

HIV FLOW-FISH

Δ.Ι. Χατζοπούλου

Ιατρός Βιοπαθολόγος, τμήμα Ανοσολογίας, ΑΟΝΑ «Ο Άγιος Σάββας».

Ο συνδυασμός κυτταρομετρίας ροής και μοριακών τεχνικών προσφέρει νέες δυνατότητες τόσο σε κλινικό όσο και σε ερευνητικό επίπεδο. Συγκεκριμένα στην HIV λοίμωξη, η ενδοκυττάρια ανίχνευση του HIV gag-pol mRNA σε συνδυασμό με ανοσοφαινοτυπικούς δείκτες, επιτρέπει την παρακολούθηση της ενδοκυττάριας παραγωγής του ιού σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα και τον καθορισμό του CCR5 ή CXCR4 τροπισμού του. Έτσι, δίνονται νέες δυνατότητες στην κατανόηση της ανοσοπαθογένειας και στην παρακολούθηση της HIV λοίμωξης, καθώς και στη χρήση των νέων φαρμάκων που στοχεύουν στην αναστολή της εισόδου του HIV στα κύτταρα.

Είσοδος του HIV στα κύτταρα

Ο HIV αντιδρά με διάφορους υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων. Το μόριο CD4 και οι υποδοχείς χημειοκινών CCR5 και CXCR4 είναι οι κύριοι υποδοχείς για την είσοδο του HIV στα ανθρώπινα κύτταρα. Άλλοι υποδοχείς, όπως οι υποδοχείς μαννόζης στα μακροφάγα και ο υποδοχέας DC-SIGN στα δενδριτικά κύτταρα, αντιδρούν με το μόριο gp120 στην επιφάνεια των ιικών σωματιδίων, αλλά δεν προάγουν την είσοδο του ιού στα κύτταρα. Ο ρόλος τους είναι να παγιδεύουν τον ιό και να τον μεταφέρουν στους λεμφαδένες.

Ανάλογα με τον υποδοχέα που χρησιμοποιούν τα στελέχη του HIV-1 κατατάσσονται σε στελέχη με CCR5 τροπισμό (R5), CXCR4 τροπισμό (X4) και διπλό τροπισμό (R5/X4). *In vitro*, τα R5 στελέχη συνήθως αντιστοιχούν σε NSI (non-syncytium-inducing), δηλ. δεν επάγουν το σχηματισμό συγκυτίων σε T κυτταρικές σειρές και είναι ικανά να πολλαπλασιάζονται σε μονοκύτταρα-μακροφάγα (M τροπισμός), χαρακτηριστικά που έχουν συνδεθεί με λιγότερο παθογόνα στελέχη. Σε αντίθεση, τα X4 στελέχη είναι SI (syncytium-inducing) δηλ. επάγουν το σχηματισμό συγκυτίων σε T κυτταρικές σειρές και πολλαπλασιάζονται σε T λεμφοκύτταρα (T τροπισμός), χαρακτηριστικά των πιο παθογόνων στελεχών.

Τα τελευταία χρόνια με την εμφάνιση νέων φαρμάκων στη θεραπευτική φαρέτρα της HIV λοίμωξης, τους αναστολείς εισόδου, έχει στραφεί το ενδιαφέρον στις αντιδράσεις κατά την είσοδο του HIV στα κύτταρα και στον τροπισμό του.

Το ιικό περίβλημα αποτελείται από τις γλυκοπρωτεΐνες gp120 και gp41. Αυτές σχηματίζουν τριμερή από τρία μόρια gp120 και τρία μόρια διαμεμβρανικής gp41. Η σύνδεση του μορίου CD4 με την gp120 οδηγεί σε δομικές αλλαγές της, που αποκαλύπτουν τα σημεία σύνδεσης (variable loops) με τους συνυποδοχείς. Το μόριο CD4 αποτελείται από τέσσερα τμήματα. Εύκαμπτες περιοχές του CD4 ανάμεσα στα τμήματα 2 και 3, αλλά και στο 4 και στη μεμβράνη επιτρέπει τον προσανατολισμό των σημείων σύνδεσης με τους συνυποδοχείς χημειοκινών. Οι V1/V2 περιοχές (loops) καλύπτουν τα σημεία σύνδεσης με τους συνυποδοχείς και επανατοποθετούνται αποκαλύπτοντας αυτά, όταν συνδέεται το CD4. Το CD4-gp120 σύμπλεγμα συνδέεται με τους συνυποδοχείς μέσω του τμήματος V3 της gp120. Περαιτέρω δομικές αλλαγές στην gp41 οδηγούν στη σύντηξη της ιικής και κυτταρικής μεμβράνης και στην είσοδο του ιικού πυρήνα στο κυτταρικό κυτταρόπλασμα.

Οι υποδοχείς χημειοκινών CCR5 και CXCR4, είναι μόρια με επτά διαμεμβρανικά τμήματα. Έτσι, εξέχουν στην κυτταρική επιφάνεια τρεις εξωκυττάριοι βρόγχοι (loops), οι E1, E2 και E3, καθώς και ένα αμινοτελικό άκρο. Για τα R5 στελέχη, το αμινοτελικό άκρο και η E2 περιοχή είναι καθοριστικά σημεία για την αναγνώριση των συνυποδοχέων και την επακόλουθη είσοδο του ιού, ενώ για τα X4 στελέχη μόνο η E2 περιοχή αρκεί.

Επιπλέον, αλληλεπιδράσεις ηλεκτρικών φορτίων εμπλέκονται στην αντίδραση της gp120 με τους συνυποδοχείς. Το θετικά φορτισμένο μόριο gp120 αλληλεπιδρά με το αρνητικά φορτισμένο αμινοτελικό άκρο του μορίου CCR5, λόγω ύπαρξης αντίστοιχα φορτισμένων αμινοξέων στην επιφάνειά τους. Παρόλα αυτά, αυτές οι ηλεκτροστατικές φύσεως αλληλεπιδράσεις δεν καθορίζουν την ειδικότητα της αντίδρασης.

HIV τροπισμός και ανοσοπαθογένεια

Τα R5 στελέχη είναι υπεύθυνα για την εγκατάσταση της λοίμωξης ανεξάρτητα της οδού μόλυνσης, ενώ τα X4 στελέχη εμφανίζονται αργότερα και σχετίζονται με γρήγορη μείωση των CD4 κυττάρων και εξέλιξη σε AIDS. Τα κύτταρα που μολύνονται είναι τα CD4 T-λεμφοκύτταρα, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και τα δενδριτικά, δηλαδή τα κύτταρα που εκφράζουν τα μόρια CD4 και τους υποδοχείς των χημειοκινών. Τα ενεργοποιημένα CD4 T-λεμφοκύτταρα με μνημονικό φαινότυπο (CD4+CD45RO+), τα οποία εκφράζουν περισσότερο CCR5 παρά CXCR4, είναι οι κύριοι παραγωγοί του ιού *in vivo*. Η έκφραση του CXCR4 επικρατεί στα παρθένα T-λεμφοκύτταρα (CD4+CD45RA+). Η μόλυνση των παρθένων T-λεμφοκυττάρων από τα X4 στελέχη συμπίπτει με την ταχεία πρόοδο της νόσου. Η λοιμογόνος δράση των X4 στελεχών μπορεί να εξηγηθεί από την ικανότητά τους να μολύνουν τα θυμοκύτταρα, δηλ. τις προβαθμίδες των T-λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα την ταχεία μείωση των CD4 T-λεμφοκυττάρων.



Μοριακές μελέτες με PCR (polymerase chain reaction)/FISH (fluorescence in situ hybridization), σε συνδυασμό με flow/FISH, παρείχαν σημαντικές πληροφορίες για τον κύκλο ζωής του HIV. Βρέθηκε ότι το ιικό DNA υπάρχει σε μεγάλη αναλογία στα κύτταρα του περιφερικού αίματος, δηλ. ο ιός βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση, στη μορφή του προιού. Παρόλα αυτά, μικρό ποσοστό των λεμφοκυττάρων/μονοκυττάρων εκφράζουν mRNA του ιού, είναι δηλ. μεταγραφικά ενεργά και ικανά να παράγουν νέα ιικά σωματίδια. Στη μέθοδο flow/FISH, δεν γίνεται πολλαπλασιασμός του γενετικού υλικού. Γίνεται απευθείας υβριδισμός του κυτταροπλασματικού HIV mRNA με τη χρήση δεξαμενής κατάλληλων ιχνηθετών (probes) που το αναγνωρίζουν, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι με φθορίζουσα χρωστική. Με τη χρήση μεγάλου αριθμού ιχνηθετών αυξάνεται η ευαισθησία της μεθόδου. Σε συνδυασμό με ανοσοφαινοτυπικούς δείκτες, καθορίζεται ο τύπος των κυττάρων που αναπαράγουν τον ιό. Αποτελέσματα μελετών με flow/FISH έδειξαν ότι τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος αποτελούν μια σημαντική δεξαμενή του ιού σε όλη τη διάρκεια της λοίμωξης, ακόμα και στα τελικά στάδια της νόσου, σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες. Άλλες μελέτες με flow/FISH έδειξαν ότι τα μνημονικά CD4+ T κύτταρα είναι αυτά που πρώτα μολύνονται στο γυναικείο γεννητικό βλεννογόνο και όχι τα δενδριτικά. Η συμβολή της μεθόδου στην καλύτερη κατανόηση της ανοσοπαθγένειας της HIV λοίμωξης ίσως αποβεί σημαντική.

Αντιρετροϊκά φάρμακα και αναστολείς εισόδου:

Τα αντιρετροϊκά φάρμακα στρέφονται εναντίον συγκεκριμένων στόχων του κύκλου ζωής του ιού HIV. Τα πρώτα φάρμακα που παρασκευάστηκαν ήταν οι *νουκλεοσιδικοί αναστολείς της ανάστροφης τρανσκριπτάσης (NRTIs, NtRTIs)*, που ανακόπτουν την προσβολή των CD4 κυττάρων από τον ιό, καθώς σταματούν τη μετατροπή του HIV RNA σε DNA, εμποδίζοντας την ενσωμάτωση του ιού στο ανθρώπινο γενετικό υλικό. Άλλα φάρμακα είναι: οι *μη νουκλεοσιδικοί αναστολείς της ανάστροφης τρανσκριπτάσης (NNRTIs)* που δρουν στο καταλυτικό σημείο του ενζύμου και οι *αναστολείς της πρωτεάσης (PIs)* που παρεμποδίζουν την τελική ωρίμανση του ιού. Οι *αναστολείς του ενζύμου ενσωματάσης (integrase inhibitors, INIs)* αναστέλλουν την ενσωμάτωση του προϊκού DNA του HIV εντός του DNA του ξενιστή.

Πιο πρόσφατα ανακαλύφθηκαν οι *αναστολείς σύντηξης (Fusion inhibitor, FI)* και στη συνέχεια οι *αναστολείς του συνυποδοχέα CCR5*. Οι δύο αυτές κατηγορίες αναστέλλουν την είσοδο του ιού στο κύτταρο (*αναστολείς εισόδου*). Η πρόσφατη αποσαφήνιση των σημαντικών λεπτομερειών της διαδικασίας εισόδου του HIV στο κύτταρο-στόχο παρείχε την ευκαιρία να αναπτυχθούν αυτές οι καινούριες ομάδες φαρμάκων, που στοχεύουν σε διαφορετικά σημεία της διαδικασίας αυτής. Οι αναστολείς της σύντηξης αναστέλλουν την αλληλεπίδραση του τριμερούς συμπλόκου μορίου gp120/gp41 με τον υποδοχέα CD4. Κατά τη διαδικασία αυτή το αμινοτελικό άκρο της γλυκοπρωτεΐνης gp41 επεκτείνεται προς την κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή και οι ελικοειδείς περιοχές HR-1 και HR-2 της gp41 δημιουργούν σπειράματα και δεμάτια. Αυτά αναδιπλώνονται, αγκιστρώνονται και διευκολύνουν τη σύντηξη των κυτταρικών μεμβρανών του HIV και του ξενιστή. Προς το παρόν κυκλοφορεί η ενφουβιρίτιδη (T-20). Οι αναστολείς των συνυποδοχέων των χημειοκινών CCR5 και CXCR4 εμποδίζουν την ένωση των συνυποδοχέων αυτών με την αγκύλη V3 της γλυκοπρωτεΐνης gp120 του HIV και διακόπτουν τη μεταφορά του μέσα στο κύτταρο-στόχο. Οι αναστολείς των συνυποδοχέων CXCR4 δεν είναι εμπορικά διαθέσιμοι. Από τους αναστολείς CCR5 κυκλοφορεί το maraviroc.

Γνωρίζοντας το μηχανισμό δράσης των αναστολέων των συνυποδοχέων, το όφελός τους περιορίζεται στις ομάδες των HIV θετικών ατόμων, των οποίων τα ιικά στελέχη χρησιμοποιούν τον έναν από τους δυο υποδοχείς. Προϋπαρξη ενός μικρού πληθυσμού από X4 στελέχη, μπορεί να οδηγήσει στην επικράτηση των στελεχών αυτών αν χορηγηθεί αναστολέας του CCR5 υποδοχέα. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται και οι ασθενείς με μεικτό πληθυσμό από R5/X4 στελέχη.

Αν και είναι γνωστή η σχέση του ιικού τροπισμού και της προόδου της νόσου, το ιικό φορτίο και ο απόλυτος αριθμός των CD4+ T-λεμφοκυττάρων αποτελούν τους κύριους δείκτες παρακολούθησης της νόσου και ανταπόκρισης στη θεραπεία. Η χρήση των νέων φαρμάκων που ανήκουν στην κατηγορία των αναστολέων εισόδου, καθιστά τον έλεγχο του τροπισμού αναγκαίο για τη σωστή χρήση τους στον πληθυσμό των HIV θετικών ατόμων που ενδείκνυνται και για την αποφυγή επικράτησης των πιο παθογόνων στελεχών X4.

Μέθοδοι καθορισμού του τροπισμού

Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για να καθορισθεί ο HIV τροπισμός. Οι περισσότερες βασίζονται σε κυτταροκαλλιέργειες. Για παράδειγμα, η χρήση MT-2 κυτταρικών σειρών στηρίζεται στην έκφραση μόνο του CXCR4 και όχι του CCR5 στην επιφάνειά τους. Έτσι, οποιαδήποτε ένδειξη HIV ιικού πολλαπλασιασμού ισοδυναμεί με παρουσία X4 στελεχών. Άλλες κυτταρικές σειρές, είναι τα GHOST κύτταρα και τα U87. Σε αυτές τις σειρές εκφράζονται στην επιφάνειά τους τα μόρια CD4 και διάφοροι υποδοχείς χημειοκινών. Μειονεκτήματα αυτών των μεθόδων είναι η συλλογή των ιικών στελεχών από τα λεμφοκύτταρα/μονοκύτταρα του αίματος και η διαφορετική έκφραση υποδοχέων χημειοκινών στα κύτταρα-στόχους του ιού στον ανθρώπινο οργανισμό, σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται στις κυτταροκαλλιέργειες.

Νεότερες μέθοδοι εξετάζουν τον ιικό τροπισμό και την αντοχή στους αναστολείς εισόδου. Στηρίζονται στον πολλαπλασιασμό της γενετικής αλληλουχίας του ιικού περιβλήματος από δείγματα πλάσματος των ασθενών και στην παραγωγή ανασυνδυασμένων ιών. Αυτοί οι ιοί, στη συνέχεια, επωάζονται σε κυτταρικές σειρές που εκφράζουν CD4 και CCR5 ή CXCR4, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο τον καθορισμό του ιικού τροπισμού. Μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου (Trofile test) είναι ότι απαιτεί ιικό φορτίο >1000 copies/ml, αν και τελευταία έχει βελτιωθεί και λειτουργεί και με χαμηλότερο ιικό φορτίο. Επιπλέον, είναι ακριβή, απαιτεί δύο εβδομάδες για το αποτέλεσμα και δεν γίνεται στη χώρα μας. Άλλες μέθοδοι καθορισμού του ιικού τροπισμού, στηρίζονται στη μοριακή βάση του, εξετάζοντας τη γενετική αλληλουχία του V3, που είναι το καθοριστικό τμήμα της gp120 που εμπλέκεται στην αντίδραση με τους συνυποδοχείς.

Μέθοδος HIV Flow-FISH

Η μέθοδος αυτή συνδυάζει την κυτταρομετρία ροής με τον *in situ* υβριδισμό (fluorescence *in situ* hybridization, FISH), για τον εντοπισμό του HIV mRNA σε ανθρώπινα κύτταρα. Γίνεται χρήση δεξαμενής σημασμένων με φλουορεσκεΐνη (FITC) ολιγονουκλεοτιδίων, που δρουν ως ιχνηθέτες (probes) για την ανίχνευση του ιικού HIVmRNA στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Σε συνδυασμό με ανοσοφαινοτυπικούς δείκτες, παρέχονται χρήσιμες πληροφορίες για την αναπαραγωγή του ιού σε κυτταρικό επίπεδο και επιτρέπεται ο καθορισμός του CCR5 ή CXCR4 τροπισμού του. Σύγχρονες μελέτες δείχνουν ότι η ανίχνευση του ενεργού ιικού mRNA προηγείται της ανίχνευσης του ιού στο πλάσμα. Επιπλέον, εντοπίζεται η παρουσία επιμένουσας αναπαραγωγής του ιού σε ασθενείς με μη ανιχνεύσιμο ιικό φορτίο στο πλάσμα.

Όπως αναφέρθηκε, το ιικό φορτίο (viral load) και ο απόλυτος αριθμός των CD4+ T-λεμφοκυττάρων αποτελούν τους κύριους δείκτες παρακολούθησης της νόσου HIV και ανταπόκρισης στη θεραπεία (HAART). Το ιικό φορτίο μετρά το ποσό των ελεύθερων ιικών σωματιδίων που κυκλοφορούν στο περιφερικό αίμα, χωρίς να παρέχει πληροφορίες για την κυτταρική πρόελευσή τους. Κατά συνέπεια, είναι εξ ορισμού ένας όψιμος δείκτης του ιικού πολλαπλασιασμού.

Η μέθοδος Flow-FISH μπορεί να μετρήσει τους ενεργά πολλαπλασιαζόμενους ιούς στα κυτταρικά διαμερίσματα, με ανιχνεύσιμο όριο τα 10 αντίγραφα του HIV mRNA ανά κύτταρο. Μαζί με τους δείκτες CCR5(CD195) και CXCR4(CD184) καθορίζεται εύκολα ο τροπισμός του ιού, παρέχοντας πληροφορίες για την πρόγνωση και τον καθορισμό της θεραπείας με τους αναστολείς εισόδου.

Συμπερασματικά, η μέθοδος Flow-FISH προσφέρει νέες δυνατότητες στην πρόγνωση, στην παρακολούθηση, στο θεραπευτικό σχεδιασμό, στην κατανόηση της ανοσοπαθγένειας της HIV λοίμωξης, παρέχοντας νέες δυνατότητες σε κλινικό και ερευνητικό επίπεδο.

Μεθοδολογία

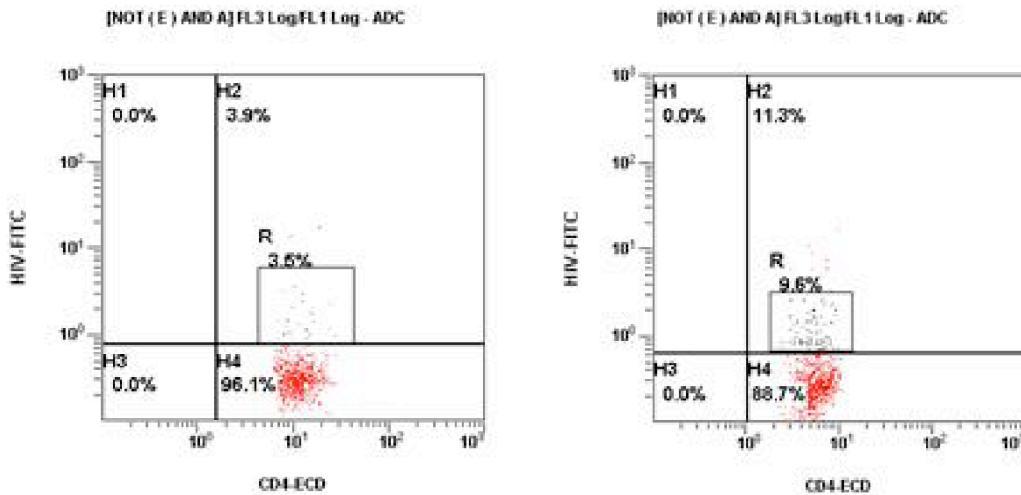
Για την ανίχνευση του ποσοστού των HIV θετικών CD4+ (T-βοηθητικών), CD45RO+ (T-μνημονικών), CD14+ (μονοκυττάρων) καθώς και για τον καθορισμό του CCR5/CXCR4 τροπισμού ακολουθείται το προτεινόμενο πρωτόκολλο από το HIV Viritect kit της εταιρείας Inviviron.

1. Μεταφέρουμε 100 μl ολικού αίματος σε δύο σωληνάρια κυτταρομετρίας ροής (από πολυπροπυλένιο). Προσθέτουμε τις προτεινόμενες ποσότητες των CD4-ECD, CD45RO-PE και CD14-PC5 (σωληνάριο 1) και τις αντίστοιχες ποσότητες των CD4-ECD, CCR5-PE(CD195) και CXCR4-PC5(CD184) (σωληνάριο 2). Επωάζουμε για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Προσθέτουμε 1 ml PBS και φυγοκεντρούμε (400 g για 5 λεπτά). Απορρίπτουμε προσεκτικά το υπερκείμενο.
3. Αναδεύουμε ήπια.
4. Προσθέτουμε 300 μl CellPerm (Reagent 1) σε κάθε σωληνάριο, αναδεύουμε ήπια και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Τοποθετούμε σε υδατόλουτρο (για 30 λεπτά, 43°C) για λύση των ερυθρών κυττάρων. Φυγοκεντρούμε (400 g για 5 λεπτά). Απορρίπτουμε προσεκτικά το υπερκείμενο.
5. (Παράλληλα, τοποθετούμε σε υδατόλουτρο στους 43°C τα: stringency wash 1(Reagent 6) και stringency wash 2 (Reagent 7)).
6. Προσθέτουμε 1 ml pre-hybridization buffer 1 (Reagent 2), αναδεύουμε ήπια και φυγοκεντρούμε (400 g για 5 λεπτά). Απορρίπτουμε προσεκτικά το υπερκείμενο.
7. Αναδεύουμε ήπια.
8. Προσθέτουμε 1 ml pre-hybridization buffer 2 (Reagent 3), αναδεύουμε ήπια και φυγοκεντρούμε (400 g για 5 λεπτά). Απορρίπτουμε προσεκτικά το υπερκείμενο.
9. Αναδεύουμε ήπια.
10. Αναμιγνύουμε 100 μl hybridization buffer (Reagent 4) με 3 μl HIV Probe Cocktail (Reagent 5) για κάθε σωληνάριο. Προσθέτουμε 103 μl HIV mRNA Buffer Probe σε κάθε δείγμα και επωάζουμε στους 43°C για 45 min.

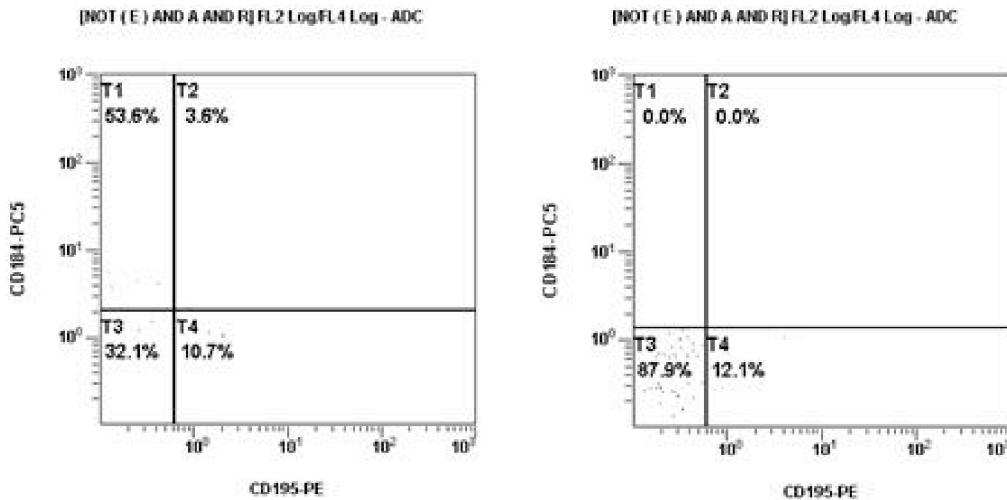


11. Προσθέτουμε 1 ml stringency wash 1 (pre-warmed buffer 6 - Reagent 6) σε κάθε σωληνάριο, αναδεύουμε ήπια και φυγοκεντρούμε (400 g για 5 λεπτά). Απορρίπτουμε προσεκτικά το υπερκείμενο.
12. Προσθέτουμε 1 ml stringency wash 2 (pre-warmed buffer 7 - Reagent 7) σε κάθε σωληνάριο, αναδεύουμε ήπια και επιάζουμε για 15 λεπτά στους 43°C.
13. Φυγοκεντρούμε (400 g για 5 λεπτά). Απορρίπτουμε προσεκτικά το υπερκείμενο. Αναδεύουμε ήπια.
14. Επαναδιάλυση σε 400 μl PBS+2%FBS.
15. Ακολουθεί η άμεση μέτρηση στον κυτταρομετρητή ροής.

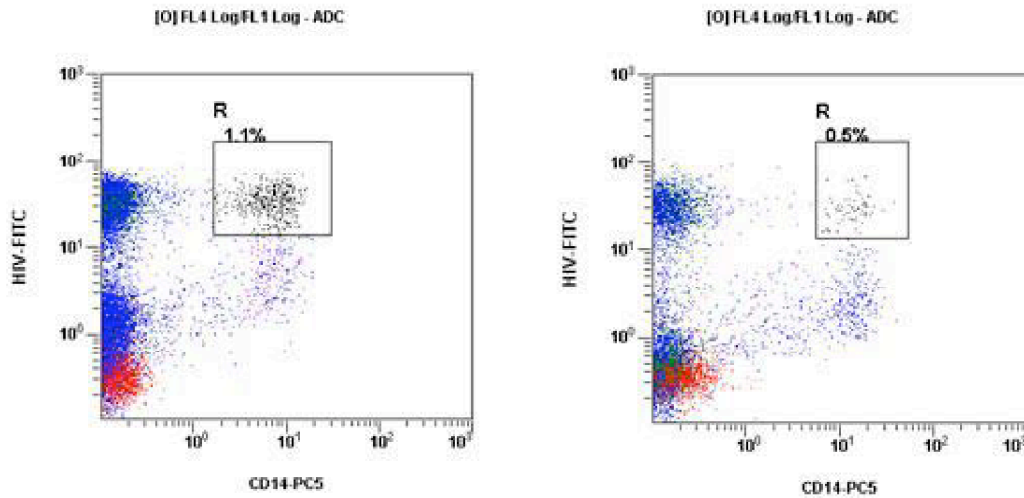
Στις ακόλουθες εικόνες φαίνονται αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα:



Εικόνα 1. Έκφραση του HIV mRNA στα CD4 T-λεμφοκύτταρα δυο δειγμάτων.



Εικόνα 2. Τροπισμός. Στο δείγμα 1 υπερισχύουν τα X4 στελέχη, ενώ στο δείγμα 2 τα R5 στελέχη.



Εικόνα 3. Έκφραση του HIV mRNA στα CD14 μονοκύτταρα δύο δειγμάτων.

Βιβλιογραφία

1. Poveda Eva, Briz Veronica, Quinones-Mateu Miguel, et al. HIV tropism: diagnostic tools and implications for disease progression and treatment with entry inhibitors. AIDS: Volume 20(10) 26 June 2006 p 1359-1367.
2. Paul R Clapham and Aine McKnight. HIV-1 receptors and cell tropism. British Medical Bulletin 2001;58: 43-59.
3. Phalguni Gupta, Kelly B. Collins, Deena Ratner, et al. Memory CD4+ T Cells are the earliest detectable human immunodeficiency virus type 1(HIV-1)-infected cells in the female genital mucosal tissue during HIV-1 transmission in an organ culture system. Journal of Virology, Oct 2002, p. 9868-9876.
4. Bruce K. Patterson, Victoria L. Mosiman, Luis Cantarero, et al. Detection of HIV-RNA-Positive Monocytes in Peripheral Blood of HIV-Positive Patients by Simultaneous Flow Cytometric Analysis of Intracellular HIV RNA and Cellular Immunophenotype. Cytometry 31: 265-274 (1998).
5. Ελένη Γιαμαρέλλου και συνεργάτες, Λοιμώξεις και Αντιμικροβιακή Χημειοθεραπεία, Εκδόσεις Πασχαλίδη, Αθήνα 2009.