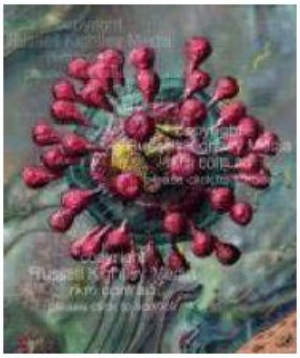
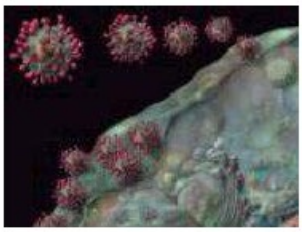
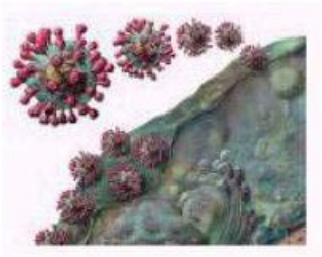
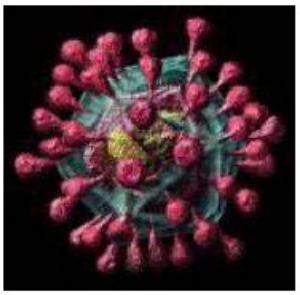
Diagnosi molecolare di infezioni virali

HIV: struttura, ciclo virale e diagnosi dell'infezione AIDS: un'ipotesi alternativa









www.fisiokinesiterapia.biz

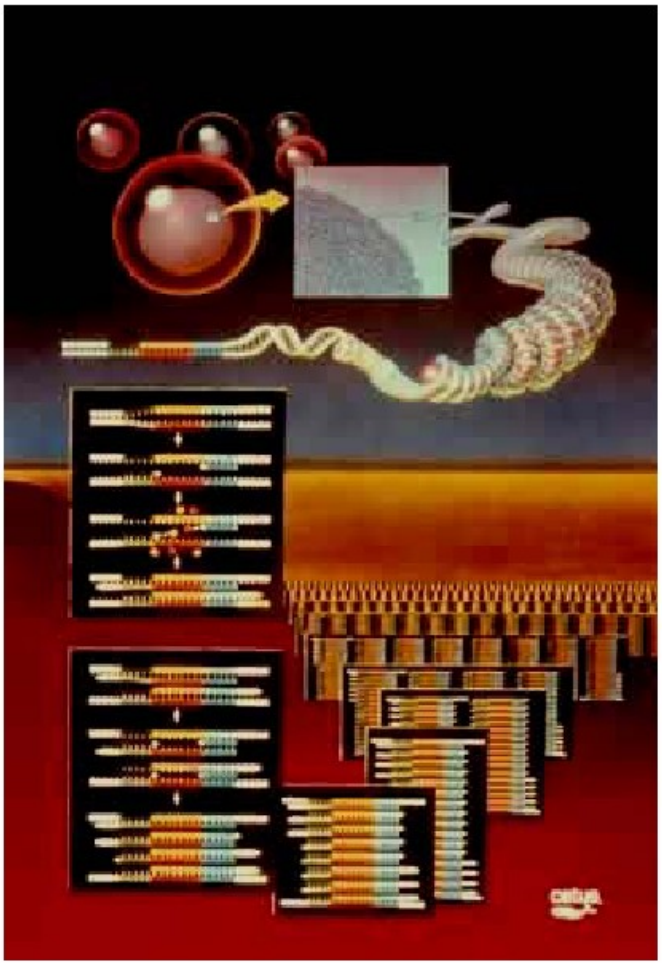
• PCR: basi teoriche e applicazioni

• Diagnosi molecolare di infezioni virali:

HIV (HIV = AIDS?)

• Test di attribuzione/disconoscimento di paternità

• Applicazioni della PCR nello studio di mutazioni geniche

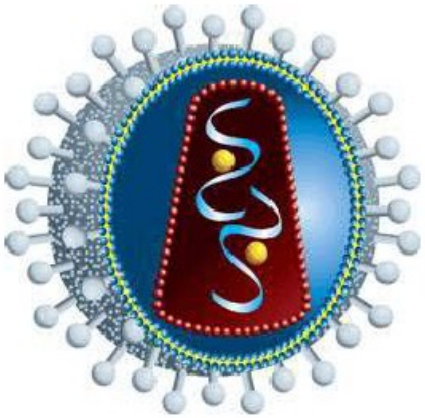


HIV

VIRUS HIV: è ritenuto la causa primaria dell'AIDS (Sindrome da Immunodeficienza Acquisita). E' stato classificato nella famiglia dei Lentivirus.

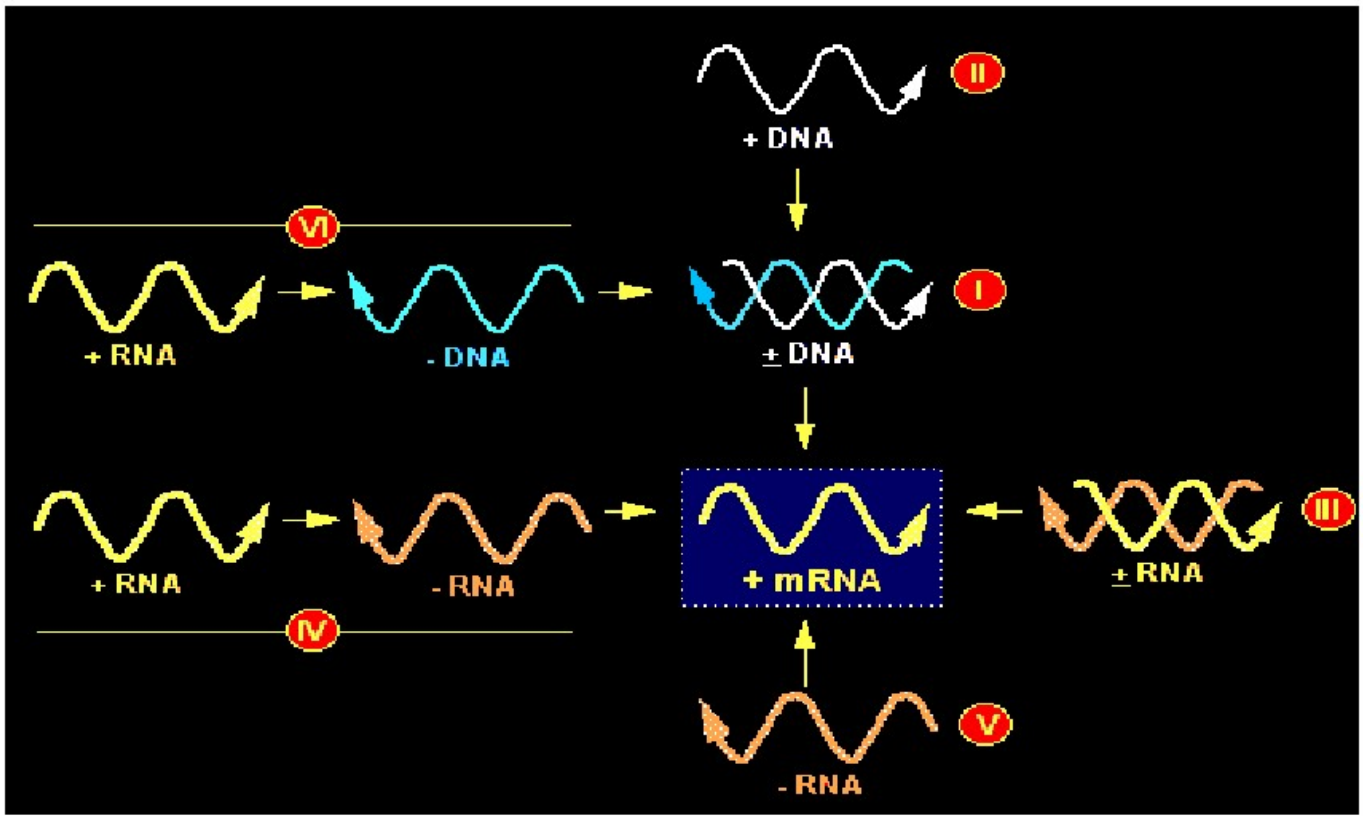
E' un RETROVIRUS, ha la capacità di invertire il normale "flusso di informazione genetica" comune a tutte le cellule, che porta da DNA a RNA e da questo alla sintesi delle proteine.

AIDS - Sindrome da immuno-deficienza acquisita: compromissione delle funzioni del sistema immunitario, con progressiva diminuzione dei livelli di linfociti T CD4+. Definizione dei CDC (Centers for Desease Control), 1982

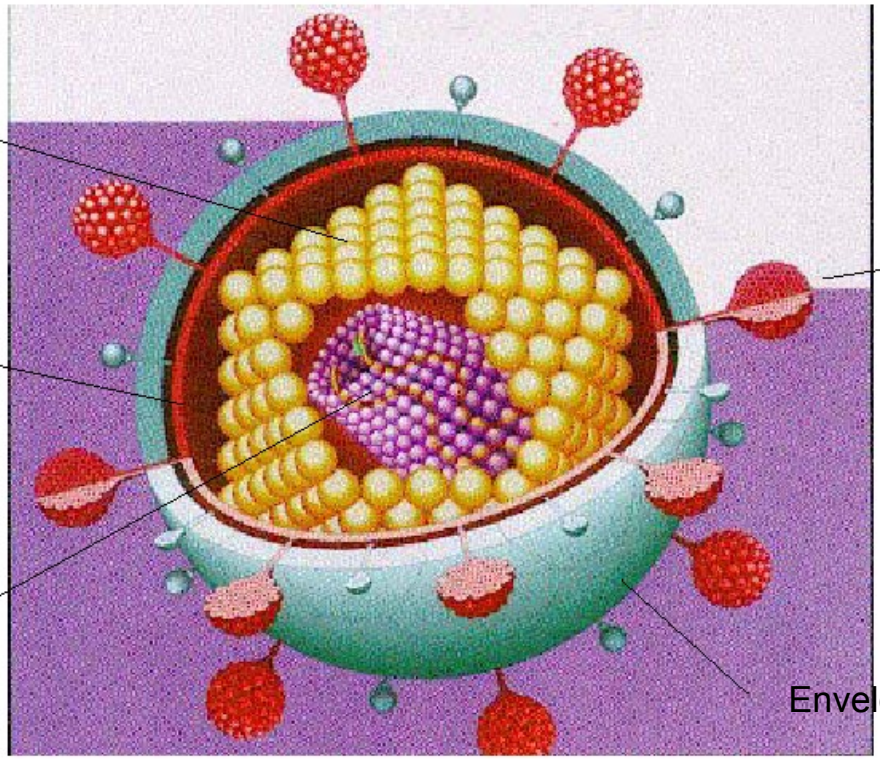


STRATEGIE REPLICATIVE

DEI GENOMI VIRALI



HIV: modello strutturale



Core

gp120

Matrice proteica

Nucleocapside

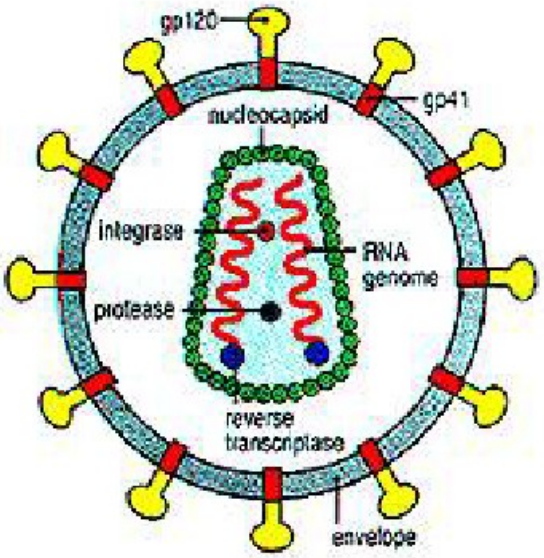
(con RNA e transcrittasi inversa)

Envelope

Dimensioni: circa 100nm

PROTEINE VIRALI

Il virus HIV utilizza le proteine come strumento per aggredire la cellula da infettare e per convertire l’intero metabolismo cellulare in un sistema adatto alla sua stessa replicazione.



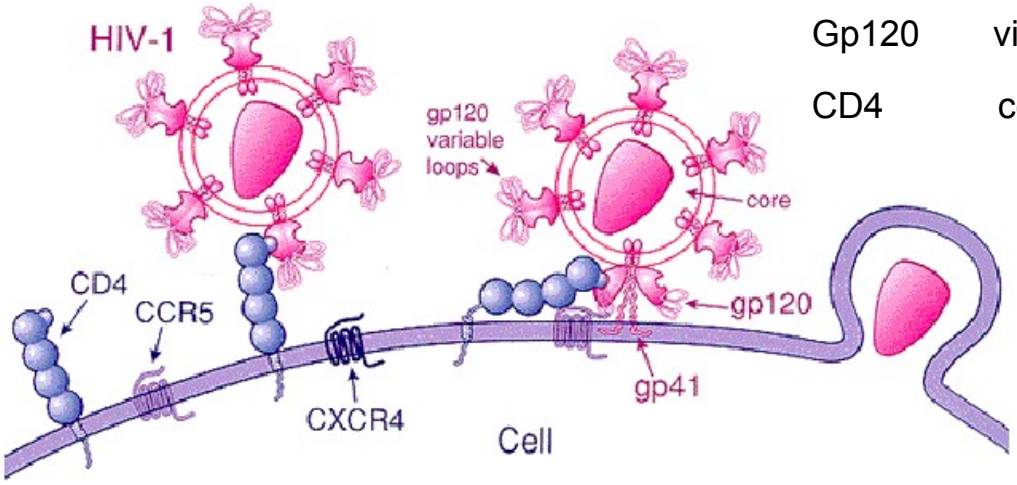
Tutte le proteine virali hanno una funzione specifica.

Le proteine virali possono essere riconosciute da anticorpi specifici: sulla base di questa caratteristica sono stati costruiti i test per rivelare e confermare la sieropositività di un paziente

HIV: RECETTORI CELLULARI

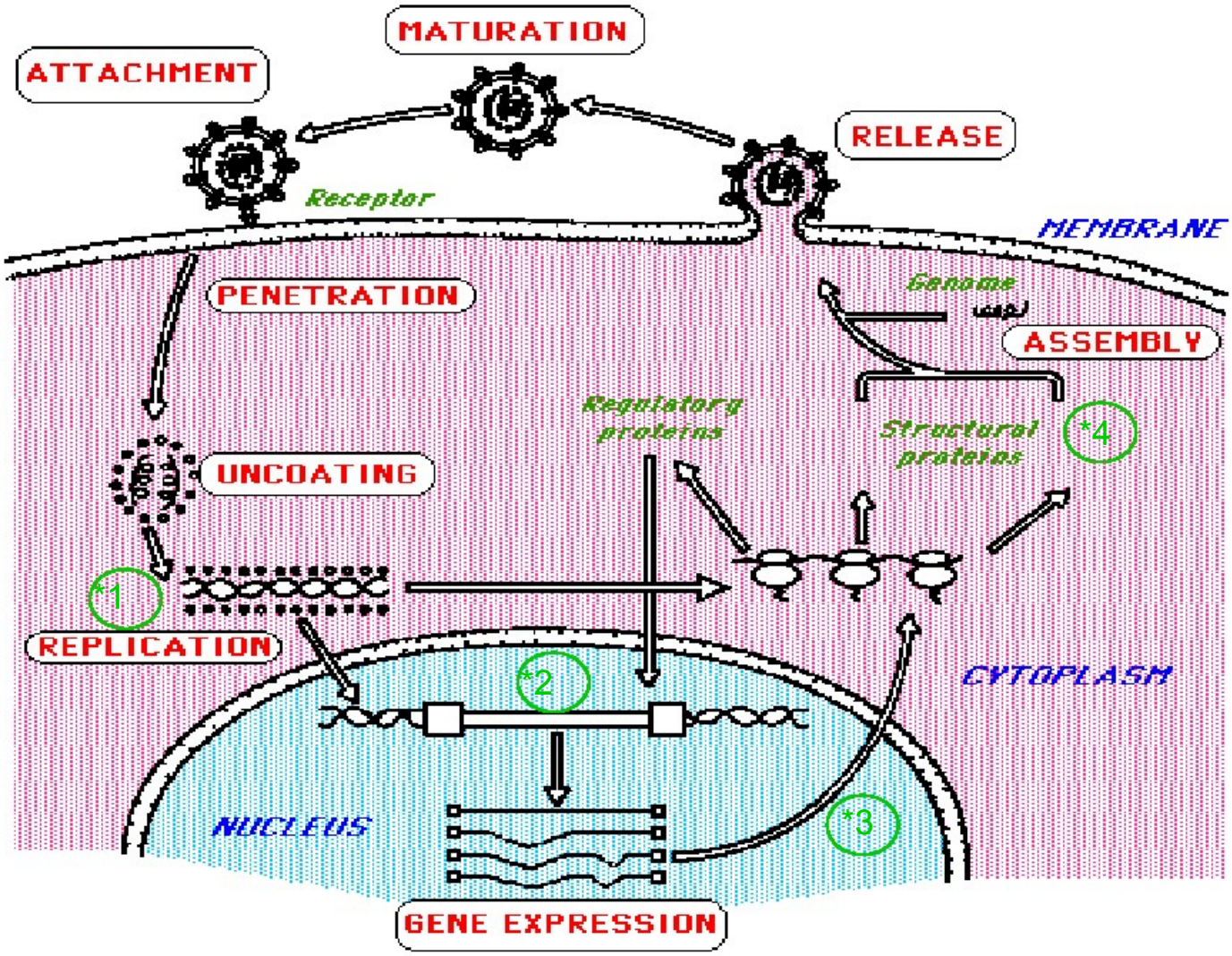
Le cellule umane che esprimono sulla loro superficie la molecola CD4 sono il bersaglio specifico per il virus HIV (linfociti T helper, monociti, macrofagi).

La molecola cellulare CD4 rappresenta il punto di attacco del virus sulla cellula che sarà infettata.

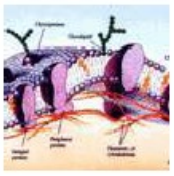


Gp120 virale

CD4 cellulare


MATURATION
ATTACHMENT
RELEASE
Receptor
MEMBRANE
PENETRATION
Genome
ASSEMBLY
Regulatory proteins
Structural proteins
*4
UNCOATING
*1
REPLICATION
*2
CYTOPLASM
NUCLEUS
*3
GENE EXPRESSION

EFFETTI CITOPATICI DELL'HIV



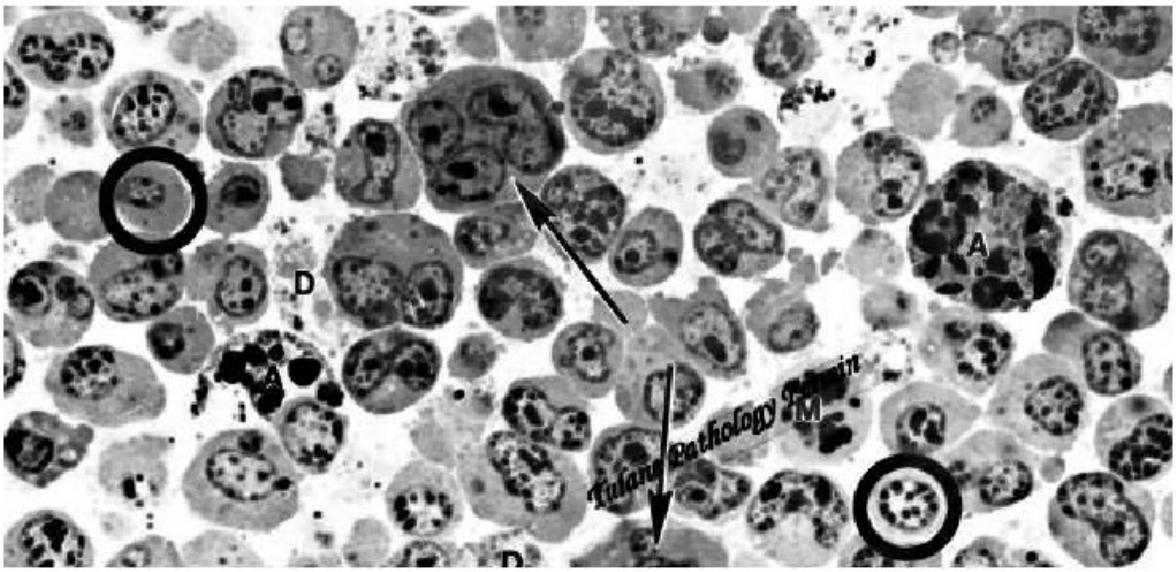
Il virus HIV infetta cellule che esprimono il CD4 sulla superficie. La capacità dell'HIV di produrre lisi delle cellule CD4+ infettate è alla base della grave immuno-deficienza indotta dal virus.

Meccanismi di danno cellulare:

• Induzione della formazione di sincizi multinucleati tra cellule CD4+ infettate e cellule sane. I sincizi sono funzionalmente inattivi e destinati a morire.

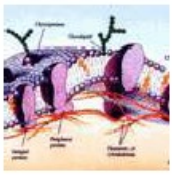
Interazione della gp120 di una cellula infettata con il CD4 di cellule sane.

Le glicoproteine gp120 e gp 41 sono prodotte in largo eccesso dal virus proprio per facilitare questo meccanismo di "aggancio"



CD4 infettati dal virus HIV che formano sincizi multinucleati. Tratto dall'archivio Fermin sul WEB.

EFFETTI CITOPATICI DELL'HIV



• Accumulo di DNA virale non integrato nel citoplasma cellulare

• Alterata produzione di secondi messaggeri intracellulari che comporta alterazioni della permeabilità della membrana plasmatica

• Distruzione delle cellule T infettate con meccanismo auto-immune mediato da anticorpi e cellule citotossiche.

• Quando i linfociti T CD4+ scendono a 200-500 cellule / ml di sangue, i linfonodi cominciano a presentare segni di disgregazione strutturale. Sotto i 200 CD4+ / ml i linfonodi presentano danni estesi e necrosi tissutale; questo rende impossibile l'attivazione dei linfociti T e B: progressione delle manifestazioni cliniche dell'AIDS.

HIV: Protocollo diagnostico

* Evento a rischio di contagio con HIV

0 - 6 settimane

• Il virus si replica nei linfociti T CD4+ e nei linfonodi

0 - 6 settimane

• Ricerca DIRETTA del virus mediante PCR: si ricerca sia l'RNA virale che il DNA integrato nei linfociti

Dopo 6 settimane

• L'organismo comincia a produrre i primi anticorpi diretti contro gli antigeni di superficie del virus

Dopo 6 settimane

• Ricerca INDIRETTA: test ELISA, ricerca di anticorpi anti HIV

• Continua la produzione di anticorpi contro tutte le proteine virali

• Test di conferma Western Blot: studio del tipo di anticorpi presenti nel soggetto siero positivo

• Il virus HIV continua la sua (lenta) replicazione nei linfociti T CD4+

• Monitoraggio dell'RNA virale in circolo mediante PCR (quantitativa)

HIV: Storia naturale della malattia infettiva

Fase 1Fase 2 Fase 3Fase 4
|| ||
Infezione Periodo di incubazione Malattia Decesso o guarigione
||
sierologia HIV neg.HIV pos. HIV pos.HIV pos.

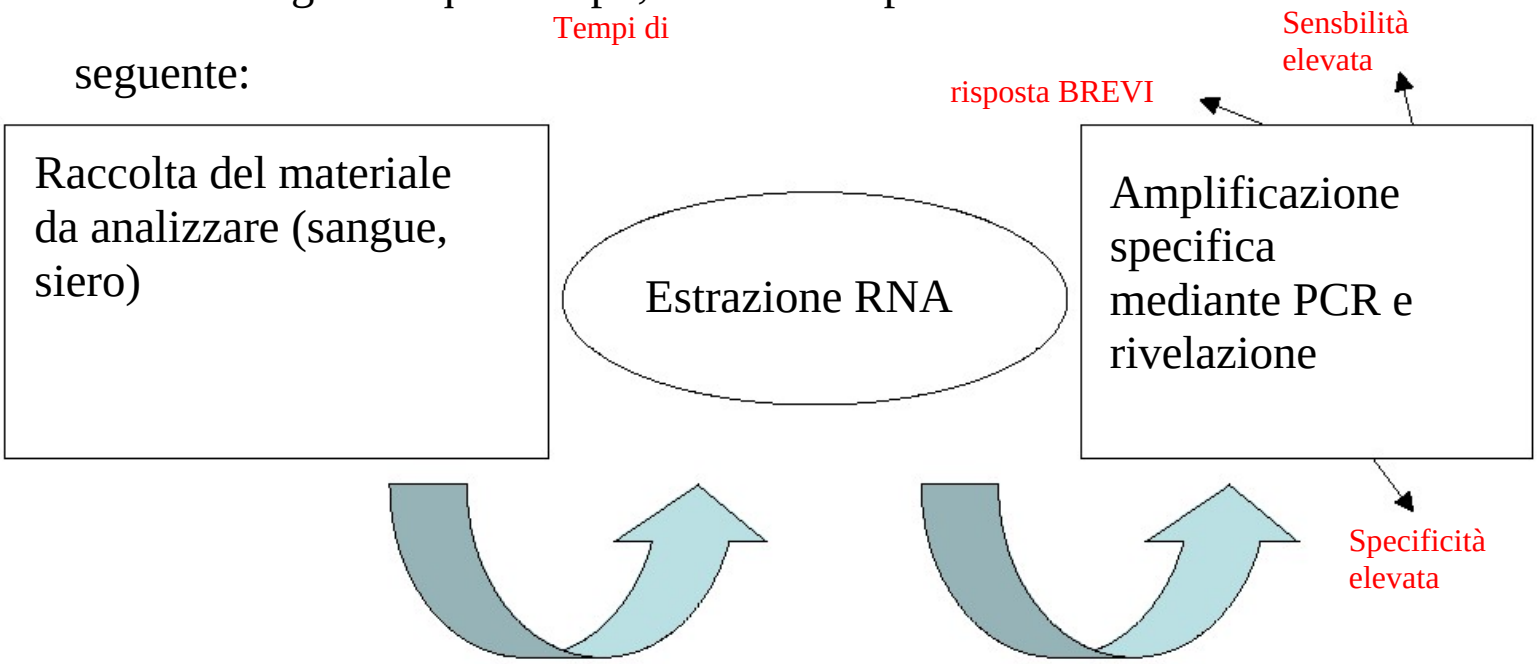
Periodo finestra: la PCR comincia a dare risultato positivo dopo circa 2-3 settimane dal contagio.

Soltanto dopo 6 – 8 settimane diventano positivi gli anticorpi, mediante test ELISA di 4a generazione.

HIV: Protocollo operativo per estrazione RNA e PCR

L'analisi di un campione di siero o plasma per verificare la presenza di HIV prevede alcuni passaggi che consentono l'estrazione e purificazione dell'RNA virale.

Per un'indagine di questo tipo, lo schema operativo è il seguente:



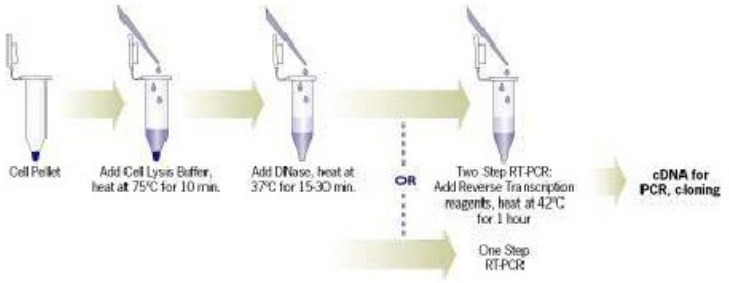
HIV: Estrazione RNA e retrotrascrizione

• Campione: siero o plasma, 100 µl

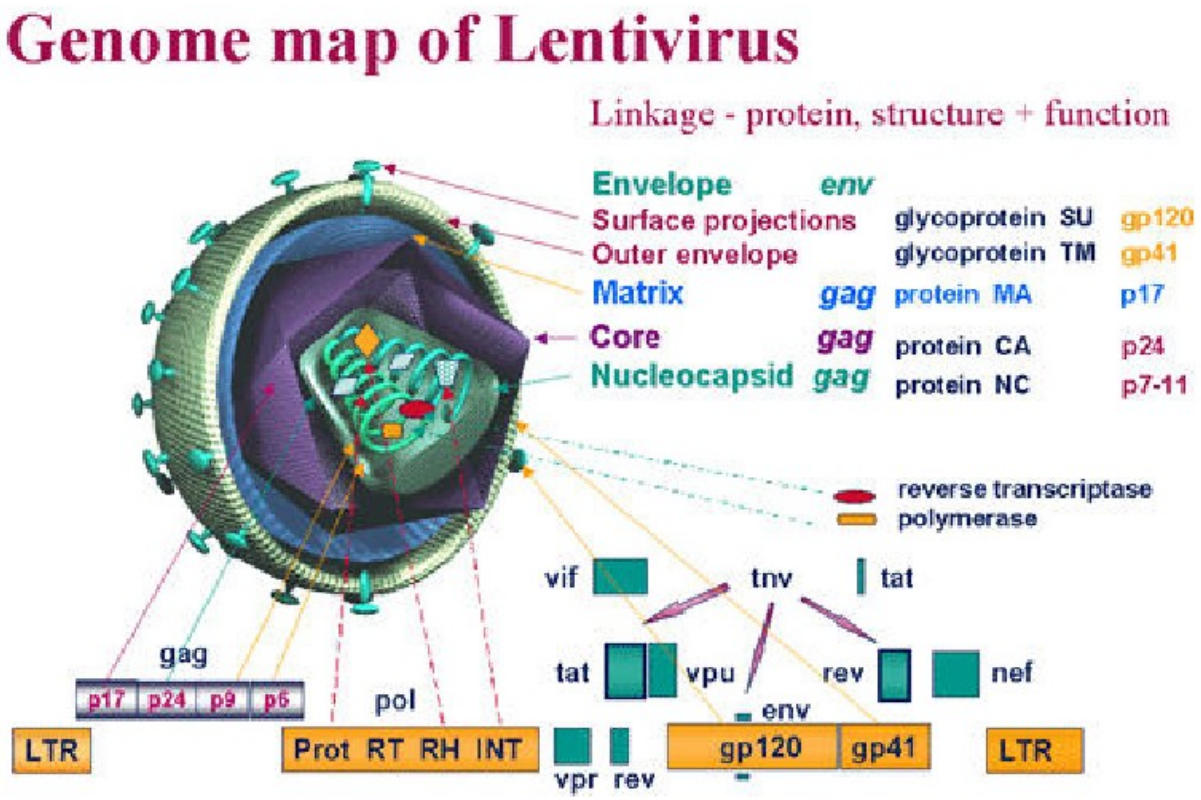
• Estrazione con Guanidinio Isotiocianato e precipitazione con isopropanolo e etanolo 70%

• Si risospende l'estratto in 100 µl di acqua senza RNasi.

• Retro-trascrizione a 42°C per 1 ora → c-DNA



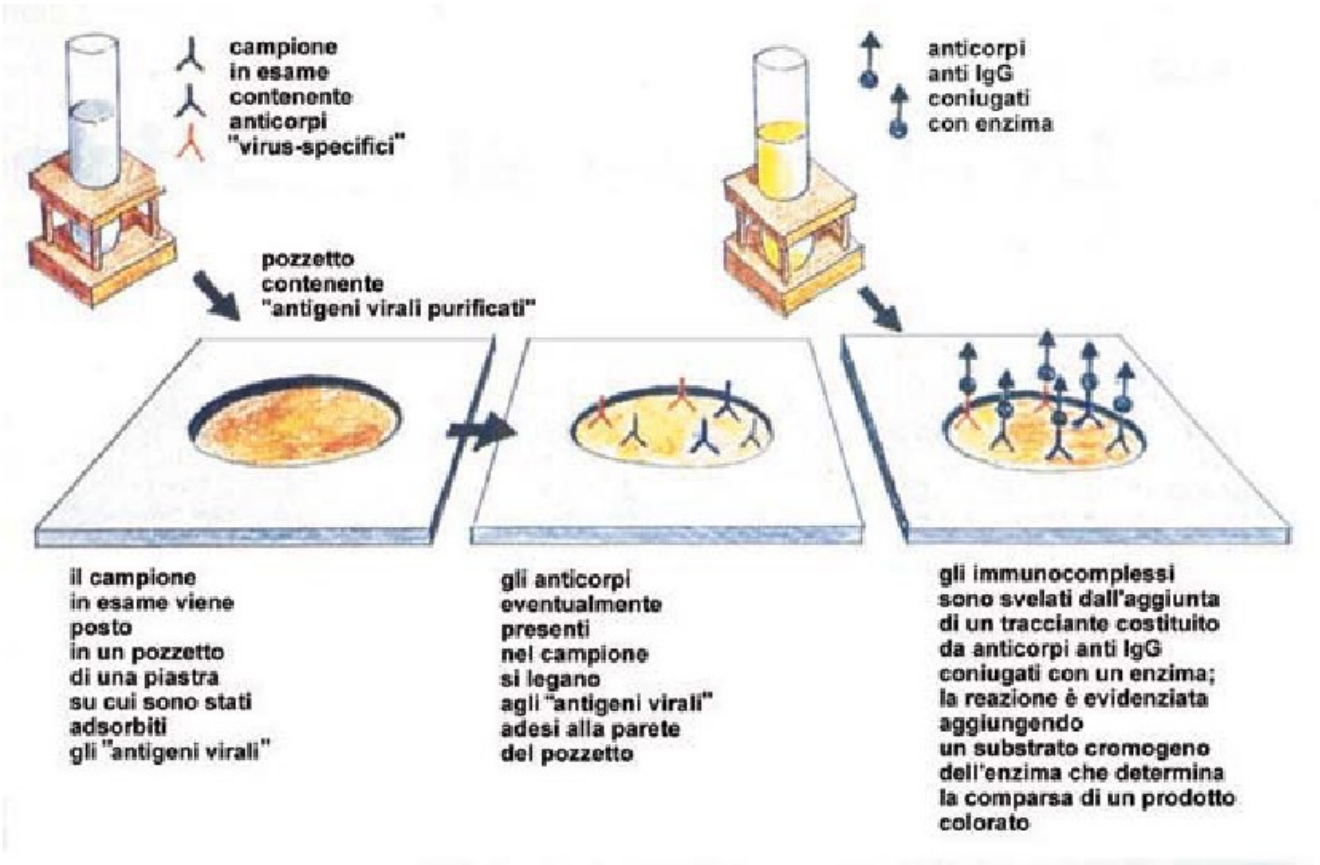
HIV: diagnosi molecolare di infezione



HIV: diagnosi molecolare di infezione

- lavorare sempre sotto cappa a flusso laminare
- cambiarsi spesso i guanti
- mantenere la sterilità di tutti i reagenti utilizzati
- smaltire adeguatamente tutti i materiali che vengono in contatto con il siero in esame
- disinfettare sempre il piano della cappa a termine lavoro

HIV: Test ELISA

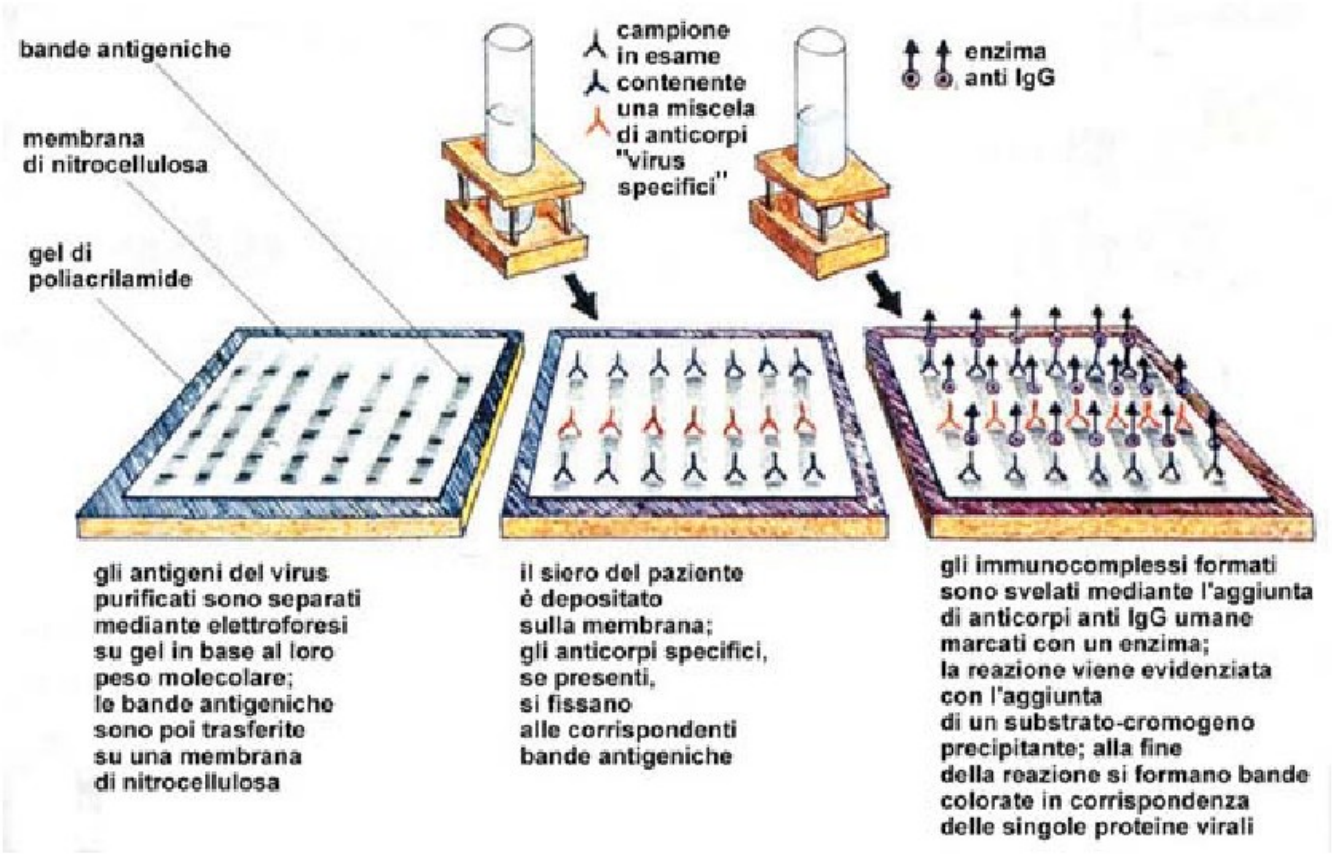


HIV: Test ELISA

Il test ELISA è molto sensibile, ma poco specifico: esiste la possibilità che un campione VERO NEGATIVO mostri una debole o decisa positività.

Il test ELISA deve essere SEMPRE seguito da un test di conferma della positività ovvero il western blot o la PCR per HIV.

HIV: Test DI CONFERMA o WESTERN BLOT



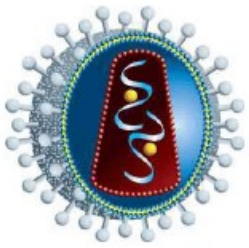
HIV: Test DI CONFERMA O WESTERN BLOT

Ogni banda corrisponde a un tipo di anticorpo diretto contro una specifica proteina virale.

Un test di conferma è positivo quando compaiono almeno due delle tre bande principali: p24, gp120/160, gp41.

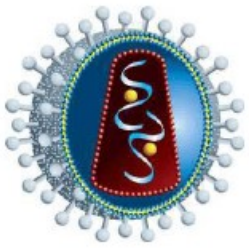
Criteri interpretativi: molteplici.

? HIV = AIDS ?



Definizione di caso di AIDS secondo i CDC (Center for Desease Control and Prevention, 1982): si definisce AIDS conclamato in un adulto o in un adolescente di 13 anni o più la presenza di una delle 29 condizioni indicative di severa immunosoppressione (come la polmonite da Pneumocystis carinii, tubercolosi, linfoma, sarcoma di Kaposi, candidiasi) associata all'infezione da HIV o la presenza dell'infezione da HIV (Test ELISA Positivo) in un soggetto con un numero di linfociti T CD4+ inferiore alle 200 cellule / ml di sangue (valore normale medio 1100 CD4 / ml)

? HIV = AIDS ?



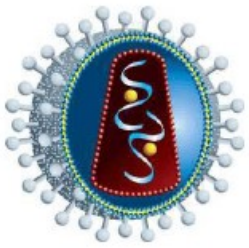
Il malato di AIDS:

1 - positivo al test degli anticorpi

2 - presenta almeno una delle 29 patologie considerate possibili conseguenze dell'infezione da HIV (Polmonite, tubercolosi, linfomi, sarcoma di Kaposi, candidiasi....)

COMPITO DEL RICERCATORE E' CERCARE DI FALSIFICARE QUANTE PIU' TEORIE POSSIBILEKarl Popper

? HIV = AIDS ?



1983 - Luc Montagnier et al. Istituto Pasteur di Parigi: LAV (Virus associato alla linfoadenopatia)

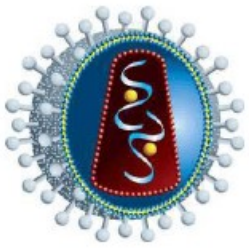
"Il ruolo del virus nell'eziologia dell'AIDS deve essere determinato"

dal lavoro originale: Barrè-Sinousi F. Et al (including L. Montagnier). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for aquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 1983; 220:868-871

1984 - Gallo et al. National Cancer Institute di Bethesda: HTLV III (Virus della leucemia a cellule T).

Popovic M et al. (incluso Gallo) Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV - III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science 1984; 224:497-500

? HIV = AIDS ?



• Peter Duesberg – Direttore del laboratorio di Biologia Molecolare dell'Università di Berkeley in California: pioniere e principale protagonista della lotta alla "teoria virale" dell'AIDS. Il suo libro: INVENTING THE AIDS VIRUS, in italiano "AIDS – Il virus inventato" – Baldini e Castaldi

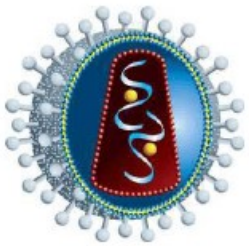
• Kary B. Mullis – Premio Nobel per la Chimica nel 1993, "inventore " della PCR

• Eleni Papadopulos-Eleopulos - "The Perth Group", del Royal Perth Hospital (University of Western Australia)

"Dissidenti" dalla teoria virale dell'AIDS

www.ilvirusinventato.it

? HIV = AIDS ?



La posizione uffciale (“teoria virale dell’AIDS”)

• Il virus HIV è la causa dell’AIDS che è quindi una patologia infettiva

• Un test (ELISA) individua la presenza degli anticorpi e quindi del virus

• Il virus può avere un periodo di latenza fino a decine di anni

• I sieropositivi (positivi al test) si ammaleranno e moriranno

• I farmaci antiretrovirali (AZT ad esempio) combattono la diffusione del virus e allungano la vita

• Alcuni sieropositivi non hanno sintomi perché il virus è latente, ma devono prendere i farmaci quanto prima.

? HIV = AIDS ?

La posizione dei “Dissidenti”:

• Il virus HIV non è stato mai isolato, l’AIDS non è causato da un virus e non è una patologia infettiva

• I test ELISA per l’HIV non sono specifici e non è chiaro cosa individuano: la risposta positiva non è indice di infezione

• I farmaci antiretrovirali sono inutili perché non c’è nessun virus da combattere e soprattutto sono letali (AZT è un analogo della Timina che blocca la sintesi del DNA)

• I malati di AIDS devono sospendere l’esposizione ai farmaci antiretrovirali e curarsi per la patologia specifica di cui soffrono, portando avanti terapie di sostegno per il recupero del sistema immunitario

•I farmaci antiretrovirali hanno trasformato in malati di AIDS individui altrimenti sani che sono risultati positivi al test ELISA.

? HIV = AIDS ?

Quali sono i dati che hanno portato Gallo e Montagnier ad affermare che l'HIV è responsabile dell'AIDS?

1 – Effettuarono l'isolamento del virus allestendo una co-coltura delle cellule di un paziente con i sintomi dell'AIDS, con cellule di un donatore non infettate e stimolate con fitoemoagglutinina per 3 giorni

2- trovarono segni di attività trascriptasica in colture cellulari

3- mostrarono fotografie di particelle simil-virali senza provare che fosse il virus

4- ritrovarono alterazioni cellulari nelle stesse colture, alterazioni che si potevano ritrovare anche in colture "non infette"

? HIV = AIDS ?

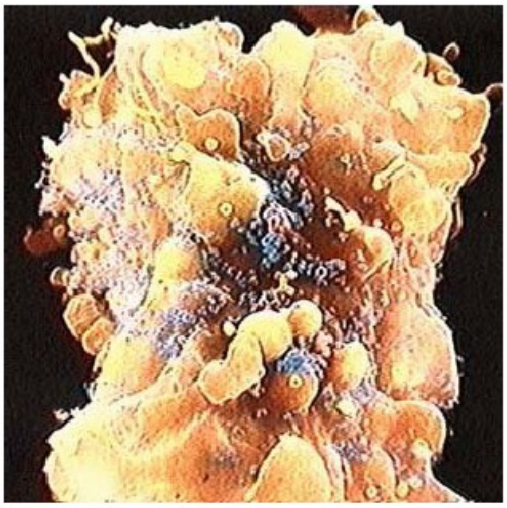
1 – Le colture cellulari allestite per l'isolamento e la dimostrazione del virus sono considerate troppo lontane dalle condizioni dell'ambiente cellulare in cui si sviluppa il virus: linee cellulari stimolate con PHA, con steroidi e agenti ossidanti.

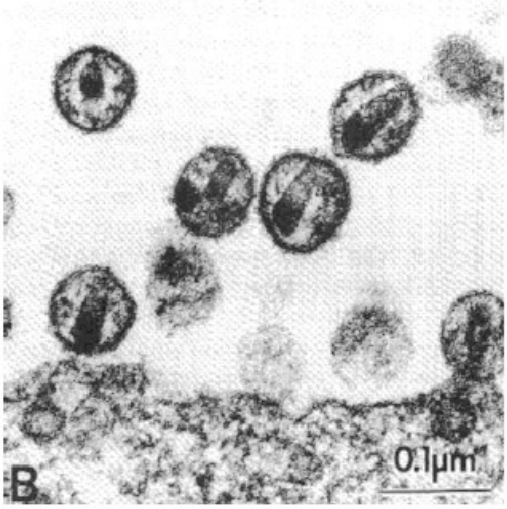
2 – L'attività tipica della trascrittasi inversa non si ritrova soltanto nelle cellule "infettate" dal virus.
(Weissbach A, Baltimore D, et al Nomenklature of eukariotic DNA polymerases. Science 1975; 190: 401-2
Sarngadharan Robert Guroff & Gallo. DNA Polymerase of normal and neoplastic mammalian cells. Biochim Biophisica Acta 1978; 516: 419-487)

? HIV = AIDS ?

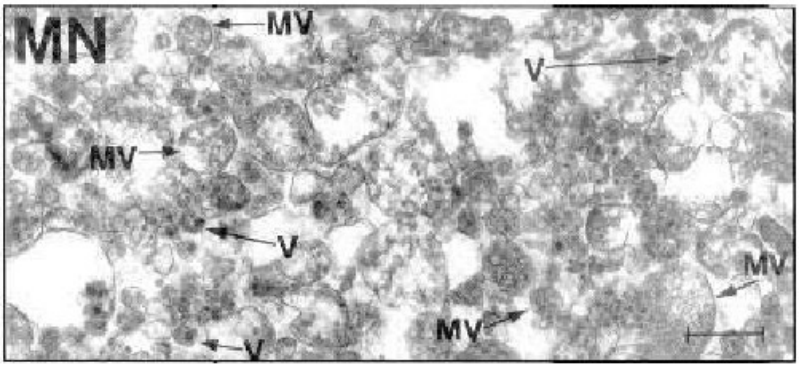
3 - Le particelle simil-virali isolate da Gallo e Montagnier possono essere dimostrate anche in linee cellulari leucemiche CEM che ospitano retrovirus, ma non HIV.
Le cellule usate da Gallo per isolare il virus HIV sono quelle della linea H9 (HUT78): esse rilasciano particelle simil retrovirali anche quando “non infettate con HIV”; già nel 1970 particelle simil retrovirali sono state frequentemente osservate nei tessuti leucemici, in colture di tessuti embrionali e nella maggioranza, se non in tutte, le placente umane

(Panem S. C-Type virus Expression in the placenta. Current Top Pathol 1979; 66:175 – 189
Papadopulos- Eleopulos E. et al 1993. Has Gallo proven the role of HIV in AIDS ? Emergency Medicine 5: 113-123)





Particelle simil-virali fotografate al microscopio elettronico su materiale fissato e non purificato



Stefan Lanka et al. HIV reality or artefact? Continuum Vol3, N° 1, 4-9, April MAy 1995

? HIV = AIDS ?

4 – Le alterazioni cellulari riscontrate da Gallo e collaboratori nelle cellule “infettate” da HIV sono i cosiddetti “sincizi” formati da linfociti che si sono aggregati e fusi insieme.

Secondo la teoria tradizionale virale la causa di queste formazioni è da ricercare nell’interazione della gp120 con i recettori CD4 presenti anche su cellule non infettate dal virus.

In realtà le stesse alterazioni sono presenti anche in linee cellulari “non infette” e simili a quelle utilizzate per l’HIV.

? HIV = AIDS ?

Il virus HIV in realtà NON E' MAI STATO isolato (secondo i dissidenti)

La possibilità di fotografare particelle virali, tutte simili tra loro e in forma purificata (senza materiale cellulare contaminante) è il presupposto su cui si basano tutti gli altri test, compreso il test ELISA e la PCR.

Manca il "GOLD STANDARD" per l'HIV

? HIV = AIDS ?
Varibilità del virus HIV

• Il virus HIV è capace di modificarsi velocemente; confrontando il genoma di virus provenienti da due distinti sieropositivi essi differirebbero di circa il 13%.

• Dal 1990 ad oggi si sono moltiplicati i tipi virali isolati e sequenziati e sono state aggiornate le classificazioni e gli alberi filogenetici del virus costruiti confrontando i geni env e gag dei i vari tipi virali tipizzati.

• Alcuni sottotipi HIV differiscono per il 10, 20, 30 o 40 %: si indicano comunque come genomi strettamente imparentati, le quasispecie.

? HIV = AIDS ?

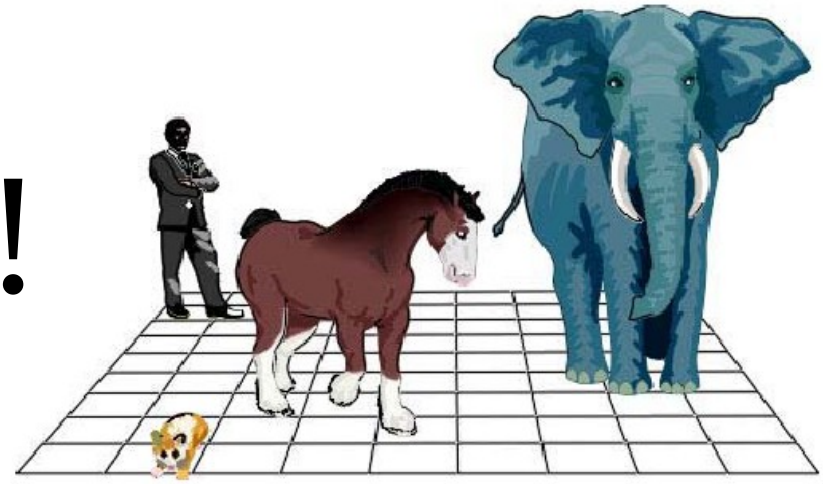
• Come è possibile allora riferirsi all'HIV come entità dalla precisa fisionomia?

La differenza genomica tra uomini di razza diversa si aggira intorno all'1 per 1000, tra uomo e orango al 2%, ma per trovare una differenza del 30% bisogna confrontare un uomo e un topo, uomo e asino, uomo ed elefante!

Possono correttamente ritenersi il topo e l'asino e l'elefante quasi- specie dell'uomo?

……

!!!



? HIV = AIDS ?

Come si spiegano i casi:

- Test ELISA POSITIVO in presenza di PCR e western blot NEGATIVI

- Test ELISA e PCR negativi in presenza di western blot POSITIVO

- Comparsa di bande anomale nel western blot

?

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

? HIV = AIDS ?

Esiste un errore di fondo nella purificazione degli antigeni virali, passaggio cruciale per la preparazione dei kit diagnostici.

Secondo i dissidenti, Gallo e Montagnier che misero a punto i primi test considerarono “pure particelle virali” una miscela di proteine e acidi nucleici che, in realtà, era di origine cellulare!!

? HIV = AIDS ?

Qual è la causa dell'AIDS secondo i Dissidenti?

• "L'AIDS è causato da un complesso di fattori (droghe pesanti, super esposizione ad agenti patogeni, farmaci) fortemente presenti in certi stili di vita che alla lunga distruggono il sistema immunitario"

• Malattia autoimmune ???

Your HIV test is positive. We don't really know what that means, but we want to give you forty experimental medications just in case...

? HIV = AIDS ?
Il test ELISA

Il test dell'HIV (ELISA, ricerca di anticorpi) svolge un ruolo centrale nella diagnosi dell'AIDS:
Se il soggetto è positivo al test, ma sta bene, viene considerato malato asintomatico.
L'eventuale successiva comparsa dei sintomi dell'AIDS cambierà la sua classificazione in malato conclamato.
Se il soggetto presenta i sintomi di una delle patologie classiche dell'AIDS, ma non è positivo al test, allora non è malato di AIDS.
L'eventuale risposta positiva al test cambierà la sua classificazione in malato conclamato.

Pertanto un malato di polmonite o tubercolosi negativo al test è SOLO malato di polmonite o tubercolosi. Mentre un malato di polmonite o tubercolosi positivo al test è malato di AIDS.

? HIV = AIDS ?
Il test ELISA

Ma come è stato costruito questo test? Quali sono le premesse per arrivare alla preparazione di un kit diagnostico valido?

- Gallo e Montagnier separarono il sopranatante di colture ritenute infette in gradiente di densità

- Considerarono che il materiale che si separava a livello di densità pari a 1,16 mg/ml fosse costituito da “pure particelle di HIV” (è quella la densità dei retrovirus).

- Le proteine estratte da questo materiale sono reattive con i sieri di pazienti con AIDS, ma non solo con i loro sieri e sono state considerate proteine dell’HIV

? HIV = AIDS ?
Il test ELISA

Ma come è stato costruito questo test? Quali sono le premesse per arrivare alla preparazione di un kit diagnostico valido?

- Una particolare frazione di RNA ritrovata nella medesima banda di densità fu considerata il genoma del nuovo virus

- Da allora alcune di queste proteine sono state iniettate nei conigli per la produzione di anticorpi specifici, poi purificati e usati nei test ELISA

- Il materiale genetico è stato sequenziato per la messa a punto di test basati sulla PCR.

Gallo allora utilizzò un miscuglio di proteine (ritenute virali, ma in realtà cellulari) per immunizzare conigli ed ottenere così un siero che ovviamente reagiva con le stesse proteine presenti nelle colture da cui proveniva