

ARTICULO ORIGINAL

La inmunofluorescencia indirecta como prueba suplementaria para confirmar infección por VIH-1: experiencia del Instituto Nacional de Salud, 1993-2000

Jorge Boshell ¹, Carlos Alvarez ², Sonia Marrugo ¹, María Consuelo Rojas ¹, Blanca Marina Rodríguez ¹, Martha González ¹, Berta Gómez ³

¹ Laboratorio de Virología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

² Unidad de Infectología, Departamento de Medicina Interna, Instituto de Salud en el Trópico, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.

³ Instituto de Seguros Sociales, Bogotá, D.C., Colombia.

Se muestra la utilidad e idoneidad de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) como prueba suplementaria confirmatoria de la infección por VIH-1 con base en siete años de experiencia de uso permanente en el Instituto Nacional de Salud (INS), siguiendo un método de confirmación (flujograma), recomendado por la Organización Panamericana de la Salud y el *Federal Center for AIDS* de Canadá. La especificidad de la prueba IFI del INS (IFI-VIH1-INS), utilizando como prueba de referencia la inmunoelectrotransferencia o *Western Blot* (WB), fue del 100% con 925 sueros estudiados. La concordancia entre la IFI y dos pruebas diferentes de WB fue similar. Sin embargo, aunque la especificidad de la prueba es excelente, su sensibilidad de 61% con 6.137 sueros probados es discretamente inferior a la de otras pruebas IFI informadas en la literatura, por cuenta de un alto número de resultados indeterminados, de los cuales 41% (975), también fue indeterminado por WB. La utilización de la IFI-VIH1-INS como prueba suplementaria confirmatoria en más de 6.000 sueros, entre 1993 y 2000, permitió ahorrar al programa de VIH de la Red Nacional de Laboratorios de Colombia un valor cercano a los \$340'000.000 o US \$170.000.

Palabras clave: inmunofluorescencia indirecta, VIH-1, diagnóstico, prueba suplementaria.

Immunofluorescent antibody test as additional confirmation of HIV-1 infection: seven years of use at the Colombia National Institute of Health

A team at the Colombian National Institute of Health (INS) has demonstrated the usefulness and suitability of the Immunofluorescent Antibody Test (IFAT) as a confirmatory assay for HIV-1. The assay followed a flow chart method recommended by the Pan American Health Organization (PAHO) and the Federal Center for AIDS of Canada. The specificity of the IFAT assay (IFI-VIH1-INS) for 925 serum samples was 100% when compared with two different Western blot (WB) assays. The IFI-VIH1-INS showed a sensitivity of 61% across 6,137 human sera. Although its specificity is excellent, the sensitivity of the IFI-VIH1-INS assay is slightly lower than other IFAT assays (41% of 975 samples were indeterminate in both IFAT assays and WB tests). After implementation of this assay in more than 6,000 serum samples between 1993 and 2000, the INS saved more than Col \$340,000,000 or US \$170.000 in its HIV1 testing program.

Key words: indirect immunofluorescent assay, HIV-1, supplementary test, diagnosis.

Alrededor de 35 millones de personas están infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), de las cuales cerca de 1,6 millones

viven en Latinoamérica y el Caribe (1). Colombia inició los primeros estudios de prevalencia de VIH-1 en 1987 y continúa hasta nuestros días con la vigilancia de su transmisión (2-6). Hasta abril del 2000, tenía registrados 19.193 casos y 4.000 muertes (7). En los países industrializados, la asociación VIH/SIDA es uno de los problemas de

Correspondencia:

Jorge Boshell

jboshell@hemagogus.ins.gov.co

Recibido: 24/08/01; aceptado: 01/03/02

salud pública que más recursos económicos demanda, especialmente en los grupos social y económicamente marginados. Los países en desarrollo tienen el mismo problema tanto en los grupos de población económicamente solventes como en los grupos marginados (8), de manera que resulta elemental desarrollar estrategias de diagnóstico que disminuyan costos, sin que esto implique detrimento en su calidad.

Los métodos de laboratorio para diagnosticar la infección por el VIH se pueden dividir en tres grupos (9,10): 1) la detección de anticuerpos contra proteínas estructurales, que incluye las pruebas presuntivas y las suplementarias; 2) la detección del virus mismo o de alguna de sus proteínas, que incluye el intento de aislamiento viral o la detección de la proteína p24, y 3) la detección del genoma viral mediante la amplificación genética e identificación del amplificado con hibridación de sondas específicas. Los dos últimos sistemas son costosos, requieren entrenamiento con equipo sofisticado y están restringidos a la investigación o a situaciones de diagnóstico muy particulares.

Para el diagnóstico de infección por el VIH, se recomienda en Colombia la detección de anticuerpos por medio de dos pruebas presuntivas y una confirmatoria (11). Las pruebas presuntivas actuales siguen siendo las técnicas de ELISA o de aglutinación, que buscan detectar simultáneamente anticuerpos contra diferentes proteínas estructurales del virus. Estas pruebas, de sensibilidad exquisita (10), pueden presentar reacciones falsamente positivas en razón de reacciones cruzadas con otras infecciones presentes en el paciente como otros retrovirus o parásitos como *Trypanosoma cruzi* o *Plasmodium* sp., por presencia de antígenos HLA, por alta concentración de inmunocomplejos o también por sueros hiperlipémicos o hemolisados (12). Por estas reacciones inconvenientes, todo resultado reactivo en las pruebas presuntivas debe confirmarse con una prueba suplementaria.

Las pruebas suplementarias o confirmatorias para VIH son el *Western blot* (WB), la radioinmuno-precipitación (RIPA) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI). El WB es una prueba más universal por su especificidad cercana al 100%. Sin

embargo, tiene deficiencias como su alto costo y la indeseable frecuencia de resultados indeterminados o dudosos (12-14). Una buena alternativa es la prueba IFI (15-20) porque su especificidad se acerca a la del WB.

Con la IFI se detectan anticuerpos totales empleando células linfoides infectadas con VIH-1 y fijadas a una lámina de vidrio. Los anticuerpos contenidos en el suero del paciente infectado reaccionan con estas células, adhiriéndose, y se detectan por medio de una antiglobulina humana marcada con fluoresceína, llamada conjugado. La especificidad de la prueba se verifica utilizando simultáneamente como control células linfoides similares, pero sin infectar. Estas no deben reaccionar con el suero del paciente (16). La IFI también presenta resultados indeterminados como el WB, pero tiene la ventaja de su bajo costo y rapidez en su ejecución (15-21). En 1991, el Comité de Expertos de la OPS/OMS para el diagnóstico de infección por VIH/SIDA y el *Federal Center for AIDS* del Canadá recomendaron a los países de Latinoamérica el uso de la IFI como prueba confirmatoria suplementaria en los sueros que tuvieran dos pruebas de tamizaje reactivas para VIH-1 (figura 1). Esta fue una de las

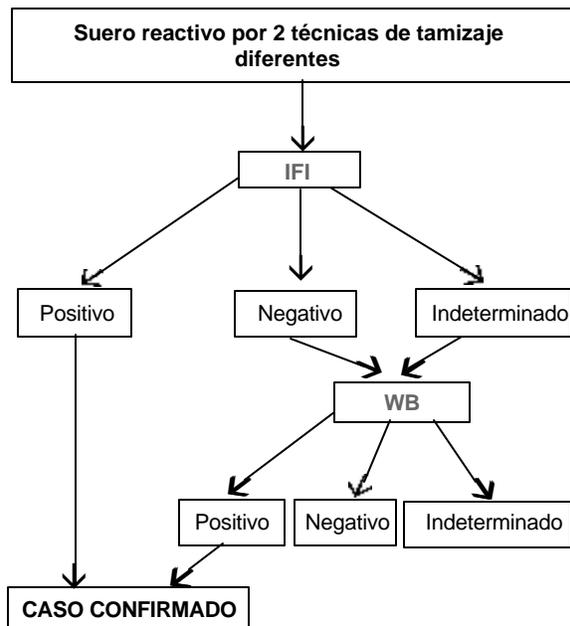


Figura 1. Flujograma propuesto en la reunión de Caracas, OMS-OPS,1991.

recomendaciones surgidas en la tercera reunión anual de directores de laboratorio de diagnóstico de sida, que tuvo lugar en San José, Costa Rica, del 22 al 25 de octubre de 1991, teniendo en cuenta la experiencia de algunos laboratorios en Norteamérica y Latinoamérica, incluido el INS de Colombia. La prueba de WB se recomienda, entonces, para aquellos sueros que resulten IFI negativos o dudosos (21). En este estudio, se presenta la experiencia adquirida en los últimos siete años por el INS con la IFI, con más de 6.000 sueros estudiados. Inicialmente, se describirá la comparación de la técnica IFI-INS frente a dos técnicas de WB y, posteriormente, los resultados de su aplicación dentro del flujograma diagnóstico descrito arriba.

Materiales y métodos

Primera fase: comparación de IFI y Western blot

Panel de sueros. Con el fin de comparar las técnicas de IFI y WB para VIH-1, se seleccionaron todas las muestras remitidas al INS para confirmación de su reactividad con el VIH-1, disponibles en el banco de sueros del Laboratorio de Virología, que tuvieran resultado doblemente reactivo por ELISA, sin tener en cuenta su procedencia de población de alto o bajo riesgo. Tales muestras reactivas integraron un panel de estudio que incluyó, además, sueros negativos en las pruebas ELISA y WB que procedían de pacientes sin riesgo de infección por VIH y sueros indeterminados en la prueba WB. Estos sueros provenían de diferentes regiones de Colombia, se almacenaron a -20 °C y se procesaron con una prueba WB preparada en el INS (Wb1) o mediante un WB comercial (Wb2) (22). La sensibilidad, especificidad y reproducibilidad del Wb1 se validó periódicamente con el *Model Performance Evaluation Program* (MPEP) para VIH-1 del Centro para Control de Enfermedades de Atlanta, EE.UU. (CDC), mientras que para el segundo se tuvo en cuenta la información dada por la casa productora.

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI VIH1 INS)

Preparación del antígeno. Se usaron células H9 de línea continua que tienen origen linfoide y están

crónicamente infectadas con VIH-1 (23) y células HT, también de línea continua con el mismo origen, pero sin infectar (24). Estas líneas celulares fueron mantenidas en viales conservados en nitrógeno líquido hasta el momento de ser utilizadas. El contenido de un vial con cada una de estas líneas se colocó en medio de crecimiento celular consistente en RPMI 48%, enriquecido con suero bovino fetal al 50%, glutamina al 1%, solución de penicilina-estreptomina al 1% y bicarbonato de sodio al 1%. Después de incubación a 37 °C en atmósfera de CO₂ durante 5 días y cambiándoles el medio diariamente, se transfirieron a medio de mantenimiento que era el mismo RPMI, pero con suero fetal bovino al 10%. Al cabo de 5 días se obtuvo la concentración celular adecuada (turbidez semejante a tubo No. 4 en la escala de Mc Farlan entre 27-37%T, con 95-98% de viabilidad), la cual se centrifugó durante 10 minutos a 1.500 rpm para obtener un sedimento de células. Este sedimento fue resuspendido homogéneamente en PBS. Para preparar los extendidos celulares, se realizó una mezcla de suspensiones de células HT y H9 en relación de 3:1 o 1:1, con el fin de que en cada campo microscópico, cuando se estudiara un suero reactivo, se observaran escasas células fluorescentes en un trasfondo de abundantes células sin fluorescencia. Estos extendidos se prepararon en láminas que tienen 18 pozos de 4 mm de diámetro, distribuidos en tres filas de 6 pozos cada una y separados por una película de color verde (Cel-Line Inc.). En los pozos de la primera y segunda filas, se colocaron 5 µl de la mezcla celular y en los pozos de la tercera fila sólo se colocaron 5 µl de células HT. Después de secarlas al aire, las placas se fijaron en acetona a temperatura ambiente por 5 minutos y se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

Procedimiento. Se prepararon diluciones con PBS 1:10 y 1:50, de los sueros problema, controles positivos y negativos y se adicionaron 20 µl de cada dilución a los dos pozos con células positivas. Además, 20 µl de la dilución 1:10 de cada suero (problema, control positivo y negativo) se agregó a un tercer pozo que contenía sólo células HT (sin infectar) para tener un control adicional de especificidad. Después de una incubación a 37 °C en cámara húmeda durante 30 minutos, se

realizaron tres lavados con PBS en agitación de cinco minutos cada uno y se secaron al aire. Finalmente, la reacción del suero con las células se reveló, agregando 20 μ l de una inmunoglobulina anti-IgG humana conjugada con isotiocianato de fluoresceína diluida en azul de Evans a una concentración 1:10.000 en agua destilada. Este conjugado se incubó en cámara húmeda a 37 °C durante 30 minutos y después de lavar tres veces como ya se describió arriba, las láminas se secaron al aire y se montaron con glicerina, pH 9,0, para observarlas en el microscopio de epifluorescencia.

Interpretación. La prueba se consideró positiva cuando aparecía fluorescencia sobre las células H9 (infectadas) y no aparecía en las células HT (sin infectar). Se consideró negativa cuando no había fluorescencia en ninguno de los tres pozos. Cuando la fluorescencia no estaba clara con las células H9 o cuando había fluorescencia de algún tipo con las células HT, es decir, fluorescencia inespecífica, el resultado se consideró indeterminado o dudoso (figura 2).

La prueba de Western Blot (WB) WB preparado en el INS (Wb1)

Preparación de las tiras de reacción. Las proteínas de un lisado de VIH-1 de origen comercial se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, corrida en amortiguador Tris-glicina, pH 8,3 con 80 mAMP durante dos horas. Las bandas proteicas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por electrotransferencia con 960 mAMP durante 17 horas y se fijaron a la misma con solución de PBS-Tween 20 durante dos horas. Después de secar la membrana se cortaron tirillas de 4 mm de ancho.

Procedimiento. 3 ml de los sueros problema y controles positivo y negativo en dilución 1:100 preparada con amortiguador PBS-Tween se colocaron en contacto con sendas tirillas durante dos horas en agitación constante y a temperatura ambiente; después de tres lavados se agregó el conjugado anti-IgG humana marcada con peroxidasa, permitiendo que reaccionara en agitación constante durante dos horas, también a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS, se agregó una solución de diamino-

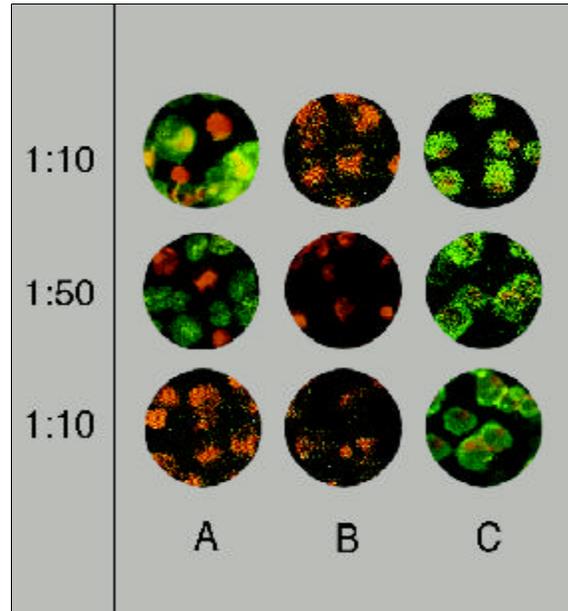


Figura 2. Prueba de inmunofluorescencia indirecta IFI-VIH-1-INS: A) positiva: nótese la fluorescencia verde manzana sobre las células H9 infectadas y el contraste con las células rojas sin infectar (HT); también, la mayor intensidad de fluorescencia en la dilución 1:10 que en la dilución 1:50; B) negativa: nótese la ausencia de fluorescencia en todos los campos (se ven solo células rojas), y C) indeterminada: nótese la presencia de fluorescencia inespecífica detectada porque no hay contraste con las células sin infectar, las cuales se deben observar rojas.

bencidina previamente estandarizada como sustrato revelador.

WB comercial (WB2)

Se utilizó la prueba de Genelabs Diagnostic HIV-Blot 2.2 siguiendo las indicaciones del fabricante. Se agregaron 2 ml de solución de transferencia a cada tira de 20 μ l de las muestras de los pacientes y los controles positivo y negativo; se dejaron una hora a temperatura ambiente en rotación permanente; después de realizar los lavados, se agregaron 2 ml de solución de conjugado anti-IgG humana marcada con fosfatasa alcalina y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en rotación continua. Después de lavar, se agregaron 2 ml de solución de sustrato BCIP (bromo-cloro-indolil-fosfato) y NBT (nitrozul de tetrazolio).

Interpretación. La interpretación de las pruebas WB se hizo siguiendo el criterio del CDC, según

el cual deben estar presentes anticuerpos contra dos de las tres proteínas del gen de la envoltura (env) y contra la proteína central p24 (25).

Segunda fase: aplicación del flujograma OPS/FCA adoptado

Una vez validada la técnica de IFI, en 1993 se incluyó como prueba suplementaria rutinaria de acuerdo con el flujograma propuesto por OPS/FCA y adoptado por el Ministerio de Salud. En esta fase se incluyeron los sueros enviados a nuestro laboratorio hasta el 31 de marzo del 2000, a los cuales se les realizó el flujograma propuesto en la figura 1.

Análisis estadístico. La información se recolectó en una base de datos utilizando el programa Epiinfo 6.04 (26). Se realizaron pruebas de concordancia entre la IFI y cada uno de los WB. En los análisis de sensibilidad y especificidad para IFI se utilizó como patrón de oro el WB y los valores de predicción positivos y negativos se calcularon considerando la prevalencia estimada para Colombia en los dos grupos de riesgo considerados (27).

Adicionalmente, basados en los valores de sensibilidad y especificidad, se buscaron los valores de las razones de probabilidad (RP) para un resultado positivo o negativo. Para cambios en la conducta clínica entre la probabilidad preprueba y postprueba, se consideraron significativos los valores RP positivos mayores de 10 y RP negativos menores de 0,1.

Resultados

La figura 2 muestra el ejemplo de un suero cuya reactividad se confirma (A), se descarta (B) o arroja un resultado inespecífico (C) con la prueba IFI-VIH1-INS. Para evaluarla, se pudo establecer un panel de 753 sueros confirmados por el Wb1 (493 positivos, 140 negativos y 120 indeterminados), y 172 sueros confirmados por el Wb2 (80 positivos, 26 negativos y 66 indeterminados).

En los cuadros 1 y 2 se muestran los valores de sensibilidad, especificidad, valores de predicción y concordancia de la IFI comparada con las dos pruebas de WB. La IFI presentó una especificidad del 100% y valores de sensibilidad superiores al

97%. Los valores de predicción, teniendo en cuenta la prevalencia de infección por VIH, calculada para Colombia en 0,2%, fueron excelentes (por encima del 99%). Los índices kappa de concordancia entre el IFI y los Wb1 y Wb2 fueron de 0,92 y 0,94, respectivamente. Sin embargo, en 88 (7,2%) sueros positivos y negativos por Wb1, el resultado por IFI fue dudoso, mientras que en los 120 sueros indeterminados hubo concordancia en 75 (62,5%) y el resto fueron negativos. Por otra parte, se encontraron 15 sueros positivos y negativos por Wb2 con resultado dudoso por IFI, en tanto que la concordancia con indeterminados fue del 33,4% (40 sueros); los restantes fueron negativos por IFI.

En los siete años comprendidos entre enero de 1993 y marzo del 2000, se estudiaron 6.137 sueros de acuerdo al algoritmo de confirmación de infección por VIH-1, que incluye la IFI y el WB, adoptado rutinariamente en el INS desde 1993. De estos sueros, 3.793 (61,4%) fueron positivos por IFI y 2.377 requirieron la prueba de WB (953, 15,4%, IFI negativos y 1.424, 23,07%, IFI dudosos. El resultado permaneció indeterminado

Cuadro 1. Concordancia entre Wb1 e IFI-VIH1-INS.

WB/IFI	Positivos	Negativos	Total
Positivos	425	0	425
Negativos	13	107	120
Total	438	107	545

Sensibilidad: 97,03%; especificidad: 100%
 VPP: 100%, IC 97,6-100; VPB: 99,9%, IC 89,9-100
 Razón de probabilidad positiva: ∞
 Razón de probabilidad negativa: 0,03
 Prevalencia: 0,2%
 Coeficiente kappa: 0,92

Cuadro 2. Concordancia entre WB2 e IFI-VIH1-INS.

WB/IFI	Positivos	Negativos	Total
Positivos	66	0	66
Negativos	2	23	88
Total	68	23	91

Sensibilidad: 97,05%; especificidad: 100%
 VPP: 100%; IC: 97,6-100; VPB: 99,39%; IC: 89,9-100
 Razón de probabilidad positiva: ∞
 Razón de probabilidad negativa: 0,03
 Prevalencia: 0,2%
 Coeficiente de correlación Kappa: 0,94

Cuadro 3. Concordancia entre IFI-VIH1-INS y WB en 2.377 sueros, Colombia, 1993-2000.

WB/IFI	Positivos		Negativos		Indeterminados		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Negativos	67	2,8	487	20,4	399	16,8	953	40
Indeterminados	579	24,3	269	11,3	576	24,2	1424	60
Total	646	27,1	756	31,8	975	36,6	2377	100

En este caso, no se incluyeron los resultados positivos por IFI porque de acuerdo con el flujograma utilizado, se consideraron verdaderos positivos y no se les realizaron pruebas de *Western blot*.

por Wb2 en 975 (41,0%) de las 2.377 muestras. En el cuadro 3 se muestra la concordancia entre el WB/IFI para los sueros negativos o indeterminados por IFI.

Discusión

El diagnóstico de la infección por el VIH-1 se hace rutinariamente mediante la detección de anticuerpos anti-VIH-1 con la ayuda de técnicas sensibles y específicas. La prueba del WB sigue siendo la prueba suplementaria de confirmación de referencia internacional (10,28). Sin embargo, múltiples estudios en Latinoamérica, EE.UU. y Europa han demostrado la utilidad de la IFI como prueba suplementaria para confirmación (16,17,19,29-31). Algunos señalan que la IFI es aún superior al WB para diferenciar infección entre VIH-1 y VIH-2 (32,33).

En este estudio se demuestra que la técnica de IFI estandarizada en el INS (IFI- VIH1-INS) puede utilizarse con confianza como prueba confirmatoria suplementaria, dada su alta eficiencia y teniendo en cuenta su concordancia (0,92 con WB1 y 0,94 con WB2), especificidad (100%) y sensibilidad (>97%), comparada con la prueba WB.

Ahora bien, los valores infinito (∞) de las razones de probabilidad positiva nos indican que, independientemente de la sospecha clínica de infección por VIH, un resultado positivo por IFI confirma la infección. Los valores de las razones de probabilidad negativas son de gran validez de acuerdo con lo propuesto por Jaeschke, lo que en el caso de la infección por VIH se considera muy significativo. Por esta razón, esta prueba no se recomienda como prueba de tamizaje ni como prueba confirmatoria única sino como prueba suplementaria en la que un resultado positivo

permite confirmar el diagnóstico, pero un resultado negativo obliga a realizar el WB.

No encontramos resultados falsos positivos con la IFI en los siete años de estudio, hecho que confirma la idoneidad del algoritmo utilizado. Experiencia similar ha sido publicada por Hedenskog (34). Sin embargo, encontramos un número bajo de casos resueltos por WB (7,2%), en los cuales el resultado por IFI fue dudoso. Este resultado es similar a otros trabajos publicados y explica la necesidad de recurrir al WB en estos casos. De igual forma y tal como ha sido descrito en otros estudios, se encontraron 'muestras problema' en las cuales los resultados indeterminados por WB permanecieron dudosos o negativos por IFI (28,35). Estos sueros generalmente provenían de pacientes en estadios terminales de la enfermedad o con infección reciente. Aunque en este estudio no se discriminó el rendimiento de la IFI según población de bajo o alto riesgo, varios autores han encontrado que el rendimiento de la IFI es similar (15,16,36).

El control de especificidad consiste en células HT sin infectar que se incluyen en proporción preestablecida en cada pozo de reacción. La proporción más conveniente se establece caprichosamente y en nuestro caso resultó ser de 1:1 por consenso entre varios observadores. La proporción de células fluorescentes en cada campo sirve, así mismo, para control de especificidad. Además de éste, durante los siete años se incluyó un tercer pozo de control que contiene sólo células sin infectar para asegurar aún más la especificidad de la prueba. Este tercer pozo sirve particularmente para comodidad de los observadores con menos experiencia. Con este control adicional, la especificidad, si es posible,

se muestra aún superior en algún aspecto, comparada con la de pruebas IFI previamente descritas (16,17).

Con alguna frecuencia se encontraron sueros que reaccionaban mejor en la dilución 1:50 que en la dilución universal, que es 1:10. Este aspecto no se cuantificó en el estudio y se explica por el llamado efecto prozona (37,38). Fue la razón para mantener la dilución 1:50 en el uso rutinario de la IFI.

Desde el punto de vista económico, el algoritmo convencional, basado sólo en la confirmación con WB, es demasiado costoso para nuestros países en desarrollo, razón por la cual se han propuesto esquemas que combinan diferentes pruebas de tamizaje, pero sin mucha acogida (39). En un estudio realizado en el programa municipal de Sao Paulo, Brasil, (29) y que utilizó el algoritmo propuesto por OPS, se demostró que el 92,8% de 7.765 sueros reactivos en el tamizaje se pudo confirmar por medio de IFI, reduciendo enormemente los costos. Nuestros resultados con 6.137 sueros, utilizando ese mismo algoritmo, fueron menos afortunados que en Sao Paulo (61,4%) y, aunque este aspecto se revisó al inicio para la estandarización de la prueba, consideramos necesario revisar la dinámica de producción de antígenos VIH por el sistema celular H9, ya que es un aspecto crítico (15) y ha podido cambiar en nuestras condiciones de laboratorio. Sin embargo, debe anotarse que en 975 casos tampoco fue posible descartar o confirmar la infección con la técnica del WB comercial.

Si aceptamos que actualmente el costo de cada prueba WB es de \$100.000 (US \$50), el valor de 6.137 pruebas WB habría sido de \$617'000.000 (US \$308.500). Actualmente, el valor de cada prueba IFI es de \$16.600 (US \$8,3), o sea que el costo de las 3.793 pruebas de IFI fue de \$62'963.800 (US \$31.482), en vez de los \$379'300.000 (US \$189.650) que hubieran resultado con la prueba WB. El valor de las 2.377 pruebas (38,6%) que debieron confirmarse por WB debido a que la IFI no pudo resolverlas fue de \$237'700.000, más \$39'458.200 del costo de la IFI que también se les aplicó. El ahorro que tuvo el programa gracias a la IFI fue, entonces, de

\$339'841.800 (\$617'000.000 - \$237'700.000 + \$39'458.200) o US \$169.920, y sería mayor si consideramos que no se ponderaron otros costos favorables a la IFI como son el tiempo del profesional que realiza cada prueba, el rendimiento/día de la misma y los precios considerablemente superiores que tenían las pruebas comerciales WB durante los primeros 5 años de la epidemia y que sólo hacia 1998 comenzaron a ser competitivos en el país.

Los resultados de este estudio permiten concluir que la IFI es una técnica rápida, económica, altamente eficiente y segura como prueba suplementaria confirmatoria para la detección de anticuerpos anti-VIH-1 y la idoneidad del algoritmo adoptado por el INS queda probada con el respaldo de siete años de experiencia.

Agradecimientos

Agradecemos muy sinceramente tanto a los Servicios de Salud como a los Laboratorios de Salud Pública Departamentales y Municipales que integran la Red Nacional de Laboratorios de Colombia, su apoyo con la remisión oportuna de los sueros que fueron seleccionados para este estudio. En ocasiones fue necesario buscar acuciosamente a algunos pacientes para obtener muestras por segunda y aún por tercera vez. Elizabeth Rozo nos ayudó a organizar el manuscrito siguiendo las normas de la revista. Marta Gracia hizo sugerencias útiles para industrializar esta prueba y está encargada actualmente de su preparación comercial.

Referencias

1. **WHO/AIDS.** Report on the global HIV/AIDS epidemic. December 2001. Disponible en: URL: http://unaid.org/epidemic_update/report_dec01/index.html.
2. **Boshell J, Gacharná MG, García M, Jaramillo LS, Márquez G, Fergusson MM, et al.** SIDA en Colombia. En: SIDA, perfil de una epidemia. Washington, D.C.: Pan American Health Organization; 1989.
3. **Boshell J.** AIDS in Colombia. PAHO Bulletin 1989;23:24-9.
4. **Navas MC, Letournier F, Gomas E, Boshell J, Saragosti S.** Analysis of the V3 loop sequences from 12 HIV type 1 infected patients from Colombia, South America. AIDS Res Hum Retroviruses 1999;15:1141-4.
5. **Navas MC, de la Hoz F, Mendoza K, Carrasquilla G, Boshell J.** Epidemiología de la infección por VIH en

- población de riesgo en Cartagena, Colombia. *Biomédica* 1999;19:230.
6. **Castro JA, Beltrán NC, González JE.** Epidemiología del sida en Colombia. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 1997;2:58-64.
 7. **Zacarías F.** Evolución de las epidemias de infección por el VIH/SIDA en la región: retos y oportunidades. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 1999;4:333-5.
 8. **Grupo temático para Colombia ONUSIDA.** Infección por VIH y SIDA en Colombia: aspectos fundamentales, respuesta nacional y situación actual, Colombia 1999. Bogotá: ONUSIDA/Ministerio de Salud; 2000.
 9. **Boshell J.** Diagnóstico específico de la infección por virus de la inmunodeficiencia humana. *Médicas UIS* 1990; 4:149-54.
 10. **Rouzioux C, Chaix ML.** Diagnostic et surveillance virologique de l'infection par le VIH. *Rev du Practicien* 1999;49:1747-9.
 11. **Ministerio de Salud.** Manejo clínico de las infecciones por VIH y sus complicaciones. Reunión de consenso. Febrero 1995. Bogotá: Ministerio de Salud; 1995.
 12. **Carlson JR, Yee J, Hinrichs SH.** Comparison of indirect immunofluorescence and Western blot for detection of anti-human immunodeficiency virus antibodies. *J Clin Microbiol* 1987;25:494-7.
 13. **Zaaijer H, Cuypers H, Wit C, Lelie P.** Results of 1-year screening of donors in The Netherlands for human T-lymphotropic virus (HTLV) type 1: significance of Western blot patterns for confirmation of HTLV infection. *Transfusion* 1994;34:877-80.
 14. **Bartlett JG, Gallant JE.** Medical management of HIV infection. First edition. Baltimore: H&N Printing and Graphics; 2001. p.6-8.
 15. **Gallo D, Diggs JL.** Comparison of detection of antibody to the AIDS by enzyme immunoassay, immunofluorescence and Western blot methods. *J Clin Microbiol* 1986;23:1049-51.
 16. **Gastaldello R, Gallego S, Isa MB, Nates S, Medeot S.** Efficiency of indirect immunofluorescence assay as a confirmatory test for the diagnosis of human retrovirus infection (HIV-1 and HTLV-I/II) in different at risk populations. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1999;41:159-64.
 17. **Abraham P, Babu PG, John TJ.** Comparison of the indirect immunofluorescence assay with Western blot for the detection of HIV antibody. *Indian J Med Res* 1994; 99:143-8.
 18. **Kvinesdal BB, Nielsen CM, Poulsen AG, Hojlyng N.** Immunofluorescence assay for detection of antibodies to human immunodeficiency virus type 2. *J Clin Microbiol* 1989;27:2502-4.
 19. **Auwanit W, Ayuthaya PI, Balachandra K, Jayavasu C, Phanthumachinda B, Ikuta K, et al.** Immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay, particle agglutination and Western blot for the detection of antibody to human immunodeficiency virus type 1. *South-east Asian J Trop Med Public Health* 1990;21:53-9.
 20. **Groen G, Vercauteren G, Piot P.** Immunofluorescence tests for HIV antibody and their value as confirmatory test. *J Virol Meth* 1987;17:35-43.
 21. **Sullivan MT, Mucke H, Kadey SD, Fang CT, Williams AE.** Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for confirmation of human immunodeficiency virus type 1 antibody in US blood donors sera. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2509-10.
 22. **Laboratorio de Virología, INS.** Informe del programa de confirmación de VIH-1, 1997. Laboratorio Nacional de Referencia, Virología, INS. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 1998;3:34-8.
 23. **Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC.** Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984;224:495-500.
 24. **Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS.** Isolation of lymphocytotropic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984;225:840-2.
 25. **Milonakis E, Paliou M, Lally M, Flanigan TP, Rich JD.** Laboratory testing for infection with the human immunodeficiency virus: established and novel approaches. *Am J Med* 2000;109:568-76.
 26. **PAHO/FCA.** Workshop for HIV laboratory directors on immunofluorescence as a confirmatory test. Caracas: OPS; 1993.
 27. **Dean A.** *Epi Info V. 6.04.* Atlanta, Georgia: Centers for Diseases Control and Prevention; 1996.
 28. **Beltrán M, Acosta J, Rojas MC, Velandia MP, Moreno L, Alquichire C, et al.** Quinto estudio centinela nacional de vigilancia de la infección por VIH en Colombia. *Inf Quinc Epidemiol Nac* 2000;5:371-81.
 29. **Houn HY, Pappas AA, Walker EM Jr.** Status of current clinical tests for human immunodeficiency virus (HIV): applications and limitations. *Ann Clin Lab Sci* 1987;17: 279-85.
 30. **Daher MA, Itiama HS, Mukai MS, Carneiro RS, Kamashiro CK.** Perfil do teste de imunofluorescência indirecta como exame confirmatório para HIV-1 nos laboratórios do programa municipal de DTS/AIDS de Sao Paulo. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1999;41:S19.
 31. **Ceballos A, Devito C, Pampuro S, Gómez M, Libonatti O, Martínez L.** Evaluation of indirect immunofluorescence as a supplementary test for the diagnosis of HIV-1 infection. *Rev Argent Microbiol* 1998; 30:59-63.
 32. **McHugh TM, Stites DP, Casavant CH, Carlson JR, Yee J, McVay PA, et al.** Evaluation of the indirect immunofluorescence assay as a confirmatory test for

- detecting antibodies to the human immunodeficiency virus. *Diagn Immunol* 1986;4:233-40.
33. **Kvinesdal BB, Nielsen CM, Poulsen AG, Hojlyng N.** Immunofluorescence assay for detection of antibodies to human immunodeficiency virus type 2. *J Clin Microbiol* 1989;27:2502-4.
 34. **Tanabe-Tochikura A, Ang Singh MT, Tsuchie H, Zhang J, Paladin FJ, Kurimura T.** A newly developed immunofluorescence assay for simultaneous detection of antibodies to human immunodeficiency virus type 1 and type 2. *J Virol Meth* 1995;52:239-46.
 35. **Jaeschke R, Guyatt G, Sackett DL.** For the Evidence-based Working Group. Users' guides to the medical literature. III: How to use an article about the diagnostic test. Are the results of the study valid? *JAMA* 1994;271:703-7.
 36. **Hedenskog M, Dewhurst S, Ludvigsen C, Sinangil F, Rodríguez L, Wu YT, et al.** Testing for antibodies to AIDS-associated retrovirus (HTLV-III/LAV) by indirect fixed cell immunofluorescence: specificity, sensitivity, and applications. *J Med Virol* 1986;19:325-34.
 37. **Schmidt BL, Hutterer J, Kunz C, Gschnait F.** Serology in HIV infection: comparison of indirect immunofluorescence, Western blot and enzyme immunoassay. *Wien Med Wochenschr* 1988;138:174-80.
 38. **Ittis JP, Patel NM, Lee SR, Barmat SL, Wallen WC.** Comparative evaluation of an immunofluorescent antibody test, enzyme immunoassay and Western blot for the detection of HIV-1 antibody. *Intervirology* 1990;31:122-8.
 39. **Gallego S, Recalde A, Gastaldello R, Isa M, Nates S, Medeot S.** Kinetic study of human retrovirus antigens expression in T lymphocytic cell lines by indirect immunofluorescence assay. *Viral Immunol* 1997;10:149-57.
 40. **Van de Perre P, Nzaramba D, Allen S, Riggin CH, Sprecher-Goldberger S, Butzler P.** Comparison of six serological assays for human immunodeficiency virus antibody detection in developing countries. *J Clin Microbiol* 1988;26:552-6.
 41. **Laleman G, Kambale M, Van Kerckhoven I, Kapila N, Konde M, Selemani U, et al.** A simplified and less expensive strategy for confirming anti HIV-1 screening results in a diagnostic laboratory in Lubumbashi, Zaire. *Ann Soc Belg Med Trop* 1991;71:287-94.