

Artículo original

Detección del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 mediante la PCR, en neonatos de madres seropositivas

Pierina D'Angelo*, Gladis Ameli, Cristina Gutiérrez

Laboratorio de Programas Especiales
Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"
Caracas - Venezuela

Recibido 21 de mayo de 2007; aceptado 13 de septiembre de 2007

Resumen: El diagnóstico temprano de la infección por el VIH-1 en el recién nacido es importante para su manejo clínico oportuno. Los objetivos de este trabajo fueron la detección del ADN proviral del VIH-1 mediante la técnica de PCR en neonatos de madres seropositivas al VIH-1 y la determinación de los posibles factores de transmisión vertical por VIH-1 en la población estudiada. Se analizaron 214 muestras sanguíneas de niños entre 0 y 18 meses de edad, referidos al INHRR entre Septiembre 2005-Agosto 2006. Todas las muestras se colectaron de manera estéril con EDTA, las células mononucleares de sangre periférica se separaron mediante gradiente de HISTOPAQUE. Posteriormente el ADN proviral fue extraído mediante columnas de sílica-gel (QIAGEN). La amplificación del material genético de cada muestra se efectuó por dos ensayos de PCR a dos rondas, utilizando iniciadores conservados de los genes *env* y *gag* del VIH-1. Se encontró ADN proviral del VIH-1 en un 8% (17/214 muestras) de la población infantil evaluada, de los cuales el 82,4% mostraron elevados niveles de carga viral ($>5.0 \log_{10}$). Se corroboró la utilidad de la PCR como herramienta molecular en el diagnóstico oportuno de infección perinatal por el VIH-1.

Palabras clave: reacción en cadena de la polimerasa, VIH, infección perinatal

Detection of type 1 human immunodeficiency virus through the PCR in newborns from seropositive mothers

Abstract: The early diagnosis of HIV-1 infection is important for the opportune management of these patients. Objectives of this work were detection of proviral HIV-1 DNA through the PCR technique in newborns from HVI-1 seropositive mothers and determination of the possible vertical HIV-1 transmission factors in the population studied. 214 blood samples taken from children aged between 0 and 18 months referred to the INHRR during the September 2005-August 2006 period. All the samples were mixed with EDTA under sterile conditions. Peripheral blood mononuclear cells were separated by an HISTOPAQUE gradient. Later, the proviral DNA was extracted through silica-gel columns (QIAGEN). The amplification of the genetic material of each sample was obtained through two PCR determinations in two stages, using initiators conserved from *env* and *gag* HIV-1 genes. Proviral HIV-1 DNA was found in 8% (17/214) of the samples of the child population evaluated, 82.4% of which showed elevated viral load levels ($>5.0 \log_{10}$). The usefulness of PCR as a molecular tool for the opportune diagnosis of perinatal HIV-1 infection is corroborated.

Keywords: polymerase chain reaction, HIV, perinatal infection

* Correspondencia:
E-mail: pierinads@yahoo.com

Introducción

La infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH-1), representa un problema de Salud Pública a nivel

mundial. Este agente viral infecta a hombres, mujeres y niños de todos los grupos socioeconómicos y edades. La transmisión del virus se produce a través de tres vías: contacto sexual, contacto parenteral y transmisión vertical, de

madre a hijo. En niños el mecanismo más importante de infección es el vertical, responsable de más del 90% de los casos. La transmisión vertical puede ocurrir durante el embarazo (intrauterino), durante el trabajo de parto y en el parto (intraparto), o bien en el período postnatal, a través de lactancia materna. Diversos estudios han demostrado que en el 50-70% de los casos la transmisión ocurre intraparto, constituyendo por lo tanto este período el de mayor riesgo de infección para el niño. Aproximadamente 16,5 millones de mujeres conviven con el VIH en el mundo y alrededor de 600.000 niños se infectan anualmente (1600/24 horas) [1]. A nivel mundial, desde el comienzo de la pandemia, se ha diagnosticado el SIDA en un estimado de 8779 niños, cuya infección había sido adquirida perinatalmente. De estos infantes, aproximadamente 4982 habían muerto para el año 2004 [2]. Desde 1994, a raíz de la implementación del protocolo PACTG 076, se bajó a un tercio la infección perinatal, se recomiendan los estudios de VIH universal y uso de antirretrovirales en la embarazada, en el parto y en el recién nacido por 6 semanas [3].

En Venezuela, se reportó una prevalencia de 8.2/100.000 casos de niños infectados en el Hospital José Manuel de los Ríos de Caracas para 1996, teniendo hasta junio del 2001, 160 casos en control, de los cuales 110 están infectados por VIH y reciben tratamiento de alta eficacia mientras que el resto son niños expuestos perinatalmente al virus quienes se encuentran en seguimiento para el descartar definitivo de la infección [4].

La infección perinatal por el VIH puede ocurrir durante el embarazo, el parto, o el período de lactancia [5]. El diagnóstico temprano de la infección en el recién nacido es muy importante para el manejo clínico, así como para la profilaxis de infecciones oportunistas. De hecho, los niños infectados por este virus pueden desarrollar neumonía por *Pneumocystis jirovecii* mucho antes que el diagnóstico sea confirmado. Sin embargo, el diagnóstico de infección por VIH en niños menores de 18 meses, nacidos de madres seropositivas, presenta dificultades especiales. La serología tradicional no ofrece garantías diagnósticas, puesto que los anticuerpos de tipo inmunoglobulina IgG detectados frecuentemente corresponden a anticuerpos maternos transferidos *in utero*. La seroconversión, o pérdida de anticuerpos maternos, sucederá entre los 12 y 18 meses de edad en aquellos niños que no hayan adquirido la infección. El uso de métodos directos es más apropiado para el diagnóstico precoz. La detección de antígeno p24 presenta una especificidad del 100%, aunque su sensibilidad es variable y en niños recién nacidos infectados puede ser sólo del 20%. El cocultivo de células mononucleares de sangre periférica tiene una sensibilidad del 50% en los primeros 15 días de vida y entre el 70-80% al final de primer mes. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) presenta una alta sensibilidad en la detección de secuencias de ADN proviral con una especificidad del 30-50% en las primeras semanas de vida y entre el 95-100% en los niños mayores de 1 mes [6]. De allí la necesidad de implementar para su diagnóstico en recién nacidos técnicas de detección directa del virus, tales como la determinación del material genómico del VIH, bien sea ADN proviral (integrado en

las células infectadas) a partir de células mononucleares de sangre periférica o ARN viral presente en el plasma mediante la PCR.

Los ensayos basados en ácidos nucleicos para la detección de ADN proviral del VIH han recibido mucha atención y son de mucha utilidad para el diagnóstico temprano del VIH en neonatos con riesgo de transmisión vertical. El énfasis de emplear ADN proviral en lugar de ARN viral viene reflejado por la dinámica de infección del VIH en el que la fase latente de la infección permanece de manera estática con respecto a la fase de replicación viral y tan sólo el genoma del VIH integrado puede ser detectado. Es decir, aprovechando la fase final de transcripción inversa en el que el ADN de doble cadena sintetizado es transportado al núcleo y se integra en el genoma celular, es posible emplear este ADN extraído a partir de células mononucleares de sangre periférica para realizar la técnica de PCR. Actualmente, no existen datos claros sobre el beneficio de la determinación de ADN proviral o ARN viral en la detección precoz de la infección. Esto último debido principalmente, a que los estudios comparativos sobre las técnicas disponibles comercialmente para la detección de ADN o ARN del VIH, no han sido bien establecidos. Sin embargo, desde hace algunos años la detección cualitativa de ARN resulta una muy buena alternativa para el diagnóstico precoz del VIH, por la alta tasa de replicación viral *in vivo* [7]. Es importante mencionar que la medición de los niveles de ARN viral en plasma son muy útiles para el monitoreo de la terapia antirretroviral, al igual que el conteo de linfocitos T CD4+.

Los objetivos del presente estudio fueron la detección de la ADN proviral del VIH-1, mediante la técnica de PCR en niños con sospecha de transmisión vertical por el VIH-1, referidos al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INH"RR"), desde septiembre 2005 hasta julio 2006 y la determinación de los posibles factores de transmisión vertical por VIH-1 en la población estudiada.

Materiales y Métodos

Muestras biológicas

Se analizaron 214 muestras de sangre total de niños entre 0 y 18 meses de edad, procedentes de diferentes estados del país, referidos al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" en el período comprendido desde septiembre 2005 hasta agosto 2006. La información referente a la historia clínica de cada paciente, tales como: edad, procedencia, tipo de parto de la madre, tratamiento antirretroviral de la madre y su hijo, fueron obtenidos del Sistema de Informática del INHRR. Todas las muestras se colectaron de manera estéril empleando EDTA al 10% como anticoagulante y mantenidas a temperatura ambiente. Las células mononucleares de sangre periférica que se utilizaron para extraer el ADN para PCR se separaron mediante centrifugación en un gradiente de HISTOPAQUE del resto de los componentes celulares. Así mismo, se almacenó a -20°C, el plasma obtenido mediante este mismo procedimiento para posteriormente ser empleado para la determi-

nación de carga viral en aquellos neonatos positivos para ambas regiones genéticas del VIH-1 por PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa

Para la extracción de ADN proviral se emplearon columnas de sílica gel siguiendo las especificaciones del estuche comercial (DNA Blood QIAGEN). El ADN fue almacenado a -20°C , hasta su posterior procesamiento. Para la amplificación del material genómico de cada muestra se efectuaron dos ensayos de PCR a dos rondas (PCR anidada), utilizando iniciadores altamente conservados de las regiones genéticas de *env* y *gag* del VIH-1 [8]. Cada ensayo de PCR anidada fue llevado a cabo en un volumen de 50 μL para cada ronda en presencia de 50 mM de MgCl_2 , 2.5 mM de cada uno de los dNTPs, 20 pM y 10 pM de cada uno de los iniciadores de la región génica *env* y *gag*, respectivamente y 5 U/ μL de taq polimerasa. En cuanto al volumen de muestra o controles, se utilizaron para la primera ronda de amplificación 5 μL de extracto de ADN y para la segunda ronda 1 μL de producto amplificado obtenido de la primera ronda.

Para la amplificación de la región genética *env*, se emplearon en la primera ronda los iniciadores (externos): E80: 5'CCAATCCCATACATTATTGTTG3' y E105: 3'GCTTTTCCTACTTCCTGCCAC 5'. Posteriormente, se utilizaron en la segunda ronda los iniciadores (internos): E110: 5'CTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAA3' y E125: 3'CAATTT-CTGGGTCCCCTCCTGAGGG5' para definir una secuencia de aproximadamente 330 pares de bases de una región altamente conservada del gen *env* [8]. En ambas rondas, la amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización de 2 minutos a 95°C seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C de desnaturalización, 30 segundos a 55°C de alineamiento y 60 segundos a 72°C de extensión. La amplificación se completó con una extensión final de 72°C , durante 7 minutos.

De la misma manera, para la amplificación de la región *gag*, se emplearon los iniciadores HIG 777: 5'TCACCTAGAACTTTGAATGCATGGG3' y HIP 202: 3'CTAATACTGTATCATCTGCTCCTGT5' en la primera ronda de amplificación y posteriormente los iniciadores HIG 822: 5'GCTTTCAGCCAGAAGTAATACC 3' y HIG 1317: 3'CCAAATTCTCCCTAAAAAATTAGCC-T5', en la segunda ronda para definir una secuencia amplificada de aproximadamente 800 pares de bases [8]. En la primera ronda las condiciones fueron: un ciclo de desnaturalización de 2 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C de desnaturalización, 30 segundos a 50°C de alineamiento y 1 minuto, 30 segundos a 68°C de extensión. La amplificación se completó con una extensión final de 68°C , durante 7 minutos. La amplificación de la segunda ronda se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización de 2 minutos a 94°C seguido de 34 ciclos de 30 segundos a 94°C de desnaturalización, 30 segundos a 50°C de alineamiento y 60 segundos a 72°C de extensión. La amplificación se completó con una extensión final de 72°C , durante 7 minutos.

Para cada ensayo, se incluyeron: un extracto de ADN proviral proveniente de un paciente positivo para el VIH (según pruebas serológicas y análisis confirmatorio por Western-Blot) como control positivo, un extracto proveniente de un paciente con serología negativa para el VIH y agua grado biología molecular como controles negativo y de reacción, respectivamente.

La visualización del producto amplificado, se obtuvo luego de realizar una electroforesis en gel de agarosa a 2% por tinción con bromuro de etidio. Cada uno de los pacientes que resultó positivo para alguna de las dos pruebas de PCR (amplificación de las regiones génicas *env* y *gag*, respectivamente) se les solicitó inmediatamente una segunda muestra para la confirmación del resultado obtenido y para la determinación de carga viral en plasma por el método de ADN ramificado (DNA branched,) de Laboratorios Bayer Health Care.

Carga viral del VIH-1 por método ADN ramificado (DNA branched)

Los plasmas de los niños que resultaron positivos para ambas regiones génicas del VIH, fueron evaluados para determinación de carga viral del VIH por el ensayo VERSANT HIV-1 branched DNA versión 3.0 (Laboratorios Bayer Health Care, Alemania), de acuerdo a las especificaciones de la técnica.

Resultados

Se analizaron 214 muestras de sangre completa, provenientes de hijos de madres seropositivas al VIH-1, con edades comprendidas entre 0 y 18 meses de edad. De estas muestras, 17/214 (8%) resultaron positivas para la amplificación de material genómico del VIH-1, evidenciándose actividad de replicación viral en ambas regiones genéticas virales estudiadas (*env* y *gag*) y en 197/214 (92%) de las muestras evaluadas resultaron negativos para el momento de la realización de este estudio. Figuras 1 y 2.

Del total de niños que resultaron positivos, 15 (88,2%) eran lactantes menores (1 a 11 meses de edad) y 2/17 (11,8%) lactantes mayores (12 a 24 meses de edad). El 70,6% (12/17) de los niños positivos provenían del interior del país (Zulia, Anzoátegui, Bolívar, Miranda y Barinas) mientras que 29,4% (5/17) provenían de áreas periurbanas sobre pobladas del Distrito Capital.

Al determinar los niveles de carga viral del VIH por la técnica de ADN ramificado (DNA branched), en los plasmas provenientes de los niños que resultaron positivos, 14/17 (82,4%) manejaban cargas virales altas >100.000 copias/ml ($5.0 \log_{10}$) y 3 (17,6%) presentaban cargas virales intermedias de 10.000 a 100.000 copias/ml ($4.0 \log_{10} - 5.0 \log_{10}$).

Por otra parte, el 41,2% (7/17) de las madres de los niños positivos para el VIH por PCR manifestaron parto normal, 35,3% (6/17) presentaron parto por cesárea y 23,5% (4/17) de las pacientes no informaron sobre el parto. El 52,9% de estos niños no recibieron lactancia materna, 35,3% si recibieron lactancia y del 11,8% restan-

te no se disponía de esta información en la historia clínica. Ninguna de las madres de estos niños positivos para VIH por PCR se encontraba bajo tratamiento antirretroviral durante el embarazo. En cuanto a la conducta terapéutica implementada al momento del nacimiento del neonato, un

41,2% recibió zidovudina (AZT) durante las primeras seis semanas de vida, 35,3% no recibió tratamiento antirretroviral y el 23,5% restante no presentó información sobre este dato.

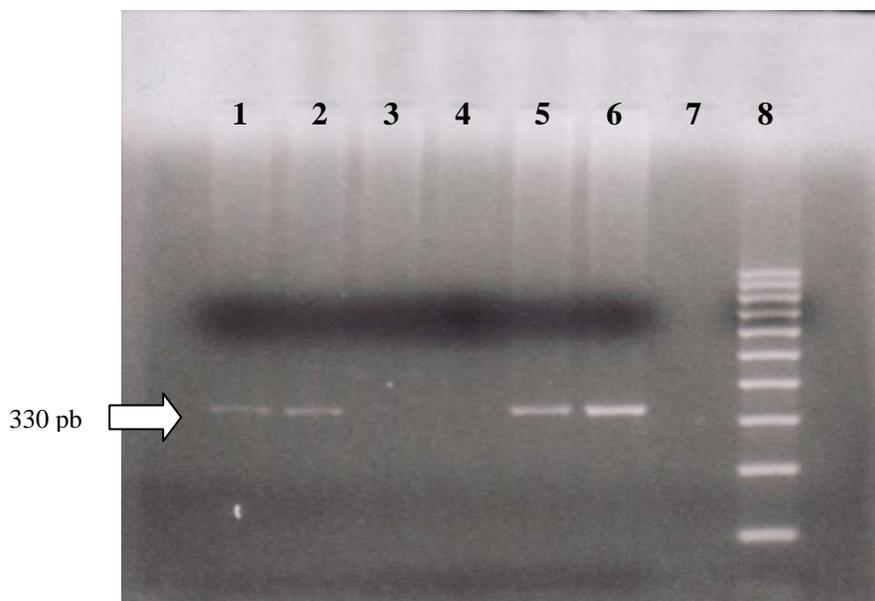


Figura 1: Productos de amplificación región "env" VIH-1
 Carriles 1, 2 y 5: pacientes positivos para la región *env*.
 Carriles 3 y 4: controles negativos
 Carril 6: control positivo para la región de *env* a aproximadamente 330 pb
 Carril 7: Vacío
 Carril 8: Marcador de peso molecular de 100 pb.

Discusión

En sus inicios la infección por VIH en la mujer era de un 7%, pero con los años ha ocurrido una "feminización" de la epidemia llegando hoy a cifras de un 23%, con mayor aumento en la mujer fértil, siendo el principal mecanismo de transmisión el heterosexual (70%). Por otra parte, la tasa de transmisión vertical, sin intervención terapéutica, varía en los distintos países: en Estados Unidos y Europa oscila entre 12 y 30%, y en África y Haití es mayor, ubicándose entre 25 y 52%. En el mundo, 2,4 millones de mujeres infectadas dan a luz anualmente a 600.000 niños contagiados con VIH, o sea, 1.600 niños por día [9]. Así la transmisión madre a hijo del VIH ocurre, sin algún tipo de intervención, en una tasa de 14% a 42% en varios escenarios. Basado en la detección virológica del VIH durante los dos primeros días de vida del infante, está generalmente aceptado que cerca de un tercio de las transmisiones en mujeres que no amamantan a sus hijos ocurre durante la gestación y el resto durante el parto [9].

En un trabajo realizado en Honduras, se analizaron 109 muestras sanguíneas de niños nacidos de madres VIH seropositivas, de los cuales el 23,8% resultaron positivos

para la presencia del ADN proviral por PCR, sugiriendo que la implementación de esta técnica en ese país permitió la utilización de un desarrollo tecnológico para el diagnóstico de la infección por el VIH-1 en los infantes que no sería posible realizar hasta la edad de 15 a 18 meses a través de pruebas serológicas [11]. Otros autores, utilizando una PCR múltiple anidada que comprendía las regiones *env* y *gag* viral, encontraron que se aumentaba la probabilidad de detectar la infección perinatal por VIH al amplificar ADN proviral de niños nacidos de madres seropositivas con una elevada sensibilidad (100%) y especificidad (99,2%), evidenciando la importancia del uso de dos regiones génicas del VIH en la optimización de los métodos de diagnóstico molecular temprano de la infección [12]. En el presente estudio se detectó la presencia de replicación viral al amplificarse ADN proviral del VIH por PCR en 8% de los niños pertenecientes a la población evaluada, evidenciándose la adquisición de la infección por transmisión vertical (contagio de madre a hijo) en estos pacientes. Todas las muestras positivas para el VIH evaluadas amplificaron repetidamente por dos ensayos de PCR previamente adaptados y optimizados en nuestro laboratorio, utilizando cebadores específicos de las regiones génicas virales *env* y *gag*, respectivamente.

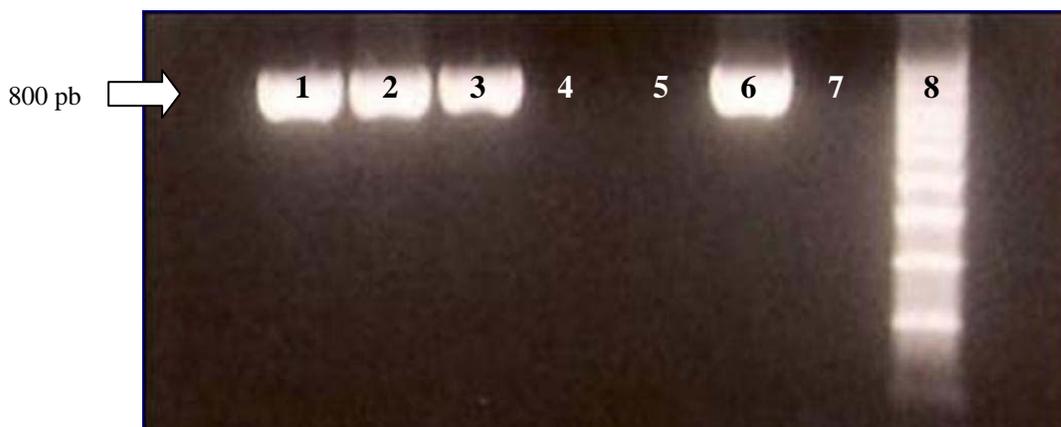


Figura 2: Productos de amplificación región *gag* VIH-1

Carriles 1, 2 y 3: pacientes positivos para la región *gag*.

Carriles 4 y 5: controles negativos

Carril 6: control positivo para la región de *gag* a aproximadamente 800 pb

Carril 7: Vacío.

Carril 8: Marcador de peso molecular de 100 pb.

Es importante destacar que el indicador de mayor certeza, asociado a la transmisión vertical del VIH es la carga viral (CV) de la madre. Este factor es crítico para determinar infección intrauterina e intraparto y también para evaluar progresión de la enfermedad en neonatos. En un estudio realizado en Europa, se demostró que la disminución de la carga viral de la madre contribuye en parte con la disminución del contagio al niño, ya que con menos de 500 copias/mL no había transmisión al feto, pero con más de 1000 copias/mL la transmisión aumentaba del 7 al 20% [2]. En el presente estudio, un alto porcentaje de niños evaluados con positividad para el VIH por PCR presentó elevados niveles de carga viral y no fue posible obtener la información referente a los valores de carga viral de sus madres. Actualmente, no se ha determinado un nivel de carga viral por debajo del cual se puede asegurar que no existe riesgo de transmisión, ya que la carga viral no es el único factor implicado en la infección. Se han descrito otros factores que pudieran contribuir, tales como el estado de inmunodeficiencia de la madre (fases avanzadas de la enfermedad, CD4 bajos), el tabaquismo, consumo activo de drogas, infecciones amnióticas y procedimientos obstétricos invasivos (amniocentesis, cordóncentesis, etc) y la rotura prematura de las membranas [1]. En Chile, se realizó un estudio sobre la infección por el VIH en la mujer embarazada y la importancia del conocimiento de la infección en el embarazo y de los factores de riesgo en la transmisión vertical del VIH. En el mencionado trabajo, se conocía la existencia de infección por VIH durante el embarazo en cuarenta y tres mujeres (81,1%) y en 10 (18,9%) se desconocía. Once niños (20,8%) hijos de estas mujeres se infectaron. Cuatro (36,4%) correspondieron a las madres con infección por VIH conocida y siete (63,6%) a las madres con infección desconocida, sugiriendo la importancia del control prenatal y el conocimiento de la infección por el VIH durante el embarazo para reducir los factores de riesgo de índole obstétrico que participan en la transmisión vertical [14].

En el presente estudio, la mayoría de las madres cuyos hijos resultaron positivos para el VIH por PCR vivían en el interior del país ó en áreas marginales periurbanas de escasos recursos económicos. Además, ninguna de estas mujeres se encontraba bajo tratamiento antirretroviral durante su embarazo, bien sea por desconocimiento de la infección durante su gestación o por la falta de accesibilidad a centros hospitalarios para su control y evaluación. Sin embargo, casi la mitad de la población infantil con resultados positivos para el VIH recibió terapia antirretroviral tal y como se ha establecido por organismos internacionales [3].

En nuestro estudio, el 52,9% de los niños VIH-positivos no recibieron lactancia materna. Se ha sugerido que cuanto más prolongado sea el periodo en que una madre infectada con el VIH amamanta a su recién nacido, más elevado será el riesgo de que el lactante contraiga la enfermedad.

Un 41,2% de las madres manifestaron dar a luz por parto normal. La decisión de la vía del parto en la gestante VIH positiva es difícil y se ve influenciada por múltiples factores (carga viral plasmática, nivel de CD4, condiciones locales, entre otros) [1]. Por otra parte diversos estudios han revelado que la cesárea electiva antes de comenzar el trabajo de parto puede disminuir el riesgo de transmisión del VIH de la madre al recién nacido para lo cual se requeriría de un control prenatal adecuado. Así se tiene que, en ausencia de cualquier actuación preventiva, la tasa de transmisión madre-hijo oscila entre el 14%-25% y en las mujeres que lactan a sus hijos aumenta hasta un 35%-45% [1].

En general, nuestros hallazgos sugieren que las madres de los niños positivos para el VIH probablemente no acudieron a un centro asistencial para su control prenatal desde el comienzo del embarazo y/o desconocían si se encontraban infectadas por el virus. Otros factores, tales como: escasos recursos económicos, falta de control prenatal, ausencia de tratamiento antirretroviral durante el embarazo y parto normal se han descrito que igualmente pueden influir en la transmisión vertical del VIH [15]. Sin embar-

go, se ha sugerido que la mayoría de las mujeres descubren que están infectadas por el VIH o tienen SIDA durante el embarazo, inmediatamente después del parto o cuando el bebé se enferma. Para muchas mujeres, el embarazo es el primer contacto con un consultorio o trabajador de atención de salud [15].

Conclusiones

En base a los datos obtenidos en este estudio, podemos concluir que la técnica de PCR para la detección de ADN proviral sigue siendo el método virológico de elección para el diagnóstico temprano de la infección perinatal del VIH-1. El uso simultáneo de iniciadores de la región de *env* y *gag* del VIH-1, aumenta la posibilidad de detectar la infección por este agente viral en forma temprana. Es importante destacar la relevancia que tiene la carga viral de la madre en la transmisión vertical del VIH, dato que no fue posible obtener en este estudio.

Agradecimientos

A la Lic. Dulce Morón y al Dr. Héctor Rangel por su valioso aporte en la estandarización de la PCR para el VIH-1.

Referencias

1. Suy A. Transmisión vertical del VIH y su prevención. En: Soriano V, González J. Manual del Sida, 5ª edición. Caracas: Publicaciones Permaryer. 2003. p. 123-36.
2. CDC HIV/AIDS Fact Sheet. Mother to child (perinatal) HIV transmission and Prevention, 2006. Disponible en: <http://www.cdc.gov/hiv>. Acceso 01 de mayo 2007.
3. Connor E M, Sperling R S, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan MJ et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. N Engl J Med. 1994; 331: 1173-80.
4. Suárez JA, Naranjo L, Casanova L, Villalobos H. Consenso de Expertos: Abordaje diagnóstico, tratamiento antirretroviral e inmunizaciones en el niño infectado con el VIH/SIDA. Memorias de XIV Jornadas Nacionales de Infectología y IX Jornadas Nororientales. Puerto La Cruz-Venezuela. 30 de octubre al 01 de noviembre de 2003.
5. Basualdo M, Moran K, Alcantara P, Gonzalez E, Puentes E, Soler C. Detección de anticuerpos Ig A y PCR como primeras opciones en el diagnóstico de infección perinatal por el VIH-1. Salud Publica Mex 2004; 46 (1): 49-55.
6. Mendoza C, Toro C, Soriano V. Diagnóstico y carga viral del VIH. En: Soriano V, González-Lahoz J. Manual del SIDA. Caracas: Publicaciones Permaryer. 2003. pp: 41-55.
7. Schneider Ken, 2000. The diagnosis of HIV infection in at risk infants: A critical review. Disponible en: http://www.aidsmap.com/en/news/labmed.ucsf.edu/education/residency/critical_rev/ped-HIV_Schneider.html. Acceso: 01 de mayo de 2007.
8. Heyndrickx L, Janssens W, Zekeng L, Musonda R, Anagonou S, Van der Auwera G et al. Simplified strategy for detection of recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group M Isolates by gag/env Heteroduplex Mobility Assay. J Virol 2000; 74: 363-70.
9. Soto JA. VIH/SIDA materno-infantil. ¿Es posible erradicar la infección neonatal? Rev Chil Obstet Ginecol 2002; 67(1):1-10.
10. Kourtis A, Bulterys M, Nesheim S, Lee F. Understanding the timing of HIV transmission from mother to infant. JAMA 2001; 285:709-12.
11. Ovalle A, Vizueta E, Casals A, Northland R, González R, Labbé M. Infección por virus de inmunodeficiencia humana en la embarazada. Importancia del conocimiento de la infección en el embarazo y factores de riesgo en la transmisión perinatal. Rev Med Chil 2003; 131(6): 1-11.
12. Aulicino PC, Gomez M., Kopka J., Mangano AM., Ovejero M., Sen L. HIV-1 genetic diversity in Argentina and early diagnosis of perinatal infection. Medicina (Buenos Aires). 2006; 66(4):319-26.
13. García P, Kalish L, Pitt J, Minkoff H, Quinn TC, Burchet S et al. Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. N Engl J Med 1999; 341:394-402.
14. Chávez A. Infección por VIH en pediatría. Rev Chil Pediatr 2000; 71(2): 1-8.
15. Patz D. La mujer y la infección por VIH/SIDA. OPS 2003; 30-40.