

Infección primaria en niños VIH-1 infectados verticalmente: Características biológicas de los aislados virales, carga viral y linfocitos T CD4+

S. Resino García, J.L. Jiménez Fuentes, D. Gurbindo Gutiérrez², J. Navarro, M.L. Abad, M^a A. Muñoz-Fernández

Resumen. *Objetivos:* Estudiar la correlación entre marcadores virológicos y/o inmunológicos durante los primeros meses de vida en niños infectados verticalmente por el VIH+ y sin tratamiento antirretroviral.

Métodos: Estudiamos 30 niños VIH-1+, ninguno recibió terapia antirretroviral, ni sus madres durante el embarazo. La carga viral se cuantificó en plasma por un método molecular estandarizado. El aislamiento del virus, el fenotipo y la cinética de replicación se determinaron analizando cocultivos virales. Las subpoblaciones linfocitarias se determinaron por citometría de flujo.

Resultados: Encontramos una relación inversa entre el log₁₀ del número de células CD4/mm³ y el porcentaje de células CD4+ con el log₁₀ de la carga viral, siendo la pendiente de -0,266 (IC95%: -0,459 a -0,074) y -6,643 (IC95%: -12,815 a -0,471) respectivamente. Al analizar la influencia del fenotipo viral sobre la relación entre el porcentaje de células CD4+ o el porcentaje de células CD4 estandarizados por edad (Z-score) con el log₁₀ de la carga viral se encontró que el grupo de niños con aislados virales con fenotipo viral inductor de sincitios (IS) tenían un 12,355% (IC95%: 2,336 a 22,373) de células CD4+ y 4,530 desviaciones estándar (IC95%: 0,448 a 8,613) más baja que los niños con aislados no inductores de sincitios (NIS).

Conclusiones: Las características biológicas de los aislados virales (fenotipo IS y cinética de replicación rápida alta) y la presencia de carga viral plasmática alta tienen tendencia a aparecer juntas. La carga viral plasmática es el marcador que muestra una relación inversa más clara con el nivel de células CD4+, mostrando esta relación distinto valor entre el grupo de niños con aislados virales IS y el grupo de niños con aislados virales NIS.

An Esp Pediatr 1999;51:469-474.

Palabras claves: VIH-1. Niños. Carga viral. Fenotipo viral. Cinética de replicación viral. Linfocitos CD4+.

PRIMARY INFECTION IN VERTICALLY HIV-1 INFECTED INFANTS: BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ISOLATED VIRUS, VIRAL LOAD AND TCD4+ LYMPHOCYTES

Abstract. *Objective:* Our aim was to study the relationship between virological and/or immunological markers during the first month of life in vertically HIV-1 infected infants without prior antiviral treatment.

¹Servicio de Inmunología, ²Sección de Inmuno-Pediatría, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón" Madrid. Este trabajo se ha realizado con la financiación del Programa Nacional de Salud (SAF 96-0094) y de la Comunidad de Madrid (07/047/096). Correspondencia: M^a. Angeles Muñoz-Fernández. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. División de Inmunología. C/ Dr. Esquerdo, 47. 28007 Madrid
Recibido: Enero 1999
Aceptado: Marzo 1999

Patients and methods: Thirty HIV-1 infected infants that had not received prior antiviral therapy, nor had their mother during pregnancy, were studied. Viral load was quantified using standard molecular assays. Viral isolation and phenotype were carried out by using viral co-cultures. Subpopulations of lymphocytes were determined by flow cytometry.

Results: We have found an inverse correlation between log₁₀ CD4+ cells/mm³, as well as CD4+ percentage with log₁₀ viral load, with a slope of -0.266 (CI95%: -0.459 to -0.074) and -6.648 (CI95%: -12.815 to -0.471), respectively. When the influence of viral phenotype on the log₁₀ viral load or the percent of CD4+ T cells standardized according to age (Z-score) with the log₁₀ of the viral load was determined, it was found that infants having syncytium inducing (SI) virus had 12.355% (CI95%: 2.336 to 22.373) less CD4+ cells and 4.530 standard deviations (CI95%: 0.448 to 8.613) than infants with non syncytium inducing (NSI) isolates.

Conclusions: Our results suggest that a particular biological phenotype of viral isolates (SI and those with rapid/high replication) and high plasma viral loads have a statistically significant tendency to be associated. Viral load is the marker that shows the best inverse correlation with the level of CD4+ cells normalized according to the infant's age. This correlation shows a different value in infants with SI and NSI isolates.

Key words: HIC-1. Infants. Viral load. Viral phenotype. Viral replication. CD4+ lymphocytes.

Introducción

En la infección vertical por el VIH-1 se puede estimar el momento en que se produce la infección y observar los cambios que se producen a nivel inmunológico y virológico⁽¹⁾. Estos cambios son de gran importancia para el mejor conocimiento de la patogenia y de la magnitud de la infección por VIH-1 en niños. Actualmente, en individuos adultos VIH-1, el recuento de linfocitos T CD4+ y la carga viral, son parámetros con valor predictivo de la evolución clínica de la infección y se utilizan para tomar decisiones terapéuticas sobre cuando comenzar o cambiar una terapia antirretroviral⁽²⁻⁵⁾. Sin embargo, en niños no infectados los linfocitos T CD4+ disminuyen con la edad⁽⁶⁾, y a diferencia de lo que ocurre en individuos adultos VIH-1, cuando el valor de los linfocitos T CD4+ se ajustan según la edad del niño, este marcador inmunológico tiene menor valor predictivo de progresión de la enfermedad⁽⁷⁾. En niños existen varios estudios sobre el papel de la carga viral en la infección por VIH-1⁽⁸⁻¹⁷⁾. Es difícil establecer valores de carga viral que puedan indicar el riesgo de progresión de la infección, tal como se ha hecho en individuos adultos VIH-1. Otro marcador importante es el fenotipo biológico de los aislados virales. Algunos estu-

dios realizados en niños muestran diferentes patrones virológicos según el estadio clínico⁽¹⁸⁻²²⁾. Sin embargo, son escasos los estudios que asocian o relacionan las diferentes características virológicas (fenotipo viral, cinética de replicación, carga viral) durante los primeros meses de vida.

El uso habitual de técnicas de cuantificación de carga viral y el estudio biológico de aislados virales en los recién nacidos y niños menores de 6 meses con infección por VIH-1, influirán en el mejor conocimiento de la primoinfección, así como de la historia natural de la infección por VIH-1. Para aclarar más estos datos, hemos estudiado la asociación entre las características biológicas de los aislados virales y la carga viral, la relación entre la carga viral y el porcentaje de células T CD4+ y el efecto del fenotipo viral en la relación entre carga viral y linfocitos T CD4+ durante los primeros meses de vida (primoinfección) en niños infectados verticalmente por el VIH-1 y sin tratamiento antirretroviral

Pacientes y métodos

Sujetos

En la Sección de Inmuno-Pediatría del Hospital General Universitario "Gregorio Marañón" de Madrid, se realizó un estudio transversal de niños infectados por VIH-1 que acudieron a la consulta entre el 28/4/90 y el 10/11/96. Seleccionamos 30 niños que acudieron a dicha Sección por tener menos de 5 meses de edad en su primera visita y no haber recibido tratamiento antirretroviral, ni sus madres durante el embarazo. Estudiamos el número y el porcentaje de células T CD4+, T CD8+, cociente CD4/CD8, carga viral, fenotipo y cinética de replicación viral de los 30 niños VIH+. Los procedimientos utilizados en los pacientes han sido realizados tras la obtención de consentimiento informado de sus padres o tutores legales.

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 C.A., EE.UU.)⁽¹⁸⁾ usando el programa de adquisición Lysis II (Becton-Dickinson, San José C.A., EE.UU.) dentro de las dos horas siguientes a la tinción de las células.

Aislamiento del VIH-1 por cultivo viral: fenotipo y cinética de replicación

La detección del VIH-1 se realizó utilizando un ensayo de microcultivo⁽²³⁾. Las CMSP se aislaron por centrifugación realizando un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Se cocultivaron 2 x 10⁶ CMSP del paciente con 2 x 10⁶ 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 medio RPMI suplementado con 20% 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 fres-

co, 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 N.V. Haven, Zwijnaarde-Bélgica); también se observó por microscopía óptica la aparición de células IS en el cultivo celular una vez por semana. Los cultivos se mantuvieron de 28 a 42 días.

La cinética de replicación de los aislados virales se consideró rápida cuando tres días después del cultivo, se detectaron valores de Ag-p24 en el cultivo, y lenta si los valores de Ag-p24 no se detectaron hasta pasados al menos siete días del cultivo. Por otro lado, se consideró cinética de replicación alta si los valores de Ag-p24 en el cultivo eran persistentemente altos (> 500 pg/ml) y baja si eran menores de 500 pg/ml.

Determinación del fenotipo viral

Se infectaron CMSP preestimuladas con PHA con sobrenadante procedente de cada uno de los virus aislados después de 7-10 días y las CMSP infectadas se cocultivaron con la línea celular MT-2. Los cultivos se mantuvieron en medio RPMI suplementado con 20% FCS. Cada tres o cuatro días se reemplazó la mitad del sobrenadante de cultivo por medio fresco completo. Posteriormente se midieron los valores de Ag-p24 en el sobrenadante del cultivo celular. Se analizó por microscopía óptica la formación de sincitios. Se consideraron como aislados IS, los cultivos en los que al microscopio se observa la formación sincitios y tenían Ag-p24 positivo⁽²³⁾.

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 MonitorTMTest, Roche Diagnostic System), aprobado por la Federal Drug Administration (FDA) para monitorización de carga viral en mayo de 1996⁽²³⁾.

Análisis estadístico

Los valores de linfocitos T CD4+ y T CD8+ se expresaron en porcentaje y en células/mm³. Se ajustaron los porcentajes de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ de cada paciente por edad según valores normales de niños VIH negativos nacidos de madres VIH+, que fueron tomados como controles (Z-score). En todos los análisis, los valores de carga viral en sangre periférica se transformaron en logaritmo base 10 para normalizarlos.

Las diferencias de las características inmunológicas y virológicas de los niños a la entrada en el estudio, entre los que habían desarrollado SIDA y no lo habían desarrollado, se realizaron por el análisis exacto de Fisher (variables dicotómicas) y la T de Student para muestras independientes (variables continuas). La asociación entre variables fue medida por el análisis no paramétrico de correlación de Spearman, y calculando la razón de proporciones cuando las dos variables implicadas fueron dicotómicas. Se ha usado el análisis de regresión lineal para calcular la pendiente entre el número de células/mm³ o el porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+, el cociente CD4/CD8 y el log₁₀ de la carga viral, obteniendo el valor de la pendiente (me-

Tabla I Características inmunológicas y virológicas de los 30 niños VIH-1 según tuvieran o no SIDA

	No SIDA	SIDA
Nº	20 (66,7%)	10 (33,3%)
Categorías inmunológicas (CDCP)		
CD4 > 25%	16 (53,3%)	4 (13,3%)
CD4 15-25%	3 (10%)	3 (10%)
CD4 < 15%	1 (3,3%)	3 (10%)
Marcadores inmunológicos y virológicos(*)		
%CD4	36,210 (7; 59,7)	26,434 (3,4; 56)
%CD8	18,120 (7; 41,5)	21,910 (4; 46,5)
CD4/CD8	2,517 (0,4; 6,1)	1,861 (0,1; 6,2)
CD4/mm ³	2.979 (201; 8.692)	1.570 (60; 4.027)
CD8/mm ³	1.483 (258; 4.847)	1.042 (71; 2.309)
Carga viral (copias/ml)	735.839 (9682; 3.000.000)	989.212 (8.410; 3.844.000)
log ₁₀ carga viral	5,178 (3,98; 6,48)	5,322 (3,93; 6,69)
Características biológicas de los aislados virales		
IS	10 (34,5%)	8 (27,6%)
NIS	9 (31%)	2 (6,9%)
L/B	6 (20,7)	3 (10,3%)
R/A	13 (44,8%)	7 (24,1%)

(*) Todos los valores se expresaron como media (min-máx). CD4: linfocitos T CD4+. CD8: linfocitos T CD8+. IS: aislados virales inductor de sincitios. NIS: aislados virales no inductor de sincitios. L/B: cinética de replicación lenta/baja. R/A: cinética de replicación rápida/alta.

dida de variación). También se usó el análisis de covarianza (ANCOVA) para determinar la influencia del fenotipo en la relación entre células CD4+ y log₁₀ CV.

Resultados

Características de la población de estudio

Realizamos un estudio transversal en 30 niños diagnosticados de infección por VIH-1 menores de 5 meses de edad y que no habían recibido tratamiento antirretroviral. El estudio incluyó 10 niños (33,3%) y 20 niñas (66,7%) con una edad media de 2,6 meses (rango de 0,42 a 4,83 meses). Según las características clínicas, a la entrada en el estudio, tuvimos 20 niños (66,7%) en categoría clínica N, A o B (no SIDA) y 10 niños (33,3%) en categoría clínica C (SIDA), según la CDC⁽²¹⁾ (Tabla I). Las características de los marcadores inmunológicos y virológicos de estos niños también se reflejan en la tabla I. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes marcadores estudiados en el grupo de niños sin SIDA o con SIDA al realizar una t de Student para las variables continuas y el test exacto de Fisher para las variables dicotómicas. Estos datos indican que la población estudiada es homogénea, aunque 10 de los 30 niños VIH+ entraron en el estudio en categoría clínica C o SIDA.

Asociación entre las características biológicas de los aislados virales y la carga viral

Se realizó un análisis de correlación de Spearman entre los diferentes marcadores virológicos, encontrando una asociación significativa entre el fenotipo IS y la cinética de replicación rá-

pida alta (R/A) ($r=0,551$, $p=0,002$), y entre cinética de replicación R/A y carga viral ($r=0,410$, $p=0,027$). Sin embargo, no encontramos asociación entre el fenotipo de los aislados virales y la carga viral. La frecuencia de aparición de aislados con fenotipo IS fue 3,60 (IC95%: 1,040 a 12,462) veces superior en los aislados virales con cinética de replicación R/A que en aislados con cinética L/B y la frecuencia de aparición de aislados virales NIS fue 3,889 (IC95%: 1,514 a 9,991) veces superior en aislados L/B que en aislados R/A. Cuando analizamos la cinética de replicación R/A, la frecuencia de aparición de aislados virales R/A fue 1,60 (IC95%: 0,956 a 2,702) veces superior en los niños VIH que tuvieron carga viral mayor de 5,5 log₁₀.

Relación entre la carga viral y el porcentaje de células T CD4+

Realizamos un análisis de correlación de Pearson entre el porcentaje de células T CD4+ y el log₁₀ de la carga viral, encontrando un coeficiente de correlación de 0,561 ($p=0,006$). Al realizar un análisis de regresión lineal, encontramos una pendiente de -6,643 (IC95%: -12,815 a -0,471), indicando que existe una relación inversa y estadísticamente significativa. Por cada log₁₀ que aumenta la carga viral, observamos una disminución de -6,643 del porcentaje de células T CD4. Cuando realizamos el mismo análisis teniendo en cuenta los valores normales según la edad del niño (Z-score del porcentaje de células T CD4+), también encontramos un coeficiente de correlación de Pearson significativo ($r=0,445$, $p=0,014$) y una pendiente de -3,015 (IC95%: -5,365 a -0,666). Realizamos el mismo análisis teniendo en cuenta el log₁₀ del número de células T CD4+ y

la carga viral igualmente normalizada en \log_{10} realizada, encontrando de nuevo un coeficiente de correlación estadísticamente significativa ($r=0,534$, $p=0,002$) y una pendiente de $-0,266$ (IC95%: $-0,459$ a $-0,074$). Sin embargo, cuando realizamos este análisis para el Z-score del número de células CD4+ de los niños VIH ajustados según la edad, el valor del coeficiente de correlación de Pearson y la pendiente no fueron significativos ($r=0,288$, $p=0,122$). Para el \log_{10} del cociente CD4/CD8 frente al \log_{10} CV, el coeficiente de correlación de Pearson fue de $0,576$ ($p=0,004$) y la pendiente de $-0,190$ (IC95%: $-0,338$ a $-0,042$).

Efecto del fenotipo viral en la relación entre \log_{10} CV y células CD4+

Para evaluar el efecto del fenotipo de los aislados virales en la relación entre el porcentaje de células T CD4+ frente a la carga viral, hemos realizado un análisis de covarianza (ANCOVA), que permite calcular la diferencia entre las medias del porcentaje de células T CD4+ del grupo de niños con aislados virales con fenotipo IS y NIS. Encontramos que los niños VIH+ con aislados IS tenían una media del porcentaje de células T CD4+ de $12,355$ (IC95%: $2,336$ a $22,373$) más baja que los niños con aislados NIS ($R^2=0,463$, $p=0,001$) (Fig. 1). Cuando realizamos el ANCOVA para los Z-score del porcentaje de células T CD4+, los niños VIH con aislados IS tenían una media que se encontraba $4,530$ desviaciones estándar (IC95%: $0,448$ a $8,613$) más baja que los niños con aislados NIS ($R^2=0,333$, $p=0,005$) (Fig. 1).

Discusión

La infección primaria por el VIH-1 presenta una cinética diferente en neonatos y adultos⁽¹⁾. En niños, la fase de infección aguda es más prolongada que en adultos, y el valor de la carga viral más alto. Además, después de la primoinfección la carga viral en adultos disminuye normalmente a valores muy bajos, mientras que en niños suele permanecer elevada^(2-3,11-17).

En adultos infectados por el VIH-1, la carga viral y el número absoluto de linfocitos CD4+ se utilizan como marcadores habituales de progresión a SIDA. Sin embargo, tal como indica este estudio transversal, hay niños menores de 5 meses de edad con alta carga viral que no evolucionaron a SIDA y niños con alta carga viral que tuvieron SIDA; de hecho, no hay diferencias en las medias de carga viral entre ambos grupos de niños VIH. La edad del niño es un factor muy importante a tener en cuenta al estudiar los diferentes marcadores inmunológicos, ya que aunque existe una buena correlación entre carga viral alta y número absoluto de linfocitos CD4+ bajos, esta correlación disminuye al estandarizar el número de linfocitos CD4+ de los niños VIH según la edad con niños sanos no VIH de su misma edad (Z-score CD4+)⁽⁶⁻⁷⁾. Nuestros datos indican que en niños es más preciso utilizar el porcentaje de linfocitos T CD4+, porque la correlación entre los diferentes marcadores se mantiene estadísticamente significativa para los valores estandarizados y sin estandarizar respecto a la edad del niño. En concordancia

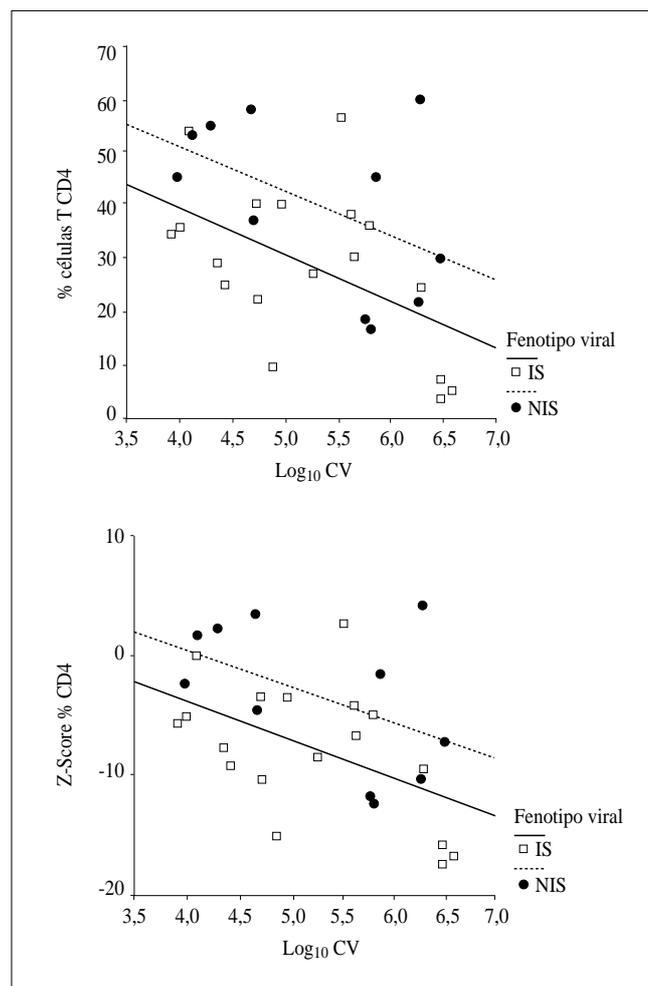


Figura 1. Relación del fenotipo de los aislados entre el porcentaje de células T CD4+ y la carga viral.

con otros estudios, cuando analizamos la relación entre carga viral y porcentaje de células CD4, encontramos una relación inversa y estadísticamente significativa, con un descenso de la media de $-6,643$ (IC95%: $-12,815$ a $-0,471$) del porcentaje de células CD4+ y de $-0,266$ (IC95%: $-0,459$ a $-0,074$) del \log_{10} del número de células CD4+ por cada \log_{10} de carga viral que aumenta^(11,22).

Cuando analizamos las diferentes propiedades biológicas de los aislados virales, encontramos una correlación positiva entre cinética de replicación R/A y fenotipo IS, lo que sugiere una tendencia de las dos características virológicas a aparecer juntas^(18,24). Además, observamos una asociación positiva entre aislados virales con cinética de replicación R/A y carga viral elevada, pero dicha asociación no apareció entre cepas con fenotipo IS y carga viral elevada, estos datos sugieren que los aislados virales con cinética R/A tienen mayor capacidad replicativa y por ello encontramos mayor carga viral plasmática, comportándose como dos marcadores virológicos que indican lo mismo.

Varios estudios sugieren que la mayor parte de los virus implicados en la transmisión del VIH-1 tienen un fenotipo NIS⁽²⁵⁾. En nuestro estudio encontramos un 62% de niños con aislados virales con fenotipo IS, la mayoría de los cuales desarrollaron SIDA, lo que podría indicar, que aunque las cepas que transmitieron las madres fueron de fenotipo NIS, debido a que los neonatos tienen un sistema inmunológico inmaduro y no controlan de forma eficaz la replicación viral durante la primoinfección^(11-12,26), se producirían rápidamente variantes IS, que se comportan como un marcador de progresión a SIDA. Por el contrario, los niños VIH+ que mantuvieron aislados NIS durante la primoinfección no evolucionaron clínicamente o tardaron más tiempo en progresar a SIDA. En concordancia con estos datos observamos que los niños que tuvieron aislados virales IS tuvieron un descenso de la media del porcentaje de células CD4+ mayor (12,355%) que los niños que mantuvieron aislados virales NIS. Además, no encontramos diferencias significativas en los valores de carga viral, linfocitos CD4+ y CD8+ entre los niños VIH+ con aislados IS y NIS, ni tampoco entre los niños VIH+ con aislados con cinética R/A y L/B, lo que vuelve a sugerir que la respuesta inmunológica en un período temprano de la infección no controla eficientemente la replicación viral. Es necesario realizar estudios de seguimiento para analizar la evolución clínica, y en qué momento se estabilizan los valores de carga viral. Sin embargo, nuestros datos indican que el estudio de los aislados virales en el período de la primoinfección proporciona información adicional a la obtenida con otros marcadores de uso habitual en la clínica, como la carga viral y el porcentaje de linfocitos T CD4+. De hecho, este marcador biológico, podría diferenciar de forma temprana a los niños VIH+ que progresaran de forma rápida de los niños VIH+ que progresaran más lentamente o no progresores.

Agradecimientos

A José María Bellón Cano por la realización del análisis estadístico y a Dolores García Alonso y Angela Puché-Torres por su excelente labor técnica.

Bibliografía

- Schrager LK, Young JM, Fowler MG, et al. Long-term survivors of HIV-1 infection: definitions and research challenges. *AIDS* 1994; **8**:5095-5108.
- Mellors JW, Muñoz A, Giorgi JV, Morgolick JB, Tassoni CJ, Gupta P. 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, Benorts, et al. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocytes counts and the risk of progression to AIDS. *N Engl J Med* 1996; **334**:426-431.
- Carpenter CC, Fischl MA, Hammer SM, Hirsch MS, Jacobson DM, Katzenstein DA et al. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1996: recommendations of an international panel. *JAMA* 1996; **276**:146-154.
- Gazzard BG, Moyle GJ, Weber J, Johnson M, Bingham JS, Brettle R, et al. British HIV Association guidelines for antiretroviral treatment of HIV seropositive individuals. *Lancet* 1997; **349**:1086-1092.
- Wade AH, Ades AE, Dunn D, et al. Age-related standards for lymphocyte subsets based on uninfected children born to HIV infected women. *The European Collaborative Study Pediatric Infect Dis J* 1992; **11**:1018-1026.
- Blanches S, Newell M, Mayaux M, Dunn AT, Teglas JP, Rouzioux C, et al. Morbidity and mortality in European Children vertically infected by HIV-1: The French prospective study and the European collaborative study. *J Acquir Immune Def Syndr* 1997; **14**:1442-1450.
- De Rossi A, Masiero S, Giaquinto C, Rugo E, Conor M, Giaca M, et al. Dynamics of viral replication in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Clin Invest* 1996; **97**:323-330.
- Palumbo PE, Kwok S, Waters S, Wesley Y, Lewis D, Mekinney N, et al. Viral measurement by polymerase chain reaction-based assays in human immunodeficiency virus-infected infants. *J Pediatr* 1995; **126**:592-595.
- McIntosh K, Shevitz A, Zaknun D, Kornegoy J, Ctiotis P, Korttias N, et al. Age- and time-related changes in extracellular viral load in children vertically infected by human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis J* 1996; **15**:1087-1091.
- Mofenson LM, Korelitz J, Meyer WA III, Bethel J, Rich K, Pahwa S, et al. The relationship between serum HIV-1 RNA levels, CD4 lymphocyte percent, and long-term mortality risk in HIV-1 infected children. *J Infect Dis* 1997; **175**:1029-1038.
- Shearer WT, Quinn TC, La Russa P, Lew JF, Mofenson L, Almy S, et al. Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1997; **336**:1337-1342.
- Cowles MK, HIV Collaborative Retrovirology Perinatal Group USA. HIV detection, virus load, and disease progression in perinatally infected infants. In: 12th World AIDS Conference Book. Geneva (Switzerland), June 28-July 3, 1998. Copyright 1998 by Monduzzi Editore S.P.A.-Bologna (Italy). 2:25-28.
- Palumbo PE, Raskino C, Fiscus S, Pahwa S, Fowler MG, Spector SA, et al. Predictive value of quantitative plasma HIV RNA and CD4+ lymphocyte count in HIV-1 infected infants and children. *JAMA* 1998; **11**:279:756-761.
- Dickover RE, Dillon M, Leung KM, Krogstad P, Plaeger S, Kwok S. Early prognostic indicators in primary perinatal human immunodeficiency virus type 1 infection: importance of viral RNA and the timing of transmission on long-term outcome. *J Infect Dis* 1998; **178**:375-387.
- Valentine ME, Jackson CR, Vavro C, et al. Evaluation of surrogate markers and clinical outcomes in two-years follow-up of eighty-six human immunodeficiency virus-infected pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J* 1998; **17**:18-23.
- Muñoz-Fernández MA, Resino S, Navarro J, et al. High viral load in children long-term non progressor vertically infected with HIV-1. Immunologic characterization. In: 12th World AIDS Conference Book. Geneva (Switzerland), June 28-July 3, 1998. Copyright 1998 by Monduzzi Editore S.P.A.-Bologna (Italy). 2:45-49.
- Muñoz-Fernández MA, Obregón E, Navarro J, Borner C, Gurbindo MD, Sampelayo TH, Fernández-Cruz E. Relationship of Virological, Immunological, and Clinical Parameters in Infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *Paediatric Research* 1996; **40**:597-602
- Balotta C, Vigano A, Riva C, Colombo MC. HIV type 1 phenotype correlates with the stage of infection in vertically infected children. *AIDS Res Hum Retrovir* 1996; **12**:1247-1253.

- 20 Muñoz-Fernández MA, Navarro J, García Montes M, Cosin J, Zabay JM, Fernández-Cruz. 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; **34**:404-408.
- 21 Center for Diseases Control and Prevention. Revised classification system for HIV-1 infection in children less than 13 years of age. *MMWR* 1994; **43**:1-13.
- 22 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**:F1-F8.
- 23 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**:60-64.
- 24 Muñoz-Fernández MA, Navarro J, Obregón, Arias RA, Gurbindo MD, Sampelayo TH, et al. Immunological and virological markers of disease progression in HIV-1 infected children. *Acta Paediatr Suppl* 1997; **421**:46-51.
- 25 Spencer LT, Ogino MT, Danker WM, Spector SA. Clinical significance of human immunodeficiency virus type 1 phenotypes in infected children. *J Infec Dis* 1994; **169**:491-495.
- 26 Resino S, Gurbindo MD, Bellón Cano JM, Sánchez-Ramón S, and Muñoz-Fernández MA. Predictive markers of clinical outcome in vertically HIV-1 infected infants a prospective longitudinal study. *Pediatric Reserch* 1999 (aceptado).