



Manifestaciones clínicas y marcadores biológicos en la historia natural de la infección por el VIH-1 en niños infectados verticalmente. Estudio longitudinal

S. Resino^a, J.M. Bellón^a, J.L. Jiménez^a, D. Gurbindo^b y M.A. Muñoz-Fernández^a

^aServicio de Inmunología. ^bSección de Inmuno-Pediatría. Hospital Central Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

(*An Esp Pediatr* 2000; 52: 138-147)

Objetivo

Estudiar el valor predictivo de marcadores inmunológicos, virológicos y parámetros clínicos en la dinámica de progresión a muerte durante el seguimiento de una cohorte de 43 niños infectados por el VIH-1.

Pacientes y métodos

Estudio prospectivo en 43 niños infectados verticalmente por el VIH-1, menores de 12 meses de edad (rango, 0-11,80 meses) que no habían recibido tratamiento anti-retroviral en el momento de su inclusión en el estudio. La cinética de replicación y el fenotipo de los aislados virales se determinó por cocultivo en CMSP y en MT-2, respectivamente. La carga viral se cuantificó en plasma utilizando el método estandarizado de RT-PCR de Roche. Las subpoblaciones linfocitarias se determinaron por citometría de flujo.

Resultados

Realizamos un análisis multivariante de Cox, obteniendo un riesgo relativo de 6,42 (intervalo de confianza del 95%, 1,28-32,03); ($p = 0,023$) para los niños con una mediana de carga viral superior a $5 \log_{10}$ copias/ml y de 6,84 (intervalo de confianza del 95%, 1,52-30,69); ($p = 0,012$) para niños con cinética de replicación R/A. También estudiamos el valor predictivo de los síntomas clínicos y observamos que los síntomas con mayor valor predictivo de progresión a muerte fueron la encefalopatía progresiva (3,60 [IC 95%; 0,92-14,06; $p = 0,065$]) y la cardiopatía (6,29 [IC 95%; 1,59 - 24,85; $p = 0,008$]).

Conclusiones

Los marcadores inmunológicos y virológicos predictivos de progresión a muerte más importantes fueron la mediana de carga viral superior a $5 \log_{10}$ y los aislados vi-

rales con cinética de replicación R/A a lo largo del estudio. Además, la encefalopatía progresiva y la cardiopatía se comportaron como marcadores independientes predictivos de progresión a muerte.

Palabras clave:

VIH-1. Niños. Carga viral. Fenotipo biológico. Linfocitos T CD4⁺. Supervivencia. Marcadores pronósticos.

CLINICAL MANIFESTATIONS AND BIOLOGICAL MARKERS IN THE NATURAL HISTORY OF HIV-1 INFECTION. LONGITUDINAL STUDY

Objective

To study the relationship among clinical symptoms and biological markers as predictive value of progression to death in HIV-1 vertically infected infants.

Patient and methods

We carry out a prospective study in 43 HIV-1 infants with a mean age of 4.27 (range: 0-11.8 months). None of the infants' mothers had received any antiviral treatment during pregnancy. None of the infants were breastfed. They were routinely assessed for clinical symptoms during follow-up.

Results

Cox regression analysis was used to study the hazard ratio (HR) of progression to death. For the median viral load $> 5 \log_{10}$, the HR was 6.42 (95% CI, 1.28-32.03) ($p = 0.023$) and 6.84 (95% CI, 1.52-30.69) ($p = 0.012$) for biological phenotype of viral isolates with rapid replication and high titer (R/H-X4). We also study the predictive value of the clinical symptoms and we observe that the symptoms

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

Recibido en mayo de 1999.

Aceptado para su publicación en junio de 1999.

with more HR of progression to death were the progressive encephalopathy (3.60 [95% CI, 0.92-14.06; $p = 0.065$]) and the cardiopathy (6.29 [95% CI, 1.59-24.85; $p = 0.008$]).

Conclusions

Our data indicate that viral load $> 5 \log_{10}$ and biological phenotype R/H-X4 of virus isolates along the study are predictive markers of progression to death. In addition, the progressive encephalopathy and cardiopathy were also markers of progression death.

INTRODUCCIÓN

Existen distintos marcadores predictivos de la evolución de la infección por VIH-1. Actualmente, en individuos adultos positivos para el VIH-1 se utilizan el recuento de linfocitos T CD4⁺ y la carga viral como parámetros con valor predictivo de evolución clínica de la infección y para tomar decisiones terapéuticas sobre cuándo comenzar o cambiar una terapia antirretroviral¹⁻⁴. En niños existen varios estudios sobre el papel de la carga viral en la infección por el VIH-1, pero los grupos estudiados han sido muy heterogéneos e incluyen niños con progresión rápida y lenta de la misma, con un rango de edad que oscila desde días hasta 18 años y muchos de los niños recibieron tratamiento⁵⁻¹⁴. A pesar de estos estudios, es difícil establecer valores de la carga viral que puedan indicar el riesgo de progresión de la infección como se ha hecho en individuos adultos infectados por el VIH-1^{3,4}. Estudios realizados sobre el fenotipo biológico de los aislados virales en individuos adultos infectados por el VIH-1 demostraron que el fenotipo de los aislados virales era diferente entre individuos asintomáticos y en pacientes con sida¹⁵⁻¹⁷ y que un fenotipo inductor de sincitios (IS) se relacionaba con progresión clínica e inmunológica de la enfermedad¹⁸⁻²⁰.

En recién nacidos, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ aumenta con la edad, aunque no en el mismo grado²¹ que el descenso del porcentaje de linfocitos T CD4⁺. Aunque se ha reconocido la importancia de los linfocitos T CD8⁺ en el control de la infección por el VIH-1^{22,23}, pocos estudios han examinado el valor pronóstico del número de linfocitos T CD8⁺ en sangre periférica en individuos adultos infectados por el VIH²⁴⁻²⁶ y carecemos de este tipo de datos en niños con VIH. Un estudio de seguimiento en pacientes adultos hemofílicos con infección por el VIH-1 ha referido que el aumento del número absoluto de linfocitos T CD8⁺ predice precozmente el descenso de linfocitos T CD4⁺ y la progresión clínica de la infección por el VIH-1²⁴. Además, se ha demostrado que el aumento de subpoblaciones CD8-citotóxicas se asocia con progresión más lenta de la enfermedad²⁷.

La evolución natural de la enfermedad causada por la infección por el VIH depende del tipo de manifestaciones clínicas. El desarrollo de infecciones oportunistas, la encefalopatía y el retraso ponderoestatural se asocian con progresión rápida, mientras que la neumonía intersticial linfoide (NIL) y la parotiditis lo hacen a progresión más lenta²⁸⁻³¹.

Existen diferencias en las manifestaciones clínicas de la infección por el VIH-1 en el niño y en adulto. La mayoría de los casos de neumonía por *Pneumocystis carinii* aparece entre los 3 y los 6 meses de edad²⁸ y el 75% de los niños con esta infección tienen menos de un año. Esto, junto con la elevada mortalidad por esta entidad^{28,29}, convierten el primer año de vida del niño con infección por el VIH-1 en un período crítico. Se ha postulado que, a diferencia del adulto, en el que la neumonía por *P. carinii* se producía por reactivación o por infección, en el niño sería por primoinfección, lo que condicionaría la mayor gravedad del cuadro. Aunque también pueda aparecer en el adulto, la encefalopatía relacionada con el VIH es mucho más frecuente en el niño, y es una de las infecciones más características de la infección por el VIH en la infancia.

Las manifestaciones clínicas más allá del período neonatal también predicen la rapidez de la progresión de la enfermedad. La aparición de infecciones oportunistas, como neumonía por *P. carinii*, la encefalopatía, la candidiasis esofágica y el retraso ponderoestatural precoz se asocian con progresión rápida^{28,29}, mientras que la NIL y la parotiditis lo hacen con una evolución más lenta^{30,31}. En los últimos años, debido a la aplicación de nuevas terapias combinadas, se han producido cambios en la significación pronóstica, tanto en las manifestaciones clínicas como en los distintos marcadores biológicos de estas entidades. Hemos realizado un estudio del valor pronóstico de progresión a muerte de diversos marcadores virológicos, inmunológicos y manifestaciones clínicas en 43 niños infectados verticalmente por el VIH-1 menores de 12 meses de edad que no recibieron tratamiento antirretroviral al ser incluidos en el estudio.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

Entre enero de 1991 y junio de 1996, 106 niños menores de 12 meses de edad nacidos de madres seropositivas para el VIH-1 ingresaron en la Sección de Inmuno-Pediatría del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid. El factor de riesgo de transmisión fue por vía vertical en los 106 niños. Todos fueron positivos para anticuerpos anti-VIH al nacimiento. De estos 106 niños, fueron diagnosticados como infectados por el VIH-1 43, utilizando métodos de detección directa del mismo (ADN-PCR y cultivo viral)¹⁴. Ningún niño recibió terapia antirretroviral al nacer, ni tampoco recibieron sus

madres durante el embarazo. En todos los casos obtuvimos el consentimiento de los padres o de los representantes legales para la realización del estudio. Ninguno de los niños recibió lactancia materna.

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.)¹⁵ usando el programa de adquisición Lysis II (Becton-Dickinson, San José C.A., EE.UU.) dentro de las 2 h siguientes a la tinción de las células.

Cinética de replicación de los aislados virales

Se cocultivaron 2×10^6 CMSP del paciente con 2×10^6 CMSP de un donante sano previamente estimuladas durante 48 h con fitohemaglutinina (PHA, Wellcome), en placas de 24 pocillos con 2 ml de medio RPMI suplementado con un 20% de FCS y 20 U/ml de interleucina 2 (IL-2). Semanalmente se añadieron 2×10^6 de blastos en 1 ml de medio fresco, y dos veces por semana se recogieron los sobrenadantes para determinar la concentración de antígenos (Ag) p24. La detección y cuantificación de Ag p24 se realizó mediante un análisis comercial de enzimoanálisis tipo "sandwich" para la detección de antígenos asociados al virus VIH-1 (innotest HIV Antigen mAb, innogenetics).

La cinética de replicación se consideró rápida cuando en el cocultivo se detectaron valores de Ag p24 el día 3 después del inicio del cultivo y lenta si los valores de Ag p24 no se detectaron hasta pasados 7 o más días del cocultivo celular. Se consideró cinética de replicación alta si en el cocultivo los valores de Ag p24 eran persistentemente altos (> 500 pg/ml) y baja si estaban por debajo de 500 pg/ml³².

Fenotipo de los aislados virales

Se cocultivaron 2×10^6 de CMSP del paciente con 2×10^6 CMSP de un donante sano previamente estimuladas con PHA (blastos) en placas de 24 pocillos con 2 ml de medio RPMI suplementado con un 20% de FCS y 20 U/ml de IL-2. Semanalmente se añadieron 2×10^6 de blastos en 1 ml de medio fresco, y dos veces por semana se observó por microscopía de contraste de fase la aparición de células sincitiales en el cultivo. Para la determinación del fenotipo viral de las cepas obtenidas de los pacientes estudiados, utilizamos la línea celular MT-2. Estas células expresan el receptor del VIH CD4 y el correceptor CXCR4 pero no expresan CCR5, por lo que se utiliza para diferenciar las cepas X4 (que utilizan CXCR4) de las cepas R5 (que utilizan CCR5). Se cultivaron las MT-2 a una concentración de 5×10^5 de células por ml. Cuando las células estaban en fase de creci-

miento exponencial se utilizaron para la realización del análisis. Se cultivaron 2×10^5 células MT-2 por pocillo en una microplaca de 24 pocillos. Las células se incubaron con sobrenadantes provenientes del cultivo de aislamiento del virus (1 ml) o con CMSP obtenidas del cocultivo. Cada ensayo se realizó por duplicado. Cada 3-4 días se reemplazó la mitad del medio por medio completo fresco y se midieron los valores de Ag p24. Las células MT-2 tienen la capacidad de producir sincitios cuando son infectadas por el VIH, por lo que podemos seguir la infección de los mismos por microscopía de contraste de fase. Se consideraron como cepas X4 o inductoras de sincitios, los cultivos en los que en el microscopio se observaban células multinucleadas gigantes o sincitiales y tenían valores de Ag p24 detectables³². En todos los cultivos utilizamos como cepas de referencia del VIH-1 con fenotipo claramente definido, la cepa pNL del tipo X4 y la cepa BAL del tipo R5.

Cuantificación de ARN viral por RT-PCR

Los valores de ARN viral en el plasma de los pacientes pediátricos se cuantificaron usando un análisis comercial (Amplicor-HIV Monitor™ Test, Roche Diagnostic System), aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) de los EE.UU. para monitorización de carga viral en mayo de 1996²⁰.

Análisis estadístico

Los valores de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ se expresaron en porcentaje y en células/ μ l. 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 positivas para el VIH, que fueron tomados como controles (*Z-score*). En todos los análisis, los valores de carga viral en sangre periférica se transformaron en logaritmo en base 10 para normalizarlos.

Las diferencias de las características inmunológicas y virológicas de los niños al ser incluidos en el estudio, entre los que no progresaron y los que progresaron a muerte, se realizó por el análisis exacto de Fisher (variables dicotómicas) y con la prueba de la t de Student para muestras independientes (variables continuas). La asociación entre variables fue medida por el análisis no paramétrico de correlación de Spearman.

Clasificamos a los niños positivos para el VIH según las características biológicas del virus a lo largo del estudio en dos grupos: niños con aislados virales con cinética de replicación rápida/alta (R/A), que mantenían una cinética de replicación R/A durante todo el seguimiento, y niños con aislados virales con cinética de replicación lenta/baja (L/B), que fueron L/B durante todo el seguimiento o que cambiaron en algún momento a cinética de replicación R/A a lo largo de todo el estudio, pero volvieron a la cinética de replicación L/B. En el ca-

TABLA 1. Características clínicas de los 43 niños infectados por el VIH-1 a su inclusión en el estudio

Síntoma	n	(%)
Adenopatías	26	61,9
Otitis	5	11,9
Candidiasis	14	34,1
Cardiopatía	5	11,9
Diarrea crónica	8	19
Encefalopatía progresiva	3	7,1
Esplenomegalia	13	31
Hepatitis	7	16,7
Hepatomegalia	7	16,7
Neumonía	6	14,6
NIL	5	11,9
Sepsis	6	14,3

n: número de niños que presentaron el síntoma descrito al ser incluidos en el estudio; NIL: neumonía intersticial linfóide.

so del fenotipo viral, tenemos a niños con fenotipo viral inductor de sincitios (IS-X4) y niños con fenotipo viral no inductor de sincitios (NIS-R5), siguiendo el mismo criterio que para la cinética de replicación. Para el porcentaje de linfocitos T CD4⁺, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ y la carga viral hemos elegido el valor de la mediana de todos los datos de cada marcador, para cada niño durante el seguimiento, como el dato más indicativo del valor de porcentaje de CD8 y carga viral durante el estudio. Seleccionamos el punto de corte del 20% de CD8 y 5 log₁₀ de carga viral. También clasificamos a los niños según la presencia de síntomas durante el seguimiento: cardiopatía, encefalopatía progresiva, infecciones oportunistas, sepsis, hepatitis, NIL, neumonía, candidiasis o diarrea crónica.

Determinamos la supervivencia por el método de Greenwood, usando las curvas de Kaplan-Meier. Las diferencias entre los grupos formados se determinaron por el análisis de rangos logarítmicos (Mantel-Haenzel) con un nivel de significación inferior a 0,05. El riesgo de progresión a muerte asociado al fenotipo viral, cinética de replicación y carga viral antes del año de vida se estimó utilizando el modelo de riesgos proporcionales de Cox³³.

RESULTADOS

Características clínicas, inmunológicas y virológicas de la serie de 43 niños al ser incluidos en el estudio

Realizamos un estudio prospectivo de seguimiento a 43 niños diagnosticados con infección por el VIH-1, 14 niños y 29 niñas, con una edad media al ser incluidos en el estudio de 4,27 meses (intervalo de confianza [IC] 95%, 3,25-5,28) (rango, 0-11,80 meses). La duración media del seguimiento fue de 24,91 ± 1,12 meses (rango, 1-82,77 meses). El número medio de estudios realizados a cada niño fue de seis (rango, 2-19 estudios).

De los 43 niños estudiados, 19 se encontraban en categoría clínica e inmunológica A1, siete en categoría B1, cuatro en categoría C1, seis en categoría A2, tres en categoría C2, dos en categoría B3 y dos en categoría C3. En la [tabla 1](#) se describen las características clínicas de los 43 niños infectados por el VIH-1 al ser incluidos en el estudio. El 83,7% (34 niños) recibieron terapia antirretroviral en algún momento del estudio de seguimiento; los 7 niños que no recibieron terapia antirretroviral permanecieron asintomáticos a lo largo del estudio.

Estudiamos el efecto de la influencia de los marcadores inmunológicos y virológicos a la inclusión en el estudio, según la dinámica de supervivencia de la serie de los 43 niños infectados por el VIH-1 ([tabla 2](#)). No en-

TABLA 2. Características inmunológicas y virológicas a la inclusión en el estudio, según la dinámica de supervivencia en la serie de 43 niños estudiados

Marcador	No progresión a muerte*	Progresión a muerte*
Características inmunológicas		
Porcentaje CD4 (± EE)	34,55 ± 2,93	30,37 ± 4,202
Porcentaje CD8 (± EE)	23,24 ± 2,13	18,78 ± 3,88
Cociente CD4/CD8 (± EE)	2,03 ± 0,31	2,46 ± 0,73
Características virológicas		
Carga viral		
Copias/ml (± EE)	617.818 ± 263.926	635.420 ± 296.183
Log ₁₀ copias/ml(± EE)	4,93 ± 0,19	5,27 ± 0,26
Fenotipo		
NIS-R5 (n = 20)	18	2
IS-X4 (n = 20)	11	9
Cinética		
L/B (n = 22)	19	3
Replicación		
R/A (n = 18)	10	8

n: número de niños infectados por el VIH-1; NIS-R5: aislados virales con fenotipo no inductor de sincitios; IS-X4: aislados virales con fenotipo inductor de sincitios; L/B: aislados virales con cinética de replicación lenta/baja; R/A: aislados virales con cinética de replicación rápida/alta. *sin progresión o progresión a muerte al finalizar el estudio.

TABLA 3. Riesgo de progresión a muerte calculado por análisis de regresión de Cox para una sola variable

	HR	IC del 95%	p
Marcadores			
T CD8 < 20%	0,18	0,04-0,68	0,0294
Carga viral > 5 log ₁₀	5,62	1,47-21,48	0,0073
R/A	8,75	2,12-36,12	0,0027
IS-X4	7,46	1,50-37,16	0,0141
Síntomas			
Cardiopatía	9,15	2,44-34,23	0,001
Encefalopatía progresiva	6,14	1,65-22,72	0,0066
Infecciones oportunistas	2,24	0,67-7,74	0,1882
Sepsis	3,13	0,94-10,46	0,063
Hepatitis	9,27	1,19-72,11	0,0033
NIL	0,981	0,26-3,08	0,817
Neumonía	4,95	1,08-22,61	0,039
Candidiasis	3,54	0,45-27,50	0,2263
Diarrea persistente	1,49	0,40-5,54	0,5502

IS-X4: aislado viral inductor de sincitios; R/A: aislado viral con cinética de replicación rápida/alta; NIL: neumonía intersticial linfoide.

contramos diferencias entre los valores del porcentaje de linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺, cociente CD4/CD8 y de la carga viral cuando los niños fueron incluidos en el estudio, según si los niños progresaron a muerte o no lo hicieron (tabla 2). Tampoco encontramos diferencias en los valores del porcentaje de células T CD4 y T CD8 cuando se estandarizaron respecto a los valores de estas subpoblaciones linfocitarias de niños controles sanos de la misma edad no infectados por el VIH. Sin embargo, sí encontramos diferencias en las características biológicas de los aislados virales al inicio del estudio (tabla 2), siendo más frecuente aislar virus con fenotipo NIS-R5 (p = 0,031) y cinética L/B (p = 0,04) en los niños que no progresaron a muerte y aislados con fenotipo IS-X4 y cinética R/A en los niños que progresaron a muerte. Al aplicar un análisis de correlación de Spearman observamos que el fenotipo IS y la cinética de replicación R/A presentaron una correlación positiva y estadísticamente significativa (p < 0,05) con la progresión a muerte. Los mismos resultados encontramos al analizar cepas IS con cepas X4 o cepas X4 con cinética R/A. También encontramos correlación significativa entre cinética de replicación R/A de los aislados virales, porcentaje de linfocitos T CD8 (r = -0,35) y carga viral alta (r = 0,467).

Valor predictivo de progresión a muerte de los marcadores analizados durante el estudio de seguimiento

Cuando analizamos como marcadores el porcentaje de células T CD4 y T CD8 no encontramos diferencias significativas en el tiempo de progresión a muerte se-

gún el valor de la mediana y distintos puntos de corte del porcentaje de linfocitos T CD4 en los 43 niños estudiados. Sin embargo, encontramos diferencias significativas en los tiempos de supervivencia de los niños según el valor del porcentaje de linfocitos T CD8 cuando situamos el punto de corte en el 20%. El tiempo medio de progresión a muerte fue menor cuando la mediana del porcentaje de células T CD8 fue inferior al 20% (17,57 meses [0-35,35; p = 0,002]). Cuando estudiamos a niños con porcentajes de células T CD8 superiores al 20% no se alcanzó el 50% de incidencia de progresión a muerte por el método de Kaplan-Meier y, por tanto, no tuvimos un valor para la mediana de tiempo de supervivencia. Al aplicar el análisis de regresión de Cox (tabla 3) obtuvimos un valor para la razón de riesgo (HR) de 0,18 (IC 95%, 0,04-0,68; p = 0,014), lo que indica que valores de la mediana del porcentaje de células T CD8 superior a 20% son *protectores* frente a la progresión a muerte. Calculando el inverso de la HR, la mediana del porcentaje de linfocitos T CD8 inferiores al 20% tuvo una HR de 5,55 (IC 95%, 1,47-25,0), lo que indica que niños con una mediana del porcentaje de linfocitos T CD8 inferior al 20% el riesgo de progresión a muerte es 5,55 veces superior respecto a los que tienen un valor de mediana del porcentaje de linfocitos T CD8 superior al 20%. Al realizar el análisis estadístico utilizamos el valor de la mediana de porcentaje de linfocitos T CD8 que presentaba cada niño; el valor de HR fue de 0,92 (IC 95%, 0,87-0,97; p = 0,002), que también indica que el incremento del porcentaje de linfocitos T CD8 actúa como factor protector de progresión a muerte.

Al analizar el valor pronóstico de la carga viral plasmática encontramos que los niños con un valor en la mediana de la carga viral superior a 5 log₁₀ copias/ml tuvieron un valor en la mediana del tiempo de supervivencia de 17,96 meses (IC 95%, 11,48-26,02). Es decir, el 50% de los niños con mediana de carga viral superior a 5 log₁₀ progresaron a muerte en aproximadamente 18 meses. No obtuvimos valor para la mediana del tiempo de supervivencia en los niños con carga viral inferior a 5 log₁₀ copias/ml. La HR para los niños con carga viral superior a 5 log₁₀ copias/ml fue de 5,62 (IC 95%, 1,47-21,48; p = 0,0073). Cuando estudiamos el valor de la mediana de la carga viral (log₁₀ copias/ml) de cada paciente, la HR fue de 3,05 (IC 95%, 1,15-6,17). La carga viral en la infección por el VIH-1 en niños es un factor de riesgo de progresión a muerte, ya que el valor de la HR fue superior a 1.

También investigamos el papel predictivo de las características biológicas de los aislados del VIH-1 a lo largo del estudio. Observamos que la mediana del tiempo de supervivencia para los niños que mantuvieron una cinética de replicación R/A durante todo el estudio de seguimiento fue de 17,57 meses (IC 95%, 0,00-39,57) y pa-

ra los niños que mantuvieron aislados del VIH-1 con fenotipo IS-X4 fue de 22,33 meses (IC 95%, 16,28-28,39). No pudimos calcular el valor de la mediana del tiempo de supervivencia para los niños que mantuvieron aislados con cinética L/B o fenotipo NIS-R5 durante todo el seguimiento. El valor de HR para los niños que tuvieron aislados con cinética de replicación R/A fue de 8,75 (IC 95%, 2,12-36,12; $p = 0,0027$) respecto a los niños que tuvieron cinética L/B durante el estudio y de 7,46 (IC 95%, 1,50-37,16; $p = 0,0141$) para los niños con aislados con fenotipo IS-X4 respecto a los niños que tuvieron aislados con fenotipo NIS-R5 durante el seguimiento.

Realizamos un análisis de regresión de Cox multivariante utilizando el método de selección "Backward" en el que se incluyeron todos los marcadores estudiados anteriormente (porcentaje de linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺, carga viral y características biológicas de los aislados virales), seleccionando como los marcadores más importantes y estadísticamente significativos la carga viral y la cinética de replicación. El valor de HR fue de 6,42 (IC 95%, 1,28-32,03; $p = 0,023$) para niños infectados por el VIH-1 con carga viral superior a $5 \log_{10}$ copias/ml y de 6,84 (IC 95%, 1,52-30,69; $p = 0,012$) para niños infectados por el VIH-1 que tuvieron aislados virales con cinética de replicación R/A.

Valor predictivo de los distintos síntomas clínicos presentados durante el estudio de seguimiento

Analizamos la posible asociación entre la supervivencia y los síntomas clínicos que presentaban los niños a lo largo del estudio (tabla 3). Encontramos diferencias significativas en el tiempo de supervivencia según presentaran cardiopatía, encefalopatía progresiva, hepatitis y neumonía ($p < 0,05$). En todos los casos analizados no obtuvimos el valor de la mediana por el método de Kaplan-Meier del tiempo de supervivencia de los niños que no presentaron el síntoma, porque la incidencia a muerte de estos niños fue inferior al 50%. La mediana del tiempo de supervivencia en los niños que desarrollaron cardiopatía fue de 12,14 meses (IC 95%, 4,01-20,26), de 17,96 meses (IC 95%, 8,26-27,67) para los que desarrollaron encefalopatía progresiva, de 22,33 meses (IC 95%, 13,81-30,85) para los que tuvieron hepatitis y de 23,53 meses (IC 95%, 13,40-33,66) para los que presentaron neumonía.

También valoramos el riesgo de progresión a muerte por análisis de regresión de Cox, y encontramos que el *hazard ratio* (HR) fue mayor en los niños que presentaron cardiopatía y hepatitis (tabla 4). Cuando se realizó una análisis de regresión múltiple utilizando el método de selección "Backward" para los diferentes síntomas mencionados, encontramos que los dos síntomas más predictivos de progresión a muerte fueron la encefalopatía progresiva (3,60 [IC 95%, 0,92-14,06; $p = 0,065$]) y la cardiopatía (6,29 [IC 95%, 1,59-24,85; $p = 0,008$]).

DISCUSIÓN

En este estudio hemos analizado de forma prospectiva la evolución de distintos marcadores inmunológicos, virológicos y clínicos de la historia natural de la infección por el VIH-1 en una serie de 43 niños infectados verticalmente por el VIH-1 menores de 12 meses de edad, que no fueron tratados con antirretrovirales durante el período neonatal, ni sus madres durante el embarazo.

En niños sanos no infectados por el VIH, el número absoluto y el porcentaje de células T CD4⁺ disminuyen con la edad³⁵. No encontramos diferencias significativas entre el porcentaje de células T CD4⁺ a la inclusión en el estudio, independientemente de que los niños progresaran o no a muerte. En concordancia con nuestros datos, en niños recién nacidos infectados por el VIH-1 e independientemente de la evolución de la infección, se observan⁹ valores elevados de linfocitos T CD4⁺. El número de linfocitos T CD8⁺ no está considerado, en general, como un buen marcador de progresión de la infección por el VIH-1. Sin embargo, un estudio de seguimiento realizado en pacientes hemofílicos con infección por el VIH-1 ha referido que el aumento del número absoluto de linfocitos T CD8⁺ predice precozmente el descenso de linfocitos T CD4⁺ y la progresión clínica de la infección por el VIH-1³⁶. Los datos obtenidos en nuestro estudio de seguimiento de los niños infectados por el VIH-1 concuerdan con este estudio e indican que los linfocitos T CD8 son un marcador de progresión de la infección por el VIH-1 (fig. 1), ya que cuando los niños de nuestra cohorte tenían porcentaje de linfocitos T CD8 inferior al 20% presentaban un mayor riesgo de progresión a muerte (5,55 [IC 95%, 1,47-5,0]).

Se han realizado estudios longitudinales de carga viral desde el nacimiento en niños con infección perinatal, incluyéndose de forma arbitraria niños con progresión lenta y rápida de la infección¹¹⁻¹³. En nuestro trabajo, utilizando el punto de corte analizado como el de mayor sensibilidad, $5 \log_{10}$, encontramos que niños con carga viral superior a $5 \log_{10}$ copias/ml progresaron a muerte más rápidamente (17,96 meses [IC 95%, 11,48-26,0]), que niños que tuvieron carga viral inferior a $5 \log_{10}$ (copias/ml). Mofenson et al encontraron que la carga viral en niños menores de 2 años de edad sólo se correlacionaba con un aumento de mortalidad cuando era superior a 1.000.000 de copias/ml⁸; estos datos no son, sin embargo, comparables con los nuestros, ya que el seguimiento de los niños se lleva a cabo con un método de cuantificación de carga viral diferente.

En el ensayo IVIG, realizado en suero de pacientes pediátricos infectados perinatalmente³⁷, se encontró un rango de carga viral amplio desde menos del 4.000 a 32.000.000 copias/ml. La carga viral basal en este grupo de niños (al menos 105.000 copias/ml) fue significativamente más alta que la observada en individuos adul-

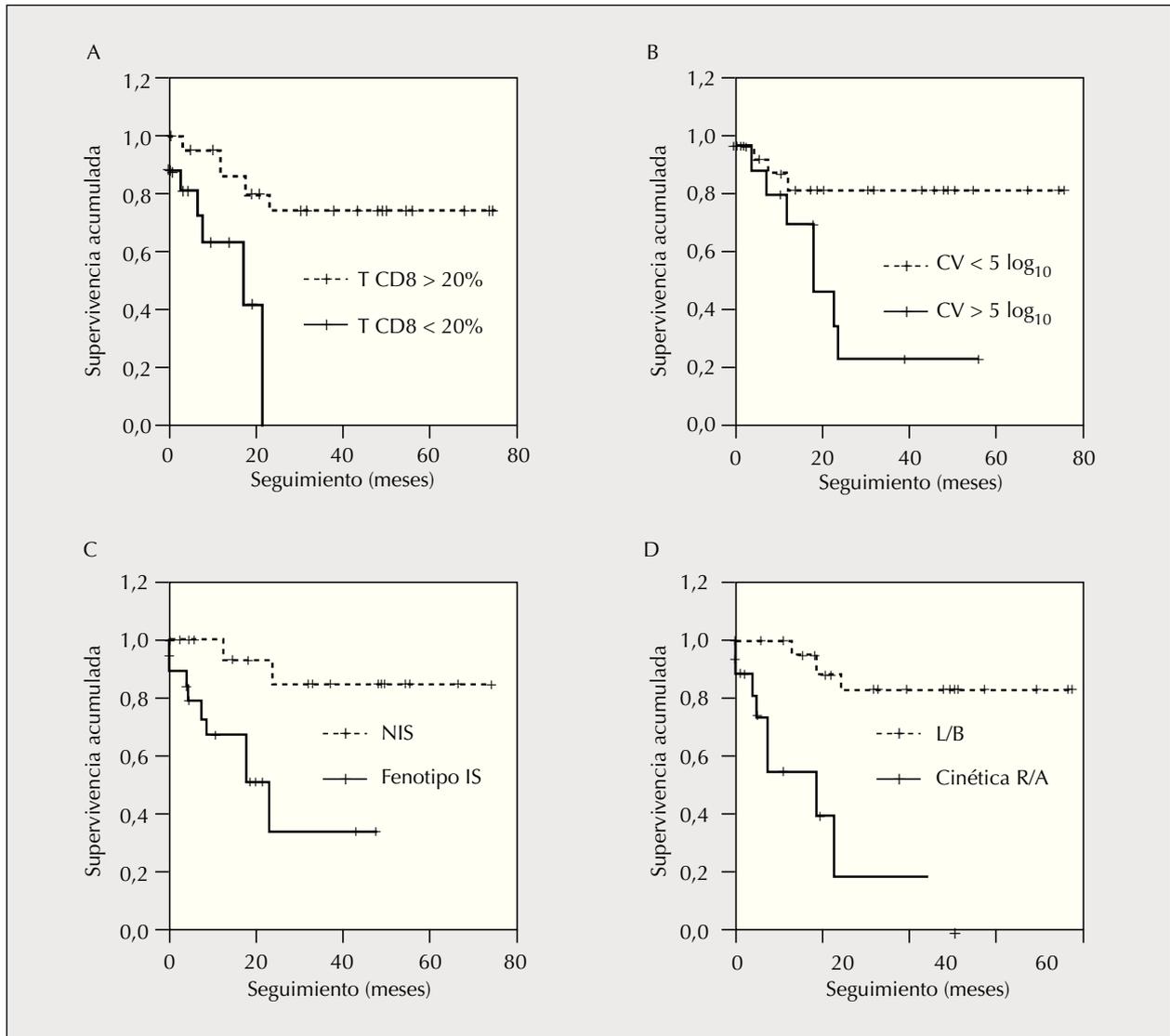


Figura 1. Curvas de supervivencia para los marcadores inmunológicos y virológicos a lo largo del estudio; CV: carga viral (copias/ml); R/A: niños con aislados virales con cinética de replicación rápida/alta durante todo el seguimiento; L/B: niños con aislados virales con cinética de replicación lenta/baja, que fueron L/B durante todo el seguimiento o cambiaron en algún momento a cinética de replicación R/A a lo largo de todo el estudio, pero volvieron a la cinética de replicación L/B; IS: niños con fenotipo viral inductor de sincitios; NIS: niños con fenotipo viral no inductor de sincitios.

tos infectados por el VIH-1 con una duración similar de la infección de 3 a 4 años, lo que concuerda con nuestros datos. En el estudio IVIG³⁷ los niños fueron seguidos durante más de 5 años, lo que permitió evaluar, al igual que en nuestro trabajo, la asociación entre carga viral, porcentaje de linfocitos T CD4 y evolución clínica. Valores basales elevados de carga viral se relacionaron con mayor riesgo de mortalidad infantil, similar a lo observado entre individuos adultos infectados por el VIH-1. En nuestro estudio, los valores de carga viral y el porcentaje de linfocitos T CD8 fueron marcadores predictivos de riesgo de mortalidad en niños. Dependiendo de si la carga viral era menor o mayor de $5 \log_{10}/\text{ml}$ y si el

porcentaje de linfocitos T CD8 era mayor o menor del 20% el valor predictivo a muerte fue mayor o menor (tabla 3 y fig. 1). Ambos marcadores deben tenerse en cuenta para tomar decisiones respecto a la terapia y evaluación de respuesta a agentes antirretrovirales.

Estudios previos realizados en niños infectados por el VIH han demostrado la asociación entre la evolución de esta infección y algunos marcadores de pronóstico clínico e inmunológico⁴³, pero pocos correlacionan la evolución clínica con las características del aislado viral^{19,20,45-46}. Estudios recientes han demostrado que las propiedades biológicas del VIH-1 en niños eran similares a las encontradas en adultos y que el fenotipo viral

se correlacionaba con la progresión de la enfermedad en niños infectados verticalmente^{18,21,39,45}. Nuestros datos indican claramente que la presencia de aislados virales con fenotipo IS-X4 (7,46 [IC 95%, 1,50-37,16]) o cinética R/A (8,75 [IC 95%, 2,12-36,12]) se asocia significativamente a progresión a muerte. Estos datos sugieren que las características biológicas del VIH-1 poseen un mayor poder predictivo que la carga viral en niños infectados por el VIH-1.

Además, analizando la relación entre la aparición de cepas virales citopáticas y la progresión clínica de la infección por el VIH-1, encontramos que la posibilidad de progresar a muerte en niños con aislados IS-X4 o cinética R/A fue mayor que en niños que no presentaron dicho fenotipo biológico (tabla 3 y fig. 1). Cuando utilizamos un análisis de regresión de Cox univariante, encontramos que el riesgo de progresión a muerte fue superior cuando se aislaba un virus con fenotipo IS-X4 o cinética R/A, células T CD8⁺ inferiores al 20% y carga viral superior al 5 log₁₀. Sin embargo, al realizar, en el análisis de regresión de Cox multivariante, los marcadores más importantes de progresión a muerte fueron la cinética R/A (6,84 [IC 95%, 1,52-30,69]) y la carga viral superior a 5 log₁₀ (6,42 [IC 95%, 1,28-32,03]).

La sintomatología clínica de los 43 niños en seguimiento en el momento del diagnóstico de infección por el VIH-1 fue inespecífica, presentando como síntomas más frecuentes adenopatías (61,9%), candidiasis oral (34,1%) y esplenomegalia (31%). Uno de los pacientes no presentó a lo largo del período de seguimiento ninguna de estas manifestaciones clínicas, y permanecía completamente asintomático. Estos datos se superponen a los de Blanche⁴⁷ y a los del grupo italiano⁴⁸. En el análisis de regresión de Cox para una sola variable y multivariante de los diferentes síntomas clínicos de progresión a muerte se observó que la HR fue superior cuando apareció cardiopatía, hepatitis, encefalopatía progresiva y neumonía (tabla 3). Sin embargo, en el análisis multivariante los marcadores con mayor poder predictivo fueron la cardiopatía (6,29 [IC 95%, 1,59-24,85]) y la encefalopatía progresiva (3,60 [IC 95%, 0,92-14,06]).

La mortalidad global de nuestro grupo de 43 niños fue un 25,5% inferior a la encontrada por otros autores⁴⁹. La mortalidad más alta fue la de las series americanas, con un 80% en los niños que desarrollaron sida antes del año y un 55% en los que lo desarrollaron después⁵⁰. La mortalidad publicada por Scott en Miami fue del 44%⁵¹, la del Grupo Colaborativo Europeo del 29% y la del grupo italiano del 21%⁴⁷. Estas diferencias entre los distintos estudios realizados se deben a la recogida de datos, porque en las series americanas los primeros casos registrados eran todos niños que cumplían criterios de sida, mientras que los estudios prospectivos europeo e italiano siguieron a los niños desde el nacimiento, sin selección según criterios de sida.

De los 11 pacientes que fallecieron a lo largo del estudio, 10 desarrollaron una encefalopatía progresiva antes del año de vida; tres de estos niños tuvieron una infección oportunista antes de los 15 meses, el primero presentó una neumonía por *P. carinii* a los 2 meses y neumonía por *Candida* a los 3 meses, el segundo una neumonía por citomegalovirus a los 10 meses y el tercero una candidiasis sistémica y diarrea por *Cryptosporidium* a los 15 meses. Cuando aparece la encefalopatía progresiva, los niños presentan un cuadro de regresión psicomotora que les lleva a la muerte en un tiempo inferior a los 30 meses a pesar de los tratamientos con antirretrovirales. La encefalopatía progresiva y las infecciones oportunistas antes de los 12 meses de vida son marcadores clínicos de mal pronóstico.

En conclusión, en este estudio de niños infectados verticalmente, menores de 12 meses de edad, sin tratamiento antirretroviral a la entrada en el estudio, y teniendo en cuenta diferentes marcadores inmunológicos y virológicos a lo largo del mismo, las características biológicas del VIH-1 poseen un mayor poder predictivo de progresión a muerte que la carga viral. Ya que no se disponen de guías sobre cuándo comenzar el tratamiento antirretroviral en niños con progresión lenta de la infección, para indicar el comienzo de un tratamiento, además de las características clínicas de los niños y de las medidas seriadas de la carga viral y del número de linfocitos T CD4⁺, se deberían incorporar estudios de características biológicas de los aislados virales y tener en cuenta la edad del niño, ya que es un factor muy importante en la interpretación de estos parámetros. Además, nuestros datos sugieren que los linfocitos T CD8⁺ son otro marcador inmunológico independiente de supervivencia en niños. Así, de nuestros datos se deduce que se debe realizar el recuento de linfocitos T CD8⁺ como parte del seguimiento clínico de los niños infectados por el VIH-1, porque los cambios de este marcador en un estudio longitudinal, aparentemente, tienen valor pronóstico.

Agradecimiento

A Dolores García Alonso y Ángela Puché-Torres por su excelente labor técnica.

Este trabajo se ha realizado con la financiación del Programa Nacional de Salud (SAF 99-0022) y de la Comunidad de Madrid (08.5/0001/98).

BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. 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.

3. 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.
4. 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.
5. De Rossi A, Masiero S, Giaquinto C, Rugo E, Connor M, Giacca 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.
6. Palumbo PE, Kwok S, Waters S, Wesley Y, Lewis D, McKinney N et al. Viral measurement by polymerase chain reaction-based assays in human immunodeficiency virus-infected infants. *J Pediatr* 1995; 126: 592-595.
7. McIntosh K, Shevitz A, Zaknun D, Kornegoy J, Ctiotis P, Kortias 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.
8. 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.
9. 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.
10. Cowles MK, HIV Collaborative Retrovirology Perinatal Group USA. HIV detection, virus load, and disease progression in perinatally infected infants. En: 12th World AIDS Conference Book. Geneva (Switzerland), June 28-July 3, 1998. Bolonia: Monduzzi Editore S.P.A., 1998; 2: 25-28.
11. 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; 279: 756-761.
12. 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.
13. Valentine ME, Jackson CR, Vavro C, Wilfertom, Mc Clernon D, St. Clair M. 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.
14. 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. En: 12th World AIDS Conference Book. Geneva (Switzerland), June 28-July 3, 1998. Bolonia: Monduzzi Editore S.P.A., 1998; 2: 45-49.
15. Asjo BJ, Morfeldt-Manson L, Albert J, Biberfeld G, Karlsson A, Lidman K et al. Replicative properties of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet* 1986; 2: 660-662.
16. Tersmette M, Lange JM, De Goede RE, De Wolf F, Fefitink-Shattenkerk JK, Schellekens PT et al. Association between biological properties of human immunodeficiency virus variant and risk for AIDS mortality. *Lancet* 1989; 6: 983-985.
17. Tersmette MJMA, De Goede REY, Al BMJ et al. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol* 1988; 62: 2026-2032.
18. Tersmette MJMA, Gruters RA, De Wolf F, De Goede RE, Lange JM, Schellekens PT et al. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of AIDS obtained from studies on a panel of sequential HIV isolates. *J Virol* 1989; 63: 2118-2125.
19. Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Derksen MW, De Goede RE, Van Steenwijk RP et al. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of the disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 1992; 66: 1354-1360.
20. Nielsen C, Pedersen C, Lundgren JD, Gerstoft J. Biological properties of HIV isolates in primary HIV infection: consequences for the subsequent course of infection. *AIDS* 1993; 7: 1035-1040.
21. Denny Y, Yogeve R, Gelman R et al. Lymphocyte subsets in healthy children during the first 5 years of life. *JAMA* 1992; 267: 1484-1488.
22. Fauci AS, Schnittman SM, Poli G, Koenig S, Pantaleo G. Immunopathogenic mechanism in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med* 1991; 114: 678-693.
23. Lange JMA, De Wolf F, Goudsmit J. Markers for progression in HIV infection. *AIDS* 1989; 3: 153-160.
24. Philips AN, Sabin CA, Elford J et al. CD8 lymphocyte counts and serum immunoglobulin A levels early in HIV infection as predictors of CD4 lymphocyte depletion during 8 years follow-up. *AIDS* 1993; 7: 975-980.
25. Anderson RE, Shiboski SC, Royce R, Jewell NP, Lang W, Winkelstein W. CD8+ T-lymphocytes and progression to AIDS in HIV infected men: some observations. *AIDS* 1991; 5: 213-215.
26. Chevret S, Roquin H, Ganne P, Lefrère JJ. Prognostic value of an elevated CD8 lymphocyte count in HIV infection. Results of a prospective study of 152 asymptomatic HIV-positive individuals. *AIDS* 1992; 6: 1349-1352.
27. Levacher M, Hulstaer F, Tallet S et al. The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value. *Clin Exp Immunol* 1992; 90: 376-382.
28. Simonds RJ, Oxtoby MJ, Caldwell MB et al. Penumocistis carinii pneumonia among US children with perinatally acquired HIV infection. *JAMA* 1993; 270: 470-473.
29. Mayaux MJ, Burgard M, Teglas JP et al. Neonatal characteristics in rapidly progressive perinatally acquired HIV-1 disease. *JAMA* 1996; 275: 606-610.
30. Tovo PA, De Martino M, Gabino C et al. Long term Non-progressors among children with perinatal HIV- infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1997; 15 (Supl 1) 19-22.
31. Morrids C, Araba-Owoyele, Spector SA et al. Disease patterns and survival after acquired immunodeficiency syndrome diagnosis in human immunodeficiency virus infected children. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 321-328.
32. Muñoz-Fernández MA, Obregón E, Navarro J, Borner C, Gurbindo MD, Sampelayo TH et al. Relationship of Virological, Immunological, and Clinical Parameters in Infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatr Res* 1996; 40: 597-602.
33. Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc* 1972; 34: 187-220.
34. Englund JA, Baker CJ, Raskino C, McKinney RE, Petrie B, Fowler MG et al. Zidovudine, didanosine, or both as the initial treatment for symptomatic HIV-infected children. *N Engl J Med* 1997; 336: 1704-1712.
35. Mofenson LM, Bethel J, Moye J Jr, Flyer P, Nugent R. Effect of intravenous immunoglobulin (IVIg) on CD4+ lymphocyte decline in HIV-infected children in a clinical trial of IVIg infection prophylaxis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; Vol. 1103-1113.

36. Phillips AN, Sabin CA, Elford J et al. CD8 lymphocyte counts and serum immunoglobulin A levels early in HIV infection as predictors of CD4 lymphocyte depletion during 8 years follow-up. *AIDS* 1993; 7: 975-980.
37. Spector SA et al (ACTG). A controlled Trial of IVIG for prevention serious bacterial infections. *N Engl J Med* 1994; 331: 1181-1187.
38. Krivine A, Firtion G, Cao L, Francoual C, Henrion R, Lebon P. HIV replication during the first weeks of life. *Lancet* 1992; 339: 1187-1189.
39. Duliege AM, Messiah A, Blanche S, Tardieu M, Griscelli C, Spira A et al. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 infection in children: prognostic value of laboratory test on bimodal progression of the disease. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11: 630-645.
40. Pizzo PA, Wilfert CM, The Pediatric AIDS Siena Workshop II. Markers and determinants of disease progression in children with HIV infection. *J AIDS* 1995; 8: 30-44.
41. Mayaux MJ, Burgard M, Teglas JP, Cottalorda J, Krivine A, Simon F et al. Neonatal characteristics in rapidly progressive perinatally acquired HIV-1 disease. *JAMA* 1996; 275: 606-610.
42. Scarlatti G. Paediatric HIV infection. *Lancet* 1996; 348: 863-868.
43. Spencer LT, Ogino MT, Danker WM, Spector SA. Clinical significance of human immunodeficiency virus type 1 phenotypes in infected children. *J Infect Dis* 1994; 169: 491-495.
44. Koot M, Keet IP, Vos AH, De Goedere, Roos MT, Coutinho RA et al. Prognostic value of HIV-1 biological phenotype for rate of CD4+ count cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* 1993; 118: 681-688.
45. 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* 1997; 421: 46-51.
46. Balotta C, Colombo MC, Colucci G, Vigano A, Riva C, Papagno L et al. Plasma viremia and virus phenotype are correlates of disease progression in vertically human immunodeficiency virus type 1-infected children. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 205-211.
47. Blanche S, Veber F, Griscelli C et al. Epidemiologie et aspects cliniques de l'infection a HIV chez l'enfant. Toulouse: Berrebi, 1988.
48. Italian Multicentric study. Epidemiology, clinical features and prognostic factors of pediatric HIV infection. *Lancet* 1988; 2: 1043-1046.
49. 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 Syndrome* 1997; 14: 1442-1450.
50. Rogers MF, Ou CY, Kilbourne B, Schochetman G. Advances and problems in the diagnosis of human immunodeficiency virus infection in infants. *Pediatr Infect Dis* 1991; 10: 523-531.
51. Scott GB, Hutto C, Makuch RW et al. Survival in children perinatally acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1989; 321: 1791-1796.