

Potensi Resistensi Virus HIV-1 terhadap Terapi Anti Retroviral (ART) pada Pasien *Voluntary Counseling and Testing (VCT)* di Beberapa Kota di Indonesia

Resistance Potential of HIV-1 Virus to Anti Retroviral Therapy (ART) in Voluntary Counseling Testing (VCT) Patients in Some Cities in Indonesia

Nur Ika Hariastuti*, Holy Arif Wibowo, Kindi Adam, Subangkit, Natalie Laurensia Kipuw, dan Roselinda

Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, Kemenkes RI
Jl. Percetakan Negara No.23 Jakarta 10560, Indonesia

Korespondensi penulis: nurika_hariastuti@yahoo.co.id

Submitted: 27-10-2015, Revised: 15-04-2016, Accepted: 30-09-2016

Abstrak

Human Immunodeficiency Virus (HIV) adalah virus yang merusak sistem kekebalan tubuh. Penggunaan kombinasi obat terapi *anti retroviral* (ARV) telah menunjukkan efektivitas yang tinggi dalam mengendalikan perkembangan virus HIV dan memperpanjang harapan hidup penderita. Cakupan pemberian *anti retroviral therapy* (ART) yang luas juga berdampak pada timbulnya mutasi pada virus HIV sehingga dapat menyebabkan resistensi. Secara umum, resistensi terhadap obat tertentu adalah hasil dari mutasi pada sejumlah posisi dalam gen pengkode protein yang ditargetkan oleh obat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya mutasi yang mengarah pada resistensi terhadap ART pada beberapa kota di Indonesia. Metode yang digunakan untuk melakukan analisis resistensi pada studi ini adalah dengan pemeriksaan genotipik. Sampel yang digunakan adalah Bahan Biologi Tersimpan pada Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan. Seratus delapan spesimen yang memenuhi kriteria inklusi diamplifikasi dan dilakukan *sequencing*. Selanjutnya analisis hasil sekuensing virus HIV dilakukan dengan mengunggah sekuen ke situs web Stanford University untuk analisis mutasi resistensi. Berdasarkan hasil penelitian ini ditemukan adanya mutasi pada virus HIV yang mengarah pada *low potential* resistensi obat ARV yaitu jenis efavirenz (EFV) dan nevirapine (NVP). Obat ini merupakan lini pertama pengobatan HIV di Indonesia. Tinjauan mengenai mutasi yang menyebabkan resistensi virus terhadap ARV dengan metode genetik ini diharapkan dapat dijadikan sebagai data dasar bagi program pengembangan obat baru atau vaksin HIV/AIDS dalam program penanggulangan HIV di Indonesia.

Kata Kunci: resistensi, virus HIV-1, VCT

Abstract

Human Immunodeficiency Virus (HIV) is a virus that damages the immune system. The use of *anti-retroviral therapy* drugs combination (ARV) has demonstrated highly effective in controlling the development of the HIV virus and prolongs survival. Comprehensive coverage of *antiretroviral therapy* (ART) also has an impact on the incidence of mutations in the HIV virus that can lead to resistance. In general, resistance to a particular drug is the result of a mutation in a number of positions in the protein-coding genes that are targeted by drugs. This study is aimed to find out mutations that related to ARV resistance in some cities in Indonesia. Genotypic assays are used in this study to analyze the viral resistance properties. The samples are from stored biological materials in the Center for Biomedical and Basic Technology of Health. One hundred and eight specimens that meet the inclusion criteria were amplified and sequenced. Further analysis is conducted by uploading sequences to the Stanford University website for the analysis of resistance mutations. Based on the results of this study there are some mutations in the HIV virus that leads to a low potential of *antiretroviral* drug resistance of efavirenz (EFV) and nevirapine (NVP). These drugs are used in the first-line treatment of HIV in Indonesia. Overview of the mutations that cause viral resistance to *antiretroviral* drugs with genetic methods is expected to serve as baseline data for program development of new drugs or vaccines HIV / AIDS in the response to HIV in Indonesia.

Keywords: resistance, HIV-1 virus, VCT

Pendahuluan

Jumlah penderita *Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome* (HIV/AIDS) di Indonesia diperhitungkan terus bertambah setiap tahunnya. Pada tahun 2006 tercatat 7.195 kasus HIV baru dan meningkat menjadi 10.362 di tahun 2008. Jumlah kumulatif infeksi HIV yang dilaporkan sampai dengan akhir tahun 2015 sebanyak 191.073.¹ Badan dunia penanganan AIDS, UNAIDS juga memberikan predikat Indonesia termasuk salah satu negara di Asia dengan epidemi yang berkembang cepat.²

HIV adalah virus yang melemahkan sistem kekebalan tubuh. HIV dapat digolongkan menjadi dua genotip yaitu HIV-1 dan HIV-2. Genotip HIV-1 dapat dikelompokkan lagi menjadi tiga kelompok yaitu kelompok M, N, dan O. Pada kelompok M, HIV-1 memiliki 9 subtipe dan CRF (rekombinan) yaitu subtipe A, B, C, D, F, G, H, J, K dan CRFs. Pada keadaan tertentu, 2 virus dari subtipe berbeda yang menginfeksi satu orang dapat menjadi virus hibrida baru, disebut sebagai "Circulating Recombinant Forms" atau CRFs.³

Pemberian *Anti Retroviral Therapy* (ART) yang luas juga berdampak pada terjadinya mutasi virus HIV yang dapat menyebabkan resistensi. Resistensi pada HIV dapat terjadi karena beberapa faktor. Faktor pertama adalah karena kecepatan replikasi virus yang sangat tinggi yang menyebabkan terbentuknya HIV subtipe baru yang memiliki kemungkinan resisten terhadap ARV tertentu.⁴ Faktor kedua, adalah terjadinya mutasi pada bagian gen penghasil protein fungsional (enzim) yang dijadikan salah satu target ARV, sehingga obat ARV tidak dapat bekerja pada enzim tersebut karena struktur dari enzim telah berubah.⁵

Menurut penelitian di beberapa negara telah ditemukan virus HIV yang resisten terhadap jenis ARV. Penggunaan obat golongan *Nucleotida* dan *Analog Nucleotida Reverse Transcriptase Inhibitor* (NRTI dan NNRTI) dapat menyebabkan mutasi pada enzim *reverse transcriptase*, sehingga mengurangi efektivitas obat (resistensi). Selain itu obat *Non-Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitor* (NNRTI); seperti Efavirenz juga dapat menyebabkan mutasi.⁶

Mutasi yang terjadi pada gene *Protease* akan menyebabkan resistensi obat yang memiliki mekanisme kerja sebagai penghambat enzim *protease* atau disebut *Protease Inhibitors* (PI). Mutasi pada gen ini telah ditemukan pada penggunaan Tipranavir/ritonavir, Saquinavir/ritonavir, Nelfinavir, Lopinavir/ritonavir, Indi-

navir/ritonavir, Fosamprenavir/ritonavir, Darunavir/ritonavir, dan Atazanavir/ritonavir.⁶

Studi ini bertujuan untuk mengetahui adanya mutasi yang mengarah pada resistensi terhadap ART di beberapa klinik VCT di Indonesia. Studi ini juga merupakan analisis lanjutan penelitian karakterisasi genotip virus HIV yang tersebar di Indonesia

Metode

Spesimen berasal dari penelitian Epidemiologi Molekuler Genotipe *Human Immunodeficiency Virus* (HIV-1) pada Orang dengan HIV/AIDS (ODHA) di Provinsi Papua, Kepulauan Riau, Maluku, Sumatera Barat, Sulawesi Utara, Sulawesi Selatan, dan Sumatera Utara tahun 2011 yang tersimpan di Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan. Preparasi dilakukan pada 108 sampel yang memenuhi kriteria inklusi dengan sentrifugasi pada kecepatan 20.000g selama 75 menit dengan kondisi suhu 4°C. Ekstraksi Sampel untuk memperoleh RNA murni untuk pemeriksaan PCR menggunakan *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiaqen, Cat : 52906) sesuai dengan petunjuk pabrikan sedangkan proses RT-PCR menggunakan *Superscript III One Step RT-PCR Platinum Taq* (Invitrogen, Cat: 12574-026) dengan teknik PCR *Nested*. Primer yang digunakan DRRT1L (5'-ATGATAGGGGGAATTGGAGGTTT-3') dan DRRT4L (5'-TACTTCTGTTAGTGCTTGGTTCC-3'). Untuk selanjutnya, PCR *Nested* dilakukan dengan primer DRRT7L (5'-GACCTACACCTGTCAACATAATTGG-3') dan DRRT6L (5'-TAATCCCTGCATAAATCTGACTTG C-3').⁷

Sampel yang menunjukkan pita sesuai dengan pita DNA yang diinginkan dinyatakan positif kemudian dilanjutkan ke tahap sekuensing dengan menggunakan *Big Dye X Terminator V3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystem, cat. 4337455). Purifikasi Produk PCR Sekuensing dilakukan menggunakan *Big Dye X Terminator Purification Kit* (Applied Biosystem, Cat. 4376487). Hasil sekuensing dianalisis dengan membandingkan data dasar resistensi virus HIV seluruh dunia dengan mengacu pada laman <https://hivdb.stanford.edu>.⁸

Hasil

Analisis sekuensing dilakukan hanya pada sampel yang memberikan hasil positif pada proses *Nested PCR* yaitu sebanyak 4 sampel

dari 108 sampel. Adapun sampel yang dimaksud adalah KRU 39; SMU 17; SLS 18; dan MLU 35. Protokol sekuensing diadopsi dari NIID (*National Institute of Infectious Disease*) Jepang. Analisis dilakukan pada gen *Reverse Transcriptase*.

Protease Inhibitor (PI)

Terdapat mutasi pada K20I (perubahan protein Lysine menjadi Isoleucine pada asam amino urutan 20 enzim *Reverse Transcriptase*) yang merupakan *protease inhibitor (PI) selected mutation* (Gambar 1). Mutasi K20I merupakan mutasi yang umum terjadi dan kemungkinan memberikan kontribusi untuk menurunkan suseptibilitas *Protease Inhibitor*. Mutasi K20I kemungkinan merupakan mutasi yang bersifat *Potential low-level resistance* terhadap obat nelfinavir (NFV)

Reverse Transcritase Inhibitor (RTI)

Hasil analisis terhadap mutasi gen *Reverse Transcriptase* ditemukan mutasi pada V179D (perubahan protein *Valine* menjadi *Aspartic Acid* pada asam amino urutan 179, ditunjukkan pada garis biru paling tinggi). Mutasi V179D merupakan *slightly polymorphic* (efavirenz) *EFV-selected mutation* yang menyebabkan efavirenz (EFV) dan nevirapine (NVP) *Potential low-level resistance*. Resistensi diatas termasuk dalam mutasi *Non-Nucleoside RTI*.

Reverse Transcritase Inhibitor (RTI)

Terdapat mutasi di beberapa titik pada gen *Reverse Transcriptase* tetapi hasil keseluruhan analisis menunjukkan bahwa sampel SMU 17 masih suseptibel terhadap obat yang ada (Gambar 2).

Hasil analisis menunjukkan terdapat mutasi di beberapa lokasi nukleotida antara 150–250. Tetapi tidak ada mutasi yang menuju pada resistensi terhadap obat ARV (Gambar 3).

Hasil analisis menunjukkan terdapat mutasi di beberapa lokasi nukleotida antara 150–250. Tetapi tidak ada mutasi yang menuju pada resistensi terhadap obat ARV (Gambar 4).

Pembahasan

Resistensi terhadap obat adalah hasil dari mutasi gen pengkode protein yang menjadi target obat. Gen yang paling banyak mengalami mutasi penyebab resistensi ARV antara lain adalah *reverse transcriptase*, *gag* dan *pol*. Karena sebagian besar data menunjukkan mutasi

yang menimbulkan resistensi, maka tingkat resistensi dapat diasumsikan dengan menentukan komposisi asam amino di sejumlah posisi pada genom HIV-1.

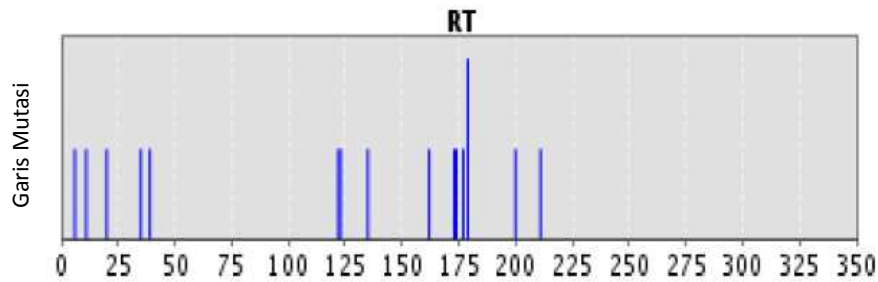
Analisis sekuensing dilakukan hanya pada sampel yang memberikan hasil positif pada proses *Nested PCR* yaitu sebanyak 4 sampel dari 108 sampel. Adapun sampel yang dimaksud adalah sample dengan kode KRU 39; SMU 17; SLS 18; dan MLU 35. Berdasarkan hasil analisis 4 sampel di atas, hanya ada 1 sampel yang bersifat *low potential* resistensi obat yaitu yang berasal Kepulauan Riau (KRU 039). Mutasi tersebut tidak bersifat langsung mempengaruhi resistensi terhadap obat. Adapun obat yang dipengaruhi adalah ARV jenis efavirenz (EFV) dan nevirapine (NVP). Jenis obat tersebut adalah obat lini pertama di Indonesia. Mutasi yang mengarah pada resistensi EFV dan NVP merupakan mutasi yang sering terjadi pada golongan ART NNRTI, selain Etravirine dan Rilpivirine.⁹

Responden KRU 39 merupakan pengguna narkoba jarum suntik (penasun). Pada analisis genotip diidentifikasi HIV pada kasus ini adalah HIV-1 sub tipe AE. Riwayat terapi spesifik KRU 39 adalah sedang diterapi duviral dan efavirenz selama 22 bulan saat pengambilan sampel dilakukan, dan tidak pernah berganti jenis ARV. Data laboratorium berkala menunjukkan CD4 terakhir kasus adalah 664 sel/mm³, sudah ada infeksi oportunistik berupa gejala candidiasis dan morbili. Hasil analisis terhadap mutasi gen *Reverse Transcriptase* menunjukkan adanya mutasi pada V179D. Mutasi tersebut tidak bersifat langsung mempengaruhi resistensi virus terhadap obat. Mutasi pada V179D ini berkaitan dengan kecenderungan resistensi virus terhadap obat ARV jenis efavirenz (EFV) dan nevirapine (NVP). Jenis obat tersebut adalah obat lini pertama di Indonesia.^{10,11}

Obat ARV yang tersedia di Indonesia saat ini terbagi menjadi 2 jenis yaitu: Lini Pertama. Jenis ini dikonsumsi oleh ODHA yang sudah memenuhi syarat minum ARV. Jenis obatnya terdiri dari: zidovudin (AZT) 100mg, lamivudin (3TC) 150mg, stavudin (d4T) 30mg, efavirenz (EFV) 200mg dan 600mg, nevirapine (NVP) 200mg, zidovudin (AZT) 100mg + lamivudin (3TC) 150mg, dan stavudin (d4T) 30mg + lamivudin (3TC) 150mg.

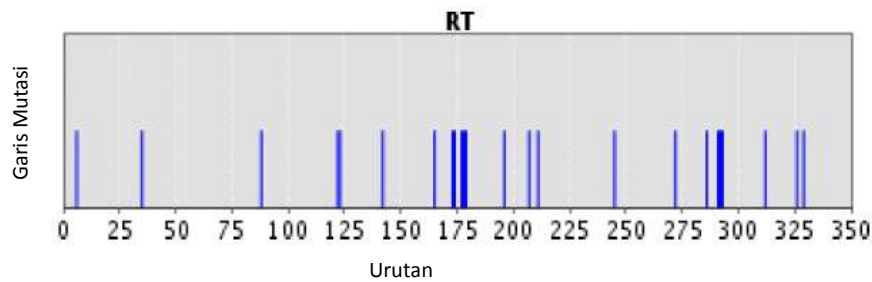
Lini Kedua pengobatan HIV dikonsumsi oleh ODHA yang sudah resisten dengan ARV lini pertama. Jenis obat lini kedua terdiri dari: Tenofovir (TDF) 300mg, Lopinavir/ritonavir

Sampel No. KRU 39 - Merupakan genotype CRF_AE



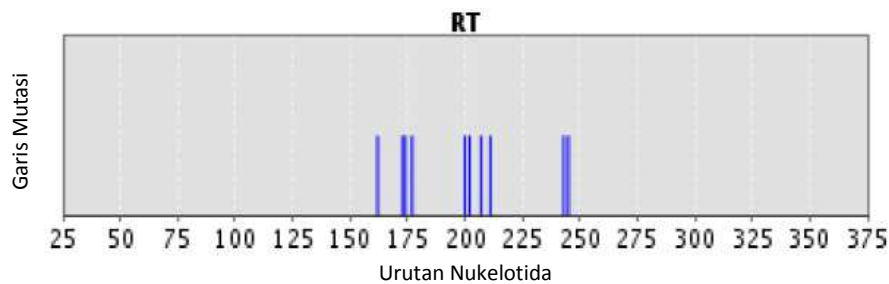
Gambar 1. Hasil Analisis Mutasi pada Sekuen KRU-39. Sumbu X: Posisi Basa Hasil Sekuensing. Sumbu Y: Koefisien Mutasi. Garis Biru Merupakan Posisi yang Mengalami Mutasi. Garis Biru Panjang Menandakan Posisi Mutasi yang Berhubungan dengan resistensi obat.

Sampel No. SMU 17- Merupakan genotype CRF_AG



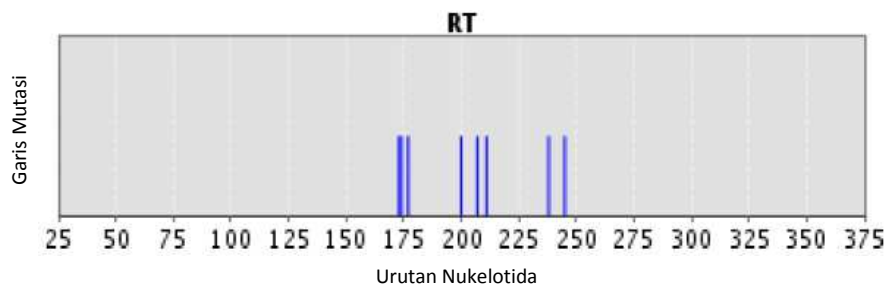
Gambar 2. Hasil Analisis Mutasi pada Sekuen SMU-17. Sumbu X: Posisi Basa Hasil Sekuensing. Sumbu Y: Koefisien Mutasi. Garis Biru Merupakan Posisi yang Mengalami Mutasi.

Sampel No. SLS 18 - Merupakan genotype CRF_AG



Gambar 3. Hasil Analisis Mutasi pada Sekuen SLS-18. Sumbu X: Posisi Basa Hasil Sekuensing. Sumbu Y: Koefisien Mutasi. Garis Biru Merupakan Posisi yang Mengalami Mutasi.

Sampel MLU 35 - Merupakan genotype CRF_AG



Gambar 4. Hasil Analisis Mutasi pada Sekuen MLU-35. Sumbu X: Posisi Basa Hasil Sekuensing. Sumbu Y: Koefisien Mutasi. Garis Biru Merupakan Posisi yang Mengalami Mutasi.

(LPV/r) 200/50mg, Didanosine (ddI) 100mg, Abacavir (ABC) 300mg, Tenofovir (TDF) 300mg + Emtricitabine (FTC) 200mg

Responden dengan kode KRU 39, tampak adanya resisten terhadap ARV lini pertama jenis efavirenz dan nevirapine. Hal tersebut diperkuat dengan kenyataan bahwa, walaupun sudah 22 bulan melakukan terapi ARV namun stadium penyakit masih belum membaik (stadium 3), yaitu dengan didapatkan gejala infeksi oportunistik. Penyebab resistensi dapat berasal dari terinfeksi virus yang sudah resisten akibat penggunaan bersama jarum suntik yang tidak steril atau *Transmitted Drug Resistance* (TDR).

Kejadian TDR telah dilaporkan terjadi di berbagai wilayah dengan besaran maksimal mencapai 25%, terutama pada wilayah yang telah tersedia ARV sejak lama. Kemampuan ARV untuk menekan angka kesakitan dan angka kematian pasien terinfeksi HIV secara dramatis membuat penggunaan ARV semakin meluas. Kebanyakan TDR berasosiasi dengan penggunaan ARV golongan NNRTI. ARV golongan ini digunakan sebagai lini pertama dengan pertahanan genetik yang rendah untuk mencegah terjadinya resistensi. Pengawasan terhadap transmisi virus resisten diperlukan untuk penyusunan panduan penggunaan ARV yang tepat.^{12,13}

Terjadinya resistensi dapat diantisipasi dengan memantau CD4 dan viral load penderita HIV/AIDS. Penggunaan ARV dalam waktu yang cukup lama dengan CD4 menurun atau viral load meningkat, maka terdapat kemungkinan telah terjadi resistensi. Pemeriksaan untuk resistensi, maka dapat dilakukan dengan dua cara yaitu *genotypic assay* dan *phenotypic assay*.¹⁴ Tigasampel lain pada penelitian ini, yaitu kasus, tidak menunjukkan adanya mutasi yang berkaitan dengan resistensi ARV.

Pada ketiga responden lainnya (SMU 17, SLS 18, MLU 35) tidak ditemukan adanya mutasi pada gen *Reverse Transcriptase*. Namun kewaspadaan tetap perlu ditingkatkan mengingat CD4 responden SMU 17 rendah dan sudah ada infeksi oportunistik TBC walaupun sudah menerima ARV selama 18 bulan. Responden SLS 18 dan MLU 35 mempunyai CD4 dengan jumlah tinggi dan SLS 18 belum diterapi, sedangkan MLU 35 sudah diterapi 36 bulan.

Terapi ARV di negara berkembang pelaksanaannya mudah dan efektif, namun mortalitas pada bulan pertama lebih tinggi jika dibandingkan dengan negara maju. ART harus dimulai dengan sebelum infeksi oportunistik

berkembang dan didampingi dengan VCT (*Voluntary Counselling and Testing*).¹⁵ VCT diharapkan dapat mengarahkan perbaikan perilaku seperti penggunaan kondom, jarum suntik steril, konseling pencegahan, layanan mitra, pengobatan substansi penyalahgunaan, dan kepatuhan pengobatan.¹⁶

Tingkat kepatuhan minum obat yang sempurna akan menghasilkan proporsi subjek yang tinggi dalam mempertahankan penekanan viral load dari waktu ke waktu.¹⁷ Hal ini mengarah keberkelanjutan penekanan virus yang merupakan tujuan terapi ARV. Namun, pasien dengan kepatuhan rendah hingga moderat (<80% *adherence*) untuk rejimen berbasis NNRTI jumlah virusnya masih dapat dikendalikan. Pasien dengan kepatuhan rendah dapat menimbulkan risiko untuk munculnya jumlah virus yang lebih tinggi. Membatasi interupsi penggunaan NNRTI yang berkelanjutan dapat meningkatkan penekanan virus yang lebih lama, terutama pada pasien dengan kepatuhan yang kurang baik.¹⁸

Kesimpulan

Gen *reverse transcriptase* merupakan gen pada virus HIV-1 yang banyak mengalami mutasi. Hal ini ditunjukkan oleh ditemukannya mutasi pada semua sampel yang berhasil disekuensing, meskipun tidak semua mutasi mengarah pada perubahan yang dapat menyebabkan resistensi terhadap obat ARV. Hasil sekuensing pada sampel KRU-39 menunjukkan *low potential* resistensi obat ARV yaitu jenis efavirenz (EFV) dan nevirapine (NVP). Obat ini merupakan lini pertama pengobatan HIV di Indonesia.

Saran

Penelitian mengenai analisis resistensi virus HIV-1 terhadap obat ARV dengan cakupan yang lebih luas, sebaiknya dapat dilakukan secara periodik.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Kepala Badan Litbangkes dan Kepala Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan atas izin yang telah diberikan untuk dapat melakukan analisis lanjutan ini. Selain itu penulis juga mengucapkan terima kasih kepada dr. Roselinda, M.Epid. selaku PI penelitian Epidemiologi Molekuler Genotipe *Human Immunodeficiency Virus* (HIV-1) pada Orang dengan HIV/AIDS (ODHA) di Provinsi Papua,

Kepulauan Riau, Maluku, Sumatera Barat, Sulawesi Utara, Sulawesi Selatan, dan Sumatera Utara serta semua subjek penelitian dan semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Direktorat Jenderal Pencegahan dan Pengendalian Penyakit. Laporan situasi perkembangan HIV-AIDS di Indonesia tahun 2015. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2016.
2. UNAIDS. HIV in the Asia and the Pacific, UNAIDS Report 2013. Bangkok: UNAIDS; 2013.
3. Feng, Y, Wei H, Hsi JH, Qing Y, Xing H, Liao L, et al. Identification of a novel HIV type 1 circulating recombinant form (CRF65_cpx) composed of CRF01_AE and subtypes B and C Western Yunnan, China. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2014;30(6):598–602.
4. Pinggen M, Wensing AMJ, Fransen K, De Bel A, de Jong D, Hoepelman AIM, et al. Persistence of frequently transmitted drug-resistant HIV-1 variants can be explained by high viral replication capacity. *Retrovirology*. 2014;11:105–120
5. Menendez-Arias L. Mutation rate and intrinsic fidelity of retroviral reverse transcriptases. *Viruses*, 2009; 1(3):1137–1165. doi: 10.3390/v1031137
6. Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Gunthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, et al. Updated of the drug resistance mutation in HIV-1. *Top HIV Med*. 2008;16(5):138-145.
7. Yoshida S, Hattori J, Matsuda M, Okada K, Kazuyama Y, Hashimoto O, et al. Japanese external quality assessment program to standardize HIV-1 drug-resistance testing (JEQS2010 Program) using in vitro transcribed RNA as reference material. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015 Mar;31(3):318-25. doi: 10.1089/aid.2014.0059.
8. Kolomeets AN, Varghese V, Lemey P, Bobkova MR, Shaferb RW. A uniquely prevalent non nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutation in Russian subtype A HIV-1 viruses. *AIDS*. 2014 Nov 13;28(17):F1-8. doi: 10.1097/QAD.0000000000000485.
9. Wensing AM, Calvez V, Gunthard HF, Johnson VA, Paredes R, Pillay D, et al. Update of drug resistance mutations in HIV-1. Special contribution. *IAS-USA*. 2014;22(3):642-650.
10. Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. Pedoman nasional tatalaksana klinis infeksi HIV dan terapi antiretroviral pada orang dewasa dan remaja. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI; 2012.
11. Pusat Komunikasi Publik, Kementerian Kesehatan RI. Pengadaan dan distribusi obat anti retroviral (ARV) [web page on the Internet]. [cited 2015 May 4]. Available from: <http://sehatnegeriku.com/pengadaan-dan-distribusi-obat-anti-retroviral-arv/>.
12. van de Vijver DAMC, Wensing AMJ, Boucher CAB. The epidemiology of transmission of drug resistant HIV-1 pp. 17–36 in *HIV sequence compendium 2006/2007*. Leitner TT, Foley B, Hahn B, Marx P, McCutchan F, Mellors J, et al, editors. Los Alamos; Theoretical biology and biophysics group, Los Alamos National Laboratory. NM. LA-UR 07-4826.
13. Avila-Rios S, Mejia-Villatoro, Garcia-Morales C, Soto-Nava M, Escobar I, Mendizabal R, et al. Prevalence and patterns of HIV transmitted drug resistance in Guatemala. *Rev Panam Salud Publica*. 2011;30(6):641–648.
14. Hirsch MS, Brun-Vezinet F, D'Aquila RT, Hammer SM, Johnson VA, Kuritzkes DR. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendation of an International AIDS Society-USA panel. *Journal of the American Medical Association*. 2000;283:2417–2426.
15. Braitstein P, Brinkhof MW, Dabis F, Schechter M, Boulle A, Miotti P, et al. Mortality of HIV-1 infected patients in the first year of antiretroviral therapy. *Lancet*. 2006 Mar 11;367(9513):817-24. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68337-2
16. Hall HI, Holtgrave DR, Tang T, Rhodes P. HIV transmission in the United States: Considerations of viral load, risk behavior, and health disparities. *AIDS Behav*. 2013 Jun;17(5):1632-6. doi: 10.1007/s10461-013-0426-z.
17. Gross R, Yip B, Re VL, Wood E, Alexander CS, Harrigan PR, et al. A simple, dynamic measure of antiretroviral therapy adherence predicts failure to maintain HIV-1 suppression. *J Infect Dis*. 2006 Oct 15;194(8):1108-14.
18. Parienti JJ, Das-Douglas M, Massari V, Guzman D, Deeks SG, Verdon R, et al. Not all missed doses are the same: sustained NNRTI treatment interruptions predict HIV rebound at low-to-moderate adherence levels. *PLoS One*. 2008 Jul 30;3(7):e2783. doi: 10.1371/journal.pone.0002783.