

Determinación de la carga viral para el diagnóstico precoz de la infección perinatal por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)

S. Resino García, R. Alonso Arias, J.L. Jiménez Fuentes, D. Gurbindo Gutiérrez¹, M.A. Muñoz-Fernández

Resumen. *Objetivo:* Comparar la sensibilidad y especificidad de la reacción en cadena de la polimerasa de DNA (PCR) y cultivo viral empleados de forma rutinaria en el diagnóstico de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con la técnica de determinación de RNA del VIH-1 (carga viral).

Pacientes y métodos: Se estudiaron 106 niños nacidos de madres VIH divididos en tres grupos: A) recién nacidos entre 24-96 horas; B) 23 niños entre 1 y 2 meses, y C) 64 niños mayores de 2 meses. La carga viral se determinó en plasma, el DNA se determinó en linfocitos por PCR y se aisló el VIH por cultivo viral.

Resultados: En el grupo A la sensibilidad de la carga viral fue del 75%, mientras que la sensibilidad de la DNA-PCR fue del 50% y del cultivo viral del 25%, la especificidad de las tres técnicas fue del 100%. En el grupo B, la sensibilidad y especificidad de la carga viral fue del 100%, mientras que la sensibilidad de la DNA-PCR y del cultivo viral fue del 85,7%, la especificidad de las tres técnicas fue del 100%. En el grupo C las tres técnicas presentaron un 100% de sensibilidad y especificidad.

Conclusiones: Nuestros resultados demuestran que las tres técnicas, determinación de la carga viral, DNA-PCR y el cultivo viral, tienen la misma sensibilidad a partir de los dos meses de edad. Sin embargo, en edades inferiores a los dos meses, la técnica de determinación de la carga viral, que no se utiliza de forma rutinaria, presenta una mayor sensibilidad, representando una técnica más eficaz para el diagnóstico.

An Esp pediatr 1998;49:60-64.

Palabras clave: Infección vertical VIH-1; PCR; Cultivo viral; Carga viral.

VIRAL LOAD QUANTIFICATION FOR THE EARLY DIAGNOSIS OF PERINATAL HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS 1 (HIV-1) INFECTION

Abstract. *Objective:* The aim of this study was to compare the sensitivity and specificity of polymerase chain reaction (DNA-PCR) and virus cultures with HIV-RNA assays (viral load) in the early diagnosis of vertically transmitted HIV-1 infection.

Patients and methods: One hundred and six infants born to HIV-1 seropositive mothers were divided into three groups: A) Nineteen newborns (24-26 hours of age); B) Twenty-three infants between 1 and

2 months of age; and C) Sixty-four infants older than 2 months. HIV-1 RNA was measured in plasma and HIV proviral DNA was determined in peripheral blood mononuclear cells after amplification by DNA-PCR. The HIV was isolated by a microculture technique.

Results: In the samples obtained during the neonatal period (less than 96 hours of age), 75% of the infants were positive by viral load analysis, 50% by proviral DNA-PCR and only 25% by culture assay. In group B, 100% of the infants were positive by viral load analysis and 85.7% by proviral DNA-PCR and culture assays. Viral load, proviral DNA-PCR and cultures were positive in all infants older than 2 months of age.

Conclusions: Our results indicate that the 3 techniques, viral load, DNA-PCR and culture, have 100% sensitivity after 2 months of age. However, the viral load technique, which is not routinely used, was found to have a higher sensitivity than proviral DNA-PCR and viral culture in infants younger than 2 months. We conclude that viral load is a useful technique to diagnose HIV infection in newborns.

Key words: Vertical transmission. HIV-1. PCR. Viral culture. Viral load.

Introducción

En los últimos años se han producido cambios muy importantes en las perspectivas del tratamiento de la infección por el VIH-1. La introducción del método de cuantificación de ARN del VIH-1 y la utilización de inhibidores de la proteasa en tratamientos combinados de tres y cuatro fármacos, han cambiado las expectativas de vida de los individuos infectados. En neonatos tan pronto como se ha confirmado el diagnóstico precoz de infección por VIH-1, si se comienza el tratamiento con terapia triple se puede llegar a niveles indetectables de carga viral, lo que sugiere que un tratamiento rápido puede ser de gran eficacia frente al virus. Este sería un objetivo deseable para todos los niños, por lo tanto, el diagnóstico precoz de la infección por VIH en la transmisión maternofetal del VIH-1 es esencial.

Las aproximaciones actuales al diagnóstico precoz de la infección por VIH-1 en recién nacidos y lactantes, se basan en técnicas de detección de DNA proviral por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y en cultivos virales. Estudios preliminares indican que la PCR, capaz de ampliar regiones del genoma viral en más de 100.000 copias, detecta secuencias de VIH-1 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en aproximadamente un 50% de recién nacidos durante la primera semana de vida y en un 95% a 100% de niños infectados mayores de un

¹Departamento de Pediatría, Servicio de Inmunología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

Financiado por el proyecto: Salud y Farmacia (SAF 96-0094), MAMF.

Correspondencia: M^a Angeles Muñoz-Fernández. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Servicio de Inmunología. C/ Dr. Esquerdo 46. 28007 Madrid.

Recibido: Marzo 1998

Aceptado: Junio 1998

mes^(1,2). Ello pone de manifiesto la dificultad que plantea el diagnóstico en las dos primeras semanas de vida. Esto nos ha llevado a la búsqueda de nuevas técnicas que permitan el diagnóstico precoz de los niños infectados perinatalmente por el VIH-1.

La cuantificación del RNA VIH-1, denominada carga viral, requiere un paso previo de RNA a DNA complementario antes del proceso de amplificación. Se recomienda la utilización de plasma para su realización. La cantidad de muestra necesaria es de 100 a 200 µl de plasma. Esta técnica se ha mostrado como un marcador predictivo en individuos adultos infectados por VIH-1 y se utiliza en la toma de decisiones sobre el comienzo y cambio de terapia antirretroviral, ya que existe una relación entre la potencia del tratamiento y la reducción del número de partículas virales circulantes⁽³⁻⁵⁾. La carga viral también se relaciona con la tasa de transmisión del VIH-1 y riesgo de progresión a SIDA en parejas sexuales⁽⁶⁾, en receptores de transfusiones⁽⁷⁾ y en recién nacidos de madres seropositivas⁽⁸⁾. El objetivo de este trabajo es estudiar si la determinación de la carga viral presenta ventajas en el diagnóstico precoz de la infección por VIH-1 en niños nacidos de madres seropositivas. Para analizar este objetivo, hemos realizado un estudio en muestras de plasma durante el período neonatal y durante los primeros 12 meses de vida en niños registrados en un estudio de transmisión vertical.

Pacientes y métodos

Pacientes pediátricos con infección VIH

El grupo de estudio incluye 106 niños nacidos de madres seropositivas para VIH-1: 19 recién nacidos de edad comprendida entre 24-96 horas, 23 niños menores de 2 meses (rango: 1-1,73 meses) y 64 niños mayores de 2 meses de edad, controlados en el Departamento de Immunopediatría del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid, desde enero de 1991, hasta junio de 1997. El factor de riesgo de transmisión fue por vía vertical en todos los pacientes pediátricos. Todos los niños fueron positivos para anticuerpos anti-VIH al nacimiento. Sin embargo, 44 niños de los 106 niños estudiados estaban realmente infectados por VIH-1 utilizando métodos de detección directa del virus (DNA-PCR y cultivo viral) en sucesivos estudios de seguimiento.

Extracción y procesamiento del plasma

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción en tubos con anticoagulante EDTA, y los plasmas se separaron durante la primera hora tras la extracción por centrifugación. El plasma se congeló directamente a -70 °C después de su separación.

Detección de anticuerpos anti-VIH-1 en suero por inmunotransferencia

Se realizó la determinación de anticuerpos anti-VIH-1 mediante un equipo comercial (New Lav Blot I, Sanofi Pasteur), destinado a la detección de estos anticuerpos por inmunotransferencia (Western-Blot, WB), para la confirmación de respuestas anti-VIH positivas⁽²⁾.

Aislamiento del VIH-1 por cultivo viral

La detección del VIH-1 se realizó utilizando un ensayo de microcultivo⁽⁹⁾. Las CMSP se aislaron por centrifugación realizando un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Se cocultivaron 2 x 10⁶ CMSP del paciente con 2 x 10⁶ CMSP de un donante sano previamente estimuladas durante 48 horas con PHA (Difco Laboratoires, Inc., Detroit, Mich.) en placas de 24 pocillos con 2 ml de medio RPMI suplementado con 20% de suero fetal de ternera (FCS) y 20 U/ml de IL-2. Semanalmente se añadieron 2 x 10⁶ CMSP preestimuladas con PHA en 1 ml de medio fresco, y dos veces por semana se recogieron los sobrenadantes para determinar por ELISA la concentración de Ag p24 para VIH-1 (Elavia-Ag I, Diagnostics Pasteur). Los cocultivos se mantuvieron de 28 a 42 días.

Detección del DNA proviral de VIH-1 por PCR

El DNA de las células, se extrajo mediante lisis y digestión con proteinasa K (10 mM Tris pH 8,0, 0,1 M EDTA, 0,5% SDS y 100 mg/ml de proteinasa K (Sigma)) durante 3 horas a 50°C, con extracción posterior con 1 volumen de fenol (pH 8,0) y 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), precipitación con 1 volumen de etanol absoluto y 0,3 M de acetato amónico. El DNA se lavó después con etanol al 70% y se resuspendió en H₂O libre de nucleasas.

Las CMSP de todos los niños se analizaron para la detección de DNA VIH-1 por doble PCR con oligonucleótidos específicos para los genes *gag*, *pol* y *env* del genoma viral (JA4-A7, JA17-JA20 Y JA13-JA16, respectivamente), previamente publicados⁽¹⁰⁾. Las muestras primero se amplificaron durante 24 ciclos con pares de oligonucleótidos externos y posteriormente 1/10 (5 ml) del producto de la primera PCR se amplificó durante 30 ciclos con pares de oligonucleótidos internos. La preparación de las muestras se realizó en una cabina de flujo laminar de alta seguridad, destinada exclusivamente a la realización de la PCR. Las muestras de todos los niños VIH-1 dieron una señal positiva con los oligonucleótidos PC03-PC04 específicos para los genes humanos de la β-globina^(2,9). El producto de la PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y tinción con bromuro de etidio. Las muestras se consideraron positivas si al menos dos regiones diferentes del genoma humano repetidamente dieron un producto de amplificación específico.

Cuantificación de RNA viral por RT-PCR

Los niveles de RNA viral en el plasma de los pacientes pediátricos, se cuantificaron usando un ensayo comercial (Amplacor-HIV Monitor TMTest), aprobado por la Federal Drug Administration (FDA), para monitorización de carga viral en mayo de 1996⁽¹¹⁾.

Resultados

Estudiamos 106 niños nacidos de madres seropositivas para VIH-1 divididos en tres grupos según edad: grupo A) 19 recién nacidos de edad comprendida entre 24-96 horas, grupo B) 23 niños menores de 2 meses (rango 1-1,73 meses) y grupo C)

Tabla I Resultados comparativos de la detección de VIH por carga viral (RT-PCR), DNA-PCR y cocultivo viral en 106 niños VIH-1 menores de 12 meses de edad

Edad	Técnica	VP	FN	VN	FP	S	VPN
< 1mes	RT-PCR	3	1 (25%)	16	0	75%	94%
	DNA-PCR	2	2 (50%)	17	0	50%	89,4%
	Cocultivo	1	3 (75%)	18	0	25%	85%
1-2 meses	RT-PCR	7	0	16	0	100%	100%
	DNA-PCR	6	1 (14,2%)	17	0	85,8%	94%
	Cocultivo	6	1 (14,2%)	17	0	85,8%	94%
> 2 meses	RT-PCR	33	0	31	0	100%	100%
	DNA-PCR	33	0	31	0	100%	100%
	Cocultivo	33	0	31	0	100%	100%

VP: verdadero positivo; FN: falso negativo; VN: valor negativo;
FP: falso positivo; S: sensibilidad; VPN: valor predictivo negativo.

64 niños mayores de 2 meses de edad. Todos los niños presentaron anticuerpos anti-VIH al nacimiento. De estos 106 niños, sólo 44 niños se diagnosticaron definitivamente como infectados por el VIH-1 por métodos de laboratorio (DNA-PCR, cocultivo viral y determinación de la carga viral) en estudios de seguimiento que se realizaron de forma rutinaria cada tres meses. Además, en todos estos estudios de seguimiento se observaron anticuerpos anti-VIH, como se demostró por ensayo de inmunotransferencia o Western-Blot positivo. Los 62 niños restantes fueron diagnosticados como no infectados en estudios de seguimiento. En estos niños al hacer los estudios de seguimiento para anticuerpos anti-VIH se observó serorreversión a los 15-18 meses, como se demostró por la ausencia de bandas específicas para VIH por inmunotransferencia o Western-Blot. Todos tuvieron DNA PCR negativa, cocultivo viral negativo y valores de carga viral negativos en todos los estudios de seguimiento.

Realizamos un estudio comparativo de los dos métodos utilizados de forma rutinaria en el diagnóstico precoz de la infección por VIH-1 en los 106 niños menores de 12 meses de edad: detección de DNA proviral por PCR y cocultivo viral y del método de cuantificación de carga viral, para evaluar la sensibilidad y especificidad de los mismos.

Tres de los 19 recién nacidos del grupo A tuvieron resultados de carga viral positivas, dos de estos tres niños tuvieron resultados de DNA-PCR positiva y solamente un recién nacido de estos tres tuvo resultado de cocultivo viral positivo (Tabla I). En estudios de seguimiento, cuatro niños (incluyendo los 3 anteriores) fueron diagnosticados como positivos para la infección. Ninguno de los otros 15 fueron infectados por el VIH-1, ya que nunca se detectó virus y los anticuerpos anti-VIH-1 desaparecieron (serorreversión).

De los 23 niños del grupo B que presentaban en el primer estudio entre 1 y 2 meses de edad, siete presentaron valores de carga viral positiva, seis de estos siete niños tuvieron resultados

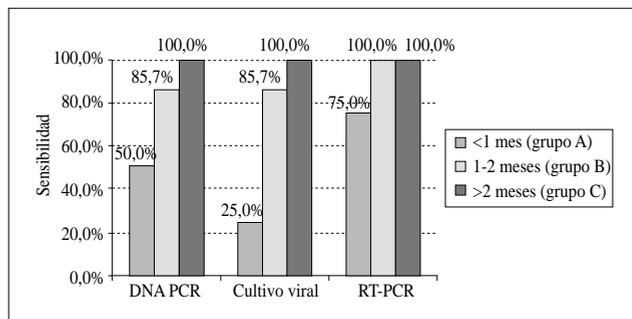


Figura 1. Sensibilidad de las técnicas de diagnóstico de la infección por VIH-1 (DNA-PCR, cultivo viral y carga viral -RT-PCR-) en niños menores de 12 meses de edad.

En el grupo A, la sensibilidad de la DNA-PCR fue del 50%, en el cultivo viral del 25% y en la RT-PCR del 100%. En el grupo B, la sensibilidad de la DNA-PCR y del cultivo viral fue del 85,7% y de la RT-PCR del 100%. En el grupo C, las tres técnicas tuvieron una sensibilidad del 100%.

de DNA-PCR positiva y seis de estos siete tuvieron valores de cocultivo viral positivo. Los siete niños se diagnosticaron positivos para VIH-1 y los restantes 16 no resultaron infectados por VIH-1 en estudios de seguimiento posteriores (Tabla I).

De los 64 niños del grupo C analizados en primera instancia con más de dos meses de edad, 33 niños tuvieron valores positivos de las tres técnicas y los 31 restantes valores negativos para las tres técnicas (Tabla I). Posteriormente, en sucesivos estudios de seguimiento se corroboró que los 33 niños estaban infectados.

Así pues, de los resultados anteriores se puede deducir que la sensibilidad de la carga viral en el grupo A de recién nacidos fue del 75% (3/4), mientras que la sensibilidad de la DNA-PCR fue del 50% (2/4) y del cocultivo viral del 25% (1/3); la especificidad de las tres técnicas fue del 100% ya que no detectaron ningún falso positivo (Fig. 1). En el grupo B, de niños de edad comprendida entre 1-1,73 meses, la sensibilidad y especificidad de la carga viral fue del 100% (7/7), mientras que la sensibilidad de la DNA-PCR y del cocultivo viral fue del 85,7% (6/7) y la especificidad de ambas técnicas fue del 100% (Fig. 1). En el grupo C, niños a partir de dos meses de edad, la concordancia entre las tres técnicas fue del 100% en cuanto a sensibilidad y especificidad (Fig. 1). El valor predictivo positivo (VPP) fue del 100% en todos los grupos de niños. El valor predictivo negativo (VPN) en los niños VIH-1 menores de 1 mes de edad fue del 94% para la carga viral, del 89,4% para la técnica de DNA-PCR, y del 85% para el cocultivo viral (Fig. 2); cuando los niños VIH-1 se analizaron entre 1 y 2 meses (grupo B), el VPN fue del 100% para la carga viral y del 94% para las técnicas de DNA-PCR y cocultivo viral (Fig. 2). Mientras que en el grupo C, niños VIH-1 mayores de 2 meses de edad el VPN fue del 100% para las tres técnicas (Fig. 2).

Discusión

En este trabajo se ha investigado el papel que podría tener la cuantificación de carga viral por RT-PCR durante las primeras

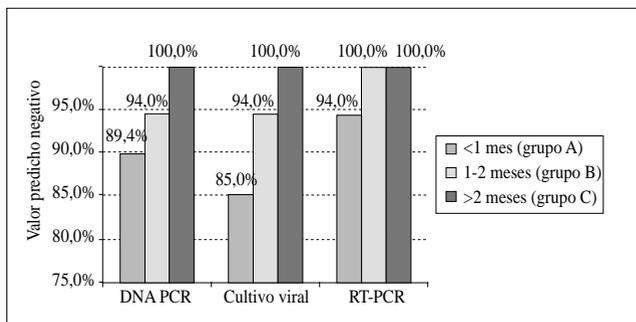


Figura 2. Valor predictivo negativo de las técnicas de diagnóstico de la infección por VIH-1 (DNA-PCR, cultivo viral y carga viral -RT-PCR-) en niños menores de 12 meses de edad.

En el grupo A, el VPN de la DNA-PCR fue del 89,4%, en el cultivo viral del 85% y en la RT-PCR del 94%. En el grupo B, el VPN fue del 94% para la DNA-PCR y cultivo viral y del 100% para la RT-PCR. En el grupo C, el VPN fue del 100% para las tres técnicas.

semanas de vida y se ha demostrado que durante este período de tiempo esta técnica incrementa el número de niños diagnosticados con infección por VIH en comparación con los ensayos convencionales de DNA-PCR y cocultivo viral, detectando RNA VIH en tres de cuatro recién nacidos (75%) y en siete de siete niños menores de 2 meses de edad (100%), frente a 50% y 85,7% por DNA-PCR. A todos ellos posteriormente se confirmó su infección por VIH-1. De especial importancia es el hecho de que todos los niños que posteriormente se hicieron seronegativos tuvieron valores de carga viral o RNA VIH negativo.

En este estudio, por métodos de PCR y cultivo viral, se han diagnosticado 11 niños infectados por VIH-1 antes del final de su segundo mes de vida, y los resultados han sido confirmados por una tercera muestra obtenida entre los meses 4 y 7. Estas evidencias muestran que se puede tener un diagnóstico de infección por VIH-1 por PCR o cultivo viral antes de los dos meses de vida y, quizás tan pronto como al final del primer mes. Sin embargo, tres de 11 (27,27%) niños infectados por VIH no se pudieron diagnosticar en el momento del nacimiento ni por PCR ni por cultivo viral. Esto no fue debido a dificultades técnicas, tales como dificultades en la obtención de muestras en el momento del nacimiento o ausencia de sensibilidad de la PCR. En cada experimento se ensayó la sensibilidad de la PCR y siempre encontramos una señal positiva de 1 copia de DNA proviral en 100.000 células. Para descartar diferencias cualitativas entre muestras, la amplificación por PCR de muestras diluidas 10 veces de lisados obtenidos en el momento del nacimiento y a 4, 7 semanas en cuatro niños (con pares de oligonucleótidos de la β -globina) mostró una señal positiva en la tercera dilución. La misma tendencia se observa en el cultivo viral. Los resultados negativos de PCR y cultivo obtenidos en el momento del nacimiento indican que la carga proviral en CMSP en ciertos pacientes infectados no fue suficiente para ser detectada.

En concordancia con los datos obtenidos en este trabajo, estudios previos estimaron la sensibilidad de la DNA-PCR en un 22% en el momento del nacimiento, 42% a los 4 días, 55% a los

7 días de edad, 73% a los 14 días, 90% a los 21 días y del 95% a los 35 días⁽¹²⁻¹⁵⁾. Otros estudios estiman más alta la sensibilidad de la DNA-PCR en el período neonatal, observando una sensibilidad del 93% a los 14 días⁽¹⁶⁾.

Nuestro trabajo demuestra que el cocultivo tiene la misma sensibilidad que la PCR a partir de los dos meses de edad, siendo la concordancia con la técnica de DNA-PCR del 100%. En edades inferiores a los dos meses la sensibilidad del cocultivo fue menor que la DNA-PCR, solamente uno de los dos recién nacidos positivos por PCR tuvieron resultado de cocultivo positivo. 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 cocultivo viral, pero suficiente para poder ser amplificada y dar un resultado positivo por DNA PCR o que el DNA no estuviera integrado⁽¹⁷⁾.

Nuestros resultados pueden indicar la utilización de la determinación de la carga viral como método complementario, incluso superior a los actualmente utilizados para el diagnóstico de la infección por VIH en recién nacidos. Es muy importante tener en cuenta que cuando se analiza una muestra por RT-PCR no se está detectando virus integrado en el genoma del hospedador, sino virus circulante en el torrente sanguíneo. En algunos casos, cuando las muestras de sangre se obtengan en el momento del parto, se podría estar detectando carga viral de la madre y no del recién nacido, o virus defectivo que posteriormente no se integre en el genoma y, por lo tanto, no sea viable. Se necesita un mayor número de estudios a largo plazo para poder confirmar la nueva aplicación de la RT-PCR del VIH como técnica diagnóstica.

Agradecimientos

A Dolores García Alonso por su excelente labor técnica.

Bibliografía

- Dunn DR, Brandt CD, Krivine A y cols. The sensitivity of HIV-1 DNA polymerase chain reaction in the neonatal period and the relative contributions of intra-uterine and intra-partum transmission. *AIDS* 1995; **9**:F7-F11.
- Muñoz-Fernández MA. Aplicación de la PCR al diagnóstico de la infección por VIH. En: Reuniones de Consenso sobre la infección por VIH. Diagnóstico de laboratorio de la infección por VIH, Marcadores de Progresión (Copyright 1994. R. Nájera Morondo y J.M. González Lahoz), 1994:63-73.
- Ho DD, Neumann A, Perelson A y cols. Rapid turnover of plasma viremia and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; **373**:123-126.
- Perelson A, Neumann A, Markowitz M y cols. HIV-1 dynamics in vivo: viremia clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996; **271**:1582-1586.
- Muñoz-Fernández MA. Valor de la carga viral en la monitorización del tratamiento antirretroviral. En: Tratamiento de la infección por el VIH en niños (Copyright 1997, Teresa Español e Isabel Ruiz). Springer-Verlag Ibérica 1997:16-22.
- Carré N, Meyer L, Boufassa F y cols. High risk of disease progression after infection through a sexual partner with AIDS. *AIDS* 1996; **10**:77-80.

- 7 Busch, Operskalski E, Mosley J y cols. Factors influencing HIV type 1 transmission by blood transfusion. *J Infect Dis* 1996; **174**:26-33.
- 8 Fang G, Burger H, Grimson R y cols. Maternal plasma HIV-1 RNA level: a determinant and projected threshold for mother-to-child transmission. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**:12100-12104.
- 9 Muñoz-Fernández MA, Obregón E, Navarro J, Börner C, Gurbindo MD, Sampelayo TH, Fernández-Cruz E. Relationship among virological, immunological and clinical parameters in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus (HIV-1) infection. *Pediatric Research* 1996; **40**:597-602.
- 10 Albert J, Feny EM. Simple sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polimerase chain reaction with nested primers. *J Clin Microbiol* 1996; **28**:1560-1564.
- 11 Colaborativo Español para la Infección VIH Pediátrica (CEVIHP). Epidemiología de la infección por VIH, mecanismo de infección, diagnóstico de laboratorio de la infección por VIH. En: Manual Práctico de la Infección por VIH en el niño (Copyright 1996, J.R. Prous, SA). Barcelona-Philadelphia: Prous Science, 1996:3-34.
- 12 Krivine A, Firtion G, Cao K, Francocual C, Henrion JR, Lebon P. HIV replication during first weeks of life. *Lancet* 1992; **339**:1187-1189.
- 13 De Rossi A, Ometto L, Mammano F, Zanotto C, Giaquinto C, Chieco-Bianchi L. Vertical transmission of HIV-1: lack of detectable virus in peripheral blood cells of infected children at birth. *AIDS* 1992; **6**:1117-1120.
- 14 Brandt CD, Rakusan TA, Sison AV, Saxena ES, Ellaurie M, Sever JL. Human immunodeficiency virus infection in infants during the first 2 months of life: reliable detection and evidence of in utero transmission. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994; **148**:250-254.
- 15 Dunn DT, Brandt CD, Krivine A y cols. The sensitivity of HIV-1 DNA polymerase chain reaction in the neonatal period and the relative contributions of intra-uterine and intra-partum transmission. *AIDS* 1995; **9**:F7-F11.
- 16 Kuhn L, Abrams EJ, Chinchilla M, Tsai W-Y, Thea DM, New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. Sensitivity of HIV-DNA polymerase chain reaction in the neonatal period. *AIDS* 1996:1181-1182.
- 17 Gurbindo MD, Fortum Guash C, Sampelayo TH, Escudero B, Muñoz-Fernández MA. Sida infantil: actualización. *Medicine* 1995; **6**:3780-3789.