

Christine Johnson

LA CARICA VIRALE E LA PCR*

**Perché non possono essere utilizzati
per testare l'HIV**

Tratto da "Continuum", vol. 4, n. 4, nov.-dic. 1996

Traduzione italiana di Fabrizio Guidi e Simonetta Pandolfi (con correzioni di Fabio Franchi)

<http://digilander.libero.it/controlinfoaids/>

"La versione biotecnologica della macchina Xerox", è così che la rivista *Forbes* ha chiamato la **polymerase chain reaction (PCR)**. Questa tecnica rivoluzionaria permette agli sperimentatori di prendere un campione contenente una minuscola quantità di DNA e replicare quella sequenza di DNA fino ad averne, invece che appena una o due copie, fin ad un milione di riproduzioni esatte.

Kary Mullis, l'ideatore della PCR, vinse nel 1993 il Premio Nobel per la sua invenzione da un bilione di dollari, divenuta oramai indispensabile per ogni laboratorio genetico. Una delle prime applicazioni della PCR, ironicamente, fu rilevare l'HIV, considerando che lo stesso Mullis non credeva che la sua invenzione ne fosse capace. Mullis afferma che il problema è che la PCR è troppo efficiente - amplificherà qualsiasi DNA che è nel campione, senza riguardo se quel DNA appartiene all'HIV oppure ad un contaminante. E come si decide quale parte del materiale amplificato potrebbe essere HIV e quale di contaminanti, se non si può rivelare l'HIV nel campione senza utilizzare la PCR?

Uno degli argomenti principali contro l'ipotesi HIV/AIDS è che, quando s'impiegano metodi tradizionali per rivelare il virus, l'HIV non è mai stato implicato in quantità significativa nelle persone con AIDS. La coltura del virus, per esempio, era adatta per trovare altri virus, ma non l'HIV. Perché no? Quando la coltura del virus è impiegata per scoprire l'HIV, esso non si è mai visto o trovato nelle culture. La sua presenza è misurata da metodi molto indiretti: analisi per la scoperta dell'enzima trascrittasi inversa o della quantità di antigene p24¹, nessuno dei quali è specifico per l'HIV. Metodi indiretti non sarebbero necessari se fosse presente una quantità significativa di HIV.

In altre parole, se fosse presente una quantità significativa di HIV, le tecniche di laboratorio consolidate nel tempo potrebbero trovarlo. Esse non possono. Ora non è più sufficiente la PCR, ma modificazioni e sviluppi continui della PCR, per tentare di trovare l'HIV.

Questa è come l'idea della "carica virale" cambia, ispirata da due ondate di pubblicazioni scientifiche che affermano che l'HIV si replica attivamente in gran quantità: le pubblicazioni [1, 2], inizialmente, e più recentemente i lavori di Ho e Wei [3, 4], affermano che l'HIV si nasconde nei linfonodi. Ho e Wei tentarono di misurare la "carica virale" in un determinato momento, dopo che ai pazienti furono somministrati farmaci "antivirali". Si riteneva che i farmaci erano in grado di prevenire la riproduzione di qualsiasi nuovo HIV e di conseguenza la carica virale decrescerebbe.

Il rimanente virus, tuttavia, entro pochi giorni muterebbe in una struttura resistente ai farmaci e la carica virale in poche settimane tornerebbe ai livelli precedenti il trattamento. Studiando il fenomeno con un appropriato modello matematico², il rapporto di riproduzione del virus è stato presumibilmente determinato.

Perciò nacque ciò che io chiamo "la teoria del lavandino della cucina del Dr. Ho". Secondo lo scienziato, ogni giorno sono riprodotte miliardi di copie dell'HIV, che infettano miliardi di cellule T4. Queste cellule T non sono distrutte dall'HIV, ma dal sistema immunitario. Esse sono reintegrate ogni giorno, ma negli anni il sistema immunitario perde terreno ed alla fine l'HIV vince. Questo processo è paragonato ad un pozzo con lo scarico aperto, l'acqua vi affluisce da un rubinetto (le nuove cellule T reintegrate) con un rapporto leggermente più basso di quello in uscita (le cellule T infette che sono distrutte).

È importante osservare che la carica virale è studiata facendo completamente affidamento sulla PCR e sulle tecniche ad essa legate. Quest'articolo screditerà la PCR come un metodo accurato per determinare l'infezione dell'HIV e successivamente vuole instillare dubbi che qualsiasi conclusione sull'HIV sia basata sulla tecnica PCR.

Come lavora la PCR

La teoria dell'HIV afferma che esso, come altri retrovirus ipotizzati, contiene RNA ma non DNA: quando si dice che l'HIV infetta una cellula, si pensa che l'enzima transcriptasi inversa trasformi l'RNA nel DNA complementare, che è quindi inserito nel DNA della cellula ospite.

Di conseguenza, se la PCR è usata per analizzare il tessuto umano sulla presenza dell'HIV, si dovrebbe cercare solamente un piccolo segmento fuori dell'intera catena cellulare del DNA. Questo piccolo segmento rappresenta il materiale genetico proposto per l'HIV, che in teoria è stato incorporato nel DNA della cellula. (La carica virale studia il tentativo di cercare l'HIV delle cellule libere. Persino in questo caso, la PCR cerca solamente una parte dell'intero pacchetto genetico proposto dell'HIV, ovvero il genoma, non un intero virus).

La PCR lavora nel seguente modo:

1. **Riscalda lo stampo (template):** si è riscaldato un lungo tratto di DNA contenente un piccolo frammento che deve essere copiato. Le due catene possono essere sciolte a parte a temperatura elevata, quindi riunite insieme lentamente per raffreddamento ("appaiamento"). Le due catene separate sono tra loro complementari. Esse fungono da modelli per le nuove catene.
2. **Aggiunge gli inneschi (primer):** è necessario qualcosa, denominato *innesco (primer)*, per il passo successivo. Si tratta di nucleotidi che formano una breve sequenza di una nuova catena e sono progettati per essere complementari ad una sequenza conosciuta, parte di una sequenza più grande, ed in questo modo è noto dove si fisseranno (ovvero dove si ibridizzeranno) i primers.

Gli inneschi (primer) si agganceranno ad ogni estremo del segmento di DNA che deve essere copiato (il segmento che rappresenta l'ipotizzato materiale genetico dell'HIV). Essi servono per due scopi: il primo consiste nel marcare ogni estremo del segmento testato in modo che solamente quel segmento sarà

ALCUNE NOZIONI BASILARI SUL DNA

La PCR trae vantaggio da indiscutibili proprietà fondamentali del DNA. Il DNA (ed anche l'RNA) è un acido nucleico, e gli acidi nucleici sono composti di "mattoni" nucleotidi. Il DNA esiste sotto forma di due filamenti complementari organizzate con una forma a doppia elica (due spirali intrecciate assieme). Questi filamenti sono unite da molti nucleotidi agganciati insieme per formare una lunga catena di DNA.

Le molecole nucleotidi presentano tre parti differenti: il fosfato e lo zucchero (che formano una spina dorsale oppure una struttura simile ad un nastro), e la base. Esistono quattro tipi di basi: A (adenina), T (timina), C (citosina), G (guanina). Queste basi sono attaccate alla struttura, che è avvolta nella nota doppia elica.

Le basi su una catena si congiungono con le basi dell'altra catena e ciò fornisce al DNA la sua struttura stabile a doppia elica (pensate a due filamenti che si chiudono come una cerniera). La distinta natura di un codice DNA dell'organismo dipende dall'ordine, o dalla sequenza, della cerniera. La distinta natura di un codice DNA dell'organismo dipende dall'ordine, o dalla sequenza, delle basi lungo la catena del DNA.

Ci sono regole particolari su come le basi formano i legami chimici con le altre basi: un A si legherà solamente con un T, ed il C solamente con un G. Una base di una catena che si lega ad una base dell'altra catena è chiamata "coppia di basi complementari". Il loro ruolo è ciò che dà al DNA la sua capacità di replicare esattamente se stesso.

Ogni volta che una cellula si divide, deve fare una copia del suo DNA per la nuova cellula. La doppia catena del DNA prima "apre" se stessa in due filamenti distinti. Ogni singola catena funge da stampo, da cui fare una nuova copia della catena complementare. (In questo modo, la catena #1 funge da stampo per fare una nuova copia della catena #2, e viceversa). La singola catena, quindi, incorpora i nuovi mattoni nucleotidi dal mezzo che la circonda, secondo la regola della coppia di basi complementari. In altre parole, un A disponibile sulla singola catena si attaccherà ad un nucleotide T, un C ad un G, sino a duplicazione completa avvenuta. I due filamenti originali, alla fine del processo, si chiudono tra loro, e i due filamenti copiati fungono da DNA per una nuova cellula.

amplificato, non l'intera catena; il secondo per iniziare il processo di duplicazione.

Le nuove catene sono costruite mattone per mattone mediante l'azione di un enzima, denominato *polimerasi*. Esso costruisce una nuova catena di DNA accanto ad una già esistente. La *polimerasi* non opererà se la vecchia catena (lo stampo (template)) non avrà già su di essa alcuni nucleotidi che formano una breve sequenza di una nuova catena (innesco (primer)). (Se vedete un riferimento a "template-primers", è proprio questo di cui parlano).

In altre parole, la *polimerasi* può solamente formare una nuova catena se la nuova catena si è già parzialmente formata. In natura, quando il vostro stesso DNA viene duplicato, altri enzimi chiamati primasi *DNA*, costruiscono i primer sulla vecchia catena.

Una volta che la *polimerasi* inizia ad agire, procede lentamente lungo la singola catena del DNA (lo stampo (template)), aggiungendo ad essa i nucleotidi, realizzando un mattone alla volta. I primers portano a termine il loro compito divenendo parte della catena appena costruita.

La *polimerasi*, in natura, separa le catene del DNA mentre esse costruiscono la nuova catena del DNA. In questo modo si duplicano copie di DNA, fatte in modo che le cellule come quelle del sangue e della pelle possono dividersi in due nuove cellule, processo essenziale per la vita.

3. **Amplifica:** una volta ancora, dopo aver fuso e quindi appaiato i primers, l'enzima *polimerasi* copia il DNA iniziando da tali caratteri, eseguendo una nuova copia di ogni segmento bersaglio. Questo processo è ripetuto fino a 30-40 volte. Durante ogni ciclo, il numero di segmenti raddoppia, così due segmenti diventano quattro, quattro diventano otto, quindi sedici e così via. Alla fine del processo sono state eseguite circa un milione di copie del segmento originale. Ora avete una gran quantità di DNA, dove in origine ne avevate una molto esigua. Per questo motivo la PCR è reputata in grado di trovare "un ago in un pagliaio".

Ovviamente, è necessario che i primers siano specifici dell'HIV. Se la PCR amplifica ("PCR positiva"), dipende dal fatto che i primers aggiunti si accoppino con parte del DNA contenuto nel campione testato.

Pi avanti, vedremo che è in dubbio la specificità dei primers per l'HIV. Persino se fossero specifici, nel caso che sequenze simili siano presenti nel campione indagato, i primers, in condizioni non restrittive, riusciranno a formare ibridi anche con le sequenze correlate pur essendo un accoppiamento meno che perfetto.

Essi quindi daranno impulso alla *polimerasi*, che inizia l'amplificazione, anche se nessun HIV è presente nel campione iniziale.

Uso della PCR per trovare l'HIV

Un problema per l'ipotesi HIV era che, persino con l'uso della PCR standard, i ricercatori non poterono rilevare molto HIV, se non affatto, sull'HIV in persone con la diagnosi di AIDS. Per risolvere questo paradosso, gli autori delle nuove pubblicazioni sulla "carica virale" aggiunsero due varianti della PCR, che essi vantavano essere molto più efficienti per il rilevamento dell'HIV. Erano la QC-PCR (PCR quantitativa) ed il test DNA derivato (bDNA). Ed improvvisamente - eureka! - furono rilevati miliardi di copie di ciò che si credeva essere HIV. Qui la contraddizione sembra essere sfuggita agli autori della pubblicazione: perché sarebbero necessari nuovi test così potenti per trovare un microbo presente in grande quantità? Sarebbero stati sufficienti i metodi tradizionali.

QC-PCR (PCR quantitativa)

Questo è il test utilizzato nelle pubblicazioni sopracitate da Anthony Fauci (Pantaleo) e Ashley Haase (Embretson), i quali affermarono che l'HIV era "nascosto nei linfonodi". Queste pubblicazioni furono accettate, di fatto, anche se la QC-PCR era, e rimane, una tecnica non valida.

Mark Craddock, dell'Università di Sidney (Australia), espose i principi di, ed i problemi con, QC-PCR nel seguente modo[8]:

"La PCR produce enormi quantità di frammenti di DNA. Partite con una piccola quantità di DNA e dopo ogni ciclo della PCR, la quantità di DNA è compresa tra una o due volte quella di partenza del singolo ciclo. Tale quantità, di conseguenza, cresce esponenzialmente, quindi anche l'errore sperimentale cresce esponenzialmente; dovete quindi prestare attenzione a cosa fate con il processo.

Molte persone hanno deciso che sarebbe possibile stimare la quantità di DNA presente in un campione utilizzando la PCR. Ciò è la cosiddetta "PCR quantitativa". L'idea è di aggiungere al campione da stimare una quantità conosciuta di DNA, simile ma distinguibile, ed amplificarli entrambi insieme. Il presupposto è che il rapporto tra le quantità dei due prodotti rimarrebbe inalterato, e quindi potete determinare la quantità iniziale del campione da tale rapporto, calcolato quando, con la PCR, si è prodotta una quantità sufficiente di entrambi, e sapendo quanto DNA di controllo è stato aggiunto.

Ciò che è assolutamente decisivo è che il rapporto tra le due quantità di DNA deve rimanere perfettamente uguale. Quasi uguale non è più accettabile. La più lieve variazione sarà amplificata esponenzialmente e può produrre un grave errore nella vostra stima.

“Le difficoltà nell’uso della PCR per questi esperimenti è stata evidenziata da Luc Raeymaekers nella rivista *Analytical Biochemistry* nel 1993. Egli osservò che le pubblicazioni sulla QC-PCR contengono dati, che mostrano come il presupposto fondamentale che il rapporto tra le due quantità rimanga costante non si verifica nella pratica. Malgrado ciò, i ricercatori che si occupano dell’HIV continuano ad utilizzare la PCR per quantificare la carica virale. Semplicemente non c’è un modo di sapere se una data stima è corretta oppure è 100.000 volte più grande!”

Todd Miller chiama la QC-PCR “l’ultima moda della scienza” e conviene che se il rapporto tra le due quantità non è uguale, l’unico dato certo sulla stima del modello di partenza (la quantità di HIV RNA proposto nel campione di sangue del paziente) sarà errato.

Come diventa la QC-PCR, con tutti i suoi difetti, un accettabile test HIV? Miller spiega:

“Il modo in cui questa situazione si è manifestata nella scienza moderna è il seguente:

- molte persone tentano di utilizzare questo test per lavoro, e se sono fortunati, scrivono pubblicazioni sulle cautele da adottare per questo procedimento;
- altri utilizzano il test per dare una risposta che “*abbia un senso*” e pubblicano i loro dati come un significativo contributo alla ricerca;
- a causa della nuova e misteriosa natura, rimane come un qualcosa a metà, con pochi utenti e molti scettici.

La maggior parte degli utenti, tuttavia, è maggiormente interessata ai propri fenomeni prediletti piuttosto che ai meccanismi della reazione.”

bDNA

Questo è il test utilizzato nella pubblicazione di Ho. Sebbene non sia la PCR nel vero senso della parola, si può considerare tale giacché incorpora la tecnologia della PCR. La differenza è che il bDNA amplifica il segnale, non il segmento bersaglio. La normale PCR, in effetti, aumenta il segmento bersaglio che potete trovare, mentre con il bDNA è come illuminare il segmento bersaglio con un riflettore, per vederlo meglio. La *Project Inform* è stata piuttosto gentile a mandarmi le spiegazioni di come opera il bDNA [9]:

“Copie di una sonda di DNA sono fissate alla parete di una piccola provetta da laboratorio; quindi vi si pone il campione (la sonda di DNA è un piccolo pezzo di DNA complementare alla sequenza del DNA del segmento

bersaglio). Tale sonda di DNA si lega ad una specifica parte dell’RNA HIV, se si trova nel campione, trattenendo l’RNA nella provetta. Quindi vi si pone un’altra sonda di DNA; un estremo di esso si fissa all’altra parte dell’RNA dell’HIV. L’altro estremo del seconda sonda di DNA ha molte diramazioni ed ognuna termina con un rilevatore chimico che, in determinate condizioni, emetterà luce, che sarà captata dalle apparecchiature di laboratorio. Ogni molecola di RNA dell’HIV può fissarsi ad una di queste strutture con diramazioni ed attaccarsi così ad un piccolo numero di sorgenti luminose, non solo ad una. In questo modo possono essere rilevate quantità molto piccole di RNA del segmento bersaglio, senza utilizzare l’amplificazione della PCR.”

Nella sua prima pubblicazione, Ho non dette alcuna indicazione sui protocolli per questo test o se fosse affidabile. Il lettore fu rimandato ad altre due pubblicazioni, ancora in corso di stampa. Nessun dato, così, era in quel momento disponibile per coloro che volevano verificare questo metodo. I dati ottenuti dal bDNA furono confermati dalla QC-PCR, i dettagli di quest’ultima furono esposti in un testo scritto da quattro collaboratori del gruppo di Wei, ascoltando quelli che potreste chiamare ricercatori indipendenti oppure oggettivi. Nella tradizione della ricerca sull’HIV, le teorie non dimostrate e gli studi imperfetti sono accettati senza riserve ed incorporati nella “visione ufficiale”, prima di essere correttamente convalidati. A causa di ciò, il danno è fatto, e se in seguito si sono scoperti difetti tutto ciò non importa molto.

I meccanismi del bDNA sono complessi: si verificano cinque differenti reazioni di ibridizzazione. L’ibridizzazione è una tecnica standard dove un DNA di prova è posto in un campione e si legherà ad ogni segmento complementare che incontra. Si tratta di un altro test indiretto, che presenta molti problemi. Secondo Bryan Ellison, biologo molecolare, “il solo momento in cui la biologia molecolare lavora è se le cose prima sono purificate. C’è sempre la possibilità di reazioni incrociate, specialmente quando ponete le vostre sonde di prova in un gran minestrone di proteine” (che è esattamente ciò che è il campione ematico da esaminare).

Duesberg evidenziò le seguenti conclusioni: lo stesso Ho, dopo aver effettuato gli appropriati aggiustamenti ai suoi calcoli, riscontrò successivamente che più di 10.000 virus erano implicati dal saggio di bDNA usato (come riportato da *Nature*) il che comporterebbe a meno di una unità di virus infettivo; portando così uno a domandarsi cosa in realtà venga rilevato da questi test [10]. Ciò nonostante queste pubblicazioni speculativi e niente affatto validati sono state accettate come verità sacrosanta!

Secondo Brian Ellison, lo studio di Ho è "Pura fantasia. Non c'è mai stata una sola pubblicazione che dimostri una carica virale."

I problemi con la PCR

L'accuratezza della PCR non è mai stata verificata da un appropriato standard di riferimento (Gold Standard)

Per scoprire se attualmente qualche test diagnostico per l'infezione HIV è valido, è necessario verificare il test mediante uno standard di riferimento indipendente. L'unico standard di riferimento appropriato per questo scopo è l'HIV stesso. In altre parole, il risultato dei vostri test sperimentali, se è la PCR o cos'altro, deve essere comparato con il risultato dell'isolamento del virus in ogni campione testato. Se al momento il virus è rilevato in ogni paziente con la PCR positiva, potreste quindi affermare che la PCR è estremamente accurata per rilevare l'HIV.

Il concetto di isolamento del virus come standard di riferimento è particolarmente importante nel caso dell'HIV, giacché per l'HIV è stato estremamente difficile, se non impossibile, da definire in termini genetici o molecolari. Anche se qualcuno non ha mai portato a termine l'isolamento del virus HIV [11], l'isolamento del virus non è mai stato usato come uno standard di riferimento per qualche test diagnostico dell'HIV, inclusa la PCR. Come si sostiene ora, il bDNA utilizza la QC-PCR come standard di riferimento; la QC-PCR utilizza la normale PCR come standard di riferimento, la normale PCR utilizza i test sugli anticorpi come standard di riferimento, ed i test sugli anticorpi utilizzano qualcos'altro.

Ho notato, nel tempo, che gli studi sulla verifica di un test sugli anticorpi HIV immancabilmente assumono l'affidabilità dei loro test su campioni, che sapevano essere **sieropositivi** o **sieronegativi**. Come sapevano ciò? Semplice: senza una regola aurea, non lo sanno.

Talvolta si è argomentato che "gli studi hanno mostrato" come tali test giungono alla medesima conclusione, oppure confermano reciprocamente le scoperte, e perciò i test devono essere corretti. Non si tratta di un pensiero rigorosamente scientifico. Talvolta i risultati di differenti test convergono reciprocamente, ma ciò non *prova* nulla, niente di più che provare se cinque criminali sono tutti d'accordo nell'avere un alibi di ferro per una rapina in banca.

Eleopoulos, sull'importanza dello standard di riferimento, afferma ciò: "L'uso dell'isolamento del virus, come un mezzo indipendente per stabilire la presenza oppure l'assenza del virus, è tecnicamente riconosciuto come lo standard aureo di riferimento, ed un elemento oltremodo essenziale per l'autenticazione di qualsiasi test diagnostico. Senza uno standard di riferimento, l'investigatore è disorientato e privo di speranza, poiché non ha un criterio autonomo che gli permette di valutare il test che ambisce a sviluppare ... solamente con questo criterio può assicurarsi che la PCR positiva dell'HIV è una conferma della presenza dell'infezione HIV, ovvero, i test sono molto specifici per l'infezione HIV".

Persino il notissimo ricercatore sull'AIDS William Blattner ha ammesso che "una difficoltà nel saggiare la specificità e la sensibilità dei saggi sui retrovirus umani (compreso l'HIV) è l'assenza di uno standard di riferimento aureo. In assenza di standard di riferimento sia per l'HTLV-1 sia per l'HIV-1, la vera specificità e sensibilità per la rilevazione degli anticorpi virali rimane incognita [12]."

Mark Craddock specifica che la QC-PCR non è verificata, e probabilmente non è verificabile. Egli si chiede, "se la PCR è l'unico modo con cui il virus può essere rilevato, come stabilire la precisa carica virale indipendentemente dalla PCR, cosicché possiate essere sicuri che i numeri dati dalla PCR siano corretti?". Tutto ciò è stato apparentemente perduto dai ricercatori sull'AIDS, poiché si raccomanda ogni volta che la PCR, particolarmente la QC-PCR, sia usata come standard aureo di riferimento per altri test HIV [9, 13].

La specificità della PCR non è mai stata determinata

La specificità significa che spesso un test darà risultati negativi in persone non infette. Il tasso di specificità di un test rivela il livello di falsi risultati positivi da aspettarsi quando si usa quel test. Senza uno standard di riferimento per l'isolamento del virus, la reale specificità non sarà mai nota. Serve anche concordanza con i test degli anticorpi, come standard di riferimento, non si è rilevato che la PCR sia molto specifica per l'HIV [6].

Citando uno studio approfondito che coinvolge cinque laboratori con ampia esperienza sulla PCR, Sloand dichiara che la specificità media era del 94,7% [14]. La specificità era bassa, fino al 90%. I risultati degli anni '90 sembrano essere favorevoli, ma in realtà non è questo il caso. Il numero di falsi sieropositivi comparato con i veri sieropositivi dipende dalla prevalenza dell'infezione HIV in qualunque popolazione testata [15] - più bassa la prevalenza, maggiori i falsi sieropositivi.

Sloand commenta che se i livelli di specificità raggiunti in questo studio fossero applicati alla popolazione

dei potenziali donatori di sangue" (i donatori di sangue ora costituiscono una popolazione generalmente a bassa prevalenza), allora "... per ogni infezione vera scoperta e tenuta nascosta, 1.800 donatori non infetti sarebbero classificati come positivi alla PCR e 3.500 come indeterminati alla PCR. La PCR, chiaramente, non è adatta per un normale screening di sangue trasfuso" e, di conseguenza, per qualsiasi popolazione a bassa prevalenza. Con una specificità del 90%, non sarebbe adatta per testare alcuna popolazione.

In un fax che ho ricevuto nel 1994 dal **Centers for Disease Control** (CDC), che riguardava la PCR, si affermava che "Non è nota né la sua specificità né la sua sensibilità" e che "la PCR non è raccomandata né autorizzata per i normali scopi diagnostici [16]".

In breve, "Non è stata determinata la specificità di qualsiasi tipo di PCR, per il genoma HIV [5]".

I primers della PCR non sono specifici

Secondo Eleopulos, Turner e Papadimitriou, "Il minimo requisito [supponendo che un segnale positivo dalla PCR, oppure in generale ibridizzazione, dimostri la presenza dell'infezione HIV] è la precedente dimostrazione che i primers della PCR e le sonde d'ibridizzazione appartengono ad un unico retrovirus, HIV, e che la PCR e le reazioni di ibridizzazione sono specifiche dell'HIV". Turner mi disse: "Le argomentazioni sul genoma della PCR richiedono in maniera assoluta l'isolamento dell'HIV. Come si conosce, altrimenti, l'origine dell'acido nucleico?"

Eleopulos disserta sulla realtà di un genoma distinto dell'HIV. Ammettendo la sua esistenza nell'interesse della disputa, offre la seguente prova per dimostrare che la PCR non è specifica per l'HIV [17]:

- non c'è nessuna sicurezza che le sonde di acido nucleico per l'HIV ed i primers della PCR siano specifici dell'HIV, poiché la maggior parte delle sonde, se non tutte, usate per saggi di ibridizzazione, comprese le sonde della PCR e dei primers, si ottengono dall'HIV cresciuto in colture di tessuto utilizzando cellule (denominate linee cellulari) estratte da un paziente con leucemia con cellule T4, una malattia che Gallo sostiene causata da un retrovirus simile all'HIV, ovvero l'HTLV-1. E recentemente si sostiene che un retrovirus è stato isolato da una coltura di cellule non infette da HIV utilizzando un'altra linea cellulare. Le linee cellulari standard, perciò, utilizzate per la crescita dell'HIV hanno evidenziato la presenza di altri retrovirus. Dal momento che persino il metodo, consolidato nel tempo, per isolare il retrovirus (che ancora non è stato utilizzato per l'HIV) non può distinguere un retrovirus da un altro, ovvero non si può essere sicuri che le

sonde per l'HIV di acido nucleico ed i primers della PCR siano specifici per l'HIV.

- I geni dell'HIV presentato ibridizzano con i geni della struttura dell'HTLV-1 e HTLV-2, due altri retrovirus umani. Ciò significa che se le sonde rilevano materiale genetico da questi altri retrovirus, si attaccheranno ad esso e segnaleranno, invece, di aver rilevato l'HIV. Poiché è accertato che il 10% dei pazienti ai quali è stato diagnosticato l'AIDS sono portatori di HTLV-1 e che il normale genoma umano contiene sequenze correlate all'HTLV-1 ed all'HTLV-2, si può anticipare questo tipo di reazione incrociata.
- **Le normali cellule umane contengono centinaia, o migliaia, di sequenze di retrovirus, ovvero piccoli tratti di DNA che si uniscono ad una piccola parte del genoma HIV presentato oppure di altri retrovirus.** Poiché la PCR amplifica spesso soltanto una piccola parte dell'intero genoma di qualunque cosa si stia cercando, come si sa che ciò che si rileva non sia una normale sequenza di geni della cellula che per caso diventano parte di ciò che è presentato come HIV?
- Ulteriore prova che la PCR non è specifica è che la PCR positiva può essere ottenuta da cellule senza acidi nucleici. In questo modo, se non c'è acido nucleico, non c'è alcun DNA, oppure RNA, ovvero certamente non vi sarà alcun HIV.
- Le sostanze chimiche usate in laboratorio nella preparazione di colture di tessuto (chiamate tamponi e reagenti), possono dare segnali positivi alla PCR per l'HIV [18].

La PCR rivela solamente un piccolo frammento di un intero virus

La PCR rivela, nel migliore dei casi, singoli geni e più spesso solamente frammenti di geni. Se la PCR rivela due o tre frammenti genetici su una possibile dozzina di geni completi, ciò non conferma la presenza di tutti i geni (ovvero l'intero genoma). Parte di un gene non equivale ad una parte di un virus completo.

Gli esperti di HIV ammettono che la maggior parte di genomi HIV presentati sono incompleti; non potrebbero mai effettuare la sintesi di un virus completo.

Turner spiega: "Anche se tutti i genomi fossero completi, è come dire, pur avendo il progetto completo, che ciò non significa costruire una casa. Si può portare un intero genoma retrovirale nelle cellule per tutta la vita senza mai generare una particella virale". Questi due problemi rendono ancora più incerto il significato di una PCR positiva.

se nel sangue sono presenti enormi quantità di HIV libero, esse non sarebbero contagiose [17].

La scoperta dell'RNA dell'HIV con la PCR

non significa presenza dell'HIV

Attualmente riecheggia la frase "HIV RNA PCR". Qual è la differenza tra ciò ed il normale vecchio DNA PCR? La normale PCR cerca la versione del DNA di ciò che spesso è assunto essere il genoma dell'HIV; l'RNA PCR cerca la versione RNA, ovvero il virus libero che ancora non ha infettato la cellula.

Con il nuovo concetto che l'HIV si replica attivamente in gran quantità, era quindi necessario scoprire quanto virus libero potrebbe essere presente ad ogni istante. Il virus libero conterrebbe solo RNA, così se la PCR trova molto HIV RNA, si reputa che miliardi di copie di virus libero pullulino nei tessuti del paziente. In altre parole, se si trova l'RNA, si è trovato anche l'HIV. Poiché si crede che l'HIV contenga due catene di RNA, la formula suggerita è: due molecole di RNA = una molecola di virus.

In effetti, la situazione non è così semplice. Nel 1993, durante la fase "l'HIV si nasconde nei linfonodi" della teoria della carica virale, Piatak ed i suoi collaboratori, compreso Shaw, ammettevano che per determinare la quantità di particelle dell'HIV, si deve avere la prova precedente che l'RNA appartiene realmente ad una particella dell'HIV [5]. Tale prova non era presentata. Non è stata stabilita finora nessuna relazione tra la quantità di RNA e la quantità di particelle che possono, o non possono, essere presenti. Nessuno ha stabilito se l'RNA proviene da una particella di virus o da altre parti. Senza l'isolamento del virus, come si conosce l'origine dell'acido nucleico (RNA)?

Il virus esterno alle cellule non è un virus infettivo

Anche se Ho avesse ragione riguardo alla presenza di miliardi di cellule libere dell'HIV nel sangue, il virus esterno alle cellule è, per definizione, un virus non contagioso. È irrilevante come agente patogeno. Perché l'HIV infetta una cellula, la sua proteina di rivestimento, gp120, deve legarsi con il recettore CD4 sulla superficie della cellula. Tuttavia, fino al 1983, Gallo evidenziava che "l'involucro virale necessario per il contagio è molto fragile. Esso tende a staccarsi quando il virus si riproduce dalle cellule infette, rendendo perciò le particelle non in grado di contagiare nuove cellule". A causa di ciò, affermava Gallo, "può essere necessario il contatto cellula-cellula" per l'infezione retrovirale. Poiché il gp120 è "fondamentale per la caratteristica dell'HIV d'infettare nuove cellule" e poiché il gp120 non si trova nelle particelle con cellule libere, anche

La PCR non è standardizzabile o riproducibile

In una recente pubblicazione, Teo e Shaunak commentarono sulla PCR *in situ*: "Nonostante uno sforzo considerevole, la tecnica è ancora praticamente difficile e non è ancora stata provata essere affidabile o riproducibile [19]".

In uno studio che comparava il risultati della PCR con i risultati dei test sugli anticorpi, la PCR fu stimata non riproducibile e "furono osservati risultati di falsi sieropositivi e falsi sieronegativi in tutti i laboratori (la concordanza con i test sugli anticorpi è compresa tra il 40 ed il 100%) [20]".

La PCR è suscettibile di contaminazione incrociata

Piccole quantità di acido nucleico dai precedenti campioni possono contaminare facilmente i campioni attualmente in fase di test, dando risultati di falsi sieropositivi [22]. Persino frammenti microscopici di pelle, o di capelli, dei tecnici di laboratorio possono causare questo problema. Esistono molte sorgenti di contaminazione incrociata e si può avere bisogno "ad ogni passo della procedura, dal momento della raccolta dei campioni fino all'amplificazione finale..."[21]"

Teo e Shaunak hanno raccolto altre cause di falsi sieropositivi: "abbiamo attualmente identificato un numero di fattori che può contribuire alla semplice amplificazione del segmento di bersaglio DNA modello e della generazione di segnali di falsi sieropositivi. Questi fattori includono gli effetti di fissazione, sottrazione di reagente, degradazione del DNA, fine etichettamento del DNA e diffusione di prodotto...si suggerisce moltissima attenzione nell'interpretare i risultati ottenuti utilizzando la PCR *in situ* [19]".

Con la PCR si manifestano

frequentemente falsi sieropositivi

- Uno studio approfondito per quantificare le prestazioni della PCR HIV nell'individuare cellule libere del DNA ha mostrato "un elevato rapporto disturbante di non specifica positività" usando i primers comunemente impiegati (SK 38/39, per la trovata o il gene p24). Infatti, sono stati riscontrati rapporti simili di positività per entrambi i campioni con anticorpi sia positivi sia negativi (18% contro 26%) [23]!
- Su 30 bambini non contagiati, 6 risultavano positivi "occasionalmente alla PCR"[24].

- La PCR eseguita su bambini al disotto dei 12 mesi di età, non contagiati, ha fornito risultati positivi per 9 su 113, 15 su 143, 13 su 137, 7 su 87 ed 1 su 63 [25].
- Su 117 bambini non contagiati, nati da madri affette dall'HIV, 6 risultavano falsi positivi alla PCR, su filo di sangue [26].
- In un approfondito studio sulla PCR, il 54% dei laboratori coinvolti ha avuto problemi con risultati di falsi sieropositivi; il 9,3% del totale dei campioni non contagiati era riportato come positivo [22].
- 1 su 69 anticorpi negativi, era positivo alla PCR [27].
- Un individuo ad alto rischio inizialmente era positivo alla PCR ma negativo ripetendo il test della PCR dello stesso provino in un secondo laboratorio. (27)
- Il gruppo di lavoro sulla PCR del World Health Organization dimostrò gli alti livelli di risultati di falsi sieropositivi ottenuti durante gli studi HIV PCR eseguiti "alla cieca" [22].
- Sheppard ed altri affermarono nei loro studi: "Questa prova dimostrò i risultati dei falsi sieropositivi, persino con algoritmi rigorosi di test, che si verificano con una certa frequenza tra gli individui non infetti; ciò rimane un serio problema. (28)
- Su 327 infermieri esposti all'HIV per puntura d'ago di siringa, 4 avevano uno o più risultati positivi alla PCR e 7 risultati indeterminati. Con successivi test, 11 erano negativi e nessuno sierconvertito oppure ha sviluppato antigeni p24, giungendo alla conclusione che "risultati falsi sieropositivi si verificano persino nei test più rigorosi." (29)

Conclusioni

Fondamentale per la teoria del Dr. Ho è l'idea che l'HIV muta così rapidamente che entro pochi giorni oppure poche settimane è diventato resistente a qualsiasi farmaco "antivirale" che il paziente sta assumendo. Per prevenire ciò, si raccomanda che il paziente prenda un insieme di tre farmaci, che teoricamente colpiscono l'HIV simultaneamente da tutte le parti, quindi riducendo la possibilità che un ceppo resistente sopravviva. Nel frattempo la carica virale deve essere continuamente monitorata con test che costano 200 dollari ognuno. Si pone l'enfasi sul pronto intervento, ovvero curare rapidamente i pazienti sierconvertiti con più farmaci (assumendo che ognuno volesse sapere quando questo evento si manifesta inizialmente) e li assuma per il resto dei suoi giorni.

Anche se non risultano essere accurati, i test della carica virale sono stati fortemente promossi come

necessità dello stato dell'arte per il PWA (People With AIDS), e non è difficile capire il perché. David Brown, nel *Washington Post* (06.02.1996), rivela inavvertitamente il motivo: "I trattamenti aggressivi contro l'HIV saranno probabilmente più costosi persino che in passato. Le misurazioni della carica virale costano circa 200 dollari ciascuna, e le nuove generazioni di farmaci contro l'HIV alla fine saranno probabilmente costosi come quelli che verranno sostituiti".

U.S. News e World Report (12.02.1996) erano più approfonditi, stimando il costo annuale di un inibitore delle proteasi in circa 6.000 dollari ed il costo della combinazione dei tre medicinali compreso tra 12.000 e 18.000 dollari. Al momento è prescritta la combinazione di tre dei quattro farmaci, dove era sufficiente usarne uno (AZT). Come sono considerati necessari sempre più farmaci per "trattare" le persone, molte di esse non hanno risolto nulla con essi, ed è ovvio che ciò per le industrie farmaceutiche è diventato come una vacca da mungere.

La teoria della carica virale ha creato una nuova preoccupazione nel produrre uno stress intollerabile nella vita di persone disperate. Si dice ora che una persona ha un solo colpo ai nuovi farmaci "antivirali", soprattutto gli inibitori delle proteasi. Se non sono assunti al momento giusto, nella giusta combinazione e quantità, o se inavvertitamente se ne assume uno solo, o si abbassa la dose perché quella attuale fa ammalare, il virus diventerà resistente ed i farmaci per sempre inefficaci. E non si possono abbandonare i farmaci, per la stessa ragione, persino se vi fanno ammalare gravemente.

Ogni articolo sull'argomento sinora ha una differente supposizione su come l'intero sistema agirà: nessuno sa se ci si può curare oppure lo stato rimarrà stazionario; nessuno può emettere prognosi a lungo termine per coloro che assumono i tre farmaci (gli inibitori delle proteasi hanno prodotto reazioni avverse gravi in molte persone, e non sarebbe difficile capire il perché). Ogni persona folle abbastanza da impegnarsi per iscritto diventerà una cavia per coloro che non sanno cosa stanno facendo.

Quando smetteremo di permettere di essere usati come cavie per qualsiasi schema rompicapo venga in mente? Quando metteremo un lucchetto ai nostri portafogli e rifiuteremo di pagare per il privilegio di essere avvelenati? Quando smetteremo di supportare i più degradati esseri umani esistenti, coloro che approfittano della sofferenza degli altri?

Con molti ringraziamenti a:

Paul Philpott, già assistente ricercatore in immunologia ed attuale editore di "Reappraising AIDS"; e

Bibliografia

1. Embretson J., Zupanciel M., Ribas J.L. ed altri: "**Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS**"; 1992, *Nature*, 362, pagg. 359-362
2. Pantaleo G., Graziosi C., Demarest J. ed altri: "**HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease**"; 1993, *Nature*, 362, pagg. 355-358
3. Ho D.D., Neumann A.U., Perelson A.S. ed altri: "**Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection**"; 1995, *Nature*, 373, pagg. 123-126
4. Wei X., Ghosh S.K., Taylor M.E. ed altri: "**Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection**"; 1995, *Nature*, 373, pagg. 117-122
5. Eleopoulos E., Turner V.F., Papadimitriou J.: "**Turnover of HIV-1 and CD4 lymphocytes**"; 1995, *Reappraising AIDS*, 3 (6), pagg. 2-4
6. Eleopoulos E., Turner V.F., Papadimitriou J.: "**Is HIV really hiding in the lymph nodes?**"; 1994, letter to *Nature*
7. Duesberg P., Bialy H.: "**Responding to 'Duesberg and new view of HIV'**"; in: *AIDS: virus-or drug-induced*, Kluwer Academic Publishers, Boston, 1996
8. Craddock M.: "**HIV: science by Press Conference**"; 1995, *Reappraising AIDS*, 3 (5), pag. 4
9. Project Inform Fact Sheet: "**PCR tests**"; August 1, 1995
10. Duesberg P., Bialy H.: "**HIV an illusion**"; 1995, *Nature*, 375, pagg. 197
11. Papadopoulos-Eleopoulos E., Turner V.F., Papadimitriou J.M.: "**Is a positive Western Blot proof of HIV invention?**"; 1993, *Bio-Technology*, 11, pag. 696-707
12. Blattner W.A.: "**Retroviruses**"; in: *Viral Infections in Humans, 1989, third edition*, edited by A. Evans, Plenum Medical Book Company, New York, pagg. 545-592
13. Macy E., Adelman D.: "**Letter to New England Journal of Medicine**", December 15, 1988
14. Sloand E., Pitt E., Chiarello R. ed altri: "**HIV testing: state of the art**"; 1991, *JAMA*, 266, pag. 2861
15. Maver R.: "**Testing AIDS tests**"; April 1993, *Rethinking AIDS*, 1 (4), pag. 4
16. **Centers for Disease Control Faxback document #320320**, January 1993
17. Eleopoulos E., Turner V.F., Papadimitriou J., Causer D.: "**Factor VIII, HIV and AIDS in hemophiliacs: an analysis of their relationship**"; 1995, *Genetica*, 95 (1-3), pagg. 25-30
18. Conway B.: "**Detection of HIV-1 by PCR in Clinical Specimens**"; in: *Techniques in HIV research, 1990*, edited by Aldovini A. and Walker B.D., MacMillan, New York, pagg. 40-45
19. Teo J.A., Shaunak S.: "**PCR in situ: aspects which reduce amplification and generate false-positive results**"; 1995, *Histochem. J.*, 27, pag. 660
20. Defer C., Agut H., Garbarg-Chenon A. ed altri: "**Multicentre quality control of polymerase chain reaction for detection of HIV DNA**"; 1992, *AIDS*, 6, pag. 659
21. Bootman J.S., Kitchin P.A.: "**an international collaborative study to assess a set of reference reagents for HIV-1 PCR**"; 1992, *J. Vir. Meth.*, 37, pag. 23
22. Bootman J.S., Kitchin P.A.: "**Reference preparations in the standardization of HIV-1 PCR: an international collaborative study**"; 1994, *J. Vir. Meth.*, 49, pagg. 1-8
23. Busch M.P., Henrard D.R., Hewlett I.K. ed altri: "**Poor sensitivity, specificity and reproducibility of detection of HIV-1 DNA in serum by polymerase chain reaction**"; 1992, *J. AIDS*, 5, pag. 872
24. Garbarg-Chenon A., Segondy M., Conge A. ed altri: "**Virus isolation, polymerase chain reaction and in vitro antibody production for the diagnosis of pediatric human immunodeficiency virus infection**"; 1993, *J. Vir. Meth.*, 42, pag. 117
25. Pau M.O., Tetali S., Lesser M.L. ed altri: "**Laboratory diagnosis of infection status in infants perinatally exposed to human immunodeficiency virus type 1**"; 1996, *J. Inf. Dis.*, 173, pag. 66
26. Simonon A., Lepage P., Karita E. ed altri: "**An assessment of the timing of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 by means of polymerase chain reaction**"; 1994, *J. AIDS*, 7, pag. 952
27. Celum C.L., Coombs R.W., Lafferty W. Ed altri: "**Indeterminate human immunodeficiency virus type 1 Western Blots: seroconversion risk, specificity of supplemental tests and an algorithm for evaluation**"; 1991, *J. Inf. Dis.*, 164, pag. 656
28. Sheppard H.W., Ascher M.S., Busch M.P. ed altri: "**A multicenter proficiency trial of gene amplification (PCR) for the detection of HIV-1**"; 1991, *J. AIDS*, 4, pag. 227
29. Gerberding J.L.: "**Incidence and prevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, and cytomegalovirus among health care personnel at risk for blood exposure: final report from a longitudinal study**"; 1994, *J. Inf. Dis.*, 170, pag. 1410