

S. Resino¹
R. Correa¹
P. Segovia²
M. D. Gurbindo³
M. Muñoz-Fernández¹

¹ Servicio de Inmunología

² Servicio de Ginecología

³ Sección de Inmuno-Pediatría

Hospital General Universitario «Gregorio Marañón»

Este trabajo ha sido realizado con la financiación del Programa Nacional de Salud (SAF99-0022) y de la Comunidad de Madrid.

Correspondencia:

M.^a Ángeles Muñoz-Fernández

Hospital General Universitario «Gregorio Marañón»

Servicio de Inmunología

Doctor Esquerdo, 46

28007 Madrid

E-mail: Mmunoz@cbm.uam.es

Identificación de mujeres embarazadas infectadas por el VIH-1: significado de pruebas serológicas indeterminadas

Identification of HIV-1 infected pregnant women: interpreting results from indeterminate western-blot test

Fecha de recepción: 27/9/99

Aceptado para publicación: 17/11/99

Resino S, Correa R, Segovia P, Gurbindo MD, Muñoz-Fernández M. Identificación de mujeres embarazadas infectadas por el VIH-1: significado de pruebas serológicas indeterminadas. *Prog Obstet Ginecol* 2000;43:53-60.

RESUMEN

Objetivo: Investigar el significado de ensayos de *screening* positivos y *western-blot* indeterminados en mujeres embarazadas.

Sujetos y métodos: Realizamos un estudio de diagnóstico de infección por VIH en una gestante primípara y tres multíparas, de edades entre 26 y 32 años, con ensayos de *screening* VIH-positivos. Ninguna refirió prácticas de riesgo para la infección por VIH. Utilizamos técnicas de detección directa del VIH: antigenemia p24 y carga viral en plasma y detección del provirus por PCR, cultivo viral y cuantificación de células T CD4+ en células mononucleares de sangre periférica.

Resultados: En las cuatro gestantes, el ensayo de *western-blot* fue indeterminado (p24-p55; p24 o p55). Al realizar las técnicas de detección

directas del VIH, en ninguna de las muestras obtuvimos resultados positivos.

Conclusión: Ninguna de las gestantes con ensayos de *screening* positivos y *western-blot* indeterminados estaban infectadas por el VIH. Es necesario realizar ensayos de detección directa del VIH para un diagnóstico definitivo.

PALABRAS CLAVE

Embarazada; VIH-1; *Western-blot*; PCR; Cultivo.

ABSTRACT

Objective: To assess the meaning of indeterminate results of positive screening and western-blot assays for HIV-1 in pregnant women.

54 Patients and methods: *We studied if pregnant women, of ages between 26 and 32 years, one of them primipara and three multipara, with positive screening test and indeterminate western-blot for HIV, were infected. None of them referred practical of risk for HIV infection. We used assays for direct detection of the virus: p24 antigenemia and viral load in plasma, detection of DNA provirus by PCR, viral culture, and T CD4+ quantification in peripheral blood mononuclear cells.*

Results: *The four pregnant women presented indeterminate Western-Blot (p24-p55; p24 or p55). The p24 antigenemia, viral load, DNA PCR, and viral culture gave negative results in all of them.*

Conclusions: *Evidence shows that, none of the 4 pregnant women with positive screening tests and indeterminate western-blot were infected by the HIV. Therefore, it is necessary the use of direct tests for detection of the virus to give a definitive diagnosis in pregnant women.*

KEY WORDS

Pregnancy; HIV-1; Western-Blot; PCR; Viral culture.

INTRODUCCIÓN

La prevalencia de la infección por VIH en gestantes varía entre los países europeos, pero es menor del 5 por 100 en las mujeres analizadas. La transmisión vertical del VIH-1 es la forma más frecuente de la infección pediátrica y la mayoría de las veces ocurre en el momento del parto. Desde 1993 se ha observado una disminución de la tasa de transmisión madre-niño en Europa, situándose actualmente en un 5-6 por 100⁽¹⁻²⁾. Este cambio, coincide con el aumento en el uso de la Zidovudina (AZT) durante el embarazo y por el incremento en la práctica de la cesárea electiva⁽³⁻⁵⁾.

En las mujeres que han recibido AZT y cesárea electiva se ha observado una disminución de la transmisión vertical hasta niveles inferiores al 1 por 100⁽³⁻⁴⁾. Esta misma reducción se ha conseguido con el aumento en el uso de terapias antivirales combinadas durante la gestación⁽⁶⁻⁷⁾. La transmisión vertical del VIH puede ocurrir antes, durante o después del

nacimiento, pero en ausencia de lactancia materna la mayoría de las infecciones ocurren al final del embarazo y durante el parto⁽⁸⁻⁹⁾. Las medidas para reducir el riesgo de transmisión vertical solamente serán efectivas si las mujeres son identificadas antes o durante el embarazo.

La serología para la detección de anticuerpos del VIH debe formar parte de los cuidados prenatales junto a otras pruebas para otras infecciones que coinciden en el embarazo. Estas exploraciones se deben realizar habitualmente y de forma voluntaria, dando la oportunidad a la mujer a negarse si ella lo desea. La prueba del VIH se puede ofrecer a todas las mujeres (universal)⁽¹⁰⁾, sólo a las que presentan prácticas de riesgo (selectivo)⁽¹¹⁾ o a demanda. Se debe asegurar la confidencialidad del resultado de la prueba VIH. Se debe garantizar a todas las mujeres el acceso a cuidados prenatales multidisciplinarios. El objetivo prioritario es la prevención, detección y tratamiento de los factores de riesgo de la transmisión vertical del VIH y los agentes infecciosos asociados.

En este estudio analizamos el significado de pruebas de detección de anticuerpos anti-VIH-1 indeterminadas en gestantes que voluntariamente aceptaron realizarse la prueba del VIH.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio detallado de cuatro gestantes de edades comprendidas entre 26 y 32 años, que acudieron al Hospital General Universitario «Gregorio Marañón» de Madrid entre 1984 y 1994. Ninguna presentaba prácticas de riesgo para la infección por VIH: no adictas a drogas por vía parenteral (ADVP), no-transmisión sexual y no-recepción de transfusiones. Los procedimientos utilizados en las pacientes han sido realizados tras la obtención de su consentimiento informado.

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⁽¹²⁾.

Detección de antígeno p24

Se realizó por un ELISA comercial de detección y cuantificación de antígeno p24 para el VIH (INNO-TEST HIV Antigen mAb, INNOGENETICS; Bélgica).

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 por 100 SDS y 100 µg/ml de Proteinasa K [Sigma]) durante tres horas a 50° C, con extracción posterior con un volumen de fenol (pH 8.0) y un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), precipitación con un volumen de etanol absoluto y 0,3 M de acetato amónico. El DNA se lavó después con etanol al 70 por 100 y se resuspendió en H₂O libre de nucleasas.

Las CMSP de las cuatro mujeres embarazadas 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⁽¹³⁾. Las muestras primero se amplificaron durante 24 ciclos con pares de oligonucleótidos externos y posteriormente 1/10 (5 µl) 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 las cuatro mujeres embarazadas dieron una señal positiva con los oligonucleótidos PC03-PC04 específico para los genes humanos de la β-globina^(12,14). El producto de la PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 por 100 y tinción con bromuro de etidio. Las muestras se consideran 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 valores de RNA viral en el plasma de los pacientes pediátricos se cuantificaron usando un ensayo comercial (Amplicor-HIV Monitor™Test, Roche Diagnostic), aprobado por la Federal Drug Administration (FDA) para monitorización de carga viral en mayo de 1996⁽¹⁵⁾.

Aislamiento del VIH-1 por cultivo viral

La detección del VIH-1 se realizó utilizando un ensayo de microcultivo⁽¹⁵⁾. Las CMSP se aislaron por centrifugación, realizando un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Co-cultivamos 2 x 10⁶ CMSP del paciente con 2 x 10⁶ de CMSP de un donante sano previamente estimuladas durante 48 horas con PHA (Difco Laboratories, Inc, Detroit, Mich) en placas de 24 pocillos con 2 ml de medio RPMI suplementado con 20 por 100 de suero fetal de ternera (FCS) y 20 U/ml de IL-2. Semanalmente se añadieron 2 x 10⁶ de 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 (INNOTEST HIV Antigen mAb, INNOGENETICS NV Haven, Zwijnaarde-Bélgica); también se observó por microscopía óptica el fenotipo del virus en el cultivo celular una vez por semana. Los cultivos se mantuvieron de 28 a 42 días.

Cuantificación de subpoblaciones de células T

Las subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica fueron cuantificadas por inmunofluorescencia directa, usando anticuerpos monoclonales de la serie T. La adquisición se llevó a cabo en un citómetro FACScan (Becton-Dickinson, San José CA, EEUU)⁽¹⁴⁾ usando el programa de adquisición Lysis II (Becton-Dickinson, San José CA, EEUU) dentro de las dos horas siguientes a la tinción de las células.

56 RESULTADOS

Entre 1984-1994 estudiamos cuatro gestantes (una primípara y tres multíparas) con edades entre 26 y 32 años. Ninguna de las gestantes refería historia de prácticas de riesgo para estar infectadas por VIH.

Técnicas indirectas de detección del virus de la inmunodeficiencia humana

Para realizar el diagnóstico de las cuatro gestantes seguimos el algoritmo de la figura 1. Las cuatro gestantes tuvieron dos resultados positivos consecutivos en las pruebas de *screening*, enzoinmunoensayo o ELISA.

Al realizar la prueba serológica de confirmación por inmunotransferencia o *Western blot*, las cuatro gestantes tuvieron un patrón de reactividad indeterminado (Fig. 1). La serología de dos de las gestantes fue reactiva frente a p24 y p55; otra tuvo reactividad positiva frente a p24, y la última, reactividad positiva frente a p55 (Fig. 2).

En primer lugar analizamos si ELISA positivo y WB indeterminado se debía a un «período ventana» y era debido a la infección por transmisión sexual

del VIH. Realizamos la prueba de *screening* o ELISA a los compañeros/maridos y en ninguno de los cuatro casos se detectó la presencia de anticuerpos anti-VIH. A las cuatro gestantes (aunque ya tenían un diagnóstico) se les repitió las pruebas de ELISA y WB a los tres y seis meses después del parto y los resultados fueron los mismos (Figs. 2 y 3).

Técnicas de detección directa del VIH-1

Debido a que las cuatro mujeres eran gestantes fue necesario un diagnóstico rápido. Fue necesario comprobar: si estaban infectadas, si los resultados eran falsos positivos o un período ventana. Realizamos pruebas de laboratorio de detección directa del virus (detección de antígeno p24, reacción en cadena de la polimerasa y aislamiento del virus).

Analizamos la detección/cuantificación de antígeno p24 en el suero de las cuatro gestantes en dos muestras consecutivas por la técnica de ELISA, por si se trataba de un período ventana. La técnica se realizó sin disociación o con disociación ácida de los inmunocomplejos Ag-Ac y en todos los casos los resultados fueron negativos. En ninguna de las cuatro gestantes detectamos antígeno p24.

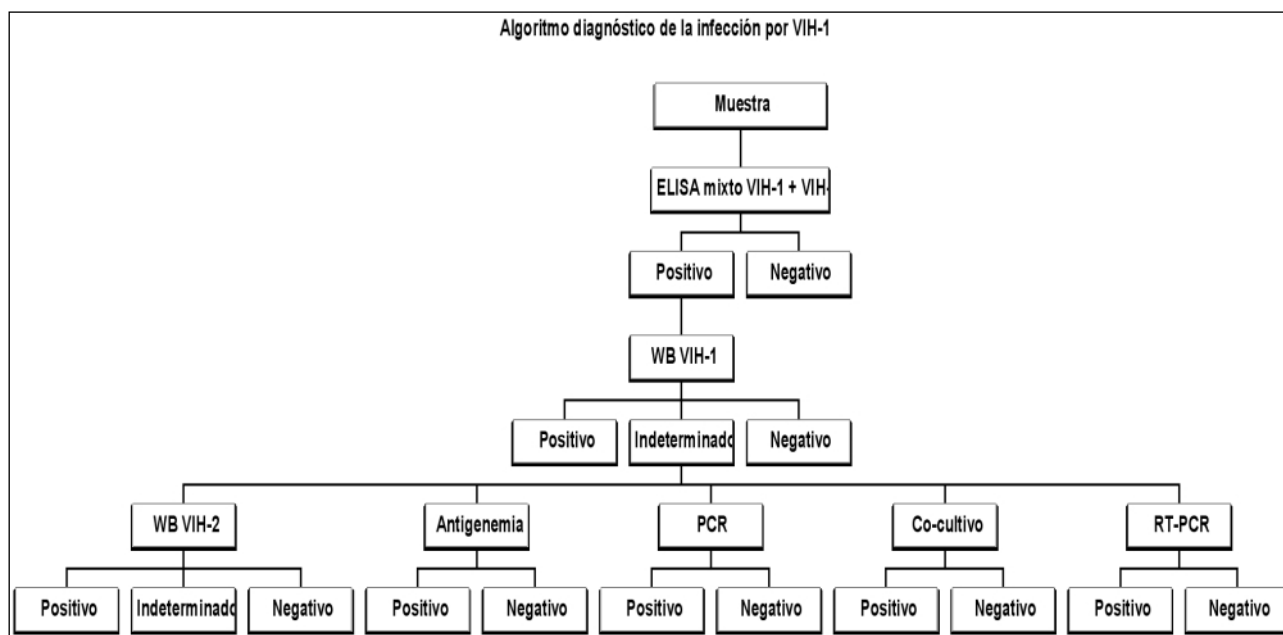


Figura 1. Algoritmo diagnóstico de la infección por VIH-1 preferible en personas sin antecedentes de riesgo.

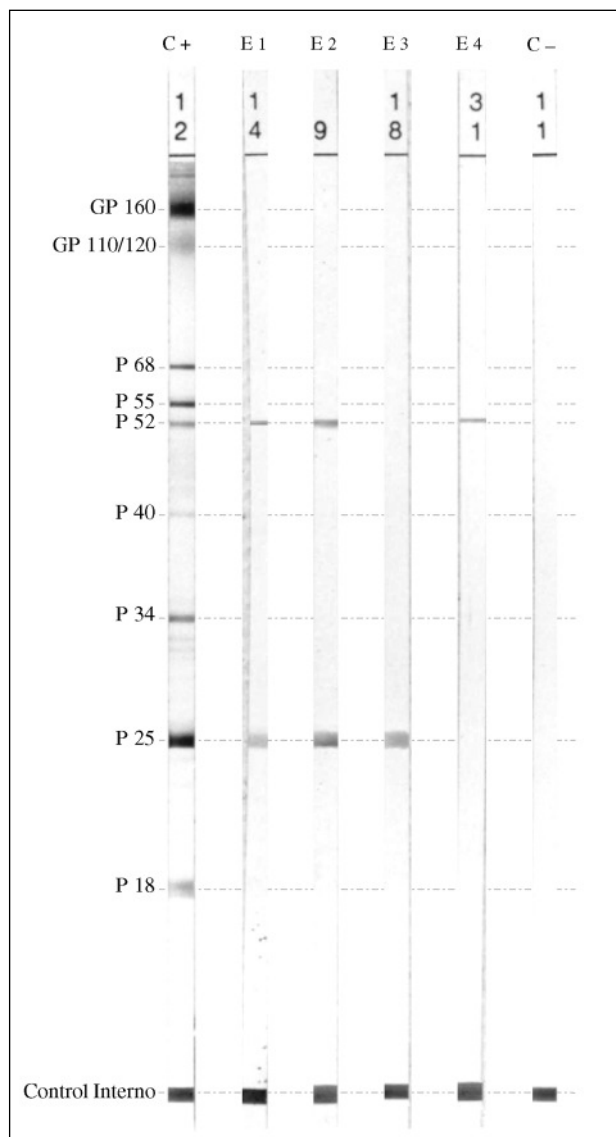


Figura 2. Resultado del Western blot de las cuatro mujeres embarazadas (E), con un control positivo (C+) y otro negativo (C-).

Realizamos una doble PCR con oligonucleótidos específicos para tres regiones del genoma viral (gag, pol y env), que confieren mayor especificidad y sensibilidad a la técnica de DNA-PCR, y las cuatro gestantes dieron resultados negativos (Fig. 3) en dos muestras consecutivas de CMSP aisladas días diferentes. En paralelo realizamos cultivos para el aislamiento del virus y obtuvimos resultados repetidamente negativos en la detección de antígeno p24 en el sobrena-

dante del cultivo a lo largo de los 28 días y tampoco observamos formación de sincitios en el cultivo cuando se observó diariamente al microscopio.

El recuento de linfocitos T CD4⁺ siempre estuvo dentro del rango normal, entre 800 y 1.000 CD4⁺/mm³. No detectamos virus linfotrópico humano (HTLV) tipo I o II por PCR o por ELISA (Abbott HTLV-1 2.0 EIA). Los ensayos para anticuerpos frente a citomegalovirus, Epstein-Barr virus, *herpes-simplex virus*, *varicella-zoster*, hepatitis B y C, y toxoplasma también fueron repetidamente negativos.

Realizamos la determinación de carga viral por RT-PCR en el plasma de dos muestras consecutivas de las cuatro gestantes y en ninguna muestra se detectó carga viral plasmática. Siempre el resultado fue menor de 25 copias/ml, que es el límite de detección de la técnica.

DISCUSIÓN

Actualmente se recomienda *screening* universal para el diagnóstico para VIH-1 a toda mujer embarazada. En el caso de diagnóstico de infección, se debe permitir el tratamiento con fármacos antirretrovirales durante el embarazo, parto y seis primeras semanas de vida del recién nacido, prevenir infecciones oportunistas que puedan afectar al curso del embarazo, evitar la lactancia materna del recién nacido y favorecer el seguimiento del neonato expuesto, garantizando el diagnóstico precoz de la infección por VIH y la profilaxis frente a las infecciones oportunistas. Sin embargo, también presenta una serie de inconvenientes, como ansiedad y depresión en la gestante, marginación social y discriminación laboral.

En la actualidad está establecido que las gestantes por el VIH deben seguir las mismas recomendaciones de tratamiento que los adultos infectados, con lo que se espera que las nuevas terapias agresivas reduzcan aún más la tasa de transmisión del VIH^(6,7). Además, también se ha incrementado la práctica de cesárea electiva⁽³⁻⁵⁾.

El diagnóstico de la infección por VIH-1 sólo puede establecerse de modo definitivo por métodos de laboratorio. Las pruebas de laboratorio utilizadas para reconocer las infecciones por retrovirus humanos pueden clasificarse en directas, cuando demuestran la presencia del virus o de sus constituyentes

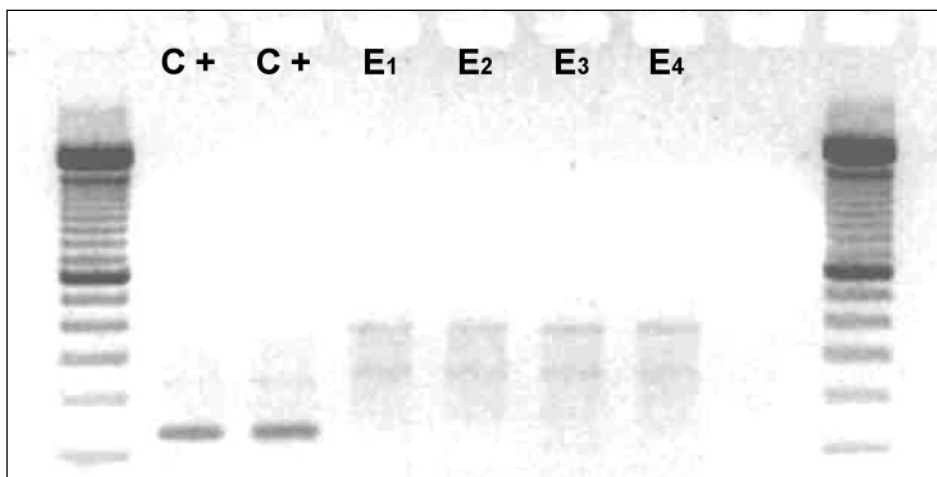


Figura 3. Resultado de la PCR de las cuatro mujeres embarazadas (E), con un control positivo (C+) y otro negativo (C-).

(cultivo viral, detección de ácidos nucleicos, PCR, LCR, bDNA, NASBA, etc., y antigenemia p24); e indirectas, cuando se analiza la respuesta inmunitaria (humoral o celular) por parte del huésped, como es la detección de anticuerpos específicos (pruebas de *screening* como ELISA o de confirmación complementaria: WB, RIPA, IFI, LIA, etc.).

La detección de anticuerpos en suero es la metodología más frecuentemente utilizada para la identificación de los sujetos infectados por VIH-1⁽¹⁶⁾. Se realiza por métodos que permiten realizar un gran número de análisis (ELISAs) o pruebas de *screening* y por la utilización de otras técnicas más complejas, que proporcionan mayor especificidad para la confirmación de la reactividad en una prueba inicial de *screening*⁽¹²⁾. La seropositividad se define por la detección de anticuerpos frente a las proteínas víricas, con reactividad repetida en las pruebas de *screening* y, además, con algunas de las pruebas de confirmación⁽¹⁶⁾.

En general las pruebas de *screening* aprobadas para los bancos de sangre tienen una sensibilidad muy alta, superior al 99 por 100⁽¹⁶⁾. El WB es la metodología más empleada para la confirmación de resultados obtenidos con pruebas de *screening*. La positividad por WB para VIH-1 requiere la presencia de al menos dos bandas correspondientes a la envoltura; la negatividad resulta de la ausencia de bandas, y el resto de patrones se consideran indeterminados⁽¹⁷⁾.

Los resultados de nuestros trabajos muestran que las cuatro gestantes presentaron un patrón de WB in-

determinado, ya que no se observó ninguna de las bandas correspondientes a la envoltura viral (Fig. 2).

Según la OMS⁽¹⁷⁾, los patrones para los que no se detectan bandas de la envoltura pueden sugerir una seroconversión, una infección por VIH-2 o una reactividad inespecífica, debiéndose repetir análisis periódicos durante al menos seis meses. Si por entonces el WB continúa siendo indeterminado, el paciente niega factores de riesgo y permanece asintomático, puede considerarse negativo. Pero en nuestro estudio este requerimiento no nos permitiría la identificación por VIH-1 durante el embarazo, ya que las cuatro mujeres estaban en la sexta semana de gestación y era imprescindible tener un diagnóstico lo más rápido posible, para poder ofrecer a las gestantes todas las posibilidades de evitar la transmisión del VIH-1 a su hijo. Además, se trataba de cuatro mujeres que no referían prácticas de riesgo.

Las bandas del núcleo p17, p24 y otras, pueden ser fruto de la reactividad inespecífica y se detectan hasta en un 15-20 por 100 de los donantes de sangre no infectados⁽¹⁸⁾, mientras que la presencia de anticuerpos frente a las proteínas de la envoltura es mucho más específica, aunque también se han descrito falsos positivos. Un resultado indeterminado en el WB del VIH-1 puede corresponder, por lo menos, a seis situaciones: *a)* infección por VIH-2, que la descartamos con nuestros resultados en las cuatro gestantes; *b)* período de seroconversión, que también fue descartado en nuestro estudio; *c)* enferme-

dad avanzada, que no era el caso analizado en nuestro trabajo; *d*) perfil de WB atípico en niños nacidos de madres seropositivas, que tampoco era el caso de nuestro trabajo; *e*) diferencias genéticas en cepas de VIH-1, que fue descartado en las cuatro gestantes, y *f*) reactividad inespecífica o cruzada con otros anticuerpos, que fue el resultado de nuestro estudio.

Un resultado indeterminado de WB supone algunas desventajas, tanto para el médico como para el paciente. Este debe ser interrogado sobre potenciales fuentes de exposición recientes al VIH-1. Además, un resultado no definitivo informado al paciente suscita a menudo ansiedad, tanto en él como en sus familiares, y es importante evitar la ansiedad y la depresión de las gestantes. Por todo ello, es necesario utilizar técnicas de detección directa del virus que permitan un diagnóstico definitivo en un tiempo breve^(12,16).

Desde 1986 se dispone de pruebas de EIA para el reconocimiento de antígeno (básicamente p24) del VIH-1 en el plasma y otros líquidos biológicos^(12,16). La proteína p24 puede reconocerse durante la primoinfección por VIH-1 en ausencia de otros marcadores serológicos, aunque este período de ventana parece ser breve⁽¹⁹⁾.

CONCLUSIONES

La sensibilidad y especificidad de las pruebas de ELISA comerciales son superiores al 98 por 100, aunque el número de falsos positivos en grupos de bajo riesgo de infección (como los donantes y las gestantes) puede no ser despreciable. Estos falsos positivos se han descrito en individuos con enfermedades autoinmunes y en pacientes con historia de múltiples gestaciones o transfusiones, relacionados con la presencia de anticuerpos frente a algún antígeno HLA-II. De forma específica, cuando se analizan poblaciones de riesgo de infección, es recomendable el algoritmo diagnóstico de la figura 1.

Aunque en la mayoría de los casos las metodologías serológicas son suficientes para establecer el diagnóstico, a veces hay que aplicar pruebas directas de diagnóstico que proporcionan una mayor certeza⁽¹²⁾. El aislamiento por cultivo constituye la mejor evidencia de la infección vírica; nosotros, utilizando técnicas de cultivo en condiciones óptimas, no conseguimos aislar el virus⁽²⁰⁾. El problema que plantea el cultivo viral en el caso de las gestantes es que no tenemos un resultado hasta pasados 28 días, y es mucho tiempo, por lo cual se debe realizar en paralelo con otras técnicas en las que se pueda tener un diagnóstico en 24-48 horas.

La PCR es una técnica cada vez más imprescindible en el diagnóstico de la infección por VIH-1, ya que en 24-48 horas se tiene un diagnóstico. Es especialmente útil en niños recién nacidos de madres infectadas por VIH-1, en casos de gestantes como el expuesto en este trabajo y en individuos con WB indeterminado (21).

Por último, datos preliminares de nuestro laboratorio⁽¹⁵⁾ indicaban que la detección plasmática de secuencias de ARN del VIH-1 por RT-PCR tiene una mayor sensibilidad que la detección de secuencias de DNA del VIH extraído de CMSP (DNA proviral presente en linfocitos T infectados) y el cultivo viral y se realiza en 24-48 horas. En concordancia con las otras técnicas, obtuvimos resultados negativos en el plasma de las cuatro gestantes.

En resumen, ninguna de las gestantes con prueba de *screening* (ELISA) positivo y WB indeterminado estaba infectada por el VIH, pudiendo dar un resultado de NO INFECCIÓN a las 72 horas de llegados los casos al laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

A Dolores García Alonso por su excelente labor técnica.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Mayaux MJ, Teglas JP, Mandelbrot L, Berrebi A, Gallais H, Matheron S, et al. Acceptability and impact of zidovudine for prevention on mother-to-child human immunodeficiency virus-1 transmission in France. *J Pediatr* 1997;131:857-62.
- 2 Alonso R, Gurbindo MD, Miralles P, Segovia P, Fernández-Cruz E, Muñoz-Fernández MA. Zidovudine treatment prevent vertical HIV-1 transmission independently of viral load. *Acta Paediatr* 1998;87:1208-9.

- 3 Mandelbrot L, Le Chenadec J, Berrebi A, Bongain A, Benifla JL, Delfraissy JF, et al. Parenteral HIV-1 transmission: Interaction between zidovudine prophylaxis and mode of delivery in the French Perinatal Cohort. *JAMA* 1998;280:55-60.
- 4 Kind C, Rudin C, Siegrist CA, Wyler CA, Biedermann K, Lauper V, et al. Prevention of vertical HIV transmission: Additive protective effect of elective caesarean section and zidovudine prophylaxis. Swiss Neonatal HIV Study Group. *AIDS* 1998;12:205-10.
- 5 Alonso R, Resino S, Gurbindo D, Miralles P, Segovia P, Fernández-Cruz E, Muñoz-Fernández MA. Prevención de la transmisión vertical del virus de la inmunodeficiencia humana: efecto protector del tratamiento con zidovudina. *Acta Pediátrica Española* (en prensa, 1999).
- 6 León JA, Leal M, Lissen E, Gurbindo MD, Muñoz-Fernández MA. Effect of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infected infants. *Acta Paediatrica* (in press 1999).
- 7 The mode of delivery and the risk of vertical transmission of Human Immunodeficiency Virus type 1. A meta-analysis of 15 prospective cohort studies. *N Engl J Med* 1991;325:1371-2.
- 8 Newell ML. Mechanism and timing of mother-to-child transmission of HIV-1 infection. *AIDS* 1998;12:831-7.
- 9 Resino S, Gurbindo MD, Bellón Cano JM, Muñoz-Fernández MA. Predictive markers of clinical outcome in vertically HIV-1 infected infants. A prospective longitudinal study. *Pediatric Reserch* (aceptado 1999).
- 10 Lindgren S, Bohlin AB, Forsgren M, Arneborn M, Ottenbland C. Screening for HIV-1 antibodies in pregnancy: results from Swedish national programme. *Brit Med J* 1993;307:1447-51.
- 11 Elford J, MacDonald MA. Antenatal HIV antibody testing in Australia. *Med J Australia* 1995;163:183-5.
- 12 Muñoz-Fernández MA. Diagnóstico de la infección perinatal por VIH-1. Manual del SIDA. 3.^a ed. Madrid: IDEPSA; 1999. p. 116-22.
- 13 Albert J, Fenyo 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;28:1560-64.
- 14 Muñoz-Fernández MA, Obregón E, Navarro J, Börner C, Gurbindo MD, Sampelayo TH, et al. Relationship among virological, immunological, and clinical parameters in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus (HIV-1) infection. *Pediatric Research* 1996;40:597-602.
- 15 Resino S, Alonso Arias R, Jiménez JL, Gurbindo MD, Muñoz-Fernández MA. Determinación de la carga viral para el diagnóstico precoz de la infección perinatal por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). *An Esp Pediatr* 1998;49:60-4.
- 16 Soriano V, Machuca A, Gutiérrez M. Diagnóstico serológico. Manual del SIDA. 3.^a ed. Madrid: IDEPSA; 1999. p. 82-97.
- 17 Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Proposed WHO criteria for interpreting results from Western blot assays for HIV-1, HIV-2 and HTLV-I/HTLV-II. *Wkly Epidemiol Rec* 1990;37:281-8.
- 18 Brooks J, MacDonalds K, Cardnell J. Absence of HIV infection in blood donors with indeterminate western blot test for antibody to HIV-1. *N Engl J Med* 1990;322:217-2.
- 19 Stramer SL, Heller JS, Coombs RW, Parry JV, Ho DD, Allain JP. Markers of HIV infection prior to IgG antibody seropositivity. *JAMA* 1989;262:64-9.
- 20 Muñoz-Fernández MA. Diagnóstico virológico de la infección en el niño. *Allergol Immunopathol* 1998;26:122-9.
- 21 Roth WK, Weber M, Scifried E. Feasibility and efficacy of routine PCR *screening* of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus and VIH-1 in blood-bank setting. *Lancet* 1999;353:359-63.