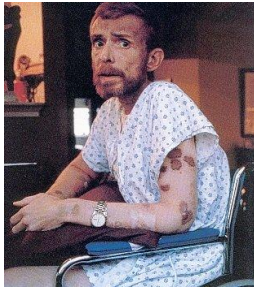


FAMILIA RETROVIRIDAE. VIRUSUL HIV. ONCOGENEZA VIRALA

FAMILIA RETROVIRIDAE. VIRUSUL HIV ȘI INFECȚIA HIV/SIDA

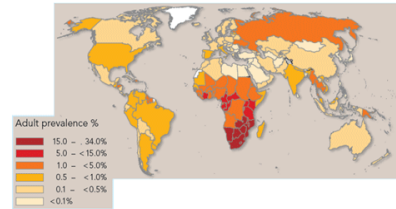


- Prima descriere clinică a SIDA - 1981.
- 1983 - HIV a fost identificat la Paris, ins. Pasteur
- 1986 - propusă denumirea HIV (*Human immunodeficiency Virus*)
- 1986 - a fost izolat HIV-2, Africa de Vest
- În prezent - 40-60 mln persoane infectate cu HIV, 25 mln decedați
- În 2010 se estimează 85 mln infectați
- Zilnic se infectează 5-6 mii persoane (6 pers/sec)
- În RM primul caz de infectare cu HIV înregistrat în 1987 (total 8 persoane)
- Nr de infectați - perioada 1987-2007 - **4131**, în 2007 - **731** infectați
- SIDA - **585** persoane, au decedat **155** persoane



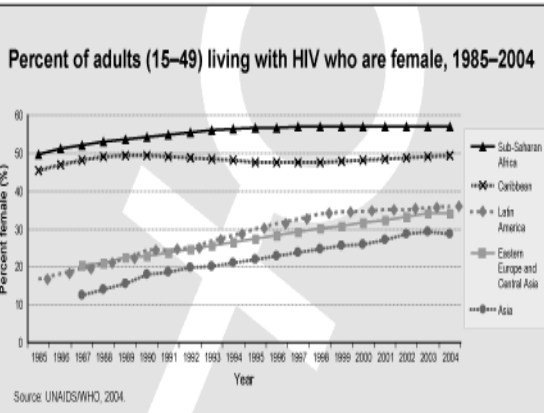
A global view of HIV infection

38.6 million people [33.4-46.0 million] living with HIV, 2005



0506

Information on the global AIDS epidemic



- Pe parcursul semestrului I al anului 2008 s-au înregistrat **371** cazuri noi de **infecție HIV**, inclusiv în teritoriul de Est al republicii 142 (6 luni 2007-336 și 142 respectiv).
- Continuă scăderea ponderii **UDI** în procesul epidemic al infecției, constituind **26,20%** (2001 - 78,6%) și sporirea proporției celor infectați pe **cale heterosexuale** - **72,05%**.
- A sporit ponderea **femeilor** infectate cu HIV de la 26,72 % în 2001 la **44,97%** în semestrul I, 2008. La **4** copii (în 6 luni 2008) s-a confirmat diagnosticul infecția HIV perinatală.

- Vîrsta cea mai afectată de virusul HIV este de **20-34 ani** și constituie **62,31%**, inclusiv în rîndul utilizatorilor de droguri injectabile - 36,14% și pe cale heterosexuale - 63,86%.
- La **38** de persoane infectate cu virusul HIV s-a diagnosticat maladia **SIDA**.
- Procesul epidemic a cuprins toate teritoriile administrative și se caracterizează prin extinderea infecției HIV/SIDA atît în populația urbană (64,63%), cît și rurală (35,37%).
- Cea mai înaltă răspîndire a infecției HIV are loc în mun. **Bălți și raioanele Basarabeasca, Căușeni, Fălești, Hîncești, Rezina, Glodeni, Sîngerei, Ștefan-Vodă**, iar în teritoriile de Est ale republicii în orașul **Tiraspol și raionul Rîbnița**.

CARACTERE MORFOSTRUCTURALE GENERALE ALE FAMILIEI RETROVIRIDAE

- Dimensiuni – 80-130 nm
- Formă – sferică
- Genom – două molecule de ARN+, capacitate de integrare în nucleu sub formă de ADN proviral
- Enzima – reverstranscriptaza
- Capsidă – icosaedrică
- Supercapsidă – derivată din MCP, lipidică cu GP virale înserate
- Ciclul replicativ este identic

- **Supercapsida:** dublu strat lipidic de origine celulară în care sunt înserate 2 GP virale
 - 1. **Gp120**, de suprafață, asigură fixarea virusului de receptorul celular CD4 și de coreceptori. Regiunea V3 (variabilă) induce anticorpi neutralizanți specifici
 - 2. **Gp41**, transmembranară, legată de gp120, responsabilă de fuziunea supercapsidei cu membrana celulară
- Proteina **p17**, (MA), matrice, cătușește stratul intern al supercapsidei, este asociată cu proteaza
- Genomul, proteinele interne (p24, p7, p17) și enzimele constituie **nucleoidul (core)** viral

CLASIFICAREA FAM. RETROVIRIDAE

- Retroviridae – familie numeroasă de virusuri ARN dotate cu o enzimă numită **transcriptază inversă (reverstranscriptază)**.

ARN \rightarrow ADN.c

- **Subfamillia Orthoretrovirinae**

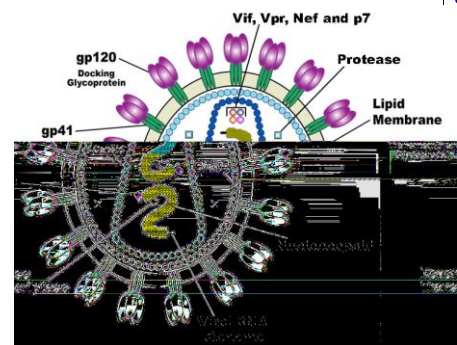
Genurile: Alpharetrovirus, Betaretrovirus, Gammaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus (induc tumori și leucemii), Lentivirus (virusul HIV, SIV)

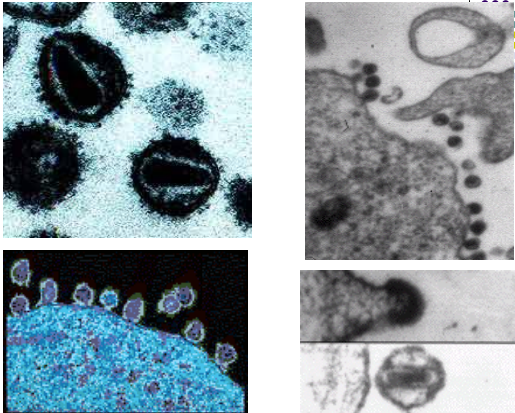
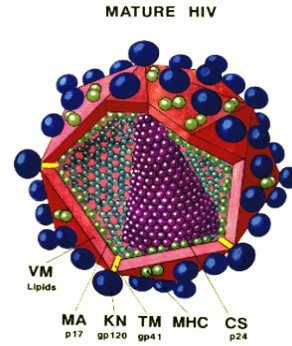
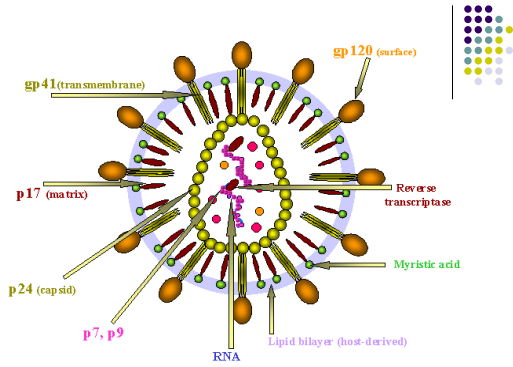
- **Subfamillia Spumaretrovirinae**

Genul: Spumavirus (nepatogeni)

VIRUSUL HIV. STRUCTURA ȘI ORGANIZAREA GENOMULUI

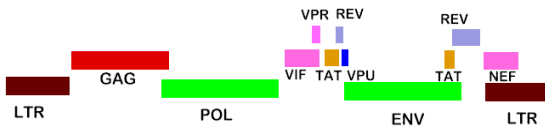
- **HIV-1 și HIV-2** – responsabili de **Sindromul Imuno-Deficienței Achiziționate (SIDA)**
- HIV-1 – repartitie mondială
- HIV-2 – limitat la Africa de Vest
- Particule sferice, 80-120 nm
- **Structura virusului HIV-1**
- **Genomul:** diploid – 2 molecule de ARN+ identice, nu sunt utilizate în calitate de ARNm
- **Enzime:** reverstranscriptaza (RT, p66), integraza (p31), proteaza (p9)
- **Capsida:** în formă de trunchi de con, constituită din 2 proteine - **p24** (CA, a capsidei, majoră) și **p7** (NP, a nucleocapsidei, asociată ARN)



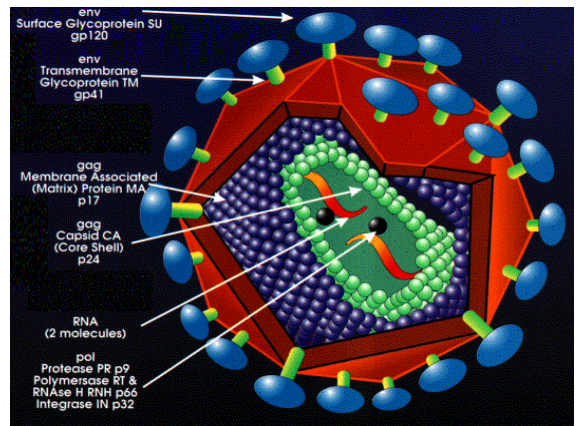


● **Structura genomului** (apr. 10 mii nucleotide)

- Gena *gag* (*group antigens*), codează proteinele structurale interne (p24, p7 și p17)
- Gena *pol* (*polimerase*), codează 3 enzime: RT (p66), integraza (p31), proteaza (p9)
- Gena *env* (*enveloppe*), codează o proteină precursor *gp160*, clivată ulterior în *gp41* și *gp120*
- Gene reglatoare *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* și *vpv* (HIV-1) sau *vpx* (HIV-2)



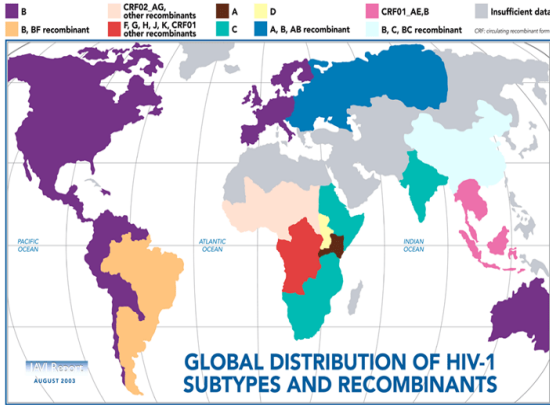
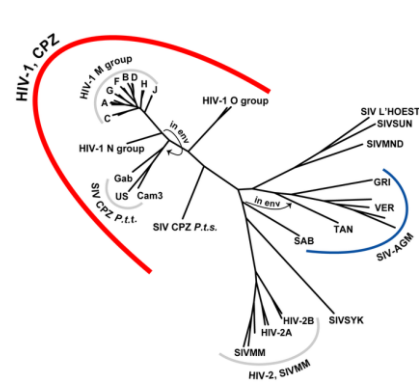
HIV-1 GENOME 9749 NUCLEOTIDES



Omologia dintre HIV-1 și HIV-2 este de 42%, mai înaltă la nivelul genelor *gag* și *pol* (peste 50%) și redusă la nivelul genelor *env* (39%)

Se disting 3 grupe genomice ale HIV-1: M (major), O (outlier) și N (new). Grupul M comportă 10 subtipuri (A-H, J și K), repartizate geografic neuniform (majoritatea – în Africa, B – Europa occidentală și America de Nord, F, B – România, G – Rusia, etc)

Structura antigenică – toate proteinele și glicoproteinele virale sunt imunogene.



Rezistența HIV

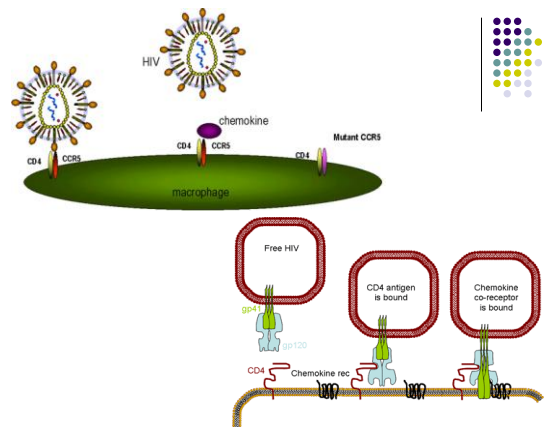
HIV este sensibil la solvenții lipidici și detergenți, la 56 grade C este inactivat în 30 min, în 5 minute - 0,2 % hipoclorit de Na, 70% etanol, 0,2% glutaraldehidă. Labil la pH-uri extreme, radiații UV și RX

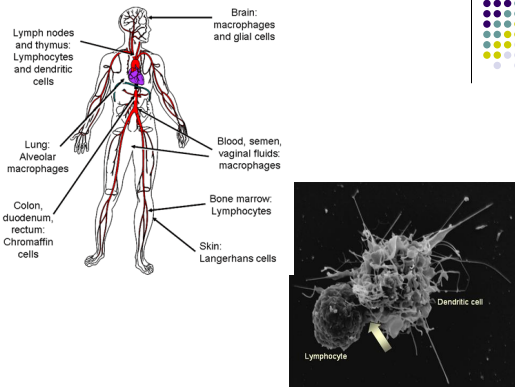
Cultivarea

- Celule mononucleate de la persoane sănătoase
- Linii celulare din LT – MT2
- Animale sensibile – maimuțele cimpanzei (HIV-1), Rhesus (HIV-2)

CELULELE-ȚINTĂ ȘI REZERVORUL CELULAR

1. Limfocite TCD4+ (Th) (99% de replicare, ECP-sincitii)
 2. CPA: monocite/macrofage tisulare (replicare redusă, ECP minim), celulele dendritice (prezente în timus, tegument, mucoase, organe limfoide, SNC și sânge perif.), celulele microgliei. Ele au rol de vector și rezervor de virus (adsorb HIV la suprafața lor și-l transportă în organele limfoide, unde el este prezentat celulelor CD4+ în care se replică).
- Se disting tulpini ale HIV cu tropism macrofagic (M, sau R5), utilizează coreceptorul CCR5, și tulpini cu tropism limfocitar (T, sau X4), coreceptorul CXCR4.
- Limfocitele T pot fi infectate cu ambele tulpini (prezintă ambii receptori).
- În **primo-infecție** – sușe R5, în stadiu de SIDA – sușe X4

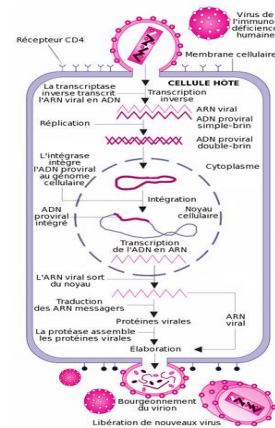
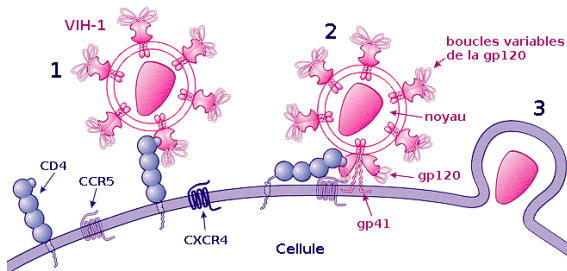
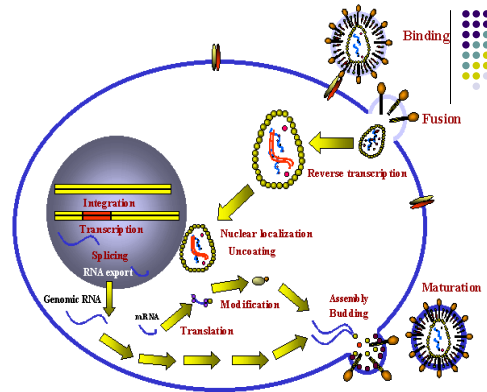




CICLUL DE REPLICARE

- **Atașarea HIV la celula-gazdă prin legarea gp120 la receptorul celular CD4.** Rezultă o modificare conformațională a gp120, ce permite buclei V3 a acestei gp să se fixeze de coreceptorii de pe suprafața celulei: **CCR5 și CXCR4, CCR3, CCR2b** ș.a.
- **Penetrarea NC** prin fuziunea supercapsidei (**gp41**) cu MCP
- **Decapsidarea și eliberarea ARN viral asociat cu RT**
- **Retrotranscrierea ARN+ în ADN- (RT).** În continuare RT (funcție de RNA-aza H) degradează ARN+, apoi transcrie ADN- în ADNc., care va fi circularizat, apoi **Integrat (integraza)** în cromozomul celular, constituind **provirusul**.

- **Transcrierea ADNv în ARNm și ARN viral** prin intermediul ARN-polimerazei II celulare
- **Sinteza proteinelor virale** sub controlul factorilor celulari și proteinelor reglatoare
- Poliproteina **gag/pol** 160 kd (p17 MA, p24 CA, p7 NC, p9 (proteaza), p66 (RT), p31 (integraza))
- Poliproteina **env** 160 kd (gp41 și gp120)
- **Asamblarea NC**
- **Eliberarea** prin înmugurire la nivelul MCP modificată prin inserarea gp virale gp120 și gp41.



- 1-10 mlrd de virioni/zi/o persoană infectată

Variabilitatea HIV este determinată de erorile comise de RT (o eroare la fiecare 10 mii baze). Mutațiile survin în special la nivelul genei *env* (bucla V3 din gp120, care intervine în fixarea HIV de coreceptori, reprezintă epitopul major de neutralizare).

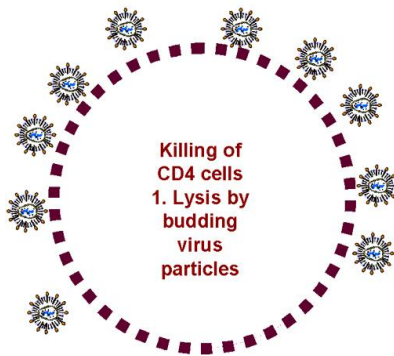
Nu există 2 tulpini virale identice. La bolnav este prezentă o populație virală polimorfă, cu genomuri diferite

Consecințe:

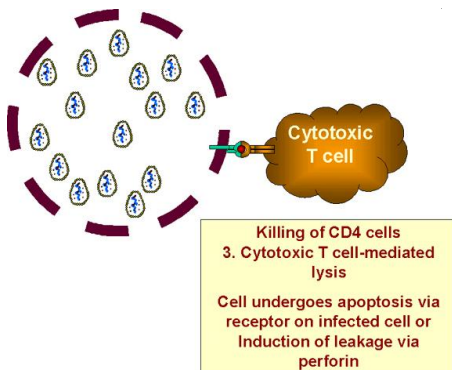
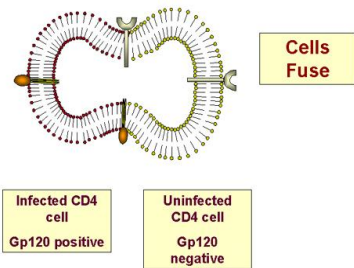
- dificultatea de a obține vaccin eficient
- selecția mutantelor rezistente la antiretrovirale

Mecanismele de distrugere a limfocitelor T CD4:

- Liza directă a celulelor infectate (ECP)
- Limfocitele T CD8 elimină limfocitele T CD4 infectate
- Apoptoză în urma stimulării antigenice a celulelor care au fost în contact cu Ag HIV
- Limfocitele infectate, acoperite cu gp120 pot provoca fixarea, fuziunea și moartea limfocitelor neinfectate
- Hiperstimulare celulară cu dezvoltarea energiei celulare



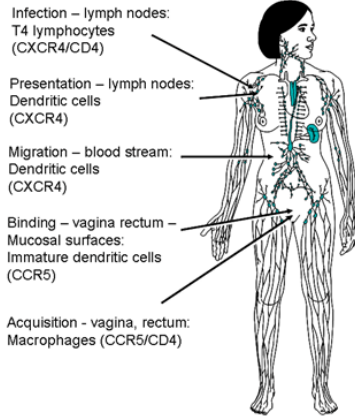
Killing of CD4 cells 2. Syncytium Formation



PATOGENEZA ȘI CLINICA INFECȚIEI CU HIV

Transmiterea:

1. Cale sexuală (hetero-, homo).
2. Cale sangvină (toxicomani, hemofili, transfuzii de sânge sau transplante de organe, manopere medicale penetrante - injecții, acupunctură, tatuaj, piercing)
3. Cale verticală (*in utero* în ultimele săptămâni de sarcină, în timpul nașterii sau în timpul alăptării)



EVOLUȚIA MALADIEI

Incubația – de la câteva zile până la câteva săptămâni de la expoziție

- **Primo-infecția** (perioada de timp de la infectare până la apariția Ac). Durata 4-6-8 săptămâni. Are loc multiplicarea intensă și diseminarea virusului, scăderea numărului de limfocite T CD4 și creșterea numărului limfocitelor TCD8. Diminuarea ulterioară a șarjei virale și creșterea nr LT CD4 este determinată de răspunsul imun specific **celular** (limf TCD8) și umoral (Ac anti-gp120, anti-gp41, anti-p24, apar la finele primoinfecției). Persoana infectată devine **seropozitivă**.

- Factorii care influențează evoluția primoinfecției: tipul virusului, răspunsul imun al gazdei și factori genetici (homoziștii cu mutație la nivelul genei receptorului CCR5 prezintă rezistență la infecția cu HIV 1)
- Evoluția poate fi asimptomatică sau simptomatică (50%): adenopatie cervicală, febră, faringită, ulcere ale mucoasei bucale, oboseală, mialgie, artralgie, erupții cutanate.
- Durata fazei simptomatice – 7 – 10 zile

- **Faza asimptomatică, de latență clinică** (durata variabilă: 3 - 18 ani).

Virusul se replică în organele limfoide, numărul LT CD4 diminuează lent sau rămâne stabil. Apar variante noi de virus care se multiplică, Sistemul Imun le recunoaște și reacționează specific, ciclul se repetă de multiple ori. Aceasta duce la diminuarea progresivă a LT CD4 și LT CD8 și epuizarea Sistemului Imun, urmată de multiplicarea necontrolată a HIV și dispariția completă a LT CD4.

• Faza clinică (SIDA)

Numărul LT CD4 - 500-200 celule/ml.

Se manifestă clinic prin febră cronică, pierdere în greutate, diaree, afecțiuni ale tuturor organelor și sistemelor, tumori (sarcomul Kaposi, limfoame), infecții oportuniste cu:

- Paraziți: *Toxoplasma*, *Histoplasma*, *Leishmania*
- Bacterii: *Mycobacterium*, *Salmonella*, enterobacterii condiționat patogene, etc
- Fungi: *Pneumocystis carinii*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium*, *Candida*, etc
- Virusuri: HSV, HZV, CMV

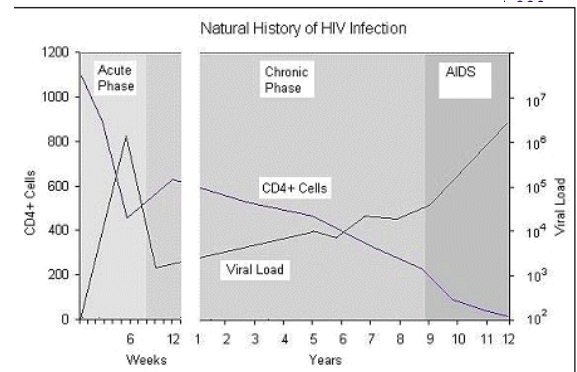
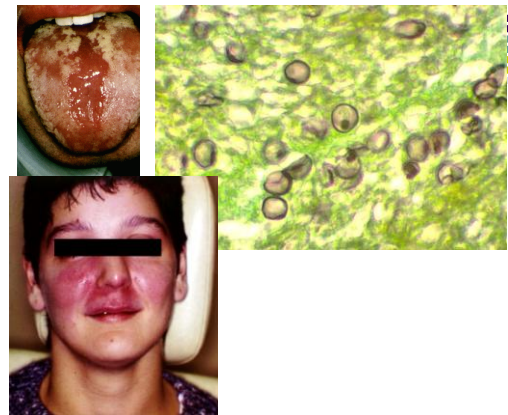
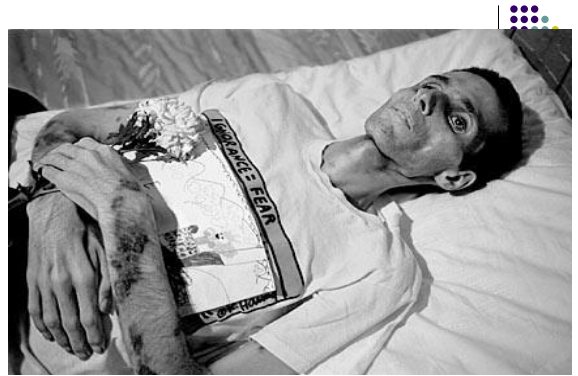
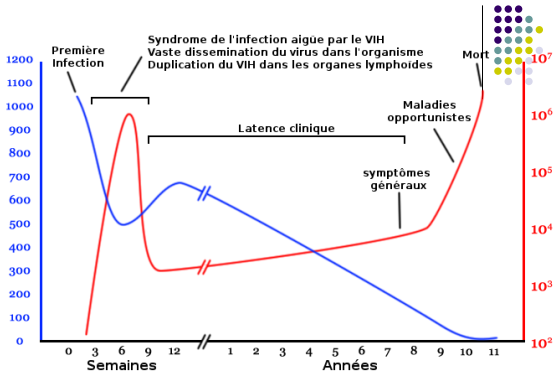


Figure 1: CD4+ T-cell count and viral load during HIV infection.



Răspunsul Imun:

Celular – LT CD8 recunoșc și elimină celulele infectate (în special LT CD4) prin citotoxicitate directă (restricție CMH I) sau prin intermediul citokinelor, chemokinelor. Imunitatea celulară este crucială pentru controlul replicării HIV și are un impact substanțial în evoluția infecției

Umoral – Ac apar precoce în infecție primară, dar depistarea lor poate fi efectuată după 6-12 săptămâni de la infectare. Rolul – neutralizarea virionilor, Ac anti-gp120 împiedică fixarea HIV pe celulele-țintă. Eficiență maximă în fazele precoce ale infecției

- 5-10% din infecțați sunt "asimptomatici de lungă durată":
 - Șarjă virală redusă
 - Numărul LT CD4 stabil (peste 500 celule/ml)
 - Răspuns imun celular și umoral constant
 - Absența semnelor clinice

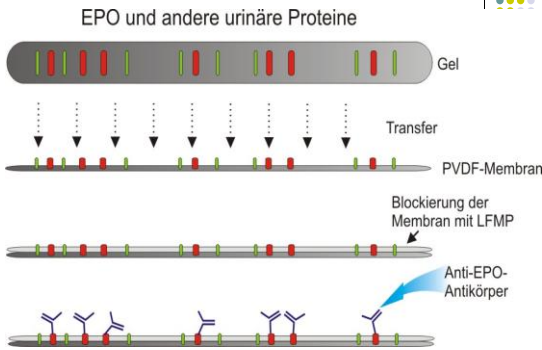
DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIEI HIV/SIDA

• **Teste Indirecte de depistare**

- Teste ELISA de depistare a Ac (după minimum 22 zile de la contagiū)
- Teste combinate Ag - Ac (detectarea Ag p24 și Ac anti-p24 prin tehnici ELISA)
- Teste rapide (RA cu particule de gelatină sensibilizate cu Ag)

- **Teste de confirmare** (în caz de reacție pozitivă) Tehnica de referință – **Western-blot** (separarea el-for. a proteinelor virale, transferarea lor pe o bandă de nitroceluloză, tratarea cu serul cercetat, apoi efectuarea RIE). Pot fi detectați Ac contra tuturor Ag HIV.

Testul Western Blot



Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

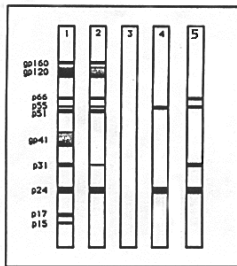
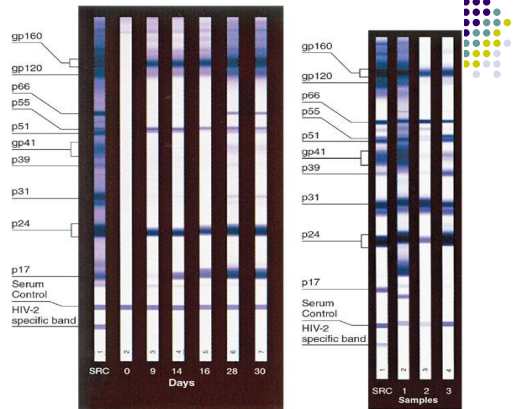


Figure:
Examples of reactions by an HIV-1 Western blot:
1. Positive control (strong)
2. Positive control (weak)
3. Negative control
4. Indeterminate profile
5. Indeterminate profile (highly suggestive)

Criterii de apreciere: un ser este considerat pozitiv dacă sunt prezenți Ac contra cel puțin 2 Ag de suprafață (gp160, gp120, gp41), asociați cu Ac contra cel puțin o proteină internă (p24, p17 sau a enzimelor)

• **Teste directe**

1. Detectarea **Ag p24** (marker direct al infecției HIV) prin tehnici ELISA. Poate fi detectat în primo-infecție până la seroconversie. Ag p24 reapare în momentul evoluției spre SIDA.

2. Detectarea **ARN-ului** plasmatic sau **ADNv** prin teste de amplificarea genică.

Prezența ARNv în ser denotă replicarea constantă a virusului. Determinarea șarjei virale este utilizată pentru monitorizarea unui pacient infectat.

3. **Izolarea HIV** în cultură

Se realizează prin inocularea cu plasmă sau celule mononucleate de la bolnav a unei culturi de celule mononucleate de la donatori sănătoși.

Replicarea este detectată prin evidențierea Ag p24, RT sau a ARNv.

● **Diagnosticul primo-infecției** (markerii virali)

- **ARNv** plasmatic (apare după 8-17 zile de la contagiu)

- **Ag p24** în ser (până la apariția Ac anti-p24)

- **Ac anti-HIV** (după minimum 3 săptămâni de la contagiu)

● **Monitorizarea seropozitivilor**

- **Parametrii imuno-hematologici** - (formula sangvină, determinarea subpopulațiilor de LT (valori absolute, raport T CD4/T CD8), dozarea Ig, microglobulinei beta2

- **Markerii virali** - **șarja virală plasmatică** (ARNv), Ag p24, Ac anti-p24

CHIMIOTERAPIA ANTIRETROVIRALĂ

● **După mecanismul de acțiune:**

1. **Inhibitorii nucleozidici și nucleotidici ai RT** (Abacavir, Didanosin, Lamivudin, Stavudin, Zalcitabin, Zidovudin, Tenofovir)
2. **Inhibitorii nenucleozidici ai RT** (Delavirdin, Efavirenz, Nevirapin)
3. **Inhibitorii ai proteazelor** (Amprenavir, Indinavir, Lopinavir, Nelfinavir, Ritonavir, Sanquinavir)
4. **Inhibitorii adevizării și penetrării** – în curs de evaluare (CD4, T20)
5. **Inhibitor ai asamblării și eliberării** - Interferonul alfa

- Binding to surface receptors
- Fusion of viral and host cell membranes
- Uncoating of the nucleocapsid
- Reverse transcription of RNA to DNA
- Integration of DNA provirus into the host genome
- Replication (Host DNA polymerase)
- Transcription (Host RNA polymerase II)
- RNA splicing in the host cell nucleus (host and viral factors)
- Translation of viral proteins
- Proteolysis of viral polyproteins
- Glycosylation of gp 160
- Phosphorylation of viral proteins
- Fatty acylation of GAG
- Assembly of the virus at the host cell membrane
- Budding
- Maturation of the virus particle after budding

Indicatii pentru TAR

- **I categorie:** pacientii simptomatici, SIDA sint tratati la orice valoare a celulelor CD4 sau ARN HIV
- **II categorie:** pacientii asimptomatici sint tratati daca nivelul celulelor CD4 este < de 350 la orice valoare a ARN HIV
- **III categorie:** pacientii asimptomatici si CD4 > 350, sint tratati in functie de nivelul ARN HIV (>50000 copii/ml)

* Pentru identificarea indicatiilor pentru initierea imediata a TAR se recomanda de utilizat numarul de limfocite

CD4(< de 200- 350) si nivelul ARN HIV(>50000 copii/ml) . De exemplu, tuberculoza pulmonara poate fi prezenta indiferent de numarul de leucocite CD4 si nivelul ARN HIV , iar celelalte criterii clinice (diareea cronica, febra persistenta si al.) pot fi induse de alte cauze care nu sunt legate cu infectia HIV.

Este indicată asocierea a 3 chimioterapice:
2 INRT + 1 IP; 2 INRT + 1 INNRT, 3 INRT,
1 INRT+1 INNRT+IP

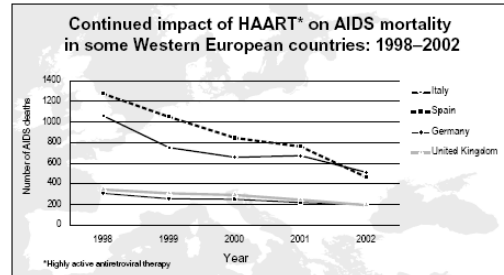
- zidovudina (300 mg) + lamivudina (150 mg)+abacavir (300mg)
- zidovudina (300 mg) + lamivudina (150 mg) + nevirapina (200 mg)
- stavudina (40 mg) + lamivudina (150 mg) + nevirapina (200 mg)
- stavudina (30 mg) + lamivudina (150 mg) + nevirapina (200 mg) pentru pacientii cu greutatea < 60kg

- Dificultăți:

- Durata și costul tratamentului
- Toxicitatea preparatelor
- Dezvoltarea rezistenței

Monitorizarea terapiei antiretrovirale:

- Măsurarea șarjei virale (copii ARNv în plasmă fiecare 6 luni)
- Determinarea numerică a LT CD4+ fiecare 3 luni



Source: HIV/AIDS surveillance in Europe (2002). End-of-year report. Data compiled by the European Centre for the Epidemiological Monitoring of AIDS.

- Persoanele infectate cu HIV și bolnave de SIDA sunt asigurate cu tratament antiretroviral gratuit.
- În semestrul I 2008 au inițiat tratamentul antiretroviral 59 bolnavi, inclusiv din teritoriile de Est - 4. Către 01 iulie curent, în total beneficiază de tratament specific antiretroviral 585 persoane, dintre care 85 din teritoriile de est.
- Au primit tratament profilactic 43 femei gravide și 43 copii, inclusiv din teritoriul de est al republicii - 12 gravide și 12 copii.
- În scopul monitorizării eficacității tratamentului s-au efectuat 1183 teste PCR și 11259 investigații ale statusului imunologic prin metoda de flucitometrie.

PROFILAXIA INFECȚIEI HIV/SIDA

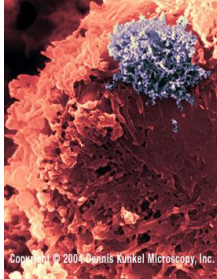
- Măsurile nespecifice: prevenirea transmiterii HIV
 - Profilaxia specifică – dificilă!!!
1. Existența a 2 virusuri HIV-1 și HIV-2 cu numeroase subtipuri genetice și antigenice, variabilitatea genetică
 2. Infecția naturală nu este stopată de răspunsul imun, iar memoria imunologică este mediocră
 3. Nu este definitiv clar rolul LT CD8+ (Tc)
 4. Lipsa unui model animal satisfăcător

STRATEGII DE VACCINARE

1. Elaborarea vaccinurilor vii atenuate
2. Elaborarea vaccinurilor inactivate
3. Vaccinuri recombinante subunitare (numai imunitate umorală)
4. Epitopi peptidici anti-gp 120 (numai imunitate umorală)
5. Utilizarea vectorilor (inserția genelor env)
6. Vaccinuri ADN

VIRUSURILE HTLV (Human T-cell Lymphotropic Virus)

- Genul Deltaretrovirus
- Specii HTLV-1 și HTLV-2
- Structura – comună retrovirusurilor
- Transmiterea – contact sexual, vertical, prin sânge (cu limfocite).
- Puterea oncogenă determinată de gena transactivatoare *tax*.
- Manifestări clinice – 1-5% din persoanele infectate dezvoltă peste 20-30 ani leucemie acută cu celule T.
- Diagnostic – depistarea virusului prin ELISA și confirmarea W-B, PCR
- Tratament – antiretrovirale, IFN



ONCOGENEZA VIRALĂ

- Cancerul este consecința dereglării procesului normal de proliferare celulară.
- Căile de apariție a cancerului:
 1. Hiperactivitatea genelor de stimulare a creșterii
 2. Blocarea genelor care inhibă creșterea

- **Virusuri cu potențial oncogen:**

1. Virusuri cu genom ADN (Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Hepadnaviridae)
2. Virusuri cu genom ARN (Retroviridae)

Caracter comun – capacitatea genomului viral de a se integra în cromosomul celei-gază, inducând transformarea ei.

Transformarea celulară – modificări ale funcțiilor biologice ale celei, ce duc la multiplicarea necontrolată a celulelor și capacitatea de invazie a țesuturilor.

- Virusurile oncogene conțin gene care pot induce tumori – *v-onc*
- Toate celulele conțin gene omologe: proto-oncogene / *c-onc* (induc o proteină care controlează replicarea ADN și multiplicarea celulară)
- *V-onc* și *c-onc* nu sunt identice!!! *C-onc* pot induce tumori numai în urma unor mutații.
- **Mecanismele oncogenezei:**
 - Virusul aduce în celulă o oncogenă
 - Virusul activează proto-oncogenele celulare