

# Serología de cuarta generación, biología molecular diagnóstica y el nuevo algoritmo para diagnóstico de infección por VIH

## 4th generation HIV serology tests, diagnostic molecular biology, and the new HIV testing algorithms

### Sorologia de quarta geração, biologia molecular diagnóstica e o novo algoritmo para o diagnóstico de infecção por VIH

Antonio Carlos Jaramillo Tobón<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Virología y Enfermedades Infecciosas. Ministerio de Salud de Colombia. Secretaría Distrital de Salud de Bogotá. Colombia

#### RESUMEN

Las pruebas de laboratorio de tercera y cuarta generación para VIH, detectan anticuerpos tipo IgG e IgM; las de cuarta además detectan la proteína p-24 del VIH que aparece antes que los anticuerpos tipo IgM. Por lo anterior, con el algoritmo disponible para las pruebas de hasta tercera generación, se puede dejar de detectar hasta el 60% de las infecciones por VIH-1 y 2. En los bancos de sangre, el uso de estas pruebas de cuarta generación puede detectar un porcentaje importante de infecciones tempranas, con anticuerpos negativos y solamente p-24/VIH positivo (3% en bancos de sangre de Bogotá, Colombia). Por lo anterior surgió la necesidad de confirmar las infecciones tempranas detectadas por las pruebas de cuarta generación que detectan antígeno-p24 y anticuerpos anti-VIH, pero son falsos negativos en las pruebas confirmatorias como Western Blot. Esos pacientes tienen infección aguda, son muy infectantes y contribuyen en forma importante a la diseminación de la infección. Esto se resuelve con la detección del RNA-VIH y un nuevo algoritmo que ya ha sido evaluado exitosamente en 2 diferentes estudios. Se recomienda además, repetir las pruebas en estos casos discordantes en 2-4 semanas después de la primera evaluación.

**Palabras clave:** VIH. Algoritmo Diagnóstico. Blips. p-24.

#### ABSTRACT

Third and fourth generation laboratory tests for HIV detect antibodies type IgG and IgM. Fourth generation test also detect HIV p24 protein that appears before the antibodies type IgM. Due to the aforesaid, the algorithm available for tests until third generation might not detect 60% of the HIV-1 and HIV-2 infections. In blood banks, these 4th generation tests can detect an important percentage of early infections the need to confirm early infections detected by fourth-generation test that detect an important percentage of early infections, with negative antibodies and only positive HIV p24 (3% in blood banks in Bogota, Colombia). Out of the aforesaid emerged the need to confirm early infections detected by fourth generation test that identify p24 antigen and anti-HIV antibodies, but that are false negatives in confirmatory laboratory tests such as Western Blot. These patients have acute infection, which are very infectious, and contribute as a significant effect to spread infections. This is solved with the detection of RNA HIV and a new algorithm that has been successfully evaluated in two different studies. It is also recommended to repeat the test in 2 to 4 weeks after the first test when there are conflicts in the results.

**Keywords:** HIV. Diagnosis Algorithm. Blips. HIV p24.

#### RESUMO

Os exames de laboratório de terceira e quarta geração para o VIH, detectam anticorpos tipo IgG e IgM; os de quarta além disso, detectam a proteína p-24 do VIH que aparece antes que os anticorpos tipo IgM. Pelo anterior, com o algoritmo disponível para os exames de até terceira geração, pode-se deixar de detectar até o 60% das infecções pelo VIH-1 e VIH-2. Nos bancos de sangue, o uso dos exames de quarta geração pode detectar uma percentagem importante de infecções iniciais, com anticorpos negativos e somente p-24/VIH positivo (3% em bancos de sangue de Bogotá, Colômbia). Pelo anterior surgiu da necessidade de confirmar as infecciones iniciais detectadas pelos exames de quarta geração que detectam antígeno-p24 e anticorpos anti-VIH, porém são falso-negativos nos testes confirmatórios como Western Blot. Estes pacientes têm infecção aguda, são muito infectantes e contribuem de forma importante à disseminação da infecção. Isto se resolve com a detecção do RNA-VIH e um novo algoritmo que já tem sido avaliado com sucesso em dois (2) diferentes estudos. Recomenda-se além, repetir os exames nestes casos discordantes nas 2 - 4 semanas depois da primeira avaliação.

**Palavras-chave:** VIH. Algoritmo Diagnóstico. Blips. p-24.

### Nuevas pruebas serológicas para VIH

Como ocurrió en la década del noventa, el desarrollo de nuevas pruebas para la detección de la infección por VIH, marcó grandes avances en el conocimiento de este problema y promovió la tecnología para detección de infecciones en general. Igualmente, la aparición de nuevos algoritmos de interpretación.

Las pruebas de cuarta generación, para detección simultánea de Antígeno p-24/VIH y anticuerpos anti-VIH, aparecieron ante la necesidad de detectar tempranamente la infección e intervenirla.

Difieren de las existentes hasta tercera generación, en su plataforma, sensibilidad, especificidad y valores predictivos (VP,VPN), al momento de la infección y también de acuerdo a la prevalencia media de infección en la población de la cual procede el sujeto examinado con ellas.<sup>1,2</sup>

Como se mejoró mucho la especificidad con anticuerpos monoclonales de captura, pero con eso se perdió también sensibilidad, se han desarrollado nuevos métodos automatizados para detección, que aumentaron hasta 10 veces la sensibilidad con relación a los ELISAs de tercera generación. Estos nuevos métodos incluyen a la quimioluminiscencia (QS) y a la electroquimioluminiscencia (ELQ), con sus respectivos lectores.

Por otra parte, los algoritmos de confirmación diseñados para las pruebas de ELISA, se han seguido usando para las nuevas pruebas de cuarta generación, pero no resuelven todos los casos donde hay discrepancias y/o resultados difíciles de interpretar.<sup>3,4</sup>

En algunas veces porque la sensibilidad de estas técnicas confirmatorias es menor que la de las pruebas presuntivas; en otras porque la prueba presuntiva detecta antígeno p-24 de VIH sin anticuerpos, lo cual puede ocurrir en infecciones tempranas. Esto se ilustra en la figura 1, donde se muestra la secuencia en la cual aparecen los antígenos, anticuerpos y RNA del VIH después de la infección.

En la tabla 1, aparecen la sensibilidad y especificidad de las serologías disponibles para VIH y el momento en el cual detectan la infección.

Por otra parte, los problemas que no se habían resuelto para la confirmación de ELISAs aún de tercera generación, siguen vigentes. Y hay nuevos.

Por ejemplo el de los indeterminados y el de los falsos negativos. Especialmente por problemas de definiciones para la interpretación de pruebas como western blot, dot blot, ensayo lineal, que además contienen antígenos de diferente origen: naturales, de síntesis y/o quiméricos.<sup>5</sup>

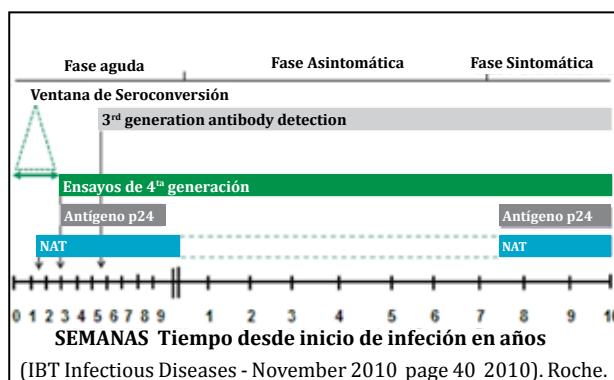


Figura 1. Diagnóstico y tamizaje, ensayos combinados. Antígeno/anticuerpo ayudan a cerrar la venta inmunológica.

Tabla 1. Ensayos disponibles para VIH							
Especificaciones claves	Roche	Roche	Abbott	Abbott	Bayer	Bayer	Ortho
	Elecsys HIV Combl 4th gen	Elecsys HIV Combl 4th gen	Axsym HIV combo 4th gen	Architect HIV combo (CE) 4th gen	ADVIA Centaur HIV como 4th gen	Centaur Anti-HIV 3rd gen	Vitros ECI Anti-HIV 3rd gen
Seroconversión sensitivity* (retraso vs. NAT)	~ 8 days	~ 6 days	~ 6 days	~ 5 days	~ 6 days	~ 14 days	~ 14 days
Especificidad en donates de sangre	99.62% 99.76%	>99.7% >99.8%	99.8%	> 99.6% 99.89%	99.64% xx %	100% (n=2191) 99.86%	n.l. 99.9%
	4a Gen				3a Gen		

Para resolver estos problemas se han ensayado varias soluciones. La primera, es **repetir la prueba antes de la confirmatoria (western blot, dot blot, ensayo lineal)** en otro laboratorio, con una tecnología similar, en la misma o en una segunda muestra. Estos resultados pueden ser diferentes, por la sensibilidad.

Se ha llegado a proponer algoritmos de confirmación con este principio; pero así son más los problemas que se consiguen que los resueltos. Y además de generar angustia en el paciente estudiado, pueden hacer perder tiempo muy importante para tomar decisiones terapéuticas y pueden favorecer la transmisión del VIH.

Una segunda alternativa, es **hacer directamente la prueba confirmatoria (western blot, dot blot, ensayo lineal)** a todas las muestras reactivas para antígeno p-24 de VIH, anticuerpos anti- VIH o ambas.

Esto puede ayudar a resolver la mayoría de los positivos con anticuerpos anti-VIH, pero no los **reactivos para p-24/VIH sin anticuerpos** (y tampoco confirma o descarta la positividad para p-24/VIH), una condición que no es tan infrecuente como se creía.<sup>6,7,8</sup>

En un estudio realizado por el autor con otros colaboradores,<sup>9</sup> en muestras de bancos de sangre de Bogotá, Colombia, de las más de 7.000 donaciones que se hicieron en la ciudad en un año, se encontraron 526 doblemente reactivas para anti-VIH, en los bancos. Repetidas en el Laboratorio de Salud Pública por una prueba de cuarta generación (ELFA, Quimioluminiscencia, Duo- Ag-Ac de Biomerieux, Francia) 138 (26.2%) se encontraron reactivas; de ellas 106 se confirmaron para VIH-1 por ensayo lineal para VIH 1,2,0 (Innolia, Biomerieux, Francia) y 4 (2.9 %) fueron positivas solamente para el antígeno p24/VIH. De las negativas por ELFA, se encontraron 8 con una banda detectable y 1 que se confirmó positiva por LIA (Innolia, Biomerieux, Francia).

Entre los negativos por ELFA había positivos por ELQ (ELECYS HIV combi Roche, Alemania). Por eso se hicieron análisis adicionales en Penzberg, Alemania con antígenos recombinantes de glicoproteínas -VIH (gp42-VIH, gp36-VIH-2, subtipo-O de VIH), y Transcriptasa reversa (RT-VIH 1, RT-VIH-2) en pruebas de ELQ.

Los resultados se muestran en la tabla 2, donde puede verse que varias de las muestras correspondían a VIH-2.

**Tabla 2. Análisis de interferencia Elecsys HIV combi (casos HCB-nov/dic-2010)**

	Proteínas re-combinantes				Péptidos		Anticuerpos	L-HIV-c 154545
Muestra	gp4/1-Ru	HIV-1/RT	gp35-Ru	HIV-Z/RT	Sub-O/Ru	gp35-Ru	MAK<p24>/Ru	Valores COI
Neg1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0.23
Neg2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0.10
Neg3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0.15
263230	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1.24
263400	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0.57
262812	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0.79
262445	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1.51
261033	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1.55
263212	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	2.35
261202	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0.57
263090	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	2.09
262734	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	1.15
264444	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1.15
262138	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1.41
262633	POS	Volumen de muestra insuficiente						1.33
262214	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	1.59
262959	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	0.79
Controles 5p	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS

**Fuente:** Schmit, U. Roche, Penzberg, Alemania. 11/junio/2010.

Además, hay que considerar que actualmente se dispone de pruebas confirmatorias que solo contienen VIH-1, otras para VIH 1,2 y otras para VIH 0,1,2. Y que aún en estas últimas, hay reactividad cruzada con otros Retrovirus como HTLV I/II (Virus de Leucemia Linfocítica de Células T del Adulto, Paraparesia Espástica Tropical) y BLSV (Virus de Leucemia Bovina) para citar solo dos de los más comunes.

El uso de estas pruebas confirmatorias que solo detectan anticuerpos anti-VIH-1, también puede ser causa de falsos negativos en las pruebas confirmatorias.<sup>5,10,11</sup>

Esto se ilustra con el caso de la paciente GC - 034456, Mujer de 23 años, natural y procedente de Bogotá, hipertensa, en Insuficiencia Renal y diálisis peritoneal ambulatoria (CAPD); a quien se le practicó prueba rutinaria para anti-VIH y gp-24/VIH de cuarta generación (ELECYS HIV combi Roche, Alemania), que fue claramente reactiva en 2 laboratorios diferentes y automatizados:

Muestra 1 : 38.96 (ELECYS HIV combi), Cl. P/Bogotá.  
Muestra 2 : 38.90 / 43.58 (ELECYS HIV combi), Cl S./ Bogotá.

Calibración en 3 corridas : OK

Controles de calidad en 3 corridas : OK

La prueba confirmatoria se hizo solamente para anti-VIH 1 (Davi Bloth, Tecnosuma, Cuba) y fue no-reactiva.

El resultado de las pruebas realizadas en Penzberg, aparece en la tabla 3, donde puede verse que posiblemente es una infección temprana.

Este problema de las discordancias entre pruebas confirmatorias y presuntivas de cuarta generación, más sensibles y que detectan analitos diferentes es nuevo.

Las pruebas confirmatorias (western blot, dot blot, ensayo lineal), como se dijo, fueron diseñadas para ELISAs que tienen sensibilidad hasta 10 veces menor per se, que las actuales pruebas de cuarta generación. Y en especial es importante para las pruebas confirmatorias indeterminadas.

Para algunos autores, incluidos los de las Guías para el manejo de VIH/SIDA en Colombia, este problema se resuelve con muestras seriadas y repetición de las pruebas.<sup>12</sup> Porque según ellos, "la mayoría de los pacientes con infección VIH se resuelve en el primer mes de seguimiento".

La experiencia del autor quien atiende pacientes con infecciones por Retrovirus desde hace años, no es ésta y ha visto varios casos en los cuales la condición de indeterminado persiste por meses y aún por años. También hay publicaciones con resultados similares.<sup>10</sup>

Otros autores, resuelven el problema eliminando la categoría indeterminado.

Así, las muestras con una o más bandas reactivas para antígenos de Retrovirus (anti-pa24, anti-p17, anti-gp 120 por ejemplo), se consideran negativas.<sup>13</sup>

Pero en esta categoría hay individuos con y sin factores de riesgo para infección VIH, con y sin antígeno p-24/VIH +, como se ha visto.

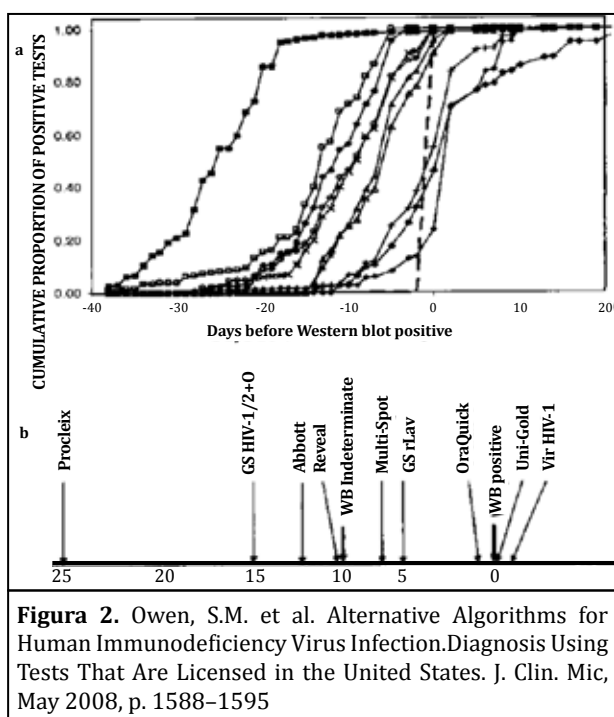
**Tabla 3. Análisis de interferencia Elecsys HIV combi (caso GC-034456)**

	Proteínas recombinantes				Péptidos		Anticuerpos	L-HIV-c 154645
Muestra	gp4/1-Ru	HIV-1/RT	gp36-Ru	HIV-2/RT	Sub-0/Ru	gp36-Ru	MAK<p24>/Ru	Valores COI
Neg1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0.25
Neg2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0.22
Neg3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	0.38
M1-GC-033456	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	34.3
M2-GC-033456	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	28.7
Controles 8p	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS

Fuente: Schmit, U. Roche, Penzberg, Alemania. 19/abril/2010.

Y hay publicaciones sobre seguimiento a estos casos, en varias de las cuales se llega a la conclusión de que no eran negativos, sino infecciones tempranas por VIH o reacciones cruzadas por otros Retrovirus.<sup>10,14,15</sup>

Igualmente, se ha probado que hay falsos negativos de las pruebas confirmatorias para ELISAs debidos a infecciones tempranas con respuesta incompleta, como se ve en la figura 2.<sup>3,16,17</sup>



Este problema de los reactivos para anti-VIH/Ag p-24 de VIH que no se repiten en otras pruebas presuntivas y/o se confirman, es especialmente crítico en los Bancos de Sangre.

Por una parte porque un donante voluntario y clínicamente asintomático con pruebas presuntivas reactivas y confirmatorias positivas, pasa a ser un caso de infección asintomática VIH.

Pero especialmente porque aquellos que no se confirman por problemas de sensibilidad como los anotados arriba, puede ser un falso negativo o una infección cruzada con otro Retrovirus.<sup>15</sup>

Las pruebas de cuarta generación, como la de Electroquimioluminiscencia (ELQ) para VIH, resuelven en gran medida estos problemas y los de interferencias, pero generan otros.

En el caso de las pruebas de cuarta generación, el perfil está claro: "HIV combi Antígeno del VIH-1 y anticuerpos totales contra el VIH-1 y el VIH-2. Es un test inmunológico in vitro para la determinación cualitativa del antígeno p24 del VIH-1 y de los anticuerpos contra el VIH-1, incluyendo el grupo O, y contra el VIH-2 en suero y plasma humanos. Este inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (electrochemiluminescence immunoassay) "ECLIAE y Requiere: analizadores automáticos Elecsys 2010 y en el módulo Elecsys MODULAR ANALYTICS E170.

La prueba resolvió varios de los problemas que había con interferentes de ELISA:

- Lipemia (triglicéridos < 2800 mg/dl)
- Hiperbilirrubinemia < 222 μmol/L (< 13 mg/dL)
- Hemolisis Hb < 0,994 mmol/L (< 1,6 g/dL),
- Biotina < 205 nmol/L (< 50 ng/mL)
- Factor Reumatoideo (2300 U/ml)

Y no tiene interferencia por 17 medicamentos de uso común:

- |                  |                          |
|------------------|--------------------------|
| 1 Acetylcysteine | 9 Methyldopa + 1,5       |
| 2 Ampicilina     | 10 Metronidazole         |
| 3 Ascorbic acid  | 11 Phenylbutazone        |
| 4 Cyclosporine   | 12 Doxycyclin            |
| 5 Cefoxitin      | 13 Acetyl-salicylic acid |
| 6 Heparin        | 14 Rifampicin            |
| 7 Intralipid     | 15 Acetaminophen         |
| 8 Levodopa       | 16 Ibuprofen             |
|                  | 17 Theophylline          |

Aunque sí puede tener problemas con otros interferentes:

- Terapia con altas dosis de biotina (>5 mg/día)
- Tratamiento previo con monoclonales (Mabs) de ratón.
- Exámenes diagnósticos previos con Mabs de ratón.
- Altos títulos de anticuerpos contra streptavidina y ruthenium (muy raros).

Y por su alta sensibilidad, requiere un algoritmo diagnóstico diferente que se muestra más adelante.

**Nuevas pruebas para detección de carga viral. Los "blips"**

Las pruebas de laboratorio para detección del RNA-VIH, Se conocen comúnmente como "pruebas de carga viral". Cuantifican la cantidad de virus presente en 1 ml. de plasma y en los leucocitos de esa muestra. Se informan en cps/ml, UI/ml, logs./ml.

Hay varias disponibles. Difieren en su principio, puntos de corte y las cps/ml, UI/ml, logs./ml. que detectan.

Las exigencias para ellas han variado en función de las metas terapéuticas.

Permite definir el estatus de la infección, su curso, orientar decisiones terapéuticas, hacer seguimiento de la terapia ARV. Además, sospechar resistencia. No sirve para confirmación de serología VIH.

Las nuevas pruebas detectan 1-10 cps./ml de RNA-VIH y visualizan blips.<sup>14</sup>

Los blips son cargas virales del VIH entre 48- 200 cps/ml en un paciente que recibe ARV y que vuelven a ser indetectable en una nueva medición. Se ilustran en la figura 3.

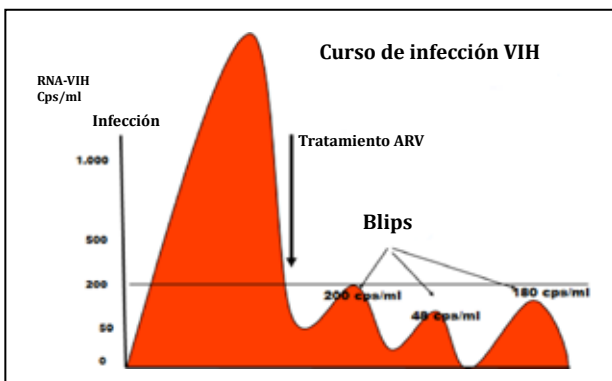


Figura 3. Blips en un paciente con infección VIH en tratamiento ARV.

Se diferencian de los Rebotes virológicos en donde el RN-VIH es detectable > 200 cps/ml, después de haber conseguido supresión viral. Y de la Viremia de bajo nivel, que está por encima de 200 cps/ml y es < 1000 cps/ml.

El significado de estos picos de baja carga viral, parece estar relacionado con pequeños clones de virus resistentes, que comienzan a aumentar y por eso predicen resistencia al antiretroviral que se usa. Indican por lo tanto la necesidad de hacer pruebas de resistencia viral, con técnicas de alta sensibilidad.

### Nuevo algoritmo diagnóstico para la infección por VIH (figura 4)

Surgió de la necesidad de confirmar las infecciones tempranas detectadas por las pruebas de cuarta generación que detectan antígeno-p24 y anticuerpos anti-VIH, pero **son falsos negativos en las pruebas confirmatorias como Western Blot.**<sup>19,20</sup>

Estos pacientes son muy infectantes y contribuyen en forma importante a la diseminación de la infección.

En un estudio realizado en Phoenix, Arizona (Emergency Department (ED), July 2011–February 2013), se identificaron 99 casos en los cuales las pruebas presuntivas de cuarta generación fueron reactivas y 55 (55.6%) con confirmatorias negativas.<sup>21</sup>

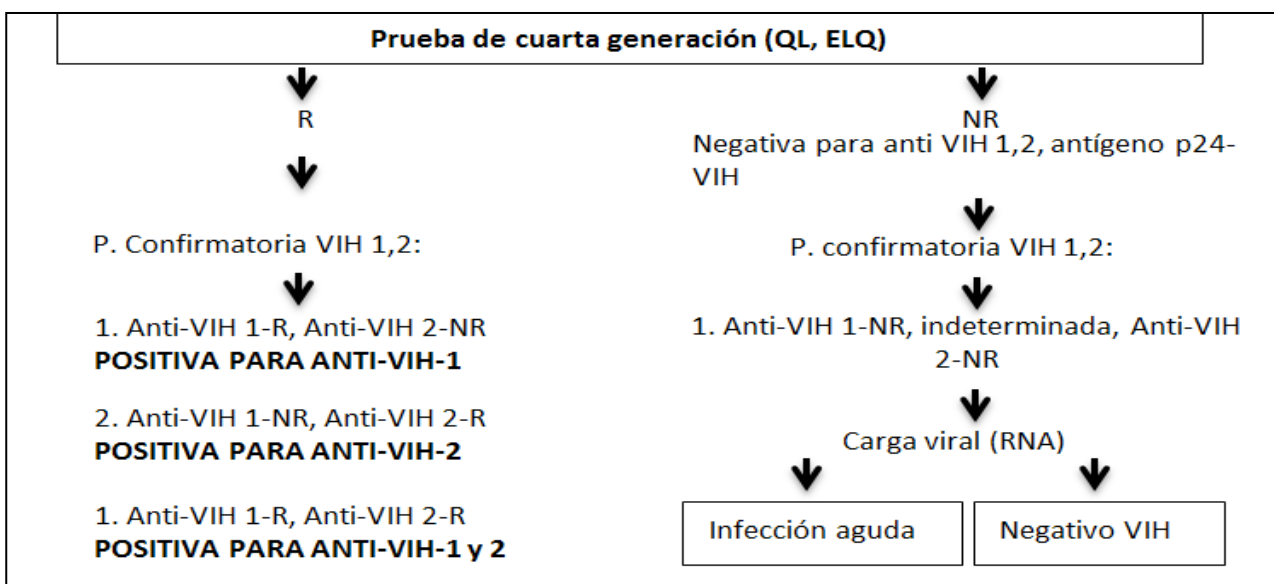


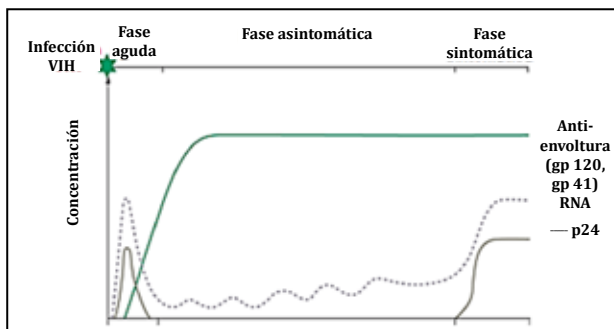
Figura 4. Nuevo algoritmo para diagnóstico de infección VIH. \*Se deben hacer pruebas adicionales para VIH-2 Adaptado de: MMWR/june 21, 2013/vol. 62/No. 24

Como se dijo antes, los CDC identificaron en otro trabajo ya mencionado arriba (Owen, S.M. et al. Alternative Algorithms for Human Immunodeficiency Virus Infection. Diagnosis Using Tests That Are Licensed in the United States. J. Clin. Mic, May 2008, p. 1588–1595) que estas confirmatorias pueden ser negativas en infecciones agudas.

Esto se puede resolver buscando en estas muestras el RNA-VIH. Hubo 37 casos no detectados por ELISA y de ellos 12 (32.4%) eran infecciones agudas.

Lo anterior se debe a que las pruebas anteriores a las de tercera generación, usaban antígenos lisados de cultivos celulares y recombinantes, que solo detectaban anticuerpo IgG anti-VIH.<sup>22</sup>

Las pruebas de laboratorio de tercera y cuarta generación detectan anticuerpos tipo IgG e IgM; y las de cuarta además detectan la proteína p-24 del VIH, que aparece antes que los anticuerpos tipo IgM, como se ilustra en la figura 5.



**Figura 5. Infección VIH y sus marcadores de acuerdo a fase clínica.**

Por lo anterior, con el algoritmo disponible para las pruebas de hasta tercera generación, se puede dejar de detectar hasta el 60% de las infecciones por VIH-1 y 2. El nuevo algoritmo resuelve este problema y ya ha sido evaluado exitosamente en dos diferentes estudios.<sup>21,22</sup>

Se recomienda además, repetir las pruebas en estos casos discordantes en 2 -4 semanas después de la primera evaluación, cuando la mayoría se resuelven con claridad.

## Referencias bibliográficas

- Gürtler, A, L., Muhlbacher, A. et al. Reduction of the diagnostic window with a new combined p24 antigen and human immunodeficiency virus antibody screening assay. Journal of virological methods. 1(75): 27-38, 1998.

- Duong L, T, Ebel, A, Faucher, V, Fihman, V, Laperche, S. Could the new HIV combined p24 antigen and antibody assays replace p24 antigen specific assays? Journal of Virological Methods. 143: 86-94, 2007.
- Weber, B., Gürtler, L. et al. Multicenter Evaluation of a New Automated Fourth Generation Human Immunodeficiency Virus Screening Assay with a Sensitive Antigen Detection Module and High Specificity. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. 938-1946, June 2002.
- Settergren, B. L. Å. Burman et al. Long-term Persistence of False Positive Antibody Reactivity in HIV Western Blot Testing of Sera from a Healthy Blood Donor. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 2(21): 233-235, 1989.
- Jack Stapleton, Judith Britz, James R. Carlson and James Folds. A Patient with AIDS and a False Negative HIV Western Blot. Infection Control, Vol. 8, No. 12 (Dec., 1987), pp. 490-491.
- Caspari, J. Beyer, E Schunter, J. Knaver-Hopf, and H. Schmitt. HIV-Specific Antibody Among Voluntary Blood Donors in Lower Saxony (FRG). Blut (1987) 55:181-187.
- Settergren, L., Å. Burman, Å. Gustafsson, P. Juto, Quan-Gen Li, G. Wadell. Long-term Persistence of False Positive Antibody Reactivity in HIV Western Blot Testing of Sera from a Healthy Blood Donor. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 1989, Vol. 21, No. 2, Ppp 233-235.
- Hoyos, O, Gómez B, C, Vanegas A, N, Jaramillo H, J, Estrada M, S. Falso Negativo en la prueba de Western Blot en un paciente con el síndrome de inmunodeficiencia Adquirida. Infectio. 7(3): 173-176, 2003.
- MPS de Colombia Guía de práctica Clínica VIH/Sida. Bogotá, 2006.
- Ly, TD, Ebel, A. Et al. Could the new HIV combined p24 antigen and antibody assays replace p24 antigen specific assays? Journal of Virological Methods 143 (2007) 86-94. C B
- Hare, B L Pappalardo, M P Busch, B Phelps, S S Alexander, C Ramstead, J A Levy, F M Hecht. Negative HIV Antibody Test Results Among Individuals Treated With Antiretroviral Therapy (ART) During Acute/Early Infection. THE XV INTERNATIONAL AIDS CONFERENCE (Poster MoPeB3107). G
- Owen, S.M. et al. Alternative Algorithms for Human Immunodeficiency Virus Infection. Diagnosis Using Tests That Are Licensed in the United States. J. Clin. Mic, May 2008, p. 1588-1595.
- CDC.- USA. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010. Recommendations and Reports December 17, 2010 / Vol. 59 / NoRR-1.
- Gómez M., M., Osorio E de J, Jaramillo, A.C. Valoración del Algoritmo Confirmatorio para Infección VIH en el LSP, en pruebas de tamizaje realizadas por la Red Distrital de Bancos de Sangre Marzo 2009 - Febrero 2010, Bogotá, Colombia. Medicina Transfusional. Memorias del VI Congreso Colombiano, XIII Congreso Iberoamericano, V Simposio Andino de Bancos de Sangre y Medicina Transfusional y III Simposio Colombiano de Bancos de Tejidos. Bogotá, 3 al 6 de junio de 2010.
- Castillo, A. et al. GUÍA DE ATENCIÓN INTEGRAL VIH /SIDA 2010. Programa Nacional de Prevención y Control de VIH/SIDA, Ministerio de Salud del Ecuador.
- Masciotra S, McDougal JS, Feldman J, Sprinkle P, Wesolowski L, Owen SM. Evaluation of an alternative HIV diagnostic algorithm using specimens from seroconversion panels and persons with established HIV infections. J Clin Virol 2011;52(Suppl 1):S17-22.

17. Branson BM, Mermin J. Establishing the diagnosis of HIV infection: new tests and a new algorithm for the United States. *J Clin Virol* 2011;52 (Suppl 1):S3-4.
18. Styer LM, Sullivan TJ, Parker MM. Evaluation of an alternative supplemental testing strategy for HIV diagnosis by retrospective analysis of clinical HIV testing data. *J Clin Virol* 2011;52(Suppl 1):S35-40.
19. Gómez, M. L., Jaramillo, A.C., Uñate, M.R. VIH-2 en la Red Distrital de Bancos de Sangre de Bogotá. *Medicina Transfusional*. Vol 10(1): 101,2012.
20. Rifkin, S B, ScM, Lauren, E. Owens,, J. L. Greenwald. Factors Associated With False-positive Results From Fingerstick OraQuick ADVANCE Rapid HIV 1/2 Antibody Test. *J Int Assoc Physicians AIDS Care*. 2012;11(6):356-360.
21. Nasrullah M, Wesolowski LG, Meyer WA 3rd, et al. Performance of a fourth-generation HIV screening assay and an alternative HIV diagnostic testing algorithm. *AIDS* 2013;27:731-7.
22. Geren, K, MD, Moore, E, Tomlinson, Ch., and others. Detection of Acute HIV Infection in Two Evaluations of a New HIV Diagnostic Testing Algorithm — United States, 2011–2013. *MMWR* / June 21, 2013 / Vol. 62 / No. 24.