

Utilidad de las determinaciones de niveles plasmáticos de los fármacos antirretrovirales en el manejo de la infección por virus de la inmunodeficiencia humana

María José Cuevas¹

María del Rosario Pérez³

Juan Ortiz de Urbina²

Luis Ortega²

Marbella del Canto¹

Vicente Martín¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas Universidad de León
²Servicio de Farmacia Hospital de León
³Servicio de Medicina Interna II Hospital de León

Resumen

La disponibilidad de nuevos y más potentes fármacos junto con los avances en el conocimiento de la patogénesis del VIH ha llevado a una cada vez mayor complejidad en el manejo clínico de la terapia antirretroviral. La variabilidad en los regímenes de dosificación, la toxicidad asociada y las potenciales interacciones entre los propios fármacos o entre los fármacos y los alimentos se presentan como dificultades añadidas. Debido a que los clínicos poseen herramientas poco precisas para valorar la adherencia o las interacciones entre fármacos, la monitorización de las concentraciones plasmáticas de estos fármacos se perfila como un factor importante en la mejora del tratamiento de la infección por VIH.

En los últimos años diversos autores han puesto de manifiesto una relación entre las concentraciones de fármacos antirretrovirales y su eficacia o por el contrario, sus efectos adversos. Como resultado de estas investigaciones, el interés por la monitorización terapéutica de estos compuestos ha ido en aumento. Sin duda, existe una importante necesidad de mejorar la eficacia de los agentes antirretrovirales actuales y preservar las opciones de tratamiento. La monitorización de fármacos antirretrovirales puede ayudar a alcanzar este objetivo, aunque es preciso realizar más estudios adicionales.

Palabras clave: VIH. Monitorización terapéutica. Fármacos antirretrovirales

Summary

Antiretroviral therapy for HIV infection has become increasingly complex. The availability of new and potent drugs and progress in understanding the pathogenesis of HIV infection have led to the establishment of new treatment paradigms. The varying dosing regimens, associated toxicities, and the potential for drug-drug and food-drug interactions further complicate treatment. This complexity contributes to patient nonadherence. Because clinicians have no tools to monitor adherence or drug-drug interactions and because response requires that therapy exceed the known inhibiting concentration, plasma monitoring of antiretroviral therapy may play a role in improving treatment of HIV infection.

Over the past years, data have emerged demonstrating a link between antiretroviral drug concentrations and efficacy

or side-effects. As a result, the issue of therapeutic drug monitoring for these compounds are arisen: many published studies provided evidence that plasma concentrations contributes to therapeutic response. Without doubt, there is a dire need to improve the efficacy of current antiretroviral agents and preserve treatment options. Therapeutic drug monitoring appears to hold a lot of hope in helping achieve this goal, but not without additional studies.

Key words: HIV. Therapeutic drug monitoring. Antiretroviral drugs.

La terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) ha traído nuevas esperanzas y desafíos a las personas que viven con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). El importante arsenal terapéutico actualmente disponible contra la infección por este virus, con sus diversas combinaciones, consigue con frecuencia controlar la replicación viral, retrasar la progresión de la infección, mejorar la calidad de vida e incrementar la supervivencia de los pacientes. El buen cumplimiento terapéutico, por otro lado, dificulta la aparición de cepas virales resistentes¹.

En la actualidad, el principal objetivo del tratamiento antirretroviral (TAR) es conseguir la máxima inhibición de la replicación del VIH, con el propósito de permitir que el sistema inmune no sólo no siga deteriorándose sino que se restaure². Sin embargo, sólo un 50% de los pacientes que comienzan TAR alcanzan una supresión máxima de la replicación viral; y este porcentaje desciende en aquellos pacientes que han recibido algún tratamiento previo³. Determinar las razones de este problema origina, a menudo, frustración entre médicos clínicos e investigadores⁴.

El fracaso del TAR puede deberse a numerosos factores⁵ (Tabla 1) y suele establecerse basándose en el incremento de la carga viral, el descenso en el recuento de CD4⁺ o la progresión clínica de la enfermedad. Los dos motivos principales de este fracaso son la inadecuada concentración de los fármacos en

Correspondencia:

Vicente Martín

Departamento de Fisiología

Facultad de Veterinaria

Universidad de León

Campus de Vegazana s/n

24071 León

E-mail:

dfvms@unileon.es

el lugar de replicación del virus, asociada o no al desarrollo de resistencia a los agentes antirretrovirales (ARVs). El que no se alcance una concentración de fármaco idónea frente al virus puede deberse, a su vez, a una pobre adhesión, una deficiente absorción, o a otros factores que intervienen en la farmacocinética, tales como el metabolismo, la eliminación y las interacciones con otros fármacos.

Ante un fracaso en el TAR, la determinación de los niveles plasmáticos de estos fármacos podría ayudar a establecer si se alcanza una concentración del fármaco adecuada y a monitorizar la adhesión del paciente al tratamiento⁶.

Determinación de niveles plasmáticos y adhesión

Para que el TAR sea eficaz, la adhesión ha de ser casi perfecta⁷, para algunos autores superior al 95% de las tomas⁸. Para muchos de los fármacos, la pérdida de una sola dosis puede originar una caída en los niveles plasmáticos por debajo de la concentración mínima requerida para inhibir la replicación viral. Los descensos en la concentración plasmática de los fármacos antirretrovirales suelen permitir la replicación del VIH y conducir a la acumulación de mutaciones en el genoma viral que confieren resistencias aditivas a los fármacos y que aceleran el fracaso terapéutico⁵. La consecuencia inmediata para el paciente es el fin de la supresión replicativa del VIH, el deterioro inmunológico subsiguiente y, a corto o medio plazo, la progresión de la enfermedad. La resistencia a un fármaco no suele ser un hecho aislado. Puede dar lugar a la disminución o pérdida de la eficacia de otros compuestos de la misma familia, lo que dificultará la búsqueda posterior de alternativas terapéuticas eficaces. Esto es particularmente cierto en el caso de los inhibidores de la proteasa (IP) y en el de los inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINAN). Si el VIH desarrolla resistencia de alto nivel frente a cualquiera de estos fármacos de forma individual, casi con toda certeza, mostrará algún grado de resistencia a todos los demás fármacos de la misma familia⁹. Además, las cepas resistentes pueden ser transmitidas a la población (resistencia primaria) y originar importantes repercusiones en el ámbito de la salud pública¹⁰.

Dado lo relevante del grado de adhesión logrado, es importante contar con métodos para evaluarlo¹¹. Si el principal objetivo del TAR es suprimir la replicación viral, el mejor marcador de una buena adhesión po-

Resistencia a los diferentes fármacos

Declive progresivo del sistema inmunitario

Bajas concentraciones de fármacos en los sitios de replicación del virus

Baja potencia del fármaco debido a:

1. Factores propios del paciente:
 - No cumplimiento
 - Variabilidad entre los pacientes
 2. Factores farmacológicos:
 - Interacciones entre fármacos
 - Ineficiente absorción del fármaco
 - Metabolismo acelerado
-

Tabla 1.
Causas del fracaso terapéutico en el tratamiento antirretroviral de alta eficacia en la infección VIH

dría ser reducir la carga viral en sangre hasta niveles indetectables y mantenerla así. Pero, según este criterio, la falta de adhesión se descubre cuando es demasiado tarde para intervenir porque se habrán generado ya un gran número de copias de las cepas resistentes. Por otra parte, en algunos pacientes, no es la falta de adhesión la que impide el descenso sostenido de la carga viral^{12,13}.

Actualmente hay acuerdo en que no existe ningún "patrón de oro" que permita averiguar la adhesión a los regímenes de medicación. Los procedimientos indirectos utilizados hasta el momento incluyen cuestionarios, asistencia a citas programadas, recuento de pastillas y estimación del médico. Sin embargo, cada uno de estos métodos presenta inconvenientes y limitaciones. Dentro del procedimiento del recuento de pastillas se está introduciendo en algunos envases un microprocesador que registra las ocasiones en que un envase ha sido abierto (MEMS), lo cual, lógicamente, no es sinónimo de que los comprimidos se hayan tomado, o no se haya incurrido en una dosificación incorrecta¹⁴. Los cuestionarios y la estimación del médico se han mostrado como métodos de escasa validez interna para discriminar entre pacientes adherentes y no-adherentes^{15,16}. El hecho de acudir o faltar a las citas se relaciona con un número tan grande de variables que por sí solo tampoco resulta una medida fiable¹¹.

La ausencia de un patrón estándar con el que medir la adhesión con la suficiente fiabilidad dificulta el conocer la magnitud del problema y valorar con precisión los factores de riesgo asociados a un mal cumplimiento. La determinación de los niveles plasmáticos de agentes ARVs ofrece un dato objetivo^{5,17}, limitado a un tiempo concreto¹⁸, de la adhesión al tratamiento en ese momento. La información aportada por esta situación permitirá detectar casos de posibles incumplidores no detectados por otros me-

canismos y ayudará a validar los mecanismos de autodeclaración y otros métodos utilizados.

Diversos investigadores se han servido de los niveles plasmáticos de fármacos ARVs como marcadores de adhesión. En 1998, Kastrissios, *et al.*¹⁷ ensayaron el cumplimiento de la TAR basándose en la concentración plasmática de dideoxynucleósidos. También los estudios realizados por Burger, *et al.*¹⁹ concluyeron que la medida de los niveles de fármacos ARVs podía ser usada para conocer la adhesión. En particular, parece ser un método sensible en aquellos pacientes en los que se sospecha una falta de cumplimiento de la medicación prescrita. Recientemente, Murri, *et al.*²⁰ pusieron en evidencia la relación entre los niveles plasmáticos de los IP y la no adhesión a la TARGA. La determinación de los niveles plasmáticos de fármacos ARVs puede identificar una pobre adhesión, pero no asegura el buen cumplimiento del tratamiento. Esto es debido a que las concentraciones en plasma reflejan que los fármacos se han administrado dentro de las últimas 24 horas; pero no pueden confirmar que los pacientes hayan tomado su medicación los días, o incluso, las semanas previos a la extracción sanguínea^{17,18}.

Determinación de niveles plasmáticos en el seguimiento de los pacientes con infección VIH

La falta de adhesión al TAR es una de las razones, tal vez la más frecuente, que provoca una concentración inadecuada de fármacos en el plasma y, como consecuencia, un fracaso terapéutico; pero existen también otras causas que pueden producir variaciones significativas en la concentración de fármacos e idéntico resultado²¹⁻²⁵.

Las características individuales, con base genética²⁶, explican diferencias de más de 10 veces en las concentraciones plasmáticas de algunos fármacos ARVs²⁷. Enfermedades gastrointestinales, alimentos y las asociaciones de otros fármacos pueden modificar de manera notoria las concentraciones de los ARVs en el plasma.

A modo de ejemplo, podemos resaltar como algunos fármacos IP presentan una amplia variabilidad en sus perfiles farmacocinéticos en pacientes VIH con enfermedades muy frecuentes como son las hepatopatías crónicas por los virus de las hepatitis B y C²⁸. Los IP y los ITINAN son sustratos de las enzimas del complejo citocromo P450. Los fármacos que inhiben la familia CYP3A4, como es el caso de los IP, pueden

eleva las concentraciones de otros IP entre sí. Por el contrario, la inducción de CYP3A4 por fármacos tales como algunos ITINAN, la rifampicina o la rifabutina, pueden disminuir las concentraciones plasmáticas de los IP³.

Debido a la gran complejidad que presenta el manejo del paciente infectado por el VIH, parece evidente que cualquier forma de monitorizar la farmacocinética del TAR, podría mejorar sustancialmente el diseño del protocolo de tratamiento¹⁸; siendo más probable que respondan al tratamiento aquellos pacientes cuyo régimen de dosis se ha determinado en base a la concentración plasmática de los agentes ARVs, que aquellos individuos que siguen un régimen estándar y fijo. El ajuste de las dosis, basado en las concentraciones en plasma de estos fármacos parece la forma más adecuada de superar las limitaciones de los regímenes estándar⁶.

La información que pueden proporcionar las concentraciones en plasma de los agentes ARVs para diseñar el tratamiento, también resulta de interés para atenuar los posibles efectos tóxicos de estos fármacos. Se ha encontrado una relación entre altas concentraciones plasmáticas de indinavir y la aparición de cálculos renales²⁹, elevadas concentraciones de ritonavir y parestesia circunmoral³⁰. También hay datos que sugieren una relación entre los niveles de los IP y los triglicéridos plasmáticos^{31,32}, así como estudios que relacionan niveles plasmáticos elevados de efavirenz con toxicidad neurológica³³.

Importancia del coeficiente de inhibición

El coeficiente de inhibición ha sido utilizado en bacteriología para representar la relación entre los niveles de fármacos y la resistencia fenotípica. Esta aproximación se desarrolló inicialmente como un método para la interpretación de los datos de concentración inhibitoria mínima³⁴:

$$\text{Coeficiente de Inhibición (QI)} = C_{\text{valle}} / CI_{50}$$

donde, C_{valle} representa la concentración plasmática de un fármaco al final del intervalo de dosificación, y CI_{50} la concentración mínima eficaz para inhibir el crecimiento en un 50%. Este concepto se ha aplicado al campo del VIH y de los agentes ARVs³⁵ con las siguientes modificaciones:

$$QIV = C_{\text{valle}} \text{ observada} / \text{fenotipo virtual} \times EC_{50} \text{ (VIH salvaje, 50\% de suero)}$$

donde, QIV se refiere al coeficiente de inhibición virtual, EC_{50} representa la concentración resultante de la inhibición de la actividad viral en un 50% de las cepas del virus salvaje. Sin embargo, el valor de EC_{50} debe ser corregido en función de la unión a proteínas plasmáticas, ya que está demostrado que en presencia de suero humano, la actividad de los fármacos ARVs, sobre todo, los IP, disminuye significativamente³⁶. Actualmente se acepta que, utilizar el QIV como predictor de respuesta a tratamientos con indinavir y lopinavir es mucho más útil que el uso del fenotipo virtual únicamente.

Fiabilidad y reproducibilidad de la determinación de niveles en plasma

La medida de las concentraciones plasmáticas de los agentes ARVs es técnicamente posible. Estos análisis pueden realizarse en un tiempo relativamente corto y no requieren un equipamiento excesivamente sofisticado para los laboratorios clínicos convencionales. Numerosos estudios ponen de manifiesto que, los ensayos desarrollados utilizando técnicas de HPLC o LC-MS-MS son útiles para medir la concentración plasmática de dichos fármacos, con una sensibilidad y una precisión relevantes desde el punto de vista clínico^{6,18,37-39}.

Sin embargo, las características de cada familia de fármacos ARV han de tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados de la determinación de sus concentraciones en plasma.

Los datos existentes con relación a los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de los nucleósidos, indican que el efecto anti-VIH puede ser explicado mejor cuando se comparan las concentraciones plasmáticas del compuesto original con las concentraciones del trifosfato intracelular. Sin embargo, aún no se han desarrollado métodos sensibles, rápidos y precisos para la cuantificación de los anabolitos intracelulares³. Desde el punto de vista analítico representa un desafío el poder establecer la medida de la mitad activa: el trifosfato intracelular.

Los datos disponibles para los ITINAN indican que estos fármacos poseen una prolongada vida media y alcanzan concentraciones plasmáticas sustancialmente estables⁴⁰. Por lo tanto, establecer las relaciones efecto-concentración puede ser difícil. Sin embargo, estos fármacos no requieren conversión intracelular para actuar, y además, actúan sobre el sistema P450, de manera que sus niveles plasmáticos pueden modificarse cuando la vía del citocromo P450 es inhibida o inducida⁴¹.

En el caso de los IP, que tampoco requieren conversión intracelular y tienen una vida media relativamente corta, son fácilmente cuantificables en el plasma; además existen fuertes evidencias que ponen de manifiesto la relación entre la exposición al fármaco y su resultado clínico⁴².

Perspectivas de la determinación de los niveles plasmáticos

Sin duda, existe la necesidad de mejorar la eficacia de los agentes ARVs actuales y preservar las opciones de tratamiento existentes. La monitorización de los niveles plasmáticos de fármacos puede ser de gran utilidad para este objetivo. La determinación de ARVs facilitará un mejor manejo clínico del paciente y permitirá un ajuste individual de la dosis, mejorando la adhesión y reduciendo los efectos secundarios. El análisis rutinario de la presencia en sangre de los diferentes fármacos ARVs puede representar una herramienta clínica muy beneficiosa, permitiendo estudiar las relaciones existentes entre los niveles plasmáticos, los desórdenes metabólicos y el fallo en el tratamiento virológico.

Se abre, por tanto, una nueva era para los fármacos ARVs, en la que su potencia terapéutica pueda relacionarse con dosis que la mayoría de las personas sean capaces de manejar.

Cada vez se está más cerca de alcanzar el objetivo de identificar una categoría de regímenes en la cual, todos los fármacos sean administrados una sola vez al día. Regímenes convenientes y bien tolerados, de una o dos veces al día, mejorarían la adhesión y la calidad de vida de las personas con la infección VIH. La monitorización de los niveles de fármacos ARVs juega, ciertamente, un papel crucial a la hora de definir las características de las dosis únicas, vía el análisis y la interpretación de los perfiles de los diferentes agentes ARVs.

Además, desde el punto de vista económico, el TAR es excesivamente caro. Por lo tanto, resulta esencial optimizar las dosis, con el fin de obtener de estos costosos fármacos, el máximo beneficio terapéutico³ y la menor toxicidad posible.

Agradecimientos

Al Doctor Amalio Telenti, de la División de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario de

Lausana, por su inestimable ayuda e interés en enseñarnos las técnicas de determinación de niveles plasmáticos de antirretrovirales y sus acertados comentarios a esta revisión.

Al Doctor Manuel Alcoba, Jefe del Servicio de Medicina Interna II del Hospital de León, por sus sugerencias y ayuda constante en el desarrollo de este proyecto.

Bibliografía

- Panel on Clinical Practices for Treatment on HIV Infection. Guidelines for the use of Antiretroviral Agents in HIV-infected adults and adolescents. En: <http://www.hivatis.org>. February 2001.
- Gatell JM. Tratamiento antirretroviral en el 2001. En: <http://www.puntex.es/todohospital/172/172gatell2.htm>.
- Back D, Gibbons SE, Khoo SH. *Therapeutic drug monitoring of antiretrovirals: ready for the clinic?*. IAPAC Symposium. Vienna, 1999.
- Hoetelmans R. The relevance of pharmacologic monitoring in HIV disease. En: http://www.prn.org/_frms/vol5/num4/hoetelmans_frm.htm.
- Bean P. Emerging laboratory procedures to monitor treatment in HIV patients. En: <http://www.clinlabexpo.com/bean/index.shtml>.
- Bean P, Patnaik M, Graziano FM, Aziz DC. Therapeutic drug monitoring of antiretroviral agents. *Am Clin Lab* 2000;19:20-2.
- Knobel H, Carmona A, Grau S, Pedro-Botet J, Diez A. Adherence and effectiveness of highly active antiretroviral therapy. *Arch Intern Med* 1998;158:1953.
- Paterson D, Swindells S, Mohr J, Brester M, Vergis E, Squier C, *et al*. How much adherence is enough? *A prospective study of adherence to protease inhibitor therapy using MEMSCaps*. 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Chicago, 1999.
- Yeni P. Difficulties with HAART. 12th World AIDS Conference. Geneva, 1998.
- Wainberg MA, Friedland GH. Public health implications of antiretroviral therapy and HIV drug resistance. *JAMA* 1998; 279:1977-83.
- Gordillo MV, González-Lahoz J. Variables psicológicas y adherencia al tratamiento antirretroviral. *An Med Interna* 2000;17:38-41.
- Fätkenheuer G, Theisen A, Rockstroh J, Grabow T, Wicke C, Becker K, *et al*. Virological treatment failure of protease inhibitor therapy in an unselected cohort of HIV-infected patients. *AIDS* 1997;11:F113-F116.
- Saag M. Use of hiv viral load in clinical practice: back to the future. *Ann Intern Med* 1997;126:983-5.
- Vrijens B, Goetghebuer E. Comparing compliance patterns between randomized treatments. *Control Clin Trials* 1997;18:187-203.
- Boyle B. Patient questionnaire insufficient for assessing adherence. En: <http://www.HIVandhepatitis.com/hiv/v041101f.html>.
- Martin J, Escobar I, Rubio R, Sabugal G, Cascón J, Pulido F. Study of the validity of a questionnaire to assess the adherence to therapy in patients infected by HIV. *HIV Clin Trials* 2001;2:31-7.
- Kastrissios H, Suarez JR, Hammer S, Katzenstein D, Blaschke TF. The extent of non-adherence in a large AIDS clinical trial using plasma dideoxynucleoside concentrations as a marker. *AIDS* 1998;12:2305-11.
- Moyer TP, Temesgen Z, Enger R, Estes L, Charlson J, Oliver L, *et al*. Drug monitoring of antiretroviral therapy for HIV-1 infection: method validation and results of a pilot study. *Clin Chem* 1999;45:1465-76.
- Burger DM, Hugen PWH, Koopmans PP. Monitoring of plasma drug levels to assess non-adherence to drug therapy. *AIDS* 1998;12(suppl 4):S61.
- Murri R, Ammassari A, Gallicano K, De Luca A, Cingolani A, Jacobson D, *et al*. Patient-reported nonadherence to HAART is related to protease inhibitor levels. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000;24:123-8.
- Gieschke R, Fotteler B, Buss N, Steiner JL. Relationship between exposure to saquinavir monotherapy and antiviral response in HIV-positive patients. *Clin Pharmacokinet* 1999;37:75-86.
- Descamps D, Flandre P, Calvez V, Peytavin G, Meiffredy V, Collin G, *et al*. Mechanisms of virologic failure in previously untreated HIV-infected patients from a trial of induction-maintenance therapy. *JAMA* 2000;283:205-11.
- Burger DM, Hoetelmans RMW, 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. *Antiviral Ther* 1998;3:215-20.
- Fletcher CV, Acosta EP, Henry K, Page LM, Gross CR, Kawle SP, *et al*. Concentration-controlled zidovudine therapy. *Clin Pharmacol Ther* 1998;64:331-8.
- Acosta EP, Henry K, Weller D, *et al*. Indinavir pharmacokinetics and relationships between exposure and antiviral effect. 37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Toronto, 1997.
- Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, *et al*. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet* 2002;359:30-6.

27. Barry MG, Merry C, Lloyd J, Halifax K, Carey P, Mulcahy F, *et al.* Variability in trough plasma saquinavir concentrations in HIV patients: a case for therapeutic drug monitoring. *Br J Clin Pharmacol* 1998;13:1623-7.
28. Khaliq Y, Gallicano K, Seguin I, Fyke K, Carignan G, Badley A, *et al.* Therapeutic drug monitoring of nelfinavir in HIV patients with liver disease. 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Chicago, 1999.
29. Dieleman JP, Gyssens IC, van der Ende M, de Marie S, Burger DM. Urological complaints in relation to indinavir plasma concentrations in HIV-infected patients. *AIDS* 1999;13:473-8.
30. Merry C, Barry MG, Gibbons S, Mulcahy F, Back D. Improved tolerability of ritonavir derived from pharmacokinetic principles. *Br J Clin Pharmacol* 1996; 42:787.
31. Churchill DR, Pym AS, Babiker AG, Back DJ, Weber JN. Rate of onset of hyperlipidaemia following treatment with ritonavir/saquinavir and correlation with drug levels. *AIDS* 1998; 12(suppl 4):S9.
32. Churchill DR, Pym AS, Babiker AG, *et al.* Hyperlipidaemia following treatment with protease inhibitors in patients with HIV-1 infection. *Br J Clin Pharmacol* 1998;46:518-9.
33. 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;15:1-5.
34. Ellner PD, Neu HC. The inhibitory quotient. A method for interpreting minimum inhibitory concentration data. *JAMA* 1981;246:1575-8.
35. Kempf DJ, 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 Retroviruses and Opportunistic Infections
36. Molla A, Vasavanonda S, Kumar G, Sham HL, Johnson M, Grabowski E, *et al.* Human serum attenuates the activity of protease inhibitors toward wild-type and mutant human immunodeficiency virus. *Virology* 1998;250:255-62.
37. Aymard G, Legrand M, Trichereau N, Diquet B. Determination of twelve antiretroviral agents in human plasma sample using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 2000; 744:227-40.
38. Marzolini C, Telenti A, Buclin T, Biollaz J, Decosterd LA. Simultaneous determination of the HIV protease inhibitors indinavir, amprenavir, saquinavir, ritonavir, nelfinavir and the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz by high-performance liquid chromatography after solid-extraction. *J Chromatogr* 2000;740:43-58.
39. Rimmel RP, Kawle SP, Weller D, Fletcher CV. Simultaneous HPLC assay for quantification of indinavir, nelfinavir, ritonavir, and saquinavir in human plasma. *Clin Chem* 2000;46:73-81.
40. John L, Marra F, Ensom MHH. Role of therapeutic drug monitoring for protease inhibitors. *Ann Pharmacother* 2001;35:745-54.
41. López Galera RM, Gómez Domingo MR, Pou Clavé L, Monerde Junyent J. Monitorización de antirretrovirales: importancia y consideraciones actuales. *Noticias Farmacoterapéuticas* 2001;29:1-3.
42. Acosta EP. Therapeutic drug monitoring in HIV infection. The promise of therapeutic drug monitoring in HIV infection. *Medscape HIV/AIDS* 1999. <http://www.hiv.medscape.com/Medscape/HIV/journal/1999/v05.n04/mha0803/mha0803.html>.