

## Marcadores predictivos de progresión a sida en niños infectados por transmisión vertical por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

Salvador Resino<sup>a</sup>, José M.<sup>a</sup> Bellón<sup>a</sup>, Dolores Gurbindo<sup>b</sup>, José Tomás Ramos<sup>c</sup>, Jesús Ruiz Contreras<sup>c</sup> y M.<sup>a</sup> Ángeles Muñoz-Fernández<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Inmunología. <sup>b</sup>Sección de Inmunopediatría. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. <sup>c</sup>Servicio de Pediatría. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid.

**FUNDAMENTO:** Estudiar el valor predictivo, individual y en conjunto, del porcentaje de linfocitos T CD4+, CD8+ y la carga viral plasmática (copias/ml), de progresión a sida en niños infectados verticalmente por el VIH-1.

**PACIENTES Y MÉTODO:** El estudio incluye una cohorte de 115 niños infectados por el VIH 1 mayores de 12 meses de edad. La carga viral se cuantificó en el plasma por un método molecular estandarizado. Las subpoblaciones linfocitarias se determinaron por citometría de flujo.

**RESULTADOS:** Los niños con una mediana de carga viral mayor de  $4,5 \log_{10}$  ( $p < 0,001$ ) y porcentaje de CD8+ inferior a 25% ( $p = 0,05$ ) durante el seguimiento tuvieron una media de tiempo de progresión a sida más baja. El riesgo relativo (RR) de progresión a sida fue mayor de 7 veces en los niños con una carga viral de más de  $4,5 \log_{10}$  de la mediana. En el caso de la carga viral como variable continua, encontramos que el riesgo de progresión a sida es superior a 3,5 por cada aumento de  $\log_{10}$  de carga viral. El porcentaje de CD8+ tuvo un RR de progresión a sida de 0,95% CD8+ a la entrada en el estudio y de 0,19% CD8+ durante el seguimiento, indicando protección frente a la progresión a sida.

**CONCLUSIONES:** Los valores individuales durante el seguimiento, pero no los basales, del porcentaje de linfocitos T CD8+ y carga viral ayudan a determinar el riesgo de progresión a sida en niños infectados por el VIH-1, y el uso de los dos marcadores juntos predice con más precisión el pronóstico de la enfermedad.

*Palabras clave:* Niños; Infección por VIH-1; Carga viral; Marcadores predictivos.

Prognostic markers of progression to aids in infants vertically infected by human immunodeficiency virus type-1

**BACKGROUND:** To study the prognostic AIDS progression value of the percentage of CD4+, CD8+, and plasma viral load (VL) (copies/ml) in HIV-1-vertically infected children.

**PATIENTS AND METHOD:** We study a cohort of 115 HIV-1 infected children older than 12 months of age. The VL was quantified using standard molecular assay. CD4 and CD8 T lymphocytes were determined by flow cytometry.

**RESULTS:** The children with a median of VL  $> 4.5 \log_{10}$  ( $p < 0.001$ ) and percentage of CD8+  $< 25\%$  ( $p = 0.05$ ) during follow-up, progressed faster to AIDS than children with a median of VL  $< 4.5 \log_{10}$  and CD8+  $> 25\%$ . The relative risk (RR) of AIDS progression was 7-fold higher in children with median VL above  $4.5 \log_{10}$ . When considering VL as a continuous variable, risk of progression to AIDS is 3.5-fold higher for each increase of one  $\log_{10}$  of VL. The percentage of CD8+ T-cells had a RR of AIDS progression of 0.95% CD8+ at entry to the study and of 0.19% CD8+ during follow-up, indicating protection against progression to AIDS.

**CONCLUSIONS:** Our results indicate that each basal values at entry in the study and during the follow-up of the percentage of CD8+ and VL helps to determine the risk of AIDS progression in HIV-1-infected children. More interestingly, the use of the two predictive markers together had higher predictive value.

Med Clin (Barc) 2000; 115: 564-567

Desde los primeros casos de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) en niños, fue evidente que la historia natural era diferente a la de adultos<sup>1-3</sup>. La infección por VIH-1 en niños presenta una distribución bimodal para los síntomas clínicos: *a*) un curso rápidamente progresivo de la infección con un corto período de incubación y una rápida y grave inmunodeficiencia con síntomas clínicos del síndrome de inmunodeficiencia humana (sida) desarrollados antes de los 18 meses de vida, y *b*) un desarrollo lento y crónico de la enfermedad similar al patrón descrito en adultos positivos para el VIH-1<sup>2,3</sup>. Las nuevas pautas de tratamiento utilizadas durante los últimos 2-3 años han modificado la forma de presentación clínica de la infección por VIH-1 en los niños.

La disminución de linfocitos T CD4+ en niños infectados por el VIH-1 solamente es similar a la de individuos adultos con el VIH-1 asintomáticos a partir de los 6 años de edad<sup>4</sup>, de manera que este marcador inmunológico tiene menor valor predictivo de progresión de la enfermedad en niños infectados por el VIH-1 que en los adultos, ya que la disminución del número de linfocitos T CD4+ se debe a un efecto combinado entre el descenso natural de los linfocitos T CD4+ por la edad y la progresión de la infección por el VIH-1. Sin embargo, en niños, el porcentaje de linfocitos T CD8+ aumenta con la edad, aunque no en el mismo grado que el descenso del porcentaje de linfocitos T CD4+<sup>5</sup>. Aunque se ha reconocido la importancia de los linfocitos T CD8+ en el control de la infección por el VIH-1<sup>6,7</sup>, pocos estudios han examinado el valor pronóstico del número de linfocitos T CD8+ en sangre periférica en individuos adultos<sup>8-10</sup> y en niños VIH-1<sup>11,12</sup>.

Otra diferencia importante entre niños e individuos adultos infectados por el VIH-1 son los valores de carga viral plasmática, que son mucho más elevados en los niños<sup>13-16</sup>. Aunque los datos son más escasos que en los adultos, la carga viral en los niños es, probablemente, uno de los marcadores que mejor predice el curso

Correspondencia: Dr. M.A. Muñoz-Fernández. Servicio de Inmunología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Dr. Esquerdo, 46. 28007 Madrid. Correo electrónico: Mmuñoz@cbm.uam.es.

Recibido el 27-4-2000; aceptado para su publicación el 12-9-2000

de la infección<sup>11,16-19</sup>. Varios estudios llevados a cabo en adultos han indicado que una carga viral baja en el momento de la estabilización se asocia con una progresión más lenta y una mejor supervivencia, en comparación con aquellos individuos con cargas virales elevadas<sup>13</sup>. Sobre la base de estos datos se han establecido recomendaciones para el uso de la carga viral en la toma de decisiones para el comienzo o cambio de la terapia antirretroviral en adultos infectados<sup>13</sup>, que también son aplicables a niños con el VIH-1. Los datos de los niños con más de 30 meses de edad son similares a los de estudios realizados entre adultos infectados, en los que el riesgo de progresión de la enfermedad aumenta sustan-

cialmente cuando la carga viral es mayor de 10.000-20.000 copias/ml<sup>13,14</sup>. La carga viral es difícil de interpretar durante el primer año de vida, ya que los valores son altos y hay un marcado solapamiento en los valores de la carga viral de niños que van a progresar y aquellos que no van a progresar rápidamente a sida<sup>16,18,20</sup>. Los datos indican que los valores basales del porcentaje de linfocitos T CD4+ y carga viral y los cambios en estos parámetros ayudan a determinar el riesgo de mortalidad en niños infectados, y el uso conjunto de los dos marcadores puede ayudar a definir con más precisión el pronóstico de la enfermedad<sup>16,21</sup>. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar el valor predictivo del porcentaje de

linfocitos T CD4+, CD8+ y carga viral en la progresión a sida en la era del tratamiento antirretroviral, en un estudio retrospectivo de seguimiento, en niños mayores de 12 meses de edad que a la entrada en el estudio no presentaban sintomatología clínica grave.

## Pacientes y método

### Sujetos

Hemos realizado un estudio retrospectivo en el que se incluyeron 115 niños infectados por VIH-1. El estudio fue realizado entre febrero de 1990 y octubre de 1998 en la Sección de Inmunopatología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid y en el Servicio de Pediatría del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, siendo el tiempo de seguimiento máximo de 30 meses. Se seleccionaron 115 de 187 niños que acudieron a dichas secciones por tener más de un año de edad y no tener sida (tabla 1). El factor de riesgo de transmisión fue la vía vertical en los 115 niños, que hemos diagnosticado como infectados utilizando métodos de detección directa del VIH-1 previamente descritos (ADN-PCR y cultivo viral)<sup>21,22</sup>. En todos los casos se obtuvo consentimiento de los padres o representantes legales para la realización del estudio.

### 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, EE.UU.)<sup>23</sup> usando el programa de adquisición Lysis II (Becton-Dickinson, San José CA, EE.UU.) dentro de las 2 h siguientes a la tinción de las células.

### Cuantificación de ARN viral en plasma por RT-PCR

Los valores de ARN viral en el plasma de los pacientes pediátricos se cuantificaron usando un ensayo comercial (Amplicor-HIV Monitor TM Test, Roche Diagnostic System), aprobado por la Federal Drug Administration (FDA) para monitorización de la carga viral en mayo de 1996<sup>24</sup>.

### Ánalisis estadístico

En todo el análisis estadístico, los valores de carga viral (ARN del VIH-1) fueron transformados en logaritmo (base 10) para normalizar su distribución. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ se expresaron como porcentaje. Calculamos la mediana de los valores de linfocitos T CD4+, CD8+ y CV antes de llegar a sida de todos los datos de cada niño durante el seguimiento.

TABLA 1

### Resumen de las características inmunológicas y virológicas de los 115 niños VIH-1 incluidos en el estudio

| Característica                    | Valores              |
|-----------------------------------|----------------------|
| Número de niños VIH-1             | 115                  |
| Edad (años)*                      | 5,79 (3,49) 1,0-15,1 |
| Tiempo de seguimiento             | 16,4 (9,7) 0,1-30    |
| Poblaciones linfocitarias         |                      |
| TCD4+* (%)                        | 25,4 (14,74) 1-62    |
| TCD8+* (%)                        | 39,7 (15,42) 7-82    |
| Marcadores virológicos            |                      |
| Log <sub>10</sub> CV (copias/ml)* | 4,20 (0,99) 2,3-6,37 |
| Categoría clínica                 |                      |
| A                                 | 82 (71,3%)           |
| B                                 | 33 (28,7%)           |
| Tratamiento                       |                      |
| No tratados                       | 35 (30,4%)           |
| Tratados                          | 80 (69,6%)           |

\*Valores expresados como media (DE) y rango.

CV: carga viral; A: síntomas leves; B: síntomas moderados; VIH-1: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1.

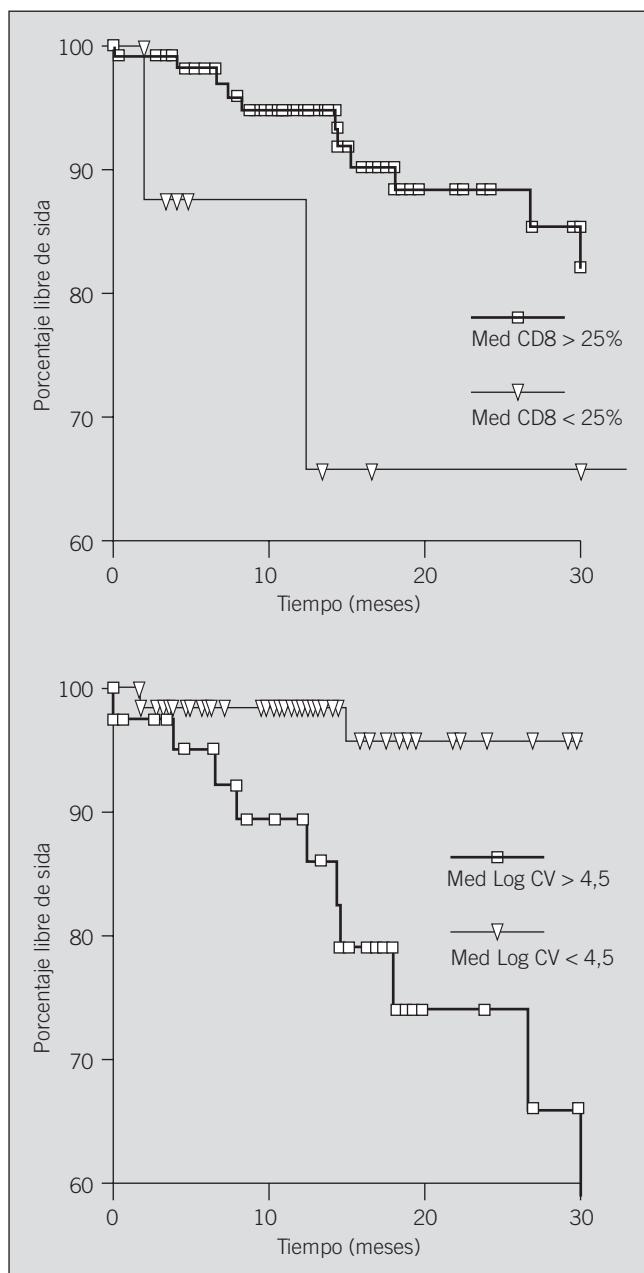


Fig. 1. Curvas de progresión a sida para los puntos de corte 25% de células T CD8+ y 4,5 log<sub>10</sub> (copias/ml) de la carga viral en los 115 niños incluidos en el estudio. Med: mediana; CV: carga viral; sida: síndrome de inmunodeficiencia humana. Los niños con mediana de carga viral > de 4,5 log<sub>10</sub> copias ARN-VIH-1/ml y < 25% de células T CD8+ tuvieron mayor probabilidad de progresión a sida que los niños que tuvieron una mediana de carga viral < 4,5 log<sub>10</sub> copias ARN-VIH-1/ml ( $p < 0,001$ ) y > 25% de células T CD8+ ( $p = 0,05$ ).

como el valor más representativo de estos marcadores de progresión. Además, clasificamos a los niños según estos valores, transformando estas variables continuas en dicotómicas. Los puntos de corte usados fueron el 25% de linfocitos T CD4+ y CD8+ y 4,5 log<sub>10</sub> copias/ml de carga viral.

Realizamos el análisis de supervivencia por el método de Kaplan-Meier, analizando las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) por el test de rangos logarítmicos (Mantel-Haenzel). Este análisis se realizó en todos los niños, tanto para los valores a la entrada o basales como para la mediana de los valores durante el seguimiento. También estimamos la asociación de estos marcadores, a la entrada y durante el seguimiento, con la progresión a sida según el modelo de riesgos proporcionales de Cox ajustado por el tratamiento antirretroviral<sup>25</sup>.

## Resultados

Las características clínicas, inmunológicas y virológicas de la población de niños estudiados se describen en la tabla 1. Hemos realizado un análisis de Kaplan-Meier y de regresión de Cox para valorar la progresión a sida según los valores basales y a lo largo del seguimiento del porcentaje de linfocitos T CD4+, CD8+ y log<sub>10</sub> de la carga viral (copias/ml).

Para el análisis de Kaplan-Meier según los marcadores basales, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en los puntos de corte descritos con anterioridad (véase el apartado Pacientes y método) en la progresión a sida. Sin embargo, sí que encontramos diferencias significativas para los puntos de corte 4,5 log<sub>10</sub> de carga viral ( $p < 0,001$ ) y el 25% de células T CD8+ ( $p = 0,05$ ) de los valores de las medianas calculados durante el seguimiento (fig. 1). Los niños infectados por el VIH-1, con una mediana, durante el seguimiento, superior a 4,5 log<sub>10</sub> (copias/ml) de carga viral e inferior al 25% de linfocitos T CD8+, desarrollaron sida más rápidamente durante el seguimiento. En el análisis de regresión de Cox, ajustado por el tratamiento antirretroviral, evaluamos el valor predictivo de progresión a sida según los valores basales y el valor de la mediana a lo largo del seguimiento del porcentaje de linfocitos T CD4+, CD8+ y log<sub>10</sub> (copias/ml) de la carga viral, así como para los puntos de corte descritos con anterioridad. Para los valores basales de estos marcadores, tanto el análisis de regresión de Cox univariante como el multivariante no pusieron de manifiesto valores de riesgo relativo (RR) significativos (tabla 2), a excepción del porcentaje de linfocitos T CD8+, que tuvo un RR < 1. Esto indica una función protectora de progresión a sida de las células T CD8+; los niños con más del 25% de linfocitos T CD8+ a la entrada en el estudio progresaron más lentamente a sida.

En el estudio de seguimiento, el análisis de regresión de Cox univariante demostró significación estadística para el porcentaje de linfocitos T CD8+ y el log<sub>10</sub> de la carga viral, pero no para el porcentaje de linfocitos T CD4+; sin embargo, cuando

TABLA 2

**Resultados de la regresión de Cox univariante y multivariante analizando el valor de varios marcadores inmunológicos y virológicos en los 115 niños estudiados para predecir la progresión a sida**

|                      | Dicotómica |             |       |                | Continua |             |       |
|----------------------|------------|-------------|-------|----------------|----------|-------------|-------|
|                      | RR         | IC del 95%  | p     | Punto de corte | RR       | IC del 95%  | p     |
| <i>Univariante</i>   |            |             |       |                |          |             |       |
| Basal                |            |             |       |                |          |             |       |
| % T CD4+             | 0,54       | 0,14; 2,01  | 0,360 | 25             | 0,97     | 0,93; 1,02  | 0,279 |
| % T CD8+             | 0,44       | 0,12; 1,59  | 0,212 | 25             | 0,96     | 0,92; 1,01  | 0,127 |
| Log <sub>10</sub> CV | 1,37       | 0,30; 6,17  | 0,674 | 4,5            | 1,24     | 0,57; 2,67  | 0,570 |
| Seguimiento          |            |             |       |                |          |             |       |
| % T CD4+             | 0,83       | 0,24; 2,81  | 0,765 | 25             | 0,96     | 0,91; 1,01  | 0,139 |
| % T CD8+             | 0,19       | 0,04; 0,94  | 0,042 | 25             | 0,96     | 0,91; 1,01  | 0,084 |
| Log <sub>10</sub> CV | 7,09       | 1,47; 34,03 | 0,014 | 4,5            | 3,77     | 1,51; 9,36  | 0,004 |
| <i>Multivariante</i> |            |             |       |                |          |             |       |
| Basal                |            |             |       |                |          |             |       |
| % T CD4+             | 0,98       | 0,19; 4,93  | 0,981 | 25             | 0,98     | 0,93; 1,03  | 0,465 |
| % T CD8+             | 0,31       | 0,06; 1,39  | 0,128 | 25             | 0,95     | 0,90; 0,99  | 0,044 |
| Log <sub>10</sub> CV | 1,31       | 0,26; 6,63  | 0,738 | 4,5            | 1,01     | 0,46; 2,19  | 0,977 |
| Seguimiento          |            |             |       |                |          |             |       |
| % T CD4+             | 2,03       | 0,51; 8,03  | 0,309 | 25             | 1,01     | 0,95; 1,07  | 0,721 |
| % T CD8+             | 0,31       | 0,05; 1,71  | 0,183 | 25             | 0,96     | 0,91; 1,00  | 0,114 |
| Log <sub>10</sub> CV | 7,01       | 1,37; 35,78 | 0,02  | 4,5            | 4,14     | 1,26; 13,60 | 0,019 |

RR: riesgo relativo; IC del 95%: intervalo de confianza del 95%; p: nivel de significación; CV: carga viral.

realizamos el análisis multivariante, encontramos significación estadística sólo para el log<sub>10</sub> de la carga viral y no para el porcentaje de linfocitos T CD8+ (tabla 2). El log<sub>10</sub> de la carga viral estuvo fuertemente relacionada con progresión clínica a sida ( $RR > 1$ ).

## Discusión

Las manifestaciones clínicas del niño infectado por el VIH-1 se producen como consecuencia de la inmunodepresión progresiva que origina el virus. La disminución de linfocitos T CD4+ en niños VIH-1 es más acusada que en adultos porque hay un efecto combinado entre el descenso natural de los linfocitos T CD4+ por la edad y la progresión de la infección por VIH-1<sup>4,11,16</sup>. Es posible que esta disminución combinada de linfocitos T CD4+ sea la causa de que no encontramos valores de RR < 1 y estadísticamente significativos en el análisis de regresión de Cox univariante a la entrada en el estudio, y durante el seguimiento, igual que por el método de Kaplan-Meier.

En los últimos años, el papel de los linfocitos T CD8+ en el control de la infección por el VIH-1 se ha visto incrementado<sup>6,7</sup>. El valor predictivo de los linfocitos T CD8+ ha sido considerado de manera muy modesta, quizás debido a los resultados contradictorios encontrados en la bibliografía<sup>9,10</sup>. Muchos de los estudios realizados han sido cortes transversales<sup>9,10</sup> y, aunque el valor de los linfocitos T CD8+ se usa de forma habitual en la práctica clínica, normalmente se realizan con el fin de calcular el cociente CD4/CD8. Cuando se analizó la evolución a sida por el método de Kaplan-Meier según el porcentaje de linfocitos T CD8+,

(fig. 1), se observó que los niños con menos del 25% de linfocitos T CD8+ progresaron más rápidamente a sida (fig. 1). Estos datos concuerdan con otros publicados por nuestro grupo de trabajo, en los que niños con VIH-1 con menos de 12 meses de edad que tuvieron menos del 25% de linfocitos T CD8+ durante el seguimiento desarrollaron síntomas neurológicos<sup>12</sup> y sida más rápidamente<sup>11</sup>. Es importante destacar que el efecto del descenso del porcentaje de células T CD8+ es también importante en este estudio, en niños mayores de 12 meses de edad. En el análisis univariante encontramos que las células T CD8+ tienen una función protectora de progresión a sida ( $RR < 1$ ) durante el seguimiento (tabla 2); a pesar de esto, el poder predictivo de progresión a sida del porcentaje de células T CD8+ fue menor que el de la carga viral plasmática, aunque mayor que para el porcentaje de células T CD4+. En trabajos publicados por nuestro grupo, en niños menores de 12 meses de edad a la entrada en el estudio encontramos un valor predictivo de progresión a sida similar para la carga viral y el porcentaje de células T CD8+ y muy bajo para el porcentaje de linfocitos T CD4+<sup>11,12</sup>. En el trabajo que presentamos aquí, los niños fueron mayores de 12 meses de edad a la entrada en el estudio, evitando la posible confusión causada por el descenso natural de linfocitos T CD4+ y aumento de linfocitos T CD8+<sup>5</sup>, que es más acusada durante el primer año de vida.

La carga viral en los niños infectados perinatalmente difiere con respecto a los adultos infectados, persistiendo elevada durante un período prolongado<sup>16,26</sup>. La carga viral suele ser generalmente baja al nacimiento (< 10.000 copias/ml),

aumentando a los 2 meses de edad ( $> 100.000$  copias/ml), con un rango que va desde indetectable a casi 10 millones de copias/ml), disminuyendo lentamente en ausencia de tratamiento<sup>21</sup> y estabilizándose hasta que comienza a desarrollarse el sida. Se ha demostrado que una carga viral baja después de la primoinfección se correlaciona con una progresión más lenta a sida<sup>13,27</sup>. A pesar de la irrupción de los tratamientos antirretrovirales, hemos demostrado cómo la carga viral sigue manteniendo un valor pronóstico elevado, superior al porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+. El riesgo de progresión a sida es superior a 7 veces en los niños con una carga viral superior a  $4,5 \log_{10}$  de la mediana, tanto en el análisis de regresión de Cox univariante como multivariante. En el caso de la carga viral como variable continua, encontramos que el riesgo de progresión a sida es superior a 3,5 por cada aumento de carga viral de  $\log_{10}$ . Los datos hallados en este trabajo son equivalentes a los encontrados en adultos infectados por el VIH-1, en los que el riesgo de progresión de la enfermedad aumenta de manera sustancial cuando la carga viral es mayor de  $10.000-30.000$  copias/ml<sup>13,18,28</sup>. Datos recientes indican que, en niños menores de un año de edad, el punto de corte más sensible de progresión a sida y supervivencia es  $\geq 5 \log_{10}$  copias/ml<sup>11,20,29</sup>. Esto puede ser debido a que, durante el primer año de vida, los valores de carga viral son altos y hay un marcado solapamiento entre los valores de carga viral de los niños que van a progresar y aquellos que no van a progresar rápidamente a sida<sup>16-18</sup>. Hemos encontrado diferencias significativas para  $4,5 \log_{10}$  copias/ml porque, en esta cohorte de niños, todos tenían más de un año de edad y habían pasado la etapa de primoinfección y el pico inicial de viremia.

Son muy pocos los estudios sobre marcadores de progresión de la infección por VIH-1 realizados en cohortes con un amplio número de niños. Nuestros datos indican que los valores, durante el seguimiento, del porcentaje de linfocitos CD8+ y carga viral ayudan individualmente a determinar el riesgo de progresión a sida en niños infectados por el VIH-1, y el uso conjunto de los dos marcadores aporta más precisión al pronóstico de la enfermedad<sup>16,21</sup>.

## Agradecimiento

A Dolores García Alonso y M.<sup>a</sup> Jesús Gómez Jiménez, por su excelente labor técnica.

Este trabajo se ha realizado con financiación del Fondo de Investigación Sanitaria (00/0207), Programa Nacional de Salud (SAF 99-0022), Proyecto de la Comunidad de Madrid (08.5/0019/98), Proyecto de la Fundación para la Investigación y la Prevención del sida en España (3008/99) y Bristol-Myers, S.A. (Grupo Bristol-Myers Squibb).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Duliege AM, Messiah A, Blanche S, Tardieu M, Griscelli C, Spira A. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 infection in children: prognostic value of laboratory tests on the bimodal progression of the disease. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11: 630-635.
- Blanche S, Tardieu M, Duliege A, Rouzioux C, Le Deist F, Fukunaga K et al. Longitudinal study of 94 symptomatic infants with perinatally acquired human immunodeficiency virus infection. Evidence for bimodal expression of clinical and biological symptoms. *Am J Dis Child* 1990; 144: 1210-1215.
- Pizzo PA, Wilfert CM. Markers and determinants of disease progressions in children with HIV infection. The Pediatric AIDS Siena Workshop II. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovir* 1995; 8: 30-44.
- Blanche S, Newell ML, Mayaux MJ, Dunn DT, Teglas JP, Rouzioux C et al. Morbidity and mortality in European children vertically infected by HIV-1. The French Pediatric HIV Infection Study Group and European Collaborative Study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovir* 1997; 14: 442-450.
- Denny T, Yogeve R, Gelman R, Skuza C, Oleske J, Chadwick E et al. Lymphocyte subsets in healthy children during the first 5 years of life. *JAMA* 1992; 267: 1484-1488.
- Fauci AS, Schnittman SM, Poli G, Koenig S, Pantaleo G. NIH conference. Immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med* 1991; 114: 678-693.
- Lange JM, De Wolf F, Goudsmit J. Markers for progressions in HIV infection. *AIDS* 1989; 3: S153-S160.
- Phillips AN, Sabin CA, Elford J, Bofill M, Lee CA, Janossy G. CD8 lymphocyte counts and serum immunoglobulin A levels early in HIV infection as predictors of CD4 lymphocyte depletion during 8 years of follow-up. *AIDS* 1993; 7: 975-980.
- Anderson RE, Shiboski SC, Royce R, Jewell NP, Lang W, Winkelstein W Jr. CD8+ T lymphocytes and progression to AIDS in HIV-infected men: some observations. *AIDS* 1991; 5: 213-215.
- Chevret S, Roquin H, Ganne P, Lefrere JJ. Prognostic value of an elevated CD8 lymphocyte count in HIV infection. Results of prospective study of 152 asymptomatic HIV-positive individuals. *AIDS* 1992; 6: 1349-1352.
- Resino S, Gurbindo MD, Bellón JM, Sánchez-Ramón S, Muñoz-Fernández MA. Predictive markers of clinical outcome in vertically HIV-1 infected infants, a prospective longitudinal study. *Pediatr Res* 2000; 47: 509-515.
- Gurbindo D, Resino S, Sánchez-Ramón S, León JA, Muñoz-Fernández MA. Neurological manifestations of HIV-1 infection in infants: viro-immunologic markers. *Neuropediatrics* 1999; 30: 197-204.
- Mellors JW, Muñoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1997; 126: 946-954.
- O'Brien WA, Hartigan PM, Martin D, Esinhart J, Hill A, Benoit S et al. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. *Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. J Immunol* 1996; 156: 1638-1645.
- Muñoz-Fernández MA, Navarro J, Obregón E, Arias RA, Gurbindo MD, Sampelayo TH. Immunological and virological markers of disease progression in HIV-1 infected children. *Acta Pediatr Suppl* 1997; 421: 46-51.
- Mofenson LM, Korelitz J, Meyer WA 3rd, Bethel J, Rich K, Pahwa S et al. The relationship between serum human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA level, CD4 lymphocyte percent, and long-term mortality risk in HIV-1-infected children. *National Institute of Child Health and Human Development Intravenous Immunoglobulin Clinical Trial Study Group. J Infect Dis* 1997; 175: 1029-1038.
- Shearer WT, Quinn TC, LaRussa P, Lew LF, Mofenson L, Almy S et al. Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. *Women and Infants Transmission Study Group. N Engl J Med* 1997; 336: 1337-1342.
- Palumbo PE, Raskin C, Fiscus S, Pahwa S, Fowler MG, Spector SA et al. Predictive value of quantitative plasma HIV RNA and CD4+ lymphocyte count in HIV-infected infants and children. *JAMA* 1998; 279: 756-761.
- HIV-1 viral load and CD4 cell count in untreated children with vertically acquired asymptomatic or mild disease. *Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA). AIDS* 1998; 12: F1-F8.
- Resino S, Gurbindo D, Navarro J, Sánchez-Ramón S, León JA, Muñoz-Fernández MA. Prognostic markers in naive infants younger than two months of age with HIV-1 infection. *Pediatrics and Related Topics (Padiatr Grenzgeb)* 1999; 38: 431-446.
- Muñoz-Fernández MA, Obregón E, Navarro J, Borner C, Burgondo MD, Sampelayo TH et al. Relationship of virologic, immunologic, and clinical parameters in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatr Res* 1996; 40: 597-602.
- Cruz García M, de Jose I, Hawkins F, Bates I, Martínez Zapico R, Ferreira A et al. The early diagnosis of the vertical transmission of the human immunodeficiency virus type 1. The evaluation of diagnostic tests. *Med Clin (Barc)* 1995; 105: 476-477.
- Pediatric European Network for treatment of AIDS (PENTA). HIV-1 viral load and CD4 cell count in untreated children with vertically acquired asymptomatic or mild disease. *AIDS* 1998; 12: 476-477.
- Muñoz-Fernández MA, Navarro J, García Montes M, Cosín J, Zabay JM, Fernández-Cruz E. Quantification of low levels of HIV-1 RNA viremia in p24-antigen-negative asymptomatic HIV+ patients by use of the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1996; 2: 404-408.
- Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc* 1972; 34: 187-220.
- Shearer WT, Langston C, Lewis DE, Pham EL, Hammill HH, Kozinetz CA et al. Early spontaneous abortions and fetal thymic abnormalities in maternal-to-fetal HIV infection. *Acta Pediatr Suppl* 1997; 421: 60-64.
- Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Demarest JF et al. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995; 332: 209-216.
- Walli R, Reinhart B, Luckow B, Lederer E, Loch O, Malo A et al. Value of HIV-1 viral load and CD4 lymphocyte count as determinants of progression to AIDS and survival. *Med Clin (Barc)* 1998; 110: 761-767.
- Resino S, Jiménez JL, Gurbindo D, Muñoz-Fernández MA. Marcadores predictivos de supervivencia en niños menores de 12 meses de edad infectados verticalmente por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Med Clin (Barc)* 1999; 113: 561-566.