



NB Nel testo inglese sono pubblicati i riferimenti numerici delle voci bibliografiche, mentre mancano nel testo italiano.

LeadershipMedica <http://www.cesil.com/0898/itfrah08.htm>

ALLA RICERCA DEL VIRUS HIV

Analisi del valore dei test utilizzati per l'“infezione da HIV”



Fabio Franchi



ompito del ricercatore è cercare di falsificare quante più teorie è possibile.

È forse un pericolo nella biologia molecolare, ovvero che l'accumulo di dati si spingerà così oltre alla sua assimilazione in una struttura concettuale, che i dati risulteranno infine d'impaccio? Parte della preoccupazione è che l'eccitamento della caccia lascia poco spazio alla riflessione. E ci sono fondi per produrre dati, ma a stento per fermarsi in meditazione.

Karl Popper

Secondo la teoria infettiva dell'AIDS, l'infezione da HIV è attiva fin dalle prime fasi e molto difficilmente può essere eliminata dall'organismo nel corso degli anni. La sua presenza è segnalata da appositi test. Quelli attualmente a disposizione sono fondamentali non solamente per la diagnosi, ma vengono utilizzati come elementi indicativi ai fini prognostici e terapeutici.

John Maddox (1)

Poiché la scienza per definizione è aperta ad ogni controllo ed ogni sua affermazione deve poter essere dimostrata su base a regole logiche, il presente studio si pone l'obiettivo di verificare se vi sia corrispondenza tra i diversi “test per l'AIDS” ed il significato a loro attribuito. Verranno esaminati i principali: quelli anticorpali (ELISA e Western Blot e p24), l'identificazione del virus tramite la coltura, l'identificazione degli acidi nucleici, la sua caratterizzazione genica, le metodiche d'isolamento, le fotografie del virus.

Verrà analizzato e criticato il procedimento seguito attualmente, come presentato in testi specialistici aggiornati, tra cui i testi “AIDS, Biology, Diagnosis, Treatment and Prevention” edito nel 1997, di cui un autore è A. Fauci, ex direttore del National Institute of Health.

Lo studio è posto in altre parole l'obiettivo di rispondere alla domanda cruciale come l'avrebbe formulata il grande filosofo e studioso di metodologia della scienza prof. Augusto Murri: “Perché devo io credere che il significato dei test per l'AIDS corrisponda a un'infezione con il virus HIV?” Egli considerava indispensabile avere, nella vita come nella professione, un'abitudine, quella di criticare prima di accettare una informazione.

ANALISI DEI TEST ANTICORPALI

I test anticorpali esaminati saranno l'ELISA, il Western Blot, il test di cattura dell'antigene p24.

ELISA (fig. 1)

In Italia, per identificare l'infezione da HIV viene in prima istanza utilizzato un test di screening (ELISA), “dotato di

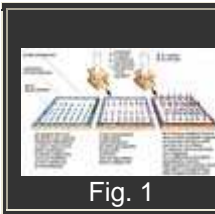


Fig. 1



Fig. 2

ona sensibilità (vicino al 99%) e minore specificità, stimata attorno al 90-95% nel 1988".
 Queste percentuali non debbono però trarre in inganno, infatti il valore predittivo del test varia a seconda della prevalenza dell'infezione in una determinata popolazione. Secondo un'ipotesi formulata dalla Commissione Nazionale AIDS nel 1988, in caso di screening della popolazione carceraria italiana, di fronte a 6.902 veripositivi si avrebbero avuti 1.751 falsi positivi; invece, nel caso dei donatori di sangue, di fronte a 198 veri positivi, ben 99.990 sarebbero stati i falsi positivi (ben 505 volte di più!).



Fig. 3

Il libro già citato "AIDS", gli autori sostengono che i progressivi perfezionamenti del test hanno portato la sua sensibilità al 95% e la specificità al 99,8% in popolazioni ad alto rischio, valori che non si discostano di molto dai precedenti. Viene però ammesso che "il valore predittivo positivo può fluttuare grandemente in dipendenza della popolazione studiata". In realtà così è avvenuto.

Quando ad informazioni pubblicate sull'autorevole rivista medica inglese The Lancet, nel 1990, in Russia vennero fatti 20,2 milioni di test ELISA, di cui 20.000 risultarono positivi, ma solo 112 vennero confermati con il WB; nel 1991, 30 milioni di test ELISA, ben 30.000 risultarono positivi, ma di questi solo 66 risultarono confermati dal Western Blot, cioè una percentuale minima (0,002%).

Unicamente il test ELISA essendo stato disegnato per ottimizzare la sensibilità a spese della specificità, non dovrebbe essere usato da solo per la diagnosi di infezione da HIV-1 senza un test di conferma, sebbene in alcune nazioni sia usato da solo.

Test Western Blot (fig. 2)

Western Blot (WB) viene comunemente usato come un test di conferma dell'infezione da HIV; la combinazione dell'ELISA e del WB vanta ufficialmente "un valore predittivo positivo maggiore del 99% per popolazioni a basso rischio e ad alto rischio".

Attavia neanche il WB appare così specifico come sostenuto se vengono analizzati alcuni dati a disposizione.

Viene riconosciuto persino da fonti ufficiali che "è stato molto difficile codificare la definizione su ciò che dovrebbe essere considerato un Western Blot positivo, a causa di discreti disaccordi".

Finché nel 1993, negli Stati Uniti vi erano ben 5 criteri ufficiali, e solo uno (indicato nel kit diagnostico della Du Pont) era stato approvato dalla FDA (Food and Drug Administration). Questo era il più restrittivo ed era usato da pochi laboratori.

Se fosse stato usato unicamente questo criterio, ben il 50% dei sieropositivi negli Stati Uniti sarebbero stati considerati come non infetti!

In Italia, in una pubblicazione del Ministero della Sanità rivolta ai medici di famiglia, veniva negato che una gestione del genere potesse costituire un problema. Al proposito si affermava: "nella grande maggioranza dei casi, indipendentemente dal criterio utilizzato, il test risulta correttamente classificato positivo quando l'individuo è infetto". Il fatto che i risultati potevano essere ben diversi non veniva neppure menzionato.

In tale situazione il rimedio è stato trovato semplicemente uniformando i diversi criteri senza riconsiderare il passato senza chiarire i motivi scientifici per cui così si è optato.

Il CDC hanno in un secondo tempo identificato i propri con quelli del ASTPHLD e nel 1993 la Croce Rossa statunitense si è adeguata adottando le raccomandazioni del ASTPHLD/CDC". "Secondo l'ente americano ASTPHLD, un risultato positivo deve presentare almeno due delle tre bande maggiori di significato diagnostico (anti-p24, anti-gp120/160, anti-p24)".

La lettura del WB è visiva ed è soggetta perciò ad interpretazione da parte dell'operatore, un fattore di variabilità non trascurabile. "La sua tecnica (ndr: del Western Blot) non è stata standardizzata, l'importanza e le conseguenze delle variazioni verificatesi nei laboratori non sono ancora state misurate. I suoi risultati richiedono d'essere interpretati; i criteri per queste interpretazioni variano non solo da laboratorio a laboratorio, ma anche di mese in mese".

Il Consorzio statunitense per la Standardizzazione della Sierologia Retrovirale (CRSS) ha effettuato un controllo di qualità inviando 19 quote dello stesso siero a 19 laboratori di riferimento ed il confronto dei risultati ha dimostrato una strabiliante differenza del numero di bande e della loro intensità nelle diverse "striscie" (fig. 3).

Le preparazioni antigeniche non sono purificate.

La presenza di bande in posizioni non corrispondenti a noti antigeni virali è un ritrovamento piuttosto comune e si presume sia la conseguenza di contaminanti nella preparazione ...". "Il peso molecolare di queste bande erranti può variare da ditta a ditta o persino da lotto a lotto della medesima ditta produttrice".

Secondo il commento di Zolla-Pazner nel 1989: "Confusione sulla identificazione di queste bande (n.d.r.: i risultati del test Western Blot) è risultata in conclusioni scorrette negli studi sperimentali. [...] potrebbe essere necessaria la reinterpretazione dei risultati già pubblicati".

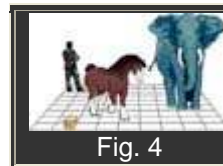


Fig. 4



Fig. 5

Questa auspicata reinterpretazione non è avvenuta fino al momento attuale (marzo 1998).

Bande considerate "specifiche" non indicano in molti casi un'infezione da HIV. Seguono alcuni esempi.

Pur utilizzando i criteri più restrittivi, Lundberg osservò che ben il 10% dei sieri di controllo, che includevano campioni di sangue dalle banche del sangue, avevano un WB positivo.

In uno studio, si rilevava che dal 2 al 49% dei pazienti testati potevano avere una reattività al WB (WB determinato), più frequentemente causata da anticorpi cross-reagenti.

Anche una semplice vaccinazione anti-influenzale può rendere positivo il risultato.

Anche la trasfusione del proprio sangue irradiato produce gli stessi anticorpi.

Tra gli omosessuali o bisessuali che risultano negativi per l'ELISA e la PCR, 20%-30% possono avere una o più bande presenti sul Western Blot.

Dati ancora più sconcertanti riguardano uno studio effettuato su dei cani e pubblicato nel 1990. Scrivendo su Cancer Research, Strandstrom e colleghi riportarono che 72 su 144 (50%) campioni di sangue canino ottenuti dall'ospedale Veterinario dell'Università di California, e testati con il Western Blot reagivano con una o più proteine combinate dell'HIV [gp120--21.5%, gp41--23%, p31--22%, p24--43%].

Poiché gli Autori considerano i cani non infetti con l'HIV, si deve concludere che questi dati sono una ulteriore prova della frequente cross reattività anticorpale con molte "proteine diverse da quelle dell'HIV".

È importante, a questo punto, introdurre alcune considerazioni.

Fatto che le bande siano definite non specifiche se ritrovate singolarmente, ma specifiche per il virus se presenti in numero di due o più di due, appare rifarsi non a considerazioni di ordine biologico, ma ad una convenzione, ad un accordo di tipo "legale", variabile nel tempo e nello spazio (infatti è differente nelle diverse nazioni).

Secondo una convenzione che era accettata fino a non molto tempo fa da molti autori, tre bande nel WB di un donatore di sangue clinicamente sano erano considerate false reazioni positive.

Secondo la medesima convenzione, le tre bande dello stesso donatore di sangue, questa volta presentate ad una società di Assicurazione per una polizza sulla vita, sarebbero state considerate vere positive!

Un gruppo di ricercatori di Perth che ha analizzato a fondo il significato del WB, ha concluso che le proteine considerate virali non sono peculiari del virus HIV e sono indistinguibili da proteine di origine cellulare.

In particolare, secondo lo studio finora non confutato della Eleopoulos e coll. , la gp 41 corrisponderebbe all'actina; la p28 e la p24/25 alle due subunità della miosina (la p24 è la banda aspecifica ritrovata con maggior frequenza in soggetti "non infetti"); la p32 sarebbe identica alla catena beta dell'antigene DR della classe di istocompatibilità II; la gp120-160 non sarebbero nient'altro che oligomeri della gp41.

Antigene p24

La valutazione del test di cattura dell'antigene p24 è stato compreso in USA tra i test che vengono effettuati ad ogni visita di sangue (e considerato come "diretta evidenza del virus HIV").

Secondo Fauci e coll. , viene ritenuto che:

la p24 corrisponde all'antigene del capsido virale (core) che viene evidenziato da un siero contenente i relativi anticorpi monoclonali (anti-p24) associati ad un sistema rivelatore;

il test comunque non è utile come mezzo di screening primario nello stabilire una diagnosi precoce di infezione da HIV;

l'aumentare del livello della p24 presumibilmente correla con l'esplosione nella replicazione virale, rilevabili con vari metodi come la viremia plasmatica;

il livello di p24 usualmente cade sotto la soglia di determinazione con metodi convenzionali come l'anticorpo anti-p24, comincia a formarsi durante la sierconversione e può rimanere in quello stato durante i seguenti anni di infezione asintomatica. Solamente il 20-30% di individui con infezione asintomatica ha livelli rilevabili di p24 sierico.

Nonostante le perplessità sul suo reale significato sono molteplici.

Dati quantitativi indicano che in pazienti sieropositivi possono essere ritrovati 50 pg e talvolta più di proteina del core, la p24.

Se un retrovirus pesa 10⁻³pg e metà del suo peso è costituita da p24₁₅, questa quantità corrisponde allora a circa 100.000 particelle virali; secondo altri autori e secondo altre premesse addirittura a 500.000 particelle!

Quindi, se tutta questa proteina venisse dai virioni, questi pazienti dovrebbero essere altamente viremici.

In altre parole vi dovrebbe essere una corrispondenza diretta tra livelli di p24, "isolamento virale", livelli di "RNA virale" (detta anche "carica virale"). Invece così non è. I risultati sono irrimediabilmente differenti da quelli che

gicamente sarebbero attesi.

Per esempio, un lavoro riporta la presenza di antigenemia ma che nessun virus poté essere isolato da 31 pazienti antigenemici, anche in seguito a coltivazione estesa.

Osservazioni analoghe sono riportate da altri studi.

Ne vengono citati alcuni:

"In metà dei casi in cui una persona aveva un test positivo, susseguentemente ne aveva uno negativo senza assumere alcuna medicazione che avesse potuto alterare i livelli di p24... il test è clinicamente erratico e dovrebbe essere interpretato molto cautamente".

L'antigene p24 non è ritrovato in tutti i soggetti sieropositivi e neppure quelli con AIDS conclamato. In uno studio, PCR (Polymerase Chain Reaction) e la p24 furono usati per scoprire l'HIV in pazienti in vari stadi, da asintomatici all'AIDS. La p24 fu trovata nel 24% dei pazienti e l'HIV-RNA nel 50%.

Oltre il 29% dei riceventi una trasfusione da soggetti sieronegativi, diventa positiva per l'anticorpo anti-p24, pur "in assenza di infezione".

La non specificità del test dell'antigene p24 è così ovvia che è accettata da un'autorità riconosciuta nel campo, Philip Mortimer -e i suoi colleghi- del Public Health Laboratory Service in Inghilterra: "L'esperienza ha dimostrato che la coltura virale, né i test per la p24 sono di gran valore nel test diagnostico. Essi possono essere non sensibili o non specifici".

Conclusione

I test anticorpali (l'ELISA, il Western Blot ed il test di cattura dell'antigene p24) per i numerosi motivi sopra esposti, non sono in grado di segnalare con ragionevole sicurezza di trovarsi di fronte ad un'infezione con il virus HIV e perciò l'asserzione che il valore predittivo positivo del WB possa essere considerato superiore al 99% non corrisponde alla realtà.

Questi test rivelano reazioni di una specificità variabile o meglio indeterminata, tanto da non poter permettere una distinzione tra cross reattività e "infezione da HIV".

IDENTIFICAZIONE DIRETTA DEL VIRUS

È una comune convinzione che i test anticorpali siano stati convalidati e in qualche modo verificati da altri in grado di identificare il virus stesso, test capaci di identificarlo direttamente.

Tuttavia, questa determinazione diretta è tale solo all'apparenza. Si limita a registrare alcuni fenomeni che si crede siano legati in maniera inequivocabile all'HIV.

L'identificazione diretta del virus è divisa in due principali categorie : la coltura virale e l'identificazione diretta degli acidi nucleici virali (Southern Blot, tecniche di amplificazione come PCR, RT PCR, bDNA, NASBA).

Coltura virale

Il isolamento virale usualmente coinvolge una co-coltura delle cellule del paziente con cellule di un donatore non infettate che sono state stimulate con fitoemoagglutinina (PHA) per 3 giorni.

Queste co-culture sono controllate approssimativamente ogni 3 giorni per 28 giorni o più per controllare la formazione di sincizi e la presenza di p24 o la transcriptasi inversa (RT) nel soprannatante della coltura.

La presenza di sincizi (a) o dell'antigene p24 (b) o della RT (c) è considerata evidenza di replicazione virale.

Secondo Gallo ed altri autori anche il ritrovamento di particelle simil-virali in coltura è da ritenersi criterio sufficiente.

Comparsa di sincizi

La comparsa di sincizi è osservata solamente in una parte delle colture considerate infette, ma le stesse sono presenti anche in linee cellulari "non infette" e simili a quelle utilizzate per l'HIV.

Così tali caratteristiche morfologiche cellulari potrebbero essere una caratteristica delle stesse linee cellulari, del risultato delle condizioni di coltura o di entrambi questi fattori.

Antigene p24

La sua mancanza di specificità è già stata menzionata. Le obiezioni al suo utilizzo come test sul siero del paziente non valde anche per il suo utilizzo nelle colture.

uno studio in cui è stato utilizzato questo metodo di "isolamento virale" (la determinazione della p24 in colture con sangue intero non frazionato), risultati positivi sono stati ottenuti in 49 su 60 "individui" (82%) presumibilmente non infetti ma sierologicamente indeterminati e in 5 su 5 donatori di sangue sieronegativi.

Transcriptasi inversa (RT)

tutta la ricerca sull'HIV, è considerata quale prova di attività transcriptasica inversa dell'HIV la capacità di copiare stampo-innesco (template-primer) A(n).dT \leftrightarrow 15 quando incubato con il sopranatante o il materiale proveniente da colture di materiale infetto con il virus dell'AIDS che si separa ad un livello di 1,16 gm/ml (gradiente di densità in crosio).

In molti casi questa attività è considerata sinonimo di "isolamento dell'HIV".

Comunque: (i) Lo stesso stampo-innesco è anche copiato quando incubato con materiale che si separa nella banda 1,16 mg/ml da colture di cellule leucemiche e spermatozoi non infetti; ii) lo stampo-innesco A(n).dT \leftrightarrow 15 può essere trascritto non solo dall'RT, ma anche da altre polimerasi cellulari del DNA. Tutte le polimerasi cellulari del DNA, alfa, beta e gamma possono copiare l'A(n).dT. Infatti, nel 1975, una Conferenza Internazionale sulle polimerasi nucleari del DNA che comprendeva Baltimore e Gallo, definì la polimerasi gamma del DNA, "un componente delle cellule normali", la cui attività può essere aumentata da molti fattori compresa la stimolazione del PHA, un enzima che "copia l'A(n).dT \leftrightarrow 15

con un alto rendimento, ma non copia bene il DNA";

Da quanto sopra si deduce che è errato affermare che tale attività enzimatica sia peculiare dei retrovirus, tanto meno che sia indice inequivocabile della presenza del retrovirus HIV.

Le particelle e le proteine che si separano a livello della banda 1,16 mg/ml potrebbero riflettere materiale prevalentemente non virale; sicuramente gran parte dello stesso materiale è cellulare e proveniente da colture stimolate con PHA (come vedremo meglio in seguito), per cui l'attività transcriptasica potrebbe derivare da esso.

Particelle con l'aspetto retrovirale

Il ritrovamento di particelle simil-retrovirali in coltura fu considerato da Gallo prova di isolamento dell'HIV (allora HTLV-III). Tuttavia Gallo, per isolare l'HTLV-IIIB, usò la linea cellulare H9 (HUT78) e tale linea cellulare rilascia particelle simil-retrovirali anche quando "non infetta con l'HIV".

Leibson ha ottenuto il suo "isolato CBL-I" dalla linea cellulare leucemica CEM, una linea cellulare che ospitava il retrovirus anche quando non infettati con l'"HIV".

Nel 1970, tali particelle erano frequentemente osservate nei tessuti leucemici, in colture di tessuti embrionali e nella maggioranza se non in tutte le placente umane.

Le particelle di tipo C mature od estroflesse appaiono in cellule linfomatose metabolicamente danneggiate ma non infettate con l'HIV.

Le "particelle retrovirali" antigenicamente simili all'HIV sono state trovate in estratti da colture di ghiandole salivari di pazienti con la sindrome di Sjorgen.

È importante ancora, nell'unico studio di microscopia elettronica, sia in vivo che in vitro in cui furono usati adeguati controlli ed in cui fosse stato effettuato un estensivo esame in cieco dei controlli e del materiale del test, vennero trovate "particelle virali indistinguibili dall'HIV" in una varietà di linfadenopatie reattive non associate all'HIV, portando gli autori a concludere: "La presenza di tali particelle non indicano, di per sé stesse, un'infezione con l'HIV" (fig. 4).

Conclusioni

È inevitabile convenire che né la presenza di sincizi, né il riscontro della p24, né l'attività transcriptasica inversa, né la presenza di particelle similvirali (insomma ciascun elemento che definisce positiva una coltura dell'HIV) sono evidenza di replicazione virale", nonostante il significato attribuito sia proprio questo.

Identificazione diretta degli acidi nucleici

Per identificazione diretta degli acidi nucleici vengono intese le tecniche del Southern Blot, la PCR, le tecniche di amplificazione quantitative (RT PCR, bDNA, NASBA). L'identificazione si basa sul riconoscimento e l'amplificazione di piccole sequenze nucleotidiche attribuite all'HIV, non dell'intero genoma virale.

Nella ricerca viene effettuata non su colture, ma direttamente sui tessuti (compreso il sangue) del paziente.

Tecnica del Southern blot (tecnica che permette di separare ed evidenziare acidi nucleici del tipo ricercato)

Il primo studio fu condotto da Gallo nel 1984. Usando la tecnica di ibridizzazione Southern Blot (capace prevalentemente di identificare una sola cellula infetta su 10), furono esaminati i tessuti di pazienti con AIDS, ma deboli

nde furono ritrovate solo in una minoranza di essi.

La PCR (Reazione polimerasica a catena)

La sensibilità della PCR è stimata 92-100% ed è in grado di rilevare una cellula "infetta" su 100.000.

Nonostante per la sua alta sensibilità è altamente soggetta alla falsa positività a causa di contaminazioni anche minime ed ad altri comuni errori di laboratorio.

Sequenze simil-retrovirali sono rinvenibili nel genoma umano in ogni cellula.

Già nel 1991, Imagawa e Detels fecero notare una potenziale fallacia della PCR. "La determinazione di parte del genoma - sostenevano - non significa rivelare un virus completo".

Un altro problema importante è il problema dei falsi positivi. Molti ricercatori contestano l'affidabilità della PCR a causa dell'alto numero di falsi positivi che questo test produrrebbe. La PCR non si è dimostrata riproducibile e falsi positivi e falsi negativi furono osservati in tutti e 7 i laboratori di riferimento coinvolti in un importante studio francese (la concordanza con la sierologia variava dal 40% al 100%). In più, il numero di risultati positivi non differiva significativamente tra i sieronegativi ad alto e a basso rischio.

Esistono numerose altre conferme a queste osservazioni:

Uno studio di efficacia nel valutare le prestazioni dell'HIV PCR nell'individuare DNA virale libero da cellule mostrò "un disturbante alto tasso di positività non specifica" usando gli inneschi comunemente utilizzati (SK38/39, per il gene della p24 o gag). In realtà, simili tassi di positività vennero trovati sia per i campioni anticorpo negativi che per quelli anticorpo positivi (18% contro il 26%).

La PCR (DNA-PCR qualitativa) effettuata su infetti e non infetti risultò in diverse occasioni positiva.

In uno studio di validità della PCR coordinato dal Gruppo di Lavoro sulla PCR dell'OMS, il 54% dei laboratori coinvolti avevano problemi con risultati falsamente positivi; 9,3% dei campioni non infetti erano riportati come positivi.

Gli autori di uno studio multicentrico di valutazione di qualità, affermarono: "questo studio ha dimostrato che i risultati falsi positivi, nonostante l'uso di rigorosi algoritmi procedurali, capitano tra gli individui non infetti con frequenza tale da rimanere un serio problema".

Il riscontro di un numero rilevante "falsi positivi" depone per una notevole mancanza di specificità della PCR.

Tecniche quantitative

Le tecniche "quantitative" sarebbero in grado di calcolare, in modo approssimativo, il numero di virioni per millilitro di plasma utilizzando delle opportune modificazioni di certe tecniche di amplificazione (amplificazione del substrato, come la RT-PCR e la NASBA, o amplificazione del segnale, come la bDNA). Il substrato consiste in "regioni conservate" di un gene presunto virale.

La sensibilità calcolata è: per la RNA RT-PCR di 100 copie di HIV RNA per millilitro di plasma

per la NASBA di 1.000 molecole per millilitro

per la bDNA (branched DNA) di 10.000 molecole per millilitro.

Finché nel 1994 si riteneva che l'HIV fosse presente in piccole quantità nei tessuti dei soggetti asintomatici e con AIDS e che infettasse poche cellule (1 linfocita su 1.000-100.000). Nel 1995 due studi sembrarono dimostrare invece che l'HIV si replicava molto attivamente fin dalle prime fasi dell'infezione. Le nuove tecniche sopra menzionate permettevano apparentemente di rivelare grandi quantità di virus che prima erano sfuggite all'osservazione. Tuttavia se negli infetti vi fosse una massiccia infezione, come alcuni dei più conosciuti esperti sostengono, l'ibridizzazione con il Southern blot sarebbe stata più che sufficiente per rilevarla. Non dimentichiamo che un sorprendente risultato sia con la Southern Blot standard sia con la PCR era "la scarsità o l'apparente assenza del DNA virale in una parte considerevole dei pazienti".

Un significativo lapsus freudiano di John Maddox conferma i sospetti: secondo Maddox "sia Ho che Wei ed i loro colleghi furono in grado di arrivare alle loro allarmanti conclusioni solamente dopo una decade di ricerche sull'HIV in cui avevano studiato in équipe con dei matematici e poiché essi furono in grado di usare nuove tecniche per rilevare i bassi livelli di virus coinvolto".

Le incompatibilità logiche dei risultati sono macroscopiche ed evidenti.

Vi è infatti mancanza di correlazione tra p24 e tecniche di amplificazione genica. (Abbiamo già menzionato il fatto che la p24 è considerata "prova diretta di identificazione dell'HIV").

Nessuna correlazione venne trovata tra il livello di p24 e la RT-PCR.

La determinazione della carica virale era altamente sensibile quando paragonata alla misurazione della p24 (più del 90% dei pazienti aveva un carico virale rilevabile mentre solo il 40% aveva una p24 rilevabile), ma nei campioni

positivi il livello di antigene e del carico virale aveva una significatività solamente borderline. Nessuna correlazione venne osservata tra il carico virale quantificato con la NASBA o con Amplicor e la concentrazione con l'antigene p24. Nessuna correlazione fu osservata tra la dose infettiva, la carica virale determinata con NASBA o con l'Amplicor (RT-PCR).

Vi è mancanza di correlazione anche tra RT-PCR ed altri test. In uno studio su soggetti vaccinati, un gruppo di quattro campioni di siero risultarono positivi alla RT PCR durante un periodo di 11 mesi, incluso un risultato di circa 10^{4-5} copie /mL, ed un quinto risultato positivo un anno dopo un soggetto vaccinato, ma "non infetto". Per questo, gli stessi autori avanzarono "dubbi riguardanti la specificità della misura del HIV RNA quale standard aureo per lo screening e la conferma dell'infezione".

Vi è infine mancanza di correlazione tra "virus" e "carica virale". Secondo Piatyak, l'alto livello di "virus" nel plasma era 999 per mille "non coltivabile". Ho et al. hanno dimostrato che 10.000 "virioni" plasmatici contati con la PCR ramificata corrispondono a meno di un virus "infettivo" per ml 64.

In un più recente studio di Ho si può constatare che ad una carica di 500.000 unità (!) corrispondevano 0 (zero!) "virus coltivati". Secondo i dati riportati, al paziente 105 prima della cura (con Ritonavir) erano stati riscontrati 3.000 "virioni"/ml, il cui numero è stato calcolato con il branched DNA assay ad esso corrispondevano più di 1.000 "virus coltivabili" (50% tissue culture infectious doses). Dopo due giorni di terapia e nei giorni seguenti il "virus coltivabile" era 0 (zero). Nel contempo, ai giorni 2, 3 e 4 i "virioni liberi" (ovvero la cosiddetta "carica virale") restava superiore a 500.000. Fino al giorno 7 i "virioni" erano ancora superiori a 100.000.

Un virione è definito come una particella virale completa costituita dall'acido nucleico virale, dal capsid e dalla matricapside (quando presente). La possibile obiezione che un virione difettivo venga "visto" dal branched DNA assay, ma non venga rilevato dai saggi colturali, non risolve il problema della mancata corrispondenza con gli altri test e con l'impossibilità di vedere queste particelle al microscopio direttamente dai tessuti del paziente, senza saggi colturali.

Non fosse stato così, Gallo non avrebbe avuto bisogno di ricorrere a frodi, non avrebbe avuto bisogno di tre anni di faticose ricerche per trovare qualcosa che avesse l'aspetto di un virus. Ci sarebbe arrivato immediatamente insieme ad altri ricercatori.

Mark Craddock, professore della School of Mathematics and Statistics, The University of Sydney, Australia ha commentato: "Cos'è questa grande viremia di miliardi di particelle di RNA che possono essere visti solamente con una tecnica non documentata (branched-DNA) o la PCR ma non con test funzionale di infettività?"

PER "IL GENOMA VIRALE"

Come già detto, le tecniche di amplificazione genica riguardano piccole frazioni, non l'intero genoma "virale" ed i risultati ottenuti non danno la sicurezza di trovarsi di fronte all'HIV, tanto più che sono francamente discordanti. A questo punto è perciò legittimo domandarsi qual è veramente e com'è fatto l'originale genoma virale. Innanzitutto il gruppo di ricercatori di Perth osserva che "se ci fosse un singolo retrovirus dell'AIDS, un unico retrovirus, allora le differenze genomiche inferiori all'1% dovrebbero essere la regola, non l'eccezione. Per esempio, il vaccino al poliovirus Sabin del tipo 3 differiva dal suo progenitore neurovirulento in solo 10 posizioni nucleotidiche dopo 53 passaggi in vitro e 21 in vivo nei tessuti di scimmie. Nel 1977, l'influenza virale A H1N1 comparve nella popolazione umana dopo 27 anni di inattività con sequenze principalmente identiche a quelle del virus del 1950".

Ma sebbene si sia usato il modello della quasispecie di Eigen per descrivere il genoma dei virus dell'RNA, differenze di sequenza anche dell'1% in questi genomi vengono considerate rappresentare "estrema variabilità". "Molte forze selettive possono stabilizzare le popolazioni virali.

Questi fattori stabilizzanti possono racchiudere la necessità della conservazione della struttura e della funzione delle proteine, una struttura secondaria dell'RNA, siti di glicosilazione e siti di fosforilazione.

Ma vediamo ora qual è il quadro offerto dalla ricerca sull'HIV.

È presto scoperto che "se si testassero due sieropositivi a caso e si analizzasse il materiale genetico del ceppo di uno e dell'altro, essi differirebbero, in media, di circa il 13%". Inoltre, quello che viene considerato il genotipo dell'HIV deriva dalle analisi di sequenza di subgenomi che misurano dal 2% al 30% del totale. Il dato sconcertante è che tali "genomi" variano fino al 40%.

Ma se il 30% del genoma dell'HIV varia fino al 40%, di quanto varia il 100% del genoma dell'HIV?" è la legittima domanda della Eleopoulos e coll.

Non c'è accordo tra gli studiosi sul numero di geni dell'HIV.

Nel 1988 si diceva che il genoma dell'HIV consisteva in 8 geni, nel 1990 in dieci. Nel 1996 Montagnier ha riferito

Il HIV possiede otto geni e secondo Barré-Sinoussi, l'HIV ha nove geni.
Inoltre il numero dei nucleotidi nel "genoma dell'HIV" sembra costante.

quasi specie

Se venivano riscontrate grandi differenze genomiche - persino nello stesso individuo albergherebbero almeno
<+>6 -10 8

varianti genotipiche"

Per tentare di giustificare tale fenomeno è stato introdotto il concetto di "quasi-specie".

Prima degli anni '90, le sequenze dell'HIV erano classificate come europee/statunitensi con differenze della
sequenza del 20-30% tra questi due gruppi.

Dagli anni '90, i ricercatori dell'HIV hanno cominciato a dividere il genoma HIV nei sottotipi A, B, C, D, E, etc.

La base di questo sistema di classificazione è: "(a) i sottotipi sono approssimativamente equidistanti uno dall'altro
nel gene env; (b) l'albero filogenetico env è per la gran parte congruente con l'albero filogenetico gag; (c) due o più
campioni sono richiesti per definire un sottotipo di sequenza".

Tuttavia, "Sono sorti dei problemi nel nominare i sottotipi. Un numero piccolo ma non insignificante di sequenze virali
sono ibride, ovvero si possono riunire, per esempio un sottotipo di sequenza del gag diventa problematico quando
emergono forme altamente divergenti di un dato sottotipo: tali forme sono talvolta designate come A', B', F', ecc. E'
è sempre più necessario avere dei dati che codificano le sequenze sia del gag che dell'env quando si sta rivendicando
una nuova forma o sottotipo".

Prima della metà del 1996 erano stati descritti "almeno dieci"(A-J) genotipi dell'HIV-I principali (M) prevalenti e quelli a
bassa prevalenza (O) e nuovi genotipi vengono ancora segnalati.

È quindi possibile descrivere i "DNA dell'HIV", anche se hanno una variazione del 10%, per non menzionare il 20 o il
30 o il 40%, come una "popolazione di genomi strettamente imparentati, e riferirsi ad essi come a quasispecie"?

L'estrema variabilità del genoma dell'HIV induce a chiedersi che senso abbia riferirsi all'HIV come ad una entità dalla
precisa fisionomia. La differenza genomica tra uomini di razza diversa si aggira attorno all'1 per 1.000, tra uomo ed
orango-tan al 2%, ma per trovare una differenza del 30%, bisogna confrontare nientemeno che uomo e topo, uomo
e asino, uomo ed elefante! Possono correttamente ritenersi il topo e l'asino e l'elefante quasi-specie dell'uomo (fig.
1).

ARTICLE DETECTION (identificazione di particelle)

I retrovirus sono definiti come particelle con rivestimento di circa 100-120nm di diametro con un core che
comprende un involucro proteico e un complesso di ribonucleoproteina.

I retrovirus sono classificati in tre sottofamiglie: Spumavirinae, Lentivirinae and Oncovirinae.

I retrovirus appartenenti all'ultima sottofamiglia sono divisi in particelle di tipo A, B, C e D.

È non chiaro quale di questi debba appartenere l'HIV, non è ben chiaro. Secondo Gallo nel 1984 si trattava di una particella di
tipo C, ma nel 1985 ammetteva che poteva essere anche del tipo D.

Montagnier e colleghi riportarono inizialmente che era una particella di tipo C, quindi di tipo D, e quindi un lentivirus,
non vero di un'altra sottofamiglia. Secondo Munn ed altri il virus dell'AIDS presenta caratteristiche del tipo C, del tipo D
e dei lentivirus. Fauci ed altri descrissero l'HIV in colture monocitarie/macrofagiche come particelle retrovirali con
caratteristiche di tipo A.

L'HIV pare assumere un'identità così imprecisa, cangiante, da aggiungere ulteriori motivi di perplessità.

FOTOGRAFIE

Diversi ricercatori nel campo dell'AIDS hanno presentato fotografie del virus HIV, ma quelle che si vedono
sono solo particelle similvirali indistinguibili da microvescicole cellulari normali. Queste particelle, in contrasto con i
virus, sono molto instabili quando rimosse dal loro contesto, ed è difficile isolarle e fotografarle in uno stato di vero
isolamento.

I virus veri sono stabili perché essi devono lasciare di nuovo le cellule o gli organismi parassitati. L'uso di
tecniche di centrifugazione non costituisce un problema per separare i virus dai vari contaminanti ed ottenere così il
vero isolamento - quindi fotografarli, quindi evidenziare le loro proteine ed i loro costituenti genetici in modo diretto.

I virus veri sono così stabili che è facile fotografarli direttamente come particelle tridimensionali nel microscopio
elettronico a scansione senza che sia necessario fissarli prima chimicamente.

Al contrario, le microvescicole sono così instabili che esse possono essere fotografate solo con un microscopio

ettronico a trasmis sione, che richiede che siano fissate chimicamente in sezioni molto sottili. Tutto ciò che stato mostrato al mondo intero come micrografie dell'HIV sono sezioni ultrasottili che includono particelle distinguibili da quelle cellulari (vedi figg. 6-8).

LA PROVA DELL'(IN)ESISTENZA DELL'HIV

una importantissima conferma alle argomentate critiche dei ricercatori di Perth è arrivata nel marzo del 1997: due gruppi, uno franco/tedesco e uno del National Cancer Institute statunitense, hanno finalmente pubblicato le micrografie dei gradienti di densità in cui doveva essere presente il virus HIV isolato, puro (fig. 9). Questo dato avrebbe dovuto essere disponibile fin dal momento della scoperta del virus (1983-84), ma nessuno prima l'aveva fatto. Ed il motivo più verosimile è che manca totalmente la corrispondenza tra quello che era stato contrattato e quello che avrebbe dovuto esserci.

Nello studio franco/tedesco le fotografie provengono dalla banda 1,16 gm/ml.

È impossibile dire da quale densità provengono le fotografie dello studio americano, ma presumibilmente è una densità corrispondente a 1,16 gm/ml (dove si ritrovano i retrovirus).

Eleopoulos et al. rilevano che "gli autori di entrambe le pubblicazioni ammettono che le particelle che sono presenti nel materiale della banda di gradiente e che sono definiti HIV rappresentano solo una frazione molto piccola del materiale totale. Gelderblom et al. affermano che il materiale contiene un eccesso di vescicole cellulari in una dimensione di 50-500 nM, come opposte ad una popolazione minore di particelle virali ... le vescicole cellulari sembrano essere il maggiore contaminante delle preparazioni di HIV arricchite dalla centrifugazione in gradiente di sucrosio".

Riguardo il piccolo numero di particelle considerate HIV non c'è nessuna prova che lo siano veramente.

Al contrario:

1) Le particelle non sembrano avere estroflessioni superficiali. In altri lavori pubblicati da diversi ricercatori, incluso Gelderblom e i suoi colleghi viene espressamente notata l'assenza di queste proiezioni;

2) Le particelle riferite come HIV non sono sferiche ed hanno diametri superiori a 100-120nM. Nella fotografia al microscopio elettronico di Gluschkof e coll., ci sono frecce che puntano a 5 "virioni" senza proiezioni superficiali, le cui dimensioni sono: 121 X 145; 121 X 169; 121 X 145, 121 X 145 e 133 X 145 nM.

Nello studio di Bess e coll. sono indicate un totale di sei particelle di HIV, anch'esse prive di proiezioni di superficie, le cui dimensioni sono 160 X 240; 200 X 240; 280 X 280; 208 X 250; 167 X 250 and 250 X 292 and nM."

In realtà, essi sostengono che quelle sono particelle dell'HIV, ma senza fornire nessuna prova.

Il materiale di quella banda di densità dovrebbero esserci moltissime particelle virali, invece ne sono indicate solo alcune, in mezzo a molte impurità.

Queste particelle hanno solo una vaga rassomiglianza con quelle che dovrebbero essere delle particelle retrovirali".

Un punto fondamentale è che ogni genuina particella retrovirale dovrebbe contenere la stessa quantità di RNA e proteine, né più né meno. Questo significa che se noi consideriamo i diametri delle particelle indicate nei due studi citati, essi sono da 1,14 a 1,96 volte più grandi del massimo previsto per il normale HIV. Traducendo questo in volumi, e confrontando con una particella con diametro di 120nM, le particelle franco/tedesche hanno un volume 750% maggiore, quelle statunitensi uno 750% maggiore", ovvero incompatibile con la definizione di retrovirus!

Ma anche se non è ammesso dagli autori, i dati dei due lavori citati contribuiscono a dimostrare che là dove doveva essere presente l'HIV puro, dell'HIV non c'è traccia.

CONCLUSIONI

Nessuno dei test esaminati appare sufficientemente sicuro per individuare un'infezione da HIV. Paradossalmente, pur essendo la "determinazione diretta del virus" è in grado di rispondere allo stesso quesito, tanto è vero che vi è una conciliabile discordanza dei risultati ottenuti con le varie metodiche che ne vengono perciò invalidati.

Il più non risulta dimostrata l'esistenza di un'entità che possa ragionevolmente chiamarsi "il virus HIV", sia nelle sue componenti proteiche, sia nel genoma, sia come particella fisica. Il vero significato dei test è meglio compreso se viene esaminata la loro origine.

Per provare l'esistenza di un nuovo virus sia il gruppo di Montagnier nel 1983 che quello di Gallo nel 1984

compararono il soprannatante di colture ritenute infette in gradienti di densità. Considerarono - erroneamente - che il materiale che si separava al livello di 1,16 mg/ml fosse costituito da "pure particelle di HIV".

Le proteine presenti in questa banda e che sono reattive con i sieri di pazienti con AIDS (ma non solo con i loro sieri) sono considerate proteine dell'HIV. Ugualmente, una particolare frazione di RNA ritrovata nella medesima banda di separazione fu considerata il genoma del nuovo virus. Da allora, alcune di queste proteine sono usate per ricavare i reattivi per alcuni test o come immunogeni per produrre negli animali di laboratorio gli anticorpi utilizzati per altri test

un procedimento simile venne seguito con certi frammenti di RNA). A questo punto la spiegazione degli esperimenti di Gallo effettuati nel 1984 appare più chiara: utilizzò un miscuglio di proteine (ritenute virali ma in realtà cellulari) per immunizzare i conigli ed ottenere così un siero che ovviamente reagiva con le stesse proteine presenti nelle colture da cui proveniva.

In altre parole Gallo ha creduto di dimostrare la sua ipotesi (l'esistenza del virus) con altre ipotesi rivelatesi errate come l'attività transcriptasica inversa, la presenza di particelle similvirali, gli anticorpi in quel modo trovati fossero specifici per il virus).

Insomma sono nati i test che ancora oggi vengono utilizzati e perfezionati per porre una diagnosi così impegnativa. Una importante prova della correttezza di questa interpretazione dei fatti sta nei risultati che vennero ottenuti su topi scimmie nel 1991. In questi studi, allo scopo di valutare un potenziale vaccino, alcuni animali di laboratorio vennero iniettati con componenti cellulari da colture non infette con l'HIV: i risultati furono simili a quelli ottenuti con il vaccino vero e proprio" (cioè con "virus da colture infette").

nessuna differenza significativa venne rilevata, tanto che il commento perfettamente appropriato ed ancora attuale di John Maddox fu: "la ricerca sull'AIDS si è capovolta".

In altre parole, per aver ottenuto quei risultati non c'era alcun bisogno di ipotizzare la presenza di un virus HIV.

Robbio Franchi

Specialista in Igiene,

Medicina Preventiva

in Malattie Infettive

dieste

"Alla ricerca del virus HIV Analisi del valore dei test utilizzati per l'infezione da HIV"

Leadership Medica settembre 1998

<http://www.cesil.com/0898/itfrah08.htm>

NB sul testo inglese sono riportati i richiami numerici delle voci bibliografiche, sul testo italiano no.

Leadership Medica®

✉ Mensile di scienza medica e attualità

Copyright 1997© All Rights Reserved



Bibliografia - References

Alla ricerca del virus HIV In Search of HIV

- 1) Maddox J.
Finding wood
among the trees.
Nature 1988;
335:11.
- 2) Metcalf JA,
Davey Jr. RT and
Lane C. Serologic
and Virologic
tests. In De Vita
VT Jr, Hellman S,
Rosenberg SA,
Curran J, Essex
M and Fauci AS.
AIDS: Biology,

Diagnosis,
Treatment and
Prevention, 4th
edition.
Lippincott-Raven
Publishers, 1997;
pp. 177-195.

3) Ministero della
Sanità.
Dipartimento per
la valutazione dei
medicinali e la
farmacovigilanza.
Linee guida per la
terapia
antiretrovirale
dell'infezione da
HIV. Bollettino
d'informazione
sui farmaci 1996;
6-7:3-13.

4) Commissione
Nazionale per la
Lotta all'AIDS.
Gli screening per
gli anticorpi anti-
HIV. The
Practitioner (ed.
it.) 1987; 3:101-
120.

5) Voevodin A.
HIV screening in
Russia (letter).
Lancet 1992;
339:1548.

6) Lundberg GD.
Serological
Diagnosis of
Human
Immunodeficiency
Virus Infection
by Western Blot
Testing. JAMA
1988; 260:674-
679.

7) Ministero
della Sanità.
AIDS - la
diagnosi, il test ,
il counselling.
1992.

- 8) Meyer KB and
Pauker SG.
Screening for
HIV: Can we
afford the false
positive rate?
NEJM 1987;
317: 238-241.
- 9) Zolla-Pazner S.
et al.
Reinterpretation
of HIV Western
Blot Patterns. N
Eng J Med 1989;
320:1280-1.
- 10) Midthum K,
Garrison L, et al.
Frequency of
indeterminate
Western Blot tests
in healthy adults
at low risk for
HIV infection. J
Infect Dis 1990;
162:1379-82.
- 11) Mac Kenzie
WR et al.
Multiple False -
positive Serologic
tests for HIV,
HTLV-1, and
Hepatitis C
Following
Influenza
Vaccination.
Jama 1991;
268:1015-17.
- 12) Kozhemiakin
LA, Bondarenko
IG. Genomic
instability and
AIDS. Biochimica
1992; 57:1417-
1426.
- 13) Strandstrom
HV, Higgins JR,
Mossie K, et al.
Studies with
canine sera that
contain antibodies
which recognize

human
immunodeficiency virus structural
proteins.
Cancer Res 1990;
50:5628s-5630s.

14) Eleopoulos EP,
Turner VF and
Papadimitriou
JM. Is a positive
Western Blot
Proof of HIV
Infection?
Bio/Technology
1993; 11:696-
707.

15) Vogt
Advances in
virus research.
1965; 11:293-
383.

16) Bourinbaiar
AS. HIV and
GAG. Nature
1991; 349:111.
(100 pg p24
equivalent to
1.000.000 HIV
particles).

17) Bialy H.
Where is the
virus? and where
is the press?
BIO/Technology
1988; 6:121.

18) Bourinbaiar
AS. HIV and
GAG. Nature
1991; 349:111.

19) Paul DA, Falk
LA, Kessler A et
al. Correlation of
serum HIV
antigen and
antibody with
clinical status in
HIV-infected
patients. J Med
Virol 1987;
22(4): 357-63.

20) Todak G,

Klein E, Lange M
et al. A clinical
appraisal of the
p24 Antigen test,
p. 326. In: Vol. I,
Abstracts VII
International
Conference on
AIDS, Florence,
1991.

21) Delord B,
Ottmann M,
Schrive MH et al.
HIV-1 expression
in 25 infected
patients: A
comparison of
RNA PCR, p24
EIA in Plasma
and in situ
Hybridization in
mononuclear
cells, p. 113. In:
Vol. I, Abstracts
VII International
Conference on
AIDS, Florence,
1991.

22) Genesca J,
Jett BW, Epstein
JS & Bloggs.
What do Western
Blot
indeterminate
patterns for
Human
Immunodeficiency
Virus mean in
EIA-negative
blood donors?
Lancet 1989;
ii:1023-1025.

23) Mortimer P,
Codd A,
Connolly J, et al.
Towards error
free HIV
diagnosis: notes
on laboratory
practice. Pub
Health Lab

Service Microbiol
Digest 1992;
9:61-64.

24) Valore
Predittivo

Positivo =
 $VP/(VP+FP)$; VP
= veri positivi, FP
= falsi positivi.

25) Poiesz B,
Ruscetti FW,
Mier JW, et al. T-
cell lines
established from
human T-
lymphocytic
neoplasias by
direct response to
T-cell growth
factor. Proc Natl
Acad Sci 1980;
77:6815-6819.

26) Schüpbach J,
Jendis JB, Bron C
et al. 1992. False-
positive HIV-1
virus cultures
using whole
blood. AIDS 6:
1545-1546.

27) Gallo RC,
Sarin PS and Wu
AM. On the
nature of the
Nucleic Acids
and RNA
Dependent DNA
Polymerase from
RNA Tumor
Viruses and
Human Cells, p.
13-34. In:
Possible
Episomes in
Eukaryotes. LG
Silvestri (Ed.).
North-Holland
Publishing
Company,
Amsterdam,
1973.

- 28) Whitkin SS,
Higgins PJ and
Bendich A.
Inhibition of
reverse
transcriptase and
human sperm
DNA polymerase
by anti-sperm
antibodies. Clin
Exp Immunol
1978; 33:244-
251.
- 29) Sarngadharan
MG, Robert-
Guroff M, Gallo
RC. DNA
polymerases of
normal and
neoplastic
mammalian cells.
Biochim
Biophysica Acta
1978; 516:419-
487.
- 30) Weissbach A,
Baltimore D,
Bollum F, et al.
Nomenclature of
eukaryotic DNA
polymerases.
Science 1975;
190:401-402.
- 31) Robert-
Guroff M,
Schrecker AW,
Brinkman BJ, et
al. DNA
polymerase
gamma of human
lymphoblasts.
Biochem 1977;
16:2866-2873.
- 32) Lewis BJ,
Abrell JW, Smith
RG, et al. Human
DNA polymerase
III (R-DNA):
Distinction from
DNA polymerase
I and reverse

transcriptase.

Science 1974;
183:867-869.

33) Weissbach A,
Baltimore D,
Bollum F, et al.
Nomenclature of
eukaryotic DNA
polymerases.

Science 1975;
190:40-402.

34) Gallo RC,
Salahuddin SZ,
Popovic M, et al.

Frequent
Detection and
Isolation of
Cytopathic
Retroviruses
(HTLV-III) from
Patients with
AIDS and at Risk
for AIDS.

Science 1984;
224:500-502.

35) Dourmashkin
RR, O'Toole CM,
Bucher D, Oxford
JS. The presence
of budding virus-
like particles in
human lymphoid
cells used for
HIV cultivation.

Vllth
International
Conference on
AIDS. Florence:
1991:122.

36) Minassian A,
Merges M,
Garrity R, et al.

Induction of a
SMRV-like
retrovirus from a
human T-cell line
after treatment
with the mutagen
ethyl-methyl-
sulfonate. J
Acquir Immun

Defic Syndr
1993; 6 (No
6):738.

37) Gallo RC,
Wong-Staal F,
Reitz M et al.
1976. Some
Evidence For
Infectious Type-C
Virus in Humans,
p. 385-407.
In: Animal
Virology. D
Baltimore, AS
Huang, CF Fox
(Eds.). Academic
Press Inc., New
York.

38) Panem S,
Prochownik EV,
Reale FR et al.
Isolation of Type
C Virions from a
Normal Human
Fibroblast Strain.
Science 1975;
189:297-299.

39) Panem S,
Prochownik EV,
Knish WM and
Kirsten WH. Cell
Generation and
Type-C Virus
Expression in the
Human
Embryonic Cell
Strain HEL-12. J
Gen Virol 1977;
35:487-495.

40) Panem S. C
Type Virus
Expression in the
Placenta. Curr
Top Pathol 1979;
66:175-189.

41) Brennan JK,
Lichtman MA,
Chamberlain, JK
and Leblond P.
Isolation of
Variant

Lymphoma Cells
with Reduced
Growth
Requirements for
Extracellular
Calcium and
Magnesium and
Enhanced
Oncogenicity.

Blood 1976;
47:447-459.

42) Garry RF,
Fermin CD, Hart
DJ et al.

Detection of a
Human
Intracisternal A-
Type Retroviral
Particle

Antigenically
Related to HIV.
Science 1990;
250:1127-1129.

43) O'Hara CJ,
Groopman JE and
Federman M. The
Ultrastructural
and
Immunohistoche-
mical

Demonstration of
Viral Particles in
Lymph Nodes
from Human
Immunodeficiency
Virus-Related
Lymphadenopathy
Syndromes.

Hum Pathol 1988;
19:545.

44) Shaw GM,
Hahn BH, Suresh
KA et al.

Molecular
Characterization
of Human T-Cell
Leukemia

(Lymphotropic)
Virus Type III in
the Acquired
Immune

Deficiency
Syndrome.
Science 1984;
226: 1165-1171.

45) Schleupner
CJ. Detection of
HIV-1 infection.
In
Mandell/Douglas/
Bennet. Principles
and Practice of
Infectious
Diseases.
Churchill-
Livingstone, IV
Edition, 1995:
1253-67.

46) Lanka S.
HIV: reality or
artifact?
Continuum May
1995; 4-9.

47) Imagawa D,
Detels R. HIV-1
seronegative homo
sexual man. N
Engl J Med 1991;
325:1250-1.

48) Sloan EM et
al. HIV testing -
State of the Art
(Review). JAMA
1991; 266:2861-
6.

49) Defer C et al.
Multicentre
quality control of
polymerase chain
reaction for
detection of HIV
DNA. AIDS
1992; 6:659-63.

50) Busch MP,
Henrard DR,
Hewlett IK et al.
The Transfusion
Safety Study
Group. Poor
sensitivity,
specificity, and
reproducibility of

detection of HIV-1 DNA in serum by polymerase chain reaction. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5(9): 872-7.

51) Paul MO, Tetali S, Lesser ML et al. Laboratory diagnosis of infection status in infants perinatally exposed to human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 1996, Jan; 173(1): 68-76.

52) Bootman JS, Kitchin PA. An international collaborative study to assess a set of reference reagents for HIV-1 PCR. *J Vir Meth* 1992; 5:872.

53) Sheppard HW, Ascher MS, Busch MP et al. A multicenter proficiency trial of gene amplification (PCR) for the detection of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1991; 4(3): 277-83.

54) Schuurman R, Descamps D, Weverling GJ, et al. Multicenter comparison of three commercial methods for quantification of

human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol.* 1996 Dec; 34(12): 3016-22.

55) Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373:123-126.

56) Wei X, Ghosh SK, Taylor M, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995; 373:117-122.

57) Simmonds P, Balfe P, Peutherer JF, et al. Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *J Virol* 1990; 64:864-872.

58) Maddox J. (review of Hodgkinson book *AIDS, the failure of contemporary science*) *The Guardian Newspaper* 1996 July 5th; page 16.

59) Coste J,
Montes B,
Reynes J, et al.
Comparative
evaluation of
three assays for
the quantitation of
human
immunodeficiency
virus type 1
RNA in plasma.
J Med Virol. 1996
Dec; 50(4): 293-
302.

60) Vandamme
AM, Schmit JC,
Van Dooren S, et
al. Quantification
of HIV-1 RNA in
plasma:
comparable
results with the
NASBA HIV-1
RNA QT and the
AMPLICOR HIV
monitor test. J
Acquir Immune
Defic Syndr Hum
Retrovirol. 1996
Oct 1; 13(2): 127-
39.

61) Gobbers E,
Fransen K,
Oosterlaken I, et
al. Reactivity and
amplification
efficiency of the
NASBA HIV-1
RNA
amplification
system with
regard to different
HIV-1 subtypes.
J Virol Methods.
1997 Jul; 66(2):
293-301.

62) Schwartz DH,
Laeyendecker
OB, Arango
Jaramillo S, et al.
Extensive

evaluation of a seronegative participant in an HIV-1 vaccine trial as a result of false-positive PCR. Lancet 1997 Jul 26; 350(9073): 256-9.

63) Piatak MJ, Saag MS, Yang LC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. Science. 1993; 259:1749-1754.

64) 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; 332:201-208.

65) Perelson AS et al. (Ho D included). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. Science 1996; 271:1582-6).

66) Palca J. Draft of Gallo Report Sees the Light of Day. Science 1991; 253:1347-1348.

67) Cohen J. HHS. Gallo

Guilty of
Misconduct.
Science 1993;
259:168-170.

68) Buianouckas
FR. HIV an
illusion. Nature
1995; 375:197.

69) Eleni
Papadopulos
Eleopulos,
Valendar F
Turner, John M
Papadimitriou,
David Causer.
The isolation of
HIV - has it really
been achieved?
Continuum
Sept/Oct 1996;
4(3) S:1-24.

70) Brown P. The
strains of the HIV
war. New
Scientist 1991;
(25th May):14-
15.

71) Salimen MO,
Carr JK, Burke
DS, et al.
Genotyping of
HIV-1. The
human
retroviruses and
AIDS
Compendium on
Line: Web site:
[http://hiv-
web.lanl.gov](http://hiv-web.lanl.gov).
USA: US
Government,
1996: 30-34.

72) Zhu T, Wang
N, Carr A, et al.
Evidence or
coinfection of
multiple strains of
human
immuodeficiency
virus type 1 B an
acute

seroconvertor. J Virol 1995; 69:1324-1327.

73) Kozal MJ, Shah N, Shen N, et al. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. Nat Med 1996; 2:753-759.

74) Gallo R, Wong-Staal F, Montagnier L, Haseltine WA, Yoshida M. HIV/HTLV gene nomenclature. Nature 1988; 333:504.

75) Lazo PA, Tsihchis PN. Biology and pathogenesis of retroviruses. Semin Oncol 1990; 17:269-294.

76) Cunningham AL, Dwyer DE, Mills J, et al. Structure and function of HIV. Med J Aust 1996; 164:161-173.

77) Barré-Sinoussi F. HIV as the cause of AIDS. Lancet 1996; 348:31-35.

78) Wain-Hobson S. Virological mayhem. Nature 1995; 373:102.

79) Blomberg J, Lawoko A, Pipkorn R, et al.

A survey of synthetic HIV-1 peptides with natural and chimeric sequences for differential reactivity with Zimbabwean, Tanzanian and Swedish HIV-1-positive sera. AIDS 1993; 7:759-767.

80) Myers G. Nucleic acids alignments and sequences. The human retroviruses and AIDS Compendium on Line: Web site: <http://hiv-web.lanl.gov>. USA: US Government, 1995: I-1-I-2.

81) Barré-Sinoussi F. HIV as the cause of AIDS. Lancet 1996; 348:31-35.

82) Salimen MO, Carr JK, Burke DS, et al. Genotyping of HIV-1. The human retroviruses and AIDS Compendium on Line: Web site: <http://hiv-web.lanl.gov>. USA: US Government, 1996: 30-34.

83) Gallo RC, Shaw GM, Markham PD.

The etiology of AIDS. In: De Vita V, Hellman S, Rosenberg SA, ed. AIDS etiology, diagnosis, treatment, and prevention. New York: J. B. Lippincott Company, 1985: 31-51.

84) Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). Science 1983; 220:868-871.

85) Klatzmann D, Barr-Sinoussi F, Nugeyre MT. Selective Tropism of Lymphadenopathy Associated Virus (LAV) for Helper-Inducer T Lymphocytes. Science 1984; 225:59-63.

86) Montagnier L. Lymphadenopathy-Associated Virus: From Molecular Biology to Pathogenicity. Annals of Internal Medicine 1985; 103:689-693.

- 87) Munn RJ,
Preston MA,
Yamamoto JK,
Gardner MB.
Ultrastructural
comparison of the
retroviruses
associated with
human and simian
acquired
immunodeficiency
syndromes.
Laboratory
Investigation
1985; 53:194-
199.
- 88) Orenstein JM,
Meltzer MS,
Phipps T,
Gendelman HE.
Cytoplasmic
assembly and
accumulation of
human
immunodeficiency
virus types 1
and 2 in
recombinant
human colony-
stimulating
factor-1-treated
human
monocytes: an
ultrastructural
study. *Journal of
Virology* 1988;
62:2578-2586.
- 89) Lanka
Stephan. No viral
identification:
non cloning as
proof of isolation!
Continuum
Feb/March 1997;
4(5):31-33.
- 90) Gluschankof
P, Mondor I,
Gelderblom HR,
Sattentau QJ. Cell
membrane
vesicles are a

major
contaminant of
gradient-enriched
human
immunodeficiency
virus type-1
preparations.
Virol. 1997;
230:125-133.
91) Bess JW,
Gorelick RJ,
Bosche WJ, et al.
Microvesicles are
a source of
contaminating
cellular proteins
found in purified
HIV-1
preparations.
Virol 1997;
230:134-144.
92) Eleni
Papadopulos-
Eleopoulos. A
critique of the
evidence for the
isolation of HIV
(A summary of
the views of
Papadopulos et
al.) Rethinking
aids web site
(<http://www.virusmyth.com/aids/epsummary.htm>)
1997.
93) Gelderblom
HR, Ozel M,
Hausmann EHS,
Winkel T, Pauli
G, Koch MA.
Fine Structure of
Human
Immunodeficiency
Virus (HIV),
Immunolocalization
of Structural
Proteins and
Virus-Cell
Relation. Micron
Microscopica

1988;19:41-60.
94) Hockley DJ,
Wood RD, Jacobs
JP. Electron
Microscopy of
Human
Immunodeficiency
Virus. J Gen
Virol 1988;
69:2455-2469.
95) Popovic M,
Sarngadharan
MG, Read E, et
al. Detection,
Isolation, and
Continuous
Production of
Cytopathic
Retroviruses
(HTLV-III) from
Patients with
AIDS and Pre-
AIDS. Science
1984; 224:497-
500.
96) Maddox J.
Aids research
turned upside
down. Nature
1991; 353:2.