

ARTICULO ORIGINAL

Evaluación de diez pruebas rápidas para el diagnóstico del virus de la inmunodeficiencia humana

Evaluation of ten rapid tests for the diagnosis of human immunodeficiency virus

***Bobadilla ML¹, Zorrilla ME¹, Mancuello A¹, Goldman M¹, Prieto F¹, López G², Peláez, R², Samudio M³**

1. Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP), Dpto. de Inmunología. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social.Asunción-Paraguay
2. Programa Nacional de Control de SIDA/ITS (PRONASIDA). Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social.Asunción-Paraguay
3. Dirección General de Vigilancia de la Salud (DGVS). Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social.Asunción-Paraguay

RESUMEN

Actualmente, existen numerosas pruebas rápidas (PR) con sensibilidad y especificidad cercanas al 100% para la detección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La incorporación de las mismas ha sido apoyada por la Organización Mundial de la Salud y han sido adoptadas en algoritmos nacionales en muchos países. Sin embargo, a pesar de que la mayoría han sido sometidas a estudios de evaluación, se recomienda realizar evaluaciones análogas a nivel nacional o regional. Se evaluó el desempeño de diez PR para diagnóstico del VIH usando muestras de sueros bien caracterizadas, anónimas, provenientes de pacientes que acudieron al laboratorio del Programa Nacional de Control de SIDA/ITS (PRONASIDA). Fueron incluidos 433 especímenes, todos testados por EIA, de los cuales 228 (53%) tuvieron resultados negativos y 205 (47%) positivos, estos últimos fueron confirmados por WB. Las diez PR evaluadas fueron aplicadas de forma enmascarada. De las PR estudiadas, seis presentaron una sensibilidad y especificidad no menores a 99% y 98%, respectivamente, como ha sido recomendado por la OMS para ser incluidas en los algoritmos nacionales para el diagnóstico del VIH mediante la utilización de pruebas rápidas. Las PR tienen un desempeño comparable al EIA, un resultado negativo puede ser considerado como definitivo, a no ser que haya posibilidades de estar en el periodo ventana de la exposición y un resultado positivo debe ser interpretado como de alta probabilidad de positividad para VIH, pero pendiente de ser corroborado con pruebas confirmatorias más específicas. Las PR pueden ser utilizadas como alternativa para el tamizaje serológico de esta patología.

Palabras clave: VIH, pruebas rápidas, tamizaje

ABSTRACT

Currently, there are several rapid tests (RT) for the detection of human immunodeficiency virus (HIV) with sensitivity and specificity close to 100%. The incorporation of these tests has been supported by the World Health Organization and they have been adopted in national algorithms in many countries. However, it is recommended to perform national or regional analogous evaluations of them though most of them have been already subjected to evaluation studies. We evaluated the performance of ten RT for HIV diagnosis using well characterized and anonymous serum samples from patients that

*Autor Correspondiente: **Dra. María Liz Bobadilla**. Laboratorio Central de Salud Pública. Departamento de Inmunología. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Venezuela y Florida
Email: bobadillaml@gmail.com. Fecha de recepción: Setiembre de 2011, Fecha de aceptación: Noviembre de 2011

attended the laboratory of the National Control Program of AIDS/STD. Using EIA, 433 specimens were tested and 228 (53%) were negative and 205 (47%) positive being the latter confirmed by WB, then ten RT were evaluated blindly. Of the RT evaluated, six showed sensitivity and specificity higher than 99% and 98%, respectively according to the recommendation of the WHO to include these RT in the national algorithms for HIV diagnosis. RT have performance comparable to EIA, a negative result could be considered as definite unless there are possibilities of the patient being in the window period of the exposure and a positive result should be interpreted as high probability of HIV positivity but depending on more specific confirmatory tests. The RT could be used as alternatives to the serologic screening of this pathology.

Keywords: HIV, rapid tests, screening

INTRODUCCIÓN

El procedimiento estándar para el diagnóstico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se realiza mediante la detección de anticuerpos anti-VIH por enzoinmunoensayos (EIA), seguido de la confirmación por western blot (1-3). Este sistema es altamente sensible y específico, pero presenta algunas desventajas operacionales como el requerimiento de equipamientos y técnicos de laboratorio entrenados; además el tiempo de reporte del resultado puede demorar entre 1-2 semanas, implicando el retraso en el diagnóstico y muchas veces la pérdida del seguimiento del paciente.

En 1987, poco después de la introducción de los enzoinmunoensayos, las pruebas rápidas (PR) para detección de anticuerpos anti-VIH comenzaron a hacerse disponibles en el mercado. Inicialmente presentaban un desempeño bastante pobre frente a EIA; sin embargo, en los últimos años, estas PR han sido mejorados notablemente y fueron desarrollados otros ensayos basados en nuevas tecnologías. De esta forma, un resultado positivo obtenido mediante esta metodología de diagnóstico, podría ser interpretado como preliminar y sería comparable con los resultados del EIA, requiriendo ser corroborados con pruebas confirmatorias más específicas como western blot (4-9).

Su utilización ha sido recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), ya sea en algoritmos que emplean estas PR o una combinación de PR y EIA para el diagnóstico de la infección por VIH, pero es fundamental que las pruebas que se utilicen tengan una sensibilidad de por lo menos el 99% y una especificidad de por lo menos el 98% (10-15). Otros factores que deben ser evaluados al escoger una determinada PR, son las características operacionales como la temperatura de transporte y almacenamiento, el número de reactivos necesarios y de pasos en el ensayo, el tiempo hasta la lectura de la prueba, nivel de entrenamiento del operador, etc. (4,7).

Actualmente, existen en el mercado tanto pruebas inmunoenzimáticas como pruebas rápidas de diagnóstico del VIH que satisfacen estos criterios y se puede obtener información en estudios de evaluación comparativa de las distintas pruebas, a partir de publicaciones científicas internacionales o de informes de la OMS. Sin embargo, está recomendado realizar evaluaciones comparativas análogas en el ámbito nacional o regional con antelación a la definición de los algoritmos nacionales. El laboratorio nacional rector es el responsable de validar una cantidad seleccionada de opciones de las pruebas que puedan ser utilizadas en los algoritmos nacionales (15).

La mayoría de las PR disponibles en nuestro país ya han sido evaluadas por OMS (4) y por otros estudios realizados en diferentes países (16-23), pero no se ha realizado a nivel local un estudio con un tamaño de muestra estadísticamente significativo y con la

metodología propuesta en este trabajo en el que fueron incluidas diez marcas proveídas sin costo para el LCSP por las empresas importadoras. De esta manera, el objetivo del presente estudio fue evaluar el desempeño de diez PR para diagnóstico del VIH usando muestras de sueros bien caracterizadas, anónimas, provenientes de pacientes que acudieron al laboratorio del Programa Nacional de Control de SIDA/ITS (PRONASIDA).

MATERIALES Y METODOS

Diseño del estudio: observacional descriptivo con muestreo de corte transversal de pruebas diagnósticas.

Población: pacientes de ambos sexos y de todas las edades, procedentes de diferentes regiones del país, que acudieron al laboratorio del PRONASIDA entre agosto a noviembre del 2011 para conocer su estado serológico para VIH, la confirmación diagnóstica, la condición inmunológica con el estudio de linfocitos T CD4 y/o el monitoreo de la evolución con la carga viral plasmática. Situación

Selección de muestras: a partir de las 2048 muestras de sueros recolectados, se fueron seleccionados por conveniencia, un total de 433 especímenes, compuesto por 205 positivos y 228 negativos. Todas las muestras fueron testadas por enzimoanálisis (EIA) y aquellas con resultados positivos confirmadas por Western Blot (WB).

Pruebas de referencia: EIA, Murex HIV Ag/Ab Combination (Abbott Diagnostics, Reino Unido) y WB, HIV BLOT 2.2 (MP Diagnostics, Singapur); fueron realizadas por el Laboratorio del PRONASIDA. Los datos obtenidos con estos ensayos de referencia sobre la presencia o ausencia de anticuerpos anti-VIH fueron comparados con los resultados obtenidos con las PR evaluadas.

Pruebas rápidas: las PR para VIH evaluadas fueron Advanced Quality One Step anti-HIV (1&2) Test (Intec, China); SmarTest Diagnostics HIV 1&2 Serum/Plasma Cassette (Orgenics, Israel); Inmuno-Rapido HIV 1&2 (Wama Diagnostica, Brasil); SD Biline HIV-1/2 3.0 (Standard Diagnostics, Korea); On Call (Acon, USA); SD Biline Ag/Ab Combo (Standard Diagnostics, Korea); Determine HIV-1/2 (Inverness Medical, Japón); HIV 1/2/O Tri-line Human Inmunodeficiency Virus, Rapid Test Device (Accurate, USA); DoubleCheckGold HIV 1&2 (Orgenics, Israel) y Alere HIV-1/2 Ag/Ab Combo (Alere Medical, Japón); y éstas, han sido proporcionadas por las empresas importadoras sin ningún costo al LCSP y fueron aplicadas en el Departamento de Inmunología. Cinco profesionales testaron las PR con cada espécimen seleccionado de forma enmascarada; es decir, sin conocer el resultado de las pruebas de referencia y siguiendo estrictamente las instrucciones de los fabricantes.

Criterios de evaluación analizados: sensibilidad, especificidad; así como el desempeño operacional de las pruebas en estudio (T° de almacenamiento; N° de pasos en el ensayo; tiempo de realización del ensayo; experiencia del operador; necesidad de instrumentos de laboratorio no provistos; instrucciones en español y tipos de muestras que pueden ser utilizadas).

Análisis estadístico: Se utilizaron herramientas estadísticas para estimar el tamaño mínimo de muestra requerido para un estudio descriptivo de una variable dicotómica y un nivel de confianza del 95% (25), y se obtuvo un mínimo de 203 especímenes negativos para determinar la especificidad y un mínimo de 203 especímenes positivos para la sensibilidad. Los resultados fueron introducidos en una planilla Excel (Microsoft Office, 2010) y posteriormente analizados por el Software Estadístico JMP 9. Se determinaron la sensibilidad, especificidad con 95% de intervalo de confianza (IC) de cada una de las PR en estudio.

Para evaluar el desempeño operacional de las PR se tuvieron en cuenta algunas características operativas positivas (asignándole una puntuación igual a 1) y negativas (asignándole una puntuación igual a 0), como la **temperatura de almacenamiento** (1, temperatura ambiente; 0, necesita refrigeración, 2-8°C; **pasos en el ensayo**, considerando aplicación de la muestra, aplicación del buffer, incubación y lectura (1,

igual o menos que cuatro pasos; 0, más de cuatro pasos); **tiempo de realización del ensayo**, incluye un promedio de 20 segundos por paso + el tiempo de incubación. (1, igual o menos de 20 min; 0 más de 20 min); **expertise del operador** (1, el operador no necesita experiencia en el laboratorio; 0, el operador necesita experiencia en el laboratorio); **necesidad de instrumentos de laboratorio no provistos en el kit**, ej: pipeta automática (1, no necesario; 0, se requiere pipeta para dispensar la muestra/buffer); **instrucciones en español** (1,sí; 0, no); y, **tipos de muestras utilizadas** (1, suero, plasma y sangre total; 0 sólo suero o plasma y no sangre total) (4).

Asuntos éticos: los especímenes seleccionados para ser testados con las PR en este estudio, fueron codificados para mantener la confidencialidad de los datos.

RESULTADOS

Fueron incluidos 433 especímenes, todos testados por EIA, de los cuales 228 (53%) tuvieron resultados negativos y 205 (47%) positivos, estos últimos fueron confirmados por WB. Sobre los resultados obtenidos con las pruebas de referencia se calcularon la sensibilidad y especificidad de cada una de las PR evaluadas. Como puede observarse en la Tabla1, 6/10 de las PR mostraron una sensibilidad igual o mayor al 99%; en cuanto a la especificidad, 7/10 presentaron valores superiores al 98%.

Se observó que la frecuencia de falsos negativos es menor que la de falsos positivos. Comparado con las pruebas de referencia, la **Marca 5** presentó mayor porcentaje de falsos negativos, 2,9% y la **Marca 9** presentó mayor porcentaje de falsos positivos, 7,9%.

Tabla1. Sensibilidad y Especificidad de las diez pruebas rápidas para VIH evaluadas.

	Falsos negativos Nº (%)	SENSIBILIDAD (N = 205) % (IC 95%)	Falsos positivos Nº (%)	ESPECIFICIDAD (N = 228) % (IC 95%)	Débiles positivos Nº (%)	% Pacientes correctamente diagnosticados
Marca 1	1 (0,5)	99,5 (96,9 - 100)	1 (0,4)	100 (97,9 - 100)	5 (2,4)	99,8
Marca 2	2 (1)	99,0 (96,2 - 99,8)	5 (2,2)	97,8 (94,7 -99,2)	3 (1,5)	98,4
Marca 3	5 (2,4)	97,6 (94,1 - 99,1)	6 (2,6)	97,4 (94,1 - 98,9)	10 (4,9)	97,5
Marca 4	3 (1,5)	99,5 (96,9 - 100)	3 (1,3)	98,7 (95,9 - 99,7)	1 (0,5)	99,1
Marca 5	6 (2,9)	97,1 (93,4 - 98,8)	2 (0,9)	99,1 (96,5 - 99,9)	63 (31)	98,2
Marca 6	2 (1)	99,0 (96,2 - 99,8)	2 (0,9)	99,1 (96,5 - 99,9)	5 (2,4)	99,1
Marca 7	3 (1,5)	98,5 (95,4 - 99,6)	3 (1,3)	98,7 (95,9 - 99,7)	1 (0,5)	98,6
Marca 8	2 (1)	99,0 (96,2 -99,8)	3 (1,3)	98,7 (95,9 - 99,7)	6 (2,9)	98,9
Marca 9	3 (1,5)	98,5 (95,4 - 99,6)	18 (7,9)	92,1 (87,6 - 95,1)	25 (12,2)	95,2
Marca 10	1 (0,5)	99,5 (96,9 - 100)	2 (0,9)	99,1 (96,5 - 99,9)	2 (1)	99,3

También se registraron resultados con bandas de muy baja intensidad en las líneas de reacción que fueron considerados positivos, encontrándose que la **Marca 3**, **Marca 9** y **Marca 5** dieron reacciones débiles en los 4,9%; 12,2% y 31% de los casos positivos, respectivamente.

Tabla 2. Evaluación del desempeño operacional de las pruebas rápidas para VIH.

	T° de almac. (1)	N° de pasos (2)	Tiem. de realiz. (3)	Expertise del Operador (4)	Instrum. no provistos (5)	Instruc. en español (6)	Muestras posibles (7)	Desempeño operacional de la PR
Marca 1	1 (2 -30°C)	1 (4)	1 (16:00)	1 (No)	1 (No)	0 (No)	1 (S;P;ST)	MUY BUENO (6/7)
Marca 2	1 (2 -30°C)	1 (4)	1 (16:00)	1 (No)	0 (Si)	0 (No)	0 (S;P)	POBRE (4/7)
Marca 3	1 (2 -30°C)	1 (4)	1 (16:00)	1 (No)	0 (Si)	0 (No)	1 (S;P;ST)	BUENO (5/7)
Marca 4	1 (2 -30°C)	1 (4)	0 (21:00)	1 (No)	1 (No)	1 (Si)	1 (S;P;ST)	MUY BUENO (6/7)
Marca 5	1 (2 -30°C)	1 (4)	1 (16:00)	1 (No)	1 (No)	0 (No)	1 (S;P;ST)	MUY BUENO (6/7)
Marca 6	1 (1 -30°C)	1 (3)	0 (20:40)	1 (No)	0 (Si)	0 (No)	1 (S;P;ST)	POBRE (4/7)
Marca 7	1 (2 -30°C)	1 (3)	1 (15:40)	1 (No)	0 (Si)	1 (Si)	1 (S;P;ST)	MUY BUENO (6/7)
Marca 8	1 (2 -30°C)	1 (4)	1 (11:00)	1 (No)	1 (No)	0 (No)	1 (S;P;ST)	MUY BUENO (6/7)
Marca 9	1 (2 -30°C)	1 (4)	1 (16:00)	1 (No)	0 (Si)	1 (Si)	0 (S;P)	BUENO (5/7)
Marca 10	1 (2 -30°C)	1 (3)	1 (15:40)	1 (No)	0 (No)	1 (Si)	1 (S;P;ST)	MUY BUENO (6/7)

(1) T° de almacenamiento (1, T° ambiente; 0 necesita refrigeración, 2-8°C)

(2) Pasos en el ensayo (1, igual o menos que cuatro pasos; 0, más de cuatro pasos). Pasos: aplicación de la muestra; aplicación del buffer; incubación; lectura.

(3) Tiempo de realización del ensayo incluye un promedio de 20 segundos por paso + el tiempo de incubación. (1, igual o menos de 20 min; 0 más de 20 min). Se considera el máximo tiempo recomendado por el fabricante; ej lectura entre 5-20 min, se toma 20 min.

(4) Expertise del operador (1, el operador no necesita experiencia en el laboratorio; 0, el operador necesita experiencia en el laboratorio)

(5) Necesidad de instrumentos de laboratorio no provistos, ej: pipeta automática (1, no necesario; 0, se requiere pipeta para dispensar la muestra/buffer)

(6) Instrucciones en español (1, sí; 0, no)

(7) Muestras utilizadas (1, suero, plasma y sangre total; 0 sólo suero o plasma y no sangre total)

Con respecto a las características operacionales de las PR se evaluaron los criterios mencionados en la Tabla 2 y los resultados fueron clasificados en EXCELENTE con una puntuación de 7/7; MUY BUENO, 6/7; BUENO, 5/7 y POBRE, 4/7 ó menos. Ninguna de las PR alcanzó una puntuación de 7/7 (EXCELENTE). Entre las marcas que obtuvieron la máxima puntuación alcanzada de 6/7 (MUY BUENO), la **Marca 1**, la **Marca 5** y la **Marca 8** no poseen el inserto con instrucciones en español; la **Marca 7** y la **Marca 10** precisan de pipeta automática para dispensar la muestra sobre el dispositivo del test; y, la **Marca 4** tiene un tiempo de realización del ensayo de más de 20 minutos.

Las PR que obtuvieron la puntuación de 4/7 (POBRE) necesitan de pipeta automática para la aplicación de las muestra sobre el dispositivo del test y no cuentan con el instructivo en español; además la **Marca 2** no puede ser utilizado con sangre total y la **Marca 6** tiene un tiempo de realización mayor a 20 minutos.

Tabla 3. Evaluación final de las pruebas rápidas para VIH.

	SENSIBILIDAD (S ≥ 99%)	ESPECIFICIDAD (E ≥ 98%)	Desempeño operacional de la PR	Evaluación Final
Marca 1	99,5	100	MUY BUENO	PR 1
Marca 2	99,0	<u>97,8</u>	POBRE	A
Marca 3	<u>97,6</u>	<u>97,4</u>	BUENO	A
Marca 4	99,5	98,7	MUY BUENO	PR 3
Marca 5	<u>97,1</u>	99,1	MUY BUENO	A
Marca 6	99,0	99,1	<u>POBRE</u>	A
Marca 7	<u>98,5</u>	98,7	MUY BUENO	A
Marca 8	99,0	98,7	MUY BUENO	PR 4
Marca 9	98,5	<u>92,1</u>	BUENO	A
Marca 10	99,5	99,1	MUY BUENO	PR 2

PR 1, PR 2, PR 3 y PR 4, recomendadas como primera, segunda, tercera y cuarta opción, respectivamente.

A: PR menos recomendadas debido a que uno o más de los parámetros evaluados quedan fuera valores de aceptación establecidos.

Según los datos resumidos en la Tabla 3, la **Marca 1**, la **Marca 10**, la **Marca 4** y la **Marca 8** constituyen las marcas recomendadas por esta evaluación de acuerdo a los criterios establecidos.

DISCUSIÓN

Con este trabajo de validación de reactivos realizado en el LCSP, se desarrolló una metodología de evaluación sistemática de las PR para VIH disponible comercialmente en el mercado local, lo que permitió comparar el desempeño de cada una de ellas con las pruebas de referencia utilizadas en el algoritmo nacional para el diagnóstico de esta patología. Sin embargo, en este estudio no se han evaluado estrategias de diagnóstico que emplean dos o más PR secuenciales o paralelas, metodología que se ha demostrado puede aumentar la exactitud de los resultados y ha sido establecida exitosamente en otros países (17-19).

De las PR estudiadas, la **Marca 1**, la **Marca 4**, la **Marca 5**, la **Marca 6**, la **Marca 8** y la **Marca 10** presentaron una sensibilidad y especificidad no menores a 99% y 98%, respectivamente, como ha sido recomendado por la OMS para ser incluidas en los algoritmos nacionales para el diagnóstico del VIH mediante la utilización de pruebas rápidas (15). Esto demuestra que las PR tienen un desempeño comparable al EIA por lo que un resultado negativo puede ser considerado como definitivo, a no ser que haya

posibilidades de estar en el periodo ventana de la exposición y un resultado positivo debe ser interpretado como de alta probabilidad de positividad para VIH, pero pendiente de ser corroborado con pruebas confirmatorias más específicas (5-9).

Este estudio fue llevado a cabo por profesionales entrenados y con experiencia en la aplicación de pruebas inmunocromatográficas; en cambio personal con menor entrenamiento puede no obtener resultados comparables, sobre todo cuando se emplean aquellas marcas con resultados positivos débiles podrían ser considerados negativos, aumentando así el número de casos falsos negativos sin confirmación.

Típicamente, estos ensayos comienzan con la aplicación de la muestra sobre el dispositivo del test, adición del buffer, incubación y lectura del resultado. En general involucran pasos sencillos que hacen factible su realización por personas que no necesariamente han sido capacitadas en tecnologías de laboratorio, pero es un componente crítico el entrenamiento previo de las personas que realizarán el test; así como su evaluación inicial y continua (26). El nivel central debe ser el responsable de elaborar, actualizar y difundir las guías, vigilar su cumplimiento y monitorear los procedimientos establecidos en las mismas.

Al contrario del EIA, que utiliza suero o plasma, las PR también pueden ser realizadas con una pequeña cantidad de sangre total, pudiéndose aplicar la muestra obtenida por medio de la punción del pulpejo del dedo en lugar de la venopunción. Esto evita una etapa del procesamiento para la obtención del suero/plasma antes de la realización del test, facilitando su empleo en el trabajo de campo y en servicios que no cuentan con equipamiento de laboratorio; sin embargo, es una limitación de este estudio el no haber probado las PR con sangre total.

Con estos datos pudo documentarse que la mayoría de las PR estudiadas presentan un desempeño similar al EIA para la detección de anticuerpos anti-VIH (4,7), pudiendo ser utilizadas como alternativa para el tamizaje serológico de esta patología, con las ventajas de ser simples por no requerir equipamiento o gran habilidad técnica por parte del operador, pueden ser ejecutados en pocos pasos y sobretodo pueden ser concluidos en menos de 45 minutos. Con lo que podría contribuirse al acceso universal a la prevención, la atención y el tratamiento del VIH mediante la expansión de la asesoría y las pruebas de diagnóstico en los centros de asesoría y testeo voluntario y programas de prevención de la transmisión materno-infantil. La elección de la estrategia y de las pruebas deberá hacer el país en base a la calidad de las mismas y de otras consideraciones de orden práctico relacionadas con su aplicación y logística.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Burke DS, Brundage JF, Redfield RR, Damato JJ, Schable JJ, Putman P, Visintine R, Kim HI. Measurement of the false positive rate in a screening program for human immunodeficiency virus infections. *N. Engl. J. Med* 1988; 319:961-64.
2. Centers for Disease Control. Serologic testing for antibody to human immunodeficiency virus. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 1988; 36:833-40.
3. Goedert JJ. Testing for human immunodeficiency virus. *Ann. Intern. Med.* 1986; 105:609-10.
4. WHO. HIV Assays: Operational characteristics. Report 16, Rapid Assays. 2009. http://www.who.int/diagnostics_laboratory/publications/Report16_final.pdf
5. Constantine N, Fox TE, Abbatte EA, Woody JN. Diagnostic usefulness of five screening assays for HIV in an east African city where prevalence of infection is low. *AIDS* 1989; 3:313-17.
6. Branson BM. Rapid tests for HIV antibody. *AIDS Rev* 2000; 2:76-83.
7. WHO/UNAIDS. Operational characteristics of commercially available assays to determine antibodies to HIV-1 and/or HIV-2 in human sera. Geneva, Switzerland: World Health Organization/ the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, Report 11. WHO/BTS/99.1;UNAIDS/99.5; 1999.
8. Wilkinson D, Wilkinson N, Lombard C, Des M, Alan S, Floyd K, et al. On-site HIV testing in resource-poor settings: is one rapid test enough? *AIDS* 1997; 11:377-381.

9. Ketema F, Zeh C, Edeleman DC, Saville R, Constantine NT. Assessment of the performance of a rapid, lateral flow assay for the detection of antibodies to HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 27:63-70.
10. Rapid HIV tests: guidelines for use in HIV testing and counseling services in resource-constrained settings. 2004. WHO ISBN 92 4 159181 1 The URL for this document is: www.who.int/hiv/pub/vct/en/rapidhivtests/en.pdf
11. Downing RG, Otten RA, Marum E, Biryahwaho B, Alwano-Edyegu MG, Sempala SD, et al. Optimizing the delivery of HIV counseling and testing services: the Uganda experience using rapid HIV antibody test algorithms. *Journal of Acquired Immune-Deficiency Syndrome and Human Retrovirology* 1998; 18(4): 384-88.
12. Potts M, Walsh J. Tackling India's HIV epidemic: Lessons from Africa. *British Medical Journal* 2003; 326:1389-92.
13. Malonza IM, Richardson BA, Kreiss JK, Bwayo JJ, John Stewart GC. The effect of rapid HIV-1 testing on uptake of perinatal HIV-1 interventions: a randomized clinical trial. *AIDS* 2003; 17:113-118.
14. Perez F, Mukotekwa T, Miller A, Orne-Gliemann J, Glenshaw M, Chitsike I, Dabis F. Implementing a rural programme of prevention of mother-to-child transmission of HIV in Zimbabwe: first 18 months of experience. *Tropical Medicine and International Health* 004; 9(7):774-83.
15. WHO. Revised recommendations for the selection and use of HIV antibody tests. *Weekly Epidemiology Record*, 20:145-149; 1992.
16. WHO. Guía práctica para la implementación de pruebas fiables y eficientes para el diagnóstico del VIH. Región de América. Serie técnica para la atención integral al VIH con enfoque de salud pública (AI-VIH). 2008.
http://www.paho.org/Spanish/AD/FCH/AI/LAB_GUIDE_SPAN.PDF
17. Ferreira OC, Ferreira C, Riedel M, Widolin MRV, Barbosa-Junior A. HIV Rapid Test Study Group. Evaluation of rapid tests for anti-HIV detection in Brazil. *AIDS* 2005; 19:S70-S75.
18. Koblavi-Dème S, Maurice C, Yavo D, Sibailly TS, N'guessan K, Kamelan-Tano Y, et al. Sensitivity and specificity of human immunodeficiency virus rapid serologic assays and testing algorithms in an antenatal clinic in Abidjan, Ivory Coast. *J. Clin. Microbiol.* 39:1808-12.
19. Phillips S, Granade TC, Pau CP, Candal D, Hu DJ, Parekh BS. Diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection with different subtypes using rapid tests. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7:698-99.
20. Ramalingam S, Kannangai R, Raj AA, Jesudason MV, Sridharan G. Rapid particle agglutination test for human immunodeficiency virus: hospital-based evaluation. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40:1553-54.
21. Urassa W, Nozohoor S, Jaffer S, Karama K, Mhalu F, Biberfeld G. Evaluation of an alternative confirmatory strategy for the diagnosis of HIV infection in Dar es Salaam, Tanzania, based on simple rapid assays. *J. Virol* 2002. *Methods* 100:115-20.
22. Van den Berk GEL, Frissen PHJ, Regez RM, Rietra PJG. Evaluation of the rapid immunoassay Determine HIV 1/2 for detection of antibodies to human immunodeficiency virus types 1 and 2. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:3868-69.
23. Wilkinson D, Wilkinson N, Lombard C, Martin D, Smith A, Floyd K, Ballard R. On-site HIV testing in resource-poor settings: is one rapid test enough? *AIDS* 1997; 11:377-381.
24. Modelo de Atención en VIH-SIDA/ITS para la Población Clave Afectada. PRONASIDA, 2011.
http://www.cird.org.py/sida/documentos/MODELO_DE_ATENCION_2011.pdf
25. Hulley SB y Cummings SR. Diseño de la Investigación Clínica: Un Enfoque Epidemiológico. Edición Española. Barcelona: Ediciones Doyma S.A.; 1993. Apéndice 13.E.
26. HIV rapid test training package: Training for quality HIV testing in an era of expanding services. 2005. Materials jointed prepared by HHS/CDC/GAP, WHO and USAID. (Package from meeting held 27-28 January 2005 in Atlanta GA).