

L'identikit dei virus HIV, epatite & C.

Articolo tratto da: Crimeblog.it
a cura di Luigi Perri

Quali informazioni utili alle indagini possono fornirci gli studi sui virus? possiamo sapere con certezza chi ha trasmesso un'infezione? oggi la scienza, mentre avanza nella lotta alle più importanti malattie, è in grado di fornire strumenti ed informazioni sempre più utili per le indagini. Non solo DNA per le persone dunque, ma è possibile tracciare un identikit molto attendibile di un virus.

In esclusiva ce ne parla il [prof. Mauro Pistello](#) del Dipartimento di patologia sperimentale, biotecnologie mediche, infettivologia ed epidemiologia dell'Università di Pisa, che ringrazio per la disponibilità.

1. Professore, comunemente si pensa che lo studio dei virus sia solo diretto al loro controllo ed eliminazione, dimenticando che prima di tutto bisogna conoscere il "nemico". E' così?

In effetti per il virus dell'immunodeficienza umana (HIV), agente eziologico dell'AIDS è proprio così. Ci siamo illusi di poter produrre un vaccino applicando semplicemente le strategie già usate con successo per altri agenti infettivi ma ogni approccio è fallito miseramente. Anzi, in alcuni casi, i soggetti vaccinati si sono dimostrati più suscettibili all'infezione rispetto ai soggetti non trattati. Oltre a non avere armi per prevenire l'infezione, non capiamo come mai, a fronte di un numero modesto di linfociti T CD4+ (le cellule che attivano e coordinano la risposta immune) infettati da HIV, le cellule sono eliminate in modo così massiccio fino a sfociare nella profonda immunodepressione osservata nelle fasi avanzate di AIDS. Quindi, come giustamente affermato, bisogna studiare bene il nemico (ed HIV lo conosciamo solo in parte) per poter sviluppare strategie efficaci di controllo ed eliminazione del virus.

2. Questi studi consentono oggi di tracciare la storia e la genealogia del virus, distinguendo anche una provenienza geografica dei vari ceppi?

Mediante opportune analisi della sequenza dell'acido nucleico di cui è costituito il genoma virale è possibile, entro certi limiti, ricostruire la storia e la genealogia dei virus. Analizzando una serie di ceppi virali di HIV siamo in grado, per esempio, di identificare un ipotetico progenitore ancestrale, cioè un virus esistito nel passato, anche molto remoto e dalla cui evoluzione sono originati i ceppi virali analizzati. Sulla base dell'albero filogenetico ottenuto, una sorta di albero genealogico e di altri parametri, possiamo capire anche il grado di somiglianza (parentela) tra i ceppi virali analizzati. E' essenziale tuttavia ricordare che si tratta di elaborazioni al computer e che l'evoluzione filogenetica o profilo evolutivo ricostruito dipende da programmi filogenetici utilizzati per l'analisi e, soprattutto, dalla banca dati di sequenze utilizzate. Da questa analisi è possibile anche desumere la provenienza geografica del ceppo. Per poter dare una risposta devono sussistere determinate condizioni ed in ogni caso il grado di incertezza aumenta via via che si restringe l'area geografica. Per questa analisi è essenziale avere una casistica molto ampia di sequenze da ceppi di

provenienza geografica certa e circolanti nello stesso periodo temporale del ceppo in analisi; poiché HIV evolve, infatti, i ceppi circolanti ai nostri giorni sono diversi tra quelli esistenti dieci anni fa o più. Oggigiorno inoltre il riconoscimento dell'area geografica di provenienza è reso ancora più difficile dai grandi flussi migratori che hanno "rimiscolato" i ceppi virali. Se negli anni '90 ceppi africani erano rari in Italia o presenti solo nei casi di importazione, oggi rappresentano il 20-25% degli isolati HIV circolanti nel nostro Paese.

3. Quanta precisione c'è nel dato fornito?

Definire un profilo evolutivo o un'area geografica di provenienza, è un po' come se volessimo ricostruire un tragitto compiuto da un individuo e del quale conosciamo solo il luogo di partenza ed arrivo (es. Roma-Milano). La ricostruzione della storia evolutiva avviene grazie ad appositi algoritmi ciascuno dei quali assume un'ipotesi diversa, ad esempio che per compiere il viaggio il soggetto ha preso il treno, o la macchina, è andato in giornata o ha pernottato da qualche parte. Anche la porzione di genoma virale che utilizziamo per l'analisi può dare informazioni diverse: se questa è ipervariabile (che cambia quindi spesso durante la replicazione del virus) può dare indicazioni sulla velocità di spostamento, se è altamente conservata tra i ceppi in esame può fornire indicazioni utili sulla direzione del movimento. La ricostruzione del tragitto ed i dettagli del percorso (evoluzione) compiuta dipendono quindi da regione genomica e dal metodo (algoritmo) e se si ottengono gli stessi risultati ripetendo l'analisi con algoritmi diversi la conclusione è fondata. I limiti citati per la ricostruzione della storia evolutiva sono ancora più forti per la definizione della provenienza geografica. In questo caso si assume che il ceppo virale in esame è più simile ai ceppi circolanti nella stessa area geografica. Oltre alla già citata evoluzione temporale, il grado di incertezza aumenta in considerazione della libera e rapida circolazione dei ceppi HIV e, soprattutto, dai ceppi utilizzati per l'analisi. In generale quindi non è possibile definire una a priori precisione del dato. Tuttavia, se il ceppo in esame condivide particolari e unici tratti di sequenza e mutazioni con ceppi selezionati e di sicura provenienza geografica è possibile trarre delle conclusioni con buona approssimazione.

4. Qual è il grado di attendibilità?

Vi sono programmi che identificano "firme", motivi particolari che accomunano uno o più virus aumentando di molto la significatività del dato. Non è possibile però a priori ed in senso assoluto definire il grado di attendibilità.

5. Si può arrivare così ad identificare la persona responsabile di un contagio?

Di fatto i programmi nascono per stabilire il progenitore ancestrale o nel caso di un virus, il ceppo capostipite che si è poi trasmesso ad altri soggetti. Questi programmi si possono usare quindi per identificare sorgente e responsabile del contagio.

6. Per tutti i virus è possibile raccogliere le stesse informazioni?

Sì, quanto affermato sopra, incluso i limiti nell'analisi e nell'interpretazione dei dati, sono applicabili a virus, batteri ed in genere a tutti gli organismi.

7. Nel caso in cui non sia possibile procedere ad esami diretti sulla persona, quali tipi di reperti sono maggiormente idonei a contenere tali informazioni?

In genere qualsiasi fluido biologico, anche non fresco, contenente tracce ematiche. Latte materno e sperma sono veicoli di infezione da HIV quindi contengono il virus. Si può usare anche materiale non fresco.

8. Un reperto contenente materiale infetto entro quanto tempo deve essere sottoposto a tali ricerche?

Il grado di rilevabilità del virus è inversamente proporzionale alla temperatura a cui il campione è stato conservato e se si tratta di tracce fresche o meno. La rilevabilità di un virus dipende comunque da molti altri fattori. Ad esempio, il virus epatite B è molto più facilmente rilevabile dell' HIV mentre il virus dell'epatite C si degrada piuttosto rapidamente. Inoltre dipende dal tipo di materiale e da come è stato conservato. Nel sangue congelato anche dopo decine di anni, nel sangue secco il virus non è più rilevabile dopo poche settimane.

9. Professore, questi dati ovviamente sono di interesse nel campo giudiziario. I suoi studi sono richiesti spesso sia in campo penale che civile?

Sono stato chiamato spesso per casi di trasmissione criminale o accidentale dell'infezione. In questo caso è chiesto di accertare il grado di parentela tra i ceppi della vittima e della persona indagata, un quesito al quale si può rispondere con un relativo grado di sicurezza ed attendibilità.

10. può fare qualche esempio pratico in cui, possono risultare determinanti o comunque rilevanti per l'esito di un procedimento?

Vari casi di violenza sessuale e somministrazione di emoderivati contaminati, rapporti sessuali in cui è taciuto lo stato di infezione e non vengono adottate le opportune precauzioni, punture con oggetti contaminati ed in genere qualsiasi evento deliberato o accidentale che comporti esposizione a materiale ematico. In questo caso è chiesto di stabilire il grado di parentela tra il ceppo virale presente nella sorgente di infezione e quello della parte in causa. Si tratta di elementi che sono rilevanti per l'esito di un procedimento. In qualche caso ed in mancanza di altre prove certe, questo dato è risultato determinante. Anche in campo civile vale quanto detto per i procedimenti penali. In diverse occasioni si è ricorso a questo tipo di accertamento i cui risultati hanno avuto un rilievo determinante per l'esito del procedimento.

11. qual è il primo caso che ricorda in cui hanno trovato pratica applicazione?

Il primo caso di impiego ufficiale dell'analisi filogenetica in ambito forense è del 1990 ed è stata utilizzata per accertare la parentela genetica tra il ceppo HIV di un dentista della Florida e di alcuni suoi [pazienti](#). A ruota è seguito il caso di una violenza sessuale in Svezia.

12. esiste dunque un'attenzione e sviluppo verso un impiego forense che, immagino, ha esigenze diverse rispetto a quelle prettamente scientifiche?

Grazie anche a potenze di calcolo sempre più elevate ed al perfezionamento degli algoritmi alla base dei programmi usati, vi è un continuo sviluppo in questo settore. Va detto che questi programmi sono nati per studi di genetica ed evoluzionistica e l'applicazione in ambito medico-forense è certamente marginale ma la conoscenza che

ne deriva consente un impiego ragionato e consapevole di questi mezzi e, soprattutto, ci dà elementi per apprezzare validità e solidità dei dati ottenuti.

13. esistono degli archivi in cui vengono catalogati questi dati? sono a livello nazionale?

Non esistono archivi in cui sono catalogati le elaborazioni eseguite dai programmi anche perché, come detto, i programmi si perfezionano continuamente e la scelta del metodo e delle procedure di calcolo da seguire dipende dall'ipotesi sperimentale (o investigativa) e da molti altri fattori. Esistono però in banche dati mondiali e di libero accesso o su articoli di riviste specializzate decine di migliaia di sequenze di HIV che si possono recuperare ed accludere alle sequenze dei ceppi virali in esame.

14. è in previsione una banca dati dei soggetti colpiti dalle più pericolose infezioni virali?

Potrebbe essere certamente utile ed è stata pensata, proposta ed in qualche caso avviata la costituzione di una banca dati. Considerazioni etiche, politiche e sociali ne hanno sempre impedito la loro costituzione e la stipula di norme regolamentari ed applicative chiare. Vi è un registro nazionale delle nuove infezioni ma la registrazione dei casi è in pratica facoltativo e contiene informazioni parziali. Attraverso l'iniziativa congiunta di vari Paesi si arriverà forse un giorno ad una banca dati di una qualche utilità, ma per ora le resistenze sono molto forti.

15. com'è la situazione all'estero e che differenze ci sono con l'Italia in questo settore?

Non vi sono grosse differenze in Italia rispetto all'estero. Nel nostro Paese vi sono genetisti, evoluzionisti e virologi di qualità non certamente inferiore rispetto ad altri Paesi. A differenza della ricerca, per la quale servono molti fondi che in Italia semplicemente non esistono, il costo della strumentazione necessaria e delle analisi è modesto e ciò ha permesso di evitare o contenere eventuali gap.

16. quali altre sorprese interessanti ci attendono in un prossimo futuro?

Più che di sorprese parlerei di un continuo affinamento dei programmi di elaborazione e di miglioramento e potenziamento delle tecnologie di estrazione, amplificazione e sequenziamento degli acidi nucleici, la materia prima con la quale condurre l'analisi. Con questa virtuosa congiuntura sarà possibile aumentare affidabilità e solidità dei risultati e fornire risposte sempre più utili e dirimenti alle indagini in oggetto. In ambito medico-forense ciò si tradurrà nell'impiego sempre più estensivo delle procedure bioinformatiche e non necessariamente limitato al solo settore infettivologico. Come ben sa, ad esempio, nel nostro intestino vi è una abbondante flora microbica. Questa cambia con la stagione e con la zona geografica. L'analisi filogenetica della flora microbica di un cadavere di provenienza ignota può aiutare moltissimo ad individuare l'area geografica in cui viveva il soggetto.