-1 among prospectively studied intravenous drug users and homosexual men in Amsterdam, the Netherlands. *AIDS* 1996; 10: 231-2.
15. RUBIO A, LEAL M, PINEDA J. Increase in the frequency of mutation at codon 215 associated with zidovudine resistance in HIV-1-infected antiviral-naive patients from 1989 to 1996. *AIDS* 1997; 11: 1184-6.
16. BODEN D, HURLEY A, ZHANG L, CAO Y, GUO Y, JONES E ET AL. HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *JAMA* 1999; 282: 1135-41.
17. HECHT F, GRANT R, PETROPOULOS C, DILLON B, CHESNEY M, TIAN H ET AL. Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse-transcriptase and protease inhibitors. *N Engl J Med* 1998; 339: 307-11.
18. LITTLE S. Transmission and prevalence of HIV resistance among treatment-naive subjects. *Antiviral Ther* 2000; 5: 33-40.
19. KIJAK G, PAMPURO S, AVILA M, ZALA C, CAHN P, WAINBERG M ET AL. Resistance profiles to antiretroviral drugs in HIV-1 drug-naive patients in Argentina. *Antiviral Ther* 2001; 6: 71-7.
20. BRINDEIRO R, DÍAZ R, SABINO E, MORGADO M, PIRES I, BRIGIDO DANTAS M ET AL. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 2003; 17: 1063-9.
21. DUMANS A, SOARES M, PIENIAZEK D, KALISH M, DE VROEY V, HERTOQS K ET AL. Prevalence of Protease and Reverse Transcriptase Drug Resistance Mutations over Time in Drug-Naive Human Immunodeficiency Virus Type 1-Positive Individuals in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3075-79.
22. LITTLE S, HOLTE S, ROUNTY J, DAAR E, MARKOWITZ M, COLLIER A ET AL. Antiretroviral-Drug Resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 2002; 347: 385-94.