



INFORME BREVE

Implementación del ensayo de carga viral COBAS Taqman HIV-1 Test, v1.0, para el diagnóstico de la infección congénita por HIV-1

Gonzalo M. Castro*, María P. Sosa, Sandra V. Gallego, Paola Sicilia, Ángeles L. Marin, Natalia Altamirano, Silvia Kademian, María G. Barbás y Analía Cudolá

Área Biología Molecular, Laboratorio Central de la Provincia de Córdoba, Ministerio de Salud de la Provincia de Córdoba, Córdoba, Argentina

Recibido el 6 de septiembre de 2014; aceptado el 30 de octubre de 2014
Disponible en Internet el 14 de febrero de 2015

PALABRAS CLAVE

Virus de la inmunodeficiencia humana;
Infección congénita;
Carga viral

KEYWORDS

Human immunodeficiency virus;
Vertical transmission;
Viral load

Resumen La transmisión vertical es la principal vía de contagio del HIV en la edad pediátrica. El diagnóstico de la infección congénita antes de los 18 meses se realiza mediante ensayos virológicos: detección de genoma viral como ARN plasmático y ADN proviral. La sensibilidad de estos ensayos varía según la edad del niño, con valores de especificidad mayores al 95%. El objetivo de este trabajo fue evaluar el desempeño del ensayo de carga viral (CV) COBAS Taqman HIV-1 Test, v1.0 (Roche), y su concordancia con una PCR múltiple anidada *in-house* para la detección del ADN proviral. De 341 muestras procesadas, 15 resultaron positivas y 326 negativas por ambas metodologías. Para la metodología de CV, la sensibilidad general fue del 88,2% y la especificidad del 100%. Nuestros resultados indican que la metodología de CV evaluada puede utilizarse como técnica alternativa para el diagnóstico de infección congénita por HIV.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Implementation of the COBAS Taqman HIV-1 Test, v1.0 for vertical transmission diagnosis

Abstract Vertical transmission is the main route of HIV infection in childhood. Because of the persistence of maternal HIV antibodies, virologic assays that directly detect HIV are required to diagnose HIV infection in infants younger than 18 months of age. The sensitivity of HIV RNA/DNA assays increases as the child becomes older. These tests have specificity values greater than 95%. The aim of this study was to evaluate the performance of the COBAS Taqman HIV-1 Test, v1.0 assay (Roche) and its concordance with a Multiplex Nested-PCR. Of 341 samples processed,

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: gonmcastro@gmail.com (G.M. Castro).

15 were positive and 326 negative by both methods. Sensitivity and specificity overall values for the viral load assay were 88.2% and 100%, respectively. Our results indicate that the COBAS Taqman assay evaluated could be used as an alternative method to diagnose HIV congenital infection.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

La transmisión vertical (TV) del virus de la inmunodeficiencia humana (*Human immunodeficiency virus* [HIV]) es la principal vía de contagio en la población pediátrica. Sucede principalmente durante el parto, aunque puede ocurrir también durante la gestación. La lactancia materna agrega un riesgo adicional en mujeres previamente infectadas, que es aún mayor en madres que cursan la infección aguda durante el amamantamiento¹³.

En Argentina, la tasa de transmisión descendió del 13,7% en 2000 al 5,2% en 2011, aunque entre 100 y 150 niños nacen anualmente con HIV. De estos, solo el 70% es diagnosticado antes del año de vida, lo que dificulta el inicio oportuno del tratamiento¹².

La profilaxis durante el embarazo, el parto y las primeras 6 semanas de vida del niño ha permitido reducir la tasa de TV a cifras menores del 2%⁷. Según la Ley 25543, toda mujer embarazada debe ser alentada a conocer su estado frente al HIV e informada sobre los riesgos de un embarazo estando infectada. La identificación oportuna de mujeres HIV positivas es fundamental para administrar el tratamiento antirretroviral (ARV) adecuado para evitar la TV.

En la población pediátrica, la infección presenta un amplio espectro clínico. Este varía desde niños que permanecen asintomáticos durante años y posteriormente desarrollan enfermedades marcadoras de sida, hasta niños que desarrollan una forma muy agresiva de la enfermedad que los conduce a la muerte antes del año de vida¹⁵. Entre estos extremos existen formas intermedias, con cuadros clínicos que aparecen a medida que se produce el deterioro inmunológico.

La presencia de anticuerpos maternos de tipo IgG anti-HIV que atraviesan placenta y persisten en los niños hasta los 15-18 meses de edad, estén infectados o no, limita el uso de las pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección en niños menores de 18 meses⁹. El diagnóstico de la infección congénita por HIV se realiza mediante métodos moleculares de detección de ácidos nucleicos: ADN proviral y ARN plasmático.

En Argentina, la mayoría de los ensayos de detección del ADN proviral son ensayos *in-house*, desarrollados y validados en los propios laboratorios. La sensibilidad de un solo ensayo de ADN proviral es menor del 40% durante la primera semana de vida, alcanza el 93% durante la segunda semana y es de un 95-100% en niños infectados mayores de un mes, con especificidad mayor al 99%^{3,8}.

Los métodos comerciales que permiten cuantificar la CV del HIV presentan diferencias en sensibilidad,

linealidad y sitios blanco en el genoma viral, así como en los métodos de amplificación y detección. Tienen una especificidad del 100% para resultados ≥ 5.000 copias/ml³ y su sensibilidad es del 25-58% durante las primeras semanas de vida, del 89% al mes y del 90-100% a los 2-3 meses, y son tan sensibles como los ensayos de detección del ADN proviral para el diagnóstico de infección por HIV en lactantes^{3,10}. Además, serían más sensibles para detectar subtipos no B del HIV⁶, aunque podrían verse afectados por la terapia ARV prenatal de la madre o por la profilaxis del niño.

Algunos autores sostienen que frente a niveles de ARN < 5.000 copias/ml los ensayos deben repetirse; también se ha indicado que deben establecerse valores de corte a partir de los cuales un resultado se interprete como positivo¹². Otros autores sugieren que los ensayos de detección del ARN viral pueden utilizarse como prueba confirmatoria en niños con resultados positivos previos de ADN proviral, pues, además de proporcionar la confirmación virológica de la infección, estos permitirían conocer la CV basal del paciente¹⁰.

Los niños expuestos al HIV durante el período perinatal deberán estudiarse mediante pruebas virológicas a los 14-21 días de vida y entre el primer mes y el segundo, procurando que la muestra de sangre se obtenga 2 semanas después de haber sido cumplimentada la profilaxis; también se evaluarán a los 4-6 meses de edad¹⁴. Actualmente, con el objetivo de no perder oportunidades, el Ministerio de Salud de la Nación recomienda obtener una muestra de sangre del niño dentro de las 24-72 h de vida, durante el período de hospitalización madre-hijo¹.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el desempeño del ensayo de ARN cuantitativo COBAS TaqMan HIV-1 Test, versión 1.0 (Roche), y establecer la concordancia, sensibilidad y especificidad de esta metodología de CV en relación con una PCR múltiple anidada *in-house*, con el fin de fijar criterios para considerarlo como metodología alternativa o complementaria en el diagnóstico precoz de la infección por HIV en niños expuestos durante la etapa perinatal.

El estudio se realizó en niños nacidos de madres HIV positivas con diagnóstico confirmado. Los niños se evaluaron en términos clínicos y virológicos siguiendo el algoritmo diagnóstico recomendado por el *National Institutes of Health* para infección pediátrica¹⁴. Se incluyeron 341 muestras de sangre entera obtenidas entre noviembre de 2011 y marzo de 2013, correspondientes a 180 niños con diagnóstico definitivo: 121 niños menores de 1 mes, 43 niños entre

1 y 3 meses y 16 niños mayores de 3 meses al momento de la toma de la primera muestra.

El estudio se realizó paralelamente en la misma muestra de sangre derivada para la detección del ADN proviral. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética correspondiente y se garantizó la confidencialidad de la información.

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa y se recolectaron en tubos que contenían EDTA. Se separó en forma estéril un volumen de plasma por centrifugación, el cual se conservó a -70°C hasta su procesamiento. El paquete celular fue homogeneizado, y a partir de este se realizó la extracción del ADN genómico utilizando el equipo comercial *High Pure PCR Template Preparation* de Roche, siguiendo las instrucciones del fabricante. El extracto se conservó a -20°C hasta su utilización.

Antes de la toma de la muestra se obtuvo el consentimiento informado de la madre y se confeccionó una ficha clínico-epidemiológica con los datos de interés: fecha de diagnóstico materno, controles durante el embarazo, tipo de parto, tratamiento ARV, condición clínica del niño al nacer y profilaxis.

Para la detección del ADN proviral se utilizaron oligonucleótidos que amplifican una región de 175 pb del gen *pol*¹¹ y una región de 342 pb del gen *env*² del genoma del HIV. Se realizó una PCR multiplex anidada *in-house* validada en nuestro laboratorio. Como control interno de amplificación, para descartar la presencia de inhibidores se incluyeron en la mezcla de reacción oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 342 pb del gen de la β -actina humana⁵.

Los productos de PCR amplificados se detectaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% mediante tinción con SYBR Safe (Invitrogen). Las muestras se consideraron positivas si se observaba al menos uno de los fragmentos específicos del HIV, y negativas si no se observaban fragmentos específicos del virus, pero sí el fragmento correspondiente a la β -actina humana.

El ARN plasmático del HIV se cuantificó mediante el ensayo comercial COBAS TaqMan HIV-1 Test, versión 1.0 (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo fue aprobado por la ANMAT para el monitoreo de la CV del HIV en marzo de 2006.

Del total de muestras procesadas para ADN proviral y ARN plasmático (341), 15 resultaron positivas y 326 negativas por ambas metodologías; la concordancia entre la metodología de CV y la de la PCR multiplex anidada fue del 100%.

En las 326 muestras con resultados de PCR negativos, pertenecientes a niños no infectados, el virus resultó ser no detectable por el ensayo de CV, con una especificidad del 100%. La CV de las muestras con ARN plasmático detectable fue del orden de 10^5 - 10^7 copias HIV-1/ml de plasma.

Durante el seguimiento se analizaron un total de 17 muestras obtenidas de los 8 pacientes con diagnóstico definitivo de la infección por HIV. De estas, 15 resultaron positivas y 2 negativas por ambas metodologías. La sensibilidad general de ambas metodologías fue estimada en el 88,2% considerando las muestras con CV detectable y PCR positiva.

En un caso, la confirmación de la infección se realizó con un único resultado de PCR positivo y CV detectable, conjuntamente con el cuadro clínico del paciente. Este niño fue asistido por primera vez a los 16 meses con una enfermedad marcadora de sida y falleció a los pocos días, por lo

que resultó imposible obtener una nueva muestra para la confirmación diagnóstica por el laboratorio.

Teniendo en cuenta la edad al momento de la toma de la primera muestra, la sensibilidad de la CV y de la PCR en el grupo de niños menores de un mes fue del 50% (2/4) y la especificidad de las 2 técnicas del 100%, ya que no se detectó ningún falso positivo. En el grupo de niños mayores de 4 meses, la sensibilidad y la especificidad de ambas metodologías fueron del 100% (4/4). El valor predictivo positivo fue del 100% en todos los grupos etarios. El valor predictivo negativo en los niños menores de un mes fue del 98,3% para ambas metodologías, y en el grupo de niños mayores de un mes fue del 100% para las 2 técnicas.

De los 8 niños HIV-positivos, solo en 2 de ellos se realizó el diagnóstico dentro del primer mes de vida. Si bien se pudo detectar la infección correctamente en un niño a los 4 días de vida y en otro a los 23 días, en otros 2 niños de alto riesgo cuyas primeras muestras fueron tomadas a los 10 días y al mes del nacimiento la PCR resultó negativa y la CV no detectable. En los 4 niños restantes el diagnóstico fue realizado después del cuarto mes de vida, debido a la demora en la toma de la primera muestra.

En los 2 casos con CV no detectable y PCR negativa en las primeras muestras, cuando regresaron para el seguimiento la CV resultó detectable y la PCR positiva, al segundo y al quinto mes, respectivamente. Esto podría deberse a distintos factores: momento de la infección (en el parto o en el posparto, a través de la leche materna), momento del diagnóstico materno, tratamiento ARV y CV. Específicamente, en uno de los casos el diagnóstico materno tuvo lugar 20 días antes del parto, y en el otro el diagnóstico fue posterior al parto. En este último, el niño además recibió lactancia durante las primeras 72 h de vida. Por otro lado, ambos niños estaban recibiendo tratamiento ARV al momento de la toma de la primera muestra.

En ambos casos, solo pudieron ser detectadas por PCR secuencias específicas correspondientes al gen *pol* del genoma viral. Esto refuerza el concepto de que la sensibilidad de los métodos virológicos de detección de ácidos nucleicos es menor del 50% durante las primeras semanas de vida, de allí la necesidad de realizar la detección de más de una secuencia del genoma viral y el seguimiento del paciente en tiempo y forma.

Los resultados del presente estudio demuestran que para la metodología COBAS TaqMan HIV-1 Test, versión 1.0 (Roche), no es necesario establecer un valor de corte a partir del cual una muestra detectable puede ser considerada como verdadera positiva para el diagnóstico de infección congénita por HIV.

Con respecto a las características de la población estudiada con resultados negativos, en el 3,5% de los casos (6/172) las madres no habían tenido controles durante el embarazo, un 20,4% (35/172) había tenido entre 1 y 3 controles, y un 76,1% (131/172) había realizado más de 4 controles. Con relación al tipo de parto, el 72,7% (125/172) de los niños nacieron por cesárea, mientras que el 27,3% (47/172) lo hicieron por parto vaginal. El 99,4% (171/172) de los niños fueron asintomáticos al momento del parto y solo uno presentó sintomatología al momento de nacer.

Con respecto a la lactancia, el 95,3% (164/172) de los niños no fueron amamantados, mientras que el 4,7% (8/172)

si lo fueron. En 3 de estos casos el diagnóstico materno había sido realizado luego del parto, y en los 5 restantes, antes de aquel.

En el 83,7% de los casos (144/172) se realizó profilaxis durante el embarazo, en el 87,2% (150/172) se administró tratamiento ARV en el momento del parto y el 96,5% de los niños (166/172) recibieron profilaxis posparto. En tal sentido, cuando no se administró tratamiento ARV durante el embarazo o en el momento del parto, o bien al niño, en el 8,7% de los casos (15/172) el diagnóstico materno había sido antes del parto; en el 73,3% de estos casos (11/15) existió al menos un control durante el embarazo, en tanto que el 26,7% (4/15) no habían sido controlados.

En cuanto al momento del diagnóstico materno, en 4 casos este fue posterior al parto; en el 75% de ellos (3/4) hubo 6 o más controles durante el embarazo.

Finalmente, los 9 casos en los que el diagnóstico materno se realizó en el momento del parto correspondieron todos a madres que habían tenido al menos un control durante el embarazo.

Con relación a la población de pacientes con infección confirmada por HIV debida a TV, en 2 casos el diagnóstico materno fue posterior al parto, en otros 2 el diagnóstico fue aproximadamente un mes antes de aquel y en otro caso el mismo día del nacimiento. En los 3 casos restantes no se disponía de la ficha clínico-epidemiológica. A excepción de la madre cuyo diagnóstico se realizó el día del parto y cuyo embarazo no fue controlado, en los demás casos todas las madres habían tenido al menos un contacto con el sistema de salud.

En los 2 casos en los que el diagnóstico fue realizado dentro del mes previo al parto, se administró tratamiento ARV durante el último mes de embarazo, en el momento del parto y al niño. En los 3 casos en los que el diagnóstico tuvo lugar el día del parto o después, solo se administró tratamiento ARV al niño.

Desde el inicio de su uso clínico, la medición de la CV plasmática ha sido fundamental en el manejo terapéutico de diversas infecciones virales, principalmente del HIV y de los virus de las hepatitis B y C. Las pruebas de CV para HIV son fundamentales en el seguimiento de los pacientes infectados desde su evaluación inicial, dado que la cuantificación de la CV se correlaciona con la progresión de la enfermedad y con la respuesta al tratamiento ARV. En casos especiales, las técnicas de CV contribuyen al diagnóstico inicial de infección aguda antes de la seroconversión.

Hoy en día se dispone comercialmente de una gran variedad de pruebas para este propósito, las cuales ofrecen numerosas ventajas sobre los métodos moleculares tradicionales. Sin embargo, ninguno de estos métodos ha sido validado por sus fabricantes como prueba diagnóstica.

El diagnóstico de infección congénita por HIV se realiza en la actualidad por técnicas *in-house* que detectan el genoma viral integrado como provirus. La sensibilidad en los primeros días de vida es baja, pero el riesgo de falsos negativos se minimiza utilizando oligonucleótidos que permiten amplificar diferentes regiones del genoma viral, lo cual aumenta la sensibilidad de la técnica en las muestras tempranas. La detección de solo una de las regiones virales específicas puede deberse a un número muy bajo de copias del provirus o a una variación genética en la región del HIV que se está detectando, dando como resultado una PCR negativa por

disminución de la sensibilidad del par de oligonucleótidos utilizados para dicha región del genoma.

Debido a la importancia de identificar precozmente la infección por HIV en la población pediátrica, se necesita un ensayo o una combinación de ensayos óptimos para la confirmación de la infección en neonatos. Sin el acceso al tratamiento ARV, la enfermedad progresa rápidamente y hasta un 45% de los niños infectados desarrollan sida y mueren dentro de los 2 primeros años de vida.

Nuestros resultados demuestran una excelente concordancia entre las 2 técnicas evaluadas (detección del ADN proviral y determinación de la CV), con la misma sensibilidad, aun en edades inferiores a un mes. La sensibilidad general de ambas metodologías fue estimada en 88,2%. A pesar de no haberse encontrado en este trabajo discordancias entre ambas metodologías, está descrito que los métodos de PCR en tiempo real para cuantificación de CV superan a las tecnologías de punto final, con la ventaja de presentar mayor sensibilidad, rango dinámico más amplio, altos niveles de automatización, con la consiguiente reducción del riesgo de contaminación y mayor capacidad para cuantificar diferentes tipos y subtipos del HIV-1.

Las técnicas de CV deben validarse frente al diagnóstico pediátrico definitivo antes de su aplicación para tal fin, y no se puede generalizar para todos los ensayos comerciales la necesidad de establecer un valor de corte. Al igual que en el trabajo de Cañizal *et al.*⁴, en este trabajo la especificidad fue del 100%, por lo cual no se requirió un valor de corte para la interpretación de un resultado como positivo. No obstante, deben seguirse los criterios establecidos para la confirmación del diagnóstico de infección congénita por HIV, teniendo en cuenta los algoritmos diagnósticos vigentes.

La terapia ARV y la profilaxis que se utiliza para reducir la transmisión madre-hijo podría afectar la sensibilidad de las técnicas de CV. Por su impacto directo sobre la CV, debe considerarse el uso de terapia ARV a la hora de interpretar los resultados. En función de la sensibilidad y especificidad encontradas, la inclusión del ensayo comercial COBAS TaqMan HIV-1 Test, versión 1.0 (Roche), permitiría el diagnóstico precoz de la infección por HIV en niños expuestos en la etapa perinatal, por lo que resulta una técnica alternativa al ensayo de ADN proviral, eficaz para el diagnóstico.

Finalmente, alcanzar la meta mundial de reducir el número de niños infectados en 2015 requerirá diferentes estrategias de prevención. Es necesario redoblar los esfuerzos para la prevención primaria de la transmisión del HIV en niñas y en mujeres en edad fértil, y proporcionar servicios de salud reproductiva y sexual a mujeres que viven con el HIV y que no quieren quedar embarazadas. Por otro lado, en mujeres en edad fértil es muy importante descartar la infección por HIV, ya que si está infectada puede recibir el tratamiento ARV adecuado para prevenir la transmisión del virus a su hijo y mejorar su calidad de vida. Por este motivo, debe ofrecerse en tiempo y forma el ensayo de detección de anticuerpos anti-HIV a toda mujer embarazada que toma contacto con el sistema de salud.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Adaszko A, Arazi Caillaud S, Asís L, Barboni G, Bouzas MB, Belforte M, Bidone N, Bogdanowicz E, Bologna R, Bordato A, Bruno M, Cañizal A, Corazza R, Deluchi GM, Gregorio L, Libonati C, López Papucci S, Maglio I, Magneres C, Mecikovsky D, Miranda C, Moreno R, Moyano M, Petroni A, Quarleri J, Rubinstein E, Salomón H, Sardi F, Siciliani D, Sosa P, Toca MC, Vulcano S. Diciembre 2012. Atención Integral de Niños, Niñas y Adolescentes con VIH. © Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) [On-line; consultado el 6 de abril de 2013]. Disponible en: [http://www.unicef.org/argentina/spanish/NNA.VIH.Web\(2\).pdf](http://www.unicef.org/argentina/spanish/NNA.VIH.Web(2).pdf)
- Albert J, Fenyö E. 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;28:1560-4.
- Burgard M, Blanche S, Jasseron C, Descamps P, Allemon M, Ciraru-Vigueron N, Floch C, Heller-Roussin B, Lachassinne E, Mazy F, Warszawski J, Rouzioux C. Performance of HIV-1 DNA or HIV-1 RNA tests for early diagnosis of perinatal HIV-1 infection during anti-retroviral prophylaxis. *J Pediatr.* 2012;160:60-6.
- Cañizal A, González F, Fernández Giuliano S, Zapiola I, Bouzas M. Utilización del ensayo Cobas Amplicor Monitor HIV-1 en el diagnóstico temprano de la infección por HIV en pediatría. *Actual SIDA.* 2010;67:18-24.
- Ceballos A, Sabatté J, Nahmod K, Martínez D, Salamone G, Vermeulen M, Maggini J, Salomón H, Geffner J. Sphingosylphosphorylcholine activates dendritic cells, stimulating the production of interleukin-12. *Immunology.* 2007;121:328-36.
- Church D, Gregson D, Lloyd T, Klein M, Beckthold B, Laupland K, Gill M. Comparison of the RealTime HIV-1, COBAS TaqMan 48 v1.0 Easy Q v1.2, and Versant v3.0 assays for determination of HIV-1 viral loads in a cohort of Canadian patients with diverse HIV subtype infections. *J Clin Microbiol.* 2011;49:118-24.
- Cooper E, Charurat M, Mofenson L, Hanson I, Pitt J, Diaz C, Hayani K, Handelsman E, Smeriglio V, Hoff R, Blattner W. Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV-1 infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 2002;29:484-94.
- Dunn D, Brandt C, Krivine A, Cassol S, Roques P, Borkowsky W, de Rossi A, Denamur E, Ehrnst A, Loveday C. The sensitivity of HIV-I DNA polymerase chain reaction in the neonatal period and the relative contributions of intra-uterine and intra-partum transmission. *AIDS.* 1995;9:F7-11.
- Garbarg-Chenon A, Segondy M, Conge A, Huguet M, Nicolas J, Grimpel E, Moniot-Ville N, Bricout F, Serre A, Courpotin C, Vendrell JP. Virus isolation, polymerase chain reaction and in vitro antibody production for the diagnosis of pediatric human immunodeficiency virus infection. *J Virol Methods.* 1993;42:117-25.
- Lambert J, Harris D, Stiehm E, Moyer J Jr, Fowler M, Meyer W 3rd, Bethel J, Mofenson L. Performance characteristics of HIV-1 culture and HIV-1 DNA and RNA amplification assays for early diagnosis of perinatal HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003;34:512-9.
- Lum J, Pilon A, Sanchez-Dardon J, Phenix B, Kim J, Mihowich J, Jamison K, Hawley-Foss N, Lynch D, Badley A. Induction of cell death in human immunodeficiency virus-infected macrophages and resting memory CD4 T Cells by TRAIL/Apo2L. *J Virol.* 2001;75:11128-36.
- Ministerio de Salud de la Nación. Dirección de Sida e ITS. Diciembre 2013. Boletín sobre el VIH-Sida e ITS en la Argentina. [On-line; consultado el 19 de diciembre de 2013]. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000297cnt-2013-11-28.boletin-epidemiologico-30.pdf>
- Newell ML. Mechanisms and timing of mother-to-child transmission of HIV. *AIDS.* 1998;12:831-7.
- Panel on Antiretroviral Therapy and Medical Management of HIV-Infected Children. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection [On-line; consultado el 18 de setiembre de 2013]. Disponible en: <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/pediatricguidelines.pdf>
- Pediatric HIV infection and AIDS-UNAIDS Point of view — Septiembre 2002 [On-line; consultado 18 Sep 2013]. Disponible en: <http://data.unaids.org/publications/IRC-pub02/jc750-paediatric-pov.en.pdf>