

YÜKSEK DÜZEYDE AKTİF ANTİRETROVİRAL TEDAVİ ALAN HIV İLE ENFEKTE OLGULARDA ANTİ-R7V ANTİKORLARININ ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF ANTI-R7V ANTIBODIES IN HIV-INFECTED PATIENTS UNDER HIGHLY ACTIVE ANTIRETROVIRAL THERAPY

Koray ERGÜNAY¹, Akif ALTINBAŞ², Nursel ÇALIK BAŞARAN², Serhat ÜNAL²,
Dürdal US¹, Erdem KARABULUT³, Şemsettin USTAÇELEBİ¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (ekoray@hacettepe.edu.tr)

² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi, Ankara.

³ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

R7V, beta-2 mikroglobulinden köken alan ve enfekte kişilerde insan immünyetmezlik virusu (HIV) virionunun yüzeyinde bulunan yedi aminoasitlik bir peptiddir. R7V peptidine karşı oluşan antikorlar, genotipik varyantlar ya da hücre tropizmi gibi faktörlerden bağımsız olarak HIV'ı nötralize edebilmektedir. Anti-R7V antikorları saptanan kişilerde, HIV enfeksiyonu progresyonunun daha yavaş olduğu gösterilmiş ve bu epitopun aşı ya da tedavi amacıyla kullanılması gündeme gelmiştir. Bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi tarafından takip edilen ve HAART (yüksek düzeyde aktif antiretroviral terapi) tedavisi alan olgularda anti-R7V antikorlarının varlığı araştırılmıştır. Çalışmaya 33 HIV pozitif olgu ve 10 sağlıklı kontrol dahil edilmiş; HIV pozitif olgularda viral yük ticari bir gerçek zamanlı polimeaz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi, CD4⁺ T lenfosit sayısı akım sitometresi, anti-R7V antikorları ise ELISA (Anti-R7V ELISA™, Ivagen, Fransa) yöntemiyle saptanmıştır. Üç HIV olgusunda (3/33, %9.1) anti-R7V antikorları pozitif olarak saptanırken, kalan 30 HIV olgusu (%90.9) ve kontrol olguları negatif olarak değerlendirilmiştir. Anti-R7V antikor varlığı ile HIV-RNA düzeyleri ya da CD4⁺ T lenfosit sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (sırasıyla; p= 0.871 ve p= 0.287). Sonuç olarak çalışmamızda, incelenen bir grup HIV olgusunda anti-R7V antikorlarının bulunduğu ortaya konmuş, anti-R7V pozitifliği ile klinik ilerleyiş arasında herhangi bir korelasyon saptanamamıştır. Anti-R7V antikorlarının AIDS'e ilerleyişin öngörülmesinde ve klinik takipte muhtemel kullanımı, yapılacak ileri çalışmalarla önümüzdeki günlerde netlik kazanacaktır.

Anahtar sözcükler: İnsan immünyetmezlik virusu, HIV, anti-R7V antikoru, HAART.

ABSTRACT

R7V is a seven-aminoacid peptide epitope derived from cellular beta-2 microglobulin, present on human immunodeficiency virus (HIV) virion surface in patients with HIV infection. Antibodies against R7V

peptide have the property of neutralizing all strains of HIV, unrelated to genotype, phenotype, or geographical origin of the virus, even in the presence of anti-retroviral drug resistance. Patients that mount an anti-R7V antibody response have been shown to be slow or non-progressors and this epitope has been considered for vaccine and/or therapeutic uses. In this study, HIV-infected patients under highly active anti-retroviral therapy (HAART) at Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Internal Medicine, Division of Infectious Diseases, were evaluated for the presence of anti-R7V antibodies. Thirty-three HIV positive patients and 10 healthy controls were enrolled to the study. For HIV-infected patients, determination of viral load and CD4⁺ T lymphocyte counts were performed by a commercial real-time PCR assay and flow cytometry, respectively. Anti-R7V antibodies were detected from serum samples by a commercial ELISA (Anti-R7V ELISA™, Ivagen, France) test. Three HIV infected patients (3/33, 9.1%) displayed anti-R7V antibodies whereas the remaining 30 (90.9%) patients and all controls were interpreted as negative. No statistically significant difference was detected for HIV-RNA levels and CD4⁺ T lymphocyte counts between anti-R7V positive and negative patients ($p=0.871$ and $p=0.287$, respectively). These results indicate the presence of anti-R7V antibodies in our study population with HIV infection. No correlation with the presence of anti-R7V and disease progression were displayed in this study. Clinical impact of anti-R7V antibody assays for the management of HIV-infected patients will be revealed in the near future with the help of advanced studies.

Key words: Human immunodeficiency virus, HIV, anti-R7V antibody, HAART.

GİRİŞ

Zarflı virusların önemli özelliklerinden birisi, hücreden olgunlaşmaları sırasında virus tarafından kodlanan proteinlerle birlikte, konak hücreye ait yapıları da yüzeylerine ya da özyapılarına entegre etmeleridir^{1,2}. Benzer şekilde insan immünyetmezlik virusu [Human Immunodeficiency Virus (HIV)]-1'de, hücre plazma membranından tomurcuklanırken kazandığı zarfında hücreye ait molekülleri taşımaktadır. Bu moleküller arasında; HLA sınıf 1 ve 2 antijenleri, β_2 -mikroglobulin, integrin, I-selektin ve ICAM gibi adezyon molekülleri ile CD55 ve CD59 gibi kompleman sistemi regülasyon proteinlerinin bulunduğu gösterilmiştir³⁻⁶. Virusun yapısında bulunan bu hücresel elemanların fonksiyonlarını sürdürdüğü ve HIV'in hücre tropizmi, enfektivite ve patogenezi etkilediği bilinmektedir. Örnek olarak kompleman kontrol proteinlerinin, virusun komplemana bağlı lizisini önlediği, LFA-1'in ise virusun enfektivitesini artırdığı saptanmıştır⁶⁻⁸. Hücreden köken alan bu ve benzeri proteinlere karşı oluşan antikorlarla sağlanan koruma, alloimmünizasyonun muhtemel bir anti-HIV stratejisi olarak kabul görmesine yol açmıştır^{9,10}.

Anti-HIV alloimmünizasyon çalışmaları sırasında, hücresel kaynaklı β_2 -mikroglobuline karşı oluşmuş monoklonal antikorların virusu nötralize ettiği ve viral replikasyonun erken aşamalarında etkili olarak yeni virus oluşumunu engellediği gösterilmiştir^{11,12}. β_2 -mikroglobulin, tüm hedef hücrelerde eksprese edilmesi ve yapısının çok korunmuş olması nedeniyle, HIV'da izlenen ve ilaç direnci/tedavi başarısızlığı ile doğrudan ilişkili genotip farklılıkları, mutant yüzey glikoproteinleri gibi varyasyonları taşıyan tüm izolatlarda bulunacak potansiyel bir alloimmünizasyon hedefidir¹³. β_2 -mikroglobulin yapısında yer alan yedi aminoasitten oluşmuş R7V (RTPKIQV), ön çalışmalar sonucunda HIV'in nötralizasyonunu sağlayan prototip epitop olarak tanımlanmış, ardından HIV pozitif kişilerde R7V'ye karşı oluşmuş antikorları saptayacak deneysel ELISA sistemleri geliştirilmiştir^{10,14}. Elde edilen sonuçlar, HIV ile enfekte olguların bir kısmında anti-R7V antikorlarının sap-

tandığını; anti-R7V antikorları negatif olan kişilerde ise HIV enfeksiyonunun tipik ilerleme göstererek zaman içinde CD4⁺ T lenfosit sayısında düşme ve viral yükte artış olduğunu işaret etmektedir. Buna karşılık anti-R7V antikorları pozitif olan kişilerde, uzun dönemde hastalığın ilerleyişinin yavaş olduğu ve bu kişilerin çoğu kez akut immünyetmezlik gelişmeden uzun yıllar asemptomatik kaldığı ortaya konulmuştur¹⁵⁻¹⁸. Böylece anti-R7V antikorları, klinikte yaygın kullanım potansiyeli taşıyan, HIV ile enfekte kişilerin AIDS'e gidişi konusunda önemli bilgi sağlayabilecek muhtemel bir laboratuvar testi olarak ortaya çıkmıştır¹⁷. Anti-R7V antikorlarının saptanmasının, viral yük ve CD4⁺ T lenfosit sayısına ek olarak yüksek düzeyde aktif antiretroviral tedavi [Highly-Active Anti-Retroviral Therapy (HAART)] başlama ve/veya sonlandırma kararında etkili olabileceği düşünülmektedir^{17,19}. Bu çalışmada hastanemizdeki takip edilen ve HAART uygulanan HIV pozitif olgularda anti-R7V antikorları araştırılmış, sonuçların CD4⁺ T lenfosit sayısı ve HIV viral yük düzeyleri ile birlikte değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Olgular

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi tarafından takip edilen hastalardan randomize olarak seçilen 33 HIV pozitif olgu ile kontrol grubu olarak 10 sağlıklı kan donörü, bilgilendirilmiş onam alınmasını takiben çalışmaya dahil edildi. Olguların yaş aralığı 27-65 yıl (ortalama yaş: 43.6; ortanca yaş: 42), kontrol grubunun yaş aralığı ise 21-64 yıl (ortalama yaş: 41.2; ortanca yaş: 42) idi. Çalışma, Hacettepe Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylandı. Çalışma sırasında HIV pozitif olguların 30 (%90.9)'u HAART tedavisi almaktaydı. Tedavi altındaki olguların 9 (%30)'u lamivudin + zidovudin + indinavir (Combivir™ + Crivixan™), 7 (%23.3)'si lamivudin + zidovudin + nevirapin (Combivir™ + Viramun™), 2 (%6.6)'si lamivudin + zidovudin + indinavir (Epivir™ + Retrovir™ + Crixivan™) almakta olup, diğer olgularda farklı HAART rejimleri uygulanmaktaydı.

HIV Viral Yüğü ve CD4⁺ T Lenfosit Sayısının Saptanması

HIV-RNA viral yükünün belirlenmesi için olgulardan elde edilen 850 µL EDTA'lı plazma, otomatize saflaştırma sistemi COBAS® AmpliPrep ile hazırlanarak COBAS™TaqMan™ HIV-1 Test (Roche Molecular Systems, ABD) ile üreticinin önerileri doğrultusunda işleme alındı²⁰. HIV-RNA viral yükü, kopya/mL olarak, kantitasyonda Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün HIV-1 RNA Uluslararası Standardı (NIBSC 97/656) temelleri standartlar kullanılarak rapor edildi²¹. HIV pozitif olgularda mutlak CD4⁺ T lenfosit sayısı akım sitometri yöntemi ile saptandı²². Kontrol grubunda değerlendirilen sağlıklı kan donörlerine HIV viral yükü ya da CD4⁺ T lenfosit sayısı testleri uygulanmadı.

Anti-R7V Antikorlarının Saptanması

Bu amaçla ticari bir ELISA sistemi kullanıldı (Anti-R7V ELISA™, Ivagen, Fransa). Sistem, R7V peptidinin çukurlara bağlanmış olduğu standart mikropipler kullanılarak uygulandı ve örneklerde antikor varlığı, peroksidadla konjuge keçi anti-insan IgG'si ile saptandı. Çalışma, üreticinin önerileri doğrultusunda 100 µL serum örneği kullanılarak yapıldı; sonuç-

lar 450 nm ve 630 nm’de okunan optik dansite (OD) olarak elde edildi. Buna göre örnekte ölçülen OD/kalibratör OD oranı 1.2’den yüksek olduğunda pozitif; 0.8’den düşük olduğunda negatif; 0.8-1.2 arasında olduğunda gri bölgede olarak yorumlandı. Test, tüm örneklerle iki kez uygulandı; ilk testte negatif ya da gri bölgede sonuç verip ikinci testte negatif bulunan örnekler negatif olarak kabul edildi. Aynı örnekten ikinci kez gri bölgede sonuç alındığı durumda, üreticinin önerilerine göre, örnek negatif kabul edildi; ancak hastadan üç ay sonra yeniden örnek alınarak tekrar test edildi.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada incelenen olgularda saptanan CD4⁺ T lenfosit sayısı, HIV-RNA düzeyi ve anti-R7V antikor pozitifliği, SPSS™ Version 12.0 programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi; p< 0.05 anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

HIV pozitif olgularda; CD4⁺ T lenfosit sayısı ortalama 411.5 hücre/mm³ (ortanca: 375, standart sapma: 270.79, dağılım aralığı: 44-1269), viral yük ise 4.84 x 10⁴ kopya/mL (ortanca: 134, standart sapma: 2.5 x 10⁵, dağılım aralığı: 0-1.47 x 10⁶) olarak saptanmıştır.

Üç HIV pozitif olguda (3/33, %9.1) anti-R7V antikorları pozitif olarak saptanırken, kalan 30 HIV olgusu negatif olarak değerlendirilmiştir (%90.9). Pozitifler dışında beş olgu (5/33, %15.2), ilk çalışmada gri bölgede bulunmuş, ancak testin tekrarında negatif olarak izlenmiştir. Anti-R7V pozitif olan olgular ile negatif olan olgular arasında, CD4⁺ T lenfosit sayısı ve viral yük açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (viral yük değerleri için p= 0.871; CD4 T lenfosit sayısı için p= 0.287). Kontrol grubundaki sağlıklı kan donörlerinin tamamı anti-R7V negatif olarak saptanmıştır.

Anti-R7V pozitif olgulardan ilki 39 yaşında olup, tanısını 1993 yılında almış bir erkek hastadır. Tek başına verilen zidovudin tedavisi, 2000 yılında lamivudin + zidovudin + indinavir (Epivir™ + Retrovir™ + Crixivan™) kombinasyonu ile değiştirilmiştir. 2004 yılında tedaviye yanıt yetersizliği nedeniyle, tedavi nevirapin + zalsitabin + satvudin (Viramun™ + HIVID™ + Zerit™) şeklinde modifiye edilmiş; yaklaşık bir yıl sonra izlenen yan etkilere bağlı olarak nevirapin + tenofovir + emtrisitabin (Viramun™ + Trueda™) şeklinde devam edilmiştir. Çalışma için örnekleme zamanında aynı HAART rejimi altında olan hastada HIV-RNA negatif, CD4⁺ T lenfosit sayısı 93 hücre/mm³ olarak belirlenmiştir.

İkinci olgu olan 51 yaşındaki kadın hasta; 2002 yılında tanı almış, 2003 yılında da lamivudin + zidovudin + indinavir (Epivir™ + Retrovir™ + Crixivan™) kombinasyon rejimi almaya başlamıştır. Aynı rejimle tedavisi devam eden hastada örnekleme zamanında HIV-RNA negatif, CD4⁺ T lenfosit sayısı ise 375 hücre/mm³ olarak saptanmıştır.

Üçüncü olgu ise, 2005 yılında tanı alan 27 yaşında bir erkek olup, lamivudin + zidovudin + indinavir (Combivir™ + Crivixan™) tedavisi başlanmıştır. Bu olguda da örnekleme zamanında viral yük 2.9 x 10⁴ kopya/mL, CD4⁺ T lenfosit sayısı 343 hücre/mm³ olarak belirlenmiştir.

TARTIŞMA

HIV ile enfekte kişilerde nötralizan antikorların hedefi genellikle virus zarf glikoproteinleri olmakta, bu antikorlar tipe özgül ve düşük düzeylerde bulunmaktadır. Birçok HIV izolatına karşı aktivite gösterebilecek bu nötralizan antikorların üretimi ve terapötik amaçla kullanımı, özellikle ilaca dirençli viruslar ya da HAART tedavisine optimal yanıt alınamadığı durumlarda büyük önem taşımaktadır. Bu maksatla birçok deneysel yaklaşım halen değerlendirme sürecindedir¹⁹. Bu çalışmalar sırasında saptanan R7V epitopunun bilinen nötralizan antikorlarla karıştırıldığında virus nötralizasyonunu engellediği gösterilmiş; bunun ardından R7V epitopuna karşı oluşan antikorları tespit etmek amacıyla ELISA sistemleri geliştirilmiştir^{13,19}. Ön çalışmalardan elde edilen veriler; incelenen HIV ile enfekte popülasyonlarda iki farklı hasta grubuna işaret etmektedir. Bunlardan ilki CD4⁺ T lenfosit sayısında beklenen düşme ve viral yükte artışla seyreden anti-R7V antikorları saptanmayan hasta grubu; diğeri ise antikor taşıyan ve uzun süre hastalıkta ilerleme izlenmeden asemptomatik kalan kişiler olarak ortaya konulmuştur¹⁵⁻¹⁷. Bu verilerin ışığında anti-R7V antikorlarının varlığının uzun süreli nonprogresyon ile ilişkili olduğu düşünülmüş; benzer görüş, klinik ilerleyişi yavaş olan kişilerden alınmış serumların retrospektif incelenmesiyle de desteklenmiştir¹⁷⁻¹⁹. Bu veriler, kalitatif ve/veya kantitatif anti-R7V antikoru saptanmasının, HIV ile enfekte kişilerin değerlendirmesi sürecinde etkili olabilecek yeni bir laboratuvar parametresi olarak önemi olabileceğini ortaya koymaktadır¹⁹. Anti-R7V antikorlarının saptanması için tanısal ELISA testi, 2002 yılında Amerika Birleşik Devletleri "Food and Drug Administration (FDA)" tarafından IDE lisansı almıştır²³.

Bu çalışma, ülkemizde izlenen HIV pozitif olgular arasında anti-R7V antikorların varlığının araştırılması amacıyla kesitsel bir ön çalışma olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada incelenen HAART rejimi altındaki HIV ile enfekte olguların %9.1 (3/33)'inde anti-R7V antikorların varlığı gösterilmiş; kalan olgular (%90.9; 20/33) ve sağlıklı kan donörlerinden oluşan kontrol grubunda (n= 10) anti-R7V saptanmamıştır. Çalışma grubunda HIV viral yükü ya da CD4⁺ T lenfosit sayısı ile anti-R7V pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır. Çalışmamızda, anti-R7V antikoru saptanan olguların sayı ve özellikleri, antikor varlığının klinik takiple ilişkisi konusunda fikir vermekten uzaktır. Tüm tedavi altında olan olgulardan sadece bir tanesi, uzun süredir (1993'ten günümüze) HIV enfeksiyonunu taşımaktadır (olgu 1). Diğer bir pozitif olgu ise (olgu 3) arada düşük düzeyler izlenmiş olmasına rağmen genellikle 1×10^4 kopya/mL üzerinde viral yük değerleri saptanan bir klinik takip ortaya koymaktadır. Yine de incelenen grubun ve antikor saptanan olguların görece düşük sayıda olması, anti-R7V antikoru oluşumu ile klinik takip parametreleri arasında ortaya çıkabilecek ilişkilerin saptanmasını güçleştirmektedir. Anti-R7V antikoru ile diğer laboratuvar testleri ve HIV enfeksiyonunun klinik ilerleme süreci arasındaki korelasyonu araştıran henüz sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlardan birisinde, AIDS gelişmiş ya da aktif enfeksiyonu olan hastalarda anti-R7V pozitiflik oranı ve düzeyi daha yüksek olarak bildirilmektedir²⁴. Diğer bir kantitatif çalışmada, HIV ile enfekte olgularda asemptomatik olan veya uzun dönem hayatta kalanlar ile hastalığı ilerleyici olanlar arasında anti-R7V antikorları açısından belirgin bir fark tanımlanmış; zaman içinde asemptomatik kişilerdeki antikor düzeyi genellikle sabit kalırken, uzun dö-

nemde hayatta kalan HIV pozitif olgularda yükselme ve düşmeler ortaya çıktığı saptanmıştır²⁵. Le Contel ve arkadaşlarının²⁶ çalışmasında, insandan saflaştırılan anti-R7V IgG antikorlarının, antiviral ilaç direnci gösteren suşlar da dahil olmak üzere, laboratuvar ve primer HIV izolatlarını nötralize edebildiği rapor edilmiştir.

Ülkemizde yayınlanan ilk çalışma olma özelliği taşıyan bu araştırmada, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri'nde takip edilen HIV pozitif olgularda anti-R7V antikorlarının %9.1 oranında bulunduğu gösterilmiştir. Anti-R7V antikorlarının saptanmasının AIDS'e ilerleyişin öngörülmesi ve klinik takipteki uygulamaları yapılan ileri çalışmalarla önümüzdeki günlerde netlik kazanacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada kullanılan anti-R7V ELISA kitinin sağlanmasındaki katkıları nedeniyle Iva-gen Inc., Fransa ve Ekin Medikal Ltd. Şti.'ye teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Michelson S, Turowski P, Picard L, et al. Human cytomegalovirus carries serine/threonine protein phosphatases PPI and a host-derived PP2A. *J Virol* 1996; 70:1415-23.
2. Spear GT, Lurain NS, Parker CJ, Ghassemi M, Payne GH, Saifuddin M. Host-derived complement control proteins CD55 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated envelope viruses. *J Immunol* 1995; 155: 4376-81.
3. Hoxie JA, Fitzharris TP, Youngbar PR, Matthews DM, Rackowski JL, Radka SF. Non-random association of cellular antigens with HTLV-III virions. *Hum Immunol* 1987; 18: 39-52.
4. Arthur LO, Bess JW, Sowder RC II, et al. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 1992; 258: 1935-8.
5. Ott DE. Cellular proteins in HIV virions. *Med Virol* 1997; 7: 167-80.
6. Saifuddin M, Parker CJ, Peebles ME, et al. Role of virion-associated glycosylphosphatidylinositol-linked CD55 and CD59 in complement resistance of cell-line-derived and primary isolates of HIV-1. *J Exp Med* 1995; 182: 501-9.
7. Fortin JF, Cantin R, Lamontagne G, Tremblay M. Host-derived ICAM1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J Virol* 1997; 71: 3588-96.
8. Rossio JL, Bess JW, Henderson LE, Cresswell P, Arthur LO. HLA class II on HIV-1 particles is functional in superantigen presentation to human T-cells: implication for HIV pathogenesis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11: 1433-9.
9. Shearer GM, Clerici M, Dalglish A. Alloimmunization as an AIDS vaccine? *Science* 1993; 262: 161-2.
10. Galea P, Le Contel C, Chermann JC. A novel epitope R7V common to all HIV-1 isolates is recognized by neutralizing IgG found in HIV-infected patients and immunized rabbits. *Vaccine* 1999, 17: 1454-60.
11. Arthur LO, Bess JW Jr, Sowder RC II, et al. Cellular proteins bound to immunodeficiency virus: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 1992; 258: 1935-8.
12. Corbeau P, Devaux CA, Kourilsky F, Chermann JC. An early postinfection signal mediated by monoclonal anti- β 2 microglobulin antibody is responsible for delayed production of human immunodeficiency virus type 1 in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* 1990; 64: 1459-64.
13. Le Contel C, Gal  a P, Silvy F, Hirsch I, Chermann JC. Identification of the β 2m derived epitope responsible for neutralization of HIV isolates. *Cell Pharmacol AIDS Sci* 1996; 3: 68-73.
14. Galea P, Le Contel C, Coutton C, Chermann JC. Rationale for a vaccine using cell-derived epitope presented by HIV isolates. *Vaccine* 1999; 17: 1699-704.

15. Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995; 332: 201-8.
16. Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, et al. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995; 332: 209-16.
17. Galea P, Le Contel C, Chermann JC. Identification of a biological marker of resistance to AIDS progression. *Cell Pharmacol AIDS Sci* 1996; 3: 311-6.
18. Haslin C, Chermann JC. Retrospective study of protective anti-R7V antibodies in HIV-infected patients for a new vaccine concept. *J Hum Virol* 2002; 5: 70.
19. Haslin C, Chermann JC. Anti-R7V antibodies as therapeutics for HIV-infected patients in failure of HAART. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13: 621-4.
20. Schumacher W, Frick E, Kauselmann M, Maier-Hoyle V, van der Vliet R, Babel R. Fully automated quantification of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 RNA in human plasma by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system. *J Clin Virol* 2007; 38: 304-12.
21. Holmes H, Davis C, Heath A, Hewlett I, Lelie N. An international collaborative study to establish the 1st international standard for HIV-1 RNA for use in nucleic acid-based techniques. *J Virol Methods* 2001; 92: 141-50.
22. Bossuyt X, Marti GE, Fleisher TA. Comparative analysis of whole blood lysis methods for flow cytometry. *Cytometry* 2007; 30: 124-33.
23. <http://www.newsrx.com/newsletters/Virus-Weekly/2002-11-12.html>
24. Xu X, Xing H, Gong W, et al. Preliminary investigation on the relation between clinical progress and anti-small monomolecular peptides antibody in individual infected with HIV. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2002; 16: 286-7.
25. Galea P, Le Contel C, Chermann JC. Correlation of the presence of protective anti-Beta2m-derived peptide antibodies with the non-progression to AIDS. *Int Conf AIDS* 1996; 11: 266.
26. Le Contel C, Galea P, Chermann JC. Immunoprecipitation and neutralization of HIV isolates by HIV patient IgG directed to a viral-associated epitope. *Int Conf AIDS* 1998; 12: 516-7.