

## **Real-time PCR: una nuova prospettiva nel monitoraggio virologico del paziente HIV-1 sieropositivo.**

**F. Vitone, P. Schiavone, D. Gibellini\*.**

*Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Clinica Specialistica e Sperimentale, Università degli Studi di Bologna, Bologna*

**Riassunto.** Dal momento della sua introduzione, l'utilizzo della PCR come metodica diagnostica si è subito rilevata promettente in tutte le aree della biologia e, in modo particolare, nella diagnosi di infezione nei soggetti infetti da virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV), permettendo di anticipare la diagnosi e fornendo nuovi mezzi per monitorare l'infezione.

Un ruolo particolarmente interessante riveste la determinazione quantitativa del DNA provirale nel soggetto HIV-infetto, al fine di potere quantificare in modo accurato la carica virale, monitorare la progressione della malattia e valutare l'efficacia di un trattamento terapeutico. Il virus dell'immunodeficienza acquisita, infatti, può persistere sotto forma di provirus integrato in distretti corporei, definiti "santuari" che rappresentano dei veri e propri serbatoi difficilmente penetrabili dai farmaci antiretrovirali.

In questa breve rassegna cercheremo di analizzare le diverse metodiche utilizzabili per il monitoraggio dei soggetti HIV infetti, puntando la nostra attenzione soprattutto sulle possibilità che vengono offerte dalla applicazione della *Real-time* PCR.

**Summary.** Since introduction, the polymerase chain reaction (PCR) has represented the gold standard for diagnosis of several infectious diseases. PCR for the detection of HIV-1 proviral DNA had reached high level of sensitivity and specificity. It is well known that both HIV-1 proviral DNA and HIV-1 plasmatic RNA detection represent two basic targets to monitor the viral reservoirs and viral replication respectively. Since HIV-1 proviral DNA can persist in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and in lymph nodes despite antiviral therapy, the persistence of these reservoirs represents one of the major drawbacks to the total eradication of HIV-1 even though the antiviral treatment is initiated at an early stage of infection

This brief review explores the different virological methods to monitor HIV-1 infected patients with particular attention to real time PCR, able to offer significant information even when the HIV-1 RNA levels drop below the detectable limits.

### **Introduzione**

La reazione polimerasica a catena o polymerase chain reaction (PCR), descritta per la prima volta negli anni '80 da Kary Mullis, può essere considerata come una delle scoperte tecnologiche ed applicative più importanti nel campo della Biologia Molecolare.

Nel suo formato classico, la tecnica di PCR rappresenta una reazione di amplificazione *in vitro* di sequenze di DNA specifiche mediata da un enzima DNA polimerasi termostabile (Taq polimerasi) capace di sintetizzare ed amplificare, in un numero preordinato di cicli di reazione, un frammento di

DNA specifico riconosciuto e delimitato da una coppia di oligonucleotidi specifici per la sequenza in esame. La tecnica di PCR consta di tre fasi distinte: la prima è rappresentata dalla fase di denaturazione, in cui il DNA bersaglio viene denaturato ad una temperatura di 95-100°C per ottenere la completa separazione dei due filamenti costituenti il DNA; la seconda denominata fase di *annealing* è invece caratterizzata da una diminuzione della temperatura della reazione a 55-60°C, in modo da permettere l'ibridazione dei due oligonucleotidi specifici (primers) alle catene complementari di DNA per l'innescamento della neosintesi del DNA specifico da parte di Taq polimerasi; nella terza, denominata fase di *ex-*

*tension*, compiuta generalmente a 72-75°C, la Taq polimerasi sintetizza il filamento di DNA complementare. Alla fine di ogni ciclo di amplificazione, i filamenti di DNA neoformati vengono nuovamente denaturati e, in eccesso di reagenti (enzimi, *primer* e desossinucleotidi), si comportano da stampo per la sintesi di successivi nuovi frammenti. Il processo di denaturazione, di ibridazione dei primer e la loro estensione viene ripetuto per un numero variabile di cicli (da 30 a 45), per ottenere così un accumulo teoricamente esponenziale della sequenza bersaglio. La ripetizione automatica dei cicli di amplificazione è resa possibile grazie all'impiego di uno strumento specifico come il termociclatore (*thermocycler*) capace di gestire elettronicamente le temperature, i tempi ed i cicli della reazione PCR. La sequenza amplificata è poi rivelata mediante corsa elettroforetica con eventuale successiva ibridizzazione con un oligonucleotide marcato specifico per una sequenza interna al DNA amplificato stesso (2).

I vantaggi della PCR sono rappresentati dall'estrema sensibilità (in condizioni ideali sino ad una copia), dalla rapidità di esecuzione e dall'automazione del processo di amplificazione. Bisogna, tuttavia, considerare come la sensibilità del metodo possa essere significativamente influenzata da diversi parametri, quali l'efficienza di estrazione degli acidi nucleici, la presenza di inibitori della Taq polimerasi etc., in grado di ridurre la sensibilità della tecnica. Inoltre, l'estrema sensibilità del metodo può determinare la presenza di falsi positivi, a causa di contaminazioni con campioni positivi (12). Questa eventualità rappresenta un serio problema nella gestione della PCR specialmente nell'ottica di un impiego nella diagnosi virologica in quanto richiede necessariamente la presenza di strutture dedicate e di personale addestrato nella gestione e nella manipolazione del campione clinico.

La tecnica di PCR ha fortemente influenzato tutti i campi della biologia molecolare ed è stata applicata, per esempio, nella diagnosi di patologie infettive, nella sequenziamento genomico, nella clonazione e nello studio di mutazioni correlate con l'insorgenza di tumori sviluppando, tra l'altro, numerose variazioni al tema della PCR classica come, per esempio, la Hot-start PCR o la Touchdown PCR per ottenere una maggior specificità di reazione (17, 22).

**La PCR: possibili applicazioni.** Tra le applicazioni metodologiche generali più interessanti sono da citare la *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR) e la *in situ* PCR. RT-PCR permette, tramite un passaggio di retrotrascrizione, lo studio dell'espressione di mRNA specifici sostituendo consistentemente gli approcci tradizionali di studio dei trascritti come il Northern e la RNase protection. La *in situ* PCR è

un'applicazione metodologica molto raffinata che viene applicata direttamente nelle cellule *in situ* per la ricerca di sequenze bersaglio di acidi nucleici specifici. Questa metodica riesce a coniugare la sensibilità della PCR con la morfologia cellulare in modo da fornire una relazione tra le strutture cellulari e l'acido nucleico bersaglio.

La PCR nel suo formato classico di semplice amplificazione di sequenze specifiche di acidi nucleici è una metodica essenzialmente qualitativa. Un'importante evoluzione metodologica della PCR è stata di trasformare questa tecnica da esclusivamente qualitativa a quantitativa in grado, pertanto, di determinare con precisione il numero di copie bersaglio presenti nel campione da analizzare. Uno dei primi approcci di PCR quantitativa fu rappresentato dall'amplificazione dell'acido nucleico bersaglio per un numero ridotto di cicli. Questa strategia permetteva di rimanere nella fase esponenziale della reazione polimerasica evitando così l'effetto *plateau* del prodotto di PCR. Il prodotto ottenuto dall'amplificazione veniva successivamente paragonato con la quantità di prodotto ottenuta dall'amplificazione di concentrazioni scalari note di un campione di riferimento. Tale approccio non era, di fatto, un sistema quantitativo ma più propriamente semiquantitativo e poneva dei problemi rispetto alla qualità del campione da amplificare e al ridotto numero di cicli utilizzati (14) **PCR quantitativa.** Gli approcci meramente quantitativi della PCR sono rappresentati dalle PCR non competitive o competitive. Nel primo caso si realizza una reazione di coamplificazione (utilizzando due diverse coppie di primer) del DNA bersaglio e di un frammento di DNA di riferimento (standard) posto nella reazione in quantità scalari note.

L'amplificazione della sequenza *target* e dello standard sono entrambe influenzate dagli stessi fattori variabili ambientali, in tal modo il rapporto tra i prodotti ottenuti al termine della reazione corrisponde, in teoria, a quello delle rispettive concentrazioni iniziali. Nota la concentrazione dello standard interno, che viene aggiunta in ogni campione, è possibile, pertanto, risalire alla concentrazione iniziale della sequenza *target* del campione. L'impiego, però, di due differenti coppie di primer per due bersagli distinti pone il rischio che la reazione di amplificazione si attui con efficienze differenti determinando una errata quantificazione. Inoltre, l'amplificazione di entrambe le sequenze deve essere mantenuta nella fase esponenziale poiché il raggiungimento della fase di *plateau* di una delle due reazioni ne altera la corretta valutazione quantitativa. Per ovviare a tali inconvenienti si utilizza la PCR competitiva (14). In questo caso lo standard interno è rappresentato da una sequenza competitora, aggiunta in concentrazio-

ni scalari al campione, il più possibile simile alla sequenza bersaglio (ne differisce di poche basi in modo da poter essere amplificata in modo riconoscibile alla rilevazione in gel di elettroforesi rispetto al DNA bersaglio) utilizzando la stessa coppia di *primer* nella reazione d'amplificazione. Tale approccio presenta il vantaggio di essere indipendente da variabili che possono essere presenti nella reazione, di non richiedere il mantenimento della fase esponenziale dell'amplificazione e di quantificare il numero di copie di partenza direttamente su gel di agaroso. Tale metodo, pur essendo una tecnica efficace, ha il problema di essere indaginoso e di richiedere una standardizzazione accurata che lo porta, in genere, ad essere una soluzione poco appetibile per una applicazione diagnostica su larga scala (18).

**Real-time PCR.** Recentemente, è comparso un nuovo approccio di semplice impiego rappresentato dalla *Real-time PCR*. Questo metodo si basa essenzialmente sull'analisi e monitoraggio, durante i cicli di amplificazione, dell'amplificato specifico che viene ad essere quantificato mediante estrapolazioni di tipo matematico rispetto ad una curva di riferimento. Il prodotto amplificato viene ad essere rilevato per la quantificazione attraverso traccianti fluorescenti che sono utilizzati in diversi formati:

1. **SYBR Green:** il metodo più immediato rappresentato da una molecola, *SYBR Green*, che è in grado di emettere un segnale fluorescente in seguito al legame con la doppia catena del DNA rappresentata da un qualsiasi amplificato.
2. **Molecular beacons:** sono sonde a DNA con una caratteristica struttura ad anello e due estremità modificate. Ad un'estremità della sonda è legato un fluoroforo, all'altra un *quencher* non fluorescente. In condizioni normali il fluoroforo e il *quencher* sono legati l'uno all'altro e non viene emesso alcun segnale, mentre, quando la sonda viene aggiunta alla miscela di reazione ibridizzandosi alla sequenza bersaglio, le due estremità si separano ed il fluoroforo emette fluorescenza. Le sonde sono aggiunte alla miscela di reazione prima di iniziare l'amplificazione e, man mano che la PCR procede, il prodotto amplificato si accumula e le *molecular beacons* si legano al loro bersaglio emettendo fluorescenza del colore caratteristico del fluoroforo prescelto (11).
3. **Sonde TaqMan o hydrolysis probes:** il sistema utilizza l'attività esonucleasica 5'-3' della Taq polimerasi, ovvero la sua capacità di staccare nucleotidi all'estremità 5' di una sequenza di DNA a doppia elica. Nella miscela di reazione viene introdotta una sonda costituita da un oligonucleotide, complementare alla sequenza target, che porta alle sue estremità due fluorofori uno detto

reporter e l'altro *quencher*. Nella fase di *annealing* sia i *primer* sia la sonda si ibridizzano con il bersaglio. La vicinanza delle due molecole, tuttavia, non permette la produzione del segnale fluorescente. Durante l'estensione del *primer* la Taq polimerasi incontra la sonda ibridata e la idrolizza utilizzando la sua attività 5'-3' esonucleasica; il reporter dissociandosi emette un segnale fluorescente, che aumenterà in modo proporzionale alla sua concentrazione. La reazione di ibridazione dei *primer* e la digestione della sonda da parte della Taq avviene ad ogni ciclo di PCR, il segnale si somma ad ogni ciclo e il valore finale sarà quindi correlato alla quantità del prodotto della PCR stessa (6).

4. **Sonde di ibridazione o Hybprobes FRET:** consistono in una coppia di oligonucleotidi che si legano adiacenti l'uno all'altro sul DNA bersaglio. Una sonda è legata ad un fluoroforo e viene detta "donatore", l'altra, legata ad un fluoroforo diverso, "accettore". Quando le sonde ibridizzano con la sequenza target durante la fase di *annealing*, il fluoroforo del donatore eccitato, trasferisce l'energia al donatore che emette fluorescenza. L'intensità del segnale è direttamente proporzionale alla quantità della sequenza target.

La quantificazione in automatico viene ad essere possibile grazie ad una generazione nuova di strumenti come il *Light Cycler* o ABI PRISM 7700 che sono in grado, attraverso un software dedicato, di gestire sia l'esecuzione della reazione sia la quantificazione delle copie di partenza attraverso dei metodi di analisi matematica della curva del campione e della curva degli standard. Il vantaggio della metodica di *Real-time PCR*, indipendentemente dai formati utilizzati, risiede nella rapidità di esecuzione, nell'assenza di manipolazioni dei campioni successive all'amplificazione e, soprattutto nella automazione della quantificazione e della gestione del risultato stesso.

### Applicazioni nella diagnostica clinica

Dalla sua introduzione, la PCR ha avuto una rapidissima diffusione in tutte le aree della biologia grazie alle sue enormi potenzialità applicative, alla rapidità di esecuzione (tempo estremamente ridotto rispetto alle metodiche tradizionali) ed alla sua estrema specificità e sensibilità. La capacità di amplificare e di modificare una specifica sequenza di DNA con una procedura semplice e automatizzata, grazie al miglioramento della metodologia e delle strumentazioni oggi disponibili, ha permesso, in breve tempo, la

sua diffusione ed applicazione nel laboratorio diagnostico.

La diagnostica molecolare sta assumendo, infatti, un ruolo sempre più importante tra le tecniche di routine, soprattutto in campo microbiologico, per la determinazione di DNA o RNA di agenti patogeni batterici e virali. I clinici interessati ai saggi di biologia molecolare, per la prevenzione e la diagnosi di malattie infettive, sono sempre più numerosi e il numero di laboratoristi che eseguono test basati sulla tecnica di amplificazione genica è in costante aumento (12). La PCR rappresenta il metodo di elezione per la diagnosi di una determinata infezione quando non esistano o non siano sufficientemente sensibili le indagini sierologiche, quando sia necessario discriminare ceppi o varianti, o identificare diverse specie, non differenziabili con altri sistemi e nel caso in cui sia utile fornire in tempi brevi un risultato.

L'identificazione di agenti virali e l'individuazione di sequenze specifiche di un determinato virus all'interno della cellula ospite e in un qualsiasi distretto dell'organismo, permette di determinare la distribuzione di quel virus nell'organismo stesso, di studiarne la patogenesi e di monitorare eventualmente l'efficacia di una terapia antivirale.

Insieme alla tradizionale metodica di PCR di tipo qualitativo, trovano sempre maggior sviluppo le tecniche che consentono una quantificazione del DNA o RNA virale. L'esatta quantità del substrato virale nel campione di origine, ha una maggiore valenza diagnostica del semplice riconoscimento qualitativo. L'utilizzo della PCR come metodica diagnostica si è subito rivelata promettente nella diagnosi di infezione nei soggetti infetti da virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV), accelerando la conoscenza della patogenesi, fornendo nuovi mezzi per monitorare l'infezione e permettendo di anticipare la diagnosi di rischio di sviluppo della malattia indipendentemente dalla presenza dei sintomi clinici e dalla diminuzione dei linfociti CD4+ nel sangue periferico (16).

Come è noto, la diagnosi di infezione da HIV-1 si effettua mediante la determinazione degli anticorpi specifici nel siero dell'individuo con test immunoenzimatici. L'eventuale positività viene confermata dal test *Western Blot*. Pur consentendo una sicura diagnosi d'infezione, la ricerca di anticorpi specifici nel siero, presenta, però, precisi limiti nelle seguenti circostanze:

**1)** nella fase iniziale (3-4 settimane) dell'infezione dove la quantità di anticorpi circolanti non è ancora sufficiente ad essere evidenziata dalle tecniche di rilevazione disponibili (il cosiddetto "periodo finestra"), **2)** nei neonati da madri infette da HIV, i quali possiedono anticorpi sierici anti-HIV di origine materna il cui ritrovamento non possiede nessun valore

diagnostico per l'accertamento dell'infezione, **3)** nella percentuale (generalmente modesta) di soggetti infetti in cui i risultati delle indagini sierologiche sono di difficile interpretazione (i cosiddetti risultati "*borderline*") (24).

In questi casi si ricorre all'identificazione del virus mediante isolamento colturale o mediante la determinazione della presenza di sue componenti antigeniche o del genoma virale. L'isolamento virale in coltura rappresenta una tecnica sensibile ma indagativa e richiede tempi lunghi. La determinazione dell'antigene p24 non sempre aiuta nel discernere i casi sierologicamente dubbi (può risultare anch'essa negativa o *borderline*). La ricerca del genoma virale (come provirus-DNA integrato nel genoma cellulare o come RNA nel plasma), mediante PCR, permette, invece, di ottenere una diagnosi certa in tempi brevi, con una quantità di materiale biologico molto ridotta e senza manipolare virus infettante (20).

Un ruolo particolarmente interessante riveste la determinazione quantitativa. Infatti, la possibilità di quantificare in modo accurato la carica virale diventa importante per monitorare la progressione della malattia, per valutare l'efficacia di un trattamento terapeutico, per verificare eventuali insuccessi terapeutici e l'insorgenza di farmaco resistenze (19).

Lo sviluppo di nuove tecniche di biologia molecolare, tutte altamente sofisticate, per la determinazione, nel plasma dei soggetti infetti, della carica virale (espressa come numero di molecole di HIV-1 RNA per ml di plasma), ha reso possibile lo studio della dinamica della replicazione del virus durante i vari stadi dell'infezione.

La carica virale, oltre ad essere una misura diretta della replicazione in atto del virus, rappresenta un marker di importante valore prognostico (13,23). Alti livelli di carica (superiori a 100.000 copie per ml), infatti, sono strettamente correlati con un alto rischio di progressione della malattia e di mortalità ed, inoltre, un corretto e costante controllo del carico virale è essenziale per impostare una adeguata terapia farmacologica e per valutarne l'efficacia, monitorando il paziente nel tempo. Idealmente una terapia antiretrovirale dovrebbe portare alla soppressione del virus circolante in un tempo variabile dalle quattro/otto settimane dall'inizio del trattamento (1, 10).

Accanto al dosaggio del RNA plasmatico a cui fanno riferimento tutti i protocolli dei nuovi regimi terapeutici, oggi si ritiene importante una stima quantitativa anche del DNA provirale, come marker di prognosi dell'infezione nel monitoraggio dei pazienti sottoposti a terapia (3,7). Il virus dell'immunodeficienza acquisita, infatti, può persistere sotto forma di provirus integrato in distretti corporei, definiti "santuari"(come

ad es. i linfonodi, il cervello, gli organi sessuali), che rappresentano dei veri e propri serbatoi difficilmente penetrabili dai farmaci antiretrovirali e in cellule della memoria immunitaria dotate di una lunga emivita come i linfociti CD4 *resting* (8).

Il DNA provirale rappresenta, quindi, un riferimento fondamentale per valutare la consistenza del *reservoir* virale che costituisce uno dei principali ostacoli all'eradicazione dell'infezione (5). A tale proposito abbiamo messo a punto un saggio di PCR quantitativa *Real-time*, sullo strumento *Light-Cycler*, per la determinazione del DNA provirale nelle cellule mononucleate del sangue periferico. Sono stati analizzati i campioni di 50 pazienti HIV-1 sieropositivi sottoposti a terapia antiretrovirale, suddivisi in base al carico virale che rappresenta il parametro principale per verificare l'efficacia della terapia. Come sistema di rivelazione è stato scelto il *SYBR Green* in quanto, rispetto agli altri metodi, offre vantaggi in termini di flessibilità, di applicabilità e di costi, ma ha il limite di legare qualsiasi doppia catena del DNA. Per ovviare, quindi, al problema dell'aspecificità abbiamo sottoposto il prodotto di amplificazione ad un'analisi della curva di *melting* che è possibile effettuare con il *software* a nostra disposizione e che permette di distinguere i prodotti specifici dai prodotti aspecifici (*dimer primers*). La fluorescenza, dovuta alla possibile formazione di dimeri, è stata eliminata dalla quantificazione finale dei campioni mediante l'acquisizione del segnale fluorescente ad una temperatura superiore alla temperatura di *melting* dei *dimer primer*. Per l'amplificazione abbiamo utilizzato una coppia di *primer* specifici nei confronti di una regione conservata del gene *pol*, che amplifica un frammento di 266 paia di basi.

Inizialmente per ottimizzare la metodica e determinare la sua sensibilità abbiamo amplificato concentrazioni scalari di un plasmide, in cui era stato clonato il genoma di HIV-1, trovando, nel 100% dei saggi, una sensibilità di 5 copie. In seguito, abbiamo analizzato anche concentrazioni scalari di DNA estratto da una linea linfoblastoide (8E5LAV) che possiede, integrata nel genoma di ogni cellula, una copia di HIV-1. I risultati hanno mostrato una sensibilità paragonabile a quella del plasmide e quindi abbiamo assunto come curva di riferimento standard quella ottenuta dalle cellule perché venivano sottoposte alla stessa processazione dei campioni.

I risultati ottenuti sui soggetti coinvolti nello studio hanno evidenziato una distribuzione del DNA provirale indipendente dai valori di HIV-1 RNA. In particolare, i soggetti con livelli non evidenziabili di carico virale mostrano quantità consistenti di HIV-1 DNA, variabili dalle 30 alle 1500 copie (9). Questo studio rappresenta una fotografia sullo stato dei pa-

zienti in un determinato momento e, pur riguardando un numero limitato di pazienti, suggerisce che la presenza di livelli di DNA provirale non deve essere sottovalutata (4). I dati, seppure preliminari, potrebbero indicare la possibilità di un continuo "*rebound*" del virus anche in seguito ad un apparente successo terapeutico (4, 9, 21). Uno studio condotto su tale argomento ha messo in evidenza come la frequenza del "*rebound*" virale sia inversamente correlata alla diminuzione delle cellule *reservoir*. Questo suggerisce che intensificando la terapia si aumenta la velocità di esaurimento del pool di cellule ad infezione latente, riducendo, così, i rischi di fallimento terapeutico a lungo termine (15).

## Conclusioni

L'avvento delle metodiche di biologia molecolare nella diagnosi di infezione da HIV-1 ha reso disponibili tutta una serie di tecniche sofisticate che possono essere utilizzate nel monitoraggio dell'evoluzione dell'infezione e della patologia. In particolare, un impiego molto importante riguarda la valutazione dell'efficacia della terapia antiretrovirale.

La *Real-time* PCR per la ricerca del DNA provirale di HIV-1 si propone come una metodologia innovativa che può fornire dati quantitativi di un certo interesse nella determinazione della variazione nel tempo della carica provirale in pazienti sottoposti a terapia antiretrovirale (HAART) in modo da monitorare la consistenza del *reservoir* virale che rappresenta uno dei principali ostacoli per l'eradicazione dell'infezione da HIV-1.

## Bibliografia

1. Baumberger C, Kinloch-de-Loes S, Yerly S, Hirschel B, Perrin L. High levels of circulating RNA in patients with symptomatic HIV-1 infection. *AIDS* 7:S59-64, 1993.
2. Bell J. The polymerase chain reaction. *Immunol Today* 10, 351-355, 1989.
3. Christopherson C, Kidane Y, Conway B, Krowka J, Sheppard H, Kwok S. PCR-Based assay to quantify human immunodeficiency virus type 1 DNA in peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Microbiol* 38, 630-634, 2000.
4. Chun TW, Stuyver L, Mizell SB, Ehler LA, Mican JA, Baseler M, Lloyd AL, Nowak MA, Fauci AS. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 13193-13207, 1997.
5. Chun TW. and Fauci AS. Latent reservoirs of HIV: Obstacles to the eradication of virus. *Proc Natl.Acad.Sci.USA*96:10958-10961, 1999.

6. Desire N, Dehee A, Schneider V, Jacomet C, Goujon C, Girard PM, Rozenbaum W, Nicolas JC. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 39, 1303-10, 2001.
7. Escaich S, Ritter J, Rougier P, Lepot D, Lamelin JP, Sepetjan M, Trepo C. Relevance of the quantitative detection of HIV proviral sequences in PBMC of infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8:1833-7, 1992.
8. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, Quinn TC, Chadwick K, Margolick J, Brookmeyer R, Gallant J, Markowitz M, Ho DD, Richman DD, Siciliano RF. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 14,1295-1300, 1997.
9. Gibellini D, Vitone F, Schiavone P, Ponti C, La Placa M, Re MC. Quantitative detection of Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells by SYBR Green real-time PCR technique. *Clin Virol* 115, 183-189, 2004.
10. Havlir D, Bassett R, Levitan D, Gilbert P, Tebas P, Collier AC, Hirsch MS, Ignacio C, Condra J, Gunthard HF, Richman DD, Wong JK. Prevalence and predictive value of intermittent viraemia with combination HIV therapy. *JAMA* 11, 286:224-6, 2001.
11. Lewin S.R, Vesanen M, Kostrikis L, Hurley A, Duran M, Zhang L, Ho D.D, Markowitz M. Use of real-time PCR and molecular beacons to detect virus replication in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals on prolonged effective antiviral therapy. *J Virol*. 73, 6099-6103, 1999.
12. Marin M.G, *Tecniche di amplificazione genica (dal laboratorio alla pratica clinica)* Ed. Sorbona, 1999.
13. Nolte FS, Boysza J, Thurmond C, Clark WS, Lennox JL. Clinical comparison of an enhanced-sensitivity branched-DNA assay and reverse transcription-PCR for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 36, 716-20, 1998.
14. O'Connell J, Houston A, Kelly R, O'Brien D, Ryan A, Bennett MW, Nally K. Rapid development of a quantitative-competitive (qc) RT-PCR assay using a composite primer approach. *Meth Mol Biol* 193, 93-102, 2002.
15. Ramratnam B, Mittler J, Zhang L, Boden D, Hurley A, Fang F, Macken CA, Perelson AS, Markowitz M, Ho DD. The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. *Nature Med* 6, 82-85, 2000.
16. Respass RA, Butcher A, Wang H, Chaowanachan T, Young N, Shaffer N, Mastro TD, Biryahwaho B, Downing R, Tanuri A, Schechter M, Pascu R, Zekeng L, Kaptue L, Gurtler L, Eberle J, Ellenberger D, Fridlund C, Rayfield M, Kwok S. Detection of Genetically Diverse Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group M and O Isolates by PCR. *J Clin Microbiol* 35, 1284-1286, 1997.
17. Roux KH. Single-step PCR optimisation using touchdown and stepdown PCR programming. *Methods Mol Biol* 192, 31-6, 2002.
18. Siebert PD, Larrick JW. Competitive PCR. *Nature* 359, 557-558, 1992.
19. Stieger M, Demolliere C, Ahlborn-Loake L, Mous J. Competitive polymerase chain reaction assay for quantification of HIV-1 DNA and RNA. *J Virol Meth* 34, 149-160, 1991
20. Sutthent R, Foongladda S, Likanonkul S, Tunsupasawasdeekul S, Roongpisuthipong A, Chearskul S, Raktam S, Louisirirotchanakul S, Wasi C. Detection of HIV-1 proviral DNA by polymerase chain reaction: a preliminary study in Bangkok. *Med Assoc Thai* 79, 142-8, 1996.
21. Tagliaferro L, Menegazzi P, Cataldini S, De Simone M, Chiriaco P, Varnier OE. Drug resistance testing in PBMCs of HIV infected patients. *New Microbiol* 24, 325-32, 2001.
22. Taylor MS, Challed-Spong A, Johnson EA Co-amplification of the amelogenin and HLA DQ alpha genes: optimisation and validation. *J Forensic Sci* 42, 130-6, 1997.
23. Verhofstede C, Reniers S, Van Wanzelee F, Plum J. Evaluation of proviral copy number and plasma RNA level as early indicators of progression in HIV-1 infection: correlation with virological and immunological markers of disease. *AIDS* 8, 1421-7, 1994.
24. Von Sydow M, Gaines H, Sonnerborg A, Forsgren M, Pehrson PO, Strannegard O. Antigen detection in primary HIV infection. *Br Med J* 296, 238-40, 1998.