

Estudio comparativo de técnicas para el diagnóstico del virus de la inmunodeficiencia humana en niños menores de 15 meses por: cultivo viral, reacción en cadena de la polimerasa y antígeno p24

M^a.A. Muñoz Fernández¹, E. Obregón González¹, J. Navarro Caspistegui¹, M^a.D. Gurbindo Gutiérrez², T. Hernández Sampelayo², E. Fernández-Cruz¹

Resumen. *Objetivos.* Estudio comparativo de los tres marcadores directos de la infección VIH-1: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), cultivo viral (CV) y detección de antígeno p24 en el diagnóstico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) en niños nacidos de madres seropositivas menores de 15 meses de edad. *Métodos.* Se evaluaron 39 niños nacidos de madres seropositivas para VIH-1 con las tres técnicas. Se realizó un seguimiento de los niños hasta los 18 meses de edad. Los niveles de antígeno p24 se midieron en suero y/o plasma; la presencia de ADN proviral de VIH-1 se determinó en células mononucleares de sangre periférica por amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos correspondientes a tres regiones del genoma del virus VIH-1. *Resultados.* En el primer estudio de seguimiento realizado a los 39 niños, 15 (100%) de los niños que posteriormente fueron clasificados por seguimientos clínicos como infectados, fueron positivos por PCR, 14 (93,3%) fueron positivos en el ensayo de cultivo viral y solamente 8 (53,3%) dieron positivo por el ensayo de Agp24. *Conclusiones.* La PCR y el cultivo viral tuvieron mayor sensibilidad que el ensayo de Agp24 para el diagnóstico de la infección VIH-1. El Agp24 se demostró como un marcador útil para el pronóstico de la enfermedad. Este estudio demuestra que la PCR es una alternativa más fiable y rápida que el cultivo viral para el diagnóstico de la infección VIH-1 en niños menores de 15 meses de edad.

An Esp Pediatr 1996;44:540-544.

Palabras clave: PCR; Cultivo viral; Agp24; Niños; VIH-1.

COMPARATIVE STUDY OF THE TECHNIQUES FOR THE DIAGNOSIS OF IMMUNODEFICIENCY VIRUS IN CHILDREN UNDER 15 MONTHS OF AGE: VIRAL CULTURE, POLYMERASE CHAIN REACTION AND p24 ANTIGEN

Abstract. The objective of this study was to compare the polymerase chain reaction (PCR), virus culture (VC) and antigen detection (AG), assays which can be used for the early diagnosis of vertically transmitted HIV-1 infection in infants under 15 months of age, when a diagnosis cannot be based on seropositivity because of maternal antibody persistence. Thirty-nine children born to HIV-1-seropositive mothers were evaluated by the three techniques. The children were then followed to at least 18 months of age. The p24 antigen was measured in plasma and HIV proviral DNA was determined in peripheral blood mononuclear cells after amplification by PCR. Primer pairs from three different regions of the proviral genome were used for the PCR tests. We found that in the first evaluation, 15 (100%) of the children who later developed clinical symptoms were positive by PCR analysis, 14

(93.3%) by the initial VC assay and only 8 (53.3%) by the p24 antigen assay. In conclusion, PCR and VC assays were found to have higher sensitivity than the p24 antigen assay for the diagnosis of HIV-1 infection. In addition, p24 antigenaemia was shown to be useful in predicting the onset of the disease. This study shows that the PCR test represents a more reliable and faster alternative to viral culture for the diagnosis of pediatric HIV infection.

Key words: PCR. Virus culture. p24 antigen assay. Infants. HIV-1.

Introducción

La transmisión maternofetal del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) es la mayor fuente de riesgo de contagio en la población infantil. La OMS estima que para el año 2000, al menos habrá diez millones de niños infectados en el mundo y que de ellos morirán entre tres o cuatro millones por la enfermedad⁽¹⁾. Las tasas de transmisión del VIH de la madre al niño varían según los países, aceptándose oscilaciones entre el 15-35%.

La infección por VIH en la infancia presenta un amplio espectro clínico, que varía desde los niños que permanecen asintomáticos durante 4-5 años y posteriormente desarrollan SIDA, hasta los niños que desarrollan en los primeros meses de vida una forma muy agresiva de la enfermedad, que les conduce a la muerte antes de los 12 meses. Entre estos dos extremos existen formas intermedias con cuadros clínicos que van apareciendo a medida que se produce el deterioro del sistema inmunológico del niño. Aproximadamente el 70% de los niños infectados desarrollan una forma lenta y progresiva y el 30% restante, una forma grave y precoz que pone de manifiesto la alteración inmunológica grave y temprana que presentan estos niños.

El diagnóstico precoz de la infección es esencial para la instauración rápida de terapias preventivas de las infecciones oportunistas, de tratamientos antirretrovirales y clave para la posible adopción de alguno de estos niños⁽²⁾. Uno de los mayores problemas que plantea el diagnóstico de la infección VIH en niños es la limitación que tienen las técnicas habituales del diagnóstico en adultos. Dichas técnicas se basan en la detección de anticuerpos IgG anti-VIH, que en el caso de la mujer VIH+ embarazada atraviesan libremente la placenta y pueden persistir en los niños hasta los 15 meses de edad⁽³⁾. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevas técnicas que permitan realizar con precisión el diagnóstico precoz de los niños infectados por el VIH⁽⁴⁻⁸⁾.

En este trabajo presentamos un estudio comparativo de los tres marcadores directos de la infección VIH-1: co-cultivo vi-

¹Servicio de Inmunología. ²Departamento de Pediatría. Hospital General Universitario «Gregorio Marañón». Madrid.

Correspondencia: Dra. M^a. Angeles Muñoz Fernández. Servicio de Inmunología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

C/ Doctor Esquerdo, 46. 28009 Madrid.

Recibido: Diciembre 1994

Aceptado: Octubre 1995

ral, detección de ADN proviral por PCR y detección de Agp24, para evaluar la especificidad y sensibilidad de los mismos en la detección de VIH-1 en niños menores de 15 meses.

Métodos

Pacientes

Se realizó un estudio en 39 niños nacidos de madres con anticuerpos anti-VIH-1. Los niños se evaluaron clínica, inmunológica y virológicamente cada 3 meses hasta los 2 años de edad y posteriormente cada 6 meses. Los niños fueron diagnosticados positivos para la infección VIH-1 de acuerdo a las normas del «Center for Disease Control» (CDC) en infección pediátrica⁽⁹⁾. El grupo control consta de 16 adultos seronegativos y 6 niños VIH negativos. Todos los ensayos de laboratorio fueron realizados consecutivamente a partir de una misma muestra de sangre del paciente (2-4 ml) usando EDTA como anticoagulante.

Ensayos clínicos

La presencia de anticuerpos anti-VIH-1 en el suero de los niños se realizó por inmunotransferencia o Western blot (Pasteur-Sanofi). La detección de Agp24 en el suero fue evaluada por un ensayo inmunoenzimático (Elavia-Ag I, Diagnostics Pasteur)⁽¹⁰⁾.

Microcultivo viral

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los pacientes se aislaron de 2-4 ml de sangre con EDTA el mismo día de la extracción en un gradiente de densidad Ficoll Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden). 2 x 10⁶ de linfocitos del paciente en 1 ml de medio completo (medio RPMI 1640, 20% suero fetal de ternera, 5% IL-2 [Boehringer Mannheim], 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, Gibco) se cultivaron con 2 x 10⁶ PBMC de donantes sanos previamente estimulados durante 48 horas con 5 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA-P, Difco Laboratories, Detroit, USA) en 1 ml del mismo medio de cultivo. Los co-cultivos se realizaron por duplicado en placas de 24 pocillos. Los linfocitos de sangre periférica de donantes sanos estimulados se prepararon una vez a la semana y se añadieron en 1 ml al co-cultivo, retirándose a su vez 1 ml del medio que se guardó a -70°C para la posterior determinación de Agp24. Los co-cultivos se mantuvieron durante 4-6 semanas. Se evaluó la replicación viral, midiendo la producción de Agp24 del VIH en el sobrenadante de los co-cultivos una vez a la semana hasta el día 45. Los co-cultivos se consideraron positivos para VIH-1 basándose en los resultados obtenidos en la detección de Agp24 según el siguiente criterio: a) Dos valores consecutivos de Agp24 VIH ≥ 30 pg/ml, de los cuales el segundo valor es al menos cuatro veces mayor que el primero o está fuera de rango (es mayor del punto más alto de la curva estándar del ensayo); b) Dos valores consecutivos de Agp24 VIH que se salen de rango, o c) Tres aumentos de valor consecutivos de Agp24 VIH ≥ 30 pg/ml, donde ningún valor consecutivo es cuatro veces mayor que el primero. En los casos a) y b) descritos anteriormente, el primer día que el Agp24 VIH fue ≥ 30 pg/ml se consideró el día del primer positivo. Para el caso

c) el día de obtención del primer positivo se asoció con la segunda muestra que dio positiva.

PCR

Preparación de la muestra o extracción de ADN

Las PBMC obtenidas de sangre periférica se lisaron en 400 µl de solución tampón de lisis (10 mM Tris hidróclorido pH 8,3, 1 mM EDTA, 0,5% Tritón X-100, 0,001% dodecil sulfato sódico y 300 µg/ml de proteinasa-K). El lisado se trató con proteinasa-K durante 1 h a 55°C o toda la noche a 37°C y se inactivó la enzima durante 15 min a 94°C. El lisado celular se guardó a -20°C hasta su utilización. Los oligonucleótidos específicos para la β -globina humana, PCO3 y PCO4⁽¹¹⁾, se utilizaron en todas las muestras para comprobar que el lisado celular se podía amplificar, verificando de esta forma que las muestras eran idóneas para poder ser amplificadas.

Se utilizaron oligonucleótidos para amplificar las regiones pol (JA17-20)⁽¹¹⁾ env (JA9-12)⁽¹¹⁾ y gag (SK380-390)⁽¹²⁾ del genoma del virus VIH-1. La PCR se realizó en dos reacciones; primero con un par de oligonucleótidos externos y posteriormente con un par de oligonucleótidos internos (doble PCR). La PCR se realizó en tubos de 0,5 ml (Perkin Elmer corp.) en un volumen de reacción de 50 µl. La mezcla de reacción contiene una concentración final de Tris ClH (pH 8,3) 10 mM, KCl 40 mM, la concentración óptima de MgCl₂ dependiendo de los oligonucleótidos utilizados (para JA17 y JA20, 7 mM; para JA9 y JA12, 4 mM y para SK380, SK390, SK38, SK39, JA10, JA11, JA18, JA 19, 3 mM); 1 µM de cada oligonucleótido, 50 µM de cada nucleótido (ATP, CTP, GTP, TTP) (Pharmacia) y 2 U de Taq polimerasa (Perkin Elmer) por cada 50 µl de mezcla de reacción. Se añaden 10 µl del lisado celular (correspondiente a 10⁵ PBMC) a la mezcla de reacción para la primera PCR. Las muestras se desnaturalizaron primero a 94°C durante 5 minutos (Termociclador Perkin Elmer 9600) y luego se sometieron a 24 ciclos para los oligonucleótidos JA9-JA12, JA17-JA20 y 30 ciclos para los oligonucleótidos SK380-SK390 a 95°C durante 30 seg; a 47°C oligonucleótidos JA9 y JA12, JA10 y JA11; a 41°C oligonucleótidos JA17 y JA20, JA18; a 53°C oligonucleótidos SK380 y SK390 y a 59°C oligonucleótidos SK38 y SK39 (temperatura de hibridación); y a 72°C durante 30 seg, aumentando dos ciclos por segundo.

Finalmente se incubó a 72°C durante 5 min; 1/10 (5 µl) del producto de la primera PCR se amplificó durante 24 ciclos con los correspondientes oligonucleótidos internos. El producto de la segunda PCR (10 µl) se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y se tiñó con bromuro de etidio. La mezcla de reacción para la doble PCR se realizó en un laboratorio donde no se trabaja con productos amplificados ni con plásmidos de ADN. De todos los reactivos se hicieron alícuotas en volúmenes suficientes para 10 reacciones de PCR y se guardaron a -20°C en un congelador destinado para tales reactivos. Todos los ensayos de PCR incluyen un control positivo y dos controles negativos, un donante seronegativo y la mezcla de reacción. La preparación de ADN y mezcla de la reacción se realizaron de

Tabla I Resultados comparativos de la detección del VIH-1 proviral por PCR y por microcultivos en 39 niños menores de 15 meses de edad

	Cocultivo		
	Positivo	Negativo	
PCR positiva	14	1	15
PCR negativa	0	24	24
	14	25	39

forma rutinaria en un laboratorio diferente de donde se efectuó la electroforesis para reducir el riesgo de contaminación. Para dar un resultado de PCR positiva se requieren al menos la amplificación de dos grupos de oligonucleótidos correspondientes a dos regiones diferentes del genoma viral.

Resultados

Estudiamos 39 niños menores de 15 meses nacidos de madres seropositivas para VIH-1. Todos los niños fueron positivos para anticuerpos anti-VIH-1 al nacimiento. Dos niños desarrollaron SIDA, 13 tuvieron signos y síntomas sugestivos de infección por VIH y 24 niños fueron considerados sanos, pues no presentaron ningún signo ni síntoma de infección por VIH después de 15-18 meses de edad. Quince niños de edad entre 1 y 8 meses tuvieron PCR positiva en el primer estudio, 10 con los oligonucleótidos correspondientes a las tres regiones del virus y 5, dos regiones de PCR positiva (Tabla I); estos 15 niños correspondieron a aquellos que posteriormente se diagnosticaron como positivos para VIH. En este primer estudio y con PBMC de la misma extracción de sangre se realizaron los co-cultivos detectándose en 14 de ellos antígeno p24. Solamente no se encontró correlación con la PCR en uno de los casos (este niño con PCR positiva y co-cultivo negativo tenía un mes de edad y en un estudio posterior, a los 2 meses, se obtuvo PCR positiva y co-cultivo viral positivo). En los estudios de seguimiento de los 39 niños seropositivos, que se realizaron cada 3 meses, se siguieron detectando en los mismos 15 niños VIH por PCR positiva, y en sus correspondientes 15 co-cultivos se detectó antígeno p24. Se realizó también en los 39 niños seropositivos un análisis de la antigenemia en muestra de suero extraída el mismo día que la muestra de PBMC. Se detectó antígeno p24 únicamente en 8 de los 15 niños con PCR positiva y co-cultivo viral positivo (Tabla II).

En los 24 niños que no presentaron posteriormente síntomas de infección por VIH, todos tuvieron PCR negativa, co-cultivo viral negativo y antigenemia p24 negativa. En estos niños al hacer los estudios de seguimiento para anticuerpos anti-VIH-1 se observó serorreversión a los 15-18 meses como se demostró por la ausencia de bandas específicas por VIH en Western blot o con Western blot indeterminado dependiendo de la edad (datos no

Tabla II Resultados comparativos de la detección del VIH-1 proviral por PCR y de la antigenemia p24 en 39 niños menores de 15 meses de edad

	Antigenemia p24		
	Positiva	Negativa	
PCR positiva	8	7	15
PCR negativa	0	24	24
	8	31	39

mostrados). Todos ellos presentaron los marcadores virales, estudiados en paralelo con las tres técnicas, negativos en todos los estudios de seguimiento.

En nuestro estudio, la sensibilidad y especificidad de la PCR fue del 100%; mientras que la sensibilidad del cultivo viral fue de un 93,3% y la especificidad del 100%. A partir de los 2 meses de edad la concordancia de las dos técnicas fue del 100% en cuanto a sensibilidad y especificidad. En relación a la PCR y el co-cultivo viral con el ensayo de antígeno p24, éste tuvo una sensibilidad del 53,3% y una especificidad del 100%.

Discusión

Nuestro estudio indica en la infección VIH-1 perinatal que la técnica de PCR tiene una alta sensibilidad y especificidad. Los resultados demuestran una concordancia en cuanto a sensibilidad entre la PCR y el co-cultivo viral de un 93,3% en el primer estudio realizado en niños menores de 15 meses y en los seguimientos posteriores de un 100%. Como era de esperar, el ensayo para la detección de antígeno p24 en el suero y/o plasma de los niños fue menos sensible que la PCR y el co-cultivo viral, aunque también con un 100% de especificidad.

El co-cultivo viral fue negativo en un niño menor de un mes de edad, mientras que la PCR dio positiva para tres regiones diferentes del genoma viral. Las posibles causas de la discordancia pueden ser que las células del donante no estuvieran estimuladas o que la carga proviral circulante fuera muy baja para ser detectada por co-cultivo viral pero suficiente para poder ser amplificada y dar un resultado positivo por PCR⁽¹³⁾.

En este estudio, el resultado de la PCR se obtiene dentro de los tres días de recepción de la muestra. Por el contrario, el co-cultivo para el aislamiento de virus necesitó de 28 a 45 días para dar un resultado definitivo.

La doble PCR debido a su alta sensibilidad y especificidad permite la visualización directa del producto amplificado mediante una electroforesis en gel de agarosa, evitando así la necesidad de utilizar sondas radiactivas para la detección del producto amplificado⁽¹¹⁾.

Un problema potencial de la alta sensibilidad de la PCR es la posible contaminación de las muestras o reactivos con productos amplificados o con muestras positivas. Estos resultados

de falsos positivos se pueden evitar con normativas de laboratorio estrictas, como cabinas de flujo laminar de uso exclusivo para la realización de la PCR, el uso de pipetas de desplazamiento positivo y mediante protocolos simples de preparación de la muestra, amplificación de ADN y detección del producto amplificado. Es imprescindible tener separada la zona de manipulación de los distintos reactivos de aquella donde se maneja el ADN amplificado⁽¹⁴⁾.

El riesgo de falsos negativos se minimiza utilizando varios pares de oligonucleótidos de diferentes regiones del genoma viral. Esto aumenta, asimismo, la sensibilidad de la técnica en las muestras de pacientes entre 0 y 3 meses. Para dar un resultado de PCR positiva se requieren al menos la amplificación de dos grupos de oligonucleótidos correspondientes a dos regiones diferentes del genoma viral. El caso de los cinco niños con dos regiones de PCR positivas o que daban una de las regiones negativas se puede explicar, o por un número muy bajo de copias proviral en las PBMC, o por una diferencia en dicha región del virus VIH presentes en estos niños, dando como resultado una disminución de la sensibilidad para esta región del genoma por el par de oligonucleótidos utilizados. El ADN de VIH-1 se identificó en todas las muestras de niños seropositivos, que posteriormente desarrollaron alguna sintomatología clínica a lo largo del estudio, mientras que ningún control negativo tuvo resultados de ADN VIH positivos.

De especial importancia es el hecho de que todos los niños que posteriormente se hicieron seronegativos tuvieron PCR negativa. Esto está en contraposición con una serie de estudios, donde una alta proporción de niños sin serología de infección por VIH-1 tuvieron PCR positiva^(13,15). Nuestros resultados están en concordancia con los obtenidos en estudios posteriores que han demostrado una buena correlación entre los resultados obtenidos por PCR y otros signos y síntomas de la transmisión perinatal de la infección por VIH^(11,16-19). Estas discrepancias pueden ser debidas a las diferentes poblaciones estudiadas, a los distintos métodos de PCR utilizados o a las condiciones en las cuales se realizaron los estudios⁽¹⁹⁾. Nosotros no hemos obtenido falsos negativos por PCR. La doble PCR utilizada en nuestro estudio, la cual es altamente sensible, detectó correctamente todos los niños que tuvieron algún signo o síntoma de infección por VIH.

Los co-cultivos de virus, a pesar de que tienen similar sensibilidad y especificidad que la PCR, tienen la desventaja de que se necesita un mínimo de 28 días para poder dar un diagnóstico, aunque por otra parte, permiten posteriores estudios fenotípicos del aislado viral. Pero es necesario destacar que es muy importante la identificación precoz de la infección por VIH en la población neonatal para la instauración rápida de terapias preventivas de las infecciones oportunistas, de tratamientos anti-retrovirales y clave para la posible adopción de alguno de estos niños, por lo cual se necesita un ensayo o una combinación de ensayos óptimos para la confirmación de VIH en neonatos. El ensayo o ensayos a realizar deben ser rápidos y se debe necesitar muy poca muestra de sangre.

El ensayo de detección de antígeno p24 en suero y/o plasma, aunque es un método simple, rápido y tiene una especificidad del 100%, no es un método que se pueda utilizar con suficiente sensibilidad como índice de infección y su utilidad es limitada en niños menores de 15 meses de edad^(20,21). Sin embargo, la presencia de antígeno p24 en un recién nacido es signo inequívoco de infección; ya que nunca se ha encontrado antigenemia p24 positiva en recién nacidos no infectados, ni siquiera en aquellos en los que su madre es positiva para el antígeno p24.

En conclusión, nuestro trabajo muestra que el VIH se puede detectar rápidamente en un 100% de lisados obtenidos de PBMC de niños infectados, mayores de un mes, mediante la utilización de una doble PCR. Es necesario analizar un mínimo de tres regiones del genoma viral, y de esta forma, solamente se necesitaría de uno a tres días para dar un diagnóstico definitivo de la infección por VIH.

Agradecimientos

A Dolores García Alonso por su excelente colaboración técnica en la realización de este trabajo.

Bibliografía

- 1 World Health Organisation Collaborating Centre on AIDS. OMS, 1992.
- 2 Report of a Consensus Workshop, Siena, Italy. Early diagnosis of HIV infection in infant. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992;**5**:1169-1178.
- 3 Garbag CA, Segondy M, Conge AM y cols. Virus isolation, polymerase chain reaction and in vitro antibody production for the diagnosis of pediatric human immunodeficiency virus infection. *J Virol Methods* 1993;**42**:117-125.
- 4 Borkowsky W, Krasinski K, Pollack H y cols. Early diagnosis of human immunodeficiency virus infection in children 6 month of age: Comparison of polymerase chain reaction, culture, and plasma antigen capture technique. *J Infect Dis* 1992;**166**:616-619.
- 5 Comeau AM, Hsu HW, Scherzler M y cols. Identifying human immunodeficiency virus infection at birth: application of polymerase chain reaction to Guthrie cards. *J Pediatr* 1993;**123**:252-258.
- 6 Gurbindo MD, Sampelayo TH, Escudero B, Fernández-Cruz E, Muñoz-Fernández MA. Diagnóstico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en neonatos y niños. *An Esp Pediatr* 1994;**43**:43-45.
- 7 Scarlatti G, Lombardi V, Plebani A, Principi N y cols. Polymerase chain reaction, virus isolation and antigen assay in HIV-1-antibody positive mothers and their children. *AIDS* 1991;**5**:1173-1178.
- 8 Eric A, Sannerud KJ, Leske VA y cols. Sensitive microculture method for isolation of human immunodeficiency virus type I from blood leukocytes. *J Clin Microbiol* 1992;**30**:444-448.
- 9 Center for Diseases Control. Classification system for human immunodeficiency virus (HIV) infection in children under 13 years of age. *MMWR* 1987;**36**:225-235.
- 10 González B, García Montes M, Zabay JM, Longo N, Sempere JM, Fernández-Cruz E. Circulating immune complexes (CIC) in HIV-infected drug users (IVDU). Demonstration of p24 antigen as a component of CIC in patients with and without free-antigen throughout the course of HIV infection (abstract W.A. 1141). En: Abstract Book, volume 2, of the VII International Conference on AIDS. Florencia (Italia), 1991.

- 11 Albert J, Fenyö EM. Simple sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. *J Clin Microbiol* 1990;**28**:1560-1564.
- 12 Yourho J, Conroy J. A novel polymerase chain reaction methods for detection of human immunodeficiency virus in dried blood spots on filters paper. *J Clin Microbiol* 1992;**30**:2887-2892.
- 13 Laure F, Courgnaud V, Rouzioux C y cols. Detection of HIV-1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. *Lancet* 1988;**ii**:538-541.
- 14 Muñoz-Fernández MA. Aplicación de la PCR al diagnóstico de la infección por VIH. Reunión de Consenso sobre la Infección por VIH. Eds. R. Nájera y J.M. González Lahoz. Madrid: SEISIDA, 1994.
- 15 Rogers MF, Ou CY, Rayfield M y cols. Use of the polymerase chain reaction for early detection of the proviral sequences of human immunodeficiency virus in infants born to seropositive mothers. *N Engl J Med* 1989;**320**:1649-1654.
- 16 Edwards JR, Ulrich PP, Weintrub PS y cols. Polymerase chain reaction compared with concurrent viral cultures for rapid identification of human immunodeficiency virus infection among high risk infants and children. *J Pediatr* 1989;**155**:200-203.
- 17 Williams P, Simmonds P, Yap PL y cols. The polymerase chain reaction in the diagnosis of vertically transmitted HIV infection. *AIDS* 1990;**4**:393-398.
- 18 Brinchmanje JE, Albert J, Jvartdal F. Few infected CD4+ T cells but high proportion of replication competent provirus copies in early human immunodeficiency type 1 infection. *J Virol* 1990;**65**:2019-2023.
- 19 Scarlatti G, Lombardi V, Plebani A y cols. Polymerase chain reaction, virus isolation and antigen assay in HIV-1-antibody-positive mothers and their children. *AIDS* 1991;**5**:1172-1178.
- 20 Connor E. Advances in early diagnosis of perinatal HIV infection. *JAMA* 1991;**266**:374-375.
- 21 Rogers MF, Ou CY, Kilbourne B, Schochetman G. Advances and problems in the diagnosis of human immunodeficiency virus infection in infants. *Pediatr Infect Dis* 1991;**10**:523-531.