

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE  
AL REPUBLICII MOLDOVA  
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„NICOLAE TESTEMIȚANU”**

**Cu titlu de manuscris  
C.Z.U: 616.36-002.2:578.891-06:616.36-006.6(043.2)**

**ȚURCANU ADELA**

**EVOLUȚIA INFECȚIEI CRONICE VIRALE DELTA – DE LA HEPATITĂ  
CRONICĂ LA CARCINOM HEPATOCELULAR**

**321.01. BOLI INTERNE (HEPATOLOGIE ȘI GASTROENTEROLOGIE)**

**Teză de doctor habilitat în științe medicale**

**Consultant științific:**

**Tcaciuc Eugen,  
doctor habilitat în șt. medicale,  
conferențiar universitar**

**Autor:**

**Țurcanu Adela  
doctor în șt. medicale  
conferențiar universitar**

**Chișinău, 2021**

**©Adela Țurcanu, 2021**

<b>CUPRINS</b>	3
<b>ADNOTARE</b>	5
<b>PEZIOME</b>	6
<b>SUMMARY</b>	7
<b>ÎNTRUDUCERE</b>	10
<b>1. HEPATITA CRONICĂ VIRALĂ DELTA – EVALUAREA PRIN PRISMA PROFILULUI CLINICO-EVOLUTIV LA NIVEL GLOBAL ȘI NAȚIONAL</b>	20
1.1 Fenomenologia hepatopatiei cronice virale delta prin definirea fenotipului clinico – virusologic evaluat la nivel global și regional.	20
1.2. Fibroza hepatică și conceptul de prezentare tardivă a pacientului cu hepatopatie cronică virală delta.	29
1.3. Carcinomul hepatocelular și conceptul de cancer precoce la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta	40
1.4. Progrese și perspective în tratamentul hepatopatiei cronice virale delta la nivel global și național	55
1.5. Concluzii la capitolul 1	66
<b>2. MATERIALE ȘI METODE</b>	68
2.1. Caracteristica cercetării	68
2.2. Metodologia cercetării	76
2.3. Metode de prelucrare statistică	77
2.4. Concluzii la capitolul 2	86
<b>3. EVALUAREA PROFILULUI CLINICO-VIRUSOLOGIC AL PACIENTULUI CU HEPATOPATOPATIE CRONICĂ VIRALĂ DELTA</b>	88
3.1. Profilul demografic și impactul transmisiei VHD al pacienților cu hepatopatie cronică virală delta	88
3.2. Stabilirea profilului virusologic al pacienților cu hepatopatie cronică virală delta și identificarea relațiilor clinico-virusologice	94
3.3. Determinarea tabloului biologic caracteristic pacienților cu hepatopatie cronică virală delta în relație cu profilul clinic.	98
3.4. Identificarea scorurilor neinvazive de stratificare a pacienților cu hepatopatie cronică virală delta în funcție de severitatea procesului fibrotic	103
3.5. Definirea conceptului de prezentare tardivă la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta.	108
3.6. Dezvoltarea și atribuirea unui scor non-invaziv cu rol de stratificare a pacientului cu hepatopatie cronică virală delta prin prisma severității bolii bolii hepatice	111
3.7. Concluzii la capitolul 3	109

<b>4. EVALUAREA PARTICULARITĂȚILOR DEMOGRAFICE ȘI AL FACTORILOR DE RISC ALE CARCINOMULUI HEPATOCELULAR LA PACIENȚII CU HEPATOPATIE CRONICĂ VIRALĂ DELTA</b>	123
4.1. Identificarea particularităților demografice al pacienților cu hepatopatie cronică virală delta și carcinom hepatocelular	123
4.2. Definirea corelațiilor clinico-virusologice la pacienții hepatopatie cronică virală delta și carcinom hepatocellular	129
4.3. Studiarea impactului factorilor de risc metabolici asociați carcinomului hepatocelular la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta.	132
4.5. Evidențierea particularităților de supraveghere a pacienților cu hepatopatie cronică virală delta	134
4.6. Concluzii la capitolul 4	135
<b>5. STUDIEREA FACTORILOR CU IMPACT ÎN PROGRESIA BOLII HEPATICE LA PACIENȚII CU INFECȚIE CRONICĂ VHD VERSUS PACIENȚII CU INFECȚIE CRONICĂ VHB</b>	137
5.1 Stabilirea interrelațiilor clinico-evolutive la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta comparativ cu pacienții cu hepatopatie cronică virală B (monoinfecție)	137
5.2 Analiza componentei virusologice și influența asupra evoluției clinice al pacienților cu HDV versus pacienții cu HBV	142
5.3 Determinarea modelului clinico-biologic și influența asupra evoluției procesului hepatic la pacienții cu HDV versus pacienții cu HBV.	144
5.4 Cercetarea caracteristicilor fibrozei hepatice și evidențierea factorilor de influență progresivă la pacienții HDV versus pacienții HBV (monoinfecție)	147
5.5. Concluzii la capitolul 5	149
<b>6. CARACTERISTICA DINAMICII PROCESULUI HEPATIC LA PACIENȚII CU HEPATOPATIE CRONICĂ VIRALĂ DELTA</b>	152
6.1. Determinarea particularităților distinctive ale pacienților cu hepatopatie cronică virală delta, în funcție de expunerea la tratament	152
6.2. Analiza factorilor asociați decompensării procesului hepatic la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta	156
6.3. Caracteristica pacienților cu infecție cronică virală delta care au dezvoltat carcinomul hepatic pe durata cercetării	159
6.4. Concluzii la capitolul 6	163
<b>7. SINTEZA REZULTATELOR</b>	166
<b>CONCLUZII GENERALE</b>	183
<b>RECOMANDĂRI PRACTICE</b>	185
<b>REFERINTE BIBLIOGRAFICE</b>	186
<b>ANEXE</b>	203
<b>CURRICULUM VITAE</b>	208

## ADNOTARE

Adela Țurcanu

### EVOLUȚIA INFECȚIEI CRONICE VIRALE DELTA – DE LA HEPATITĂ CRONICĂ LA CARCINOM HEPATOCELULAR

Teză de doctor habilitat în științe medicale

**Structura tezei:** introducere, capitole (șapte), concluzii generale și recomandări practice, referințe bibliografice (201 numiri), 184 de pagini de text de bază, 37 de figuri/diagrame, 23 tabele. Rezultatele obținute au fost publicate în 60 de lucrări științifice.

**Cuvinte cheie:** Delta, HDV, carcinom hepatocelular, ciroză hepatică delta, GDNT.

**Domeniul de studiu:** Boli Interne (hepatologie și gastroenterologie).

**Scopul cercetării:** evidențierea particularităților de progresie a bolii hepatice la pacienții cu infecție cronică virală delta prin identificarea factorilor de risc clinico-evolutivi, precum și estimarea scorurilor noninvazive de diagnostic al stadiilor avansate în boala hepatică cronică virală delta.

**Obiectivele cercetării:** 1. Evaluarea profilului clinico-virusologic al pacientului cu infecție cronică virală delta și identificarea modelului clinico-evolutiv caracteristic progresiei bolii hepatice. 2. Stabilirea modelului biologic de progresie a bolii hepatice la pacienții cu infecție cronică virală delta. 3. Caracterizarea paternului fibrotic al pacienților cu infecție cronică virală delta, prin prisma scorurilor neinvazive. 4. Aprecierea sensibilității și sensibilității scorului neinvaziv de stratificare a pacienților cu hepatopatie cronică virală delta. 5. Identificarea particularităților distinctive ale evoluției bolii hepatice la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta comparativ cu pacienții cu hepatopatie cronică virală B (monoinfecție). 6. Cercetarea particularităților clinico-biologice la pacienții cu carcinom hepatocelular asociat infecției cronice virale delta. 7. Determinarea factorilor de influență în progresia bolii hepatice la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta monitorizați pe o perioadă de timp. 8. Analiza influenței factorului terapeutic în dinamica evolutivă a hepatitei cronice virale delta. 9. Stratificarea pacienților cu hepatopatie cronică virală delta prin prisma procesului evolutiv clinico-biologic cu scopul de evaluare mai personalizată a acestor pacienți.

**Noutatea și originalitatea științifică:** în baza unui studiu complex a fost apreciată valoarea aplicativă a abordării stratificate a pacientului cu hepatopatie cronică virală delta, și a identificării factorilor cu rol de progresie în boala hepatică cronică virală delta.

**Problema științifică aplicativă de importanță majoră soluționată:** a fost realizată fundamentarea științifică a evaluării profilare ale pacientului cu HDV, ceea ce a condus la elaborarea scorului neinvaziv de decompensare hepatică și detectarea parametrilor biologici valizi cu rol de prognostic în evoluția HDV.

**Semnificația teoretică și valoarea aplicativă a lucrării:** Rezultatele cercetării au demonstrat utilitatea și informativitatea evaluării neinvazive și individualizate la pacienții cu HDV.

**Implimentarea rezultatelor științifice:** Recomandările metodice au fost implimentate în secția de hepatologie al ISMP Spitalului Clinic Republican Timofei Moșneaga, în procesul didactic al Disciplinei de gastroenterologie USMF „Nicolae Testemițanu”.

## РЕЗЮМЕ

диссертации соискателя Адела Цуркану

« Эволюция хронической дельта-вирусной инфекции - от хронического гепатита до гепатоцеллюлярной карциномы. »

**Структура диссертации:** введение, главы (семь), выводы, библиография, 184 страниц основного текста, 37 рисунков, 23 таблиц. Результаты опубликованы в 60 научных работах.

**Ключевые слова:** дельта, HDV, гепатоцеллюлярная карцинома, цирроз печени, GDNT.

**Область исследования:** внутренние заболевания (гепатология, гастроэнтерология).

**Цель исследования:** выявление особенностей прогрессирования заболевания печени у пациентов с хронической вирусной дельта гепатопатией путем выявления усугубляющих клинико-эволюционных факторов риска для развития осложнений: цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома. **Задачи исследования:** 1. Оценка клинико-вирусологического профиля пациента с хронической дельта-вирусной гепатопатией и определение клинико-эволюционной модели, характерной для прогрессирования заболевания печени. 2. Определение биологической модели прогрессирования заболевания печени у пациентов с хронической дельта-вирусной болезнью печени. 3. Характеристика фиброзного паттерна у пациентов с хронической дельта-вирусной болезнью печени. 4. Оценка чувствительности шкалы неинвазивной стратификации пациентов с хронической дельта-вирусной болезнью печени. 5. Выявление отличительных особенностей эволюции заболевания печени у пациентов с HDV по сравнению с пациентами с хронической вирусной гепатопатией HBV. 6. Исследование клинико-биологических особенностей пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой, ассоциированной с хронической дельта-вирусной инфекцией. 7. Определение факторов, влияющих на прогрессирование заболевания печени у пациентов с хроническим дельта-вирусным заболеванием печени, отслеживаемых в течение определенного периода времени. 8. Анализ влияния терапевтического фактора на эволюционную динамику хронического дельта-вирусного гепатита. 9. Стратификация пациентов с хронической дельта-вирусной гепатопатией через призму клинико-биологического эволюционного процесса с целью более персонализированной оценки этих пациентов.

**Научная новизна и оригинальность:** на основе комплексного исследования была оценена аппликативная ценность стратифицированного подхода пациента с хроническим дельта-вирусным заболеванием печени и выявление факторов риска с ролью прогрессирования в заболевании печени.

**Новые научные и практические результаты:** было выполнено научное обоснование оценки профилирования пациента с HDV, что привело к разработке неинвазивной шкалы декомпенсации печени и выявлению достоверных биологических параметров с прогностической ролью.

**Теоретическая значимость и практическая ценность работы:** результаты исследования продемонстрировали полезность и информативность неинвазивной и профилярной оценки HDV.

**Внедрение научных результатов:** Методические рекомендации были внедрены в отделении гепатологии ISMP Республиканской клинической больницы им. Тимофея Мошнеага, в дидактическом процессе подготовки медицинского персонала на ГУМиФ “Николае Тестемицану”.

## SUMMARY

The dissertation by **Adela Turcanu**

### **Evolution of chronic viral delta infection – from chronic hepatitis delta to hepatocellular carcinoma**

**Structure of dissertation:** introduction, seven chapters, conclusions, bibliography, 184 pages of basic text, 37 figures, 23 tables. The results were published in 60 scientific papers.

**Keywords:** Delta, HDV, hepatocellular carcinoma, delta liver cirrhosis, GDNT.

**Field of study:** Internal Diseases (hepatology and gastroenterology).

**Aim of the research:** highlighting the peculiarities of liver disease progression in patients with chronic delta hepatopathy by identifying aggravating clinical-evolutionary risk factors, as well as estimating noninvasive scores predictive for advanced stages of chronic delta viral liver disease (liver cirrhosis and carcinoma). **Research objectives:** 1. Evaluation and identification of the clinical-virological profile of the patient with chronic viral HDV. 2. Establishment of the biological model of liver disease progression in patients with chronic HDV. 3. Characterization of the fibrotic pattern of patients with chronic delta viral liver disease. 4. Assessment of the sensitivity and specificity of the noninvasive score of patients with chronic HDV. 5. Identification of the distinctive features of the evolution of liver disease in patients with chronic HDV compared to patients with chronic HBV. 6. Research of clinical-biological features in patients with hepatocellular carcinoma associated with chronic delta viral infection. 7. Determining the influencing factors in the progression of liver disease in patients with chronic delta viral liver disease monitored over a period of time. 8. Analysis of the influence of the therapeutic factor in the evolutionary dynamics of chronic delta viral hepatitis. 9. Stratification of patients with chronic delta viral liver disease through the prism of the clinical-biological evolutionary process in order to more personalized evaluation of these patients.

**Scientific novelty and originality:** based on a complex study, the applicative value of the stratified approach of the patient with chronic delta viral liver disease, and the identification of risk factors with a role of progression in delta viral liver disease was assessed.

**The importance of this study:** the scientific substantiation of the profiling evaluation of the patient with HDV was performed, which led to the elaboration of the noninvasive liver decompensation score and the detection of valid biological parameters with prognostic role in HDV evolution.

**Theoretical significance and applicative value of the thesis:** The research results demonstrated the usefulness and informativeness of the HDV noninvasive and individualized evaluation.

**Implementation of scientific results:** The methodological recommendations were implemented in the hepatology department of the ISMP of the Republican Clinical Hospital Timofei Moşneaga, in the didactic process of training medical staff at the gastroenterology discipline of SUMP N. Testemiţanu

## ABREVIERI

AASLD	Asociația Americană pentru Studiul Bolilor Ficatului
Ac	Anticorpi
ADN	acid dezoxiribonucleic
AgHBe	antigenul e al virusului hepatic B
AgHBs	antigenul superficial (s) al virusului hepatic B
ALT	Alaninaminotransferază
AMA	anticorpi antimitocondriali
ANA	anticorpi antinucleari
anti-HBc	anticorpi către antigenul Hbcor
anti-HBc IgM	anticorpi către antigenul HBcor clasei imunoglobulinei M
anti-Hbe	anticorpi către antigenul Hbe
anti-HBs	anticorpi către antigenul HBs
anti-VHC	anticorpi către virusul hepatic C
anti-VHC IgM	anticorpi către virusul hepatic C clasei imunoglobulinei M
anti-LKM	anticorpi antimicrozomali
anti-VHD	anticorpi către virusul hepatic D
anti-VHD IgM	anticorpi către virusul hepatic D clasei imunoglobulinei M
ARN	acid ribonucleic
AST	Aspartataminotransferază
CH	ciroză hepatică
CrH	Carcinom hepatocelular
ECG	Electrocardiogramă
EIA	analiză imunoenzimatică
FA	fosfatază alcalină
EGDS	Esofagogastroduodenoscopie
gGTP	Gamaglutamiltranspeptidază
HC	hepatită cronică
HCC	carcinom hepatocelular
HBV	hepatită virală B
HCV	hepatită virală C



HDV	hepatită virală D
HDL-colesterol	Colesterol al lipoproteinelor cu densitate înaltă ( <i>high density lipoproteins cholesterol</i> )
IFN	Interferon
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
LDL-colesterol	Colesterol al lipoproteinelor cu densitate joasă ( <i>low density lipoprotein cholesterol</i> )
PBH	puncție-biopsie hepatică
PCR	reacție de polimerizare în lanț ( <i>polymerase chain reaction</i> )
RIBA	analiză prin imunoblot recombinant ( <i>recombinant immunoblot assay</i> )
RMN	rezonanță magnetică nucleară
SMA	anticorpi antifibră musculară netedă ( <i>smooth muscle antibodies</i> )
TAV	terapie antivirală
TC	tomografie computerizată
USG	Ultrasonografie
VHB	virusul hepatitic B
VHC	virusul hepatitic C
VHD	virusul hepatitic D

## ÎNTRUDUCERE

### Actualitatea și importanța problemei abordate

Infecția cronică cu VHD rămîne o importantă cauză de morbiditate în țările Europei de Est și regiunea bazinului Mediteranean. În același timp se observă o renaștere a infecției VHB și VHD la persoanele tinere (vârsta mai mică de 50 de ani) în Europa de Vest, ca o consecință a modului intrafamiliar și sexual de achiziție printre imigranții din Europa de Est, a regiunii Mediteranene și din țările fostei Uniuni Sovietice, precum și datorită utilizării drogurilor intravenoase în această regiune vestică [10, 79, 38, 199]. Sunt recunoscite trei paternuri epidemiologice ale infecției hepatice delta: boala endemică, focare epidemice în comunități izolate de AgHBs-purtători și boala din cadrul grupelor de risc înalt [57, 123]. Hepatopatia cronică virală delta este un proces dinamic, progresiv. A fost observat și un patern citopatic direct de afectare a tesutului hepatic, în special în prezența genotipului 3 VHD. Unele studii sugerează că viremia VHD nu se asociază cu gradul de inflamație hepatică (VHD genotip 1), ci severitatea procesului hepatic ar fi influențată de cantitatea AgHBs. Se relatează că hepatita cronică virală delta progresează la ciroză și cancer hepatocelular, iar această tendință este mai mare cu cât este mai mare nivelul viremiei VHD la momentul prezentării [84, 117, 183]. Cu toate acestea, odată ce s-a dezvoltat ciroza, rolul nivelurilor ridicate de ARN VHD ca predictor al unui rezultat negativ devine atenuat. VHD induce stimularea genelor interferonului precum și citochinelor proinflamatorii (mult mai evident decât în mono-VHB) contribuind la persistența și severitatea inflamației [33, 65,120]. În dezvoltarea bolii pe termen lung infecția persistentă cronică a virusului hepatitic B cu antigen Delta și necroza inflamatorie recurentă a ficatului determină regenerarea și repararea sau activarea celulelor stelate hepatice, displazia de țesut conjunctiv intrahepatic și o depunerea matricei extracelulare anormale care are ca efect fibroza hepatică și ciroza hepatică. În hepatita cronică virală delta, identificarea fibrozei avansate și a cirozei rămâne importantă, în special pentru luarea de decizii clinice, cum ar fi terapia, screeningul pentru carcinomul hepatocelular, monitorizarea complicațiilor legate de ciroză și listarea pentru transplantul hepatic [13, 48,71, 101]. De notat, că nici unul dintre cele mai frecvente scoruri clinice pentru a prezice rezultatul bolii hepatice: modelul pentru stadiul terminal al bolii hepatice (MELD) sau scorurile Child-Pugh nu au fost evaluate în hepatita delta. Cu atât mai mult, scorurile noninvazive de evaluare a fibrozei hepatice (APRI, FIB-4, Fibroscan, Fibrotest) au fost validate pentru HCV și HBV, dar nu și pentru HDV [1,3,91]. Așa dar, la etapa actuală când aprecierea gradului de fibroză hepatică nu mai necesită efectuarea biopsiei hepatice, este necesar identificarea și validarea unor scoruri sensibile și

pentru boala hepatică indusă de infecția cronică virală delta. Evoluția clinică a infecției cronice cu VHD cronică a fost descrisă ca fiind accelerată în comparație cu mono-infecția cu virusul hepatitei B cu rate de progresie a fibrozei către ciroză în 2–6 ani [13,73,82]. VHD este implicat în selectarea formelor mutante ale VHB, cu rol în capacitatea replicativă a ambilor viruși (Shirvani-Dastegerdi 2016), VHD prezentându-se și ca un factor direct implicat în carcinogeneza hepatică (prin alterarea metilării ADN). Cancerul hepatic indus de VHD este mai frecvent întâlnit la pacienții tineri [22, 106, 172]. Identificarea factorilor de risc care prezic evoluția evenimentelor clinice ar fi foarte utilă în gestionarea pe termen lung a pacienților cu HDV, în special pentru a selecta acei indivizi care ar beneficia cel mai mult de terapia antivirală. Interferonoterapia rămâne tratamentul de bază pentru VHD, eficacitatea fiind de 20-25% sub o durată de terapie prelungită (mai mult de 1 an) [18, 148, 149]. Relaps-ul ARN VHD este frecvent întâlnit la pacienții cu răspuns virusologic postterapie [66, 113]. Clearance-ul AgHBs este punctul final în terapia HDV [31. 99, 116]. Monitorizarea cantitativă a HBsAg este necesară la toți pacienții cu VHD pe IFN-terapie, care va fi stopată la pierderea AgHBs (cu sau fără apariția anticorpilor AgHBs). Astfel, viremia ARN VHD persistentă, precum și persistența unui nivel mai mare de 1000 ui/ml de AgHBs, gradul de fibroză avansat sunt factori ce influențează dezvoltare hepatocarcinomului [83,88]. Sunt date care demonstrează că chiar dacă pe interferonoterapie s-a atins negativarea ARN VHD prelungirea tratamentului cu NUC pentru VHB ar reduce semnificativ riscul de hepatocarcinom. Aceste condiții au argumentat efectuarea unui studiu complex interesând scorurile neinvazive în boala hepatică cronică virală delta, precum și identificării factorilor de risc implicați în evoluția progresivă a acestei boli către ciroză hepatică, carcinom hepatocelular și deces.

### **Scopul și obiectivele**

**Scopul:** evidențierea particularităților de progresie a bolii hepatice la pacienții cu infecție cronică virală delta prin identificarea factorilor de risc clinico-evolutivi, precum și estimarea scorurilor noninvazive de diagnostic al stadiile avansate al bolii hepatice cronice virale delta.

### **Obiectivele investigaționale:**

1. Evaluarea profilului clinico-virusologic al pacientului cu hepatopatie cronică virală delta și identificarea modelului clinico-evolutiv caracteristic progresiei bolii hepatece.

2. Stabilirea modelului biologic de progresie a bolii hepatice la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta.
3. Caracterizarea paternului fibrotic al pacienților cu hepatopatie cronică virală delta, prin prisma scorurilor neinvazive.
4. Aprecierea sensibilității și sensibilității scorului neinvaziv de stratificare a pacienților cu hepatopatie cronică virală delta.
5. Identificarea particularităților distinctive ale evoluției bolii hepatice la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta comparativ cu pacienții cu hepatopatie cronică virală B (monoinfecție).
6. Cercetarea particularităților clinico-biologice la pacienții cu carcinom hepatocelular asociat infecției cronice virale delta.
7. Determinarea factorilor de influență în progresia bolii hepatice la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta monitorizați pe o perioadă de timp.
8. Analiza influenței factorului terapeutic în dinamica evolutivă a hepatitei cronice virale delta.
9. Stratificarea pacienților cu hepatopatie cronică virală delta prin prisma procesului evolutiv clinico-biologic cu scopul de evaluare mai personalizată a acestor pacienți.

### **Noutatea științifică a rezultatelor obținute**

Cercetarea respectivă este un prim studiu complex care studiază profilul demografic și virusologic al pacientului cu hepatopatie cronică virală delta din diferite regiuni ale Republicii Moldova.

A fost determinat impactul transmiterii virusului hepatitic delta asupra evoluției clinice al bolii hepatice.

A fost identificat modelul biologic caracteristic progresiei și decompensării bolii hepatice cronice induse de VHD.

A fost apreciat paternul fibrotic caracteristic bolii hepatice induse de VHD, determinându-se factorii legați de pacient care influențează evoluția fibrozei hepatice. Astfel, a fost definită grupa pacienților „prezentatori tardivi”, o nouă categorie de pacienți cu HDV cu risc de complicații precoce.

A fost evaluată sensibilitatea și sensibilitatea diferitor scoruri neinvazive de evaluarea a fibrozei hepatice (index Fibrosis, FibroQ, GUCI, King score, API, APRI, GPRI) și a fost determinat scorul cel mai sensibil în evaluarea progresiei HDV.

A fost creat și măsurat scorul de apreciere a cirozei hepatice GDNT cu rol predictiv în progresia bolii hepatice, care este un instrument accesibil, ieftin, aplicabil atât la nivel de specialist, cât și la nivel de pacient.

Au fost determinate caracteristicile carcinomului hepatocelular asociat cu VHD.

Au fost analizați și stabiliți factorii cu influență asupra decompensării bolii hepatice și dezvoltării carcinomului hepatocelular la pacienții cu HDV.

### **Problema științifică rezolvată în cercetare**

Justificarea și aprobarea modelului de îngrijire continue al pacientului cu boală hepatică cronică indusă de VHD și monitorizarea factorilor agravanți ai progresiei bolii hepatice. Definierea conceptului de prezentare tardivă și boală avansată la pacientul cu HDV.

Evidențierea factorului intrafamiliar de achiziție a VHD, cu rol în progresia bolii hepatice și implementarea screeningului infecției VHD la toți membrii familiei pacientului cu AgHBs pozitiv.

Identificarea și atribuirea scorului neinvaziv de diagnosticare a cirozei hepatice la pacienții cu hepatopatia cronică virală delta și introducerea acestui scor ca un instrument de monitorizare a severității procesului hepatic atât la nivel de specialist, cât și la nivel de pacient.

Introducerea conceptului de screening precoce al carcinomului hepatocelular la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta.

Definierea rolului citochinelor proinflamatorii în evoluția procesului hepatic provocat de VHD.

Identificarea și elaborarea algoritmului de evaluare multilaterală al pacientului cu hepatopatie cronică virală delta prin definirea indicatorilor clinici și biologici, ceea ce a permis

determinarea riscului de decompensare hepatică și de dezvoltare al carcinomului hepatocelular implicând ulterior clasificarea țintită a grupelor de pacienți (cu risc înalt și fără risc).

### **Semnificația teoretică**

Rezultatele cercetării au elucidat caracteristicile evolutive ale infecției cronice virale delta sub aspectul clasic (aparitia complicațiilor în timp), precum și sub aspectul factorilor care au influențat evoluția progresivă a acestei boli. Aceasta a contribuit la determinarea particularităților evolutive ale bolii hepatice induse de VHD în funcție de origine, mod de transmisie a infecției precum și profilul virusologic al VHB și VHD. Factorii determinanți ai evoluției hepatopatiei cronice virale delta au condus la identificarea profilului pacientului cu hepatopatie cronică virală delta prin prisma tabloului clinic atât pe interiorul grupului de cercetare, cât și la grupul - martor. Importanța științifică ale rezultatelor acestei cercetări se impune la evaluarea complicațiilor bolii hepatice virale delta și crește atunci când, pe lângă analiza retrospectivă, s-a efectuat și analiza prospectivă a evoluției bolii, efectuată prin supravegherea în timp a acestor pacienți. Astfel, rezultatele și dovezile obținute cu privire la tendința de progresie și dezvoltare a cirozei hepatice de novo, decompensării cirozei hepatice și carcinomului hepatocelular sunt argumente științifice de amploare care ar putea fi valorificate în elaborarea politicilor în domeniul screening-ului activ și controlului complicațiilor hepatopatiei cronice virale delta. Rezultatele cercetării respective care s-au axat pe abordare calitativă evolutivă a bolii hepatice și atribuire de scoruri neinvazive, aplicabile la diferit nivel de asistență medicală permit analizarea multilaterală a progresiei bolii hepatice. Iar abordarea directă a acestei boli hepatice cronice, interesând pentru prima dată țara noastră, a contribuit la identificarea priorităților privind îmbunătățirea controlului complicațiilor hepatice la nivel național. În premieră, a fost efectuată evaluarea profilului clinico-virusologic al infecției cronice cu VHD în funcție de statutul social (locul de origine, vârstă) în relația cu profilul molecular-genetic (ARN VHD și ADN VHB) și frecvența complicațiilor hepatice. Rezultatul obținut a evidențiat două profile clinico-virusologice, caracteristice la nivel național: profilul sudic și profilul non-sudic. Totodată, analiza paternului fibrotic a identificat alte două profile ale pacienților: profilul lent-progresiv și profilul rapid-progresiv. Importanța identificării și cunoașterii hepatopatiei cronice virale delta din aspectul multiprofilar este important pentru ajustarea practicilor internaționale privind identificarea și supravegherea factorilor de risc la condițiile și necesitățile Republicii Moldova

## **Valoarea aplicativă a lucrării**

Rezultatele obținute în urma cercetării pot fi considerate ca dovezi pentru pentru elaborarea unui concept nou multifactorial și accesibil pentru boala hepatică cronică indusă de virusul hepatitic delta. Identificarea factorilor cu influență asupra progresia acestei boli, precum și definirea scorului neinvaziv de diagnostic al bolii decompensate se impun în stabilirea unei conduite de monitorizare a evoluției infecției cronice virale delta prin ciroză hepatică și carcinom hepatocelular. Astfel, sunt recomandate mai multe măsuri (1) implimentarea îngrijirii continue a pacientului cu HDV, (2) includerea în protocol clinic național: „Hepatita cronică virală B cu antigen delta” în criteriile de spitalizare a unui nou criteriu: “este obligatorie spitalizarea pacientului cu hepatopatie cronică virală delta, care atestă prezența unei formațiuni suspecte la examenul ecografic +/- sporirea alfa-fetoproteinei”, (3) includerea în recomandările de diagnostic a scorului neinvaziv de diagnostic al bolii hepatice decompensate GDNT. Rezultatele studiului au determinat aplicabilitatea scorului GDNT la nivel de pacient cu auto-raportare foarte bună în vederea depistării progresiei bolii hepatice și intervenției rapide în controlul acesteia. Acest fapt, poate plasa scorul respectiv ca o metodă de evaluare a bolnavului cu hepatopatie cronică virală delta de la distanță, metodă necesară la etapa când pacientul nu se poate deplasa la unitatea medicală (spre ex., situație de pandemie). Stadializarea neinvazivă a carcinomului hepatocelular la nivel de asistență medicală specializată – gastroenterologie/hepatologie, prin utilizarea scorului ALBI/ PALBI la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta este propusă ca metodă de depistare precoce a pacientului suspect. Iar recomandările obținute ca rezultat al studiului sunt propuse spre utilizare în secțiile de gastroenterologie și hepatologie, precum și în secțiile de boli infecțioase, la nivel de medic de familie.

## **Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere**

1. A fost evidențiat că severitatea hepatitei cronice virale delta este influențată de prezența mai multor factori legați de gazdă și de virus. Identificarea factorilor biologici, legați de loc de trai, vârstă și condițiile asociate, probabil, interacționează în sensul agravării procesului hepatic.
2. Identificarea impactului de transmisie a infecției VHD conduce la depistarea unor aspecte demografice influențabile pe severitatea bolii hepatice. Astfel, riscul intrafamiliar de achiziție

a infecției VHD (modul orizontal de transmisie) a fost asociat cu o severitate mai mare, precum și cu dezvoltarea complicațiilor hepatice (în special carcinom hepatocelular).

3. Implimentarea conceptului de prezentare tardivă a HDV este o metodă de stadializare a pacientului netratat, care definește situația caracteristică a acestei boli, și anume de prezentarea în stadiul tardiv la prima vizită medicală, când tratamentul existent este contraindicat.
4. Evaluarea neinvazivă a fibrozei hepatice la pacienții cu HDV a identificat că Indicele de fibroză a fost sistemul de notare cu cel mai bun nivel de discriminare între pacienții cu ciroză hepatică delta și cei cu hepatită cronică virală delta ( $3,6 \pm 0,1$  față de  $2,6 \pm 0,1$ ,  $P = 1,5E-13$ ).
5. Scorul neinvaziv de diagnosticare a cirozei GDNT (sistemul de punctare creat de noi) a fost capabil să diferențieze corect pacienții cu afectare hepatică în stadiul decompensat, compensat și fără ciroză. Iar curba ROC a scorului GDNT a fost mai performantă decât toate sistemele de punctare testate.
6. Dinamica virusologică a infecției cronice virale delta a influențat evoluția progresivă a bolii, astfel seroconversie în sistemul AgHBe/anti-AgHBe a fost universală la pacienții cu HDV versus pacienții cu HBV,  $p = 1,7 E-06$ . Iar, în ciroza hepatică delta qADN VHB era cu un log zecimal sub nivelul cazurilor mono-infectate ( $p = 0,0024$ ), această reflectând, probabil pierderea hepatocitelor competente în replicare în cazul cirozei în contextul infectat cu VHD.
7. Evoluția hepatopatiei cronice virale delta spre ciroză hepatică reflectă un comportament deosebit și la nivelul de replicare VHD, astfel dezvoltarea cirozei hepatice se asociază cu reducerea qARN VHD versus cazurile fără ciroză ( $p = 0.002$ ).
8. Analiza factorilor asociați progresiei bolii hepatice a identificat pacientul cu un risc mai mare de progresie pentru ciroză hepatică. Astfel, pacientul cu hepatopatie cronică virală delta, cu achiziția intafamilială de VHD (OR2.09, CI 95% 1.06-4.12), ADN VHB detectabil (OR4.13, CI 95%: 3.12-9.65) și ARN VHD detectabil, OR 3.13, CI95%: 1.42-6.21) este supus riscului de a progresa rapid spre ciroză hepatică.
9. Expunerea la tratamentul cu TAV (IFN) nu a influențat progresia bolii în vederea decompensării hepatice, deși s-a asociat cu un risc redus de dezvoltare al carcinomului hepatocelular.
10. Diagnosticul și supravegherea pacientului cu hepatopatie cronică virală delta trebuie să fie personalizat și considerat din aspectul factorilor de risc, iar screeningul precoce al complicațiilor trebuie să fie implimentat în strategiile de control al acestei boli, la nivel național.



### **Aprobarea rezultatelor științifice.**

Rezultatele științifice obținute au fost raportate în cadrul comunicărilor la diverse foruri științifice:

- International Liver Congress (EASL), 13 April 2018 (Paris, France)
- APASL STC Single Topic Conference Delta Hepatitis, 27 June 2019 (Baku, Azerbaijan)
- Workshop Universitat Leipzig, in colaboration with Moldova Institut Leipzig, 17 May 2019 (Leipzig, Germany)
- Workshop Moldova-Lepzig: Wissentransfer zu Methoden und Praxis der Hepatologie, 7 februarie 2020 (Chișinău, Republica Moldova).
- Annual Meeting of the German Association for the Study of the Liver (GASL), 21 ianuarie 2017 (Essen, Germania)
- EASL Closed-door Workshop Baku, 26 iulie 2019 (Congress Center Baku, Azerbaijan)
- Curs Update Hepatology cu participare internațională, 29 mai 2018 (Chișinău, Republica Moldova)
- Forum național din cadrul Asociației de Imunologie și Alergologie Clinică, 2018
- Școala de vară de Gastroenterologie și Hepatologie (Republica Moldova), 16 iunie 2017
- Simpozion interdisciplinar cu participare internațională, 25 noiembrie 2017, Chisinau, Republica Moldova

Totodată rezultatele cercetării au fost susținute și de Asociația Europeană de Studiu al Ficatului, prin oferirea unui grant EASL (Hepatitis Delta International Registry 2018).

Rezultatele cercetării au fost premiate cu diplomă pentru cele mai bune 3 lucrări de științifice în cadrul APASL STC Single Topic Conference Delta Hepatitis, 27 June 2019 (Baku, Azerbaijan).

Cercetarea respectivă a fost elaborată, aprobată și implimentată în cadrul mai multor proiecte științifice:

Proiect: “Îmbunătățirea diagnosticării, prevenirii și tratamentului bolilor hepatice de origine virală în Republica Moldova, Colaborare internațională dintre Universitatea Leipzig, Germania și IP USMF Nicolae Testemițanu, sub auspiciile Moldova Institut Leipzig, Germania (2018-2020)

Proiectul internațional susținut de Fundația Germană de Studiu al Ficatului - HDIN: Hepatitis delta International Network. D- 30625 Hanouver, Germania 2015 – present (Project leader in Moldova

Republic).

Proiect instituțional “Studiul particularitatilor epidemiologice, clinico- imunologice si molecular-genetice ale maladiilor imunodeficitare primare si secundare (pe model de hepatita cronica virala delta) cu elaborarea procedeelor inedite pentru imunoreabilitare, inclusiv remedii autohtone” codul 15.817.04.06f. (2016-2020).

În cadrul cercetării subiectului înaintat pentru teza de doctor habilitat în medicină au fost publicate 60 lucrări științifice: monografie fără coautor „Hepatopatia cronică virală delta – de la hepatita cronică la carcinom hepatocelular” (231 pag.), subcapitole în 2 monografii colective, șapte articole în reviste științifice de specialitate cu circuit internațional: 5 articole cu impact factor, 15 articole în reviste științifice din Registrul Național al revistelor de profil categoria B; categoria C, articole în materialele conferinței științifice naționale, rezumate în culegeri de rezumate în cadrul conferințelor și congreselor internaționale, ghiduri, compendii și îndrumări metodice, 10 protocoale clinice naționale și instituționale. Rezultatele cercetării au fost implementate în cadrul activităților IMSP Spitalul Clinic Republican “Timofei Moșneaga” și procesul didactic la disciplina de Gastroenterologie, USMF „Nicolae Testemițanu”.

### **Sumarul compartimentelor tezei.**

Teza conține 184 pagini de text de bază, fiind structurată în conformitate cu rigorile de întocmire a tezei de doctor habilitat, astfel conține: foia de titlu, foia privind dreptul de autor, cuprins, adnotare în limba română, engleză și rusă, introducere, studiu de sinteză a literaturii medicale (capitolul 1), metodologia cercetării clinice (capitolul 2), compartimentele de bază ale tezei care includ rezultatele cercetării (cuprinse în capitolul 3-6), concluzii generale și recomandări și bibliografia (include 201 numiri), 4 anexe, declarația privind asumarea răspunderii, CV-ul autorului. Rezultatele cercetării respective sunt introduse și prezentate în 37 de figuri, 23 tabele. În primul capitol a fost definită problema hepatopatiei cronice virale delta prin prisma profilului clinico-evolutiv, precum și s-au accentuat caracteristicile particularitativ ale acestei boli pentru țara noastră în comparație cu datele altor țări. Iar în scopul identificării ipotezelor de cercetare au fost analizate direcțiile de evoluție și dezvoltare a complicațiilor prin evidențierea factorilor de risc cu impact în progresia bolii în cauză. În capitolul 2 este descrisă etapizat metodologia cercetării, prin proiectarea design-ului studiului de bază precum și substudiilor complementare, bazat pe obiectivele prevăzute pentru realizarea scopului prestabilit. S-a evidențiat amănunțit metodologia fiecărui studiu invocat în cele 3 substudii

complementare: studiul descriptiv - retrospectiv și predictiv (determinarea evolutivă demografico-corelațională tumorală în HDV), studiul analitic evaluare-rezultat (centrat pe fenomenul clinico-evolutiv), studiul de cohortă caz-control (evaluarea factorilor de risc progresivi). În *capitolul 3* este cercetat profilul pacientului cu infecție cronică virală delta din Republica Moldova, prin prisma fenomenului de transmisie al bolii și impactul acestuia în evoluția bolii hepatice. Rezultatele obținute au permis identificarea unui profil progresiv evolutiv și lent progresiv. În acest compartiment a fost identificat un scor neinvaziv (GDNT) cu rol predictiv în decompensarea bolii hepatice la pacienții cu HDV. Rezultatele studiului au permis trasarea perspectivelor de viitor care constituie argumente științifice de amploare, pentru a fi luate în considerare la elaborarea strategiilor de prevenire a complicațiilor bolii hepatice VHD-induse. În *capitolul 4* sunt descrise rezultatele cercetării orientate spre determinarea factorilor de risc pentru dezvoltarea carcinomului hepatocelular la pacienții cu HDV. Autorul în premieră a efectuat evaluarea comparativă și diferențiată a paternului tumoral hepatic la pacienții cu carcinom hepatocelular indus VHB, VHC, VHD. Rezultatele obținute au permis de a evidenția unii factori de risc specifici țării noastre cu impact în supravețuirea pacientului cu HDV și astfel atenționează despre necesitatea consolidării promovării sănătății în vederea fortificării prevenției hepatopatiei cronice virale delta. În *capitolul 5* sunt prezentate rezultatele studiului de cohortă (caz-control) privind impactul factorilor de risc în progresia bolii hepatice induse de VHB fără antigen delta versus celei induse de VHB cu antigen delta. Evaluarea factorilor de risc identificați a furnizat dovezi cantitative cu privire la prezența unor oportunități pentru eventuala aplicare în practica clinică a specialistului întru îmbunătățirea îngrijirii pacientului cu HDV. În *capitolul 6* sunt descrise rezultatele studiului de cohortă în cadrul căruia a fost efectuată evaluarea dinamicii procesului hepatic și supravețuirii pacienților cu HDV încadrați în studiu și urmăriți pe o perioadă de medie de 35.5 luni. Aceasta a facilitat identificarea premiselor pentru dezvoltarea conceptului supravegherii factorilor de risc care influențează negativ dinamica acestei boli. În următoarele compartimente sunt formulate concluziile generale și recomandările practice bazate pe dovezile obținute în cercetare.

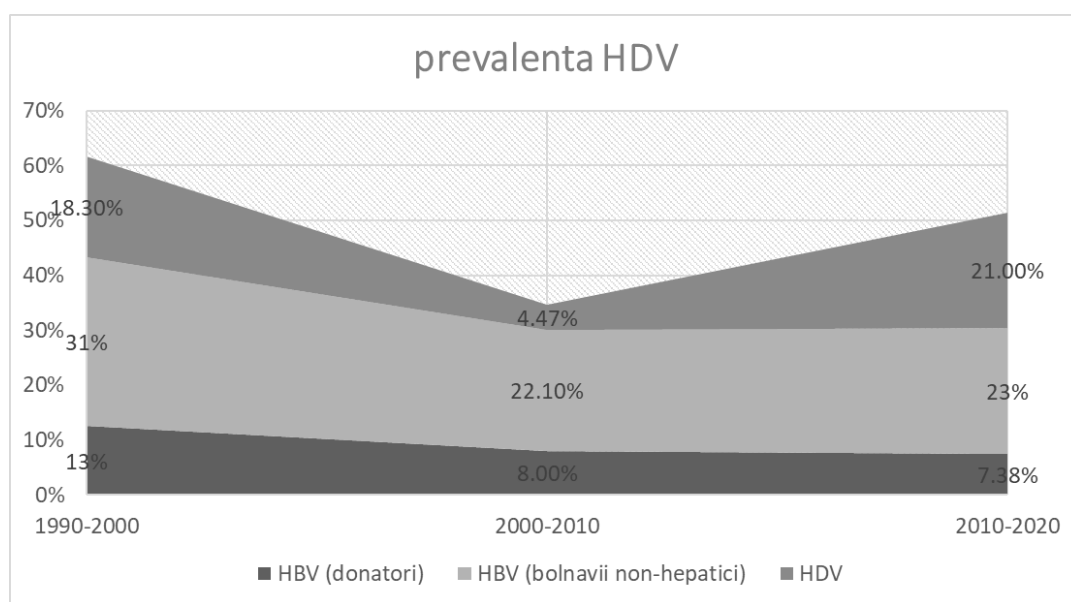
# **1. HEPATITA CRONICĂ VIRALĂ DELTA – EVALUAREA PRIN PRISMA PROFILULUI CLINICO-EVOLUTIV LA NIVEL GLOBAL ȘI NAȚIONAL**

## **1.1. Fenomenologia hepatitei cronice virale delta prin definirea fenotipului clinico – virusologic evaluat la nivel global și regional.**

Cele mai recente date cu privire la prevalența infecției cronice virale delta [5, 13, 28] declară că aproximativ 15-20 de milioane de persoane sunt infectați cronic cu VHD. Deși, date recente aduc dovezi pentru un număr mult mai consistent al infecțiilor cu VHD. Chen și colab [35] sugerează că peste 60 de milioane de persoane din întreaga lume ar putea fi infectate cu VHD. Autorii au analizat 182 de studii din 61 de țări și regiuni și au arătat că prevalența globală a infecției cronice cu VHD a fost de 0,98%. Prevalența VHD la purtătorii de AgHBs a atins 10,6%, ceea ce este de două ori mai mare decât estimările anterioare. Deși au fost ridicate mai multe probleme metodologice cu privire la acest studiu de altfel bine condus, acesta arată în mod clar că numărul pacienților infectați cu VHD este probabil mult mai mare decât estimările anterioare. Ratele de prevalență variază pe scară largă, cu rate mai mari, notate în Africa, America de Sud, Mongolia. Studiile retrospective au observat că infecția cu VHD este mai frecventă la bărbați decât la femei [26, 28, 85], la consumatori de droguri, la bărbați care au relații sexuale cu bărbați, la persoane infectate cu HIV sau VHC și pacienți cu comportament sexual riscant (mai mulți parteneri sexuali). Migrarea și transmisia sexuală sunt stabiliți recent ca factorii de risc semnificativi pentru achiziția infecției cu VHD [78, 94]. Rezultatele studiului cercetătorilor din Spania (Mireia Miguel și coautorii, 2020) demonstrează că imigranții cu hepatită cronică virală B care sunt candidați la terapia antivirală au acces scăzut la tratamente în comparație cu non-imigranții. În plus, rezultatele acestei analize confirmă faptul că imigranții infectați cu VHB reprezintă o proporție considerabilă de pacienți din zonele urbane. Aceste rezultate sunt comparabile cu cele observate într-un alt studiu spaniol realizat din perspectiva populației (Rodriguez-Tajes S și coaut., 2017) care estimează că 55% dintre pacienții infectați cu VHB într-o regiune a Spaniei sunt de origine imigranți. Studiul demonstrează, de asemenea, că pacienții imigranți sunt mai tineri datorită unei transmisii verticale mai mari și majoritatea sunt imunotoleranți. Acest fapt nu este surprinzător având în vedere că un număr mare din populația imigranților provine din regiuni cu prevalență ridicată, unde această cale de transmitere este mai frecventă. Pe de altă parte, non-imigranții erau mai

în vârstă, aveau o transmisie orizontală (adică istoricul transfuziei) și aveau alți cofactori, cum ar fi consumul de alcool.

În Republica Moldova, indicele morbidității prin hepatita virală B acută s-a redus de la 25,46 la 100000 populație în anul 1997 până la 0,99 în 2015; prin hepatită virală D (HVD) – de la 1,89 până la 0,1 în 2015, dar indicii menționați depășesc indicii țărilor europene: Austria – 0,7 cazuri la 100000 populație, Franța – 0,2, Germania – 0,7, Ungaria – 0,6, România – 1,6; pentru hepatita virală C acută: Austria – 1,6 cazuri la 100000 populație, Ungaria – 0,4, Grecia – 0,1, Lituania – 1,3, Estonia – 1,7, România – 0,4 (*Supravegherea de stat a sănătății publice în Republica Moldova. Raport Național*, 2014, p. 84). Totodată, în dinamica multianuală se observă o creștere lentă a morbidității prin hepatite cronice și ciroze hepatice de origine virală: de la 35,98±0,23% (anul 2000) până la 49,68±0,19% (anul 2011) pentru hepatitele cronice și de la 22,27±0,26% în anul 2000 până la 44,34±0,72% în 2011 pentru cirozele hepatice.



**Figura 1.1. Prevalența HDV în Republica Moldova (anii 1990-2020)**

Conform datelor statisticii moldave, în dinamica multianuală, în perioada 2000-2017, prevalența hepatitelor cronice a sporit de circa două ori – de la 1092,2±5,68 la 100.000 populație în anul 2000 până la 2156,02±7,62 la 100.000 populație în 2017. O consecință inevitabilă a hepatitelor cronice sunt cirozele hepatice, care actualmente au atins valori absolute de 10.000 cazuri și, respectiv, implică un impact economic și social considerabil. În perioada menționată, prevalența îmbolnăvirilor prin ciroze hepatice în Republica Moldova a crescut de la 168,6±2,23 cazuri la 100.000 populație în

2000 până la  $276,72 \pm 2,71$  cazuri în 2017, fiind de 1,12 ori mai mare comparativ cu media:  $M=259,94$  la 100.000 populație. S-a constatat o creștere a cancerului hepatic de la 186 cazuri (sau 5,1 la 100.000 populație) în anul 2000 până la 381 cazuri (sau 10,7 la 100.000) înregistrate în 2017. Astfel, observăm că morbiditatea prin cancer hepatic în Moldova a sporit de două ori în această perioadă. După cum numărul persoanelor cu ciroze hepatice depinde în mare parte de numărul celor cu hepatite cronice, așa și numărul persoanelor cu cancer hepatic depinde în mare măsură de numărul de persoane care au dezvoltat ciroză hepatică. Coeficientul de corelare demonstrează că morbiditatea prin cancer hepatic prezintă o corelare puternică direct proporțională cu morbiditatea prin hepatite cronice ( $r=0,86$ ) și ciroze hepatice (0,76). (A.Paraschiv, Epidemiologie, 2017). Aceste date statistice ne-au motivat pentru a cerceta aspectele evolutive ale pacienților care au fost diagnosticați cu hepatita cronică delta care au fost supuși terapiei antivirale, precum și celor care nu au administrat tratament antiviral cu interferone. În aceeași ordine de idei, la studierea structurii etiologice a hepatitelor virale cronice s-a stabilit că cele mai multe din ele sunt provocate de virusul B – 58,19%. O situație similară se atestă și în cazul cirozelor hepatice, ponderea majoră având-o virusul hepatitei B, cu media de 43,06% cazuri pentru anii 2000-2011, iar cele provocate de virusul D au constituit 9,44. [107] Opt genotipuri HDV au fost identificate până în prezent, genotipul 1 fiind distribuit pe scară largă, 2 și 4 predominant în Asia, 3 în bazinul Amazonului și 5-8 din regiunile africane. VHD era un virus transmisibil, necesită VHB pentru propriul ciclu replicativ și interferează cu replicarea VHB [110, 111]. În ultimii 40 de ani de la identificarea inițială a VHD, infecția cronică hepatică delta a devenit cunoscută drept cea mai severă formă de hepatită virală [98, 101], ceea ce duce la rate mai mari de ciroză [47, 61] și carcinom hepatocelular (HCC) [82, 88] comparativ cu infecția cu VHB mono [38, 97] și infecția cronică cu VHC (Oyunsuren T, 2006).

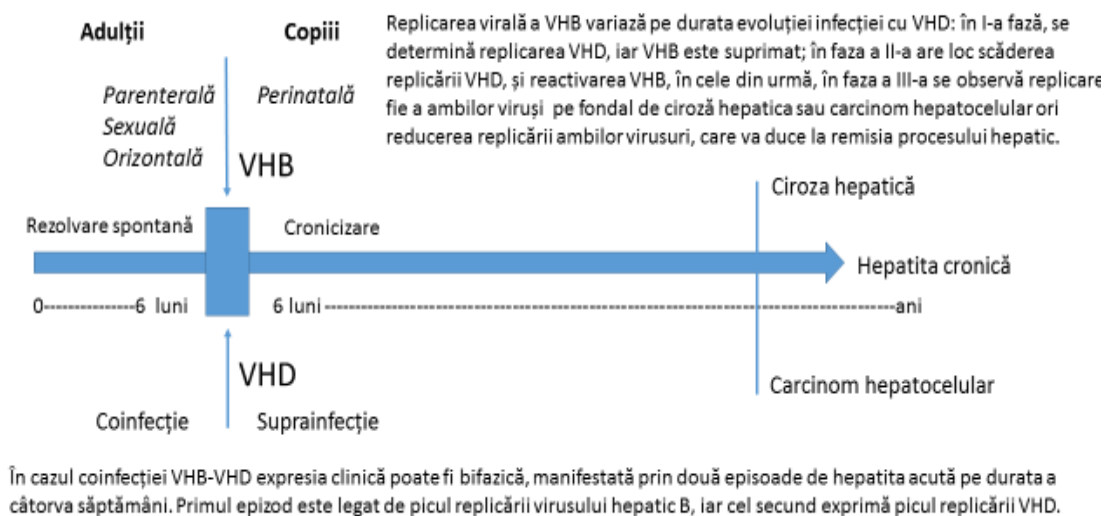


**Figura 1.2. Structura VHD**

Prezentarea clinică a hepatopatiei cronice virale delta poate fi variabilă, iar pacienții pot fi asimptomatici cu creștere ușoară a enzimelor până la insuficiență hepatică fulminantă. Infecția cu

VHD poate fi prezentată sub forma de co-infecție cu VHB acut și suprainfecție cu VHB cronic. Principala diferență serologică dintre ele este anti-HBc IgM pozitiv la indivizii co-infecțați [131, 118]. Co-infecția apare ca infecție acută a ambilor virusuri. Evoluția clinică este în mod obișnuit benign, similar cu infecția acută cu VHB, recuperarea spontană are loc la până la 90% dintre indivizi, iar evoluția spre cronicitate apare la 2-8% dintre indivizi [192]. Suprainfecția apare la persoanele cu infecție cronică cu VHB, ulterior infectate cu VHD. Recuperarea spontană are loc la 10% dintre indivizi, progresie spre cronicitate la 90% -100% dintre indivizi. Infecția cronică cu virusul hepatitic delta duce la ciroză la aproximativ în 80% cazuri în 5-10 ani [27]. Astfel, în perioada timpurie, Mario Rizzeto [110] descrie despre două forme clinice ale infecției cu VHD: coinfectia dintre VHD și VHB sau suprainfecția cu VHD la un VHB cronic. Acelaș autor menționează conform studiilor sale relația dintre infecția cu VHD și boala hepatică severă, astfel acceptându-se conceptul că acest virus este un agent foarte patogen. Contrar acestei ipoteze, Hadziyannis și colab, precum și Ottobrelli și colab. (1991) relatează despre o formă de infecție cronică virală delta latentă clinic, chiar cu ficat normal morfologic. În raportul efectuat de Caredda și coautorii în 1987 se punctează despre cronicizarea a circa 1,2% dintre pacienții cu hepatită B acută și 2,4% dintre pacienții coinfectați cu VHB/VHD, pe când la cei suprainfectați cu VHD această progresie se observă la 91%. Sunt observații, care susțin existența purtătorilor de AgHBs și anti-VHD cu alaninaminotransferază serică normală constantă și ficat normal [56, 108]. S-a demonstrat că VHD suprimă replicarea VHB. Se sugerează că afectarea hepatică este în principal din cauza VHD [109].

## Evoluția naturală a infecției virale delta



**Figura 1.3. Evoluția naturală a infecției cu virusul hepatitic delta** (ad. A. Turcanu, 2018)

Din punct de vedere clinic, suprainfecția VHD poate fi împărțită în trei faze:

- faza acută, replicarea VHD activă și suprimarea VHB cu niveluri ridicate de ALT;
- faza cronică, scăderea VHD și reactivarea VHB cu niveluri moderate de ALT;
- faza târzie, dezvoltarea cirozei și carcinomului hepatocelular, asociindu-se cu reducerea semnificativă a replicării ambilor virusuri

Evoluția bolii este semnificativă și rapidă la pacienții cu infecție cronică cu VHD ceea ce a impus evaluarea unor sistemele de punctaj, precum și markerii neinvazivi ai fibrozei hepatice, cu scopul de a prezice leziunile hepatice și urmările clinice.

Astfel, au fost identificate trei grupe de progresie a procesului hepatic conform scorului BEA: grupa cu risc de progresie ușor, moderat și înalt. Acest scor include vârsta, sexul, regiunea de origine, bilirubina, trombocitele și raportul internațional normalizat (INR) fiind alocate puncte [68, 84]. Lee CM și colab publică în J. Virol, 1992 despre rezultatele cercetării sale în domeniul relației dintre structura virusului delta și evoluția clinică. Au fost determinate secvențele complete de ARN VHD izolate la trei puncte de timp diferite la un pacient cu hepatită cronică delta. Aceste perioade de timp au reprezentat trei perioade clinice diferite. Iar, în urma analizei secvenței s-a obținut că aceste trei



izolate VHD au evoluat la o rată variind de la  $3,0 \times 10^{-2}$  până la  $3,0 \times 10^{-3}$  substituții / nucleotidă / an, în funcție de perioada de infectare. Ratele evoluției păreau a fi corelate cu modificările clinice ale hepatitei, adică, cu cât simptomatică a fost mai drastică, cu atât au fost detectate mai multe modificări ale nucleotidelor. Cu excepția perioadei de tranziție de la faza acută la faza cronică a hepatitei delta, când a existat un număr mult mai mare de modificări în secvența ARN VHD. Relația acestor ARN-uri VHD a sugerat că exacerbările acute în hepatita cronică delta au fost asociate cu evoluția persistentă a infecției cronice și nu rezultă din infecțiile virale noi. Cu toate acestea, unele mutații nu au fost cumulative, ceea ce sugerează că VHD izolat la o dată ulterioară nu a evoluat direct de la cel imediat anterior. Este demonstrat că infecția cronică cu VHD la orice punct de timp a fost un amestec de viruși cu variații ușoare de secvență și o specie specifică de ARN VHD. Aceste constatări indică faptul că ARN-ul VHD este heterogen și evoluează rapid. Conform unei analize prospective a 33 de pacienți cu infecție cronică cu VHD admiși la un spital spaniol în perioada 2006-2007, efectuată de Schaper M și colab (2010), replicarea virală a VHB și VHD a fost destul de variabilă. S-a observat că replicarea VHD predomină la 54,5% pacienți, VHB la 30,3%, iar 15,2% au fost înregistrate nivele de VHB și VHD similare. Aceste date sugerează că există o suprimare a VHB prin VHD, dar cu o fluctuație importantă de replicare a celor doi virusuri. Lozano JL și colab în 1994 afirmă că la pacienții cu dubla infecție B și D, persistența replicării virusului hepatitic B, chiar și la niveluri minime, este asociată cu afectarea hepatocelulară mai gravă. Pascarella S și Negro F. în 2011 au descris o formă evolutivă a infecției cronice virale delta observată la pacienții după transplantul hepatic, și anume infecție latentă. Această formă clinică se caracterizează prin prezența anti-VHD în ficat și nucleeele hepatocitelor, în absența HBsAg și a ARN VHD în sânge și sunt asociate cu leziuni hepatocelulare minime.

Menționăm că evoluția infecției cu virusul hepatitic delta, depinde și de condiția infectării, conform căreia avem două stări: coinfecția dintre VHB și VHD și superinfecția dintre VHD și infecția cronică cu VHB. Coinfecția dintre acești doi viruși, mai frecvent dezvoltă forme de hepatita severă sau fulminantă, decât infecția acută virală B. Pe de altă parte infecția acută cu VHD este imperceptibilă de o infecție ordinară cu VHB, din punct de vedere clinic și histologic. Astfel, evoluția clinică a infecției cronice cu VHD este totuși dependentă și de cursul bolii hepatice induse de infecția cronică virală B.

**Tabel 1.1. Etapele evolutive ale infecției cronice VHB**

Infecția cronică VHB, imunotoleranță	AgHBs+, AgHBe+, AND-VHB cantitativ înalt, ALT normal, lipsa necroinflamăției, examn histologic normal.
	Faza imunotolerantă poate persista timp de 10-30 de ani la subiecții infectați perinatal cu VHB, în timp ce este de scurtă durată sau chiar absentă în cazul achiziției infecției cu VHB în perioada de copilărie precoce sau în perioada de adult.
Hepatita cronică AgHBe pozitivă	AgHBs+, AgHBe+, fluctuația nivelului de ADN-VHB (se înregistrează scăderea progresivă), ALT crescut și necroinflamare hepatică. Această fază este prezentă la pacienții cu infecție achiziționată în copilăria tardivă, adolescență sau dobândită la adulți.
Infecție cronică cu VHB, variant AgHBe negative (Stare de purtător HBsAg)	Se caracterizează prin negativitatea AgHBe și pozitivitate anti-HBe, niveluri nedetectabile sau scăzute de AND-VHB (nivelurile sugerate mai mici de 2000 UI / ml), niveluri persistente normale de ALT și histologie hepatică inactivă cu o cantitate de fibroză de obicei minimă.
Hepatita cronică virală B, AgHBe negativă	Se caracterizează prin negativitatea AgHBe cu pozitivitate anti-HBe, niveluri detectabile de AND-VHB seric și creștere a activității ALT, necroinflamare moderată sau severă cu grad de fibroză variabil.
Infecție cronică virală HBV, AgHBs negativă	Purtătorii AgHBs inactivi pot pierde în cele din urmă HBsAg odată cu dezvoltarea anticorpilor HBs neutralizanți (antiHBs), dar nivelele scăzute serice sau în țesut hepatic de ADN-ul HBV pot fi detectate în continuare. Și imunosupresia la astfel de pacienți, spre exemplu: chimioterapia cancerului sau după transplantul de organe, poate duce la reactivarea hepatitei B. Această fază caracterizează – infecția ocultă cu VHB.

Diagnosticul diferențial dintre coinfecția VHB/VHD și monoinfecția VHB este posibil doar pe baza rezultatelor serologice, care prezintă markerii pentru infecția virală delta acută (anticorpii anti-VHD IgM) în comun cu markerii pentru infecția VHB primară (AgHBs, AgHBe/anti-HBe, anti-HBcor IgM).

În cazul coinfecției VHB/VHD expresia clinică poate fi *bifazică*, manifestată prin două episoade de hepatita acută pe durata a câtorva săptămâni. *Primul epizod* este legat de picul replicării virusului hepatitic B, iar *episodul secund* exprimă picul replicării VHD. Dar se mai poate întâmpla și un alt mod de prezentare clinică, atunci când VHD inhibă virusul hepatitic B, și astfel coinfecția se poate evidenția sub forma clinică de hepatită cu activitate moderată. Clasic, coinfecția dintre virusul hepatitic B și virusul hepatitic D este cunoscută prin evoluția sa autolimitată. Hadziyannis SJ (1999) afirmă că în multe cazuri de coinfecție VHB/VHD, este predominat statusul AgHBe negativ (mutații

precure prezente) al VHB, iar aceasta este responsabilă pentru cazurile de hepatită severă sau fulminantă, dar rareori pentru cronicizarea procesului hepatic, indiferent de vârsta pacientului. În comunitățile cu stare endemică de infecție virală B, coinfecția VHB/VHD autolimitată pare a fi destul de frecventă. În aceste zone se pot identifica un număr semnificativ de persoane care prezintă markerii serologici pentru un istoric infecțios al VHB (anti-HBcor or anti-HBs) sau VHD (anti-VHD IgG).

Suprainfecția virusului hepatitic delta pe o infecție cronică virală B în majoritatea cazurilor evoluează spre hepatita cronică. În suprainfecție, antigenemia HBs preexistentă asigură condiții optime pentru exprimarea completă a virulenței VHD. Din punct de vedere clinic, acest lucru are ca rezultat hepatită fulminantă acută, adesea severă. Imaginea clinică depinde de faptul dacă subiecții infectați au o boală hepatică semnificativă anterioară produsă de VHB. La purtătorii sănătoși de AgHBs, suprainfecția VHD induce, de obicei, o hepatită acută, dacă starea VHB este necunoscută, poate imita o hepatită acută clasică B. La purtătorii cronici de AgHBs se dezvoltă o replicare cronică a VHD și acești indivizi sunt expuși unui risc ridicat de a dezvolta o boală hepatică cronică progresivă. Histopatologic, o hepatită cronică activă sau ciroză activă este demonstrată în 90% din toate cazurile de suprainfecție la toate vârstele.

În evoluția hepatopatiei cronice virale delta este menționată o trăsătură interesantă care relevă prezența unui istoric al unui episod hepatitic acut, probabil acest episod reprezintă timpul de suprainfecție cu VHD. Rizzetto M, Verme G, Recchia S și coaut., 1983 au raportat despre prezența unui astfel de episod la 70% dintre pacienții cu VHD, fiind evaluați 101 pacienți.

Încă în 1985 Carreda F., și coautorii publică un studiu despre coinfecția și superinfecția cu antigen delta la pacienții cu hepatita B și urmările acestor. Metodologia acestei cercetări prospective a inclus testarea markerilor virusului hepatitei B și ai antigenului delta în serul a 107 utilizatori de droguri intravenoase cu hepatită acută B (AgHBs-pozitivă) asociat cu infecția delta și s-au comparat cu evenimentele clinice la utilizatorii de droguri suferinzi de hepatită B. Astfel, 86 dintre persoanele cu VHB și infecție delta prezentau – coinfecție, și 21 au prezentat superinfecție delta acută pe un fondal de purtător cronic de AgHBs. Frecvența hepatitei bifazice și hepatitei severe a fost semnificativ mai mare la pacienții infectați cu virusul hepatitic delta, decât în cazul martorilor (VHB monoinfecție), dar totuși caracteristicile clinice și biochimice acute ale celor două tipuri de hepatită delta nu au fost distinse. Cu toate acestea, prin analogie cu rezultatul clinic al hepatitei B clasice, toți pacienții cu

coinfecție VHB/VHD au avut boală auto-limitată, în timp ce 20 din 21 dintre purtătorii cronici de AgHBs suprainfectați cu VHD au dezvoltat hepatită cronică activă.

Hepatita cronică virală Delta este mai severă și rapid-progresivă versus alte hepatite cronice virale. Aceasta duce la ciroză la aproximativ 70% dintre pacienți în decurs de 5 până la 10 ani, implicând de obicei pacienții de la o vârstă tânără. Riscul de a dezvolta ciroză este de 3 ori mai mare în cazul unei infecții cu VHD decât în cazul unei infecții mono-VHB.

Activitatea progresivă prelungită a procesului hepatic este frecvent vizualizată la pacienții cu hepatită cronică virală B superinfectată cu VHD. Lok și coaut., 1985 analizează un grup de 106 de pacienți cu infecția cronică virală B, dintre care 20 au fost depistați pozitivi pentru VHD. Acești pacienți infectați VHB/VHD au fost mai tineri și au avut leziuni cronice hepatice mai severe decât în grupul de pacienți cu VHB cronică fără VHD. Urmăriți în timp, s-a dovedit că ciroza a apărut la 55% dintre pacienții cu infecție combinată, în timp ce la cei cu VHB cronică ciroza a fost documentată doar la 19% [37, 79, 45]. Un alt grup evaluat de Kanel și colab. (1984) a inclus 57 de pacienți cu hepatită cronică virală B, dintre care 18 au fost pozitivi și pentru VHD. Pacienții cu dubla infecție au prezentat inflamația portală, inflamația lobulară și necroza hepatică mai severă, decât la pacienții cu monoinfecție [85].

Impactul semnificativ al infecției cu VHD asupra dezvoltării cirozei este bine ilustrat în observațiile lui Faci P. (2003) ce descrie particularitățile procesului hepatic la copii cirofici cu AgHBs pozitiv, dintre care 40% din ei au avut dovezi ale prezenței infecției cu VHD. În urma acestei faze rapide a dezvoltării cirozei, se pare că activitatea bolii slăbește pentru o lungă perioadă de inactivitate înainte de apariția semnelor clinice de ciroză decompensată. Fattovich G și coaut. publică în anul 2000 observațiile lor despre influența infecției delta asupra mortalității și morbidității în ciroza hepatică virală B. Se menționează că riscul dezvoltării hepatocarcinomului și al decesului este triplu crescut și respectiv dublu la pacienții cu ciroză hepatică B și D, comparativ cu pacienții cu ciroză hepatică virală B fără antigen delta. Odată ce stadiul clinic al cirozei hepatice a fost atins, se instalează un declin al replicării VHD iar ARN-ul VHD se detectează la aproximativ o treime din pacienți.

Fagiua S. publică despre experiența italienilor în transplantarea hepatică a pacienților cu ciroză hepatică, evidențiind că 36% dintre pacienții transplantați care prezentau date pentru prezența VHB, au fost depistați și cu virusul hepatic delta.

Până astăzi, încă nu sunt definitivați suficient factorii de prognostic în progresia bolii hepatice induse de virusul delta, dar totuși sunt dovezi care încredințează rolul unor determinanți în acest

proces. Și acestui rol sunt atribuiți: genotipurile virusului hepatitic delta; nivelul replicării VHB și VHD; coinfecția cu alți viruși, cum ar fi VHC sau HIV.

În 1995 Wu IC și coautorii explică scenariul evoluției infecției virale delta, pentru faza inițială determinându-se o hepatită cronică cu activitate înaltă, ulterior exprimându-se ca un proces cronic cu activitate moderată. Iar din acest punct, boala hepatică poate progresa spre ciroza hepatică or poate rămânea într-o remisie prelungită caracterizată prin descreșterea replicării VHB și VHD. Saracco G., Rosina F. și Brunetto MR evidențiază încă în 1987 că dezvoltarea cirozei hepatice se determină la 70-80% dintre pacienții cronici infectați cu VHD, iar 15% dintre ei se dezvoltă în primii doi ani.

La al 50-lea Congres Internațional de Hepatologie din 2015, care a avut loc în Viena, Austria (22-26 aprilie 2015), un grup de cercetători francezi (Roulot D., 2015) au prezentat rezultatele unui studiu efectuat pe 1112 pacienți cu VHB/VHD, colectați dintr-un centru de referință medical francez. Autorii au evaluat factorii predictivi ai cirozei hepatice, decompensării hepatice și cancerului hepatocelular la pacienții cu infecție virală delta. Vârsta medie ai pacienților cercetați a fost 37 +/- 10 ani, au predominat bărbații (69%), imigranții au fost circa 86%; pentru 88% ARN VHD a fost detectabil, cu mediana 165000 copii/ml. La prima adresare 28% dintre pacienți erau cu ciroză hepatică, 15% - au suportat unul sau mai multe episoade de decompensare hepatică, iar 2.7% - carcinom hepatocelular. Pacienții au fost urmăriți 1.4-8.9 ani, mediana fiind 4.4 ani. Pe durata supravegherii s-a constatat următoarea evoluție a bolii: au dezvoltat ciroză hepatică 20% pacienți, au suferit decompensare hepatică 10% dintre pacienți și au fost stabiliți cu carcinom hepatocelular 6% dintre pacienții supravegheați. Astfel, calcularea riscului de apariție ale acestor evenimente timp de 10 ani a format următorul tablou: pentru ciroză hepatică – riscul de 40%, pentru decompensare hepatică – 31%, pentru carcinom hepatocelular – 15%. Analiza multivariabilă a extras vârsta și valoarea gGTP ca factori predictivi pentru progresia bolii hepatice VHB/VHD, adică pentru dezvoltarea cirozei hepatice, decompensării hepatice și apariției carcinomului hepatocelular. Nivelul crescut al AST s-a manifestat ca factor predictiv pentru dezvoltarea cirozei, iar ARN VHD detectabil și trombocitopenia (mai mică de 100000/mm<sup>3</sup>), predictive pentru decompensarea hepatică.

## **1.2. Fibroza hepatică și conceptul de prezentare tardivă a pacientului cu hepatită cronică virală delta.**

Fibroza hepatică a fost definită de un grup de experți ai Organizației Mondiale a Sănătății încă în 1978 "ca prezența excesului de colagen în țesutul hepatic, datorită formării excesive ale fibrelor

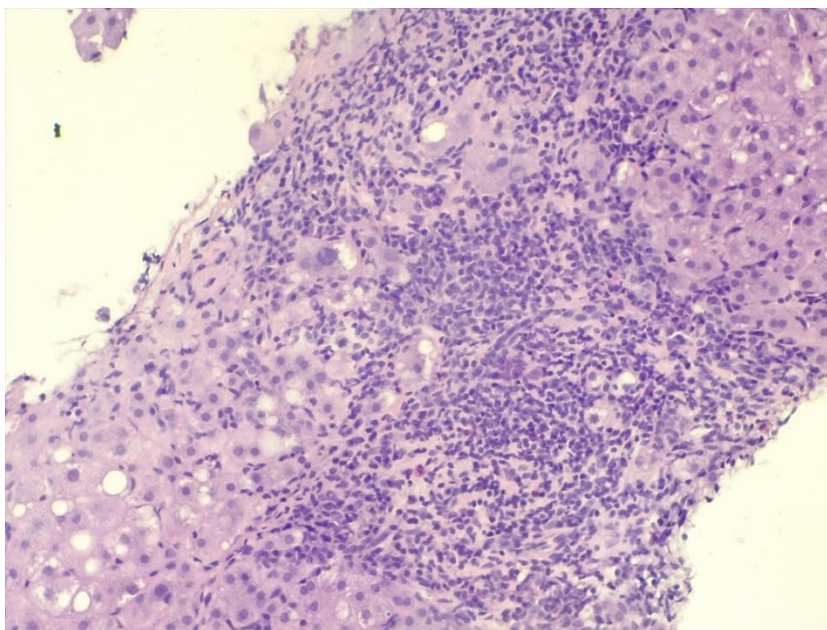
noi. Fibroza hepatică trebuie distinsă de colapsul pre-existent al reticulinei, care poate fi urmat de fibroplazie activă" [198]. Cu toate acestea, în ultimele decenii de cercetare experimentală intensivă a devenit evident faptul că fibrogeneza este un proces care necesită interacțiunea mai multor tipuri de celule care sunt declanșate de un spectru larg de citokine, chemokine și mediatori nonpeptidici incluzând specii reactive de oxigen, celule imune și hormoni [24, 61, 116]. Fibroza progresivă este legată de modificările arhitecturale ale ficatului, prin creșterea rigidității favorizând hipertensiunea portală, avansând spre ciroza hepatică și oferă un micromediu care predispune la cancer hepatic [61, 53]. Soyer, M.T., și colaboratorii (1976) sugerează că fibroza hepatică avansată este potențial reversibilă. Cu toate acestea, fibroza hepatică a fost subestimată și puțin cercetată până în anii 1980, când celulele stelate hepatice, cunoscute anterior ca lipocite, sau celule perisinusoidale, au fost identificate ca celule principale producătoare de colagen în ficat [101, 142]. Von Kupffer descrie pentru prima dată acest tip de celule în 1876, și demonstrează despre activarea lor fenotipică semnificativă în bolile hepatice cronice, și dobândirea proprietăților fibrogenice (Geerts, A. 2001). Clinic, istoricul natural al fibrozei hepatice, de la modificările precoce la ciroza hepatică, a fost delimitat la pacienții cu infecție cronică cu VHC [106]. S-au identificat două profiluri evolutive de fibroză hepatică: fibroza rapidă și fibroză lentă, iar factorii genetici și de mediu care au influențat progresia fibrozei au fost parțial descoperiți [38, 39]. Activitatea fibrogenică a VHB se argumentează prin activitatea virală, care produce leziuni hepatice constante imun-induse, oferind ca răspuns regenerarea continuă a țesutului hepatic, dar într-o ordine dezorganizată. Iar implicarea proteinei X virale în activitatea ADN-ului celular, declanșează potențiale efecte angiogenice, fibrogenice și oncogene [8, 68, 73]. Mai mulți factori de risc pentru progresia fibrozei hepatice la pacienții cu VHB au fost cercetați, cum ar fi sexul masculin, vârsta înaintată, consumul de alcool, nivelurile ridicate de alaninaminotransferază, nivelul ADN VHB, asocierea cu VHC sau VHD [93, 162]. De asemenea, prezența AgHBe este cunoscută ca potențial de avansare a fibrozei hepatice [58, 73].

Infecția cronică virală Delta este cunoscută pentru potențialul de progresie rapidă către ciroză hepatică și cancer hepatocelular. Unii cercetători recunosc despre implicarea virală dublă în progresia procesului hepatic, atribuind acest rol atât VHB, cât și VHD. Totuși, sunt cercetări care sugerează despre contribuția VHD separat în progresia fibrozei hepatice. În 1987 G. Fatovich și coaut. descriu despre înrăutățirea histologică hepatică, exprimată prin dezvoltarea fibrozei severe la 77% dintre pacienții cu VHB/VHD, versus 30% dintre persoanele AgHBs pozitive, fără antigenul delta. La 70% dintre pacienții cu VHD care au evoluat din hepatită cronică spre ciroză hepatică, această tranziție s-

a dezvoltat în primii doi ani. Ulterior, au fost evidențiate rezultatele și altor cercetări care aveau ca scop identificarea factorilor de progresie a fibrozei hepatice la pacienții cu VHB/VHD.

S-a identificat o prevalență de 33% pentru fibroza avansată (METAVIR F3) la pacienții infectați cu genotipul 3 VHD (evaluați prin biopsie hepatică), în bazinul Amazonian de Vest (Braga WS, 2014). Lutterkort GL (2015) relatează despre o prevalență de până la 40% de fibroză avansată la pacienții cu genotip-1 al VHD, iar Stroffolini T, și coaut., (2016) prezintă rezultatele unui studiu multicentric italian, în care se detectează până la 53% dintre pacienții cu VHD cu fibroză severă (F3-F4). Ingrid Couto, (2017) prezintă o prevalență și mai înaltă a fibrozei severe la pacienții cu VHD din Brazilia. Cercetătorii au identificat circa 57% dintre pacienții cu VHD ce prezentau la prima adresare fibroza hepatică severă  $\geq 15$  kPa (Fibroscan). Cercetătorii respectivului studiu relatează câteva particularități: pacienții cu VHD și fibroză severă au avut o rată mai mare de încărcătură virală VHB, niveluri mai ridicate de transaminaze, gGGT, fosfatază alcalină, bilirubină totală și INR, precum și un număr mai scăzut de trombocite și valoare mai redusă de albumină comparativ cu pacienții VHD cu fibroză ușoară sau moderată. Lacombe K, și coaut., 2007 remarcă severitatea fibrozei hepatice la două categorii de pacienți cu infecție cronică virală B și HIV (134 de pacienți au fost cercetați), dintre care prima categorie au asociat VHC și a doua categorie suprainfectați cu VHD. Rezultatele obținute au evidențiat fibroza mai severă (F3-F4) la pacienții cu VHB-HIV și VHD, concluzionând despre implicarea terapeutică multiplă la acești pacienți. JV Fernández-Montero, 2014 confirmă că anume VHD este un determinant al evoluției nefavorabile, și anume a decompensării rapide hepatice la pacienții HIV-pozitivi, spre deosebire de pacienții HIV-VHC sau HIV-VHB, care evoluează într-un tempou mai lent spre decompensare hepatică, totodată facilitând de un tratament eficient (analogi nucleozidici pentru VHB, agenți antivirali cu acțiune directă pentru infecția cu VHC). Soo-Ho Choi, Sook-Hyang Jeong, Soon B. Hwang, în 2007 demonstrează că L-HDAg poate induce fibroza hepatică prin reglarea transducțiilor de semnal induse de TGF- $\beta$ . Această reglare a semnalizării mediate de TGF-p este realizată prin izoprenylarea L-HDAg, care este un mecanism nou implicat în patogeneza VHD. Wranke A și coaut, 2014 publică rezultatele unei cercetări interesante despre rolul anticorpilor anti-VHD IgM ca predictor despre severitatea fibrozei hepatice la pacienții cu infecție cronică virală delta. Au fost analizate două cohorte independente de pacienți, fiind incluși pacienții din HIDIT-2 (trial multicentric, internațional, prospectiv care a analizat eficacitatea PegIFN alfa2 + Tenofovir la pacienții cu VHD) și pacienții de la baza Clinicii din Hanover, Germania (recrutați pe perioada anilor 1995-2012). Pacienții selectați au fost supuși biopsiei hepatice, și fibroza hepatică a fost definită

conform scorului Ishak. Rezultatele acestei cercetări au evidențiat următoarele: nivelul anti-VHD IgM au corelat veridic cu nivelul seric CXCL10 (chemokine indusă de interferon gamma). CXCL10 a fost recent investigată la alte infecții cu virus hepatitic și a fost propus ca marker seric care indică starea de activare a sistemului de interferon. O posibilă legătură între CXCL10 și anti-HDV IgM, ar putea fi faptul că IFN $\alpha$  induce CXCL10 și stimulează celulele plasmatice care, prin urmare, conduc la o creștere a nivelurilor IgM anti-HDV. Nivelul sporit de CXCL10 a corelat cu scăderea mai accentuată a titrului AgHBs în timpul terapiei cu analogi nucleozidici anti-VHB. Persoanele cu anti-VHD IgM au avut niveluri mai ridicate ale AST, valori mai mari ale bilirubinei și valori mai scăzute ale albuminei, decât pacienții cu anti-VHD IgG. Nivelurile anti-VHD IgM au fost, de asemenea, asociate cu activitate histologică mai înaltă. Un studiu multicentric amplu a fost desfășurat de cercetătorii din Romania, țară cu infecția cronică virală delta cu prevalență foarte înaltă. L.Gheorghe, și coaut, 2015 confirmă prevalența înaltă a infecției cu virusul delta în România, precum și nuanțează despre severitatea bolii hepatice la pacienții coinfectați cu VHB/VHD, constatându-se că aproape 1 din 5 pacienți se prezentau deja cirofici, iar 12% dintre aceștia prezentau carcinom hepatocelular. Totodată se menționează că anume pacienții cu infecție activă, adică cu încărcătură virală pozitivă sunt cu fibroză avansată.

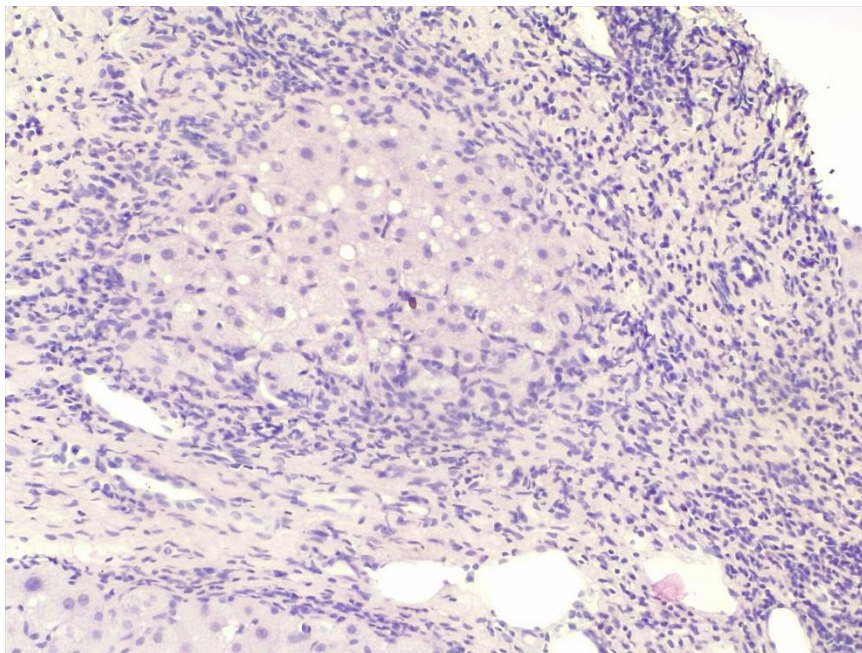


**Figura 1.4. Examenul histopatologic cararakteristic pentru hepatita cronică HDV**

*Notă:* Descriere de caz clinic. Femie, 66 ani, ADN VHB 210 ui/ml, ARN VHD 2703000 ui/ml, ALT 156 U/l, AST 161 U/l, alfa-fetoproteina 31 U/l). Rezultat histopatologic: Hepatită cronică cu activitate necroinflamatorie



întă grad A3, și fibroză portală severă – F3 (scor 3- 4 METAVIR). Steatoză micro-, macroveziculară marcată. Hemosideroză absentă (Din colecția personală. Biopsie hepatică cu ac gros efectuată de dr. A. Cotoneț, ex.histopatologic – dr. Mocanu E).



**Figura 1.5. Examen histopatologic în hepatita cronică HDV**

*Notă:* Descriere de caz clinic: Femeie, 39 ani, ADN VHB <20 ui/ml, ARN VHD 11500 ui/ml, ALT 56 U/l, AST 48 U/l, alfa-fetoproteina 2.3 U/l). Rezultat histopatologic: Hepatită cronică cu activitate necroinflamatorie moderată, grad A2 și fibroză severă – F3 (METAVIR). Modificări distrofice și steatoză și hemosideroză sunt absente. (Din colecția personală. Biopsie hepatică cu ac gros efectuată de dr. A. Cotoneț, ex.histopatologic – dr. Mocanu E).

Concluziile tuturor cercetărilor analizate se axează pe faptul, că pentru evaluarea pacientului cu afecțiune hepatică cronică, este important să se determine riscul individual de progresie a bolii, pentru care s-au identificat o serie de markeri neninvasivi. Cercetătorii sugerează următoarele criterii pentru un marker ideal al fibrozei hepatice: ar trebui să fie specific ficatului; nu trebuie să fie influențat de alterarea funcției hepatice, renale sau reticuloendoteliale; ar trebui să identifice unul sau mai multe dintre procesele legate de fibroză (stadiul fibrozei, activitatea depunerii matricei sau nivelul de regresie a matricei); și ar trebui să fie ușor de efectuat.

Elaborarea unor parametri neninvasivi care estimează gradul de fibroză hepatică este esențială pentru pacienții cu hepatite cronice virale, în special în ceea ce privește hepatopatia cronică virală delta,

dat fiind eficiența slabă a terapiei bazate pe interferon, efectele secundare numeroase și împovărătoare pe care le presupune, precum și contraindicațiile pentru pacienții cu ciroză Child-Pugh B și C. Acest obiectiv a impus ca cercetătorii să identifice mai multe scoruri clinice cu rol predictiv în hepatopatia cronică virală B, C. Astfel, au fost validate scorul FIB-4 pentru hepatita cronică virală C, apoi validat și pentru hepatita cronică virală B; APRI elaborate pentru hepatita cronică virală C, apoi validat și în hepatita B; la fel s-a întâmplat și cu indicele Forns initial implementat la pacienții cu VHC, apoi la pacienții cu VHB. Și totuși, acești indicatori și scoruri sunt inadecvate pentru monitorizarea fibrozei hepatice în timpul tratamentului, deoarece nivelurile serice ale aminotransferazelor (component obligator pentru majoritatea scorurilor) scad rapid după inițierea tratamentului. Un alt marker serologic de identificare a gradului de fibroză hepatică, cum ar fi FibroTestul include nivele serice de haptoglobină, bilirubină și  $\gamma$ -glutamiltansaminotransferază, pot apărea rezultate fals - pozitive la pacienții cu hemoliză sau colestază și la cei care au consumat recent alcool. Pentru evaluarea fibrozei hepatice la pacienții cu VHB au fost propuse scorurile Hui și Zeng, deși utilitatea acestora rămâne a fi validată de alte grupuri. Avantajele indicatorilor respectivi sunt: reproductibilitatea bună, aplicabilitatea înaltă, și pot fi efectuate ambulator. Și totuși, acești markeri serici, neinvazivi presupun și niște dezavantaje, precum: sunt nespecifice pentru ficat; nu sunt utile în discriminarea stadiului intermediar al fibrozei, unele din ele sunt costisitoare (în special pentru țara noastră), pot înregistra rezultate fals- pozitive (în hemodializă, hiperbilirubinemia benignă, inflamație, colestază, insuficiență cardiacă, trombocitopenii severe). Pentru hepatita cronică virală delta, practic nu a fost validat nici un test din cele enumerate.

**Tabel 1.2 Metode de estimare neinvazivă a fibrozei hepatice**

Marcheri serologici indirecti	Panel seric patentat	Modalități imagistice
<b>AST/ALT</b> Sheth SG, Flamm SL, Gordon FD, și coaut., 1997 (hepatita cronică virală C)”	<b>Fibrotest</b> (haptoglobina, 2-macroglobulina, apolipo-proteina A1, $\gamma$ GTP, bilirubina, vârsta, genul) (validat în hepatopatia cronică virală C și B) „Imbert-Bismut F, și coaut. 2001)”	<b>Elastografia tranzitorie</b> (Fibroscan, Echosens) Sandrin L, și coaut. 2003
<b>APRI</b> (AST, trombocite) Wai CT, Greenon JK, Fontana RJ, 2003 (HCV, ciroza hepatica, validat și în VHB)	<b>Fibroindex</b> (trombocite, AST, $\gamma$ GTP) Koda M, 2007	<b>Elastografia prin rezonanța magnetică</b> Huwart L, Sempoux C, Vicaut E, 2008
<b>FIB-4</b> Sterling RK, 2006 (hepatita cronică virală C, validat și în VHB)	<b>Fibrospect</b> Patel K, 2009	<b>ARFI</b> (cuantificarea tisulară virtuală); ElastPQ, Lupsor M, 2009

<b>Indicele Forns</b> (vârsta, trombocite, gGTP, colesterol) Forns X, 2002 (hepatita cronică virală C, validat VHB)	<b>Hepascore</b> (acidul hyaluronic, a2-macroglobulina, gGTP, vârsta, gen) Adams LA, 2005	<b>Fibro-CT</b> Romero-Gomez M, 2008
<b>Indicele LOK</b> (INR, ALT, AST, trombocite) Lok AS, 2005 (hepatita cronică virală C, HALT-C)	<b>Fibrometers</b> (validat în hepatopatia cronică virală C și B) Cales P, 2005	<b>Elastografia în timp real</b> Friedrich-Rust M, 2007
<b>FPI</b> (AST, colesterol, HOMA, vârsta, alcool în anamneza) Sud A, și coaut., 2004 (hepatita cronică virală C)		
<b>GUGI</b> Islam S, și coaut 2005 (hepatita cronică virală C)		
<b>Scorul HUI</b> Hui AY, Chan HL, Wong VW, Liew CT, și coaut., 2005 (hepatopatia cronică virală B)		
<b>Scorul Zeng</b> Zeng MD, Lu LG, Mao YM, și coaut 2005 (hepatita cronică virală B)		

Indicii FIB-4 și APRI au fost utilizați și în definitivarea conceptului de “prezentare tardivă a pacienților netratați cu hepatita cronică virală C și B”, propus de Grupul de Consens European [22], ulterior termen acceptat de Consensus EASL în 2015. Promotorii ideii respective au argumentat necesitatea introducerii unui consensus care ar diferenția pacienții cu hepatopatie virală avansată sau severă ce se adresează pentru prima dată la specialist. Astfel, Mauss, Pol și alții, în cadrul Conferinței EASL dedicată infecției HIV și hepatitelor virale, din Barcelona, pe 22 octombrie 2015 într-un discurs pro-consensus au concluzionat: *“Circa 13 milioane de adulți trăiesc cu hepatita B și 15 milioane cu hepatită C în Europa și majoritatea persoanelor rămân nediagnosticsate de aceste boli. Tratamente eficiente atât pentru VHB cât și pentru VHC sunt disponibile cu un mare impact asupra posibilității de a trata persoanele dacă sunt diagnosticate precoce. Cu toate acestea, nu se știe dacă politicile și strategiile actuale de testare au succes în atingerea populației nediagnosticsate la momentul potrivit. Mai mult, legătura dintre sistemul de sănătate și capacitatea lor de a oferi îngrijiri complete nu este, de asemenea, cunoscută. În consecință, o mare parte a populației infectate cronic intră în îngrijire numai după ce au dezvoltat simptome clinice. Astfel, un consensus privind prezentarea târzie a hepatitei virale este esențială pentru ca autoritățile din domeniul sănătății publice din Europa și din alte părți să poată răspunde la problemele legate de prezentarea tardivă și avansată a hepatitei*

*virale*". Aceiași autori își argumentau poziția explicând că definirea consensului va contribui atât la îmbunătățirea supravegherii hepatitelor virale, cât și la elaborarea politicilor și strategiilor de testare. După mai multe discuții, întâlniri și mai multe revizuirii, ultimele două definiții au fost aprobate în cadrul EASL 2015.

**Tabel 1.3. Prezentarea tardivă a pacienților cu hepatita cronică virală B, C și D**

Definiția	Caracteristica
Prezentarea cu boală hepatică avansată a pacienților cu hepatită cronică virală B și C netratați	Pacientul cu hepatita cronică virală B sau C cu fibroză avansată $\geq F3$ , estimată prin una din următoarele metode: „APRI > 1.5, FIB-4 > 3.25, Fibrotest > 0.59 or FibroScan > 9.5 kPa” sau biopsia hepatică ( $\geq F3$ după METAVIR), la pacienții care anterior nu au fost supuși terapiei antivirale.
Prezentarea tardivă a pacienților cu hepatită cronică virală B și C netratați	Prezența a cel puțin unui simptom al cirozei hepatice decompensate (icter, encefalopatie hepatică, ascita detectabilă clinic, hemoragie variceală) și / sau carcinom hepatocelular la pacienții fără tratament antiviral anterior.

Deci, Stefan Mauss, Stanislas Pol, Maria Buti și coaut. (2017, BMC Medicine) abordează acest consensus, astfel diferențiind cele două categorii de pacienți adresați tardiv după îngrijire medicală. Termenul "prezentare tardivă a pacienților netratați cu VHB/VHD și VHC" se referă la persoanele infectate cu VHB sau VHC care ajung la specialist prima dată, atunci când există deja o fibroză hepatică semnificativă. Acest lucru implică faptul că timpul de diagnostic primar al bolii hepatice cronice provocate de VHB/VHD sau VHC este considerat târziu, deoarece acești pacienți nu au fost diagnosticați mai devreme. În schimb, termenul de "prezentare cu boală hepatică în stadiu avansat" definește clinic subgrupul de pacienți care se prezintă primar la medic cu boala hepatică avansată, adică în prezența carcinomului hepatocelular sau a cirozei decompensate (icter, encefalopatie hepatică, ascitei detectabile clinic, hemoragie variceale). Această nouă formula definitivează categoria de pacienți care necesită abordare rapidă de diagnostic și tratament. Implimentarea acestui concept permite să se determine dimensiunea populației expuse riscului și să identifice grupul vulnerabil și factorii de risc pentru prezentarea târzie. Va spori înțelegerea barierelor sociale și medicale care limitează accesul la asistența medicală în diferite țări europene și pot fi ca reper pentru elaborarea recomandărilor privind accesul la tratament pentru participanții cu prezentare tardivă din întreaga regiune.

Evaluarea gradului de fibroză prin FibroTest sau FibroMax (Biopredictive, Paris, Franța, FibroSure-Labcorp, Burlington, NC, SUA). Investigațiile respective au un grad ridicat de precizie și reproductibilitate în prezicerea fibrozei și a cirozei la pacienții cu afecțiuni hepatice cronice. În hepatita cronică virală B, performanța sa este foarte semnificativă, cu o aria ROC de 0,84-0,90 și 0,85-0,87 pentru diagnosticul de fibroză semnificativă și, respectiv, ciroză (Poynard T, Ngo Y, Munteanu M, și coaut., 2011). FibroTest are o valoare prognostică de 5 ani similar cu cel al biopsiei hepatice pentru predicția decompensării și supraviețuirii a cirozei hepatice la pacienții cu virusul hepatitei cronice virale C și hepatitei cronice virale B și bolii hepatice alcoolice (Morra R, și coaut, 2006).

Gradul de fibroză prin FibroMax/FibroTest corelează cu supraviețuirea pacienților cu hepatită cronică:

- 0.95 – rata de supraviețuire 0%,
- < 0.75 – rata de supraviețuire 97% pentru pacienții cu VHC (*Morra R și coaut, 2008*),
- <0.73 – rata de supraviețuire 96.8%;
- 0.85 – rata de supraviețuire 49.26% (pentru hepatita cronică virală B, *V. de Ledinghen și coaut, 2013*).

Totodată conform acestor biomarkeri (FibroMax/FibroTest) fibroza hepatică este clasificată în 7 grade:

- F0, F1, F2 (0.48), F3 (0.5-0.7), F4.1 (0.74), F4.2 (0.85), F4.3 (0.95),
- În timp ce F4.2 este predictor pentru varicele esofagiene, F4.3 – prezice decompensarea hepatică.

Deci, ce avem astăzi cu privire la FibroTest: este validat în hepatita cronică virală, predominant cu VHC, recent validat și în VHB și propus pentru VHD. Pot fi rezultate fals-pozitive: în coinfecția VHC-HIV, coinfecția VHB-VHD, în trombocitopenii, hiperbilirubinemie, sepsis.

În practica clinică au mai fost implementate și alte metode neinvasive de evaluare a fibrozei hepatice, decât cele serologice. Modalitățile imagistice utilizate pentru cuantificarea fibrozei hepatice (Fibroscan, ARFI, Elastografia-RMN, Fibro-CT), astăzi înlocuiesc biopsia hepatică, care până nu demult era considerată gold-standard în evaluarea fibrozei hepatice. Cu aceste metode confortabile, specialiștii pot cu precizie să stratifice pacienții cu hepatită cronică și ciroză hepatică. Dar, cercetătorii nu s-au limitat în a utiliza metodele neinvasive doar în aprecierea fibrozei hepatice, ci încearcă să le

exploateze pe larg în zona de predicție ale complicațiilor bolilor hepatice (carcinom hepatocelular, hipertensiunea portală); monitorizarea progresiei sau regresiei fibrozei hepatice, precum și în screeningul fibrozei hepatice în populația generală. Sunt identificați niște factori, care influențează rezultatele cu privire la rigiditatea hepatică măsurată prin aceste metode. Astfel, pentru elastografia tranzitorie s-au identificat unii factori care pot contribui la rezultate *fals-pozitive*, așa ca: obezitatea, steatoza hepatică, insuficiența cardiacă, activitate necroinflamatorie înaltă, ascita, colestaza sau efectuarea examinării după luarea mesei sau efort fizic semnificativ.

Elastografia tranzitorie (Fibroscan) și valorile cut-off:

- 13.0 kPa pentru ciroza hepatică VHB, VHC
- 11.7 kPa – ciroza hepatică din ficatul gras metabolic asociat,
- 22.7 kPa pentru ciroză hepatică din boala ficatului alcoolic, dacă subiectul administrează alcool,
- 12.5 kPa pentru ciroza hepatică din boala ficatului alcoolic, dacă se află în abstenență. (Trapper, 2015).

Măsurarea rigidității hepatice poate fi mai puțin exactă la pacienții cu hepatită cronică virală B față de pacienții cu hepatită cronică virală C [13]. O explicație posibilă a diferenței în precizia diagnosticului este că hepatita cronică B este asociată cu exacerbări acute, în care necroinflamația severă poate duce la supraevaluarea fibrozei, mai frecvent decât în hepatita cronică C [29-31].

**Tabel 1.4. Indicațiile evaluării fibrozei hepatice prin Elastografia tranzitorie (Fibroscan)**

Indicații	Fibroscan
Hepatita cronică virală C	Stratifică pacienții în 3 categorii: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pacienții fără fibroză</li> <li>• Pacienții cu fibroză</li> <li>• Pacienții cu fibroză avansată – ciroză</li> </ul> Reduce necesitatea biopsiei hepatice la pacienții cu VHC
Hepatita cronică virală B	Sensibilitate redusă în HBV (fluctuații ALT) Recomandat pentru evaluarea fibrozei la purtătorii de AgHBs, stratificând în: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Purtătorii AgHBs inactivi, fără fibroză</li> <li>• Purtătorii AgHBs activi, cu fibroză</li> <li>• Pacienții cu fibroză severă – ciroză</li> </ul> Selectează pacienții cu HVB pentru biopsia hepatică Sensibilitate redusă în VHD

Metodele neinvazive pot fi folosite pentru a prezice complicațiile cirozei hepatice virale B. Jung KS, Kim SU, Ahn SH și coaut, 2011 au efectuat un studiu prospectiv pe 1130 de pacienți cu hepatită cronică virală B, urmăriți pe o perioadă de 2-4,5 ani, dintre care 57 de pacienți au dezvoltat CrH. Acest studiu a demonstrat că pacienții care au avut rigiditate hepatică mai înaltă (măsurată prin elastografia tranzitorie) au avut un risc semnificativ mai mare de a dezvolta CrH.

Conform gradului de fibroză obținut prin Fibroscan au fost constatate următoarele grupe de risc pentru dezvoltarea carcinom hepatocelular:

- ✓ 8,1-13 kPa – 3.07%;
- ✓ 13,1-18 kPa – 4.68%;
- ✓ 18,1-23 kPa – 5.5%;
- ✓ > 23 kPa – 6.6%.

Un alt scor predictiv pentru CrH a fost propus de Wong GL, Chan HL, Wong CK, și coaut., 2014 care este bazat pe rigiditatea hepatică, măsurată prin elastografie tranzitorie (LSM-HCC), a fost evaluat pe 1555 de pacienți cu infecție cronică VHB. Scorul LSM-HCC este constituit din rigiditatea ficatului (kPa), a vârstei (ani), al nivelului albuminei serice și al nivelului ADN VHB și variază de la 0 la 30. Valoare cutoff al scorului de 11, prezintă o valoare predictivă negativă ridicată (99,4% - 100%) pe o durată de 5 ani (Wong GL, 2014). Ye XP, Ran HT, Cheng J și col., 2012 au constatat corelații liniare semnificative între rigiditatea ficatului și splinei stadiul fibrozei (acești parametri au fost evaluați la 138 de pacienți cu ciroză hepatită virală B). La fel, a mai fost evidențiată și o corelație între rigiditatea splinei și gradul varicelor esofagiene.

Parametrii neinvazivi de apreciere a fibrozei hepatice se infiltrează tot mai profund în sistemul de sănătate actual, servind ca un instrument de screening, supraveghere și predictibilitate, precum și monitorizare terapeutică. Acești indici încă sunt lăsați în umbra, și sunt insuficient explorați în infecția cronică virală delta. În hepatopatia cronică virală delta utilitatea marcherilor neinvazivi de estimare a fibrozei hepatice în mare parte nu au fost validați. Deși sunt câteva cercetări care atestă beneficiul acestor indici și la pacienții cu VHD, totuși necesitatea validării pe diferite grupe de pacienți încă persistă. C. Kalkan, F. Karakaya, O. Keskin și coaut au prezentat în cadrul Congresului Internațional de Hepatologie (organizat de Asociația Europeană pentru studiul Ficatului) în anul 2017 rezultatele evaluării a nouă teste neinvazive de apreciere a fibrozei hepatice la pacienții cu hepatita cronică delta și au remarcat, că Fibroscan este o metodă mai eficientă decât markerii serologici în diferențierea gradului de fibroză F 5-6 (după Ishak) de fibroza F 0-4. Iar, dintre indicii serologici, indicele Hui s-a

impus printr-o eficiență mai înaltă decât indicele AST/ALT. În studiul efectuat de Oana Săndulescu și colab, 2017 au fost evaluate fibroza hepatică și progresia bolii hepatice la pacienții cu hepatita cronică delta din România. Urmare acestui studiu, s-a identificat o distribuție bifazică a fibrozei hepatice la pacienții cu hepatită Delta, astfel primul vârf (sau fază) au constituit pacienții cu fibroză ușoară până la moderată, și al doilea vârf – de la fibroza hepatică moderată până la fibroză avansată. Proporția pacienților care au avut deja ciroză în momentul diagnosticului hepatitei delta a fost de 21,1%. Comparând evaluările neinvazive ale fibrozei hepatice la pacienții cercetați s-a constatat că scorul FIB-4 corelează moderat cu FibroTest și că atât FIB-4 cât și APRI corelează moderat cu valorile ActiTest.

Biomarkerii neinvazivi existenți ai fibrozei hepatice au o precizie mai scăzută de performanță la pacienții cu infecție cronică VHD comparativ cu pacienții monoinfecțați cu VHB sau VHC. În țările cu tehnologie medicală avansată, pot fi explorate și alte modalități neinvazive de cuantificare a fibrozei hepatice, în timp ce în țările sărace și slab deservite din punct de vedere medical, markerii neinvazivi deja existenți ai fibrozei hepatice pot oferi o perspectivă asupra stadiului bolii hepatice la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta.

### **1.3. Carcinomul hepatocelular și conceptul de cancer precoce la pacienții cu infecție cronică virală delta**

Carcinomul hepatocelular (CrH) este o tumoare cu creștere lentă, a cărei istorie naturală nu este complet cunoscută. Din moment ce procesul hepatocarcinogenetic poate evolua de-a lungul anilor într-o manieră treptată, de la tumoare premalignă la CrH, detectarea timpurie a tumorilor tratabile sunt posibile prin supravegherea pacienților cu risc. O supraveghere cu interval de 6 luni prin ecografie este considerată eficientă din punct de vedere al costurilor, ceea ce duce, în general, la identificarea unei singure tumori <3 cm în 50-70% pacienții cu risc. Pentru tumori mai mari de 2 cm, demonstrarea hipervascularizării arteriale nodulare prin tomografia computerizată cu regim angiografic (trifazică) este obligatorie unui diagnostic cert de CrH. În urma identificării bolilor cronice de ficat ca factori de risc relevanți pentru CrH, campanii de supraveghere care vizează detectarea precoce a CrH sunt posibile și se consideră a fi singura abordare practică pentru îmbunătățirea tratamentului CrH. Majoritatea acestor pacienți sunt diagnosticați tardiv și au șanse reduse de vindecare. Diagnosticul



unei tumori cu diametru mai mic de 2 cm poate fi mai dificilă datorită riscului de diagnosticare fals-negativă prin tehnica imagisticii de contrast (50% din cazuri) cauzată de vascularizarea arterială imatură a nodulilor mici. Prognosticul depinde în mare măsură de stadiul evolutiv la care CrH este detectat, adică mărimea și numărul tumorilor, invazivitatea vasculară și gradul de afectare a ficatului. Multinodularitatea CrH, reprezintă o treime din toate cazurile de cancer precoce, prezintă un prognostic slab, în special pentru pacienții care nu includ criteriile Milano pentru transplantul de ficat. Cel mai bun prognostic este pentru o formațiune unică, mai mică de 5 cm pe fondalul cirozei hepatice compensate, fără invazie vasculară, deoarece această tumoare poate fi supusă atât transplantului hepatic, cât și rezecției hepatice care pot conferi supraviețuire pe termen lung. O mai bună supraviețuire a pacienților cu ciroză hepatică și cu tumori identificate recent poate fi reflectată de aplicarea unor criterii exacte pentru stadializarea tumorilor și criterii stricte pentru tratamentele curative. Cu toate acestea, vârsta pacienților, deteriorarea funcției hepatice în timpul supravegherii, tumorile multinodulare și accesul limitat la transplantul hepatic poate împiedica eficacitatea programelor de screening și supraveghere.

Înțelegerea noastră despre istoricul natural al carcinomului hepatocelular este de mare ajutor pentru selectarea adecvată a tratamentului și este adesea împiedicată de heterogenitatea clinică a tumorii.

*Conceptul de cancer precoce* a evoluat în ultimele decenii datorită implementării programelor de supraveghere la nivel mondial. Supravegherea a condus la creșterea depistării numărului de cancere precoce detectate sub formă de noduli mici care apar mai întâi ca tumori bine diferențiate și proliferază împreună cu diferențierea treptată, într-o distribuție multicentrică sau din noduli displazici (Kojiro M, 1998). Sheu GS, Sung JL, Chen DS și colab, descriu despre strategia conform căreia în anii 1970 - 1975 un diagnostic precoce al cancerului era considerată o tumoare de 5 cm în curs de dezvoltare la pacienții cu ciroză compensată, în virtutea cifrelor excelente de supraviețuire obținute prin rezecție hepatică comparativ cu pacienții cu tumori mai mari. În 1996, conceptul de CrH precoce a fost extins și a implicat 3 sau mai puține formațiuni tumorale, fiecare egal sau mai mic de 3 cm în diametru (criteriile de la Milano), care au supraviețuit după transplantul hepatic. Mai apoi, chirurgii din Tokyo au identificat importante diferențe clinice între tumorile cu dimensiuni de 1 cm și până la 2 cm, care pot prezenta o capsulă fibroasă și / sau septa fibroase, spre deosebire de alte tipuri de tumori nodulare "indistincte", detectate ca noduli hipoechoici sau hiperechoici la examenul ecografic. Tumorile de tip "indistinct" au fost considerate ca "carcinom in situ" al ficatului datorită

absenței invaziei în ramurile venei porte și metastazele intrahepatice și pot fi diferențiate de nodulii displazici de grad înalt deoarece provoacă invazia stromală.

Despre factorii etiologici ai carcinomului hepatocelular sunt multiple studii fundamentale și clinice. În anii 1970, cauzele etiologice ale carcinomului hepatocelular erau divizate în trei grupe: primul grup era constituit de factorii alimentari: substanțele nutritive cu impact carcinogenic, aflatoxina B1 (micotoxină fungică *Aspergillus flavus*), ce crește impropriu în porumbul și boboasele stocate, alune; grupul doi este constituit de ciroza hepatică de diversă etiologie (virală B (doar acest virus era descoperit în acele timpuri); alcoolică) și grupul trei care întrunea cauze mai rare, cum ar fi: administrarea de medicamente: steroizii anabolizanți, contraceptivele cu steroizi, hemocromatoza ș.a. (Roger G. Warell, 1981). Carcinomul hepatocelular în 80% se detectează la persoanele cu ciroză hepatică preexistentă. Distribuția CrH este variată și dependentă de zona geografică. Reiffershed în 1957 prezintă un indice de 0.399 % de CrH primar la disecția a 533 952 decedați, iar în Europa acest indice era de 0.215%. În țările fostei Uniuni Sovietice rata carcinomului hepatocelular era de 0.16% până la 0.3% din toate observațiile secționale. Acelaș autor punctează despre o frecvență mult mai înaltă în Iacutia – 4.6%, explicând prin prezența înaltă a bolii Botkin și cirozei hepatice în această zonă. Zubov M.A (1966) evidențiază prezența CrH la 0.8%-3% în regiunea râului Tobol. Shein A.A (1972) afirmă despre o frecvență înaltă de carcinom hepatic în regiunea Tiumeni, determinându-se circa de la 51 până la 376, iar în unele cazuri chiar până la 430 de cazuri CrH la 100000 populație, ceea ce a constituit 4.47 – 22.3% din totalul cancerelor din această zonă. Conform dovezilor aduse de Patiutco Iurii (2005) în anii 2000 erau înregistrați 7255 de pacienți cu CrH primar, dintre care 1/3 a fost supusă tratamentului chirurgical. Мерабишвили В.М. (2015) descrie despre mediana cumulativă a supraviețuirii pacienților cu CrH în ultimii 15 ani (Federația Rusă) pentru toate formele histologice (cu excepția pacienților diagnosticați postmortem), atât pentru bărbați, cât și pentru femei, care a fost aproximativ de 3,3 luni de la momentul diagnosticării. Se nuanțează și că în majoritatea regiunilor administrative din Federația Rusă, mortalitatea din cauza CrH depășește nivelul de morbiditate, indicând o subestimare semnificativă a pacienților primari. Sankt Petersburg este teritoriul unic al Rusiei, unde dinamica incidenței cancerului de ficat din populație poate fi analizată începând din 1980. Dinamica structurii histologice a cancerului hepatic, înregistrată la Sankt Petersburg, arată o scădere accentuată a proporției tumorilor ficatului fără un tip histologic specific determinat și creșterea semnificativă a carcinomului hepatocelular și a cholangiocarcinomului. Urmare acestei relatări, autorii concluzionează că pentru Federația Rusă, cât și pentru alte țări cancerul hepatic nu este doar

unul dintre tumorile cu cea mai mare letalitate și cea mai mică mediană a supraviețuirii, referindu-se, de asemenea, și la o subestimare semnificativă a cazurilor primare. În Africa, China, Taiwan au fost înregistrate cei mai înalți indici de mortalitate prin carcinom hepatocelular încă din anii 1970. Popper H descrie despre o prevalență înaltă în anii 1970-1980 a CrH la populația din Africa subsahariană, astfel în Mozambic se înregistrau 98.2 persoane cu CrH la 100000 de locuitori per an. Cea mai frecventă cauză era descrisă ciroza hepatică virală B iar, markerii infecției cu VHB erau pozitivi practic la 92.1% dintre persoanele cu CrH, versus 34.6% dintre persoanele de control (fără CrH). După frecvența depistării CrH, după Africa (în care se înregistra cea mai înaltă rată), sunt menționate, China și Taiwan-ul (Chen DS, 1978), unde CrH se înregistrează în circa 82.7% (crește prevalența de la nord la sudul țării), contrar a 11.9% de alte malignități. Ca frecvență urmează Asia Mijlocie, Europa de sud-est, Grecia, Spania, Italia (Trichopolus D., 1978). Aceiași distribuție a CrH se păstrează și în deceniul XXI, astfel în anii 2010-2014 hepatocarcinomul înregistrează cea mai mare frecvență în zonele endemice pentru VHB (unde prevalența HBsAg este de 8% sau mai mult), cum ar fi Africa sub-sahariană și Asia de Est, cu incidență de peste 20 la 100.000 de persoane. Țările mediteranene precum Italia, Spania și Grecia au rate de incidență intermediară de 10-20 la 100.000 de persoane, în timp ce America de Nord și de Sud au o incidență relativ scăzută (<5 la 100.000 de persoane). Distribuția globală este dependentă de vârsta la care a fost dobândită infecția cu VHB. În regiunile cu incidență mare, cea mai comună cauză este transmiterea perinatală a VHB și diagnosticul de CrH este cu aproximativ cu zece ani mai devreme stabilit în comparație cu regiunile din America de Nord și Europa de Vest, unde cea mai comună etiologie este VHC dobândită mai târziu (în perioada de adult). CrH este mai frecvent diagnosticat la bărbați decât la femei, posibil fiind influențat și de abuzul de alcool (având rol de factor additional la persoanele cu hepatopatie cronică preexistentă). Și actualmente, ca și în anii 1970-1980, în 80 - 90% cazuri, carcinomul hepatocelular apare pe fundalul cirozei hepatice [74, 95, 119]. În Statele Unite ale Americii, hepatocarcinomul este înregistrat cu frecvență mai redusă, și totuși se observă o tendință de creștere a acestei boli în ultimul deceniu. Datele statistice (registrul SEER) au arătat că ratele globale anuale de incidență ajustate la vârstă ale CrH s-au dublat de la 1, 4 la 100 000 în 1975-77 la 4, 8 la 100 000 în 2005-2007 [22, 74, 95]. Supraviețuirea globală de 5 ani este mai mică de 12%, ceea ce face ca CrH să fie cea mai rapidă cauză de creștere a mortalității în Statele Unite. Ambele sexe prezintă o creștere de 3 ori a incidenței CrH din 1975 spre 2007 [137, 138]. Aproximativ jumătate din creșterea numărului de cazuri CrH a fost atribuită infecției

cronice cu virusul hepatitic C [119]. Infecția cronică virală B se identifică la 10-15% dintre persoanele cu CrH în Statele Unite ale Americii, iar la 30-35% nu au fost identificați careva virusuri hepatitice.

Evidente sunt cauzele virale în dezvoltarea hepatocarcinomului. Riscul de apariție a CrH este de la 10 până la 25 de ori mai mare la persoanele cu infecția cronică virală B și de până la 17 ori mai mare în ciroza hepatică provocată de virusul hepatitis C [22,32]. Studiile lui Palmer Beasley și Li-yu Hwang efectuate în Taiwan, sunt remarcabile și trebuie să facă parte din istoria hepatitei virale B. Sunt studii prospective adresate incidenței carcinomului hepatocelular în rândul subiecților AgHBs negativi și AgHBs pozitivi [22,24]. Urmărind peste 22707 de indivizi, aceștia au arătat că aproape fiecare caz de ciroză hepatică urmat de CrH au apărut doar în grupul HBsAg pozitiv și că riscul relativ al CrH a fost mai mare de 200 ori la persoanele infectate cu VHB decât la grupul martor (fără AgHBs). Legăturile epidemiologice definitive dintre VHB și CrH au fost demonstrate, de asemenea, în Africa de Sud de Michael Kew (1983). Această asociere a sugerat, de asemenea, că vaccinul împotriva hepatitei B ar preveni CrH asociat cu VHB și, prin urmare, reprezintă primul vaccin împotriva cancerului [137, 138]. Infecția cronică cu VHB, a dictat în mare parte și distribuția geografică a carcinomului hepatocelular, iar odată cu imunoprofilaxia prin vaccinare a VHB se observă o tendință de reducere a prevalenței acestui tip de cancer. În unele țări se păstrează un indice înalt de CrH indus prin VHB, mai ales la persoanele cu vârsta mai mare de 50 ani. La persoanele mai tinere un impact evident în dezvoltarea CrH este atribuit infecției cronice cu virusul delta. Infecția cronică cu virusul hepatitic B are un risc de dezvoltare a carcinomului hepatocelular de 10% - 25% pe durata vieții. Spre deosebire de alte hepatite virale, virusul hepatitic B este unic și poate dezvolta CrH fără dezvoltarea cirozei hepatice [117]. VHB are o serie de caracteristici, care sunt cunoscute pentru a contribui la dezvoltarea CrH independent de inflamația hepatică [119, 137] Genomul VHB se poate integra în genomul gazdei și pot induce modificări cromozomiale și mutageneza inserției genelor canceroase [19, 22, 74]. Este binecunoscut că hepatocitele sunt celule regenerative, care pot prolifera pentru a menține ficatul în timpul injuriei. Hepatita virală B este un process necroinflamator asociat cu o proliferare hepatocitară crescută, ce menține ADN VHB integrat și, în consecință, abnormalitățile epigenetice și genetice vor crește în timp [118, 119, 123]. Mason și colab. 2016 au raportat că evenimentele de integrare aleatorie a VHB au sporit randamentul hepatocitelor și că expansiunea clonală a hepatocitelor apare la persoanele infectate cu VHB înainte ca deteriorarea hepatică să fie aparentă din punct de vedere clinic. Proteinele de suprafață și HBx ale VHB sunt raportate că contribuie direct la transformarea hepatocitelor prin căi distincte și care nu se suprapun, inducând

stresul reticulului endoplasmatic printr-un răspuns proteic desfășurat, iar șoarecii transgenici, concepuți pentru a exprima proteinele din înveliș, dezvoltă cancer de ficat. HBx joacă un rol în transformarea hepatocitelor și este un factor determinant al progresiei CrH. HBx este de obicei exprimat la nivel scăzut în timpul infecției, iar odată cu creșterea frecvenței de integrare a ADN-ului VHB din timpul infecției și creșterea proliferării hepatocitelor, sporește și nivelul de exprimare HBx fiind detectat la niveluri ridicate în CrH [176, 182]. Eficacitatea terapiei antivirale în patologia indusă de VHB este incompletă, iar riscul de CrH se păstrează. O revizuire sistematică efectuată de Papatheodoridis GV și colaboratorii în 2010 a arătat că pacienții cu VHB care au primit tratament cu analogi nucleotici (nucleotici) au un risc mai redus de dezvoltare a carcinomului hepatic (2,8% față de 6,4% dintre pacienții tratați și cei netratați) pe o perioadă de 46 (32-108) luni. Autorii au concluzionat că tratamentul antiviral existent reduce, dar nu elimină riscul de hepatocarcinom. Ca factori de risc au fost asociați dezvoltării carcinomului hepatic au fost identificați: ciroza hepatică la momentul inițierii terapiei, forma AgHBe negativă a VHB și lipsa răspunsului virusologic. Acești factori au contribuit la menținerea riscului crescut de CrH la pacienții tratați. Studiile suplimentare au confirmat faptul că pacienții cu infecția cronică cu VHB rămân în pericol pentru dezvoltarea carcinomului hepatocelular [22], în ciuda tratamentului antiviral. Integrarea VHB și proliferarea clonală a hepatocitelor sunt observate timpuriu pe durata infecției cu VHB și pot fi cauza unor riscuri persistente de CrH după inițierea tratamentului, iar ineficacitatea medicamentelor curente în degradarea cccADN VHB contribuie la menținerea unui risc de malignitate. Pe când în infecția hepatică virală C s-a produs o revoluție terapeutică, în ultimii 5 ani, aprobate și recomandate spre tratament fiind antiviralele cu acțiune directă, care au o eficacitate mai mult de 90% de eradicare a VHC. Se pare, că problema infecției cu VHC este la limita de a fi eradicată în lumea întreagă. Riscul de CrH în această infecție este foarte înalt, iar terapia actuală presupune reducerea totală a acestui risc. Sunt foarte puține analize, care ar estima impactul eradicării VHC (prin noua terapie) pe CrH. Am găsit un studiu retrospectiv - observațional cu urmărirea timp de 1 an al pacienților care au fost tratați cu medicamentele antivirale cu acțiune directă și au obținut răspuns virusologic susținut. Acest studiu prezintă o rată anuală a incidenței CrH de 3-5% după o terapie cu antiviralele directe [18, 19, 24] ceea ce ne sugerează că și pe această dimensiune încă nu este totul clar. Rezultatele studiului francez prospectiv de cohorta (ANRS collaborative study group on hepatocellular carcinoma. 2016) a demonstrat, rata de recurență de CrH de aproximativ 12% după o urmărirea de 20 de luni a pacienților cu VHC supuși terapiei cu antivirale directe și înregistrând răspuns virusologic. Cred că astăzi, noi încă nu deținem controlul

absolut asupra acestor infecții, în special VHC, care beneficiază de un tratament progresiv și eficace, dar totuși păstrându-se un risc de dezvoltare a CrH. Deaceia, studiile controlate randomizate vor fi necesare pentru a arunca o lumină asupra acestor dezbateri actuale și care să explice despre factorii implicați în acest proces. Mark Ringehan, Jane A. McKeating sugerează despre un potențial rol al scăderii răspunsului imun specific VHC după obținerea răspunsului virusologic susținut indus de antiviralele directe în ceea ce privește influențarea riscului de creștere a celulelor transformate și reparația / dezvoltarea a carcinomului hepatocelular.

Statistica oficială cu date despre prevalența carcinomului hepatocelular în țara noastră este practic necunoscută. Din evidențele de la baza Institutului de Oncologie au fost înregistrate în anul 2016 – 277 de cazuri de carcinom hepatocelular, dintre care în stadiul IV (TNM) - 200 (72.2%) cazuri, în anul 2017 au fost identificate 251 cazuri noi de hepatocarcinom, dintre care 175 de cazuri în stadiul IV. Date certe referitor la etiologia virală nu au fost fixate, însă aproximativ 70.0-80.0% din bolnavii fac cancer pe fondalul infecției virale, afirmă Ana Donscaia, profesor universitar, specialist oncolog din cadrul Laboratorului de cercetări în Oncologie (comunicare la conferința UpDate in Hepatology, Chișinău, Republica Moldova 2018).

După o fază inițială de controverse, infecția cu VHD este recunoscută ca fiind asociată cu o progresie mai rapidă a bolii hepatice și o rată mai mare de conversie la CrH [ 119, 138, 173, 186]. Rolul său în tumorigeneza hepatică este cunoscut în special pentru populațiile care trăiesc în Africa Centrală, Turcia de Est sau Mongolia, unde se regăsesc 27-80% dinre cazurile de carcinom hepatocelular [164, 201]. Replicarea persistentă a virusului hepatite delta conduce la inflamația prelungită și severă hepatică și poate determina dezvoltarea precoce de ciroză hepatică și carcinom hepatocelular. S-a raportat că virusul hepatitic B este responsabil pentru dezvoltarea carcinomului hepatocelular, iar virusul hepatitic Delta pare să exercite un control epigenetic asupra transcripției și replicării VHB [137, 138]. Încă din anii 1980-1990 se cercetează influența virusului hepatitic delta la pacienții cu infecție cronică virală B. Iar concluziile sunt controversate și opiniile specialiștilor sunt dispersate. Tăpălagă D și coaut, 1986 relatează despre frecvența înaltă al infecției virale delta la pacienții cu boli hepatice cronice, inclusiv carcinom hepatocelular (studiul efectuat pe pacienții din România). El și coautorii analizează 373 de pacienți cu boli cronice hepatice, dintre care 228 au fost depistați pozitivi pentru AgHBs, iar dintre ei 190 de pacienți (83.3%) au fost pozitivi pentru anticorpii anti-VHD [24, 29].

În tabelul de mai jos vom sumariza unele cercetări efectuate în anii 1980-1990, care cercetau prevalența marcherilor serologici pentru infecția virală delta la pacienții cu carcinom hepatocelular. Aceste evaluări relatează o distribuție neuniformă a prevalenței anti-VHD, între 0 și 88% dintre persoanele cu CrH HBsAg-pozitiv.

**Tabel 1.5. Seroprevalența anti-VHD la pacienții cu carcinom hepatocelular**

Autorii / țara	Nr pac. CrH	Prezența AgHBs / VHD
<b>Africa</b>		
Kew et.al, 1984	107	AgHBs - 107/ AntiVHD – 0
Cenac et.al, 1987	29	AgHBs – 21/ antiVHD – 14
<b>Asia</b>		
Chen et al., 1984	11	AgHBs - 11/ AntiVHD – 0
Ashraf et.al, 1986	30	AgHBs - 30/ AntiVHD – 5
Shobokshi et al., 1987	116	AgHBs - 116/ AntiVHD – 5
Toukan et al. 1987 (Iordania)	15	AgHBs - 15/ AntiVHD – 10
Rezvan et.al.1990 (Iran)	8	AgHBs - 8/ AntiVHD – 5
Kage M et al, 1992 (Japonia)	58	AgNBs – 58/ Anti VHD - 1
The-la-Huo et.al, 1996	297	AgHBs – 255/ antiHDV – 42
<b>Europa</b>		
Craxi et al. 1984 (Italia)	79	AgHBs - 79/ AntiVHD – 8
Tăpălagă et.al 1987 (România)	8	AgHBs - 8/ AntiVHD – 7
Tassopoulos et al, 1989 (Grecia)	47	AgHBs -20/ AntiVHD – 0
Verme et al, 1991 (Italia)	62	AgHBs - 25/ AntiVHD – 9
Hadziyanis et.al, 1991 (Grecia)	303	AgHBs -303/ AntiVHD – 59
Oliveri et al, 1991 (Italia)	91	AgHBs-31/ antiVHD – 10
Turcanu A. et.al. 2019 (Moldova)	148	AgHBs – 48/anti VHD - 19
<b>America</b>		
Govindarajan et.al 1984	39	AgHBs - 39/ AntiVHD – 1

Verme G., Rossana M., Filippo B. și colab. (1991) evidențiază rolul infecției virale delta în hepatocarcinogenază. Autorii au studiat impactul infecției VHD în patogeneza CrH la 62 de pacienți. Vârsta medie a fost de 59 de ani (în intervalul 25-75 de ani), 54 au fost bărbați și opt femei; 58 au avut ciroză hepatică. Constatările lor sugerează că pacienții AgHBs pozitivi cu superinfecție VHD au dezvoltat ciroză hepatică și CrH la o vârstă mai tânără, decât bolanvii cu hepatopatie cronică AgHBs-pozitivi fără infecție delta. Concluzionând rezultatele obținute cercetătorii au sugerat că infecția cu virusul hepatitic Delta pare să reprezinte un factor de "promovare" pentru carcinomul hepatocelular la subiecții cu risc oncogen indus de VHB, iar leziunea necroinflamatorie de lungă durată hepatică susținută de infecția productivă cu VHB și VHD poate fi un mecanism patogenetic major.

Teh-Ia Huo, Jaw-Ching Wu, Chung-Ru Lai, 1996 publică rezultatele studiului efectuat cu privire la relația clinico-patologică la pacienții cu infecție cronică virală delta față de cei cu monoinfecția B, ca urmare ei contrazic rezultatele cercetărilor anterioare despre influența negativă a VHD în evoluția bolii hepatice. Astfel, cercetătorii analizează 42 de cazuri consecutive de carcinom hepatocelular seropozitiv pentru anti-VHD (anii 1986-1994) comparând manifestările clinice și rezultatele terapeutice cu 255 de cazuri consecutive de carcinom hepatocelular seropozitiv pentru AgHBs, dar seronegativ pentru anti-VHD. Rezultatele obținute au permis să concluzioneze că superinfecția cu VHD nu accelerează dezvoltarea carcinomului hepatocelular. Manifestările clinice au fost similare, iar rezultatul la pacienții cu anti-VHD pozitiv nu a fost mai rău decât în cazul pacienților cu carcinom hepatocelular asociat cu VHB, atâta timp cât au fost diagnosticați într-o fază incipientă și tratați activ.

Infecția cronică cu VHD prezintă un risc triplu de dezvoltare a CrH, iar mortalitatea prin această complicație prezintă un risc dublu la pacienții cu ciroză hepatică AgHBs pozitivă, afirmă Fattovich G. [13,18, 28] Într-un studiu din Japonia, riscul general pentru ciroza hepatică și CrH a fost de 2,58 și, respectiv, de 2,87 la pacienții cu infecție cronică virală Delta [114, 191]. Conform unui alt studiu, replicarea persistentă a VHD duce la ciroză hepatică și CrH cu rate anuale de 4% și, respectiv, 2,8% și este singurul predictor al mortalității hepatice [112]. Infecția cronică virală Delta, suprapusă pe fundalul oncogenetic furnizat de infecția cronică cu VHB, pare să ofere un risc suplimentar de dezvoltare a CrH. Pacienții pozitivi pentru VHD, din studiul efectuat de Abbas Z, 2012 (a fost analizată o cohortă de pacienți cu CrH din Pakistan) au prezentat dimensiuni reduse ale ficatului și dovezi ale hipertensiunii portale severe și ale prezenței precoce TNM comparativ cu monoinfecția VHB. Romeo R., Foglieni B., Casazza G și colab. 2014, au efectuat un studiu, care avea ca scop de a investiga corelațiile dintre viremia VHD și progresia bolii. Au fost analizați 193 de pacienți cu infecție cronică VHD, care au fost urmăriți cu o medie de 9,5 ani (4,8-19,3). Analiza cantitativă al ARN-ului HDV a fost măsurată prin rtPCR. Nivelurile ARN VHD apar semnificativ sporite la pacienții cu CrH. În cazul non-ciroticilor la prima prezentare (n = 105), nivelurile de ARN VHD au fost asociate cu progresia spre ciroză hepatică. Analiza ROC a arătat că aproximativ 600.000 copii / mL de ARN VHD a fost valoarea care a distins dezvoltarea cirozei hepatice. Concluzia cercetătorilor a fost: nivelurile ridicate ale viremiei VHD la pacienții non-cirolici sunt asociate cu o probabilitate considerabilă de progresie la ciroză și dezvoltarea de hepatocarcinom, iar odată ce ciroza s-a dezvoltat, rolul replicării VHD ca predictor al unui rezultat negativ diminuează.



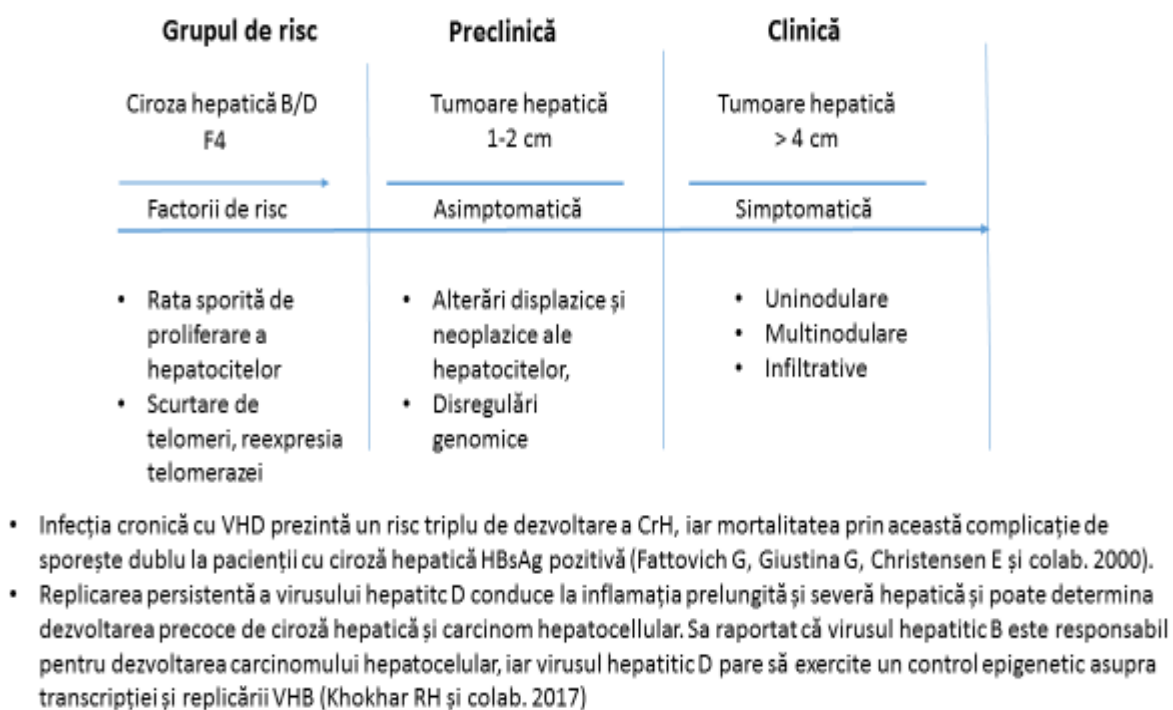
Margetts și colab, 2018 au găsit ca raportul neutrofil-limfocit de  $> 3,15$  este asociat cu supraviețuirea mică. În plus, s-a constatat că scorul indicelui de imunitate inflamatorie sistemic a fost puternic corelat cu dimensiunea tumorii. Zheng et al 2017 a propus, de asemenea, un raport ridicat de neutrofile-limfocite ca un biomarker predictiv al supraviețuirii slabe la pacienții cu hepatocarcinom. Studiul a descoperit, de asemenea, raportul ridicat dintre neutrofile și limfocite, precum și raportul dintre trombocite și limfocite ca fiind factori predictivi independenți pentru supraviețuire și reapariția tumorii la pacienții cu hepatocarcinom care suportă tratament curativ și paliativ.

Diferențele în abordarea CrH se datorează în parte heterogenității sale clinice și biologice inerente, dar pot fi datorate și diferențelor prin care clinicienii și cercetătorii observă cancerul. În ciuda numeroaselor studii de validare, de comparație precum și ale recomandărilor "consens" generate de hepatologi, oncologi, chirurghi și radiologi, cu grade diferite de colaborare multidisciplinară, nu există încă un singur sistem care să poată fi numit "standard" pentru clasificarea CrH. Contabilizarea heterogenității carcinomului hepatocelular nu este doar o reflectare a diferitelor condiții etiologice, cum ar fi virale sau metabolice, ci și a dimensiunilor de afectare a funcției hepatice. Primul sistem modern de stadializare al carcinomului hepatocelular, a fost propus la Simpozionul Internațional de Carcinom Hepatocelular din Kampala, Uganda în 1971 (Vogel CL. 1971). Încercările ulterioare pentru stadializarea CrH au continuat să utilizeze atât variabilele tumorale, cât și cele specifice hepatice, deseori având la dispoziție țesut hepatic, obținut prin biopsie, foarte limitat ca și cantitate și calitate, ceea ce înseamnă că informația patologică se prezintă ca insuficientă, iar rolul biopsiei este contrazis în diagnosticarea CrH. Astăzi, sunt utilizate o serie de stadializări clinice ale CrH, având la bază diverși factori de risc (supuși analizelor multivariate), criteriile clinice (care influențează atât prognosticul, cât și eficacitatea terapeutică). Utilizarea scorurilor clinice relevante în estimarea funcțională hepatică, cum ar fi scorul Chiald- Turccote – Pugh (1973), sau cu impact predictor al supraviețuirii pacientului cu boală hepatică decompensată – MELD [78, 84, 116], au contribuit și la stratificarea pacienților cu CrH. Sigur, că nici un cancer nu ar fi complet fără un algoritm de stadializare TNM (T – histological tumor; N – nodal involvement, M – metastases). Criteriile au fost elaborate de un consensus comun dintre Comitetul American privind cancerul (AJCC) și Uniunea Internațională pentru Controlul Cancerului (1977, I-a ediție) și au fost actualizate periodic, a șaptea ediție a intrat în vigoare în 2010 (AJCC Cancer Staging Handbook. 7 ed. Chicago, 2010). În esență, sistemul TNM se bazează pe histopatologie și este aplicabil în prognosticarea supraviețuirii pentru o minoritate distinctă a pacienților care au suferit intervenții chirurgicale curative. Această stadializare a

fost supusă în timp unor modificări, astfel în 2002 Vautney și colab. au simplificat clasificarea respectivă, propunând ca să fie utilizat în componentul T doar numărul, dimensiunea tumorii și invazia vasculară. Alți cercetători, adaptează TNM pentru pacienții cu CrH și infecția cronică virală B și propun utilizarea microinvaziei vasculare și afectarea țesuturilor din vecinătate [99, 103]. Și totuși, stadializarea TNM nu oferă orientări privind rezectabilitatea și, prin urmare, adaugă foarte puțină valoare discriminatorie evaluării pacientului. Are o relevanță mică pentru pacienții care prezintă boală avansată, din cauza incapacității modelului de a reflecta prognosticul bolii hepatice (2013). În anii următori, apar mai multe scorificări pentru carcinomul hepatocelular, bazate pe criterii clinice, cum ar fi: scorul Okuda, CLIP, BCLC și altele. Primul scor clinic este elaborat de Ocuda și coautorii în 1985, care include în clasificare caracteristica tumorii și gradul de afectare hepatică. Se înaintează acest scor ca urmare a analizei de către cercetători a 850 de pacienți diagnosticați cu CrH (pe perioada anilor 1975-1983), care au fost analizați prin prisma a patru factori reprezentativi pentru boala hepatică avansată: dimensiunea tumorii (implică mai mult sau mai puțin de 50% din ficat; prezența ascitei, valoarea albuminei și nivelul bilirubinei. Studiul efectuat de Ocuda K și colaboratorii este interesant din punct de vedere clinic și practic, și a stat la baza implementării unei stadializări clinice al carcinomului hepatocelular. Voi relata unele aspecte metodologice al acestui studiu, care din punctul meu de vedere tranșează clar ideea cu privire la abordarea personalizată și individualizată a pacientului cu carcinom hepatocelular. Deci, cei 850 de pacienți cu carcinom hepatocelular (monitorizați pe o durată de 8 ani), au fost analizați retrospectiv pentru supraviețuire în funcție de stadiul bolii și tratamentul aplicat. A fost utilizată o nouă schemă de stadializare bazată pe dimensiunea tumorii, prezența ascitei, nivelul bilirubinei și albuminei serice. Supraviețuirea mediană a 229 pacienți care nu au primit nici un tratament specific a fost de 1,6 +/- 0,7 luni pentru pacienții cu Stadiul III, 2,0 luni pentru stadiul II și 8,3 luni pentru stadiul I. Supraviețuirea mediană a pacienților din stadiul I care au avut rezecție hepatică (n = 115) a fost de 25,6 luni, iar pacienții cu stadiul II cu rezecție (n = 42) a fost de 12,2 luni. La pacienții care au avut tumoare de dimensiuni mici (mai puțin sau egal cu 25% din suprafața hepatică), supraviețuirea mediană a fost de 29,0 luni. Supraviețuirea mediană a pacienților tratați medical (n = 124) a fost de 9,4 luni, pentru stadiul II (n = 290) - 3,5 luni și pentru stadiul III (n = 50) - 1,6 luni. Tratamentul medical a prelungit supraviețuirea la pacienții din stadiul II și III, dar nu și pentru cei din stadiul I. Embolizarea arterială transcater a dat o supraviețuire mai bună în comparație cu chimioterapia, fie administrarea intraarterială bolus a Mitomicinei C, a Mitomicinei sistemice C sau administrarea de Tegafur oral / rectal, pentru stadiul II. Dintre diferitele modalități

chemoterapeutice, injectarea intra-arterială bolus a fost superioară chimioterapiei sistemice în supraviețuirea pacienților din stadiul II. În stadiul III, chimioterapia a îmbunătățit supraviețuirea în comparație cu lipsa tratamentului specific. Cauzele majore de deces au fost insuficiența hepatică și hemoragia gastrointestinală. În analiza respectivă se diferențiază multitudinea de opțiuni terapeutice utilizate în alte țări, decât în țara noastră. Posibilitățile pentru tratamentul carcinomului hepatocelular sunt multiple, atât chirurgicale cât și farmacologice. Realitățile din țara noastră, și nu numai, sunt foarte precare, iar situația pacienților cu carcinom hepatocelular este dificilă.

## Perioadele de diagnostic în carcinomul hepatocelular



**Figura 1.6. Perioadele de diagnostic în carcinomul hepatocelular** (ad. A. Turcanu, 2018)

În 1998 un grup de cercetători italieni elaborează și validează un nou scor clinic pentru pacienții cu hepatocarcinom, numit scorul CLIP. Cercetătorii au propus scorul respectiv, ce include stadiul Child-Pugh, morfologia tumorală, nivelul AFP și prezența sau absența trombozei venoase portale. În acest scor sunt considerate funcția hepatică și caracteristicile tumorii. Scopul studiului respectiv a fost de a verifica valoarea factorilor prognostici cunoscuți și de a elabora un indice de prognostic mai sensibil decât scorul Okuda. Analiza respectivă a fost efectuată pe 435 de pacienți

diagnosticați cu CrH. Punctul final al acestei analize a fost estimarea supraviețuirii globale. Supraviețuirea mediană globală a fost de 20 de luni. La analiza multivariată, factorii predictivi independenți de supraviețuire au fost stadiul Child-Pugh, morfologia tumorii, alfa-fetoproteina și tromboza venei portale. Astfel a fost produs un sistem simplu de punctare (scor CLIP), atribuind scorurile liniare (0/1/2) covariantelor. În comparație cu scorul Okuda, scorul CLIP, structurat ca instrument pe șase categorii, a prezentat capacitate mai mare de a diferenția și stratifica un grup de pacienți cu un prognostic favorabil și un grup cu o supraviețuire relativ mai scurtă. Scorul CLIP este ușor de calculat și pare să ofere informații mai precise decât scorul Okuda. Scorul respectiv, încă odată menționează despre dependența supraviețuirii de severitatea bolii hepatice preexistente, totodată este un instrument util în selectarea pacienților la diferit nivel de asistență medicală și orientarea către terapia adecvată. Conform acestui scor pare că rolul nivelului AFP este destul de semnificativ, ceea ce permite și până astăzi utilizarea acestui parametru în screenigul CrH. Cercetătorii atrag atenția spre un nou detaliu evolutiv în boala respectivă, și anume tromboza sistemului port, care influențează prognosticul pacienților.

În 1999 mai apare o stadializare a CrH, bazat pe criteriile clinice, și anume: clasificarea BCLC [117,19,47]. Aceasta este considerată standardul în clasificarea CrH de către Asociația Americană pentru Studiul Bolilor cronice Hepatice (AASLD) și Asociația Europeană pentru Studiul Ficatului (EASL). Investigatorii acestui studiu au analizat supraviețuirea pacienților cu cancer precoce diagnosticat, care au fost selectați pentru terapia radicală, precum și pentru urmărirea evoluției naturale a pacienților cu CrH non-chirurgical. Datele obținute au permis să fie propus un nou sistem de stadializare – BCLC (Stadializarea Barceloniană a carcinomului hepatocelular), care cuprinde patru etape și care selectează cei mai buni candidați pentru cele mai adecvate terapii disponibile. Deci, conform BCLC se distinge: stadiul incipient (A), care include pacienți cu cancer precoce, asimptomatici, potriviți pentru terapii radicale - rezecție, transplant și tratamente percutane; stadiul intermediar (B) cuprinde pacienții cu CrH multinodular, asimptomatic; stadiul avansat (C) include pacienții cu tumori simptomatice și / sau tumoare invazivă (invazie vasculară / răspândire extrahepatică), pacienții din stadiul B și C pot primi tratamente paliative / agenți noi în cadrul studiilor de fază II sau al studiilor randomizate controlate, iar stadiul final (D) include pacienți cu prognostic extrem de sumbru, care ar trebui să primească doar tratament simptomatic. De altfel, urmărim că stadializarea respectivă consideră mărimea și amploarea tumorii primare, funcția hepatică și factorii de risc, încorporând scorul Okuda și scorul Child-Pugh. Iar aplicarea tratamentului fiecărei etape,

nuanțează despre individualizarea terapeutică a acestor pacienți variind de la terapii curative, cum ar fi rezecția sau transplantul, pentru pacienții în stadiu incipient, și până la cea mai bună îngrijire de susținere pentru pacienții din stadiul final.

**Tabel 1.6. Scorificarea și stadializarea carcinomului hepatocelular**

<i>Scorul</i>	<i>Parametrii</i>
Ocudă	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dimensiunea tumorii</li> <li>• Ascita</li> <li>• Albmina</li> <li>• Bilirubina</li> </ul> <p>Stadiul I – fără factori, stadiul II - 1-2 factori, , stadiul III – 3-4 factori</p>
CLIP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stadializarea Child-Pugh: A, B,C</li> <li>• Stadializarea morfologică a tumorii: uninodulară și extensia <math>\leq 50\%</math>, multinodulară și extensia <math>\leq 50\%</math>, masivă sau extensie <math>&gt; 50\%</math></li> <li>• AFP <math>&lt; 400, \geq 400</math></li> <li>• Tromboza venei portale: nu, da</li> </ul>
BCLC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stadiul A (CrH precoce):</li> <li>— A1. Tumoare uninodulară (st. Ocudă I), fără HTP, valoarea bilirubinei normale.</li> <li>— A2. Tumoare uninodulară (st. Ocudă I), cu HTP, valoarea bilirubinei normale;</li> <li>— A3. Tumoare uninodulară (st. Ocudă I), cu HTP, valoarea bilirubinei normale;</li> <li>— A4. 3 tumori <math>&lt; 5</math> cm (st. Ocudă I-II), Child-Pugh A-B</li> </ul> <p>Tratament radical: chirurgical, transplant hepatic, tratament farmacologic percutanat;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Stadiul B (CrH intermediar). Tumoare multinodulară (Ocudă I-II), Child-Pugh A-B. Tratament paliativ: embolizare transarterială, chemoembolizare</li> <li>• Stadiul C (CrH avansat). Tumoare invazivă cu metastazare extrahepatică (Ocudă I-II), Child-Pugh A-B. Tratament paliativ, agenți medicamentoși noi.</li> <li>• Stadiul D (CrH, stadiul terminal). Tumoare invazivă (Ocudă III), Child-Pugh III. Tratament simptomatic și suportiv.</li> </ul>
JIS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Scorul 0: st Child-Pugh A, TNM gr I</li> <li>• Scorul 1: st. Child-Pugh B, TNM gr II</li> <li>• Scorul 2: st. Child-Pugh C, TNM gr III</li> <li>• Scorul 3, TNM gr.IV</li> </ul> <p>Scorul 0 – 65% dintre pacienți atestă supraviețuirea 10 ani</p>
CUPI	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stadializarea TNM</li> </ul> <p>I-II (punctaj: -3),            IIb – IIIa (punctaj: -1)            IVa și IV b (punctaj: 0)</p>

- Clinica asimptomatică la prima prezentare (punctaj: -4)
  - Ascita (punctaj: 3)
  - AFP  $\geq 500$  ng/mL (punctaj: 2)
  - Valoarea bilirubinei:
    - <34  $\mu\text{mol/L}$  (punctaj: 0)
    - 34-51  $\mu\text{mol/L}$  (punctaj: 3)
    - $\geq 52$   $\mu\text{mol/L}$  (punctaj: 4)
  - Fosfataza alcalină  $\geq 200$  IU/L (punctaj: 3)
- Stadializarea CUPI: scorul  $\leq 1$  (risc redus); 2-7 (risc intermediar);  $\geq 8$  (risc înalt)

Scorificările respective, au pus baza identificării și elaborării altor sisteme de stadializare pentru pacienții cu carcinom hepatocellular. Astfel, apar următoarele scoruri clinice: GRETCH scor, propus în 1999 de Sistemul de scorificare francez (1999); scorul JIS (2003), elaborat de Grupul de Studiu privind Cancerul de Ficat din Japonia (CLIP score, 2003); scorul CUPI înaintat de investigatorii chinezi (2002), care au stadializat pacienții cu infecție cronică virală B și CrH, 2002).

Recent au fost introduse și alte scoruri cu rol predictiv în supravețuirea pacientului cu carcinom hepatocellular: scorul ALBI ( $ALBI = -0.085 \times (\text{albumin g/L}) + 0.66 \times \lg (TBil \mu\text{mol/L})$ ), clasifică CrH în 3 grade: 1, 2, 3 (Philip J. Johnson et.al. 2017).

1.  $\leq -2.60$  (ALBI gradul 1 – supravețuire satisfăcătoare),
2.  $-2.60 \leq -1.39$  (ALBI gradul 2),
3.  $> -1.39$  (ALBI gradul 3).

Sunt propuse și alte modele de clasificări, mai noi care se bazează pe amprenta genetică a CrH, dar care sunt foarte costisitoare în utilizare. Scorurile clinice propuse, începând cu anii 1985 și până în prezent și-au găsit aplicabilitate și eficacitate în practica clinică internațională, având un rol semnificativ în selectarea corectă a pacienților cu CrH pentru o conduită terapeutică adecvată [201]. Și, chiar dacă nu există un sistem perfect de stadializare a CrH, încercarea de a caracteriza și de a clasifica mai bine această boală rămâne o încercare demnă, în special dacă suntem capabili să identificăm subseturi de pacienți care obțin beneficii substanțiale din aceste intervenții. Sunt scoruri simple, ieftine și care pot fi aplicate și la nivelul asistenței medicale primare. Cu regret, în țara noastră aceste scoruri nu au fost implementate nici la un nivel de asistență medicală, cu atât mai mult utilizarea acestor scoruri în stratificarea pacienților cu CrH, de către specialiștii hepatologi, oncologi.

#### **1.4. Progrese și perspective în tratamentul hepatopatiei cronice virale delta la nivel global și național**

Virusul hepatitic delta este un patogen uman unic, cel mai mic virus cunoscut; dependent de VHB pentru a-și disemina ARN-ul viroidic; codifică numai o proteină (HDAg), care are atât funcții structurale, cât și cele de reglementare; și se replică folosind proteine predominant ale gazdei. Eșecul analogilor nucleozidici specifici VHB de a suprima funcția de helper VHB și limitările sistemelor experimentale în studierea ciclului de viață al VHD au împiedicat dezvoltarea de medicamente specifice pentru VHD. Încă (anul 2020) nu există o terapie specifică pentru infecția cronică virală delta. Precum și nu există un vaccin contra infecției cu virusul hepatitic delta. Dar, precum spunea Dl Mario Rizzetto pentru eliminarea hepatitei delta, trebuie vaccinate toate persoanele din grupul de risc, precum și tratați toți cei cu HBV, care întrunesc criteriile pentru tratament, iar în cazurile când nu întrunesc criteriile standard de tratament antiviral trebuie să fie monitorizați adecvat. Să nu uităm, că la noi în țară mai mulți ani consecutiv sunt implementate programe de sănătate pentru combaterea hepatitelor virale. Astfel, în cadrul acestor programe se promovează vaccinarea răspândită a populației contra VHB, precum și sunt alocate medicamente antivirale anti-VHB și anti-VHD [1, 3, 4, 140].

De fapt, terapia HDV nu s-a modificat din anii '80. Interferonul alfa, standard sau pegilat, rămâne singura opțiune aprobată disponibilă până în prezent. Hadzyannis SJ promitea în anii 1990 că interferonul ar fi o soluție pentru pacienții cu infecție virală delta având în vedere efectele sale imunomodulatoare și antiapoptotice [140, 145]. Farci și coaut, prezentau pe 3 noiembrie în 1990 în cadrul Asociației Americane pentru Studiul Ficatului despre rezultatele primului studiu randomizat care cerceta eficacitatea virusologică, biochimică și histologică a interferonoterapiei cu doze mari și doze mici la pacienții cu HDV. Astfel, rata răspunsului s-a dovedit a fi proporțională cu doza de interferon, doza de 9 milioane de unități de trei ori pe săptămână fiind mai eficientă decât 3 milioane de trei ori pe săptămână. Pacienții care au administrat doze mari de Interferon alfa (9 mln/3 ori pe săptămână) au avut o îmbunătățire histologică evidentă, exteriorizată prin: reducerea necrozei periportale, descreșterea inflamației portale și inflamației lobulare, comparativ cu pacienții care nu au administrat terapia antivirală, precum și cu cei care au injectat IFN 3 mln de 3 ori/săptămână [13, 145, 154]. Punctele finale ale tratamentului antiviral în hepatita cronică virală delta sunt:

- Eradicarea sau supresia replicării VHD

- Eradicarea VHB cu clearance-ul sau seroconversia AgHBs
- Normalizarea testelor biochimice și îmbunătățirea tabloului histologic

Recomandările terapeutice în hepatita cronică virală delta sunt:

- PegIFN alfa > 48 săptămâni
- Analogii nucleozidici pot fi considerați la pacienții cu hepatita cronică virală delta și viremie activă pentru VHB

Predictorii răspunsului virusologic la pacienții cu hepatita cronică virală delta

- Genotipul non-1 al VHD,
- Viremia inițială a VHD < 10 000000 copii/ml,
- ARN VHD (PCR) negativ în luna a VI-a de tratament cu interferon,
- Titrul inițial redus de AgHBs

### **Tabel 1.7. Tratamentul antiviral în hepatita cronică virală delta**

(după Triantos, M. *Aliment. Pharamcol Ther*, 2012)

Grupul I	IFN alfa/fără TAV	IFN alfa mai eficient în obținerea răspunsului biochimic (OR, 0.11 (95%CI, 0.04-0.2), și virusologic (OR, 0.08 (95%CI, 0.03-0.2), dar slab eficient în menținerea răspunsului virusologic
Grupul II	IFN alfa doza redusă/ IFN alfa doza înaltă	IFN alfa doza înaltă mai eficientă în obținerea răspunsului biochimic (OR, 0.24 (95%CI, 0.08-0.73), și virusologic (OR, 0.27 (95%CI, 0.01-0.74).
Grupul III	IFN alfa +/- Lamivudina/	Fără beneficii în primul grup (IFN + Lamivudină) vs grupul doi (IFN – fără Lamivudină) de regim therapeutic
Grupul IV	PegIFN alfa/ analogi nucleozidici	PegIFN alfa mai eficient în obținerea răspunsului virusologic (OR, 0.419 (95%CI, 0.018-0.974), răspunsului virusologic susținut (OR, 0.404 (95%CI, 0.189-0.866), și ameliorarea activității necroinflamatorii (OR, 0.308 (95%CI, 0.129-0.732), vs NUC.

Interferonul convențional administrat timp de un an are ca rezultat răspunsul virusologic și biochimic la sfârșitul tratamentului la o treime dintre pacienți. Cu toate acestea, răspunsul virusologic susținut (SVR) la 6 luni după tratament este observat numai la 17% dintre pacienți [3,4,13]. Tratamentul cu interferon pegilat (PEG-IFN) are ca rezultat SVR la șase luni după tratament la un



sfert dintre pacienți [1,2,3,4]. Administrarea săptămânală de PEG-IFN este utilizată în prezent pe o perioadă de la 12 până la 18 luni. SVR la șase luni corelează cu absența fibrozei avansate în majoritatea cazurilor. Relapsul întârziat (adică după mai mult de 6 luni) al ARN-ului VHD poate să apară după terapia cu PEG-IFN, astfel termenul "răspuns virologic susținut" trebuie utilizat cu prudență la infecția cu VHD.

Daryl T.-Y. Lau, David E. Kleiner, Yoon Park și coaut (Gastroenterology 1999) [15,17] demonstrează că terapia cu Interferon alfa 2a câte 5 mln zilnic, timp de 12 ani rezolvă hepatopatia delta definitiv, prin dispariția atât antigenului delta și antigenului HBs din țesutul hepatic, cât și restabilește parenchimul hepatic (de la ciroză la ficat normal).

*De ce infecția cu virusul hepatitic delta este dificil de tratat?* Bineînțeles, că VHD nu este un virus obișnuit și nu oferă nici o țintă pentru atacul antiviral; este prea mic pentru a codifica proteinele complexe necesare pentru replicarea independentă și se bazează în întregime pe mecanismele replicative ale hepatocitelor pentru sinteza sa. Potențialele medicamente antivirale sunt disponibile pentru a controla sinteza ADN-ului VHB, dar nu și pentru ARN-VHD. VHD are nevoie de AgHBs pentru a pătrunde în hepatocite și a se propaga și atâta timp cât AgHBs este exprimat de ADN-ul VHB circular covalent închis, care este protejat de atacul preparatelor antivirale, VHD poate să prospere indiferent de inhibarea sintezei virionilor VHB.

Răspunsul la terapia antivirală cu IFN la pacienții cu infecție cronică virală VHD este determinat de mai mulți parametri: biochimici, virusologici, histologic.

**Tabel 1.8. Eficacitatea interferonoterapiei la pacienții cu hepatopatie cronică delta**

<i>Eficacitatea terapeutică</i>	<i>Definirea</i>
Răspunsul biochimic total	Normalizarea aminotransaminazelor ALT, AST - Evaluarea ALT, AST este necesară în fiecare lună pe durata terapiei cu IFN
Răspunsul virusologic (RV)	
— RV total	ARN VHD nedetectabil (PCR, cantitativ)
— RV parțial	ARN VHD redus cu cel puțin 1 log adică de 100 de ori față de valoarea inițială - Evaluarea ARN VHD este recomandabilă la 3, 6, 12 luni pe perioada terapiei antivirale

- Răspunsul virusologic susținut (adică, menținerea ARN VHD negativ posttratament) este considerat pentru pacienții cu infecția virală VHD, dacă ARN VHD negativ (obținut prin interferonoterapie) se menține pe o durată de 3 ani.
- Eficacitatea absolută a terapiei cu PegINF al pacienților cu VHD este considerată doar la pierderea AgHBs și obținerea anti-HBs.

Răspunsul histologic	Descreșterea inflamației hepatice (> 2 puncte) și fibrozei hepatice (> 1 punct).
----------------------	--

*Notă:* Infecția virală delta aproape întotdeauna are o evoluție severă de boală și un prognostic sărac; prin urmare, tratamentul cu PegINF este recomandat indiferent de rezultatele histologice (sigur, luând în calcul contraindicațiile clinice).

După inițierea tratamentului cu PEG-IFN, s-a observat o întârziere medie de 9 zile (intervalul interquartilă 5-15) fără modificări semnificative ale nivelului VHD. Ulterior, VHD a scăzut într-o manieră bifazică, unde o primă fază rapidă, care a durat 25 zile (intervalul interquartilă: 23-58), a fost urmată de o fază secundă mai lentă sau de platou. Niciunul dintre pacienții cu a doua fază în VHD nu a obținut clearance-ul virologic complet [16,17,40,145]. Evidențierea unei faze platou secundare în cinetica VHD și AgHBs a fost asociată cu eșecul de a atinge RVS și oferă bază pentru elaborarea regulilor de stopare timpurie în timpul tratamentului cu PEG-IFN la pacienții infectați cu VHD. Acest studiu efectuat de Guedj J., Rotman Y și Cotler SJ. oferă prima analiză de cinetică detaliată a VHD pe durata terapiei cu interferon pegilat și prezintă informații noi despre evoluția procesului infecțios și tratamentul HDV. Cercetătorii au descris că după o întârziere de câteva zile, nivelurile de ARN VHD scad într-un model bifazic, cu o primă fază de declin virală rapidă, care durează de la 2 zile la 14 săptămâni, urmată de o scădere mai lentă a fazei a doua sau de un platou scăzut. Totodată, se menționează că în contrast cu VHD, HBs a avut un declin liniar monofazic (sau platou) cu o pantă paralelă cu a doua fază a declinului ARN-ului VHD (sau a platoului) [25,40]. Scăderea AgHBs paralelă cu a doua fază a cineticii ARN-ului VHD sugerează un mecanism comun de *clearance*!

Răspunsul la tratamentul antiviral la pacienții cu infecție cronică virală delta poate fi prezis de evaluarea ARN-ului VHD la șase luni, ceea ce poate indica punctul de stopare a tratamentului. Erhardt A coaut., 2006 au evaluat eficacitatea și tolerabilitatea PegINF alfa2b la pacienții cu hepatita cronică virală delta. Un răspuns virusologic susținut a fost atins doar la 17% dintre pacienții care au administrat interferonoterapia. Valoarea predictivă negativă a unei scăderi a ARN-ului VHD cu mai puțin de 3 log-uri în luna a 6-a a fost de 100%. Valoarea predictivă pozitivă a unei scăderi a ARN-ului VHD cu mai mult de 3 log-uri în luna a 6-a a fost de 67%. Scorul histologic Ishak a fost comparabil la momentul inițial și a fost îmbunătățit semnificativ la respondenți comparativ cu cei care

nu au răspuns la tratament. Deci, dacă concluzionăm cele relatate de cercetări obținem că pacienții cu ARN VHD negativ la șase luni au mai multe șanse de a avea un răspuns virusologic susținut, față de cei care nu răspund terapeutic (identificați printr-o scădere a ARN-ului VHD cu mai puțin de 3 log-uri la 6 luni de tratament) [3, 17, 25].

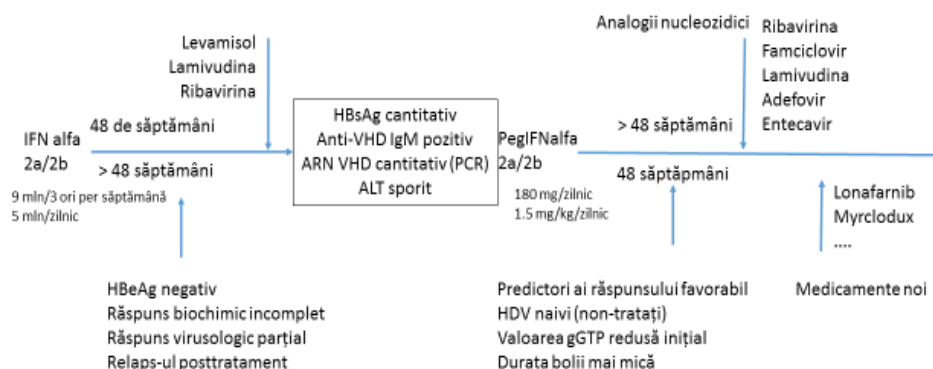
O dimensiune a problemei tratamentului infecției cronice virale delta este legată de recurențele infecției după terapia antivirală. *De ce este infecția VHD atât de predispusă la recădere?* Dat fiind că hepatita cronică virală delta, rezultă din dubla infecție cu VHB și VHD, definiția obiectivelor terapeutice necesită luarea în considerare a ambelor infecții. VHD este extrem de infecțios, iar AgHBs acționează ca un magnet care atrage cantități infime de virus; este dovedit că VHD a fost achiziționat prin serul infectat diluat până la  $10^{-11}$  la cimpanzeii purtători de AgHBs [164, 168].

Analizele curente cele mai sensibile pentru măsurarea ARN-ului VHD au o limită de detecție de 10 genomuri virale / ml și sensibilitatea lor este mult mai mică decât pragul de infectivitate naturală a VHD la un purtător cronic de AgHBs, prin urmare clearance-ul ARN-ului VHD determinat prin aceste teste nu garantează eradicarea virusului infecțios. Aceasta înseamnă că la pacienții care obțin un răspuns virusologic cu IFN, dar rămân AgHBs-pozitivi, VHD rezidual (nedetectabil prin PCR) se poate reactiva în orice moment după o terapie aparent de succes. În mod evident, obiectivul final al terapiei ar fi eliminarea AgHBs; acesta este singurul punct de referință de încredere indicat de vindecarea infecției cu virusul hepatitic delta, dar, din nefericire, este rareori atins. (M.Rizzetto).

Mai multe întrebări nesoluționate rămân în contextul tratamentului cu interferone în infecția cronică virală delta, cum ar fi:

- (1) necesitatea standardizării cuantificării ARN-ului VHD, cel mai utilizat marker surogat de eficacitate a tratamentului;
- (2) validarea punctului final de tratament ca indicator de *stop* tratament;
- (3) durata optimă a tratamentului;
- (4) predictorii eficacității tratamentului;
- (5) identificarea de markeri noi ai eficacității tratamentului.

## Metode terapeutice în infecția cronică virală delta



Farci P, Mandas A, Coiana A et al. Treatment of chronic hepatitis D with interferon alfa-2a. *N Engl J Med* 1994; 330:88-94.  
 Yurdaydin C, et al. Treatment of chronic delta hepatitis with lamivudine vs. lamivudine + interferon vs. interferon. *J Viral Hepat* 2008; 15: 314-321.  
 Morzano A, et al. Treatment of early chronic delta hepatitis with lymphoblastoid alpha interferon: a pilot study. *Ital J Gastroenterol* 1992; 24: 119-121  
 Bordier BB, et al. A prenylation inhibitor prevents production of infectious hepatitis delta virus particles. *J Virol* 2002; 76: 10465-10472

**Figura 1.9. Metodele terapeutice în infecția cronică virală Delta** (ad. A. Țurcanu, 2018)

Analogii nucleoz(i)idici (NA) au fost testați pe scară largă în tratamentul hepatitei cronice virale delta, dar aceste medicamente par a fi ineficiente.

Combinăția dintre IFN- $\alpha$  și ribavirină timp de 24 de luni la 19 pacienți cu hepatita cronică virală delta a determinat normalizarea ALT și dispariția ARN-ului VHD la 42,1% (IFN + ribavirina) [164]. Gunsar F, Akarca US, Ersoz G, și al., 2005 au comparat terapia cu IFN cu sau fără ribavirină pe o perioadă de 2 ani la 31 de pacienți cu hepatita cronică virală delta a obținut normalizarea ALT și dispariția ARN-ului VHD la 57,1% (terapia combinată), și respectiv la 52,4% (doar IFN).

Au urmat și alte studii cu privire la terapia combinată dintre interferon și analogii nucleozidici aplicate în tratamentul HDV. Totuși, necâtând la speranțe mari cu privire la eficacitatea acestor terapii, nu au fost obținute rezultate copleștoare, totodată studiile prezentate sunt puține și pe un număr mic de pacienți. Doar un studiu a arătat că expunerea pe termen lung la Tenofovir a redus în mod semnificativ ARN-ul VHD-ului seric, cu suprimarea completă a ADN-ului VHB la pacienții cu hepatita cronică virală delta infectați cu HIV. Acest beneficiu virusologic a fost însoțit de îmbunătățiri semnificative ale fibrozei hepatice. Investigatorii respectivi au identificat 19 pacienți cu HDV/HIV. Toți au fost viremici pentru VHD (ARN VHD pozitiv) și 11 au avut viremii pozitive pentru VHB. Administrare de Tenofovir pe o durată de 58 de luni, toți au obținut ADN VHB nedetectabil și 10 (53%) au fost cu ARN VHD nedetectabil. La restul pacienților (9) scaderea mediană a ARN-ului VHD

la sfârșitul terapiei a fost de 2,4 log copii / ml. O reducere de peste 30% a rigidității hepatice a apărut la șase din 10 (60%) pacienți care au obținut ARN nedetectabil, în timp ce rigiditatea hepatică nu s-a modificat la pacienții VHD viremici. Concentrațiile serice de AgHBs nu au diminuat semnificativ, deși clearance-ul serologic al AgHBs a apărut la trei pacienți, toți devenind negativi pentru ARN-ul VHD.

Tratamentul combinat al analogilor nucleozidici cu IFN nu oferă nici un avantaj față de monoterapia PEG-IFN în ceea ce privește supresia infecției cu VHD. Abbas Z, 2016 au investigat eficacitatea terapiei cu interferon alfa pegilat cu și fără Entecavir la pacienții cu hepatită cronică virală delta. 40 de pacienți cu ARN VHD pozitiv au fost randomizați să administreze fie săptămânal PEG-IFN $\alpha$ -2a în asociere cu Entecavir 0,5 mg zilnic (n = 21) sau numai PEG-IFN $\alpha$  (n = 19). Pacienții care nu au prezentat o reducere cu 2 log-uri a nivelului ARN VHD la 24 săptămâni de tratament sau au prezentat ARN VHD detectabil la 48 săptămâni de terapie au fost considerați ca fiind eșec de tratament. Tratamentul a continuat timp de 72 săptămâni la restul pacienților. Toți pacienții au fost urmăriți după 24 de săptămâni după tratament. Concluzia acestui studiu a fost că administrarea PegIFN $\alpha$ -2a cu sau fără Entecavir, a determinat clearance-ul persistent al ARN-ului VHD doar la 37% dintre pacienți. Adăugarea Entecavirului nu a îmbunătățit răspunsul virusologic global [1,3]. Wedemeyer H, și coaut., 2011 “Hep-Net / International Delta Hepatitis Intervention Trial (HIDIT 1)”, au efectuat un studiu randomizat în care 31 de pacienți cu infecție VHD au primit tratament săptămânal cu 180  $\mu$ g peginterferon alfa-2a plus 10 mg Adefovir zilnic, 29 au primit 180  $\mu$ g Peginterferon alfa-2a pe săptămână plus placebo și 30 au primit 10 mg Adefovir singur săptămânal timp de 48 de săptămâni. Punctele finale de eficacitate au inclus clearance-ul ARN-ului VHD, normalizarea nivelului de ALT și scăderea titrului AgHBs. Astfel, normalizarea ALT și clearance-ul ARN-ului VHD în săptămâna a 48-a s-a realizat la doi pacienți din grupul care primeau Peginterferon alfa-2a plus Adefovir și doi pacienți din grupul care primeau Peginterferon alfa-2a plus placebo, dar la nici unul dintre pacienții din grupul care primeau numai Adefovir. În săptămâna a 48-a, ARN VHD a fost negativ la 23% dintre pacienții din primul grup, la 24% dintre pacienți în al doilea și la nici unul la cel de-al treilea. O scădere a nivelului de AgHBs cu mai mult de 1 log (10) UI pe mililitru față de valoarea inițială până în săptămâna 48 a fost observată la 10 pacienți din primul grup, 2 din al doilea și la niciunul din cel de-al treilea grup. Astfel, autorii au concluzionat că tratamentul cu Peginterferon alfa-2a timp de 48 de săptămâni, cu sau fără Adefovir, a condus la clearance-ul ARN-ului VHD susținut la aproximativ un sfert din pacienți. Iar în trialul HIDIT 2 aceiași autori au folosit analogul

nucleotidic Tenofovir, în asociere cu Interferon pegilat, cu o durată de tratament crescută de până la 96 săptămâni. La sfârșitul celor 96 de săptămâni de tratament, 47% dintre pacienții care au luat Interferon pegilat plus Tenofovir au prezentat ARN VHD nedetectabil comparativ cu 33% dintre cei care au luat Interferon plus placebo. După terminarea tratamentului, 44% dintre pacienții din brațul de combinație (PegIFN + Tenofovir) și 40% din brațul cu PegIFN + placebo care au răspuns la sfârșitul tratamentului au prezentat recăderi. Astfel, răspunsul virusologic susținut de 24 de săptămâni post-tratament a fost de 30% în brațul combinat și 23% în brațul placebo. Autorii au prezentat aceste rezultate în cadrul Congresului Internațional de Hepatologie (Londra, 2014). În discuții a luat parte și dl profesor Mario Rizzetto de la Universitatea din Torino, (savantul care a descoperit VHD în 1977) ce a declarat că acest studiu "*confirmă ceea ce deja știm*" –de obicei, după oprirea tratamentului apare recăderea infecției. Cercetatorii au ajuns la concluzia ca, opțiunile de tratament alternativ sunt urgent necesare pentru pacienții infectați cu VHD [168, 188].

Concluzii cu privire la strategia terapeutică pentru pacienții cu infecție cronică virală delta non-responsivi la interferonoterapie.

- Pacienții care nu au răspuns la terapia cu PegIFN reprezintă o problemă importantă. O parte din motivul non-răspunsului ar putea fi faptul că au ratat ocazia de a răspunde la tratament din cauza întreruperilor de lungă durată a tratamentului. Prin urmare, este important să definim ceea ce înseamnă, de fapt, lipsa de răspuns într-o stare în care astăzi singurul tratament cu eficacitate dovedită este tratamentul cu PegIFN.
- Pacienții care prezintă reduceri ale ARN-ului VHD de 2 log-uri sau mai mult comparativ cu valoarea inițială pot beneficia de prelungirea tratamentului, iar pacienții care prezintă recidivă după tratament pot beneficia de reintroducerea tratamentului fără întârziere.
- Pacienții care au la sfârșitul tratamentului o scădere cu mai puțin de 1 log comparativ cu valoarea inițială pot fi totuși considerați ca fiind non-responsivi adevărați, iar la acești pacienți trebuie recomandat un tratament alternativ. O astfel de alternativă este să introduci acești pacienți într-un studiu clinic cu noi medicamente care testează în prezent eficacitatea și siguranța lor la pacienții cu VHD.
- O posibilitate pentru non-responsivi (mai realistă) este de a pune astfel de pacienți pe tratament pe termen lung cu analogi nucleozidici. Utilizarea pe termen lung a analogilor

nucleozi(ti)dici constă în faptul că acestea poate diminua în mod indirect producția de cccADN VHB și a AgHBs, ceea ce ar reduce scăderea pătrunderii VHD în hepatocite neinfectate.

Ultimii ani sunt în desfășurare mai multe studii cu evaluarea eficacității unor molecule noi în tratamentul infecției cronice virale Delta. Iar, studierea structurii VHD precum și implicării sale în dezvoltarea procesului de inflamație hepatică a dus la identificarea de noi candidați terapeutici. *Opțiunile terapeutice* sunt:

- 1) inhibarea farnosilării proteinei L-AgHD permissive de asamblare a virionului,
- 2) blocarea intrării AgHBs în celulele hepatice prin inhibarea receptorului de co-transport de taurocholat de sodiu, pentru a împiedica răspândirea VHD la hepatocitele neinfectate,
- 3) reducerea particulelor subvirale de AgHBs conducând la o morfogeneză virionică redusă.

Așa că opțiunile terapeutice noi sunt în evoluție rapidă, deoarece mai mulți agenți noi au intrat în dezvoltare clinică, incluzând inhibitorul de intrare *Myrcludex-B*, polimerul acidului nucleic *REP 2139-Ca* care inhibă secreția de antigen de suprafață VHB, inhibitorul farnosyltransferazei *Lonafarnib* care vizează asamblarea virusului și un interferon mai bine tolerat - *Interferonul lambda* [13, 16, 25,40, 178]. Cihan Yurdaydin de la Universitatea de medicină din Ankara (Turcia) a prezentat în cadrul Congresului Internațional de Hepatologie (EASL, 2014) concluziile studiului de faza 2 LOWR HDV-1, un studiu de dovada a conceptului de evaluare a Lonafarnib-ului ca primul tratament oral pentru hepatita cronică virală delta. Lonafarnib (Eiger BioPharmaceutic), vizează farnesil transferaza, o enzimă care modifică proteinele printr-un proces cunoscut sub numele de prenilare. Acesta este un pas cheie în ciclul de viață al virusului delta, iar blocarea prenilării interferează cu asamblarea și ambalarea de noi particule de virus. Deoarece Lonafarnib acționează mai degrabă asupra unei enzime gazdă umană decât asupra virusului în sine, ar trebui să aibă o barieră mai mare la rezistență decât antiviralele cu acțiune directă. În cadrul întâlnirii anuale a Asociației Americane pentru Studiul Bolilor hepatice (AASLD), în 2014, s-a raportat un studiu de fază 2a (NIH) care a constatat că monoterapia de 100 mg de două ori pe zi cu Lonafarnib pentru 4 săptămâni a redus ARN-ul VHD cu -0,7 log doar la o treime dintre pacienți, practic c-am aceeași proporție ca Interferonul pegilat plus tenofovir din studiul HIDIT-2. Creșterea dozei de Lonafarnib la 200 mg de două ori pe zi a crescut reducerea medie a ARN-ului VHD la 1,6 log zecimali și rata de răspuns a fost la 100% [179, 180]. A fost acordat statutul de medicament orfan pentru Interferonul Pegilat lambda 1a (Lambda,

Eiger Bio, Inc.) ca tratament potențial pentru HDV. Interferonul pegilat lambda 1a este un interferon de tip III (IFN) de primă clasă, care stimulează răspunsul imun protector al gazdei în timpul infecțiilor virale. Interferonul pegilat lambda 1a vizează receptorii IFN de tip III, care sunt diferiți de receptorii IFN de tip I vizați de IFN alfa. Acești receptori de tip III sunt exprimați pe hepatocite și posedă expresie limitată asupra celulelor hematopoietice și ale sistemului nervos central, ceea ce reduce efectele în afara țintei și pot îmbunătăți tolerabilitatea Interferonului pegilat lambda 1 a. Deși, nu utilizează receptorul IFN alfa, semnalizarea fie prin intermediul complexelor IFN lambda sau IFN alfa rezultă în activarea aceleiași cascade de transducție a semnalului Jak-STAT.

Primul studiu pilot cu Myrcludex B a implicat 24 de săptămâni de tratament (injecții subcutanate de 2 mg zilnic) fără de interferonul pegilat standard, precum și combinația acestor medicamente. După această perioadă de tratament, pacienții au continuat să utilizeze numai Interferon pegilat  $\alpha$  pentru 48 de săptămâni. Rezultatul studiului a fost o scădere a AgHBs, în săptămâna 24, precum și reducerea ARN-ului VHD de 1,67 cu numai Myrcludex B, o reducere de 2,17 log cu Interferon pegilat alfa (monoterapie) și o reducere de 2,59 log la combinarea acestor două preparate. Acest studiu a fost prima demonstrație a activității antivirale *in vivo* al medicamentului Myrcludex B împotriva VHD la pacienții cu hepatita cronică virală Delta. Cu toate acestea, atunci când tratamentul a fost oprit, ARN viral a crescut. Un studiu mai amplu, de fază 2B, deschis, cu Myrcludex B plus un nucleozid anti-VHB a implicat la toți pacienții și un analog nucleozidic anti-VHB plus câte 2, 5 sau 10 mg de Myrcludex B administrat prin injecții subcutanate zilnice timp de 24 de săptămâni. Datele intermediare prezentate la reuniunea din 2017 a Asociației Americane pentru Studiul Bolilor Hepatice (AASLD) au arătat o scădere a ARN-ului VHD de 1,8 log pentru doza de 2 mg, o scădere mediană de 1,6 log pentru doza de 5 mg și de 2,7 declinul median pentru doza de 10 mg. Valorile ALT s-au îmbunătățit, în general, dar nivelul AgHBs nu s-a schimbat. Acizii biliari au crescut, ceea ce este în concordanță cu modul în care funcționează mecanismul acestui medicament (de exemplu prin vizarea receptorului pentru absorbția acidului biliar, utilizat atât de VHD cât și de VHB), dar nu a existat nici un raport privind pruritul semnificativ. [13, 14, 15, 16].

Polimerul acidului nucleic REP 2139 a fost testat într-un studiu pilot de 12 pacienți din Republica Moldova, în cadrul Spitalului de Boli Infecțioase Toma Ciorbă. Studiul a constatat din 15 săptămâni de 500 mg de REP-2139 administrat intravenos o dată pe săptămână, urmată de alte 15 săptămâni la jumătate din doză plus Interferon alfa pegilat standard, ultimul dintre acestea fiind



continuat pentru un total de 48 de săptămâni. Patru din cei 12 pacienți au prezentat o scădere impresionantă (până la 5 log-uri) a antigenului de suprafață al hepatitei B în timpul monoterapiei intravenoase. Aceste scăderi au fost asociate cu ARN-ul VHD negativ. Răspunsul a fost menținut, în cea mai mare parte, în timpul fazei cu Interferon pegilat, deși 5 pacienți au revenit după întreruperea REP 2139 (Bazinet M. 2017).

**Tabel 1.8. Efecte adverse ale moleculelor noi utilizate în tratamentul infecției cronice cu VHD**

<i>Medicamentele</i>	<i>Efectele adverse</i>
Myrclohex B	Sporirea valorii lipazei, amilazei  Elevarea acizilor biliari taurin- și glicine-conjugați, fără careva consecințe clinice  Thrombocitopenia, neutropenia, limfopenia, eozinofilie tranzitorie
Lonarfanib	Simptome gastrointestinale: anorexie, nausea, vomă, diaree;  Scădere ponderală (dependent de doză)
Polimerul acidului nucleic	Anorexie, disfagie  Febră, cefalee, transpirații

Și dacă sumarizăm cele expuse mai sus, relatăm că tratamentul actual al HDV (până în anul 2020, când a fost scris acest manuscris) este interferon pegilat (PEG-IFN) cu durata mai mare de 48 de săptămâni, fără alte opțiuni terapeutice la pacienții care nu răspund sau prezintă contraindicații la terapia cu PEG-IFN. Analogii nucleoz(t)ideci: Eentecavir și tenofovir nu au fost aprobați pentru terapia infecției cu VHD. Deși s-au făcut progrese semnificative în tratamentul hepatitei virale cronice, vizarea HDV este încă o provocare majoră din cauza naturii neobișnuite a acestui virus și a severității bolii. VHD nu codifică propria polimerază, ci folosește ARN polimeraza gazdă pentru a se replica. Astfel, spre deosebire de VHB, care posedă o polimerază specifică virusului care poate fi vizată de inhibitori specifici, lipsa unei polimeraze specifice face din VHD o țintă terapeutică deosebit de dificilă. Cunoașterea ciclului viral VHD este importantă, deoarece fiecare etapă a ciclului este o țintă potențială pentru dezvoltarea de noi medicamente. Scopul ideal al tratamentului pentru HDV este eliminarea Ag HBs, care este echivalent cu eliminarea VHD, în timp ce un obiectiv realizabil este un răspuns virologic susținut (ARN VHD negativ la 6 luni după oprirea tratamentului). Medicamentele

aflate în curs de dezvoltare includ în principal inhibitori de intrare, inhibitori de prenilare și inhibitori de eliberare de asamblare a AgHBs. În acest context apare întrebarea: *Aceste medicamente reflectă careva concepte noi despre implicarea VHD în patologia hepatică?* Direcționarea blocării prenilăriei cu Lonafarnib este un exemplu de direcționare a unei infecții virale cu un medicament care inhibă țintă celulară (adică acționează extra-virus real). Una dintre predicțiile unei astfel de abordări este că aceasta vizează un loc genetic care nu este sub controlul virusului; astfel, poate fi o sarcină evolutivă mult mai dificilă pentru ca virusul să dezvolte rezistență sau să se sustragă acestei inhibiții. Acest lucru se preconizează că se va traduce într-o barieră mai mare la dezvoltarea rezistenței clinice. Primele date empirice la om sunt acum disponibile din studiile efectuate de NIH și în Turcia, în care izolate de virusuri de la fiecare pacient s-au secvențiat la fiecare moment și nu s-a revelat nici o dovadă de rezistență. Astfel, direcționarea unei funcții a celulei gazdă de care depinde virusul se poate traduce într-o barieră foarte înaltă în dezvoltarea rezistenței. Acest lucru poate permite ca medicamentul să fie utilizat la doze progresiv mai mici. Acest concept de direcționare se aplică și altor virusuri.

### **1.5. Concluzii la capitolul 1**

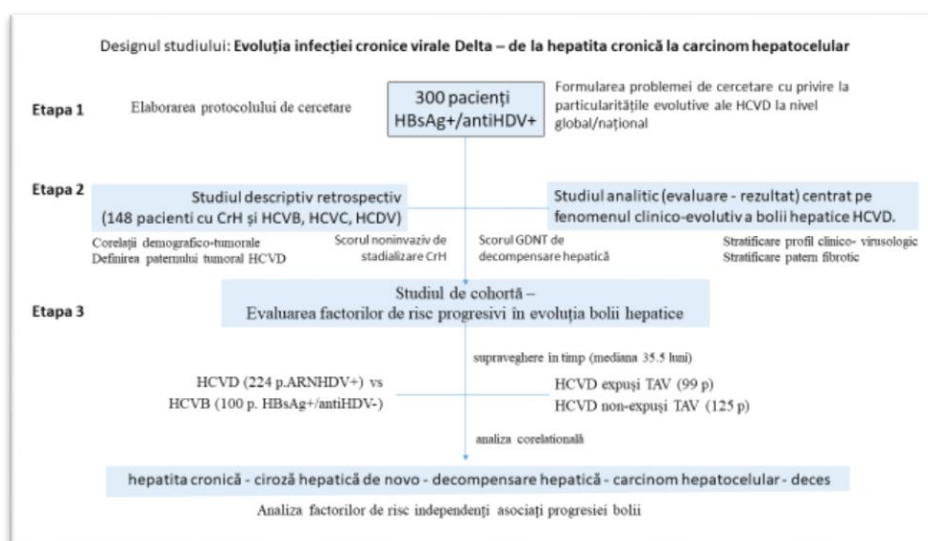
1. Diferențierea profilului clinico-evolutiv al pacienților cu hepatită cronică virală delta distinge două categorii de pacienți cu HDV: grupul pacienților cu evoluție lent-progresivă și grupul pacienților cu evoluție sever-progresivă.
2. Definirea conceptului de prezentare tardivă a pacientului cu hepatopatie cronică virală delta permite să se determine dimensiunea populației expuse riscului și să identifice grupul vulnerabil și factorii de risc pentru prezentarea târzie.
3. Distincțiile evolutive ale pacienților cu infecție cronică virală delta a impus evaluarea unor sisteme de punctaj, precum și markerii non-invazivi ai fibrozei hepatice, cu scopul de a prezice leziunile hepatice și urmările clinice.
4. Identificarea scorurilor neinvazive de progresie a bolii hepatice valide pentru hepatita cronică virală delta prezintă un obiectiv extrem de necesar țării noastre, având în vedere profilul clinico-evolutiv (prezentarea în faze avansate) și inaccesibilitatea biopsiei hepatice la nivel regional.

5. Înțelegerea evoluției infecției cronice virale delta și definitivarea factorilor de risc în progresia bolii hepatice induse de VHD în țara noastră poate fi ca reper pentru elaborarea recomandărilor de supraveghere și accesul la tratament pentru pacienții din întreaga regiune.
6. Stabilirea și selectarea scorurilor neinvazive de stadializare a pacientului cu carcinom hepatocelular la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta prezintă o necesitate în selectarea corectă a pacienților cu hepatocarcinom la etapa precoce, precum și pentru selectarea unei conduite terapeutice adecvate.
7. Este important să definim lipsa de răspuns virusologic în condițiile terapiei antivirale cu PegIFN al pacientului cu hepatită cronică virală delta, precum și determinarea condițiilor de prelungire și de stoparea al tratamentului cu PegIFN,
8. Identificarea și ecomandarea unui tratament antivirală cu molecule noi (Myrclodux B, Lonafarnib) este o opțiune reală astăzi pentru pacienții cu HDV.

## 2. MATERIAL ȘI METODE

### 2.1. Caracteristica cercetării

Elaborarea conceptului și design-ului cercetării a fost efectuat bazându-ne pe obiectivele identificate pentru realizarea scopului prevăzut. Ca urmare, studiul prestabilit de noi a inclus mai mulți pași științifici bazați pe obiectivele trasate, astfel determinând un raționament teoretico-practic direcționat spre a obține dovezi, care finalizează de fapt scopul cercetării propuse.



**Figura 2.1. Design-ul cercetării**

**Etapa I.** (identificarea conceptului și ipotezei științifice): se prezintă printr-o sinteză a resurselor bibliografice și cuprinde crearea conceptului de cercetare. În cadrul acestei etape a fost definită problema care necesită a fi cercetată și a inclus o analiză sumativă direcționată privind evoluția infecției cronice cu virusul hepatitic delta și aspectele progresiei procesului hepatic atât la nivel mondial cât și pe scară națională. În etapa întâia s-a definit subiectul cercetat sub aspectul contribuției factorilor de risc pentru progresia hepatică (referindu-ne la nivel global și național). Alături de definirea problemei în cauză, s-au studiat bunele practici internaționale privind funcționarea sistemelor de screening activ al a factorilor de risc și complicațiilor precoce ale hepatopatiei cronice

virale delta din lume și perspectivele de fortificare privind particularitățile de screening activ al carcinomului hepatocelular în Republica Moldova.

**Etapa II.** Determinarea caracteristicilor clinico-virusologice ale pacienților cu infecție cronică virală delta (evaluare - rezultat) cu accent pe fenomenul clinico-evolutiv a bolii hepatice.

Această etapă a cuprins două substudii:

a) *studiul descriptiv retrospectiv*, de identificare a particularităților carcinomului hepatic primar la pacienții cu infecție cronică virală delta

b) *studiul analitic*, de evaluare a profilului clinico-evolutiv al pacienților cu hepatopatie cronică virală delta în funcție de severitatea procesului hepatic

Pentru realizarea acestui studiu retrospectiv/prospectiv s-a aplicat următoarea metodologie:

**Tabel 2.1 Metodologia studiului de evaluare a profilului clinico-evolutiv al HDV**

Obiectul de studiu	Pacienții cu boală hepatică provocată de virusul hepatitic delta
Sursa de informație	Fișa medicală de ambulator sau staționar, care a cuprins datele de confirmare a infecției virale delta
Metoda de colectare	Vizita medicală, efectuat personal pentru fiecare pacient și extragerea datelor din fișa medicală sau buletinul de analize
Instrumentul de colectare	Chestionar standartizat forma Excel, Acord Informat al pacientului
Volumul	300 pacienți cu infecție cronică virală delta
Locul efectuării	Disciplina de gastroenterologie USMF N.Testemișanu, aflată în cadrul ISMP, Spitalului Clinic Republican „Timofei Moșneaga, Spitalul Clinic Bălți (cabinet infecționist), Centrul Medicilor de familie, Cahul (cabinet gastroenterolog)
Perioada efectuării studiului	Analiza descriptivă a cuprins perioada anilor 2016-2020 și acoperă practic toate cele 37 de raioane al Republicii Moldova (organizarea administrativ-teritorială a Republicii Moldova în funcție de raioane).

**Tabel 2.2. Metodologia studiului de identificare a particularităților carcinomului hepatic primar în HDV**

Obiectul de studiu	Pacienții cu carcinom hepatocelular confirmat (2 metode imagistice și/sau histologic)
--------------------	---

Sursa de informație	Fișa medicală de ambulator sau staționar, care a cuprins datele de confirmare carcinomului hepatocelular
Metoda de colectare	Extragerea datelor din fișa medicală, cu/fără consultație medicală personală
Instrumentul de colectare	Chestionar standartizat forma Excel
Volumul	139 pacienți cu carcinom hepatocelular primar
Locul efectuării	Disciplina de gastroenterologie USMF N.Testemițanu, aflată în cadrul ISMP Spitalului Clinic Republican „Timofei Moșneaga
Perioada efectuării studiului	Perioada anilor 2016 - 2018 și acoperă 33 de raioane ale Republicii Moldova (organizarea administrativ-teritorială a Republicii Moldova în funcție de raioane).

**Etapa III.** Studiul de cohortă cu obiectivul de evaluare a particularităților de progresie a procesului hepatic la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta prin identificarea factorilor cu influență în progresia bolii. În acest studiu au fost încorporate două substudii:

- a) *Studiul de cohortă (caz-martor)* bazat pe analiza factorilor cu influență în progresia bolii hepatice la pacienții cu HDV, comparativ cu grupul de pacienți HBV (monoinfecție)
- b) *Studiul de cohortă bazat pe principiul evaluare-expunere*, care întrunește evaluarea factorilor cu influență în progresia bolii la pacienții cu HDV în funcție de expunerea la tratament antiviral și non-expunerea la tratament

Pentru realizarea acestui studiu de cohortă s-a aplicat următoarea metodologie:

**Tabel 2.3. Metodologia studiului de analiză a factorilor de risc pentru progresia bolii hepatice la pacienții cu HDV**

Obiectul de studiu	Pacienții HDV și HBV-monoinfecție
Sursa de informație	Fișa medicală de ambulator sau staționar, care a cuprins datele de confirmare infecției virale B cu/fără D
Metoda de colectare	Extragerea datelor din fișa medicală, cu consultație medicală personală
Instrumentul de colectare	Chestionar standartizat forma Excel
Volumul	224 pacienți cu HDV, 100 pacienți cu HBV
Locul efectuării	Disciplina de gastroenterologie USMF N.Testemițanu, aflată în cadrul Spitalului Clinic Republican „Timofei Moșneaga, Spitalul Clinic Bălți (cabinet infecționist), Centrul Medicilor de familie, Cahul (cabinet gastroenterolog)

Perioada efectuării studiului	Perioada anilor 2016 - 2020 și acoperă regiunea de Sud, Nord, Centru a Republicii Moldova.
-------------------------------	--

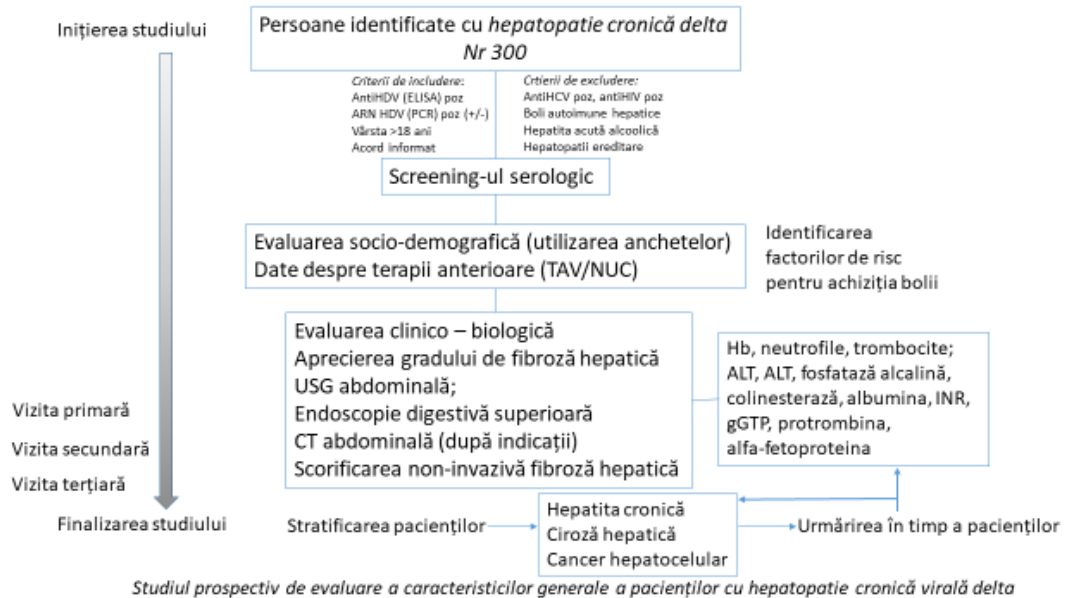
- c) studiul de cohortă bazat pe principiul evaluare-expunere, care întrunește evaluarea factorilor de risc la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta în funcție de expunerea la tratament antiviral și non-expunerea la tratament

**Tabel 2.4. Metodologia studiului de evaluare a factorilor de risc în funcție de expunerea la tratament antiviral**

Obiectul de studiu	Pacienții HDV expuși terapiei antivirale (TAV) vs non-expuși TAV
Sursa de informație	Fișa medicală de ambulator sau staționar, care a cuprins datele de confirmare HDV și anamneză de TAV
Metoda de colectare	Extragerea datelor din fișa medicală, cu consultație medicală personală
Instrumentul de colectare	Chestionar standartizat forma Excel
Volumul	132 HDV fără TAV, 92 HDV cu TAV
Locul efectuării	Disciplina de gastroenterologie USMF N.Testemițanu, aflată în cadrul Spitalului Clinic Republican „Timofei Moșneaga, Spitalul Clinic Bălți (cabinet infecționist), Centrul Medicilor de familie, Cahul (cabinet gastroenterolog)
Perioada efectuării studiului	Perioada anilor 2015 - 2019 și acoperă regiunea de Sud, Nord, Centru a Republicii Moldova.

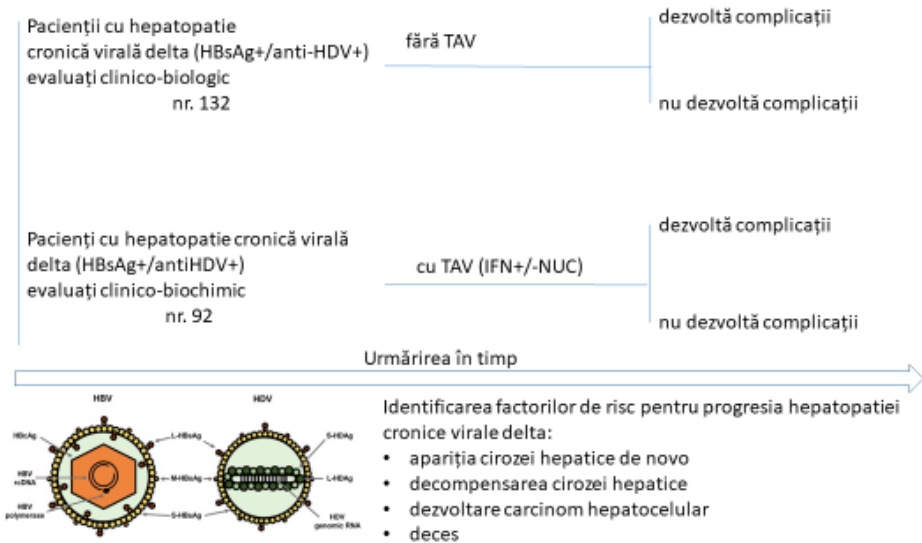
Astfel pentru realizarea integră a tezei de doctor habilitat în științe medicale cu tema: Evoluția infecției cronice virale delta – de la hepatita cronică la carcinom hepatocelular, au fost utilizate mai multe metode de cercetare în dependență de obiectivele înaintate. Au fost aplicate metodele de cercetare, după cum urmează: descriptivă, analitică, comparativă, matematică și statistică.

Conceptul și design-ul studiului prospectiv de evaluarea ale caracteristicilor generale (clinice și biologice) și particularitățile clinico-evolutive ale pacienților cu hepatopatie cronică virală delta, incluși în studiu (nr.300) este încorporat în diagrama 1, iar design-ul studiului de cohortă de analiză a factorilor cu influență pentru progresia hepatopatiei cronice virale delta (stabilirea frecvenței dezvoltării cancerului hepatocelular, decompensării hepatice) – definit în diagrama 2.



**Figura 2.2. Conceptul studiului de evaluare a caracteristicilor generale ale pacienților cu HDV**

*Studiul de cohortă: evaluarea factorilor de risc pentru progresia hepatopatiei cronice virale delta*



**Figura 2.3. Conceptul studiului de cohortă**

Metodologia cercetării a cuprins colectarea aleatorie a pacienților diagnosticați pozitiv cu infecția virală Delta, între anii 2015 și 2019, din diferite raioane ale Republicii Moldova. Pacienții au



fost colectați din instituțiile medicale republicane: secția hepatologie din cadrul ISMP SCR Timofei Moșneaga, Centrele medicale regionale; CMF Cahul, cabinet gastroenterolog; Spitalul Municipal Bălți, cabinet medic infecționist.

Toți pacienții au fost urmăriți pe o perioadă de la 8 – 61 luni, fiind evaluați în cel puțin în trei vizite (acestea fixate în fișele de spitalizare sau fișele ambulatorii).

Stabilirea diagnosticului infecției cronice virale delta: HDV a fost definită de prezența antigenului VHD prin detectarea anticorpilor: anti-HDV IgG, antiHDV – IgM și/ sau qARN-ului VHD seric la pacienții AgHBs pozitivi.

Analiza particularităților demografice, factorilor de risc pentru achiziția HDV s-a realizat în baza chestionării pacienților conform unui protocol (Carta investigării complete al pacienților cu infecția VHD – anexa 1), care conținea date demografice (sex, vârstă, rasă, loc de trai, loc de muncă), caracteristici antropometrice (masă corpului și talie), deprinderile vicioase, locul de muncă, datele anamnezei agravate (maladii suportate anterior, traume fizice, intervenții chirurgicale, transfuzii de sânge sau preparate de sânge, donarea sângelui, donator de organe, transplantare de organe, tratament stomatologic, anamneză ginecologică agravată la femei, tattoo, piersing, acupunctură, purtarea cerceilor) prezența carcinomului hepatocelular intrafamiliar sau ale altor boli hepatice în familie, factorii de mediu, despre statutul migrațional (migrație temporară (pentru lucrul) sau definitivă în alte țări decât Republica Moldova. În același protocol au fost introduse și datele examenului clinic detaliat pe sistemele organelor interne. Au fost incluse și unele date de laborator cu relevanță în atingerea obiectivelor cercetării, totodată s-a punctat și date despre anamnestical terapeutice al acestor pacienți.

Compartimentul clinic al acestui protocol conținea informații despre prezența simptomelor hepatice (semne din cadrul sindroamelor - astenovegetativ, dispeptic, angos, icteric, hemoragic, de hipertensiune portală, edematos, insuficiență hepatică etc.), precum și simptomatocii extrahepatice (reumatologice, dermatologice, endocrine, vasculare, renale). Acest compartiment a fost evaluat și în cadrul vizitelor secundare și terțiare. Totodată, au fost fixate și semnele de decompensare hepatică din cadrul vizitelor ulterioare, astfel înregistrându-se etapa de dezvoltare a cirozei hepatice (dacă pacientul inițial a fost diagnosticat cu hepatita cronică), apariția de novo a cirozei hepatice, precum și dezvoltarea decompensării hepatice prin prezența ascitei, hemoragia digestivă superioară primară sau repetată, cu sau fără ligaturarea vv.esofagiene; encefalopatia hepatică, carcinomului hepatocelular, decesul (precum și cauza decesului).

Progresia la ciroză hepatică a pacienților cu prezentare primară de hepatită cronică delta a fost stabilită prin parametrii clinici cum ar fi numărul de trombocite  $\leq 100.000 \text{ mm}^3$ , examenul ecografic abdominal care evidențiază splenomegalie, diametrul venei porta mai mare de 14 mm, varice esofagiene la endoscopie și valori ale elastografiei tranzitorii (Fibroscan) mai mari de 11,9 kPa, sau FibroTest  $\geq 0.85$ . La cei care prezintă deja ciroză la vizita primară, progresia bolii a fost evaluată prin creșterea clasei Child-Pugh, dezvoltarea de decompensare clinică sau apariția de hepatocarcinom.

Ulterior, începând cu prima vizită și continuând cu vizitele repetate a fost evaluat și profilul biochimic al pacientului, reflectând parametrii sindromului de citoliză (ALT, AST), colestaza intra-hepatocitară (fosfataza alcalină, gamma-glutamattanspeptidaza, bilirubina totală și fracțiile); de sinteză hepatică (albumina, INR și colinesteraza); indicii imuni umorali (IgA, IgM, IgG, IgE); autoanticorpii (ANA, AMA, anti-LKM); parametrii imuni celulari (CD3, CD4, CD8, Cd16); citochinele (IL2, IL10, TNF alfa).

Pentru toți pacienții a fost apreciat și nivelul alfa-fetoproteinei inițial, precum și la vizitele repetate; iar la obținerea unui nivel mai mare de 400 ng/ml (sau sporirea mai mult decât valoarea normală pe parcursul supravegherii pacientului), pacienții respectivi au fost evaluați prin Tomografia computerizată a organelor abdominale (ficatul, splină) sau Rezonanță magneto-nucleară. În unele cazuri (fără contraindicații) a fost efectuată biopsia hepatică. În stabilirea carcinomului hepatocelular au fost utilizate criteriile recomandate de ghidul EASL, 2018 (Asociației Europene pentru studiul Ficatului) cu privire la managementul carcinomului hepatocelular.

Toți pacienții au fost investigați prin ecografia abdominală, în cazurile când a fost suspectată ciroza hepatică s-a aplicat și Dopler duplexulul sistemului portal.

Severitatea fibrozei hepatice a fost apreciată prin cuantificarea rigidității hepatice prin Fibroscan sau Fibrotest, astfel au fost evidențiate patru grade de fibroză hepatică: F1, F2, F3, F4.

Criteriile de includere în studiu:

- Vârsta > 18 ani
- HBsAg+/antiHDV
- HBeAg pozitiv sau negativ
- antiHCV negativ
- anti-HDV sum/ sau antiHDV IgM pozitiv

- ARN VHD (PCR) pozitiv/negativ
- AND VHB (PCR) pozitiv sau negativ
- Tratament antiviral anti-VHB sau anti-VHD (anamnestic sau prezent, cu/ fără TAV)
- Consimțământul pacientului pentru participare în studiu

Criterii de includere pentru grupa de control:

- Vârsta mai mare de 18 ani
- HBsAg pozitiv (screening)
- HBeAg pozitiv sau negativ
- antiHDV negativ, ARN VHD negativ
- ADN VHB cantitativ sau calitativ – pozitiv/ sau negativ

Criterii de includere pentru grupul cu carcinom hepatocelular (studiul descriptiv/ retrospectiv):

- Vârsta mai mare de 18 ani
- HBsAg pozitiv (screening)
- HBeAg pozitiv sau negativ
- antiHBcor pozitiv
- antiHCV poz/ ARN VHC poz sau neg
- antiHDV pozitiv, ARN VHD negativ/pozitiv
- ADN VHB cantitativ sau calitativ – pozitiv/ sau negativ
- Formațiune tumorală depistată la 2 metode imagistice (+/- examen histopatologic)

Criteriile de excludere în studiu:

- Anti-HCV pozitiv (cu sau fără ARN VHC pozitiv),
- HIV - pozitiv
- Hepatita autoimună definită
- Hepatita acută etilică
- Maladii oncologice altele decât carcinomul hepatocelular
- Persoanele care nu au semnat consimțământul

## 2.2. Metodologia cercetării

Pentru aprecierea volumului minim a eșantionului de bază au fost folosite recomandările practice generale pentru selectarea eșantioanelor reprezentative pentru studii științifice, inclusiv următoarea formulă:

$$n = t^2 \times p \times (1-p) \times n / t^2 \times p (1-p) + \Delta^2 \times n$$

n – volumul eșantionului reprezentativ

t – valoarea teoretică a probabilității acceptate (1.96 este pentru un nivel al încrederii de 95%)

p – procentul în care populația deține caracteristica populației

$\Delta$  – eroarea minimă de reprezentativitate admisă (0.05)

*Notă:* Exemplificare: AgHBs este detectat la 7-8% din populația Republicii Moldova (datele menționate de Prisacari V și coaut, Monografie: Hepatite virale parenterale și ciroze hepatice, 2013). Dintre persoanele pozitive cu AgHBs circa 4-5% sunt depistați cu VHD. Astfel, raportându-ne la statistica națională, cu privire la efectivul populației generale din anul 2018-2020, vom identifica circa 187,721 persoane pozitive pentru AgHBs, dintre care 7,508 sunt cu VHD. Deci, 0.27% din populație poate fi considerată infectată cu VHD. Eroarea admisă este de 0.05<sup>2</sup>, adică pentru eșantionul cercetat de noi sunt +/- 18 pacienți. Formula aplicată  $1.96^2 \times 0.28 \times (1 - 0.27) \times 2.681735 / 1.96^2 \times 0.27 (1 - 0.27) + 0.05^2 \times 2.681735 =$  mărimea eșantionului evaluat. Volumul eșantionului reprezentativ (n) a fost calculat având la bază datele oficiale despre efectivul populației pe durata efectuării cercetării (statistica.gov.md, 2019 Numărul populației cu reședința obișnuită în Republica Moldova).

Toate investigațiile au fost efectuate atât la nivelul IP Spitalului Clinic Republican Timofei Moșneaga, la Centrul de Diagnostic Republican, Laboratorul Medical Synevo.

Pentru confirmarea infecției cu VHB, și VHD s-a utilizat tehnica ELISA (anticorpi AgHBs, AgHBe, anti-HBeAb și anti-HBc IgG și IgG anti-VHD).

Toți pacienții au fost testați pentru infecția cu VHC, prin determinarea anticorpilor antiVHC IgG/cu sau fără IgM prin metoda ELISA.

Detectarea semicantitativă a ARN-ului VHD în ser s-a efectuat prin amplificarea PCR unice ale unei regiuni conservate a genomului VHD, utilizând primeri selectați din genotip 1 VHD.

Determinarea cantitativă a ADN VHB a fost efectuată cu Monitorul HBV 2.0 (Roche Molecular Diagnostics).

Viremia ARN VHD detectabilă este propusă ca o indicație a unei infecții VHD active, iar pentru ADN-ul VHB, nivelele mai mari de 20 UI / ml au fost considerate asociate cu infecția VHB activă în hepatită cronică și respectiv ciroză hepatică.

Parametrii biochimici utilizați: ALT, AST au fost determinați prin metoda automată cu seturile standardizate „Haman” (Germania), bilirubina totală și fracțiile (directă și indirectă), gGTP, FA – prin metodele standard; albumina, colinesteraza și IRN. Colinesteraza este enzimă sintetizată în principal de hepatocite și eliberată în sânge. Activitatea colinesterazei serice este redusă în disfuncția hepatică datorită sintezei reduse. Acest lucru este în contrast cu alte enzime serice asociate cu evaluarea clinică a funcției hepatice a căror activitate crește ca urmare a eliberării sporite din sursele sale celulare în urma afectării membranei celulare a hepatocitului.

Evaluarea imună celulară: CD3, CD4, CD8, CD16 va fi efectuată cu ajutorul flowcitometriei BDFACF Via Dikenson, SUA. Aprecierea nivelului IFN gamma, IL10, TNF alfa prin metoda ELISA.

Investigații instrumentale: USG abdominală, Fibromax (Biopredictive, Franța) și/sau Fibroscan (Echosens®, Franța) pentru a stratifica pacienții cu fibroză avansată (toți pacienții).

Pentru toți pacienții cu infecția VHD se evaluează nivelul alfa-fetoproteinei, iar valoarea mai mare de 400 ui/ml a fost considerată valoare de diagnostic pentru cancer hepatocelular și servește ca indicație pentru evaluarea acestor pacienți prin tomografie computerizată sau RMN, biopsie hepatică pentru confirmarea sau excluderea cancerului hepatocelular.

**Considerații etice.** Toate persoanele care au fost incluse în cercetarea respectivă au semnat acordul informat și consimțământul de participare în acest studiu. Pacientul a primit nota informativă despre studiul respectiv și i-a fost asigurată confidențialitatea pe durata acestei cercetări. Iar toate datele colectate de la pacienți sunt stocate într-o bază de date din computerul personal, cu acces restricționat. Avizul pentru această cercetare a fost obținut la Comitetul de Etică a cercetării al Instituției Publice Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” - ședința din (nr. 35 / 24\_ 12.02.2018).

### **2.3. Procesarea și analiza matematico-statistică a materialului**

Analiza statistică a materialului clinic a fost efectuată în cadrul Institutului de Dezvoltare a Societății Informaționale de pe lângă Academia de Știință a Republicii Moldova. A fost utilizate

softurile speciale SPSS-10, Microsoft Excel 2000 și Prism 6.0d (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, SUA)/ Prelucrarea indicilor a inclus:

- **Media** este un indicator care caracterizează un esantion (o populație) din punctul de vedere al unei caracteristici studiate. Există mai multe notări pentru medie:  $M$  și  $\bar{x}$  reprezintă media unui esantion, iar  $\mu$  (miu) este media unei populații. Media se calculează conform formulei:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

- **Eroarea standard** a unui exemplu este o estimare a deviației standard probabile pe care ar avea-o mediile dintr-un număr infinit de exemple.

Această eroare standard oferă o indicație asupra preciziei mediei exemplului ca estimare a mediei esantionului. Cu cât eroarea standard este mai mică, cu atât ecartul este mai mic și cu atât este mai probabil ca orice medie a unui exemplu să fie apropiată de media esantionului, altfel spus, există 68% șanse ca media populației să se încadreze într-o eroare standard de + sau - 1 față de media exemplului.

Formula de calcul al erorii standard a mediei unui esantion :

$$SE = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

- **Abaterea (devierea) standard** este o măsură a variabilității, care descrie cum variază punctele de date față de medie. Porțiunea dintr-o distribuție care se găsește între plus și minus o deviere standard de la medie include aproximativ 68% din cazuri, în timp ce porțiunea care se găsește între plus și minus 1,96 deviații standard include aproximativ 95% din cazuri. Adică, dacă o variabilă este distribuită normal, vă puteți aștepta ca 95% din cazuri să fie incluse în 2 deviații standard de la medie.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

- **Coeficientul (indicele) de asimetrie** prezintă gradul de asimetrie a unei repartiții.
- **Coeficientul de variație** a unui set de date  $D$ , ce conține  $N$  înregistrări se definește ca fiind raportul dintre valoarea abaterii standar și valoarea medie .

$$v = \frac{s}{\bar{x}}$$

- **Amplitudinea absolută a variației** se determina ca diferenta absoluta între cea mai mare și cea mai mica valoare observata:

$$A_x = x_{max} - x_{min}$$

- **Amplitudinea relativă a variației** se obtine prin raportarea amplitudinii absolute la media aritmetica a valorilor inregistrate:

$$Ax\% = \frac{A_x}{\bar{x}} * 100$$

**Distribuția t Student (intervalul de încredere)** – determină probabilitatea ca valoarea adevărată a parametrului să aparțină intervalului de încredere să poată fi fixată independent de date.

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

Analiza de corelație dintre variabilele continue a fost efectuată prin determinarea coeficienților de corelație Pearson (când variabilele erau aproximativ normal distribuite), respectiv Spearman (în caz că variabilele nu sunt normal distribuite sau sunt de ordine). Coeficientul de corelație (Pearson și/sau Spearman) este un număr cuprins între -1 și +1. Punctul -1 caracterizează o relație perfect lineară negativă (legătura inversă), punctul +1 caracterizează o relație perfect lineară pozitivă (legătura directă). Gradul de intensitate a legăturii de dependență între variabilele cercetate a fost interpretat în conformitate cu următoarea gradație: valoarea coeficientului de corelație mai mare sau egală cu ±1 - corelație foarte puternică; valoarea coeficientului de corelație cuprinsă între ± 0,99 și ± 0,70 - corelație puternică; valoarea coeficientului de corelație cuprinsă între ± 0,69 și ± 0,30 - corelație moderată; valoarea coeficientului de corelație cuprinsă între ± 0,0 și ± 0,29 - corelație slabă; valoarea coeficientului de corelație 0 - nu există corelație.

- **Coeficientul de corelație (Pearson)** este o valoare cantitativa ce descrie relatia dintre doua sau mai multe variabile.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

**Criterii de evaluare:**

- „valoarea coeficientului de corelație cuprinsă între ±1 prezintă o corelație foarte puternică între fenomene”;
- „valoarea coeficientului de corelație între ±0,99 și ±0,70 definește o corelație puternică”;
- „valoarea coeficientului de corelație între ±0,69 și ±0,30 denotă o corelație medie între fenomene”;
- „valoarea coeficientului de corelație între ±0,29 și ±0,0 atestă corelația slabă între fenomene”.

Coeficientul de corelație a rangului, propus de **K. Spearman**, se referă la indicatori neparametrici ai relației dintre variabilele măsurate pe o scară de rang. La calcularea acestui coeficient, nu sunt necesare presupuneri cu privire la natura distribuției caracteristicilor în populația generală. Acest coeficient determină gradul de apropiere a relației trăsăturilor ordinale, care în acest caz reprezintă rangul valorilor comparate. Coeficientul de corelație liniară a rangului lui Spearman este calculat folosind formula:

$$r_R = 1 - \frac{6 \sum d_i^2}{n(n^2 - 1)}$$

unde n este numărul de caracteristici clasate (indicatori, subiecte);

d este diferența dintre rândurile din două variabile pentru fiecare subiect;

**Pentru estimarea și prognozarea decompensării hepatice sau dezvoltării complicațiilor bolii au fost analizați mai multe scoruri non-invazive.**

**Scorul King** (T.JS Cross, 2008), reprezentat prin următoarea formulă: vârstă (ani) x AST (Ui/ml) x INR/ trombocite (10<sup>9</sup>/mm).

Criterii de evaluare:



- *Scorul mai mare sau egal cu 16,7* – risc înalt pentru ciroză hepatică (predictibilitate pentru ciroză hepatică în 34% dintre pacienții cu hepatita cronică virală B, C; sensibilitate 86%, specificitate 80%, valoare predictivă negativă înaltă – 96%);
- *Scorul mai mic de 16.7* prezintă risc redus pentru dezvoltarea cirozei hepatice.

**Scorul GUCI** (Goteborg University Cirrhosis Index), reprezintă raportul:  $AST \times INR \times 100 /$  trombocite (10<sup>9</sup>/l).

Criterii de evaluare:

- Scorul mai mare de 0.3 – caracteristic pentru F0-F1, sensibilitatea 90.1%, specificitatea 31.6%, valoarea predictiv pozitivă 84.9 % și valoarea predictiv negativă 42.9%.
- Scorul mai mare de 1.5 – caracteristic pentru F3-F4, sensibilitatea 53.6%, specificitatea 81.9%, valoarea predictiv pozitivă 53.6 %, valoarea predictiv negativă 81.9 %.
- Scorul mai mare de 4.35 – caracteristic pentru F4, sensibilitatea 75.0%, specificitatea 96.9%, valoarea predictiv pozitivă 50.0%, și valoarea predictiv negativă 98.9%.

**Tabelul 2.1. Scorul CDS (Score Discriminant cirotic).**

Parametri	0	1	2	3	4	5	6
INR	<1.1	1.1-1.4	>1.4				
ALT/AST	>1.7	1.7-1.2	1.19-0.6	<0.6			
Trombocite (mm) <sup>3</sup>	>340	340-280	279-220	219-160	159-100	99-40	<40

Criterii de evaluare:

- 0-7 puncte – fără ciroză hepatică
- 8-11 puncte – cu ciroză hepatică

**Scorul API**, reprezentat de scorul de vârstă + scorul trombocitar. Identificare unui scor > 6 este specific pentru ciroza hepatica.

Scorul de vârstă este constituit astfel:

- < 30 ani = 0;
- 30–39 ani = 1;
- 40–49 ani = 2;
- 50–59 ani = 3;

- 60–69 ani = 4;
- $\geq 70$  ani = 5

Scorul trombocitar cuprinde următoarele:

- $< 225$  (K/ $\mu$ L): = 0;
- 200–224 (K/ $\mu$ L): = 1;
- 175–199 (K/ $\mu$ L): = 2;
- 150–174 (K/ $\mu$ L): = 3;
- 125–149 (K/ $\mu$ L): = 4;
- $\geq 125$  (K/ $\mu$ L): = 5

**Scorul APRI.** Se calculează după formula:

$$\text{APRI} = (\text{AST(U/L)} \div \text{AST(U/L)}) \div [\text{trombocite (K/\mu L)}]$$

Criterii de evaluare:

- $\geq 1.5$  caracteristic pentru fibroza semnificativă
- 2 și mai mult este caracteristic pentru ciroza hepatică

**Scorul FIB-4.** Se calculează după formula:

$$\text{FIB - 4} = \text{vârsta} \times \text{AST(U/L)} \div \text{trombocite (K/\mu L)} \times [\sqrt{\text{ALT(U/L)}}]$$

Criterii de evaluare:

- $\geq 3.25$  – caracteristic pentru ciroza hepatică avansată

**Indexul FibroQ** (fibrosis quotient). Apreciază gradul de fibroză, se calculează conform formulei:

$$\text{FibroQ} = 10 \times (\text{vârsta} \times \text{AST} \times \text{INR/ALT} \times \text{numărul de trombocite})$$

Criterii de evaluare:

- $< 0.6$  – fără ciroză hepatică
- $> 1.6$  semnifică fibroză semnificativă (F2-F4 Metavir)
- 2.6 semnifică ciroza hepatică (F4 Metavir)

**Scorul GDNT** include variabile de laborator, cum ar fi valoarea albuminei, numărul de trombocite, nivelul de bilirubină totală și indicile INR, precum și o caracteristică oferită prin examinarea ecografică a determinării dimensiunilor splinei. Acest scor este urmare a analizei multifactoriale descriptive.

Scorul GDNT	Albumin g/L+(Trombocite x 0.1)
	(INR x 10)+ (Bili x 0.25)+ (Dle splinei x0.1)

Explicație:

- Scorul GDNT cu valoarea <0.8 – ciroză hepatică progresivă (decompensarea hepatică);
- Scorul GDNT cu valoarea 0.8-1.6 – ciroză hepatică compensată
- Scorul GDNT cu valoarea >1.6 – non-cirofici, fără progresie

Construirea acestui scor s-a bazat pe recomandările TRIPOD (G. S. Collins, J. B. Reitsma, D. G. Altman, and K. G. M. Moons, “Transparent reporting of a multivariable prediction model for individual prognosis or diagnosis: The TRIPOD statement,” In: *Br. J. Cancer*, 2015, vol. 112, no. 2, pp. 251–259). Scorul GDNT este o componentă a proiectului (Primary Liver Cancer and Hepatitis in Moldova Republic (PriLiHepM), moldo-francez dintre USMF N.Testemițanu (investigatori A.Turcanu, E.Tcaciuc) și Unité « Organisation nucléaire et Oncogénèse », INSERM U993, Institut Pasteur, Paris, France (investigator prof. Pascal Pineau).

**Pentru evaluarea carcinomului hepatocelular au fost utilizate următoarele scoruri non-invazive:**

**Scorul CLIP** (Cancer of the Liver Italian Program, propus și implementat în 1988) pentru pacienții cu carcinom hepatocelular și se calculează prin atribuirea unui scor (0, 1 sau 2) fiecăruia dintre cei patru factori clinici:

- a) stadiul Child-Pugh (A-0; B-1, C-2)
- b) numărul de noduli tumorali și dacă tumora se extinde prin  $\leq 50\%$  (1) sau  $> 50\%$  (2) din ficat;
- c) valoarea alfa-fetoproteinei ( $< 400$  (0),  $\geq 400$  (1))
- d) tromboza venei porte (prezentă – 1).

Supravețuirea medie :

- 0 = 42.5 luni
- 1 = 32.0 luni

- 2 = 16.5 luni
- 3 = 4.5 luni
- 4 = 2.5 luni
- 5-6 = 1 luni

**Scorul Okuda**, elaborat de cercetătorii japonezi Okuda K și echipa în 1984.

Acest scor include:

- dimensiunea tumorii:  $\leq 50\%$  (-) sau  $> 50\%$  (+),
- prezența sau absența ascitei (+ sau -),
- nivelul albuminei serice ( $\leq 3.0$  g/dl (-) sau  $> 3,0$  g / dl (+),
- nivelul bilirubinei serice ( $\leq 3.0$  mg/dl (-) sau  $> 3,0$  mg / dl (+)

Bazându-ne pe aceste variabile pacienții sunt clasificați în trei stadii:

- Stadiul I (patru de -): neavansat,
- Stadiul II (cel puțin un +): moderat avansat,
- Stadiul III (cel puțin trei +): foarte avansat.

Supraviețuirea

- 11,5 luni pentru pacienții din stadiul I,
- 3,0 luni pentru pacienții din stadiul II,
- 0,9 luni pentru pacienții din stadiul III.

**Scorul BCLC** (Barcelona Clinic Liver Cancer). Este alcătuit din patru elemente (extensia tumorii, rezerva funcțională hepatică, starea fizică și simptomele legate de cancer). Extinderea tumorii încorporează numărul de tumori, dimensiunea tumorii și prezența invaziei venei porte sau a metastazelor extrahepatice. Funcția hepatică este evaluată prin gradul Child-Pugh, iar starea fizică este determinată în funcție de starea de performanță fizică ECOG (elaborată de Robert L. Eastern Cooperative Oncology Group). ECOG încorporează 5 grade de performanță fizică pentru pacienții oncologici (de la I-ul stadiu, în care activitatea fizică este completă și finalizând cu stadiul 5 – decesul pacientului).

Pacienții sunt apoi repartizați în cinci categorii (0, A, B, C și D) pe baza acestor elemente.

- stadiul 0 (definită ca boală în stadiu foarte incipient) cuprinde pacienții care prezintă o funcție hepatică bine conservată (Child-Pugh A) diagnosticată cu un nodul asimptomatic cu o dimensiune mai mică de 2 cm, fără invazie vasculară sau sateliți.
- stadiul A (definită ca boală în stadiu incipient) include pacienți cu statut Child-Pugh A sau B diagnosticați cu un nodul de orice dimensiune sau cu un maxim de trei noduli măsurați  $<3$  cm.

- stadiul B (definită ca boală în stadiu intermediar) corespunde pacienților cu statut de Child-Pugh A sau B diagnosticați cu noduli multipli, fără invazie vasculară sau metastază extrahepatică.
- stadiul C (definită ca boală avansată) corespunde pacienților cu Child-Pugh grad A sau B, invazia vasculară sau metastazele extrahepatice și simptomele legate de cancer (PS 1-2).
- Stadiul D (definită ca boală în stadiu terminal) sunt incluși pacienții cu un Child-Pugh clasa C, în orice stadiu tumoral și simptome legate de cancer (PS > 2).

Pentru pacienții cu stadiul 0 și A, se recomandă opțiuni de tratament curativ: rezecția chirurgicală, transplantul de ficat și ablația. Între timp, TACE (chemoembolizare transarterială) este recomandat pacienților cu BCLC st. B, sorafenibul, inhibitorul multikinazei, este recomandat pacienților cu stadiul C.

În lucrarea de față am utilizat și scoruri mai noi și simpliste ca modele mai convenabile și bazate pe dovezi pentru evaluarea severității disfuncției hepatice la pacienții cu carcinom hepatocelular, astfel ca scorul ALBI și PALBI. Avantajul este acela că valoarea prognostică este comparabilă între scorurile ALBI, PALBI și Child-Pugh, (excluzând doi indici subiectivi [adică ascita și encefalopatia hepatică incluse în scorul Child-Pugh]).

#### **Scorul ALBI** (albumina – bilirubina).

Formula:  $ALBI = (\log_{10} \text{bilirubin} \times 0.66) + (\text{albumin} \times -0.085)$ , bilirubin in  $\mu\text{mol/L}$  și albumina in g/L.

Criterii de evaluare:

- Gradul 1 -  $\leq -2.60$ , supraviețuirea 18.5 – 85 luni
- Gradul 2 -  $\leq -1.39$ , supraviețuirea 5.3-46.5 luni
- Gradul 3 -  $> -1.39$ , supraviețuirea 2.3-15.5 luni

#### **Scorul PALBI** (trombocite, albumina, bilirubina serică)

Formula scorului PALBI:  $2.02 \times \log_{10} \text{bilirubina} - 0.37 \times (\log_{10} \text{bilirubina})^2 - 0.04 \times \text{albumina} - 3.48 \times \log_{10} \text{trombocite} + 1.01 \times (\log_{10} \text{trombocite})$

- Gradul 1 -  $\leq -2.53$ ,
- Gradul 2 -  $> -2.53 - \leq -2.09$ ,
- Gradul 3 -  $> -2.09$ .

*Limitele:* În analiza subgrupului cu ciroză hepatică virală B, mărimea eșantionului pentru qHBsAg a fost mică (doar 43.6% dintre pacienți au fost analizați), precum și un număr mic au fost evaluați pentru ADN VHB cantitativ (38.9%). În analiza subgrupului de pacienți cu ciroză hepatică delta, mărimea eșantionului pentru determinarea qHBsAg a fost circa 39,3%, și pentru ADN VHB cantitativ a fost 36,3%. Tratamentul aplicat acestor pacienți a fost un tratament neomogen, astfel în subgrupul pacienților cu hepatita cronică virală B au administrat 59,8% dintre pacienți terapie cu analogi nucleozidici (Entecavir, Tenofovir – preparate originale și generice). Toate punctele de mai sus pot avea un impact ușor asupra rezultatului studiului de cohortă.

## **2.4. Concluzii la capitolul 2**

1. Conceptul studiului include un complex de ipoteze științifice dependente de obiectivele prestabilite, iar dovezile obținute identifică scopul înaintat. Proiectarea protocolului de cercetare a considerat regulamentul metodologiei științifice aprobate în cercetările din domeniul sănătății publice.
2. Teza de doctor habilitat în științe medicale include o cercetare compusă din mai multe substudii realizate în mai multe etape, iar fiecare dintre ele raportate la obiectivul lansat a implicat un raționament clinic ținut spre a obține dovezi, care sunt de fapt componentele studiului realizat.
3. Etapele cercetării au cuprins:
  - **etapa I:** are loc proiectarea conceptului studiului și definirea problemei înaintate spre cercetare, utilizând sinteză datelor științifice internaționale cu privire la fenomenul evoluției infecției cronice cu virusul hepatitic delta și particularitățile progresiei hepatice în lume și Republica Moldova. În plus, s-a realizat definirea problemei la scară internațională precum și națională sub aspectul contribuției factorilor de risc de progresie hepatică. Totodată a fost analizat și studiat impactul practicilor internaționale pe dimensiunea screening-ului activ al factorilor de risc și al complicațiilor precoce ale hepatopatiei cronice virale delta din lume precum și condițiile de îmbunătățire privind particularitățile de screening activ al carcinomului hepatocelular în lume și Republica Moldova.
  - **etapa II.** studiul direcționat către analizarea caracteristicilor clinico-virusologice ale pacienților cu hepatopatie cronică virală delta (evaluare - rezultat) centrată pe fenomenul clinico-evolutiv a bolii hepatice. Această etapă a cuprins două substudii: a) studiul descriptiv

retrospectiv, de identificare a particularităților carcinomului hepatic primar la pacienții cu infecție cronică virală delta b) studiul de evaluare a profilului clinico-evolutiv al pacienților cu hepatopatie cronică virală delta în funcție de severitatea procesului hepatic

- **etapa III.** Studiul de cohortă (analitic, observațional) cu obiectivul de evaluare a particularităților de progresie a procesului hepatic la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta prin identificarea factorilor de risc progresivi/ protectori. În acest studiu au fost încorporate două substudii: a) studiul de cohortă (caz-martor) bazat pe analiza factorilor de risc pentru progresia bolii hepatice la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta în comparație cu pacienții cu hepatopatie cronică virală B (monoinfecție) și b) studiul de cohortă bazat pe principiul evaluare-expunere, care întrunește evaluarea factorilor de risc la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta în funcție de expunerea la tratament antiviral și non-expunerea la tratament
- 4. Metodologia cercetării a cuprins metodele de cercetare, după cum urmează: descriptivă, analitică, comparativă, matematică și statistică.
- 5. În scopul confirmării diagnosticului, în toate formele de patologie hepatică s-a folosit un spectru larg de metode paraclinice, molecular-biologice și instrumentale
- 6. Materialul clinic colectat a fost supus analizei statistice detaliate cu utilizarea diverselor metode matematice, ceea ce a permis aprecierea veridicității rezultatelor.

### **3. EVALUAREA PROFILULUI CLINICO-VIRUSOLOGIC AL PACIENTULUI CU HEPATOPATIE CRONICĂ VIRALĂ DELTA**

#### **3.1. Profilul demografic și impactul transmisiei VHD al pacienților cu hepatopatie cronică virală delta incluși în studiu**

Pentru realizarea acestui obiectiv am evaluat o cohortă de 300 de pacienți cu hepatopatie cronică virală delta. Înrolarea pacienților s-a petrecut între anii 2016 - 2020 în cadrul a 3 instituții medicale: 1. Secția de hepatologie a spitalului Clinic Republican Timofei Moșneaga, Chișinău, Centrul Medicilor de Familie din Cahul (cabinetul gastroenterolog/hepatolog) și IP Spitalul Municipal Bălți (cabinetul infecționistului).

Inițial au fost colectați 321 de pacienți cu HDV, dar au fost identificați asociați cu VHC (9 pacienți), cu HIV (1 pacient) care ulterior au fost excluși din studiu. Din studiu au mai fost excluși încă 2 pacienți, care au fost diagnosticați cu tuberculoză pulmonară, și pacienții cu malignități extrahepatice și metastatice (9 pacienți). În final, evaluarea a fost efectuată pe 300 de pacienți cu hepatopatie cronică virală delta. Diagnosticul a fost stabilit pe criterii clinice, biologice, imagistice și molecular-biologice.

Pacienții cu infecție cronică virală delta au avut o mediană de vârstă medie 48 - 49 ani (predominant erau în categoria de vârstă a adultului tânăr și adult matur), iar predominarea feminină a fost semnificativ reprezentată în acest grup.

Rezultatele obținute demonstrează o tendință a unei prevalențe mai sporită a HDV la femei (158 femei) decât bărbați (142 bărbați). Acest rezultat, posibil a influențat și tabloul ulterior cu privire la transmiterea perinatală a infecției cu VHB, precum și achiziția în copilărie a HDV. Este interesant de menționat că predominarea femeilor în cercetarea noastră nu corespunde numai decât cu severitatea bolii la femei.

Ulterior vom dezvolta acest subiect cu privire la influența genului, vârstei și severității bolii.

Din datele obținute este relevant că circa 13.3% dintre femeile infectate au raportat prezența acestei infecții și la copii. Mai mult, circa 11.3% dintre femeile au raportat infectarea a mai mult de 1 copil dintre membrii familiei. Pe când bărbații infectați au fost mai frecvent diagnosticați în stadiile tardive de boală sau în boala avansată.



Pentru a înțelege mai bine istoria naturală a bolii hepatice virale delta în Moldova, am analizat comparativ reperele infecției în diferite medii.

Dintre cei 300 de pacienți cu HDV înrolați în studiul nostru s-au identificat 19 familii cu membrii familiei infectați cu HDV. Astfel, dintre aceste familii în 12 familii au fost depistați pozitivi cu HDV părinții (unul sau ambii) și toți copii (2 familii cu câte 1 copil, 4 familii cu 3 copii, și 6 familii cu mai mult de 3 copii). În 7 familii au fost depistați pozitivi doar copii (frații). Mai mult, menționăm că în cazul determinării familiilor infectate cu VHD, practic 73% dintre copii au fost depistați cu HDV doar la vârsta de adult și deja în stadii tardive, adică cu fibroză avansată.

Am observat că în cazul infecției duble (AgHBs+/antiHDV +), vârsta stabilirii diagnosticului hepatitei delta a fost în mediu 38,7 +/- 12,8 ani. Iar diagnosticul de infecție cu VHB a fost stabilit cu 10 ani anterior HDV, astfel, vârsta medie fiind 25,8 +/- 14,9 ani.

La repartizarea pe criteriul de vârstă (conform OMS, 2018) infecția cronică virală delta a fost stabilită la 54 persoane din categoria de adult tânăr (vârsta 20-29 ani), 88 persoane – adult matur (30-39 ani), 98 persoane adulți (40-49 ani), și 51 persoane din categoria de vârstă 50-59 ani, 21 persoane – vârsta 60-65 ani și la 6 persoane cu vârsta peste 65 de ani.

Practic toți pacienții înrolați în studiu suportau condiția de suprainfecție cu VHD, pe fondal de un hepatic cronic cu VHB. Indirect aceasta ne sugerează că infecția cu VHB a fost achiziționată în copilăria precoce, cunoscând că evoluția hepatitei B în copilărie se soldează cronicizând la majoritatea copiilor. Iar, suprainfecția cu VHD are loc numai în condițiile unei hepatite cronice VHB. Astfel, ne dăm seama că acești pacienți au fost peduți din urmărire cel puțin 20 ani, ceea ce a influențat la evoluția acestei boli, totodată prezentând riscul de achiziționare a infecției delta. Vârsta la diagnosticul infecției cu delta a fost similară atât la grupul de ciroză hepatică, cât și la grupul de hepatită cronică. Ambele infecții B și Delta au fost descoperite simultan în 31,7% de cazuri. Acest fapt, nuantează despre omiterea acestor pacienți din urmărire pe un termen îndelungat, mai mult de 10 ani și despre acest fenomen ne indică și faptul că diagnosticul primar al pacienților cu infecție cronică virală B/D a fost stabilit în stadiul de ciroză hepatică la circa 56.1 %.

Distribuția în funcție de origine identifică că practic 52% dintre pacienții care au fost înrolați în studiu erau din zona centrală a țării (municipiul Chișinău, Orhei), alții circa 29% (adică fiecare al 3-lea pacient era din zona de sud a țării (în special, Cahul, Cantemir, Comrat), și 18 % proveneau din zona de Nord (Bălți, Florești, Fălești, Sîngerei și altele).

Fenomenul respectiv ne vorbește, că totuși pacienții originari din centrul țării (în mare parte municipiul Chișinău) au accesibilitate mai largă către asistența medicală specializată (această zonă fiind acoperită 100% cu specialiști gastroenterologi și hepatologi).

Pe de altă parte pacienții din sudul țării sunt mai frecvent diagnosticați cu hepatopatia cronică virală Delta, mai ales în zonele: Cahul, Comrat, Cimișlia, Basarabeasca, Ciadâr-Lunga, și sunt mai tineri  $46.2 \pm 9.1$  ani vs cei de la nordul țării.

În acest context se separă un grup de pacienți cu hepatopatie cronică virală delta proveniți din sudul țării, tineri, predominant bărbați. Această ipoteză este analizată ulterior.

Implementarea măsurilor de prevenire este esențială pentru combaterea circulației endemice a virusurilor hepatitice în Republica Moldova. Prin urmare, am încercat să înțelegem particularitățile acestor boli în țară în funcție de modelele de transmitere. Așa că dacă să analizăm factorii de risc pentru achiziția infecției virale Delta, vom observa că predomină calea de transmisie intra-familială.

Astfel, am observat că în ambele loturi de pacienți cu hepatopatie delta (lotul cu hepatita cronică și lotul cu ciroză hepatică) predomină transmiterea intrafamilială a infecției VHD.

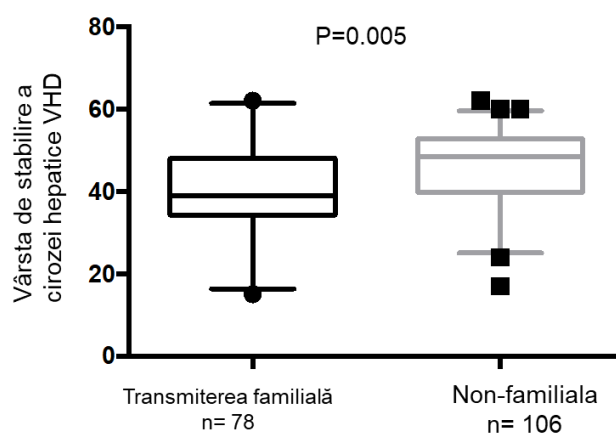
Analiza modului de achiziție a infecției virale delta, remarcă următoarea arhitectură în transmiterea HDV la pacienții originari din întreaga țară:

- calea parenterală (au fost invocate în anamneză transfuziile, administrarea intravenoasă medicamentoasă, intervenții chirurgicale, stomatologice și ginecologice (mai ales menționate până în perioada anilor 80-90) a fost identificată la 17.3% în grupul pacienților cu ciroză hepatică virală delta versus 8.6% la pacienții cu hepatită cronică virală delta ( $p < 0.05$ ),
- calea de transmisie sexuală (au fost menționate relații sexuale neprotejate cu parteneri multipli, sau cu parteneri cunoscuți cu AgHBs) a fost remarcată la 3.0% dintre pacienții cu ciroză hepatică VHD vs 6.6% pacienții cu hepatită cronică VHD ( $p < 0.05$ ),
- prezența tattoo-piersing (calea percutanată) a fost în același procent indentificat la ambele grupe,
- iar, modul intra-familial (prezența infecției VHD la mai mulți membri din familie, posibil cu implicarea contactului strâns dintre membri, prin utilizarea acelorași unelte de igienă personală (lame de ras, periute de dinți, cercei și altele) de achiziție a infecției delta s-a remarcat prin predominarea în ambele grupe, dar semnificativ a fost evidențiat în grupul cu ciroză hepatică HDV 40.3% vs hepatită cronică HDV 36.0% ( $p = 0.001$ ).

Fenomenul respectiv identifică că modul intra-familial de achiziție a fost remarcat mai frecvent în copilărie, iar durata și vechimea persistenței acestei infecții a contribuit la dezvoltarea de fibroză hepatică și ciroză la adulții tineri.

Ulterior, am decis să examinăm mai detaliat cei 78 de pacienți cu transmitere intra-familială a bolii și să-i comparăm cu cei (n = 106 p) fără cazuri familiale de infecție cronică (au fost excluși din această analiză pacienții cu factor aparent necunoscut de achiziție).

Transmiterea intra-familială a fost marcată de descoperiri semnificative la diferite etape ale bolii (vârsta de depistare a AgHBs, vârsta de diagnostic a hepatitei delta, momentul stabilirii diagnosticului de ciroză hepatică), în special la pacienții cu ciroză hepatică, dar nu și la pacienții care nu au progresat în timp. Aceste observații implică faptul că un subgrupa de pacienți diagnosticați cu hepatopatie delta expuși la transmiterea intra-familială riscă să fie afectați de o formă precoce și severă a bolii hepatice, probabil, în concordanță cu prezența susceptibilității genetice (?), sau cu factorii de mediu (?) sau asocierea ambilor factori.



**Figura 3.1. Modul de transmitere a infecției VHD raportat la vechimea bolii**

*Rezultatele obținute au elucidat și alte aspecte:*

- ✓ Am observat că transmiterea intra-familială a fost mai frecvent întâlnite la pacienții care provin din sudul Moldovei vs pacienții din alte regiuni non-sudice (39,2% față de 17,7%, OR = 2,9, IC 95% = 1,7-6,0, P = 0,0010).
- ✓ În plus, detectarea ARN HDV (pozitiv) a fost mai frecvent la pacienții cu familii contaminate decât la ceilalți pacienți non-intrafamiliali (98,7% față de 89,2%, P = 0,0094).

Ne-am întrebat ulterior dacă unele caracteristici ar putea diferenția pacienți cu hepatopatie cronică virală delta din sudul Moldovei de ceilalți pacienți (din alte regiuni ale țării).

Analiza rezultatelor obținute a evidențiat unele aspecte în aceste grupe de pacienți, diferiți ca origine:

- ✓ A fost evident că mediana vârstei mai tinere (<48 ani), și o suspiciune de transmitere intrafamilială datorată prezenței unui membru al familiei contaminat a fost mult mai semnificativă, decât mediana vârstei mai mari (59,3% vs. 26,7%, OR = 3,1, CI 95% = 1,6-5,9, P = 1,5E-04).
- ✓ Vârsta medie a pacienților suspectați pentru a fi contaminați în cadrul familiei a fost semnificativ mai mică decât vârsta altor pacienți ( $46,0 \pm 9,1$  y vs  $50,6 \pm 9,2$  y, 2,1 E-04).
- ✓ Același lucru a fost valabil și pentru vârsta când s-a diagnosticat ciroza hepatică, care a fost mult mai mică la pacienți (adică pacienții mult mai tineri) cu mod de transmisie intrafamilial ( $40,8 \pm 11,2$  vs  $46,9 \pm 9,7$ , P = 0,005).
- ✓ Am observat că pacienții din această regiune (de sud) au fost, de asemenea, mai frecvent pozitivi pentru ADN-ul VHB seric (42,1% față de 22,2%, OR = 2,5, CI 95%: 1,3-5,0, P = 0,004).

Atunci când stratificăm subgrupele de pacienți cu contaminare intra-familială în funcție de membrul familiei identificat la originea bolii (părinți sau frați), au fost evidente variații ale modelelor de transmitere.

- ✓ Astfel, modelul de transmisie HDV între frați (frate sau soră) a fost mult mai răspândit în sudul Moldovei (64,2% față de 20,0%, OR = 4,6, CI 95% = 2,0-10,7, P = 6,2E-05). Această observație sugerează că condițiile de trai în familie și nu numai circumstanțele de naștere a copiilor sunt propice pentru transmiterea virusului delta în această parte a țării.
- ✓ În plus, dacă un frate era transmitătorul virusului putativ, pacienții contaminați erau mai des bărbați (64,0% față de 44,1%, OR = 2,3, CI 95% = 1,05-5,3, P = 0,028).
- ✓ În cazul transmiterii hepatitei între frați, se identifică o distanță de timp mai îndelungată până la diagnosticul hepatitei delta ( $12,8 \pm 8,4$ y vs  $9,9 \pm 6,8$ y, P = 0,027), în timp ce încărcătura virală ARN VHD a fost mai scăzută ( $4,9 \pm 1,5$  log<sub>10</sub>IU / ml față de  $5,7 \pm 1,6$  log<sub>10</sub>IU / ml, P = 0,026).

Aceste observații implică faptul că pacienții expuși la transmisie intrafamilială sunt mai susceptibili riscului de a dezvolta complicații evolutive ale hepatopatiei delta datorită posibil, unei expuneri intrinseci mai lungi la către acesată infecție.

Rezultatele obținute sunt foarte interesante din punct de vedere epidemiologic, dar și pentru evaluare de prognostic.

Cercetarea respectivă a pus în evidență un nou profil de pacient hepatic caracteristic țării noastre. Astfel, am identificat *profilul sudic al pacientului cu HDV* care se deosebește de un alt *profil non-sudic*.

*Profilul sudic are câteva caracteristici clinico-epidemiologice:*

- Este un pacient tânăr, bărbat, provenit din sudul țării, cu infecție HDV achiziționată intra-familial, mai frecvent de la frați, diagnosticați în perioade de adult tânăr cu boală hepatică avansată.

*Profilul nonsudic al pacientului cu HDV se comportă diferit:*

- Este o persoană de vârstă medie, prezintă același raport femei:bărbați, provine din centrul și nordul țării, achiziționând infecția mai frecvent prin tattoo sau calea parenterală (non-familială), cu viremie ADN VHB redusă și ARN VHD mai scăzută, iar ciroza hepatică fiind stabilă la o vârstă mai înaintată.

De fapt, majoritatea studiilor din țara noastră, care examinează infecțiile cronice virale B, C și Delta au fost efectuate în categorii de populații selectate, inclusiv deținuți, pacienți supuși hemodializei, consumatori de droguri intravenoase și, în special, pacienți co-infecțați cu HIV. Dar, fiind constrânși de datele sero-epidemiologice, formele clinice ale HBV, HCV, HDV nu pot fi evaluate pe deplin. Și mai puține studii s-au referit la contextul demografic al infecției cu VHB/VHD la persoanele care trăiesc în anumite regiuni (adică, studii regionale). În acest substudiu noi am avut ca și scop determinarea caracteristicilor demografice și epidemiologice ale unei cohorte de pacienți cu VHD originari din zone diferite ale țării (sud, nord și centru). Rezultatele prezentate mai sus foarte interesante din aspectul demografic. Astfel, am notat că trebuie de considerat două tipuri de profiluri hepatice al pacientului cu VHD, atitudine medicală binevenită pentru optimizarea strategiilor de screening a infecțiilor hepatice intrafamiliale.

### 3.2. Stabilirea profilului virusologic al pacienților cu hepatopatie cronică virală delta și identificarea relațiilor clinico-virusologice

Obiectivul acestei analize a fost și identificarea interrelațiilor clinico-virusologice în evoluția bolii hepatice induse de infecția cu VHD. Iar, odată identificate, vor fi considerate în strategiile de monitorizare și supraveghere ale pacienților cu HDV.

Ca urmare a studierii minuțioase a pacienților incluși în cercetare au fost identificate câteva aspecte demografice:

- Pacienții au fost diagnosticați pentru infecția cronică virală delta la 10 ani după diagnosticarea hepatitei B (prin identificarea AgHBs pozitiv), ( $38,6 \pm 12,6$  ani față de  $28,8 \pm 13,8$  ani).
- Toți pacienții au fost pozitivi pentru AgHBs și negativi pentru AgHBe (100% dintre pacienți au fost anti-HBe pozitiv).
- ADN VHB a fost detectabil în 28,1% din cazuri (încărcătura medie a fost de ADN VHB =  $3,2 \pm 1,4 \log_{10}$  UI / ml),
- în timp ce ARN-ul VHD pozitiv a fost detectat la 92,8% dintre pacienți. Încărcătura virală medie a ARN-ului VHD a fost de  $5,6 \pm 1,7 \log_{10}$  UI / ml (n = 143).

**Tabel 3.1. Caracteristicile virusologice ale pacienților cu HDV**

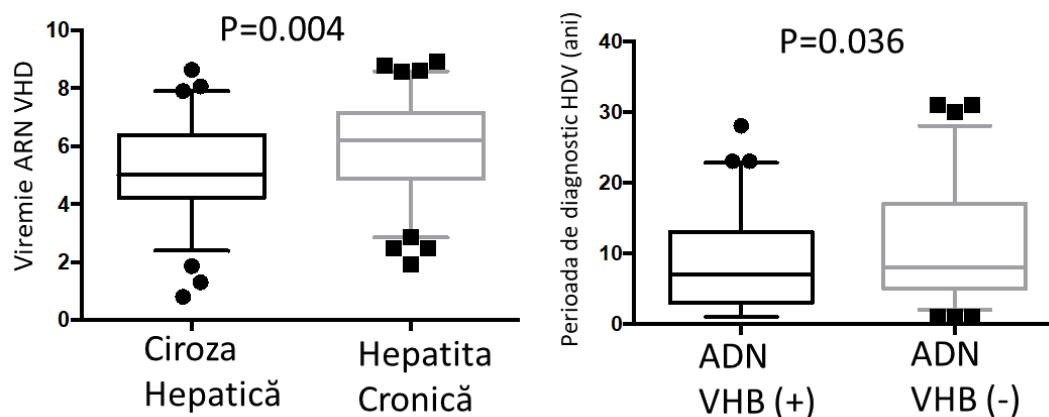
Parametrii virusologici	AgHBs+/antiVHD +
AgHBe(+)/anti-HBe (%)	0.0/100.0
HBV ADN (+) (%)	28.1
ADN VHB (Log10 IU/mL, mean±SD)	3.2±1.4
ARN VHD(+) (%)	92.8
ARN VHD (Log10 IU/mL, mean±SD)	5.6±1.7

Așa cum era de așteptat, parametrii virusologici au prezentat o utilitate limitată pentru a înțelege cursul bolii. S-a evidențiat și faptul că pe durata progresiei bolii ARN-ul VHD tinde să dispară sau să scadă la pacienții incluși în studiu. Și totuși, s-au delimitat câteva aspecte cu privire la interrelațiile dintre severitatea procesului hepatic și viremia ARN VHD (identificată prin rtPCR).

Caracteristicile virusologice evidențiate la cele două grupe de pacienți sunt:

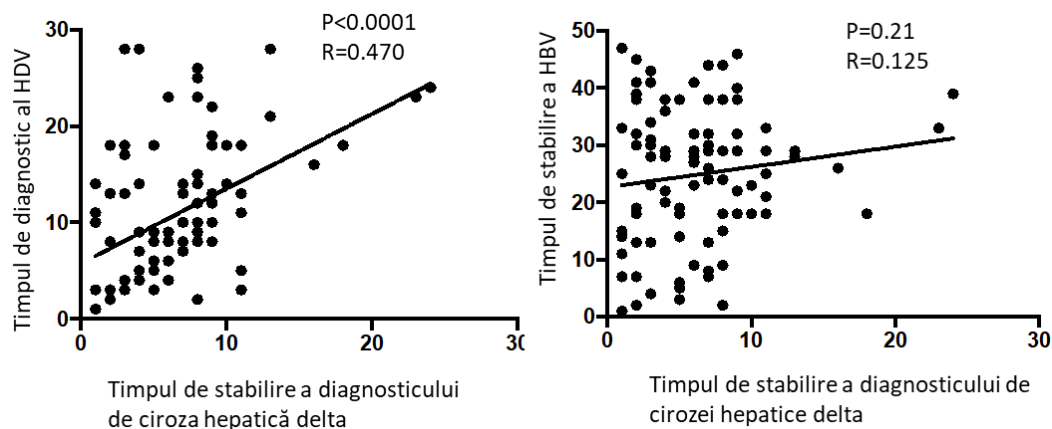
- Pacienții cu ciroză hepatică au prezentat, în mod semnificativ mai puține cazuri de ARN VHD pozitiv decât cei non-cirofici (88,6 vs 99,0%, OR = 12,3, CI = 1,5-95,6, P = 0,002),
- Iar pacienții cirofici cu ARN VHD pozitiv au avut o încărcătură virală mai redusă decât pacienții non-cirofici ( $5,2 \pm 0,18$  vs  $5,9 \pm 0,18$  Log10 UI / ml, P = 0,004).
- De asemenea, am observat că distanța de timp separată de diagnosticul de hepatită Delta a fost mai mică la pacienții cu ADN VHB pozitiv, decât la cei cu ADN HBV negativ ( $8,8 \pm 6,9$  ani vs  $11,1 \pm 7,5$  ani, P = 0,036).
- În cele din urmă, am observat că distanța de timp pentru diagnosticul cirozei hepatice a fost corelată cu durata infecției cronice virale delta (P <0,0001), dar nu și cu durata hepatitei cronice virale B (P = 0,21, ns), subliniind rolul ofensiv produs de VHD în evoluția hepatopatiei cronice.

Astfel, am notat că în timpul progresiei bolii qARN HDV tinde să dispară sau să scadă la pacienții cu hepatopatie cronică delta. Deci, pacienții cu ciroză hepatică au înregistrat qARN HDV pozitiv, semnificativ mai redus decât cei non-cirofici. Totodată la pacienții cirofici încărcăturile virale qARN HDV au fost mai mică decât în la cei non-cirofici (P = 0,004).



**Figura 3.2. Interrelația dintre qARN VHD și qADN VHB în funcție de vechimea bolii și severitatea procesului hepatic**

În cele din urmă, am observat că distanța de timp de la diagnosticul de ciroză hepatică a corelat cu durata hepatitei delta (P <0,0001), dar nu și cu durata hepatitei virale B (P = 0,21, ns), subliniind rolul nociv jucat de virusul hepatitic Delta în evoluția bolii hepatice cronice ale pacienților din Moldova.



**Figura 3.3. Timpul de diagnostic al HDV raportat la severitatea procesului hepatic**

Principala constatare a cercetării virusologice în acest compartiment al tezei a fost că semnificația clinică a viremiei VHD este diferită la pacienții cu hepatită cronică spre deosebire de cei cu ciroză stabilită. Într-adevăr, analiza univariată a arătat că nivelul viremiei VHD a fost un parametru virusologic legat de progresia către ciroză la pacienții care nu erau cirofici la momentul prezentare clinică. Având în vedere binecunoscutul efect inhibitor al VHD asupra replicării VHB [21, 22], nu este surprinzător faptul că majoritatea particulelor virale infecțioase circulante conțin ARN HDV în loc de ADN VHB. Într-un studiu asupra pacienților cu infecție cu VHB singur, al cărui design a fost similar cu cel al nostru, Iloeje și colab (REVEAL-HBV, 2006) a găsit o strânsă corelație între progresia către ciroză și nivelul virusului circulant măsurat în momentul primei observații clinice, după excluderea factorilor importanți de comorbiditate precum vârsta, sexul, fumatul și abuzul de alcool.

Un al doilea obiectiv în această cercetare este să analizăm profilul clinic al pacientului cu hepatopatie cronică virală delta. Totodată, am evaluat dinamica caracteristicilor clinice al pacienților încadrați în studiu. În cercetarea noastră este vizibilă o predominare a pacientului simptomatic, și în special care se prezintă practic chiar de la etapa de înrolare cu hepatomegalie și splenomegalie. Iar, fiecare al 4-lea pacient prezintă ascită (21.7%), și fiecare al 5-lea se prezintă la prima adresare deja cu encefalopatie hepatică (14.6%) și varice esofagiene (14.6%).

Analiza comparativă a acestor pacienți, pe durata vizitelor repetate, notează următoarele caracteristici evolutive: asimptomaticii se reduc în pondere, și progresează simptomele de decompensare hepatică: ascita (21.7% vs 27.6% vs 31.3%); hepatomegalia (93% vs 100%), varicele esofagiene (14.6% vs 17.3% vs 22.4%), encefalopatia hepatică (14.6% vs 15.2% vs 19.3%). Iar numărul pacienților cu hemoragia digestivă superioară sporește în timp, la vizita de înrolare



detectându-se 9.6% dintre pacienții cu semne de hemoragie digestivă superioară, iar la vizita terțiara (efectuată în mediu la 1 an de la prima vizită ) această manifestare s-a înregistrat la 13.6% dintre pacienții cu hepatită cronică virală delta.

Sumarizând particularitățile clinico-evolutive analizate la pacienții incluși în cercetare se conturează două profiluri evolutive: profilul non-progresiv de hepatopatie cronică virală delta și profilul progresiv de hepatopatie cronică virală delta. Astfel, prezentarea clinică a bolii, precum și parametrii biochimici ale pacienților cu hepatopatie cronică virală Delta au fost radical diferite în funcție de stadiile bolii, precum și în funcții de profilul pacientului.

După cum se observă din tabelul și diagrama atașată, simptomatologia clinică a fost diferită începând cu prima prezentare a pacientului (de la asimptomatic și până la ciroză hepatică decompensată, exprimată prin ascită, hemoragie digestivă superioară, encefalopatie hepatică)

Prezentarea clinică variată a pacienților cu HDV a fost analizată și în corelare cu statusul virusologic al acestor pacienți și timpul de diagnosticare a bolii (în stadiul de hepatită sau ciroză hepatică).

S-a remarcat faptul, că perioada de timp care separă diagnosticarea hepatitei Delta și stabilirea cirozei hepatice au corelat strâns ( $p < 0.0001$ ,  $R=0.470$ ). O perioadă destul de scurtă de circa 5 ani a fost separarea diagnosticului de hepatită delta și debutul cirozei hepatice.

Totodată se observă că ARN VHD pozitiv nu pare să influențeze evoluția progresivă a bolii, astfel pacienții cu ciroză hepatică au prezentat în mai puține cazuri ARN VHD pozitiv vs cei cu hepatită cronică (88.8% vs 99%,  $p=0.004$ ).

Pacienții cu hepatopatie cronică delta au fost identificați și anatomic diferiți, în funcție de stadiul bolii: astfel pacienții cu ciroză delta au prezentat mai frecvent un ficat mai mic și splenomegalie vs pacienții cu hepatita cronică ( $p < 0.05$ ).

În cazul hepatitei cronice Delta, clinicienii se confruntă cu o deficiență de markeri clinici și biologici, indicatori ai evoluției bolii spre ciroza hepatică. Din acest motiv, ne interesează căutarea corelațiilor dintre setările clinice și markerii biologici aplicabili contextului moldovenesc al bolii.

Am comparat sistematic pacienții infectați cu VHD cu ciroză hepatică cu acei subiecți care nu au progresat încă, îndreptându-ne spre următoarea ipoteza de cercetare.

### 3.3. Determinarea tabloului biologic caracteristic pacienților cu hepatopatie cronică virală delta în relație cu profilul clinic.

În cercetarea respectivă am urmărit identificarea unor variabile cu rol de progresie pentru hepatopatia cronică virală delta. Am divizat pacienții cu hepatopatie cronică delta în două loturi:

1. Lotul cu pacienții HDV non-progresivi (hepatita cronică/ ciroză hepatică compensată) și
2. Lotul pacienților progresivi (ciroză hepatică decompensată).

Monitorizarea profilului biologic în ambele loturi de pacienți a permis să identificăm un set de nouă parametri (*hemoglobină, leucocite, trombocite, albumină, INR, ALT, GGT, bilirubină totală și colinesterază*) care s-a prezentat diferit semnificativ între pacienții infectați cu hepatopatie cronică virală delta din primul și al doilea lot.

Cei mai importanți factori (puterea de discriminare reprezentată prin:  $<1,0E-06$ ) au fost hemoglobina ( $122 \pm 15g / L$  față de  $133 \pm 16g / L$ ,  $1,7E-07$ ), număr de trombocite ( $111 \pm 65G / L$  vs  $159 \pm 47G / L$ ,  $5,3E-09$ ), valoarea de albumină ( $31,8 \pm 6,9g / L$  față de  $37,4 \pm 3,9g / L$ ,  $3,3E-11$ ) și INR (INR,  $1,41 \pm 0,25$  față de  $1,18 \pm 0,16$ ,  $1,5E-11$ ).

Este vizibilă semnificația câtorva teste biochimice, care ar putea fi luate în considerare în evaluarea pacienților cu hepatopatie cronică virală delta. Nivelul sporit al ALT, AST s-a identificat la toți pacienții cu infecție cronică virală delta, încadrați în cercetare. Nivelul seric al enzimelor hepatice, precum aminotransaminazele serice (ALT, AST), care sunt determinate deseori în practica clinică, și sunt marcheri ai necroinflamatiei hepatice. Aminotransaminazele serice se prezintă în valori sporite iar, în comun cu nivelul ADN VHB detectabil se impun ca un criteriu eligibil pentru inițierea tratamentului antiviral (cu interferon sau cu analogi nucleozidici). Reușita terapiei antivirale anti-VHB este evidențiată prin normalizarea biochimică, care se refera în special la normalizarea aminotransaminazelor serice. Pe când la pacienții care suporta eșec la tratamentul antiviral se mențin nivele persistent înalte de aminotransaminaze. Astfel, aminotransaminazele sunt și parametri biochimici ai eficienței terapiei antivirale atât pentru infecția VHB cât și pentru infecția cu VHD (sub tratamentul cu interferon). Pe de altă parte la o grupă de pacienți cu fibroză hepatică semnificativă (în special, la cei cu ciroză hepatică), valorile ALT, AST pot fi normale datorită unei capacități reduse ale hepatocitelor de sinteză enzimatică hepatică. Așa că bolnavii cu boală hepatică cronică virală B cu sau fără Delta (inclusiv și provocată de virusul C) progresivă prezintă nivele serice sporite, dar și cei cu aminotransaminaze normale pot prezenta leziuni hepatice severe. În general, ALT este distribuit în

citoplasma celulelor hepatice, iar AST este distribuit în mitocondria celulelor hepatice. În stadiile incipiente ale hepatopatiei cronice virale B, nivelul ALT seric crește mai mult decât nivelul AST seric, dar, în stadiul de ciroză hepatică, afectarea celulelor hepatice este mult mai gravă și mitocondriile suportă, de asemenea, distrugere severă, prin urmare, nivelurile serice ale AST cresc mai mult decât ALT. Nivelul bilirubinei totale serice este un indice important pentru a evalua gradul de deteriorare a celulelor hepatice. Toate cele menționate indirect ne vorbesc despre faptul că ameliorarea leziunilor hepatice ar putea scădea semnificativ cursul clinic al hepatopatiei cronice virale B cu sau fără antigen delta, astfel se va reduce dezvoltarea cirozei hepatice. Nivelul colinesterazei serice a fost diferit în grupul pacienților cu hepatită/ciroză compensată versus pacienții cu ciroză hepatică decompensată. Colinestara serică (sau pseudocolinesteraza), se prezintă ca o esterază nespecifică sintetizată în celula hepatică (în ribosomi). Persistența valorii serice reduse a acestei enzime indică cronicizarea. În leziunea hepatică severă și ciroza hepatică se atestă scăderea acestei enzime, reflectând deficiența de sinteză și nutriției hepatocitară. Uneori, valoarea redusă de colinestază serică poate contrasta cu valoarea normală de aminotransferază (în special, în ciroza hepatică subcompensată sau decompensată, coma hepatică), datorită unui complex enzimatic intrahepatocitar deficient precum și deficienței capacității de sinteză a aminotransaminazelor. Valoarea gama-glutamyl-transpeptidaza, o enzimă microsomală, care sporește de obicei în afecțiunile hepatice, dar mai poate prezenta un nivel sporit și în alterările altor organe, cum ar fi: boli pancreatice, afecțiuni cardiace, abuz de alcool, diabet zaharat. Sporirea izolată a activității gama-glutamyl-transpeptidaza poate fi observată în abuzul de alcool, chiar în absența leziunii hepatice, astfel determinarea acestei enzime serice poate fi utilă în identificarea persoanelor alcoolice (totuși la 1/3 dintre acestea valoarea poate fi în limitele referințelor). În fibroza hepatică extinsă și ciroza hepatică activitatea gama-glutamyl-transpeptidaza este sporită, dar de obicei se asociază cu și cu alte anomalități biochimice. Nivelul indicilor care reflectă funcția de sinteză hepatică, albumina și INR. Totodată, la pacienții evaluați au fost identificate și valori particulare ale nivelului seric de albumină și INR. Albumina serică este o proteină plasmatică produsă de hepatocit (sintetizată în reticulul endoplasmatic), iar scăderea acesteia reflectă, reducerea funcției hepatice. Scăderea concentrației albuminei se face lent, timpul de înjumătățire fiind de aproximativ 22 de zile. În hepatita cronică și ciroza hepatică hipoalbuminemia este prezentă și corespunde severității leziunii hepatice, fiind un indicator de prognostic. Iar, valoarea normală a albuminei care se menține pe un context clinic sever poate fi consecința regenerării hepatocelulare eficiente. Un alt parametru, dintre cei nouă indici care s-au comportat definitiv la pacienții

examinați, este INR (International Normalized Ratio), se prezintă ca un sistem de exprimare al Timpului de protrombină (Quick) bazat pe calibrarea tromboplastinei prin referire la un standard internațional. Indexul de calibrare se numește ISI (international sensitivity index). Astfel, INR este raportul timpului de protrombină Quick al bolnavului la timpul de protrombină Quick martor ridicat la puterea ISI. Valori normale sunt între 0.9-1.2.

O altă dimensiune a cercetării noastre a fost analiza profilului imunologic al pacienților incluși. Studiul nostru a fost și o parte componentă a proiectului instituțional *“Studiul particularitatilor epidemiologice, clinico- imunologice si molecular-genetice ale maladiilor imunodeficitare primare si secundare (pe model de hepatita cronica virala delta) cu elaborarea procedeeleor inedite pentru imunoreabilitare, inclusiv remedii autohtone”* codul 15.817.04.06f. În acest proiect noi am cercetat particularitățile imunității umorale și celulare la pacienții cu hepatită cronică virală Delta, în funcție de activitatea virală și paternul fibrotic. Analiza imunității celulare a fost efectuată prin flow-citometrie (BDFACF Via Dikenson, SUA), în cadrul laboratorului de Alergologie și Imunologie Clinică (director de proiect prof. Lucia Andrieș). Analiza imună a inclus și aprecierea interleuchinelor IL10, IL6 și TNF alfa, precum și autoanticorpii ANA, antiDNA, antiLKM1. Datele obținute în cadrul acestui proiect instituțional au fost publicate și aprobate la mai multe forumuri naționale și internaționale.

Pentru evaluarea particularităților imunologice, noi am analizat două subgrupe de pacienți: subgrupul pacienților cu ADN VHB poz/ ARN VHB poz și ADN VHB neg/ ARN VHD poz.

Astfel, analiza imunității umorale prin determinarea nivelului imunoglobulinelor serice: IgA, IgG, IgM, IgE; unele tipuri de citochine: IL2, IL10, IFN gama, TNF alfa.și celulare prin aprecierea nivelului CD3, CD4, CD8, CD16 la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta, în funcție de gradul de severitate al procesului hepatic, precum și în relație de activitatea virusologică VHB sau VHD au remarcat următoarele:

- Studiul nivelului de citokine a evidențiat creșterea valorii TNF-alfa la pacienții cu ARN HDV + / ADN HBV + față de cei din grupul pacienților cu ARNHDV+/ADNHBV- (p <0.05).
- Nivelul TNF-alfa crește la pacienții cu boală hepatică cronică indusă de reactivarea VHD și VHB. Nivelul acestor citokine a fost crescut și la pacienții cu ARN HDV + / ADN HBV + după tratamentul fără răspuns virusologic față de ARNHDV + / ADNHBV - pacienți care nu au fost tratați (p <0.036).

- Sporirea valorilor interleuchinei IL10 a fost evidențiată la pacienții ARN HDV + / AND HBV neg după terapia antivirală față de pacienții din grupul II ( $p < 0.048$ ).
- Valoarea redusă a IL 10 a fost remarcată la pacienții cu activitate crescută de ALT față de cei cu valoarea ALT în limite normale ( $p < 0.05$ ), tot o valoare redusă a IL10 a fost identificată la pacienții din grupul II cu gradul avansat de fibroză F3-F4 ( $p < 0.05$ ). Deci poate fi folosit pentru a evalua activitatea bolii. Scăderea relevantă a fost notată în valoarea IFN-gamma la pacienții cu ARNHDV + / ADNHBV - față de cei din grupul II ( $p < 0.05$ ),
- de asemenea, s-a identificat că pacienții după terapia antivirală cu PegIFN (care au obținut răspuns virusologic) au avut IFN- concentrații  $\gamma$  ( $88,2 \pm 15,3$  pg / ml) decât pacienții care nu răspund ( $162,8 \pm 19,3$ ).

Monitorizarea nivelurilor IFN-y poate ajuta clinicienii să identifice în continuare pacienții cu risc ridicat care pot eșua terapia cu PegIFN și să permită adoptarea strategiilor adecvate pentru un medicament mai personalizat.

Concluzionând cele relatate am observat rolul interleuchinelor IL2 și IL 10 în răspunsul virusologic obținut prin intrferonoterapie, precum și raportul CD4/CD8 corelând cu gradul de fibroză hepatică, ceea ce ne-a determinat prelungirea acestei cercetări, pentru identificarea unor biomarkeri imuni cu rol predictiv în evoluția terapeutică sau postterapeutică a hepatopatiei cronice virale delta.

Pacienții cu hepatita cronică virală delta din țara noastră, sunt în mare parte tineri, clinic prezentând trombocitopenie și splenomegalie, iar imunologic evidențiindu-se o imunodereglație de tip imunostimulare, având în vedere nivelele sporite de IgG și IgE; pentru o doime dintre pacienții cercetați s-a determinat sporirea numerică a limfocitelor CD3 și CD4 (evaluate în sângele periferic); confirmând tipul de hiperstimulare imună în hepatita delta.

Urmare cercetării noastre cu privire la influențele imunologice în evoluția hepatitei cronice virale delta au fost determinate unele interrelații dintre nivelul viremiei VHD și valorile serice la imunoglobulinelor.

- A fost înregistrată o corelație pozitivă dintre nivelul viremiei ARN VHD și valoarea CD4, CD8 și IgE; situație ce sugerează implicarea imunității celulare în activitatea virusologică.
- Sporirea valorii IL-10 la pacienții cu viremia ARN VHD negativă obținută post-interferonoterapie, totodată valoarea micșorată a IL-10 s-a detectat la pacienții cu hepatopatie

delta și fibroză avansată, sau cu aminotransferase sporite. Influența acestei interleuchine inflamatorii în evoluția infecției virale delta sugerează rolul său în persistența virală sau răspunsul virusologic postterapeutic, de altfel concluzionăm că titrarea acelei interleuchine, posibil ar fi ca un punct de reper în selectarea corectă a pacienților pentru terapia antivirală.

- Deasemenea a fost evidențiată și o interrelație dintre TNF-alfa (citochină proinflamatorie), detectându-se într-o concentrație sporită la pacienții care nu au răspuns la terapia antivirală cu interferon.

Și, totuși aceste date imunologice au fost neconcludente când am lărgit grupul pacienților cercetați (initial au fost evaluați 50 de pacienți). Deaceea cercetarea acestor indici nu a fost continuată în studiul respectiv. Rezultatele imunologice obținute la analiza pacienților cu hepatită cronică virală delta au fost prezentate în cadrul Forumului de Imunologie național (2019), organizat de către Societatea de Alergologie și Imunologie Clinică din Republica Moldova. Rezultate au fost remarcate prin Diploma Laureat al concursului „Performanțe în cercetare” din cadrul congresului aniversar al USMF N.Testemițanu, 21-23 octombrie 2020.

Dacă sumarizăm rezultatele obținute observăm că pacientul cu hepatopatie cronică virală delta se comportă din punct de vedere biologic în funcție de severitatea procesului hepatic. Iar, cei nouă parametri biologici evidențiați pot fi utilizați la orice etapă de asistență medicală, începând cu medicul de familie și finalizând cu medicina specializată. Identificarea acestor parametri va crea tabloul definitiv de stratificare a pacientului cu infecție cronică virală delta în pacientul compensat și pacientul decompensat.

Având în vedere importanța și semnificația utilizării acestor teste în monitorizare de durată a pacienților cu hepatita cronică virală delta se va recomanda includerea obligatorie ai acestor parametri în protocolul național de management al pacientului cu hepatită cronică și ciroză hepatică virală delta.

Așa dar, un rol aparte în identificarea pacientului decompensat îi revine biomarkerilor non-invazivi de determinarea a fibrozei hepatice. Acest proces a fost analizat ulterior în etapele de cercetare.

### **3.4. Identificarea scorurilor neinvazive de stratificare a pacienților cu hepatopatie cronică virală delta în funcție de severitatea procesului fibrotic**

Un obiectiv al cercetării a fost studierea biomarkerilor neinvazivi de estimare a progresiei bolii hepatice induse de infecția cronică virală delta și identificarea celui mai sensibil biomarker neinvaziv. Astfel, pentru realizarea acestui obiectiv am evaluat indicii neinvazivi de fibroză hepatică și am încercat să identificăm cel mai sensibil marker pentru hepatopatia cronică virală delta.

Evoluția fibrozei hepatice la pacienții cu hepatopatie cronică virală Delta poate fi în relație cu parametrii virusologici și biologici. Astfel, pentru conștientizarea acestor indici am evaluat cohorta de pacienți din două direcții: o direcție a fost evaluarea markerilor neinvazivi ai fibrozei hepatice și identificarea unui scor cel mai sensibil în prognozarea evoluției pentru aceasta categorie de pacienți. Iar altă direcție a fost identificarea unui scor național care ar putea fi utilizat și de pacienți.

În prezent, standardul de aur pentru diagnosticarea gradului de fibroză sau a cirozei este biopsia hepatică. Cu toate acestea, biopsia hepatică a fost și rămâne o tehnică invazivă care poate induce pacientului disconfort fizic sau / și mental, complicații și contraindicații, ceea ce a restricționat utilizarea pe scară largă în practica de rutină. Uneori, erorile de eșantionare pot afecta precizia biopsiei hepatice. Mai mult, discrepanțele intraobservator și interobservator pot induce părtinire în stadializarea fibrozei hepatice, atunci când se analizează același eșantion de biopsie hepatică. Prin urmare, câteva metode alternative neinvazive au fost dezvoltate intens și au îmbunătățit evaluarea stadiului de fibroză hepatică, cum ar fi indicele de fibroză, FIB-4, elastografia tranzitorie sonografică (Fibroscan), indicele raportului aspartat aminotransferază-trombocite (APRI) și altele. Ca metode noninvazive, APRI și FIB-4 au fost recomandate (de către OMS) pentru a determina stadiul de fibroză în țările cu resurse limitate.

În studiul efectuat am testat performanțele diferiților predictorii neinvazivi ai fibrozei hepatice (API, APRI, scorul de discriminare a cirozei, raportul de Ritis, FIB-4, Fibro Q, indexul fibrozei, GPRI, GUCI, scorul King). Elastografia tranzitorie (FibroScan, Echosens, Paris) a fost efectuată la toți pacienții care nu aveau dovezi clinice de ciroză care au refuzat să se supună unei biopsii hepatice. Valoarea cut-off de 11,9 kilopascali (kPa) a fost adoptată pentru a exclude fibroza / ciroza severă.

Rezultatele obținute au relevat mai multe aspecte, care după părerea mea trebuie considerate.

Analiza la nivel anatomic a pacienților din ambele loturi (ciroză hepatică versus hepatită) a înregistrat o diferență semnificativă dintre rigiditatea ficatului ( $23,3 \pm 10,2$  kPa vs  $10,2 \pm 3,8$  kPa, 7,3E-

16) și dimensiunea splinei ( $117 \pm 42\text{cm}^2$  față de  $69 \pm 21\text{cm}^2$ ,  $4,7\text{E}-19$ ). Fenomenul respectiv punctează că chiar și pacientul cu hepatită s-a prezentat primar la consultația specialistului cu un grad de fibroză avansat (10.2 kPa), precum și pacientul cu ciroză care se afla în stadiul F4.2, ceea ce sugerează că pacienții cu delta se prezintă în stadii avansate de boală hepatică.

S-a observat că la pacienții cercetați nivelul de trombocite scădea, iar analiza corelațională dintre numărul de trombocite și gradul de fibroză a evidențiat un coeficient de corelație  $-0,43$  (o corelație slab negativă). Adică, cu cât este mai mare nivelul de trombocite, cu atât este mai mic gradul de fibroză. Această corelație denotă că numărul de trombocite (care a fost scăzut la majoritatea pacienților din studiu) reflectă oarecum gradul de fibroză hepatică, și anume un număr mic de trombocite este mai caracteristic unui grad înalt de fibroză hepatică.

O altă corelație ( $r = -0.49$ ) a fost observată între gradul de fibroză și viremia ARN VHD. Analiza a fost efectuată pe un esantion de 142 pacienți. Această corelație nuanțează gradul de fibroză mai înalt, la un nivel al viremiei ARN VHD mai mic, ceea ce denotă că nivelul viremiei nu trebuie să influențeze decizia terapeutică în stadiile avansate ale bolii hepatice induse de VHD.

Analiza efectuată pe un esantion de 194 pacienți a cuprins evaluarea corelației dintre alfa-fetoproteină și gradul de fibroză. S-a determinat un coeficient de corelație pozitiv  $r = 0.36$  (ne semnificativ), dar care reflectă o tendință pozitivă de corelație directă. Aceasta denotă că valoarea alfa-fetoproteinei sporește odată cu progresia bolii hepatice cronice induse de VHD. Situația respectivă, trebuie de luat în vedere în cazul înregistrării unei valori sporite ne semnificativ la un pacient cu fibroză hepatică severă.

În continuare au fost testate performanțele diferiților predictorii neinvazivi ai fibrozei hepatice (API, APRI, scorul de discriminare a cirozei, raportul de Ritis, FIB-4, Fibro Q, indexul fibrozei, GPRI, GUCI, scorul King). Metodologia evaluării acestor scoruri este descrisă în capitolul Materiale și metode.

**Tabel 3.4. Scorurile clinice de evaluare a fibrozei hepatice în HDV**

Scorurile clinice	Anti-Delta(+)/AgHBs(+)
Scorul King	$62 \pm 80$
Indexul Fibrosis	$3.2 \pm 1.0$
GUCI	$3.1 \pm 3.9$
FibroQ	$9.8 \pm 16.8$
Indicile de Ritis	$1.1 \pm 0.6$
CDS	$6.8 \pm 1.3$
API	$5.9 \pm 1.9$
FIB4	$4.7 \pm 5.1$



APRI	2.1±2.3
GPRI	1.0±1.1
Raportul neutrofilic/limfocitar	0.52±0.14
PNI	25.2±23.2
PLR	86±104

Conform rezultatelor obținute am identificat că o mare majoritate din indicii de evaluare a fibrozei hepatice nu sunt sensibili pentru pacientul cu hepatopatie cronică virală delta. Am continuat investigațiile noastre pentru a descoperi dacă unii dintre acești factori pot fi indicatori ai decompensării bolii hepatice.

Am comparat 52 de pacienți cu semne de decompensare hepatică (ascită, encefalopatie, varice esofagiene) cu 42 de pacienți cu ciroză hepatică, dar fără semne de decompensare hepatică.

În această analiză comparativă au fost remarcate unele particularități: dimensiunea splinei, numărul de trombocite, INR, bilirubina totală și albumină au fost factorii capabili cu un nivel rezonabil de semnificație ( $P < 0.01$ ) pentru a discrimina între ciroza compensată și cea decompensată.

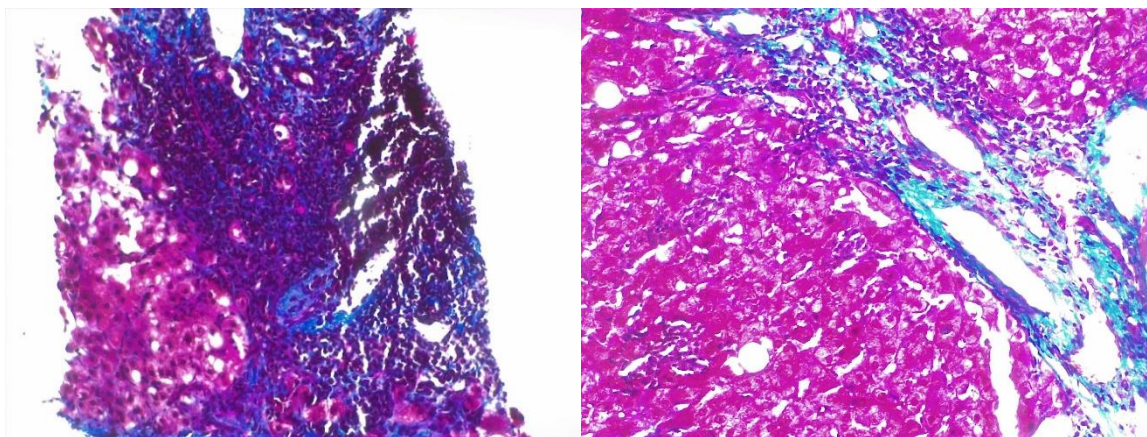
Dintre sistemele de evaluare a fibrozei hepatice neinvazive, în cazul pacienților cu hepatopatie cronică delta, indicele de fibroză (Index Fibrosis) rămâne cel mai performant ( $4,1 \pm 1,0$  față de  $3,1 \pm 0,9$ ,  $P = 9,8E-08$ ). Index Fibrosis a fost și sistemul de notare cu cel mai bun nivel de discriminare între pacienții progresivi (cirotici) și cei non-progresivi ( $3,6 \pm 0,1$  față de  $2,6 \pm 0,1$ ,  $P = 1,5E-13$ ).

Rezultatele obținute în cadrul acestui compartiment sunt ținte spre identificarea unui indice neinvaziv de fibroză hepatică în hepatita delta. Aprecierea fibrozei hepatice este importantă pentru a determina dacă, când și cum să se inițieze terapia antivirală. Gradul de fibroză sau ciroza este un factor independent pentru a prezice mortalitatea la pacienții cu hepatită cronică delta. Datele din literatură demonstrează că rata de mortalitate la un an a scăzut de la 57% la cei cu ciroză severă la 1% la pacienții cu fibroză hepatică în stadiu incipient. Mai mult, aproximativ 10-17% dintre pacienții cu ciroză hepatică vor dezvolta carcinom hepatocelular în 5 ani. Evaluarea precisă precoce a fibrozei hepatice la pacienții cu hepatită cronică virală delta este esențială nu numai pentru rezultatele mai bune asociate cu inițierea precoce a tratamentului antiviral, ci și pentru prezicerea prognosticului clinic pe termen lung.

Pentru a înțelege dacă gradul de fibroză hepatică evaluat prin teste neinvazive corespunde cu cel identificat la examenul histopatologic, am implicat analiza histopatologică a țesutului hepatic extras prin biopsie cu ac gros, care a fost analizat în cadrul Laboratorului histopatologic de pe lângă

Laboratorul Synevo. Această analiza a fost suportată de EASL grant, obținut în 2018 (parte componentă a HDIN proiect).

Astfel, 20 de pacienți cu infecție cronică virală delta au fost supuși biopsiei hepatice, iar fragmentul de țesut hepatic obținut a fost evaluat histopatologic pentru gradul de activitate necroinflamatorie și gradul de fibroză hepatică (gradarea după METAVIR). Toți acești pacienți au fost evaluați și prin alte două metode neinvazive de apreciere a fibrozei hepatice: FibroTest și Fibroscan. Astfel, s-a obținut că gradul de fibroză identificat histopatologic nu a corelat cu gradul de fibroză definit prin Fibrotest, dar a corelat cu cel definit prin Fibroscan.



**Figura 3.6. Examen histopatologic în HDV (caz nr.1)**

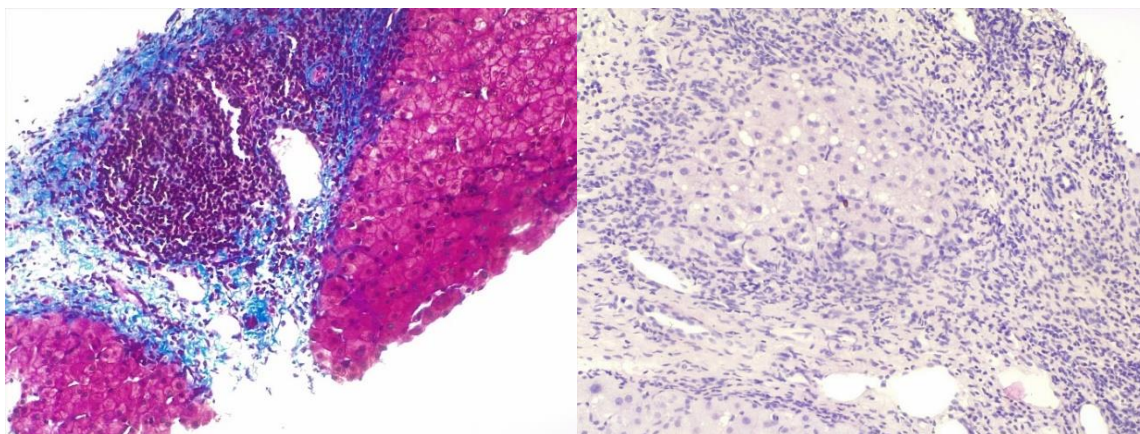
*Notă:* Descrierea cazului clinic. Femeie, 66 ani, cunoscută cu HDV de 20 de ani (TAV cu PegIFN alfa2a, 24 de săptămâni).

Rezultat histopatologic: Hepatită cronică cu activitate necroinflamatorie marcată grad A3 și fibroză portal severă – stadiul F3 (scor 3/4 METAVIR). Steatoză hepatică macro-microveziculară marcată.

Rezultat după Fibrotest 0.71 – ce corespunde gradului de fibroză F3 (fibroză severă)

Rezultat după FibroScan a identificat valoarea de 14.5 kPa – ceea ce corespunde unui grad de fibroză F4. Astfel, pentru pacienta respectivă rezultatele obținute prin diferite metode practice au corespuns în identificarea gradului de fibroză hepatică.

Rezultatele obținute prin diferite metode de evaluare a fibrozei hepatice (invazive și neinvazive) pot fi și diferite ca interpretare. Acest fenomen vine să ne sugereze că o corelare absolută între metodele invazive și neinvazive nu este înregistrată. Mai ales sunt probleme de interrelație în cazul gradului de fibroză redus (F1-F2), așa numita zona-gri de fibroză hepatică. Totodată se observă o stratificare clară cu privire la pacientul cu fibroză hepatică severă și cel cu fibroză minimă.



**Fig. 3.7. Examen histopatologic în HDV (caz nr.2)**

*Notă:* Descrierea cazului clinic. Femeie de 38 de ani, cunoscută cu HDV de 13 ani (TAV cu PegIFN alfa2a, 48 de săptămâni).

Rezultat histopatologic: Hepatită cronică cu activitate necroinflamatorie marcată grad A3 și fibroză portal severă – stadiul F3 (scor 3 METAVIR).

Rezultat conform Fibrotest - 0.33, corespunde gradului de fibroză F1-2 (fibroză moderată)

Rezultatul prin FibroScan a identificat valoarea de 9.8 kPa – ceea ce corespunde unui grad de fibroză F3.

Pentru a confirma ipoteza științifică cu privire la eficacitatea testelor neinvazive în evaluarea pacientului HDV am înaintat un studiu pilot, în care ca și obiectiv a fost aprecierea comparativă a fibrozei quantificată după Fibroscan și examen histopatologic.

**Tabel 3.2. Corelație dintre gradul de fibroză identificat prin Fibroscan versus examenului histopatologic**

Grupul de pacienți	R	P
Fibroză minimă- moderată (11 p.)	0.103	0.13
Fibroză severă (9 pac.)	0.72	< 0.001

Rezultatele obținute reflectă o corelare pozitivă dintre gradul de fibroză identificat prin Fibroscan și cel histopatologic la pacienții cu fibroză severă (ciroză hepatică),  $p < 0.001$ , și nu corelează în cazul pacienților cu fibroză minimă.

Astfel, conform rezultatelor acestui studiu pilot s-a identificat că gradul de fibroza identificat prin Fibroscan corelează cu gradul de fibroza obținut la examenul histopatologic în cazurile de fibroză severă ( $> F3$ ) și nu corespunde în cazul gradului de fibroză minimă ( $< F2$ ). Posibil, este necesar de revăzut valoarea cut off al Fibroscanului pentru pacienții cu HDV. Aceste rezultate sunt premise

pentru o cercetare ulterioară, care ar răspunde la întrebările cu privire la reevaluarea cutt off Fibroscan pentru pacienții cu HDV.

### 3.5. Definirea conceptului de prezentare tardivă la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta

În țara noastră, precum și în majoritatea țărilor europene, rămâne necunoscut în ce măsură politicile și strategiile de testare reușesc să identifice populația nedagnosticată în cursul bolii. De asemenea, nu se cunoaște măsura în care pacienții diagnosticați sunt ținuti sub supraveghere medicală. Astfel, pentru a beneficia pe deplin de utilizarea tratamentului, persoanele infectate cu VHD trebuie să beneficieze de îngrijire medicală înainte ca boala hepatică să progreseze în leziuni hepatice considerabile. Pacienții cu fibroză hepatică avansată pot fi considerați „pacienții avansați”. Dintre acestea, un subgrup de indivizi cu „boală hepatică în stadiu tardiv”, cum ar fi ciroza hepatică decompensată, hipertensiunea portală sau carcinomul hepatocelular, poate fi definit în continuare ca un subgrup în care există dovezi incontestabile că inițierea anterioară a tratamentului ar fi oferit un beneficiu semnificativ. Aplicarea acestor definiții: pacienții cu prezentare de „boală avansată” și pacienți cu prezentare „boală tardivă” vor ajuta la cuantificarea proporției cazurilor care lipsesc în timp util diagnostic și tratament.

**Tabel 3.3. Prezentarea tardivă a pacienților cu hepatita cronică virală B, C și D**

Definiția	Caracteristica
Prezentarea cu boală hepatică avansată a pacienților cu hepatită cronică virală B și C netratați	Pacientul cu „hepatita cronică virală B sau C” cu fibroză avansată $\geq F3$ , estimată prin una din următoarele metode: APRI > 1.5, FIB-4 > 3.25, Fibrotest > 0.59 or FibroScan > 9.5 kPa, sau biopsia hepatică ( $\geq F3$ după METAVIR), la pacienții care anterior nu au fost supuși terapiei antivirale.
Prezentarea tardivă a pacienților cu hepatită cronică virală B și C netratați	Prezența a cel puțin unui simptom al cirozei hepatice decompensate (icter, encefalopatie hepatică, ascita detectabilă clinic, hemoragie variceală) și / sau carcinom hepatocelular la pacienții fără tratament antiviral anterior.

În contextul cercetării efectuate de noi, am analizat 100 pacienți cu hepatopatie cronică virală delta, prin prisma evaluării prezentării clinice primare a pacienților cu hepatita cronică virală Delta. Pentru evaluarea factorilor de risc pentru prezentarea particularitivă a acestor pacienți, am analizat și

prezentarea primară pentru pacienții cu hepatita cronică virală B (monoinfecție, 78 pacienți) și C (monoinfecție, 82 pacienți).

**Tabel 3.4. Prezentarea clinică a pacientului cu HDV**

	HBV	HCV	HDV
asimptomatic	54.40%	57.30%	11.10%
sm astenoneurotic	41.70%	40.60%	69.30%
dispepsie digestivă	42.20%	33.30%	48.60%
hepatomegalie	39.70%	42%	93.60%
splenomegalie	30.90%	33.30%	87.80%
durere abdominală	22.50%	34.20%	79.60%
ascita	18.90%	22.40%	38.90%
HDS	11.50%	13.30%	24.20%
encefalopatie	8.60%	10.80%	13.70%
edeme periferice	13.60%	15.60%	19.60%
scadere ponderală	21.50%	28.80%	21.20%
crampe musculare	8.60%	11.30%	15.80%
lipsa poftei de mâncare	11.50%	21.20%	28.40%

Rezultatele obținute au fost semnificative, iar pacienții cu hepatopatie cronică virală delta s-au adresat primar la specialiști cu simptomatice avansată, așa că prezentarea avansată s-a înregistrat practic la jumătate dintre pacienții examinați (48.7%), prezentarea tardivă – la 1/3 (36.2%) dintre bolnavii cu VHD, iar asimptomaticii au fost doar 11.1% dintre pacienți. Pe când la pacienții cu hepatita cronică virală B s-a obținut același procent de pacienți cu prezentare tardivă (29.7%) și cu prezentare asimptomatică (54.4%), în hepatopatia cronică virală C au predominat pacienții cu prezentarea cu boală avansată (29.4%), prezentare tardivă (22.4%) și cei simptomatici (42.7%).

Utilizând criteriile menționate cu privire la boală avansată și boală tardivă, noi am stratificat cohorta noastră de pacienți în 2 subgrupe:

1. Pacientul cu boala hepatică avansată: gradul de fibroză (Fibroscan)  $\geq$  F3 (9.5kPa), scor APRI  $>$  1,5, FIB-4  $>$  3,25, și fără tratament antiviral anterior.
2. Pacientul cu hepatopatie în stadiul tardiv: prezența cirozei hepatice decompensate (cel puțin un simptom dintre următoarele: encefalopatie hepatică, ascită detectabilă clinic, hemoragie digestivă variceală) și / sau carcinom hepatocelular, Fibroscan – F4 ( $>$  24.6 kPa).

Utilizarea acestei stratificări a fost deosebit de importantă în identificarea factorilor de risc pentru prezentarea tardivă și, prin urmare, are un impact asupra noilor strategii de supraveghere.

Dacă urmărim ce se întâmplă la cele două categorii de pacienți: pacienții cu hepatopatie cronică virală delta (infecția duală ) și pacienții cu hepatopatie cronică virală B (monoinfecție) se observă că prezentarea tardivă predomină în primul grup (ciroză decompensată 48.7% vs 29.7% ( $p < 0.05$ ), prin prezentarea a unui din următoarele simptome : encefalopatie 13.7% vs 8.6%, ( $p = 0.0451$ ), varice esofagiene 47.9% vs 30.7%, (ns), HDS 24.2% vs 11.5%, ( $p < 0.05$ ). În cazul pacientului cu fibroză avansată a fost evident predominarea pacienților cu hepatopatie cronică virală delta (dubla infecție) versus cei cu monoinfecție, după cum urmează: FIB-4  $6.4 \pm 5.2$  vs  $3.3 \pm 2.9$ ,  $p = 0.0017$ ), APRI  $2.7 \pm 2.2$  vs  $1.5 \pm 2.1$ ,  $p = 0.0038$ , GDNT 0.99 vs 1.32,  $p < 0.05$ ), Fibroscan  $14.8 \pm 10.7$  kPa vs  $11.54 \pm 11.1$  kPa,  $p > 0.05$ .

Cele două definiții prezentate aici pentru boala hepatică la pacienții cu hepatită cronică Delta pot fi utilizate în scopuri diferite. În primul rând, vor uni metodele de monitorizare și evaluare a eficacității serviciilor de testare și recomandare. De exemplu, dacă un procent mare dintre pacienți sunt „prezentatori tardivi”, aceasta implică faptul că screeningul are nevoie de îmbunătățiri pentru a asigura un diagnostic mai timpuriu. Ca atare, definițiile pot fi utilizate pentru a monitoriza efectul intervențiilor care vizează reducerea numărului de prezentatori târzii. În al doilea rând, utilizarea acestora va permite studii viitoare în țară pentru a determina dimensiunea populației expuse riscului și pentru a identifica grupurile vulnerabile și factorii de risc pentru prezentarea târzie.

### **3.6. Dezvoltarea și atribuirea unui scor neinvaziv cu rol de stratificare a pacientului cu hepatopatie cronică virală delta prin prisma severității bolii bolii hepatice**

Obținerea datelor enumerate mai sus, care au și putere de discriminare, precum și lipsa indicatorilor neinvazivi cu rol de progresie a cirozei hepatice la pacienții cu hepatopatie delta ne-a inspirat să cream un sistem al nostru (regional). Am încercat să construim propriul nostru sistem de diagnosticare a decompensării hepatice, prin identificarea bolii avansate – ciroza hepatică, folosind variabilele capabile să discrimineze între pacienții compensați și decompensați. Astfel, scopul studiului nostru a fost de a elabora un scor bazat pe parametri de rutină neinvazivi care pot fi de ajutor medicilor pentru a identifica atât pacienții cu risc crescut, cât și cei cu risc scăzut de a avea ciroză

progresivă în rândul unei populații de pacienți cu HDV fără efectuarea biopsiei hepatice și pentru a compara scorul nostru cu altele folosind parametrii de rutină.

Așa a fost creat scorul de ciroză **GDNT** (GDNT - **G**astroenterology **D**eartment **N**icolae **T**estemitanu).

Scorul GDNT include variabile de laborator, cum ar fi valoarea albuminei, numărul de trombocite, nivelul de bilirubină totală și indicile INR, precum și o caracteristică oferită prin examinarea ecografică a determinării dimensiunilor splinei. Construirea acestui scor s-a bazat pe recomandările TRIPOD (G. S. Collins, et. al. *The TRIPOD statement*,” 2015). Scorul GDNT este o componentă a proiectului (Primary Liver Cancer and Hepatitis in Moldova Republic (PriLiHepM), moldo-francez dintre USMF N.Testemițanu (investigatori A.Turcanu, E.Tcaciuc) și Unité « Organisation nucléaire et Oncogenèse », INSERM U993, Institut Pasteur, Paris, France (investigator prof. Pascal Pineau).

Elaborarea scorului dat, a trecut prin mai multe etape: de la identificarea variabilelor cu posibil rol în progresia bolii hepatice induse de VHD (acestea au inclus parametrii demografici, clinici, biologic și instrumentali). Următoarea etapă a fost analiza univariabilă (adică, a fost evaluată corelația dintre valoarea doar unei variabile cu condiția clinică, adică cu ciroza hepatică). Când am studiat unul câte unul aceste variabile au fost obținute indici cu semnificație pentru ciroza progresivă, dar când am analizat aceste variabile împreună, au fost obținute doar cinci variabile semnificative din punct de vedere statistic care corelează cu severitatea procesului. Adică, albumina, INR, trombocitele, bilirubina și aria splinei (identificată ecografic) au corelat cu gradul de progresie a cirozei hepatice ( $p < 0.001$ ). Deci, astfel noi am identificat aceste 5 variabile care prezintă interes. Acești indici de fapt pot fi plasați ca niște parametri medico-biologici cu rol predictiv în progresia cirozei hepatice.

A treia etapă în elaborarea scorului a fost analiza multivariabilă, adică am analizat corelația dintre mai multe variabile cu gradul de progresie a cirozei hepatice. Am ajustat coeficienții primiți și am obținut rezultatele. Și etapa următoare a fost elaborarea formulei matematice propriu-zise, adică utilizând variabilele cu valoare statistică am reușit să obținem o formulă care poate descrie progresia cirozei hepatice.

Ulterior, au fost identificate 3 grupe de pacienți cu hepatopatie cronică virală delta în diferite stadii de boală: ciroză hepatică decompensată (52 p), ciroză hepatică compensată (42 p.) și non-cirozicii (74 p.). Scorul GDNT a fost atribuit fiecărui participant din grupele respective, iar rezultatele obținute au fost ajustate și clasificate. Pentru grupul cu ciroză hepatică decompensată a fost obținut o

valoare medie de  $1.06 \pm 0.48$ , pentru grupul cu ciroză compensată –  $1.73 \pm 0.68$  și non-cirofici  $2.4 \pm 0.7$ . Valorile obținute ulterior au fost ajustate către variabile și astfel, conform scorului GDNT am obținut trei loturi de pacienți cu hepatopatie cronică virală delta: 1. lotul pacienților cu ciroză decompensată (sau în decompensare), 2. lotul pacienților cu ciroză compensată și 3. lotul pacienților fără ciroză hepatică.

Scorul GDNT	$\frac{\text{Albumin g/L} + (\text{Trombocite} \times 0.1)}{(\text{INR} \times 10) + (\text{Bili} \times 0.25) + (\text{Dle splinei} \times 0.1)}$
-------------	--

Fig. 3.8. Scorul GDNT de decompensare a cirozei hepatice

Scor GDNT = albumina g/l + (trombocite x 0.1) / (INR x10) - (bilirubina totală x 0.25) + (suprafața splinei x 0.1)

Exemplu: *P.1.la prima adresare (2019): albumina – 28 g/l, trombocitele 80 (80x0.1=8), INR – 1.3 (1.3x10=13), bilirubina 30 (30x0.25=7.5), splina 120 cm (120x0.1=12). Calculăm: GDNT = 28+8/13+7.5+12 = 1.1. Astfel GDNT = 1.1 (corespunde unei ciroze hepatice compensate). Pacientul respectiv poate să administreze tratament de ambulator, fără a fi spitalizat. P.1 la adresarea a doua (2020): albumina – 27 g/l, trombocitele 70 (70x0.1=7), INR – 1.4 (1.4x10=14), bilirubina 32 (32x0.25=8), suprafața splinei (160x0.1=16). Calculăm: GDNT=27+7/14+8+16=0.8. Astfel, peste 1 an GDNT=0.8 – ciroză hepatică progresivă. Se necesită spitalizare.*

#### Explicație:

- Scorul GDNT cu valoarea <0.8 – ciroză hepatică progresivă (decompensarea hepatică);
- Scorul GDNT cu valoarea 0.8-1.6 – ciroză hepatică compensată
- Scorul GDNT cu valoarea >1.6 – non-cirofici, fără progresie

Sistemul nostru de punctare a fost capabil să diferențieze corect pacienții cu *decompensare, compensare și non-ciroză*.

Curba ROC a scorului GDNT a fost mai performantă decât toate sistemele de punctare testate.

Curba operatorului de primire (ROC) a scorului GDNT a fost mai performantă decât toate sistemele de punctaj testate. De fapt, „curba ROC este o curbă bidimensională în care pe axa Y avem sensibilitatea și pe axa X avem specificitatea”. Această curbă ne ajută să măsurăm eficiența acestui scor. Cu cât aria de sub curbă este mai mare (maximul este 1) cu atât modelul este mai bun”. Deci,



observăm că la un scor GDNT  $< 0.93$ , specificitatea (proprția fals-pozitivilor =  $1 - \text{specificitate}$ ) este de 95%, iar sensibilitatea (proportia real pozitivilor) este de 52%.

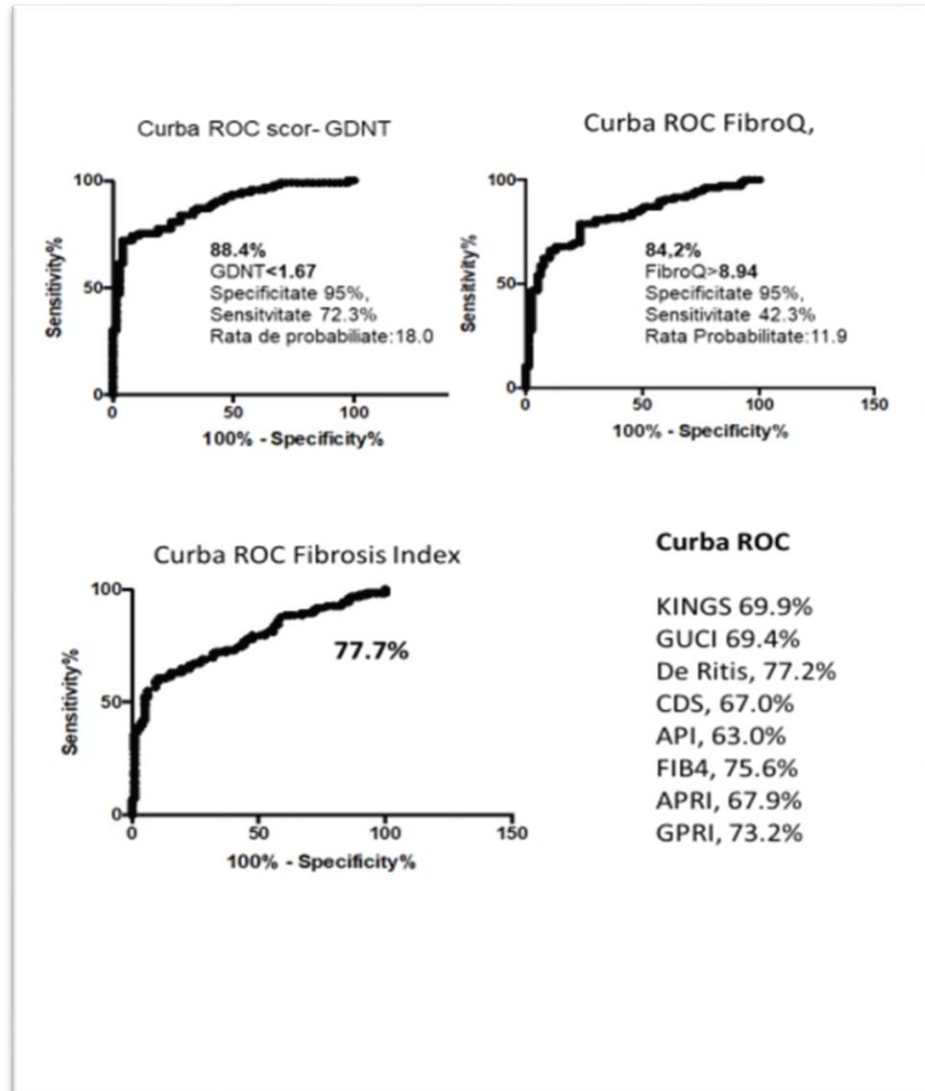
Evaluăm curba ROC astfel,

- Aria  $> 0,9$  – excelent
- $0,9 > \text{Aria} > 0,8$  – foarte bun
- $0,8 > \text{Aria} > 0,7$  – bun
- $0,7 > \text{Aria} > 0,6$  – corect
- $\text{Aria} < 0,6$  – modelul se respinge”

Sensibilitatea acestui test este probabilitatea de a avea decompensări hepatice, la pacienții cu ciroză hepatică virală delta compensată. Astfel, sensibilitatea acestui test are puterea acestuia de a prezice decompensarea în 84.6%; și cu „cu cât testul este mai sensibil, riscul este mai mic să omită decompensarea. Pe când, specificitatea este probabilitatea de a avea testul negativ, atunci când persoana este compensată, sau poate prezenta proporția celor cu test negativ (adică cu decompensări), printre cei compensați hepatic.”

Un test specific este foarte util pentru a pune diagnosticul de boală (adică de decompensare), când acesta este pozitiv, pentru că specificitatea este invers proporțională cu rata fals pozitivilor.

Pentru argumentarea efectivității scorului nostru, numit GDNT au fost evaluate sensibilitatea și specificitatea, prin curba ROC. Am obținut o sensibilitate de 52% și o specificitate de 95%. Sunt indici satisfăcători pentru plasarea acestui scor în practica medicală. Dacă comparăm cu specificitatea și sensibilitatea scorului Indice de fibroză, care este pe larg folosit în practica medicală, vedem că scorul nostru depășește după sensibilitate (Indice de fibroză- 38%/ Scorul GDNT – 52%).

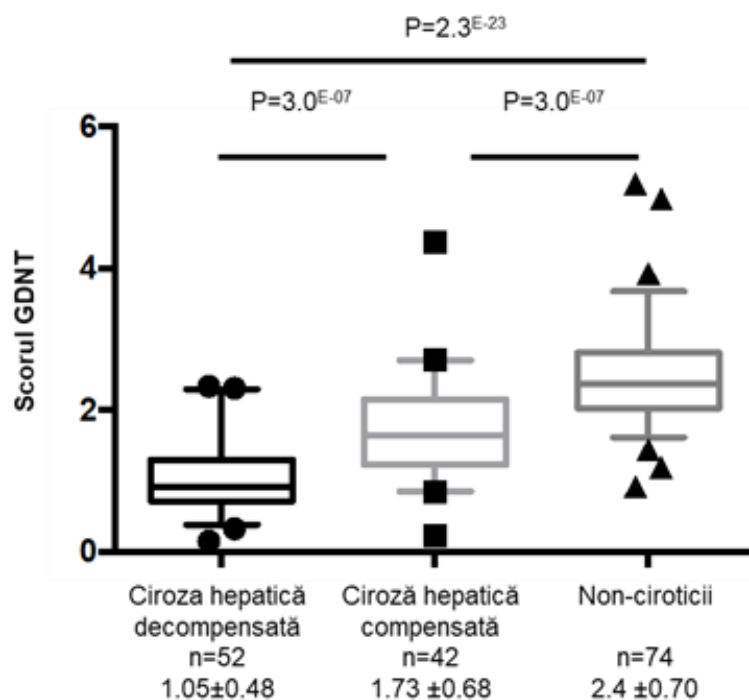


**Figura 3. 2 Curba ROC al scorului GDNT**

Și observăm că scorul GDNT este mai sensibil decât Fibrosis Index, care are o specificitate înaltă, dar o sensibilitate redusă. Este binecunoscut că dacă testul este specific, nu însă și sensibil, în cazul când acest test este pozitiv punem diagnosticul de boală, dar dacă este negativ, este posibil să fie fals negativ. Scorul respectiv poate înlocui unele metode de investigație mai costisitoare și care necesită anumite condiții sau aparataj, și sunt dependente de cunoștințele operatorului, așa precum Fibroscan sau Fibrotest. Scoruri neninvasive de estimare a prognosticului pacienților cu hepatopatie cronică virală Delta practic nu sunt elaborate.

Astfel, pentru pacienții care suferă de hepatopatie cronică virală B sau C au fost elaborate și validate mai multe scoruri clinice, dar pentru hepatopatia Delta nu au fost validate.

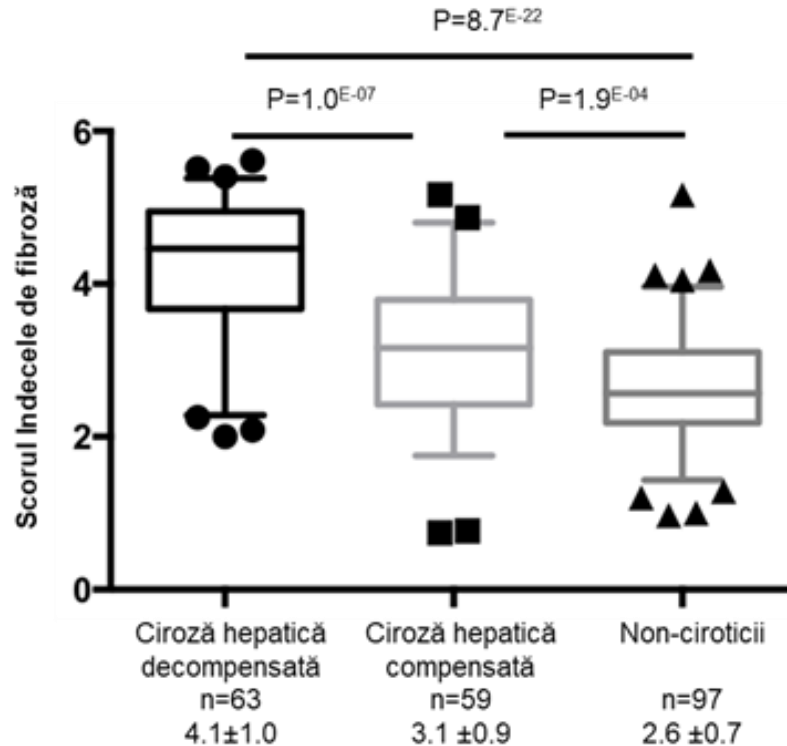
Deaceea scorul GDNT este binevenit în practica clinică, în timpurile când lumea medicală caută să se reorienteze de la diagnosticul invaziv la cel noninvaziv, ușor aplicabil și comod în aceeași măsură pentru doctor și pentru pacient.



**Figura 3.3. Scorul GDNT și severitatea procesului hepatic la pacienții cu HDV**

Validarea acestui scor presupune folosirea scorului GDNT la pacienții care nu au participat în elaborarea scorului, dar sunt selectați în aceeași instituție unde au fost selectați pacienții evaluați.

Din, aceste considerente noi propunem ca acest scor să fie încadrat în evaluarea tuturor pacienților cu hepatită cronică și ciroză virală delta care sunt spitalizați în secția hepatologie ISMP SCR Timofei Moșneaga, astfel creând un registru al acestor pacienți, totodată formând premise pentru validare instituțională.



**Figura 3.4. Scorul Index de Fibroză și severitatea procesului hepatic la pacienții cu HDV**

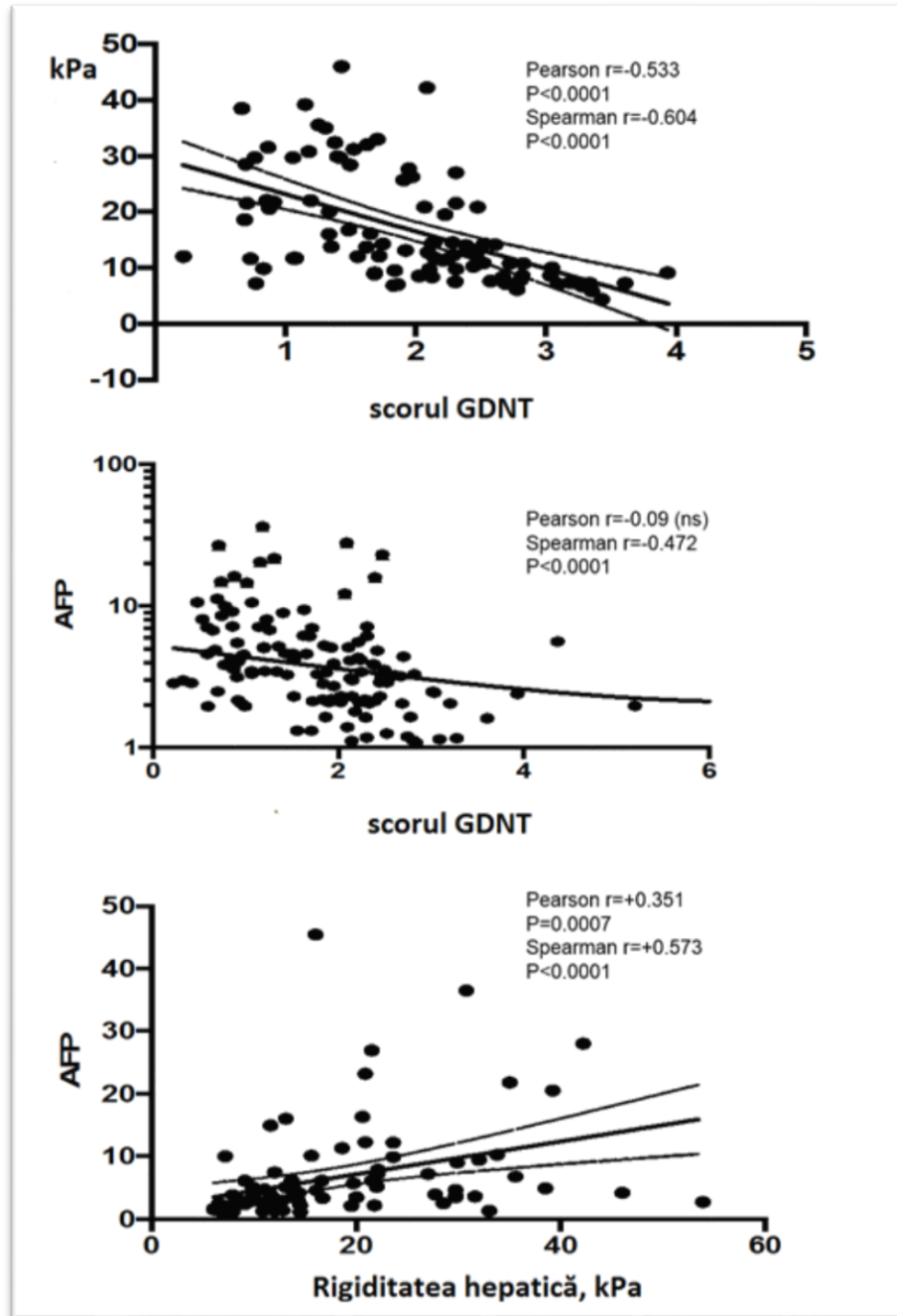
Folosirea unui scor clinic de evaluare a severității, cum ar fi GDNT, poate crește eficiența activității de triaj în compartimentele de asistență primară, având o tendință de scădere a spitalizărilor. Iar, standardizarea evaluării are multiple efecte favorabile, de la cost-eficiență crescută până la creșterea gradului de complianță a pacientului la recomandări

Scorul GDNT este primul și unicul scor elaborat în țara noastră, care este în măsură să prezică decompensarea hepatică la pacienții cu ciroză hepatică delta. Conform acestui scor noi vom putea stratifica pacienții pentru tratament farmacologic, de cei care necesită transplant hepatic.

Este un scor neinvaziv cu aplicabilitate largă atât la nivel de asistență primară, cât și cea specializată.

Totodată este o metodă ieftină, care nu necesită condiții speciale pentru a fi aplicată.

Acest scor a fost identificat ca o aplicație ușor de accesat de pe diferite device-uri electronice, și utilizat chiar de pacient. Astfel, pacientul integrează acest scor în auto-îngrijirea bolii hepatice induse de hepatopatia delta, periodic calculând scorul. Iar, când se identifică un scor mai mic de 0.8, pacientul știe că trebuie să se adreseze medicului specialist.



**Figura 3.5. Corelații dintre scorul GDNT și alfa-fetoproteina/ rigiditatea hepatică**

Odată, identificat scorul GDNT a trezit interes să înțelegem dacă corelează și cu severitatea cirozei hepatice reprezentată de gradul de fibroză (mai bine zis rigiditatea hepatică), măsurat prin Fibroscan (kPa). Astfel, analiza corelațională a relatat o corelare după Pearson de  $r = -0.533$ ,  $p < 0.0001$ . Deci, corelația este moderată, lineară negativă și semnifică că odată cu sporirea rigidității

hepatice se reduce și valoarea scorului GDNT, ceea ce poate încă odată să semnifice importanța acestui scor în prezicerea progresiei bolii hepatice. Acest fapt, ne denotă că scorul GDNT poate fi utilizat și în cazul lipsei posibilității de măsurare a rigidității hepatice (lipsa tehnicii, imposibilitatea deplasării, precum și lipsa sursei financiare). Dar, coeficientului Pearson are unele limite, care trebuie considerate în studiul nostru, și anume: calculul se poate face numai pentru date scalate pe un interval. Coeficientul Pearson este un coeficient parametric, deci variabilele trebuie să fie normal distribuite, iar relația dintre cele două variabile trebuie să fie liniară și să aibă o “direcție”. Coeficientul Spearman poate să rezolve unele limite ale coeficientului Pearson, din considerentele că este non-parametric – nu se face nici o presupunere asupra normalității variabilelor, iar relația dintre cele două variabile nu trebuie să fie liniară, important este să aibă o “direcție” și nu necesită date scalate pe un interval. Astfel, corelarea dintre scorul GDNT și rigiditatea hepatică (kPa) prin coeficientul Spearman  $r = -0.604$ ,  $p < 0.0001$  este relevantă, și exprimă o corelație negativă, ceea ce confirmă tendința de reducere a valorii GDNT odată cu creșterea rigidității hepatice. Au mai fost tendințe de apreciere a corelației dintre scorul GDNT și valoarea alfa-fetoproteinei, coeficientul Pearson a fost nesemnificativ, doar în cazul coeficientului Spearman am obținut un  $r = -0.472$  ( $p < 0.0001$ ). Aceste rezultate identifică încă odată că scorul GDNT corelează cu parametrii de progresie hepatică. Totodată, a fost observată o corelație pozitivă dintre valoarea AFP și gradul de rigiditate hepatică, coeficientul Spearman  $r = 0.573$ ,  $p < 0.0001$ . Acest fapt denotă reținerile cu privire la semnificația AFP în cazul bolilor hepatice severe. Dar, aceste limite pot fi atenuate, dacă completăm evaluarea cu scorul GDNT care prezice gradul de rigiditatea hepatică, și astfel ajustează evaluările noastre cu privire la relația dintre AFP și severitatea bolii.

Subliniem că scorul GDNT include doar variabile plauzibile biologic. De fapt, hipoalbuminemia și INR sunt asociate cu progresia către ciroză (deficit de sinteză în ficatul cirotic), se agravează odată cu progresia fibrozei și pierderea hepatocitelor. Un număr scăzut de trombocite este asociat cu ciroză hepatică din cauza sechestrării splenice datorate hipertensiunii portale. O producție redusă de trombopoietină hepatică a fost, de asemenea, susținută ca un factor care determină scăderea trombocitelor la pacienții cu ciroză. Este de remarcat faptul că nivelurile de trombocite sunt incluse în aproape toate scorurile neinvazive care prezic prezența cirozei sau a varicelor esofagiene. Splenomegalia este un aspect anatomic particular pentru ciroza hepatică virală delta și presupune dezvoltarea hipertensiunii portale și este asociată cu ciroză.

Sumarizând avantajele scorului GDNT elaborat de noi vom menționa:

1. Include parametri care sunt disponibili în mod obișnuit și imparțiali în contrast cu alte studii care includ analize care sunt dificil de efectuat în practica clinică (examen histopatologic) sau includ variabile subiective (consum de alcool). Mai mult, costul determinării parametrilor noștri este foarte mic.
2. Este un scor simplu de calculat, nu necesită tehnică sofisticată sau programe computerizate speciale. Acesta reprezintă un avantaj clar de ușurință, care este un element cheie pentru a face scorul potențial utilizat pe scară largă la pat sau ambulator. Poate fi efectuat și de pacienții însuși.
3. Scorul nostru a arătat o performanță diagnostică bună în cohortele noastre de pacienți. Sensibilitate și specificitate cu cele mai mari valori printre alte scoruri dedicate predicției cirozei. Acesta este un punct relevant pentru un test de screening.

Limite: o potențială limitare a studiului nostru cu privire la elaborarea scorului GDNT (la fel ca toate studiile dedicate predicției neinvazive a cirozei) este că biopsia hepatică poate oferi informații suplimentare pentru medic, cum ar fi cuantificarea gradului de fibroză și poate prezenta semne de suprapunere a condițiilor (de exemplu, steatoză hepatică sau supraîncărcare cu fier). Totodată acest scor necesită a fi validat instituțional și răspândit în mai multe unități medicale specializate.

### **3.7. Concluzii la capitolul 3**

1. Pacienții cu hepatopatie cronică virală Delta au avut o mediană de vârstă 48-49 ani.
2. Vârsta stabilirii diagnosticului hepatitei delta a fost în mediu 38,7 +/- 12,8 ani. Iar diagnosticul de infecție cu VHB a fost stabilit cu 10 ani anterior HDV, astfel, vârsta medie fiind 25,8 +/- 14,9 ani.
3. Pacienții locuitori ai regiunii de sud al Republicii Moldova sunt mai frecvent diagnosticați cu hepatopatia cronică virală Delta și sunt mai tineri 46.2±9.1 ani vs cei din alte regiuni ale țării.
4. Transmiterea intra-familială a HDV a fost cea mai frecventă cale de transmitere, și a fost cea mai întâlnită cale de transmisie la pacienții care provin din sudul Moldovei vs pacienții din alte regiuni non-sudice (39,2% față de 17,7%, P = 0,0010).
5. Detectarea ARN HDV (pozitiv) a fost mai frecventă la pacienții cu familii contaminate decât la ceilalți pacienți non-intrafamiliali (98,7% față de 89,2%, P = 0,0094).

6. Dacă un frate era transmitătorul virusului putativ, pacienții contaminați erau mai des bărbați (64,0% față de 44,1%, OR = 2,3, CI 95% = 1,05-5,3, P = 0,028).
7. În cazul transmiterii hepatitei între frați, se identifică o distanța de timp mai îndelungată până la diagnosticul hepatitei delta ( $12,8 \pm 8,4y$  vs  $9,9 \pm 6,8y$ , P = 0,027), în timp ce încărcătura virală ARN VHD a fost mai scăzută ( $4,9 \pm 1,5 \log_{10}IU / ml$  față de  $5,7 \pm 1,6 \log_{10}IU / ml$ , P = 0,026).
8. Monitorizarea profilului biologic în ambele loturi de pacienți a permis să identificăm un set de nouă parametri (*hemoglobină, leucocite, trombocite, albumină, INR, ALT, GGT, bilirubină totală și colinesterază*) care s-a prezentat diferit semnificativ între pacienții cu hepatopatie cronică virală delta din primul (ciroză hepatică) și al doilea -lea lot (hepatită cronică).
9. Evaluarea fibrozei hepatice a identificat că Indicele de fibroză a fost sistemul de notare cu cel mai bun nivel de discriminare între pacienții cu ciroză hepatică delta și cei cu hepatită cronică virală delta ( $3,6 \pm 0,1$  față de  $2,6 \pm 0,1$ , P =  $1,5E-13$ ).
10. Scorul GDNT (sistemul de punctare creat de noi) a fost capabil să diferențieze corect pacienții cu decompensare, compensare și non-ciroză. Iar curba ROC a scorului GDNT a fost mai performantă decât toate sistemele de punctare testate. Scorul GDNT este primul și unicul scor elaborat în țara noastră, care este în măsură să prezică decompensarea hepatică la pacienții cu ciroză hepatică delta.
11. A fost definit pacientul cu prezentare tardivă și prezentare bolii hepatice avansate, care a predominat în grupul pacienților cu hepatopatie cronică virală delta vs monoinfecția cu VHB.
12. Prezentarea tardivă la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta vs HBV înregistrează criteriile: ciroză decompensată 48.7% vs 29.7% (p<0.05), prin prezentarea a unui din următoarele simptome : encefalopatie 13.7% vs 8.6%, (p = 0.0451), varice esofagiene 47.9% vs 30.7%, (ns), HDS 24.2% vs 11.5%, (p<0.05).
13. În cazul pacientului cu fibroză avansată a fost evident predominarea pacienților cu hepatopatie cronică virală delta (dubla infecție) versus cei cu monoinfecție, după cum urmează: FIB-4  $6.4 \pm 5.2$  vs  $3.3 \pm 2.9$ , p=0.0017), APRI  $2.7 \pm 2.2$  vs  $1.5 \pm 2.1$ , p=0.0038, GDNT 0.99 vs 1.32, p <0.05), Fibroscan  $14.8 \pm 10.7$  kPa vs  $11.54 \pm 11.1$  kPa, p>0.05.
14. Ciroza hepatică (40,2% față de 61,7%, OR = 0,41, IC 95% = 0,22-0,77, P = 0,003) și complicațiile sale (33% față de 57,4%, OR = 0,37, IC 95%: 0,15-0,87, P = 0,034 ) au fost mai puțin răspândite la pacienții tratați cu interferon.



*Caz clinic:* Pentru ilustrarea profilului caracteristic unui pacient cu hepatita cronică virală delta în Republica Moldova voi relata istoria unui pacient, monitorizat un timp îndelungat. Cazul respectiv reflectă parcursul bolii hepatice induse de HDV la un bărbat de vârstă medie originar din sudul țării (Comrat). La prima vizită (prima consultație medicală a fost în anul 2008) pacientul prezentă un discomfort în hipocondriul stâng și astenie fizică moderată. Era cunoscut ca și purtător sănătos de antigen "australian" (menționând că dintre cei 11 frați, 2 frați au decedat de ciroză hepatică, iar 6 frați sunt cunoscuți ca purtători de antigen "australian"). Mama pacientului a decedat de ciroză hepatică de cauză necunoscută. Examenul obiectiv era relevant pentru hepatosplenomegalie, cu predominarea splenomegaliei. Examenul biologic a remarcat leucopenie și trombocitopenie (hipersplenism moderat), citoliză înaltă, coleastăză minoră (din conținutul bilirubinei și gGTP), albumina și proteina totală în limitele valorii normale, timpul de protrombină – 4 sec. Marcherii hepatitei virale: AgHBs pozitiv, antiHBs negativ, AgHBe negativ, anti-HBe pozitiv, anti-HBcor sum pozitiv, anti-VHD total pozitiv, anti-VHD IgM pozitiv. Ecografia abdominală a confirmat hepatosplenomegalia, precum și hipertensiunea portală de grad mediu. Endoscopia digestivă superioară a identificat varice esofagiene de gradul I fără semne de hemoragie. Rezultatele obținute au fost argumente pentru a stabili diagnosticul final de ciroză hepatică de etiologie virală B cu antigen delta (fără evaluarea viremiei VHB și VHD), faza activă. Stadiul Child-Pugh A. Hipersplenism moderat. Reflectând asupra acestui caz clinic observăm că pacientul prezintă un parcurs clasic al unui pacient tânăr de la sudul Moldovei, care suferea de infecție cronică cu VHB din copilărie, posibil achiziționată perinatal sau în copilăria precoce. Semnificativă este prezența infecției cu VHB la toți membrii familiei, ceea ce ne sugerează despre transmisia intrafamilială sau achiziționarea perinatală a tuturor fraților de la mama infectată. Și nici un membru al familiei nu a fost evaluat pentru prezența infecției cu virusul hepatitic delta, sau aprecierea viremiei VHD. Astfel, pacientul se adresează primar deja cu boală hepatică avansată (în stadiul de ciroză hepatică). Și, doar la această etapă este testat pentru VHD, fiind detectați pozitivi anticorpii anti-VHD totali și clasa IgM, condiție specifică suprainfecției cu VHD la un pacient cronic cu VHB. Au fost recomandate testele pentru aprecierea viremiei (prin rtPCR) și s-au obținut: ADN VHB negativ, ARN VHD pozitiv (calitativ). În cazul respectiv se observă supresia VHB de către VHD, exteriorizare a acestui fenomen este AgHBe negativ și ADN VHB negativ. A fost inițiată terapia cu PegIFN alfa2b 1.5 mg/kg/corp pe săptămână, subcutanat. S-au testat parametrii biochimici și hematologici în fiecare lună, timp de 1 an, iar ARN VHD și ADN VHB la 6 luni de tratament, apoi la 12 luni de tratament. Pe durata terapiei s-au redus semnificativ trombocitele, astfel, în luna a patra de interferonoterapie au atins valoarea de 55000 mm<sup>3</sup>, în acest moment s-a redus doza de PegIFN și s-a suplimentat cu sol. BioR – 2 săptămâni (derivat de spirulina, care anterior își demonstrase acțiunea hematologică prin sporirea trombocitelor, leucocitelor și eritrocitelor). Starea hematologică s-a ameliorat și pe un fondal de trombocitopenie 80 - 65 x 10<sup>3</sup>/l terapia cu interferon a fost prelungită, până la 48 de săptămâni, timp în care s-a atins negativarea ARN VHD. La a 24-a și 48-a săptămână de tratament ADN VHB și ARN VHD au fost negativi, aceleași rezultate s-au înregistrat și la 6 luni după sfârșitul terapiei, după 12 luni și după 24 de luni de la sistarea interferonoterapiei. Deci, pacientul a obținut un răspuns virusologic susținut. Răspunsul virusologic susținut post-interferonoterapie la pacientul cu hepatita cronică virală Delta se definește prin negativarea ARN VHD la 6 luni după finalizarea interferonoterapiei. Pacientul revine în atenție peste alți patru ani, pentru un control

medical de rutină fără a prezenta careva acuze. Datele obiective relevau hepatomegalie minoră, splenomegalie nesemnificativă. Parametrii paraclinici: ALT, AST, bilirubina, gGTP, albumina și timpul de protrombină erau în limitele normei. Ecografic: ficatul – lobul drept 15.3 cm, lobul stâng 7.8 cm, lob caudat 2.2 cm, v.portae 1.3 cm, splina 13.5x5.6 cm, v. splenică 0.7 cm. A fost cuantificată fibroza hepatică prin Fibroscan, care a determinat o rigiditate de 11.8 kPa. Virusologic s-au determinat: AgHBs pozitiv, antiHBe pozitiv, anti-HBcor sumar pozitiv, antiVHD total pozitiv, ADN VHB negativ, ARN VHD negativ. Rezultatele obținute relevă un parcurs favorabil al bolii hepatice induse de VHD. Astfel pacientul descris face parte dintre cele 20-25% cazuri responsivi la interferonoterapie, manifestându-se prin obținerea unui răspuns virusologic prelungit, precum și prin ameliorarea funcțională hepatică. Predictorii pentru răspunsul favorabil au fost vârsta tânără, ADN VHB negativ, funcția de sinteză hepatică păstrată. Cazurile de acest fel, sunt mai rare, deseori pacienții ori sistează interferonoterapia din cauza efectelor adverse, ori răspunsul virusologic nu este obținut sau chiar dacă se obține se observă frecvent relapsul acestei infecții. Contextul epidemiologic al acestui caz relevă o realitate pentru țara noastră, dar și pentru alte țări. Studiile remarcă testarea VHD a doar o treime dintre purtătorii de AgHBs în țările dezvoltate.

## **4. EVALUAREA PARTICULARITĂȚILOR DEMOGRAFICE ȘI FACTORILOR DE RISC ALE CARCINOMULUI HEPATOCELULAR LA PACIENȚII CU HEPATOPATIE CRONICĂ VIRALĂ DELTA**

### **4.1. Identificarea particularităților demografice al pacienților cu hepatopatie cronică virală delta și carcinom hepatocelular**

În studiul propus de noi s-a urmărit ipoteza științifică de evoluție particularitivă a carcinomului hepatocelular la pacienții cu infecție cronică virală delta. Pentru a confirma această ipoteză a fost înaintat un substudiu retrospectiv de evaluare a unei cohorte de pacienți diagnosticați cu carcinom hepatocelular. Acești pacienți au fost colectați pe o perioadă definită, iar urmărirea lor a fost pe un interval de 14-28 săptămâni. După cum știm este un prim studiu care analizează impactul infecțiilor hepatitice cronice virale B, C și D la pacienții cu carcinom hepatocelular. Pentru stabilirea acestui diagnostic au fost folosite criteriile ghidului european precum și protocolului național. Diagnosticarea carcinomului hepatocelular s-a bazat pe prezența unei tumori hepatice obținute imagistic, și confirmată histopatologic (în unele cazuri, în special cele precoce), pe contextul clinic, nuanțându-se prezența unei boli hepatice cronice (hepatita sau ciroza hepatică), pe aprecierea markerilor serologici ai infecțiilor virale hepatice (B, C, D) și nivelurilor alfa-fetoproteinei (valoarea  $> 400$  ng/ml a fost considerată definitorie pentru diagnosticarea de carcinom hepatocelular). Date despre starea socio-demografică, simptome clinice, biochimie, hematologice, date serologice privind cele trei virusuri principale responsabile de infecțiile hepatice persistente (virusul hepatitei B, C și Delta), factorii de risc legați de stilul de viață, factorii de risc infecțioși, examen histologic al ficatului non-tumoral, numărul și diametrul tumorii, implicarea ganglionilor limfatici, metastazele, durata tratamentului și durata de supraviețuire au fost culese din fișele medicale și stocate într-o bază de date.

Rezultatele obținute: Au fost evaluați 148 de pacienți suspecți pentru malignități hepatice primare (datele au fost extrase din fișele medicale, secția hepatologie, SCR; secția chirurgie hepatobiliară SCR, precum și la nivel de cabinet gastroenterologic din cadrul Clinicii de Gastroenterologie

și Hepatologie. Au fost depistați 139 pacienți cu carcinom hepatocelular, și 7 pacienți cu colangiocarcinom, un pacient cu carcinom mucinos și un carcino-sarcom.

**Tabel 4.1. Caracteristica parametrilor demografici la pacienții cu carcinom hepatocelular**

Parametrii demografici (n=139)	Valori
Vârsta	
• Media	59.2±10.1
• Mediana (IQR)	59 (35-66)
Bărbați : Femei	1.9 (92:47)
Originari (%)	
• Centru	56.8
• Nord	23.0
• Sud	17.2
• Transnistria	2.1
Nivelul de Educație (%)	
• Primară	40.3
• Secundară	37.4
• Academică	22.3
Venitul familial (%)	
• Scăzut	57.2
• Mediu	42.4
Markerii serologici (%)	
• AgHBs	25.9
• anti-HCV	42.4
• AgHBs+anti-HCV	12.9
• AgHBe	1.6
• anti-HBc	67.8
• anti-Hbe	22.6
• anti-HBs	9.6
• anti-Delta	18.5
• nonB, nonC	17.9
Factorii de risc virali (%)	
• Drog i/v	9.8
• Tاتoo	12.7
• Transfuzii	46.0
• Sexual	2.3
Alți factori de risc (%)	
• Consum de alcool	53.6
• Tabagism	30.0
• Diabet zaharat tip 2	46.1
• Supra-ponderal (IMC ≥25)	34.7

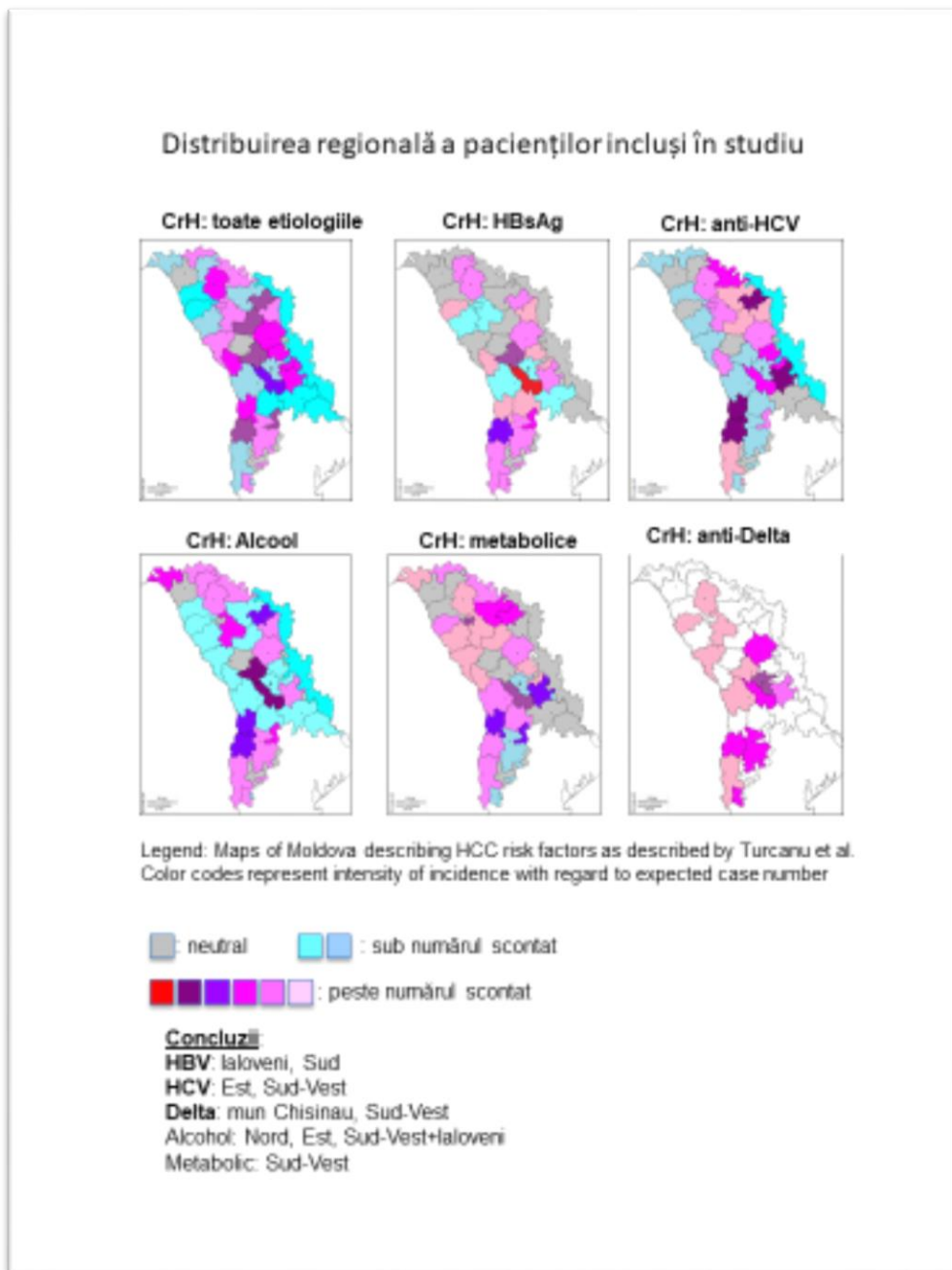
• Tumori intra-familiale	14.8
• Consumul de cafea	48.2

Analizând datele obținute am remarcat că vârsta medie a pacienților înrolați în cercetare a fost de  $59,2 \pm 10,1$  ani, iar raportul dintre bărbați și femei: doi bărbați la o femeie. În cercetările internaționale dedicate prevalenței hepatocarcinomului în populație s-a observat că această boală este identificată mai frecvent în populația masculină. În raportul lui Wands J (2007) incidența bărbat-femeie variază între 2:1 și 4: 1 între diferite populații. Riscul de carcinom hepatic mai mare la bărbați este posibil explicat de o prevalență mai mare a factorilor de risc stabiliți, de exemplu, infecția persistentă cu VHB sau VHC, consumul de alcool și fumatul, precum și expuneri intrinseci cu distribuție diferențiată între sexe [6, 19]. Se mai speculează că hormonii sexuali, cum ar fi estrogenul, ar putea fi implicați în dezvoltarea hepatocarcinomului. S-a emis ipoteza că efectul protector al estrogenilor împotriva dezvoltării CrH ar fi mai slab după menopauză din cauza nivelului scăzut de hormoni, care se reflecta printr-o scădere a raportului bărbați-femei în incidență la această vârstă [17, 78].

Cercetarea noastră a cuprins populația din întreaga țară, astfel au fost incluși pacienți din diferite diviziuni administrative (raioane) ale țării. Au fost reprezentate cele patru regiuni geografice principale: Nord, Centru (inclusiv Chișinău), Sud (inclusiv Găgăuzia) și Transnistria. Cu toate acestea, regiunea de Centru a fost suprareprezentată în ceea ce privește ponderea pacienților (57% față de 43%,  $P = 0,022$ ,  $OR = 1,7$ ,  $CI\ 95\%: 1,1-2,9$ ). Prin contrast, populația transnistreană (inclusiv Tighina / Bender) a fost subreprezentată în această serie de pacienți ( $P = 2,8 E-04$ ,  $OR = 0,13$ ,  $CI\ 95\%: 0,02-0,46$ ).

Cauza cea mai frecventă de carcinom hepatică la pacienții incluși în studiu a fost identificată infecția cu VHC (55,3%), față de nivelul infecției cu VHB (36,1%,  $OR = 1,9$ ,  $CI\ 95\%: 1,2-3,2$ ,  $P = 0,007$ ). O proporție substanțială din grupul pacienți cercetați ( $n = 26$ , 18,5%) a fost infectată cu VHD, situație care a implicat aproape jumătate din pacienții cu AgHBs (+) (47,2%!)). În general, cel puțin unul dintre virusurile hepatitice responsabile pentru infecția hepatică persistentă (VHB, VHC sau VHD) a fost prezent în mai mult de 81% din cazuri. Mai mult, coinjecțiile HBV-HCV au fost găsite la 19 pacienți (13,6%). Mai surprinzător, 10 dintre acești 19 pacienți (52,6%, adică 7,2% din întreaga serie) au fost afectați de o infecție triplă cu HBV-HCV-HDV. Analizele largi, efectuate în scopul identificării factorilor virali implicați în dezvoltarea carcinomului hepatocelular, prezintă infecția cronică cu VHC ca și principala cauză de CrH în țările occidentale. Riscul de CrH la pacienții infectați

cu VHC este de 15 - 20 de ori mai mare, cu o incidență anuală estimată de la 1% până la 4% în cazul cirozei hepatice urmăripe o perioadă de 30 de ani.

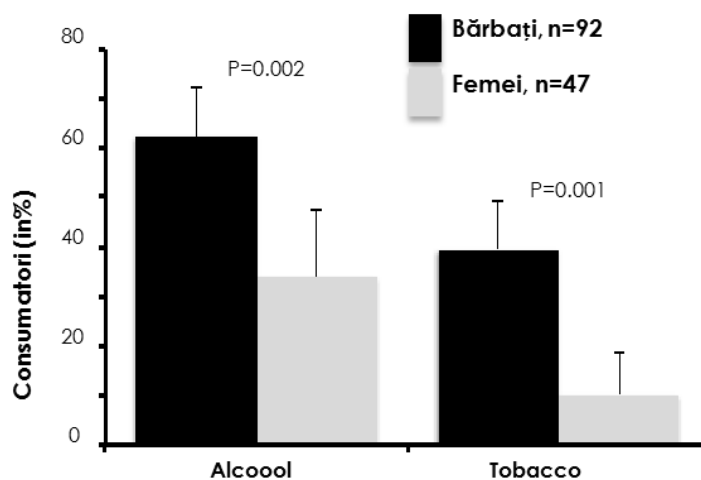


**Figura 4.1. Distribuția regională a pacienților cu carcinom hepatocelular asociat cu infecția VHB, VHC, VHD**

Rezultatele studiului nostru retrospectiv raportează că fiecare al patrulea pacient a fost infectat cu cel puțin doi virusi hepatitici. Astfel, profilul infecțios a fost deosebit de semnificativ în această serie de pacienți cu carcinom hepatocelular din Republica Moldova.

Ciroza și cancerul hepatic primar sunt rezultatul multor ani de infecție virală B, C și D persistentă nerezolvată. Rata de apariție a carcinomului hepatocelular la o persoană infectată cronic cu VHB sau VHC este cuprinsă între 1 și 6% pe an (El Serag și colab., 2001; Lok și et. al., 2001). Infecția cu VHB a nou-născuților duce de obicei la infecție cronică, iar la adulți, doar 10% din infecțiile cu VHB duc la cronicitate (Lok și colab., 2001). Pe de altă parte, majoritatea infecțiilor acute adulte cu VHC duc la cronicitate (Di Bisceglie, 1997). În ambele cazuri, populația de purtători cronici este expusă riscului pentru carcinom hepatocelular.

În studiul nostru factorii de risc legați de stilul de viață al pacienților cu CrH au fost destul de răspândiți, deoarece consumul de alcool și tabagismul au fost auto-raportate de către pacienți în 56,3 și 30,0% dintre cazuri. În sfârșit, după cum este evidențiat și în tabel 4.1, factorii metabolici ai carcinomului hepatocelular, cum ar fi supraponderabilitatea / obezitatea (34,7%) sau diabetul de tip 2 (DZ tip 2, 46,1%), au fost de asemenea frecvenți. Genul (bărbați sau femei) nu a fost diferit pentru prevalența infecțiilor hepatitice, dar a fost extrem de contrastat pentru expunerea la factorii de risc toxici și metabolici.

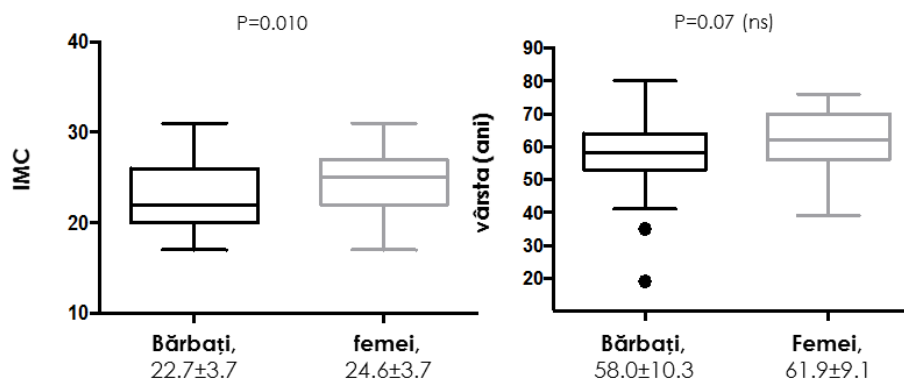


**Figura 4.2. Factorii metabolici determinați în cohorta pacienților cu carcinom hepatocelular**

S-a observat că consumul de alcool (62,4% față de 34,0%, OR = 3,2 95% CI: 1,4-7,3, P = 0,0020) cât și tabagismul (39,5% față de 10,2%, OR = 5,6, 95% CI: 1.7-23.9, P = 0,0011) au fost semnificativ mai frecvent întâlnite la bărbați decât la femei. Posibil, aceasta ar fi o explicație pentru incidența mai înaltă a hepatocarcinomului la bărbați decât la femei. În contrast, indicele de masă corporală (IMC) a fost mai mic la bărbați decât la femei ( $22,7 \pm 3,7$  vs  $24,6 \pm 3,7$ , P = 0,010).

Pacienții de sex masculin au avut tendința de a fi mai tineri, deși nu foarte semnificativ, decât femeile ( $58,0 \pm 10,3$  vs  $61,9 \pm 9,1$ , P = 0,070).

Pacienții infectați cu VHC au fost caracterizați printr-un IMC ușor mai mare ( $24,0 \pm 4,0$  vs  $22,5 \pm 3,5$ , P = 0,041) și tumori mai mici ( $54,6 \pm 32,8$  vs  $65,9 \pm 38,4$  mm, P = 0,0766, ns) decât pacienții cu VHB cu sau fără VHD.



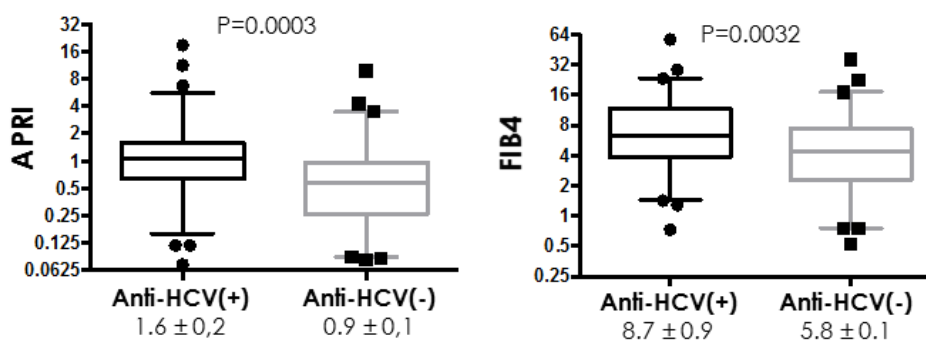
**Figura 4.3. Distribuția femeii/bărbați în coraport cu vârsta și IMC**

Totodată, este important de menționat că pacienții, incluși în cercetare, care prezentau factori de risc infecțioși, originari din sudul Moldovei au fost suprareprezențați de hepatopatia AgHBs pozitivă (27,7% față de 10,2%, OR = 3,17, ÎI 95%: 1,17-9,05, P = 0,012). Acești pacienții AgHBs-positivi au prezentat mai des tatuaje decât cei AgHBs-negativi (22,2 vs 6,1%, OR = 4,3, 95% CI: 1,1-20,2, P = 0,019). Coinfecția AgHBs (+) / anti-HDV (+) au fost, de asemenea, mai des proveniți din regiunea de Sud (38,8 vs 14,1%, OR = 3,80, IC 95: 1,09-12,63, P = 0,0174) adesea tatuati (31,2 vs 9,5%, P = 0,0308) și / sau utilizatori de droguri intravenoase (23,5 vs 7,3%, P = 0,0022) decât alții. Aceste observații sugerează că coinfecțiile cu VHB / VHD apar în special la persoanele adulte cu comportamente cu risc sporit.



## 4.2. Definirea corelațiilor clinico-virusologice la pacienții hepatopatie cronică virală delta și carcinom hepatocelular

Evaluarea caracteristicilor clinico-paraclinice la cei 139 pacienți cu carcinom hepatocelular identifică că stadiul bolii hepatice, măsurat prin scorul Child-Pugh, este mai sever la pacienții infectați cu VHC ( $P = 0,036$ ) decât cei cu VHB.



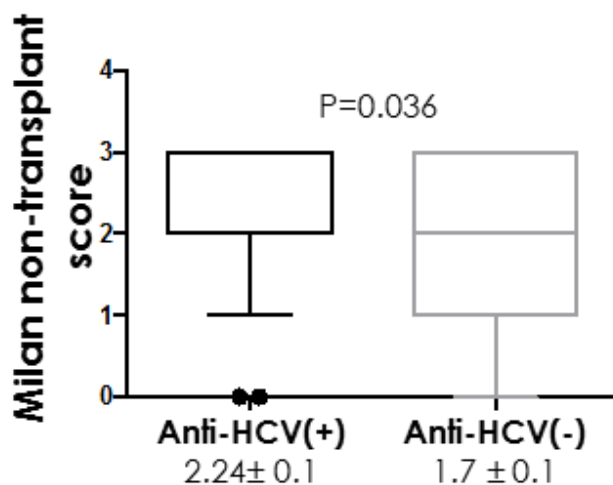
**Figura 4.4. Indicile APRI și carcinomul hepatocelular HCV-indus**

În plus, scorurile neninvasive care apreciază evoluția bolilor hepatice, cum ar fi indicele raportului aspartat aminotransferază-trombocite (APRI) sau indicele Fibrosis-4 (FIB-4), s-au înrăutățit semnificativ la pacienții cu carcinom hepatocelular asociat cu VHC.

**Tabel 4.2. Caracteristica parametrilor clinico-paraclinici la pacienții cu carcinom hepatocelular**

Parametrii clinico-paraclinici (n=139)	Valoarea
Diagnostic clinic primar (%)	
Ciroză hepatică	82.9
<i>Child-Pugh A</i>	13.2
<i>Child-Pugh B</i>	42.4
<i>Child-Pugh C</i>	44.3
Steatoză	70.3

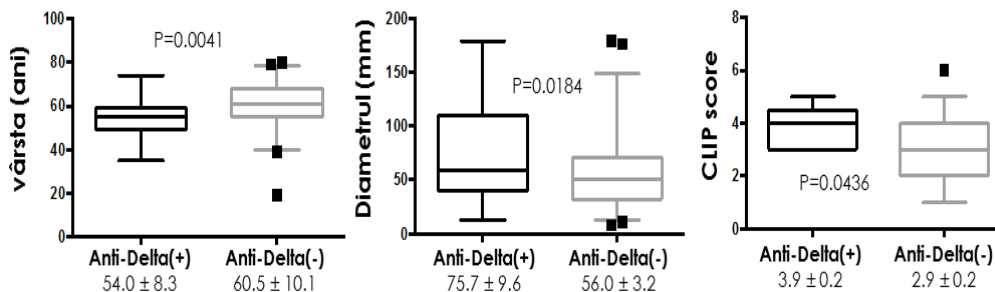
De asemenea, folosind sistemele de (din în cadrul criteriilor de la Milano) pentru pacienții care nu au fost transplantați, pacienții cu hepatopatia- VHC au prezentat scoruri mai severe decât alți pacienți.



**Figura 4.5. Criteriile Milan și carcinomul hepatocelular HCV-indus**

Obiectivul nostru principal a fost stabilirea interrelațiilor dintre paternul tumorii hepatice și infecția cronică virală delta, la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta comparativ cu pacienții cu hepatopatie cronică virală B sau C. Rezultatele obținute în acest context au fost surprinzătoare. Astfel, pacienții infectați cu virusul delta au fost cu 6 ani mai tineri decât ceilalți pacienți ( $54,0 \pm 8,3$  vs  $60,5 \pm 10,1$  ani,  $P = 0,0041$ ) și au fost afectați cu tumori de dimensiuni mai mari ( $75,7 \pm 9,6$  vs  $56,0 \pm 3,2$ ,  $0,0184$ ). Iar, ciroza hepatică a fost prezentă universal la acești pacienții cu carcinom hepatocelular asociați cu HDV ( $95,8$  vs  $79,2\%$ ,  $OR = 5,96$ ,  $CI\ 95\%: 0,87-256,95$ ,  $P = 0,074$ ). La evaluarea scorurilor de severitate al carcinomului hepatic la acești pacienți s-a remarcat că scorul de stadializare CLIP a fost mai mare la pacienții infectați cu VHD decât în cazul pacienților non-VHD.

Am remarcat și faptul că dintre factorii de risc de achiziție ai suprainfecției cu virusul Delta, consumul intravenos de droguri a fost mai frecvent în rândul pacienților seropozitivi decât al altor pacienți ( $23,8$  vs  $6,5\%$ ,  $OR = 4,34$ ,  $95\% IC: 0,93-19,52$ ,  $P = 0,0312$ ). Și interesant că, pacienții cu infecție dublă VHB și VHC au fost, de asemenea, mai frecvent seropozitivi pentru anti-VHD decât pentru alți subiecți ( $66,6$  vs  $12,5\%$ ,  $OR = 13,5$ ,  $95\% IC: 3,6-57,9$ ,  $P = 1,3 E-05$ ).



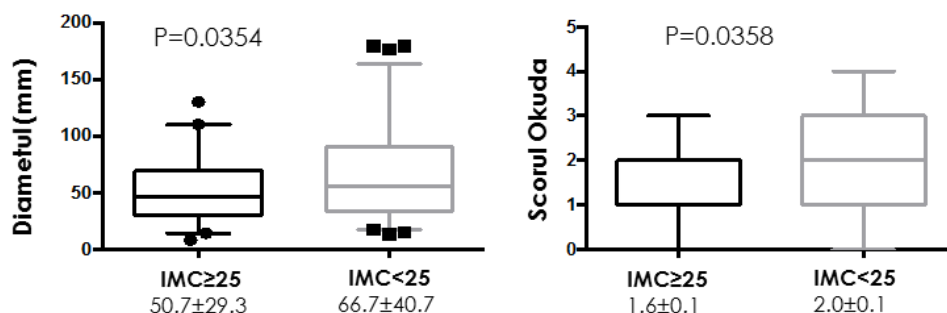
**Figura 4.6. Caracteristicile carcinomului hepatocelular- HDV indus**

Analiza rezultatelor obținute în studiul nostru aduce în fața noastră două întrebări referitoare la hepatocarcinomul „viral”, și anume (1) care, structuri genetice virale sunt implicate în dezvoltarea hepatocarcinomului și (2) în ce moment, dacă există, în dezvoltarea tumorii hepatice, cancerul devine independent de virus? Aceste întrebări mai rămân încă mistere atât pentru VHB/VHD, cât și pentru VHC. Iar, pentru țara noastră este primordial de continuat cercetarea în acest domeniu, mai ales în contextul că la noi se conturează un profil al carcinomului hepatic deosebit.

### **4.3. Studiarea impactului factorilor de risc metabolici asociați carcinomului hepatocelular la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta.**

Nu este surprinzător interesul crescând din ultimii ani pentru mecanismele care stau la baza implicării tulburărilor metabolice în dezvoltarea hepatocercinomului, iar, o mai bună înțelegere a impactului acestor factori asupra micromediului hepatic poate avea beneficii potențiale asupra managementului bolilor hepatice cronice. Deaceia în acest studiu cu privire la factorii de risc asociați cu carcinomul hepatic la pacienții cu HBV, HCV, HDV am atras atenția și la prezența factorilor metabolici cu posibil rol în dezvoltarea CrH.

Factorii de risc metabolici, cum ar fi diabetul zaharat tip 2 și IMC asociați CrH, au fost asociați cu caracteristici clinice și biologice distincte la pacienții din studiul efectuat de noi.



**Figura 4.7. Factorii metabolici și carcinomul hepatocelular**

Rezultate din acest studiu relevă mai multe aspecte cu privire la factorii care ar putea influența dezvoltarea carcinomului hepatic. Am observat că pacienții cu diabet zaharat tip 2 au fost într-un număr mai redus asociați cu HBV (19,4 față de 45,2%,  $P = 0,018$ ) sau cu HDV (2,7 față de 23,0%,  $P = 0,0147$ ) decât pacienții cu HCV. Această observație ne atenționează despre rolul posibil al VHC în dezvoltarea diabetului zaharat tip 2. Pacienții cu diabet zaharat au prezentat un indice de masă corporală mai mare ( $26,4 \pm 3,4$  față de  $22,7 \pm 3,1$ ,  $P = 1,72 \text{ E-}05$ ) decât pacienții fără diabet zaharat. Iar, steatoza hepatică (determinată prin ecografie abdominală, sau tomografie computerizată abdominală) a fost universală la pacienții cu DZ tip 2, versus cei fără diabet (100% vs 42,8%,  $P = 7,16 \text{ E-}06$ ). Dependența de sex în contextul analizei noastre a identificat că femeile au fost semnificativ reprezentate (46,9 vs 23,8%,  $P = 0,005$ ) în rândul pacienților cu diabet zaharat. Steatoza hepatică, ca și în cazul diabetului zaharat tip 2, a fost răspândită la pacienții cu IMC ridicat (96,6 vs 43,3%,  $P = 7,9 \text{ E-}06$ ). Interesant este că diametrul mediu al tumorii a fost semnificativ mai mic în rândul pacienților cu exces de greutate ( $\text{IMC} > 25$ ), ceea ce sugerează că au fost diagnosticați fie mai devreme decât alții, o ipoteză îndoielnică, fie că au fost supuse unui proces tumoral mai puțin agresiv / mai indolent ( $50,7 \pm 29,3$  vs  $66,7 \pm 40,7$  mm,  $P = 0,0354$ ). Scorul Okuda a fost semnificativ mai favorabil la pacienții supraponderali sau obezi decât la ceilalți pacienți.

**Tabel 4.3. Caracteristica parametrilor clinico-paraclinici la pacienții cu carcinom hepatocelular**

Parametrii clinico-paraclinici (n=139)	Valoarea
Parametrii tumorali (CT)	
• Noduli multipli (%)	35.5
• Diametrul tumorii (cm)	$5.9 \pm 3.5$
• Limfadenopatie (%)	79.3
• Metastaze (%)	83.7
AFP (%)	
• $>400$ ng/mL	45.8

• 10-400 ng/mL	30.8
• <10 ng/mL	23.3
Indicii biochimici hepatici	
• ASAT (IU/mL)	117±83
• ALAT (IU/mL)	90±91
• GGT (IU/mL)	187±245
• FA (IU/mL)	190±170
• Proteina generală (g/L)	67±9
• Albumina (g/L)	30±7
• Urea (mmol/L)	9.7±6.7
• Creatinina (micromol/L)	108±74
• Bilirubina totală (micromol/L)	113±173
Leucocitele (Giga/L)	6.8±3.9
Eritrocitele (T/L)	5.6±14.2
Trombocitele (103/mL)	135±64
INR	1.5±0.3
Simptome clinice (%)	
• Varice esofagiene	78.4
• Tromboza portală	58.7
• Gastropatii	20.5
• Hemoragie digestive	26.7
• Ascita	86.6
• Encefalopatie	75.0
• Pierdere ponderală	87.6
• Durere în hipocondriul drept	98.0
Supravețuirea (mediana, IQR luni)	12.0 (7.0-24.0)

Concluzionăm că în acest studiu este relevantă influența factorilor metabolici în dezvoltarea carcinomului hepatocelular. Iar, rezultatele noastre nu sunt diferite de rezultatele obținute din alte cercetări. Se identifică că excesul de greutate și obezitatea sunt factori de risc independenți recunoscuți pentru carcinomul hepatocelular, adipozitatea viscerală arătând o asociere mai puternică cu riscul de cancer decât greutatea corporală generală. Studiile au demonstrat că obezitatea poate influența și prognosticul CrH, indicele de masă corporală (IMC) pare a fi un predictor al invaziei microvasculare și al prognosticului slab, în timp ce adipozitatea viscerală este asociată cu recurența CrH după tratament (Sieghel AB, 2012). Diabetul zaharat de tip 2 a fost recunoscut în diferite studii ca un important factor de risc independent pentru CrH, indiferent de consumul de alcool (Raff EJ, 2015).

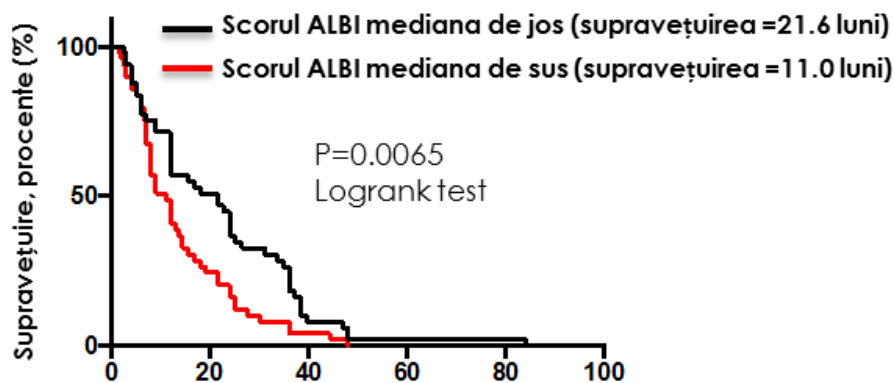
#### 4.4. Evidențierea particularităților de supraveghere a pacienților cu hepatopatie cronică virală delta

Supraviețuirea generală a pacienților analizați a fost evaluată la 108 dintre aceștia. După cum s-a menționat în tabelul 4.2, supraviețuirea mediană a fost de 12 luni (intervalul inter-quartil 7-24).

Niciun factor de risc nu a fost asociat semnificativ cu supraviețuirea redusă.

Doar consumul de tutun și diabet zaharat tip 2 au fost factori de risc tumorali asociați cu o diferență de supraviețuire (testul de rang log,  $P = 0,059$  și  $P = 0,073$ ).

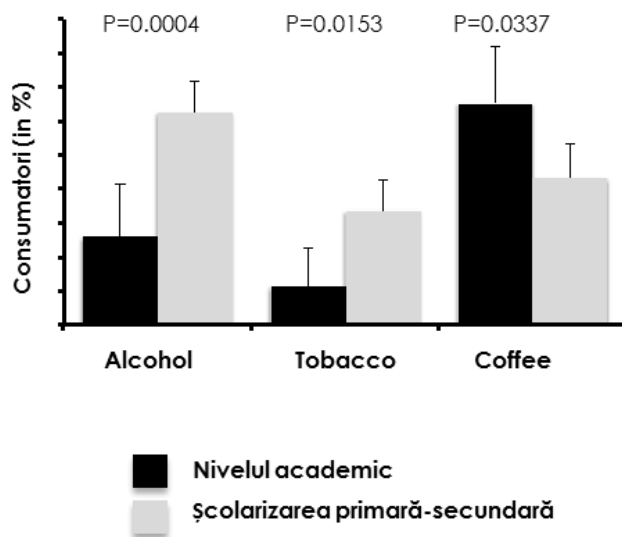
În schimb, nivelul de educație academică a fost asociat semnificativ cu o supraviețuire mai bună ( $P = 0,0036$  Test Logrank) în comparație cu nivelul de școlarizare secundare sau primare (supraviețuirea mediană totală 23,4 față de 12 luni).



**Figura 4.8. Scorul ALBI și supraviețuirea pacientului cu carcinom hepatocelular**

Această diferență nu a depins de metodele terapeutice (rezechție chirurgicală, chimioterapie sau îngrijire paliativă), care erau distribuite uniform între grupurile de educație ( $P > 0.05$ ). Am observat, însă, că factorii de risc toxici (consumul de alcool și consumul de tutun) au fost semnificativ mai puțin prevalenți în subșelul de pacienți cu studii superioare, decât în la cei cu studii medii. De remarcat, acești pacienți au fost, în plus, mai des consumatori de cafea decât restul seriei, posibil cafeaua este o băutură hepatoprotectoare.

Alte caracteristici asociate variației duratei de supraviețuire au fost diametrul tumorii, prezența simptomelor clinice de severitate (de exemplu tromboză portală, hemoragie, encefalopatie hepatică), markeri biochimici (AST, uree), scoruri ridicate în trei sisteme de stadializare (scoruri CLIP, Tokyo și ALBI), și, desigur, tratament chirurgical.



**Figura 4.9. Caracteristicile pacienților cu carcinom hepatocelular**

Așa dar, carcinomul hepatocelular este responsabil pentru aproximativ 250.000 până la 1 milion de decese pe an în întreaga lume, iar mortalitatea prin această boală este rezultatul mai multor factori, incluzând screeningul inefficient, lipsa tratamentului specializat (cum ar fi transplantul de ficat sau terapiile ablativă) în unele regiuni și diagnosticul tardiv la pacienții cu tumori avansate și cu rezerve funcționale hepatice sărace. Prin mini-analiza noastră am evidențiat faptul că un rol important în supraviețuirea pacienților cu hepatocarcinom îi revine și nivelului de educație, fapt care ar putea atrage atenția autorităților asupra acestei lacune în populația generală din țara noastră.

#### 4.5. Concluzii la capitolul 4

1. Carcinomul hepatocelular este a „cincea cauză de patologie malignă la nivel global”. Nu este identificată o cauză individualizată anume ce va determina dezvoltarea hepatocarcinomului, totuși se prezintă ca o condiție complexă constituită din efecte care cumulează mai mulți factori de risc la același pacient, aceasta definind natura plurifactorială a procesului de carcinogeneză .

2. Una din cele mai importante contribuții pentru dezvoltarea carcinomului hepatocelular la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta este reprezentat de ciroza hepatică.
3. Pacienții care dezvoltă carcinom, sunt săraci în simptome clinice și de obicei prezintă semnele corelate cu boala hepatică cronică indusă de VHD;
4. Pacienții cu carcinomul hepatocelular au fost depistați în 80% cazuri cu infecție cronică virală B cu sau fără antigen Delta și C, cu vârsta medie de  $59,2 \pm 10,1$  ani, iar pacienții de sex masculin au avut tendința de a fi mai tineri, decât femeile ( $58,0 \pm 10,3$  vs  $61,9 \pm 9,1$ ,  $P = 0,070$ ).
5. Pacienții cu carcinom hepatocelular asociați cu VHD au prezentat un profil de pacient mai tânăr cu 6 ani decât pacienții infectați cu VHC și VHB (monoinfecție) ( $54,0 \pm 8,3$  vs  $60,5 \pm 10,1$  ani,  $P = 0,0041$ ) și cu un ficat cirotic universal vs ceilalți pacienți ( $95,8$  vs  $79,2\%$ ,  $OR = 5,96$ ,  $CI\ 95\%: 0,87-256,95$ ,  $P = 0,074$ )
6. La pacienții cu hepatocarcinom asociat cu infecția delta, cel mai frecvent factor de risc de achiziție ai suprainfecției cu VHD a fost consumul intravenos de droguri decât în cazul altor pacienți ( $23,8$  vs  $6,5\%$ ,  $OR = 4,34$ ,  $95\% IC: 0,93-19,52$ ,  $P = 0,0312$ ).
7. Coinfecția AgHBs(+) / anti-HDV (+) au fost originari mai frecvent din regiunea de sud a țării ( $38,8$  vs  $14,1\%$ ,  $OR = 3,80$ ,  $IC\ 95: 1,09-12,63$ ,  $P = 0,0174$ ) decât pacienții anti-Delta negativi.
8. Pacienții cu carcinom hepatocelular asociați cu VHD au prezentat un patern de tumoare hepatică mai mare ca diametru, decât pacienții cu VHC și VHB monoinfecție ( $75,7 \pm 9,6$  vs  $56,0 \pm 3,2$ ,  $0,0184$ ) pe fondalul unui scor de stadializare- scorul CLIP semnificativ mai înalt, decât în cazul pacienților non-VHD ( $p = 0,0436$ ).



## **5. STUDIAREA FACTORILOR CU IMPACT ÎN PROGRESIA BOLII HEPATICE LA PACIENȚII CU INFECȚIE CRONICĂ VIRALĂ DELTA VERSUS PACIENȚII CU INFECȚIE CRONICĂ VHB**

### **5.1. Stabilirea interrelațiilor clinico-evolutive la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta comparativ cu pacienții cu hepatopatie cronică virală B (monoinfecție)**

Sunt binecunoscute cele două modalități de infecție cu VHD: coinfecția simultană cu VHB și superinfecția VHD a unei persoane cu portaj cronic AgHBs. Coinfecția se traduce prin hepatită acută, timp în care nivelurile de aminotransferază pot urma un curs tipic bifazic, corespunzător unei răspândiri inițiale a VHB urmată de propagarea VHD. În ceea ce privește monoinfecția cu VHB, la majoritatea pacienților adulți imunocompetenți (90-95%), aceasta progresează până la rezolvarea atât a infecțiilor cu VHB, cât și a infecțiilor cu VHD. Riscul de insuficiență hepatică acută în coinfecția cu VHD este însă mult mai mare decât cel din timpul monoinfecției acute cu VHB [112]. Suprainfecția acută cu VHD a unui pacient infectat cronic cu VHB este asociată cu un episod de hepatită acută care poate fi confundat cu o reactivare cu VHB. În acest context, riscul de insuficiență hepatică acută este deosebit de mare [111]. Peste 90% dintre purtătorii de VHB suprainfectați cu VHD progresează către infecția cronică duală. Infecția cronică virală delta este considerată cea mai severă formă de hepatită virală cronică, cu o progresie mai rapidă către ciroză și un risc mai mare de decompensare și mortalitate. Într-adevăr, 10-15% dintre pacienții infectați cronic ar putea dezvolta ciroză în decurs de 5 ani de la infecție și până la 80% după 30 de ani [114]. Pentru a înțelege particularitățile evolutive și interrelațiile cu arhitectura demografică ale pacienților cu hepatopatie cronică delta ne-am propus să analizăm comparativ două categorii etiologice ale pacienților, care au fost înrolați în cercetare:

- grupul pacienților cu hepatopatie cronică virală B (AgHBs pozitivi) fără antigen delta
- grupul pacienților cu hepatopatie cronică virală delta (anti-HDV pozitivi)

Astfel, au fost identificate două grupe de pacienți (au fost selectați în aceeași perioadă de timp – 2016 - 2018): grupul 1 (de cercetare) a inclus 224 de pacienți cu hepatopatie cronică virală delta, iar grupul 2 (grupul martor) a inclus 100 de pacienți cu hepatopatie cronică virală B (AgHBs pozitiv).

Ulterior, aceste grupe au fost repartizate în alte 2 subgrupe în funcție de severitatea bolii, astfel având subgrupa de hepatită și subgrupa de ciroză hepatică.

Repartizarea subgrupelor în acest studiu analitic (caz-martor) a permis să analizăm următoarele subgrupe de pacienți:

1. 224 de pacienți cu hepatopatie cronică virală delta (AgHBs poz/anti-HDV poz)
  - a) 99 pacienți cu hepatită cronică virală delta
  - b) 125 pacienți cu ciroză hepatică virală delta
2. 100 pacienți cu hepatita cronică virală B (AgHBs poz/anti-HDV neg)
  - a) 64 pacienți cu hepatită cronică virală B
  - b) 36 pacienți cu ciroză hepatică virală B

Au fost analizați mai mulți indici neinvazivi (biochimici sau tumorali) care ar putea să ne orienteze spre depistarea complicațiilor hepatopatiei cronice virale delta: ciroză hepatică de novo, decompensarea cirozei hepatice, dezvoltarea de carcinom hepatic, sau deces).

*Rezultate:* Vârsta pacienților incluși în studiu a fost omogenă (48-49 ani), cu excepția pacienților mono-infecțați cu VHB care au fost puțin mai tineri (43,6 ani). De asemenea, ultimul grup a fost singurul care a prezentat o puternică predilecție masculină care reflectă susceptibilitatea sexului masculin la VHB (M: F = 3.1). Am observat că în cazul pacienților infectați cu dubla infecție, diagnosticarea VHB a avut loc întotdeauna mai târziu decât la pacienții monoinfecțați (25 de ani față de 17-19 ani). Motivul acestei diferențe este necunoscut, dar posibil se datorează evoluției mai insidioase al bolii conferite de prezența HDV? Sau posibil acești pacienți, care deja erau cunoscuți cu VHB nu au mai fost testați pentru VHD, decât în stadiile tardive (de apariție a complicațiilor). Vârsta diagnosticului infecției cu VHD a fost similară atât la subgrupul de ciroză hepatică, cât și la cei cu hepatită și a fost poziționată cu 13 ani mai târziu decât diagnosticarea persistenței VHB. Mai surprinzător, a fost că vârsta descoperirii cirozei a fost similară în cazul infecției duale și mono-infecției (44-45 de ani). Acest fenomen ne atenționează, că pacienții sunt diagnosticați mai frecvent tardiv, în stadiile de fibroză avansată sau ciroză hepatică.

**Tabel 5.1. Caracteristicile demografice ale pacienților cu HBV**

	Anti-HDV(+)/AgHBs(+)	Anti-HDV- (AgHBs(+))	p
	n=224	n=100	

Vârsta (ani, mean±SD)	49.9±9.0	44.8±10.3	0.0005
Raport barbati:femei	0.89 (106:118)	2.33 (70/30)	0.0002
Vârsta ds HBV (ani, mean±SD)	28.8±13.8	17.8±12.4	<0.0001
Vârsta ds HDV (ani, mean±SD)	38.6±12.6	Na	--
Durata hepatita B (mean±SD)	23.4±12.7	27.0±12.1	0.0201
Durata hepatita D (mean±SD)	10.5±7.3	Na	--

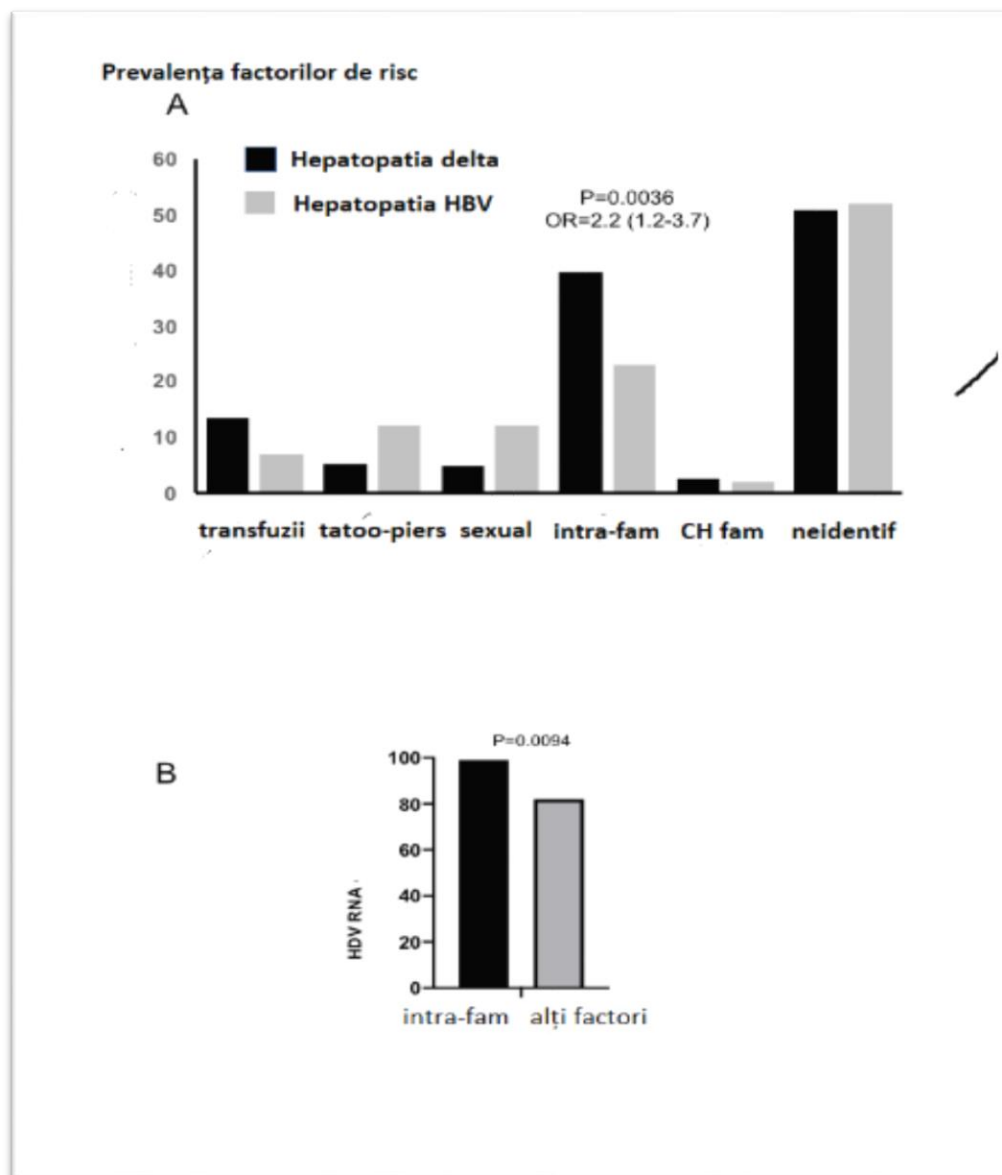
În schimb, perioadele de timp care separă diagnosticarea hepatitei B și ciroza *bona fide* au fost foarte diferite și mult mai scurte în cazul infecției duale ( $19,2 \pm 12,1$  ani față de  $27,3 \pm 12,4$  ani,  $P = 0,0042$ ). Această diferență este în mod plauzibil legată cu diferența medie de vârstă inițială a diagnosticării hepatitei B între infecțiile cu VHB/VHD și cea VHB monoinfecție. O perioadă destul de scurtă de 5 ani a fost separarea diagnosticului de hepatită delta și debutul cirozei hepatice.

Particularitățile obținute pe dimensiunea stabilirii diagnosticului de hepatopatie cronică virală delta au fost o premisă pentru evaluarea de mai departe a căilor de achiziționare a acestor infecții în populația țării noastre, în raport cu regiunea de origine a bolnavilor. Identificarea modului de achiziție în ambele grupe ar fi o explicație pentru faptul de ce la pacienții cu delta predomină la diagnosticul clinic primar formele clinice avansate. Poate este necesar de considerat „vârsta infecției delta?”

Este cunoscut că VHD ca și VHB poate fi transmis prin sânge și produsele derivate din sânge și prin contact sexual. Transmiterea verticală este totuși rară. La populațiile endemic (Mongolia, Pakistan, regiuni ale Africii) transmiterea are loc în principal prin răspândirea intra-familială și iatrogenă în asocieră cu condiții de igienă precare. În regiunile cu endemie scăzută din emisfera nordică, transmiterea iatrogenă și intrafamilială nu mai sunt frecvente, iar utilizarea intravenosă de droguri este acum principala cale de transmisie. Transmiterea sexuală, deși mai puțin frecventă decât pentru VHB sau HIV, pare a fi importantă în regiunile în care infecția cu VHB este endemică. Astfel de analiză, care va identifica particularitățile de transmisie la pacienții cu monoinfecție versus cei cu dubla infecție nu s-a efectuat în țara noastră.

În cercetarea efectuată de noi, analiza modului de achiziție a ambelor tipuri de infecții a pus în evidență faptul că la circa jumătate dintre pacienții din ambele grupuri nu a fost identificat un factor careva de transmisie (pacienții nu au raportat careva sursă de infecție). Iar, în celelalte cazuri au fost menționate: modul de transmisie parenteral, sexual, percutanat și intrafamilial. Remarcabil, atunci

când fuzionează cazurile de ciroză hepatică și hepatită cronică, transmisia intra-familială a fost singurul factor de risc de infecție care diferă în mod semnificativ între seria pacienților cu infecție virală delta și pacienții cu monoinfecția VHB (39,8% în cazul prezenței HDV vs 23,0% în cazul HBV,  $P = 0,0036$ ,  $OR = 2,2$ ,  $CI\ 95\% = 1,2-3,7$ ). Această diferență a fost semnificativă în stadiul de hepatită cronică ( $P = 0,0010$ ) și aproape semnificativă în subgrupa cu ciroză hepatică ( $P = 0,068$ ).



**Figura 5.1. Factorii de risc în achiziția HDV vs HBV**

Deasemenea am atras atenția că modul sexual de transmisie a fost semnificativ veridic la grupul de pacienți cu monoinfecție-VHB, în stadiul de ciroză hepatică (23% ciroza VHB vs 3% ciroza VHD,  $p=0.0028$ ).

Se observă ca pacienții care au fost incluși în studiu, aveau o evoluție de peste 20 de ani pentru ambele tipuri de infecția cronică virală , mai bine zis:  $23,4 \pm 12.7$  ani pentru grupul cu infecție dublă versus  $27 \pm 12.1$  ani pentru grupul cu monoinfecție ( $p < 0.0201$ ).

Și dacă atragem atenția că pacienții au avut o vârstă medie de 48-49 ani, atunci ne dăm seama că achiziția acestei infecții a fost în copilărie sau adolescență, ceea ce indirect ne vorbește despre predominarea căii de transmise perinatală (verticală) și intra-familială (orizontală).

Este cunoscut faptul, că în regiunile în care infecția cu VHB este endemică, transmisia verticală și transmisia orizontală în timpul copilăriei timpurii au un rol remarcabil în transmiterea VHB în rândul membrilor familiei. Din 1992, în țara noastră a fost lansat Programul național de vaccinare împotriva VHB. Acest program a dus la o reducere semnificativă a ratei infecției persistente cu VHB, a carcinomului hepatocelular și a hepatitei fulminante. Acum Republica Moldova este o zonă endemică intermediară pentru infecția cu VHB. În cazul pacienților evaluați a fost evidentă transmiterea intra-familială a VHD în special regional, iar aceste rezultate pot oferi informații valoroase despre rutele de transmitere a VHB/VHD în populație și poate ajuta la descoperirea modului predominant de răspândire și a caracteristicilor locale

## **5.2. Analiza componentei virusologice și influența asupra evoluției clinice al pacienților cu HDV versus pacienții cu HBV**

O altă evidență este că infecția cu VHD a fost stabilită (stabilită de obicei pe criteriul adresabilității pacientului, în lipsa unui screening activ pentru persoana asimptomatică) peste circa 10-13 ani de la diagnosticarea infecției cu VHB ( $10.5 \pm 7.3$  ani), fapt care sugerează că majoritatea pacienților suportă condiția clinică (asimptomatic?) de suprainfecție cu delta, și acest fenomen se petrece la vârsta adolescentului sau adultului tânăr.

**Tabel 5.2. Interrelațiile virusologică-evolutive ale grupelor de pacienți incluși în studiu**

Caracteristicile virusologice	AgHBs+/antiDelta + n= 224 p	AgHBs+/antiDelta – n=100 p	p
Durata hepatita B, ani (mean±SD)	23.4±12.7	27.0±12.1	0.0201
Durata hepatita D, ani (mean±SD)	10.5±7.3	Na	--
AgHBe(+)/anti-HBe (%)	0.0%/100.0	44.4/56.0	< <b>0.0001</b>
ADN VHB (+) (%)	28.1	78.0	< <b>0.0001</b>
Viremia AND VHB (log10 IU/mL, mean±SD)	3.2±1.4	3.7±1.1	0.0377
ARN VHD(+) (%)	92.8	Na	--
Viremia ARN VHD (log10 IU/mL, mean±SD)	5.6±1.7	Na	--

Evaluările serologice și virusologice privind VHB au fost drastic diferite între pacienții infectați dual și monoinfecțați. Fiecare pacient infectat cu delta a prezentat o seroconversie anti-HBe atât în cazuri de hepatită cât și în ciroză (de exemplu, în ciroză hepatică delta, 100,0% față de ciroza hepatică HBV - 72%,  $P = 1,7 \text{ E-}06$ ). Astfel, 100% dintre pacienții cu AgHBs+/anti-HDV+ au fost cu infecției cronice virale B, varianta HBeAg negativă.

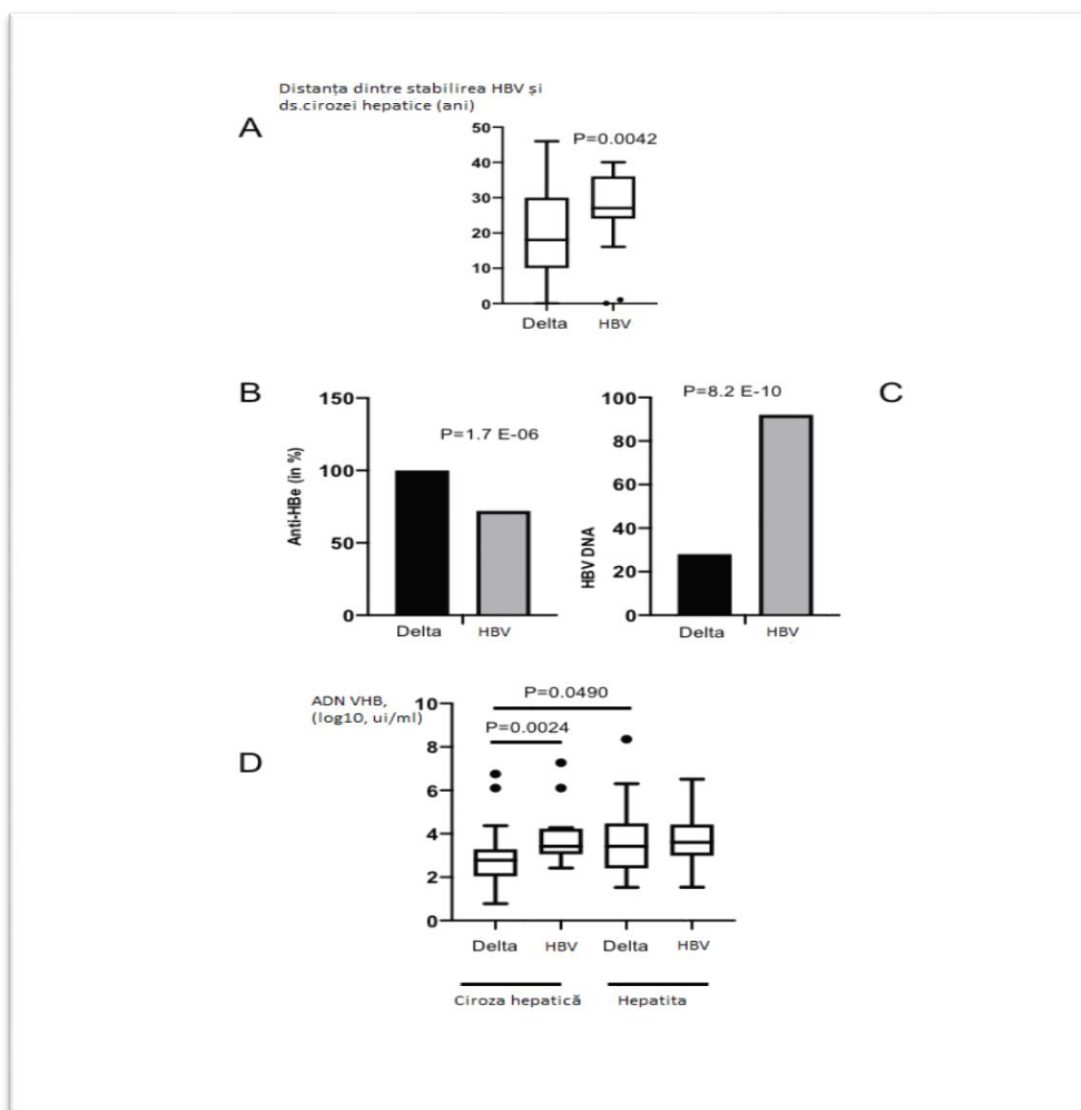
Prezența ADN-ului VHB în sânge, detectat de rtPCR a fost, prin urmare, semnificativ mai puțin frecvent în cazul infecției cu delta (în jur de 28,1% față de 76,0-92,0%).

În prezența cirozei, atunci când s-au măsurat, încărcăturile virale ADN VHB ale subiecților infectați dual erau cu un log zecimal sub nivelul cazurilor mono-infectate ( $2,8 \pm 1,2 \text{ log}_{10} \text{ UI / mL}$  vs  $3,7 \pm 1,2 \text{ log}_{10} \text{ UI / mL}$ ,  $P = 0,0024$ ).

La acești pacienți cu ciroză hepatică delta, încărcăturile virale ADN VHB au fost, de asemenea, ușor mai mici decât la pacienții cu hepatită deltă ( $P = 0.0421$ ). Această situație reflectă probabil pierderea mai importantă a hepatocitelor competente în replicare în cazul cirozei în contextul infectat cu HDV.

De asemenea, și viremia ARN VHD a urmat același model. Pacienții cu ciroză hepatică delta au fost ușor, deși semnificativ mai puțin pozitivi pentru ARN VHD decât cei non-cirofici (88,6 față de 99,0%, OR = 12,3, CI 95% = 1,5-95,6, P = 0,002).

La pacienții cirofici pozitivi pentru ARN VHD, încărcăturile virale au fost mai mici decât la pacienții non-cirofici ( $5.1 \pm 1.6$  față de  $6.0 \pm 1.6$  Log<sub>10</sub> UI / mL, P = 0.002).



**Figura 5.2. Caracteristicile serologice în funcție de severitatea procesului hepatic la pacienții cu HBV**

Interrelațiile virusologice identificate în cercetarea noastră, de fapt sunt o expresie a interacțiunii la nivel molecular dintre virusul helper (VHB) și cel defectiv (VHD). Acest domeniu este cercetat amplu în întreaga comunitate academică medicală din lume. Studiile efectuate pe modele

experimentale au arătat o scădere a replicării VHB în contextul infecției cu VHD, cu impact minim asupra expresiei AgHBs, după cum a demonstrat creșterea raportului AgHBs /ADN VHB în celulele hepatice co-infectate în comparație cu hepatocitele monoinfectate cu VHB [106]. Această observație a fost confirmată și la pacienți, deși modelele de dominanță virală par să fluctueze în timp (Shaper M, et.al., 2010). Sunt posibile și mecanisme indirecte de interferență printr-o dereglare a răspunsului imun înăscut al hepatocitelor. VHB este clasic considerat a nu fi recunoscut de sistemul imunitar înăscut. În timp ce această noțiune a fost contestată de dovezi care sugerează că virusul poate contracara activ răspunsul interferonului. Astfel, două studii recente (Suslov A et al., 2018) susțin conceptul de VHB ca „virus ascuns” [134]. HDV, pe de altă parte, s-a dovedit că induce un răspuns puternic IFN de tip I și prin urmare, expresia crescută a genelor stimulate de IFN poate contribui la inhibarea replicării VHB [174]. Cercetarea noastră suplimentează cunoștințele cu privire la o posibilă interrelație dintre VHB și VHB nu doar la nivel molecular-virusologic, ci posibil și la nivel social? (dependent de vârsta pacientului, locul de origine, sexul pacientului, calea de achiziție).

### **5.3. Determinarea modelului clinico-biologic și influența asupra evoluției procesului hepatic la pacienții cu HDV versus pacienții cu HBV**

Recomandările internaționale diferă în prezent în ceea ce privește strategia de screening pentru diagnosticul infecției cu VHD. Spre exemplu, în Europa se recomandă screening-ul VHD al tuturor pacienților infectați cu VHB. În Statele Unite, în ciuda dovezilor crescânde care indică un diagnostic suboptim al infecției cu VHD, screening-ul este recomandat doar la pacienții cu factori de risc specifici (inclusiv migranți din regiuni cu endemicitate ridicată, antecedente de administrare intravenoasă de droguri sau comportament sexual cu risc ridicat, persoane infectate cu VHC sau HIV și pacienți cu aminotransferaze crescute cu ADN VHB scăzut sau nedetectabil). În țara noastră testarea VHD este de obicei bazată pe adresabilitatea pacientului, adică pe simptomatologie. Simptomele apar în timp și sunt expresia unei boli avansate. Deseori acești pacienți sunt diagnosticați deja la etapa de complicații. În cercetarea respectivă au fost punctate mai multe aspecte cu privire la evoluția clinică a pacienților cu hepatopatie cronică delta versus cei cu monoinfecție. Ciroza hepatică virală delta a fost caracterizată prin un indice mai înalt de prezență a encefalopatie ( $p=0.0013$ ), varicelor esofagiene ( $p<0.0001$ ) și mai frecvente antecedente de splenectomie ( $p=0.0060$ ).



**Tabel 5.3. Caracteristica evolutivă a cirozei hepatice la pacienții cu VHB/ VHD**

	AgHBs+/antiVHD+	AgHBs+/antiVHD-	P
Ciroza hepatică (%)	55.8	26.0	< 0.0001
Ciroza hepatica decompensata (%)	51.1	42.3	Ns
Durata cirozei (ani, mean±SD)	6.0±4.3	Nd	--

Pacienții cirofici infectați cu VHD au fost anatomic diferiți vs pacienții cu cirofici VHB (monoinfecție), astfel s-a observat un ficat mai mic la cei cu VHD ( $p=0.0075$ ) și splină mărită ( $118 \pm 42\text{cm}^2$  față de  $91 \pm 40\text{cm}^2$ ,  $P = 2,0 \text{ E-}04$ ) față de subiecții mono-infectați cu VHB.

**Tabel 5.4. Manifestările clinice la pacienții VHD versus pacienții cu monoinfecția VHB**

Manifestări clinice (%)	AgHBs+/anti-VHD+	AgHBs+/anti-VHD-	p
Ascita	12.2	8.0	Ns
Encefalopatia	8.6	0.0	0.0013
Varice esofagiene	26.8	8.0	< 0.0001
Spelenectomia	8.9	1.0	0.0060
D-le hepatice ( $\text{cm}^2$ , mean±SD)	112±28	118±15	0.0662 (ns)
D-le splinei ( $\text{cm}^2$ , mean±SD)	94±41	74±25	< 0.0001

Profilul biologic al pacienților cu hepatopatie cronică virală delta versus cei cu HBV monoinfecție.

După cum se observă din tabelul atasat (tabel 5.5) setările biologice în ambele grupe de pacienți studiați au fost ușor diferite, cu tendință de agravare în contextul pacienților cu infecția cronică virală delta. Totodată, când au fost analizate toate patru subgrupe de pacienți, s-a remarcat că în subgrupa pacienților cu hepatopatie AgHBs+/anti-VHD+ non-cirofici s-au înregistrat deviații semnificative ale indicilor biologici vs subgrupa AgHBs+/anti-VHD -, și în special al nivelului leucocitelor ( $p<0.001$   $2.1\text{E-}05$ ), trombocitelor ( $p <0.001$   $1.6\text{E-}13$ ), ALT ( $p<0.05$   $2.4\text{E-}06$ ), AST ( $1.7 \text{ E-}04$ ), GTP ( $p = 0.0099$ ), bilirubina totală ( $5.0 \text{ E-}04$ ), albumina ( $p=0.0039$ ). Subgrupa pacienților cu

ciroză hepatică delta versus ciroză hepatică VHB (monoinfecție) a prezentat diferențe veridice pe linia trombocitelor ( $p=0.0006$ ) și nivelului GTP ( $p=0.0105$ ).

**Tabel 5.5. Parametrii biologici la pacienții cu HDV versus pacienții cu HBV**

Valorile parametrilor de laborator	AgHBs+/anti-HDV+	AgHBs+/anti-HDV -	p
Hemoglobina (g,mean±SD)	127±17	132±17	0.0366
Leucocite (G/L, mean±SD)	4.3±1.6	5.3±1.3	< 0.0001
Neutrofile (G/L, mean±SD)	2.1±0.7	2.5±0.7	0.0001
Trombocite (G/L, mean±SD)	133±62	201±55	< 0.0001
ALT (IU/mL, mean±SD)	85±69	56±26	0.0037
AST (IU/mL, mean±SD)	80±65	51±18	0.0001
GGT (IU/mL, mean±SD)	90±89	49±16	< 0.0001
Bilirubina totală (mcromol/L, mean±SD)	26.2±41.9	12.5±4.0	< 0.0001
Colinesteraza	6090±2702	7075±1891	0.0016
Albumina (g/L, mean±SD)	34.3±6.3	37.2±4.0	0.0001
AFP (ng/L, mean±SD)	24±175	17±107	0.314 (ns)
INR (mean±SD)	1.3±0.2	1.2±0.2	0.0621 (ns)

Având în vedere dovezile recente care sugerează că povara globală a bolii hepatice induse de VHD poate fi mai mare decât se estimase anterior, trebuie de luat în considerare screeningul tuturor pacienților cu AgHBs pozitiv. O astfel de strategie nu numai că ar permite o determinare mai precisă a prevalenței infecției cu VHD, ci ar conduce, de asemenea, la intervenții terapeutice mai largi și mai timpurii, scăzând povara complicațiilor bolii. În plus, accesul la îngrijire ar fi semnificativ consolidat prin implementarea diagnosticului la punctul de îngrijire.

#### **5.4. Cercetarea caracteristicilor fibrozei hepatice și evidențierea factorilor cu influență progresivă la pacienții cu HDV versus pacienții cu HBV (monoinfecție)**

Progresia către fibroza avansată în hepatita cronică virală B și delta poate fi rapidă, lentă sau sporadică, în funcție de starea bolii și de gradul de inflamație și leziune hepatică activă. Evaluarea formală a fibrozei hepatice este vitală pentru prognostificarea bolii și pentru a determina urgența tratamentului, precum și răspunsul la terapie. Principalul predictor al rezultatului este severitatea bolii hepatice la prezentare. Ciroza este asociată cu supraviețuirea redusă și cu o incidență crescută a hepatocarcinomului. Ciroza este asociată cu rate de supraviețuire la 5 și 20 de ani de 55%, respectiv 25%, în timp ce aceste rate sunt de 97% și respectiv 63%, la pacienții fără ciroză. Prezența fibrozei avansate la evaluarea neinvazivă este un predictor independent al dezvoltării carcinomului hepatocelular. Mai recent, studiile au arătat că supresia susținută a VHB/VHD cu tratament antiviral poate duce la o reducere a activității necroinflamatorii și îmbunătățirea stadiului fibrozei, incluzând regresia cirozei în unele cazuri. Markerii neinvazivi sunt adjuvanți utili pentru a demonstra efectele tratamentului fără a fi nevoie de biopsii hepatice repetate. O multitudine de teste neinvazive au fost dezvoltate în ultimii ani, în încercarea de a reduce nevoia de biopsie hepatică și de a informa mai bine practica clinică. În analiza noastră am evaluat sensibilitatea unor modalitățile actuale de evaluare a fibrozei în VHB/VHD, inclusiv rolul biopsiei hepatice, precum și a markerilor neinvazivi pe bază de sânge și imagistică în gestionarea bolii.

Astfel, evaluarea paternului fibrozei hepatice (apreciat prin metode neinvazive) la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta versus pacienții cu monoinfecție VHB a evidențiat câteva particularități distincte, care se implică în evoluția progresivă a pacientului hepatic.

La pacienții cu hepatopatie cronică virală delta non-cirofici rigiditatea hepatică (Fibroscan) chiar la prima vizită era mai înaltă versus pacienții cu monoinfecție ( $10,2 \pm 3,7$  kPa față de  $8,3 \pm 1,6$  KPa,  $P = 3,2 \times 10^{-4}$ ). Iar, analiza scorurilor de evaluare a progresiei bolii hepatice a evidențiat următoare dinamică veridică. La pacienții cu ciroză virală delta (AgHBs+/anti-VHD +) unii indici de fibroză au fost veridic diferiți versus pacienții cu ciroză hepatică VHB (AgHBs+/AgHBs-), aceste diferențe s-au înregistrat în cazul scorului King ( $9.4 \times 10^{-8}$ ), Indicelelui de Fibroză ( $2.6 \times 10^{-11}$ ), scorului GUCI ( $1.2 \times 10^{-6}$ ), FibroQ ( $3.9 \times 10^{-4}$ ), CDS ( $5.1 \times 10^{-11}$ ), API ( $6.1 \times 10^{-12}$ ), APRI ( $7.9 \times 10^{-7}$ ), GPRI ( $4.8 \times 10^{-5}$ ).

Scorurile respective au fost evaluate și la subgrupele de pacienți cu hepatita cronică virală delta și hepatita cronică virală B. Rezultatul acestei analize a evidențiat că în subgrupa pacienților cu hepatita AgHBs+/anti-VHD+ se înregistrează diferențe semnificative ale indicilor și scorurilor de fibroză versus pacienții cu hepatita cronică virală B (AgHBs+/anti-HDV-), și anume scorul FibroQ (3.0E-04), FIB4 (3.0E-04), APRI (p=0.0038), GPRI (p<0.0001), PLR (p<0.0001).

**Tabel 5.6. Parametrii fibrozei hepatice la pacienții cu HBV/HDV**

<b>Severitatea fibrozei hepatice</b>	AgHBs+/anti-HDV+	AgHBs+/anti-HDV-	p
Rigiditatea hepatică (Kpa, mean±SD, n=122)	16.9±10.1	10.8±5.4	< 0.0001
Rigiditatea hepatică non-cirofici (Kpa, mean±SD)	10.2±3.7	8.3±1.6	0.0003
Rigiditatea hepatică cirofici (Kpa, mean±SD)	23.2±10.2	18.2±6.0	0.0315
<b>Scorurile clinice</b>			
Scorul King	62±80	20±34	< 0.0001
Indexul de Fibrosis	3.2±1.0	2.2±0.8	< 0.0001
GUCI	3.1±3.9	1.1±1.7	< 0.0001
FibroQ	9.8±16.8	3.1±3.2	< 0.0001
de Ritis	1.1±0.6	0.9±0.2	0.4936 (ns)
CDS	6.8±1.3	5.5±1.3	< 0.0001
API	5.9±1.9	3.6±2.0	< 0.0001
PohL (% de cazuri pozitive)	30.8	7.0	< 0.0001
FIB4	4.7±5.1	1.9±2.2	< 0.0001
APRI	2.1±2.3	0.8±1.2	< 0.0001
GPRI	1.0±1.1	0.3±0.3	< 0.0001
Raportul neutrofilic/limfocitar	0.52±0.14	0.49±0.24	Ns
PNI	25.2±23.2	10.9±37.5	< 0.0001
PLR	86±104	152±193	< 0.0001

După cum observăm din rezultatele obținute evoluția bolii hepatice cauzată de infecția duală este un proces progresiv cu o rată înaltă de decompensare hepatică.

## 5.5. Concluzii la capitolul 5.

1. Pacienții de sex masculin predomină în grupul pacienților cu hepatopatie cronică virală B (monoinfecție), care reflectă susceptibilitatea sexului masculin la VHB (M: F = 3.1).
2. La pacienții cu hepatopatie cronică virală delta vârsta la diagnosticul infecției cu delta a fost similară atât la subgrupul de ciroză hepatică, cât și la hepatită și a fost poziționată cu 13 ani mai târziu decât diagnosticarea persistenței infecției cronice virale B.
3. Perioadele de timp care separă diagnosticarea hepatitei B și stabilirea cirozei hepatice au fost foarte diferite și mult mai scurte în cazul infecției duale ( $19,2 \pm 12,1$  ani față de  $27,3 \pm 12,4$  ani,  $P = 0,0042$ ). Această diferență este în mod plauzibil legată cu diferența medie de vârstă inițială a descoperirii hepatitei B între infecțiile cu VHD și VHB.
4. La fuzionarea cazurilor de ciroză hepatică și hepatită cronică, transmisia intra-familială a fost singurul factor de risc de infecție care diferă în mod semnificativ între seria pacienților cu infecție virală D și pacienții cu monoinfecția VHB (39,8% în cazul prezenței VHD vs 23,0% în cazul VHB,  $P = 0,0036$ , OR = 2,2, CI 95% = 1,2-3,7). Această diferență a fost semnificativă în stadiul de hepatită cronică ( $p = 0,0010$ ).
5. Fiecare pacient infectat cu delta a prezentat o seroconversie anti-HBe atât în cazuri de hepatită cât și în ciroză versus pacienții cu VHB (monoinfecție)  $P = 1,7 \text{ E-}06$ .
6. În ciroza hepatică delta qADN VHB era cu un log zecimal sub nivelul cazurilor mono-infectate ( $2,8 \pm 1,2 \log_{10} \text{ UI / mL}$  vs  $3,7 \pm 1,2 \log_{10} \text{ UI / mL}$ ,  $P = 0,0024$ ), această reflectând, probabil pierderea mai importantă a hepatocitelor competente în replicare în cazul cirozei în contextul infecției cu VHD.
7. Evoluția hepatopatiei cronice virale delta spre ciroză hepatică reflectă un comportament deosebit și al replicării VHD, astfel dezvoltarea cirozei hepatice se asociază cu reducerea qARN VHD versus cazurile fără ciroză ( $5.1 \pm 1.6$  față de  $6.0 \pm 1.6 \log_{10} \text{ UI / mL}$ ,  $P = 0.002$ ).
8. Subgrupa pacienților cu hepatita delta versus pacienții cu hepatita B (monoinfecție) a înregistrat devieri semnificative ale indicilor biologici la nivel de leucocite ( $p < 0.001 \text{ } 2.1\text{E-}05$ ), trombocite ( $p < 0.001 \text{ } 1.6\text{E-}13$ ), ALT ( $p < 0.05 \text{ } 2.4\text{E-}06$ ), AST ( $1.7 \text{ E-}04$ ), GTP ( $p = 0.0099$ ), bilirubina totala ( $5.0 \text{ E-}04$ ), albumina ( $p = 0.0039$ ).
9. Pacienții cu ciroză hepatică delta versus ciroză hepatică HBV (monoinfecție) au prezentat diferențe veridice pe linia trombocitelor ( $p = 0.0006$ ) și nivelului GTP ( $p = 0.0105$ ).

10. Pacienții cu hepatita delta versus pacienții cu hepatita cronică B (monoinfecție) au înregistrat diferențe semnificative ale scorului de fibroză FibroQ (3.0E-04), FIB4 (3.0E-04), APRI (p=0.0038), GPRI (p<0.0001), PLR (p<0.0001).

**Caz clinic:** Pacientul este un bărbat cu vârsta de 36 de ani, referit la consultația specialistului de către medical de familie cu următoarele semne subiective: scăderea poftei de mâncare, scădere ponderală (circa zece kilograme în 3 luni), mărirea abdomenului în volum, astenie fizică importantă. Cunoscut pozitiv de HBsAg de la vârsta de 3-4 ani. De la vârsta de 7 ani până la prima adresare, persoana respectivă se consideră practic sănătoasă, nu se mai adresează pentru consult medical. Starea se agravează cu jumătate de an anterior adresării recente, cu apariție de epistaxis periodic, astenie fizică evidentă și scădere ponderală, edeme gambiene neânsemnate, scăderea capacității de muncă. La consultație medicală apelează la apariția ascitei și scăderii ponderale evidente. Statutul social al acestui pacient relevă următoarele: este căsătorit, are 2 copii, muncește ca slujbaș la o fabrică de spirtoase din sudul țării. Dintre comorbidități: cunoscut pentru prezența antigenului de suprafață al virusului hepatic B din copilărie. Pacientul este fumător – fumează de 5 ani (mai mult de 5 țigări per zi). Tata pacientului suferă de boală hepatică (cauză nu este evaluată). Alți doi frați ai pacientului suferă de hepatită (nu precizează etiologia). Examinarea obiectivă a acestui pacient a pus în evidență un bărbat astenizat (masa corporală 70 kg, înălțimea 1,85 m), cu tegumente palide, uscate. Pe membrul superior stâng, regiunea antebrațului se evidențiază un tatuaj. Abdomenul este mărit în volum din contul ascitei, nedureros la palpare. Ficatul și splina nu pot fi apreciate palpator. Diagnosticul clinic prezumtiv: Ciroză hepatică virală VHB (viremie neprecizată), subcompensată. Este necesar de concretizat activitatea procesului hepatic, etiologia definitivă a patologiei hepatice și gradul de decomensare vasculară. Atragem atenția asupra faptului că pacientul este tânăr, cu un anamnezic neagravată, cu un fondal de purtător sănătos de AgHBs, și totuși aceste elemente la prima vedere nu ar fi îndeajuns pentru dezvoltarea cirozei hepatice. Cunoaștem faptul că infecția cu virusul hepatitic B achiziționată în perioada copilăriei, cronicizează în 50%, iar fiind achiziționată în timpul nașterii de la o mamă AgHBs pozitivă și cu viremie înaltă, poate croniciza în 90-95%. Și odată cronicizată această infecție poate evolua în timp spre complicații; cum ar fi ciroza hepatică sau carcinom hepatocelular. Pentru dezvoltarea cirozei hepatice, ca urmare a infecției cronice cu virusul B este necesară o perioadă de timp îndelungată, circa 20-30 ani. Dacă infecția cu virus B este achiziționată la vârsta de adult, o mare parte (circa 90%) dintre aceste persoane se pot vindeca spontan timp de 4-6 luni. Reîntorcându-ne la pacientul descris de noi, fiind un bărbat tânăr, care probabil a achiziționat infecția cu virusul hepatitic B în perioada copilăriei, sau pe cale perinatală de la mama infectată. Examenul biologic relevant pentru anemie de grad mediu; albumina redusă, INR 1.4; colinesteraza ușor redusă. Dintre markerii serologici hepatici s-au evidențiat: AgHBs 12500 ui/ml; anti-HBs - neg; AgHBe – neg; anti-HBe – poz; anti-HBcor sum – poz, anti-HDV – poz; anti-HCV negativ. ADN VHB – 1500 ui/ml; ARN VHD – 4302000 ui/ml, alfa-fetoproteina – 28.9 ui/ml. Gradul de fibroză hepatică a fost evaluat prin Fibroscan, detectându-se 56 kPa, care corespunde gradului F4. Evaluarea ecografică și cu Dopler duplex a sistemului portal a evidențiat hepato-splenomegalie (splenomegalia circa 18.9x10.7 depășind hepatomegalia 16.5 x 8.9 x 3.5 cm), indicele de hipertensiune portală majorat, ascită. Evaluarea lichidului ascitic a determinat prezența unui transudat, fără celule atipice, cu predominare de limfocite. Endoscopia digestivă superioară evidențiază varice esofagiene gradul 1, fără risc de hemoragie. Diagnosticul clinic definitiv: Ciroză hepatică virală B, D (viremie ADN HBV 1500 ui/ml; ARN VHD 4302000 ui/ml), faza acivă, subcompensată, scorul Chiald-Pugh B (8 p.), MELD 15. Atragem atenția la câteva aspecte:

- Persoană tânără, cunoscută din copilărie ca purtător de AgHBs, care nu a fost supravegheat medical, nu a fost testat niciodată pentru VHD (cunoscând faptul că oricare persoană AgHBs- pozitivă prezintă risc pentru achiziționarea VHD);
- Dezvoltarea cirozei hepatice la o vârstă tânără, la un pacient cunoscut cu infecția cronică cu VHB, deseori presupune suprainfecția cu VHD, care grăbește evoluția hepatitei în ciroză hepatică sau carcinom hepatocelular;
- Viremia ADN VHB de 1500 UI/ml, precum și ARN VHD 4302000 ui/ml sunt criterii clare că ambele infecții sunt active, în faza de replicare și necesită terapie specifică – antivirală.
- Totodată, anemia, trombocitopenia, splenomegalia sunt semne relevante pentru hipersplenism de gradul II.
- Valorile sporite ale alfa-fetoproteinei ridică suspiciunea despre posibila dezvoltare de hepatocarcinom, care presupune o cercetare ulterioară prin tomografie computerizată a ficatului. Un alt argument pentru riscul înalt de hepatocarcinom este valoarea de 56 kPa identificată la Fibroscan (vom vedea ulterior că această valoare prezintă un risc înalt pentru dezvoltare de hepatocarcinom).

Managementul terapeutic al acestui pacient cu diagnosticul de ciroza hepatică, scorul Child-Pugh B, scorul MELD 15 este plasarea în lista de așteptare pentru transplant hepatic. Iar, viremia ADN VHB înaltă presupune inițierea terapiei cu analogi nucleozidici: Entecavir 0.5 mg per zi or Tenofovir 300 mg /zi timp îndelungat (până și după transplant hepatic); viremia ARN HDV înaltă presupune inițierea interferonoterapiei, doar că în acest caz acest tratament (cu Interferon standard sau PegInterferon) este contraindicat (gradul de fibroză înalt 56 kpa; hipersplenismul gradul II, scorul Child-Pugh B). Revine în atenția medicului peste un an, în stare gravă: ciroză hepatică, scorul Child-Pugh C. Encefalopatie hepatică st II. Peritonită bacteriană spontană, a fost spitalizat. Externat în stare ameliorată. Revine pacientul peste 6 luni, cu hemoragie digestivă superioară (din varice esofagiene), stare generală gravă. Hemoragia este stopată și efectuată ligaturarea varicelor esofagiene. Peste 3 luni aflăm că pacientul a decedat la spitalul raional cu hemoragie digestivă superioară repetată. Acest caz clinic reprezintă o istorie medicală clasică pentru un pacient din țara noastră care a decedat la vârsta de 30 de ani, de complicațiile cirozei hepatice (survenită ca urmare a infecției hepatitice mixte virale B și D). Pacientul descris face parte din grupul persoane cu risc pentru achiziția infecției cu virusul hepatitic delta, care nu a fost identificat la timp ca persoană cu risc. Cel, mai probabil că acest pacient face o suprainfecție cu VHD în perioada de adult (ce este caracteristic pentru infecția cu virusul delta, calea de transmisie raportată la adulți fiind cea parenterală), care ulterior se cronicizează și progresează rapid spre ciroză hepatică și deces.

## **6. CARACTERISTICA DINAMICII PROCESULUI HEPATIC LA PACIENȚII CU HEPATOPATIE CRONICĂ VIRALĂ DELTA**

### **6.1. Determinarea particularităților distinctive ale pacienților cu hepatopatie cronică virală delta, în funcție de expunerea la tratament**

Conform datelor statisticii moldave, în dinamica multianuală, în perioada 2000-2017, prevalența hepatitelor cronice a sporit de circa două ori – de la 1092,2±5,68 la 100.000 populație în anul 2000 până la 2156,02±7,62 la 100.000 populație în 2017. O consecință inevitabilă a hepatitelor cronice sunt cirozele hepatice, care actualmente au atins valori absolute de 10.000 cazuri și, respectiv, implică un impact economic și social considerabil. În perioada menționată, prevalența îmbolnăvirilor prin ciroze hepatice în Republica Moldova a crescut de la 168,6±2,23 cazuri la 100.000 populație în 2000 până la 276,72±2,71 cazuri în 2017, fiind de 1,12 ori mai mare comparativ cu media: M=259,94 la 100.000 populație. S-a constatat o creștere a cancerului hepatic de la 186 cazuri (sau 5,1 la 100.000 populație) în anul 2000 până la 381 cazuri (sau 10,7 la 100.000) înregistrate în 2017. Astfel, observăm că morbiditatea prin cancer hepatic în Moldova a sporit de două ori în această perioadă (A. Paraschiv, 2017). Aceste date statistice ne-au motivat pentru a cerceta aspectele evolutive ale pacienților care au fost diagnosticați cu hepatita cronică delta și au fost supuși terapiei antivirale, precum și celor care nu au administrat tratament antiviral cu interferone.

Pentru a evolua rata riscului de dezvoltare a decompensării procesului hepatic, 224 pacienți cu hepatopatie cronică virală delta au fost monitorizați pe o perioadă de 8 – 61.6 luni (mediana 35,5 luni). La înrolare dintre cei 224 de pacienți, 125 de pacienți erau cu ciroză hepatică (55,8%), iar 99 de pacienți erau cu hepatită cronică (44,2%). Dintre pacienții cu ciroză hepatică 61 de pacienți (49%) erau cu ciroză compensată și 64 de pacienți prezentau semne de decompensare a cirozei hepatice (51%). Giroza hepatică a fost stabilită pe criteriile clinice (iar la 11 pacienți au fost evaluate și criteriile histologice). Dintre toți pacienții supravegheați 92 de pacienți au avut istoric de interferonoterapie, iar 132 – fără tratament antiviral. Dintre cei cu interferonoterapie – 70% - au administrat 1 cură de tratament cu durata (12-24 săptămâni), alții 25% - 2 cure de interferonoterapie, și 5% - 3 cure de interferonoterapie. În acest studiu am analizat și rolul de diagnostic și prognostic al alfa-fetoproteinei (AFP) în depistarea carcinomului hepatic la pacienții cu ciroză hepatică delta. Nivelele AFP au fost împărțite în: normală (<20 ng/ml), suspectă (între 20 și 400 ng/ml) și diagnostică (>400 ng/ml).



*Rezultate:* 224 de pacienți stabiliți cu hepatopatie cronică virală delta, cu vârsta medie de 49.2±9.4 ani, dintre care 120 bărbați au fost monitorizați pe durata mediană de 36,4 luni. Toți pacienții au fost originari din Republica Moldova, din regiunea de Centru – 54,2%, Sud - 28,7%, Nord - 14,8%.

Hepatopatia cronică virală delta a fost stabilită pe baza marcherilor serologici caracteristici acestei infecții. Astfel, la 202 pacienți a fost determinat anticorpul anti-VHD sumar, 32 de pacienți – anticorpul anti-VHD IgM, AgHBe a fost apreciat la toții cei 224 pacienți, (dar pentru toți pacienții s-a obținut negativitatea acetui marker), anticorpul anti-HBe – a fost determinat pozitiv la 198 de pacienți.

Urmare a evaluării viremiei VHB și VHD am obținut următoarele rezultate:

- ADN VHB a fost cercetat la 158 de pacienți la etapa de înrolare, repetat (pe durata supravegherii) a fost determinată la 79 pacienți. La înrolare ADN VHB a fost detectat pozitiv la 28% dintre pacienții cu ciroză hepatică, și 28.8% pacienții cu hepatita cronică virală delta. Viremia a fost determinată cantitativ la 110 de pacienți, observându-se o diferență validă dintre viremia la pacienții cu ciroză hepatică delta și hepatita cronică virală delta (ADN VHB 2.8log10 Iu/ml versus ADN VHB 3.6 log10 Iu/ml, p=0.0377).
- Viremia ARN-VHD a fost apreciată la 164 de pacienți la vizita de înrolare, ulterior repetat a fost detremintată la 109 pacienți. S-a dovedit, că la înrolare ARN VHD este detectat pozitiv la 92.8% pacienți cu ciroză hepatică delta vs 99.0 pacienți cu hepatita delta (p=0.0052), iar evaluarea cantitativă a evidențiat diferență nesemnificativă dintre cantitatea virmiei virusului hepatitic delta la pacienții cu ciroză hepatică și cei cu hepatita cronică (ARN VHD 5.6 log10 Iu/ml vs ARN VHD 6.0 log10 Iu/ml, p=0.0215).

**Tabel 6.1. Particularitățile virusologice ale pacienților cu HDV în funcție de severitatea procesului hepatic**

Marcherii serologici	Ciroza hepatică delta	Hepatita cronică delta	p
AgHBe (+)/anti-HBe (%) (198p)	0.0/100.0	0/100	-
aDN VHB (+), (58p) (%)	28.1	28.8	ns
ADN VHB (Log10 IU/mL, mean±SD, 158p)	2.8±1.2	3.6±1.6	0.0377
ARN VHD (+) (%)	92.8	99.0	0.0052

ARN VHD (Log10 IU/mL, mean±SD, 164p)	5.6±1.7	6.0±1.6	0.0215
--------------------------------------	---------	---------	--------

După cum observăm din rezultatele obținute, severitatea procesului hepatic și viremia VHD apreciată prin rtPCR se întreconectează slab, dar totuși se atestă o viremie mai redusă odată cu apariția cirozei hepatice.

Infecția cronică cu VHD a fost întotdeauna considerată severă și rapid progresivă, ducând la boală hepatică în stadiul final în doar câțiva ani, în timp ce a fost identificată o formă progresivă mai lentă care a evoluat în ciroză la 30% dintre pacienți urmăriți pentru perioade de până la până la 28 de ani, îndreptându-se spre decompensarea ficatului mai degrabă decât spre cancerul hepatic [117]. Aceste observații sugerează existența unei categorii de pacienți cu forme de infecție cronică HDV cu o evoluție eterogenă, totodată patogeniza afectării hepatice legate de această infecție rămâne încă controversată. Pare puțin probabil ca virusul să aibă un efect citopatic direct, deoarece studiile au descoperit grefe hepatice care exprimă HDAg singular, fără vreo leziune tisulară. Pe de altă parte, așa-numita citopatogenitate asociată cu replicarea virusului ar putea explica deteriorarea țesutului observată la pacienții cu infecție acută cu VHD, care se caracterizează prin niveluri ridicate de replicare virală, în timp ce infecția cronică se caracterizează prin niveluri scăzute de producție virală și patogenitate [Tailor J, 2206]. Mai mult, descoperirile recente care indică existența unei corelații directe între nivelurile serice de AgHBs și ARN VHD în absența unei corelații inverse cu nivelurile ADN VHB sugerează o interpretare alternativă a patogenității VHD care este mai strâns legată de biologia VHB [Zachou J, 2010].

O ipoteză înaintată în cercetarea noastră este influența terapiei cu interferon în dinamica evolutivă a pacienților cu infecție cronică virală delta. Astfel, noi am analizat grupul de pacienți supuși terapiei antivirale și grupul de pacienți care nu au fost supuși tratamentului antiviral. Tratamentul antiviral administrat de pacienții cu HDV au inclus interferonoterapia (Interferon alfa-standard 6-9 mln/3 ori pe săptămână sau interferon pegilat alfa-2a 180 mcg/sapt). Pacienții au obținut acest tratament în cadrul Programului Național de Combatere a hepatitei cronice virale B, C și Delta (inițiat în 2007 și prelungit până în 2021).

Rezultate obținute în acest context au relatat mai multe particularități dependente de expunerea pacienților către tratamentul antiviral.

Astfel, au fost înregistrate unele caracteristici evolutive ale pacienților cu infecției cronice virale delta netratați. În acest caz, au fost monitorizați 132 de pacienți cu hepatopatie cronică delta netratați, dintre care 71 pacienți erau cu ciroză hepatică (48 – compensată/23 - decompensată la înrolare, și 51 de pacienți cu hepatita cronică. Fiind urmăriți pe o durată mediană de 35.5 luni (8 – 61,6 luni) s-a observat următoarele: s-au dezvoltat încă (+)16 cazuri de ciroză hepatică compensată, și +11 cazuri de ciroză hepatică s-au decompensat, s-au înregistrat 7 cazuri de carcinom hepatic (detectat prin 2 metode imagistice + nivelul sporit de alfa-fetoproteină). Totodată 9 pacienți au decedat (6 pacienți de hemoragie digestivă superioară, 2 pacienți – cancer hepatic, 1 pacient – cauză necunoscută (pacientul era plecat din țară).

O altă componentă a fost analiza particularităților evolutive a pacienților cu istoric de TAV (tratament antiviral cu interferon standard sau PegInterferon). Au fost evaluați 92 de pacienți care au administrat terapie antivirală. Au fost monitorizați pentru o perioadă medie de 29.7 luni (10.3- 49,3 luni). La înrolare 54 pacienți aveau ciroză hepatică (58.6%), iar 38 de pacienți sufereau de hepatită cronică (41.2%). Dintre toți pacienții care au administrat TAV 9 pacienți (9.7%) aveau ARN VHD nedetectabil la înrolare, dar anti-VHD pozitiv. În acest subgrup de pacienți a fost analizată și rata răspunsului la tratamentul antiviral (cu interferon/ PegInterferon). De menționat, că din cei 92 de pacienți, doar 86 de pacienți au ajuns la 6 luni (24 săptămâni) de tratament și 72 pacienți au atins 12 luni (48 de săptămâni) de tratament antiviral. 13 pacienți au prelungit tratamentul mai mult de 12 luni (72 de săptămâni), iar 5 pacienți au administrat tratament mai mult de 3 ani. La 6 luni de tratament antiviral au atins un răspuns biochimic 49.5% dintre pacienți, la 12 luni – 31.3% dintre pacienți. În cazul pacienților care au prelungit terapia după 12 luni, s-a obținut un răspuns biochimic la 37% dintre cei care au administrat 72 de săptămâni tratamentul antiviral.

Ca o concluzie în cercetarea respectivă a fost că terapia antivirală nu a influențat semnificativ evoluția progresivă a bolii hepatice. Dar, totuși s-a observat că în grupul celor tratați carcinomul hepatocelular a fost stabilit doar la un pacient.

## **6.2. Analiza factorilor asociați decompensării procesului hepatic la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta**

Cauzele progresiei bolilor hepatice sunt multiple, dar și nedefinite, totuși studiile epidemiologice au condus la identificarea unui număr crescut de dovezi care sugerează contribuția unor factori extra-constituționali sau de mediu care participă la decompensarea hepatică. Aceștea sunt numiți factori de risc. În literatura epidemiologică, un factor de risc este definit ca „un eveniment bine-definit sau o caracteristică care a fost asociată cu creșterea ratelor de apariție a unei boli subsecvente”; astfel, termenul este limitat la pacienții care nu prezintă boala.

Având în vedere că hepatita acută a fost raportată ocazional de către pacienții noștri, astfel ca modalitatea de infecție cu VHD a rămas obscură în mai mult de 70% din cazuri, iar majoritatea pacienților care au dezvoltat ciroză au făcut acest lucru ca urmare a unei infecții asimptomatice de lungă durată achiziționată în copilărie, intrafamiliar.

Rezultatul studiului a arătat, de asemenea, un istoric familial de hepatită delta, vârstă mai mare și sexul feminin, crește semnificativ riscul de dezvoltare a cirozei hepatice, iar aceste rezultate au fost fapte existente. Astfel, vârsta medie a pacienților cu ciroză hepatică VHD era de 48+/- 7,7 ani versus cei cu hepatita cronică VHD – 43,6+/- 10.9 ani ( $p < 0.05$ ). Este interesant că, în studiul nostru sexul feminin a predominat la pacienții care au dezvoltat ciroza hepatică, iar sexul masculin a predominat la pacienții care au dezvoltat carcinom hepatocelular. Dacă analizăm pe dimensiunea hepatopatiei cronice virale delta, atunci observăm că durata infecției delta corelează cu dezvoltarea cirozei hepatice, precum și transmisia intra-familială corelează cu decompensarea cirozei hepatice, și apariția de cancer hepatic.

**Tabel 6.2. Distribuția factorilor asociați cu decompensarea hepatică în HDV**

Parametri	Ciroza hepatica +/-	OR (95% CI)	CrH+/-	OR (95% CI)
Sex				
• femei	23/118	1	2/118	1
• bărbați	12/106	0.67(0.29-1.54)	6/106	<b>2.1</b> (1.12-3.87)
Mod de transmisie				
• necunoscut	11/107	1	4/107	1
• transfuzii	6/30	0.59(0.17-2.11)	-	
• sexual	-/11	0.38(0.08-1.73)		
• intra-fam	18/86	<b>2.09</b> (1.06-4.12)	4/86	0.68(0.32-1.89)

ADN VHB				
• negativ	14/82	1	1/82	1
• pozitiv	21/56	<b>4.13</b> (3.12-9.65)	5/56	<b>2.34</b> (1.41-3.87)
ARN VHD				
• negativ	12/39	1	1/39	1
• pozitiv	23/168	<b>3.13</b> (1.42-6.21)	6/168	1.56 (0.76-3.1)
Tratament antiviral				
• interferon	12/65	1.18(0.98-2.32)	3/65	1.16(0.48-2.21)
• analogi nucleozidici	6/22	1.33(0.60-2.93)	4/22	0.68(0.28-1.56)

Urmare a analizei și interpretării datelor, au rezultat diferențe semnificative în ceea ce privește indicatorii referitori la structura ficatului (gradul fibrozei, ficatul cirotic, conturul ficatului și aspectul ficatului), valorile enzimelor hepatice (ALT și GGT), valorile indicilor hemoleucogramei (trombocite) și administrarea tratamentului, în funcție de evoluția și complicațiile hepatopatiei cronice virale delta.

Studiile retrospective-prospective ale cohortelor ca ale noastre au arătat scenarii de caz mai bune pentru infecția cu VHD, oferind unele indicii care tind să releve rezultatelor severe timpurii ale infecției cu virusul hepatitic delta.

Care sunt caracteristicile procesului de decompensare a cirozei hepatice și fenomenului letalității la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta? Supravegherea pacienților incluși în studiu a permis stabilirea unor particularități de evoluarea a pacientului cu hepatopatie cronică virală delta. În primul rând ne referim la faptul că au decompensat doar pacienții cu ciroză hepatică stabilită la înrolare, totodată circa 21% procente de pacienți au progresat spre ciroză hepatică pe o durată mediană de 2.5 ani!. Decompensarea cirozei hepatice s-a dovedit a fi la 11.2% dintre pacienții cu ciroză hepatică, urmăriți pe o durată mediană de 2 ani, ceea ce ne vorbește despre faptul că evoluția bolii este rapidă și progresivă. Pacienții au suportat mai multe decompensări hepatice (4 pacienți – o decompensare hepatică a fost stabilită), 5 pacienți – 2 decompensări hepatice, 5 pacienți 3 decompensări hepatice). Astfel din cei 14 pacienți, 5 pacienți au prezentat encefalopatie hepatică, 6 pacienți – ascită refractară, 3 pacienți infecție pulmonară, 4 pacienți – peritonită bacteriană spontană, 8 pacienți- hemoragie digestivă superioară. Analiza factorilor de risc asociați progresiei bolii hepatice a identificat pacientul cu un risc mai mare de progresie pentru ciroză hepatică. Astfel, pacientul cu

hepatopatie cronică virală delta, cu achiziția intafamilială de VHD (OR2.09, CI95% 1.06-4.12), persistența infecției cu virusul hepatitic B activ, ADN VHB detectabil (OR4.13, CI95%:3.12-9.65) și infecție delta pozitivă ARN VHD detectabil, OR3.13, CI95%: 1.42-6.21) este supus riscului de a progresa rapid spre ciroză hepatică pe o durată mediană de 2,5 ani.

Descoperirile noastre conform cărora decompensarea clinică și nu hepatocarcinomul a fost prima complicație dominantă care apare la pacienții cu ciroză hepatică poate avea consecințe clinice. Într-un studiu retrospectiv efectuat pe 200 de pacienți din Europa de Vest cu ciroză hepatică virală B, Fattovich și coautorii (Fattovich G, 2000) au demonstrat decompensarea la 12 din 39 (31%) pacienți infectați cu VHD versus 31 din 161 (19%) pacienți monoinfecțați cu VHB, pe durata a 80 de luni de urmărire. În aceeași analiză, hepatocarcinomul s-a dezvoltat în 5 (13%) dintre pacienții cu ciroză hepatică delta și în 22 (36%) dintre cei cu monoinfecția VHB, cu un risc de decompensare și carcinom hepatic crescut de 2,2 și, respectiv, 3,2. Între 1984 și 2006, 46 de pacienți (15%) din cohorta lui Romeo et, (2009) au dezvoltat hepatocarcinom cu o incidență anuală de 2,8%, o rată similară prezentată într-un raport anterior din Grecia (Hadziyannis SJ, 1997). Cu toate acestea, aceste descoperiri au fost contrazise de o analiză retrospectivă a 962 pacienți infectați cu VHB ( Iloeje UH, 2006) din Londra care a raportat rate similare de dezvoltare a hepatocarcinomului la cei 82 de pacienți infectați cu infecția cronică virală delta și la cei 880 de pacienți VHB- monoinfecțați.

În studiul nostru se înregistrează că circa 10% dintre pacienții cu ciroză hepatică delta înrolați au decedat. Astfel, 12 pacienți au decedat pe durata medie de 35.5 săptămâni, dintre care 8 pacienți de hemoragie digestivă superioară, 2 pacienți – cancer hepatic, 1 pacient pneumonie, 1 pacient – cauză necunoscută. Se observă că cea mai frecventă cauză de deces este hemoragia digestivă superioară

Constatarea noastră a unei asociații între replicarea VHB, ciroză și riscul de hepatocarcinom la pacienții infectați cu VHD a fost oarecum așteptată, deoarece observațiile epidemiologice, clinice și experimentale au legat replicarea VHB cu hepatocarcinomul la pacienții infectați cu VHB/VHD.

### **6.3. Caracteristica pacienților cu hepatopatie cronică virală delta care au dezvoltat carcinomul hepatic pe durata cercetării**

Carcinomul hepatocelular în Republica Moldova ocupă un loc similar cu nivelul incidenței în Europa, poate ceva mai înalt din cauza factorilor etiologici mai frecvenți și constituie circa 3-3,5%

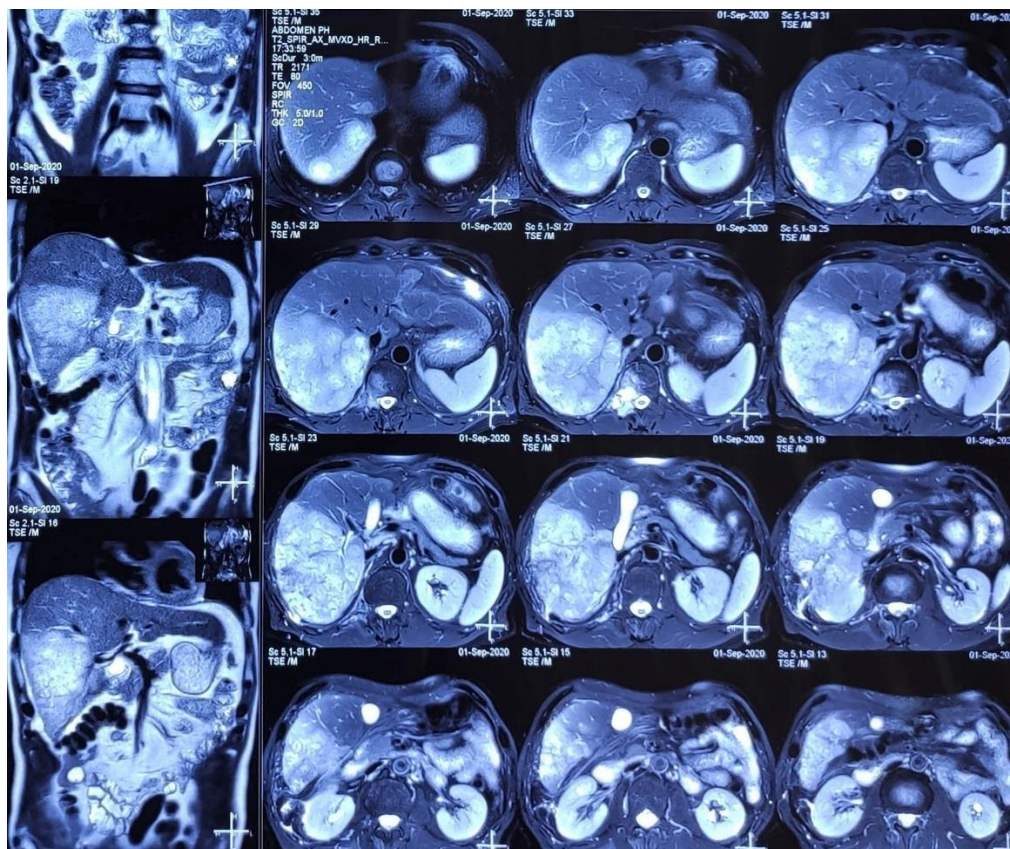
din structura oncologică a țării. De rând cu această incidență cancerului hepatic în Moldova se află într-o creștere permanentă. În ultimii 10-15 ani numărul bolnavilor a crescut de 3-3,5 ori. Cauzele principale ale situației sunt consecințele hepatitei cronice virale, care bântuie în Moldova, fiind factor etiologic principal prin filiația binecunoscută: hepatită virală – hepatită cronică – ciroză – cancer hepatic. În 70- 75% din numărul de cazuri, cancerul hepatic se dezvoltă pe un ficat cirotic. Altă particularitate constă în depistarea tardivă a bolnavilor datorită evoluției accelerate a procesului și perioadei îndelungate de evoluție asimptomatică. Totodată în 65-70% al cancerului hepatic evoluează sub formă nodulară cu afectarea ambilor lobi, ceea ce exclude orice intervenție chirurgicală radicală (cu excepția hepatectomiei cu transplant). Singura metodă de tratament eficient este tratamentul chirurgical radical, care poate fi aplicat la circa 10% din totalul bolnavilor depistați. Toate cele enumerate sunt cauza supraviețuirii joase a bolnavilor de carcinom hepatocelular, până la 6 luni. Dacă urmărim rezultatele analizei noastre vom observa că pacienții cu hepatopatie cronică virală delta sunt particulari în privința unei evoluții progresive și severe. Astfel, din cei 224 de pacienți înrolați (125 de pacienți au fost cu ciroză hepatică și 99 pacienți cu hepatită cronică), monitorizați pe o durată medie de 35,5 luni au progresat către ciroză hepatică 21 de pacienți dintre cei 99 de pacienți cu hepatită cronică (21.2%), au decompensat ciroza 14 pacienți din cei 125 de pacienți cu ciroză hepatică (11.2%), au dezvoltat carcinom hepatocelular – 8 pacienți dintre cei 125 de pacienți cu ciroză hepatică (6.4%), și au decedat 12 pacienți din cauza complicațiilor de ciroză hepatică (9.6%).

**Tabel 6.3 Caracteristica complicațiilor dezvoltate la pacienții cu HDV**

	Complicații				Total, (n,%)
	<i>Ciroza hepatică</i> (n, %)	<i>CH decomp.</i> (n, %)	<i>Cancer hepar</i> (n, %)	<i>Deces</i> (n, %)	
hepatita cronică HDV (nr.99)	21 (21,2%)				21 (21,2%)
ciroză hepatică delta (nr.125)		14 (11,2%)	8 (6,4%)	12 (9,6%)	34 (27,2%)
total (nr.224)					55 (24,5%)

În cercetarea noastră, carcinomul hepatic a fost depistat ca și complicație la opt pacienți dintre cei 224 de pacienți cu hepatopatie cronică virală delta. Dar, dacă observăm toți pacienții care au dezvoltat carcinom hepatic au fost inițial stabiliți cu ciroză hepatică. Astfel, din numărul pacienților cu ciroză hepatică delta (125 de pacienți) se identifică ca 6.4% dintre cazuri au dezvoltat carcinom pe durata de supraveghere de la 8 - la 61 de luni. Diagnosticul de carcinom hepatocelular a fost stabilit

pe metode imagistice, combinate cu dozarea AFP, iar la unii pacienți au fost combinate cu examen histopatologic. Pentru diagnosticarea carcinomului hepatocelular a fost pus în aplicare Protocolul Clinic Național ”Cancerul hepatic primar”, elaborate de colectivul de autori din cadrul Institutul Oncologic în 2014, totodată am atras atenția și la modificările efectuate pe parcursul anilor (din 2014-2020). Ierarhizarea metodelor de examinare invazive sau neinvazive este dată în primul rând de mărimea formațiunii tumorale.



**Figura 6.1. CT spiralat în hepatocarcinom (S1.5T).**

*Notă:* Descriere de caz clinic. Pacientul Z.Gh (efectuată CT în septembrie 2020), 57 ani, HDV depistat în 1998, nu a administrat tratament antiviral. Concluzie: hepatocarcinom (lob drept hepar). Biopsie hepatică: Aspect de hepatocarcinom, cu patern de creștere în travee și cu stromă desmoplazică tumorală. Imunohistochimie: celulele tumorale sunt pozitive la HepPar-1, Arginaza-1, focal pozitive la Glypican-3, pozitive la Citokeratina-7 și negative la CitoKeratina-20.

Consensurile europene existente propun următoarea modalitate de examinare. Metode invazive • leziuni nodulare < 2 cm: examen histopatologic și / sau citologie prin biopsie echo sau CT ghidată, indiferent dacă nodulul este sau nu vascularizat. Metode neinvazive • leziuni nodulare > 2



cm pe ficat cirotic - două modalități : A. criteriile imagistice : două tehnici imagistice coincidente ( echografie, CT sau RMN cu contrast , arteriografie), care să demonstreze arterialitatea leziunii cu „wash out” în timp portal la un cirotic cu nodul hepatic > 2 cm; B. criteriile combinate : folosesc o tehnică imagistică care să demonstreze hipervascularizația arterială a formațiunii nodulare + AFP > 400 ng / ml. De atras atenția că RMN –ul are performanțe superioare CT –ului în depistarea și caracterizarea nodulilor hepatici , fiind folosit în cazul în care examinarea CT- ului nu reușește să aducă suficiente elemente diagnostice.

Unele forme de hepatocarcinom ( forme difuze, infiltrante - ce reprezintă până la 10-15 % din tumorile hepatice primitive maligne) sunt dificil de diagnosticat în absența leziunilor focale vizibile imagistic. Pot apare imagistic cu aspect intens heterogen +/- tromboză portală segmentară sau globală, împreună cu valori mari ( diagnostice ) ale AFP. În suspiciunea de hepatocarcinom biopsia din nodul se va face doar atunci când criteriile clasice (imagistice +/- AFP) nu au stabilit diagnosticul. Biopsia echoghidată ( sau CT ghidată ) se va face cu ac fin (ace cu diametrul exterior sub 1 mm ) sau va fi de tip “ core biopsy “ (ace având diametrul peste 1 mm ). Biopsia unei leziuni suspecte pentru hepatocarcinom se evită dacă leziunea pare a fi operabilă (grad de recomandare B), din cauza riscului de diseminare, care apare în 1-3 % din cazuri. Consensul AASLD 2018 a adus unele modificari față de consensul EASL 2016, cu privire la diagnosticul hepatocarcinom. Valoarea diagnostică a AFP a scăzut la 200 ng / ml; această valoare împreună cu decoperirea unei mase imagistice arterializate, este sugestivă pentru diagnostic.

Unii indici neinvasivi pot să ne orienteze spre depistarea carcinomului hepatic, alții pot doar să posede un rol confirmativ. În acest studiu am încercat să analizăm rolul de diagnostic și prognostic al alfa-fetoproteinei (AFP) în depistarea carcinomului hepatic la pacienții cu ciroză hepatică delta.

Alfa-fetoproteina a fost determinată la 125 de pacienți identificați cu ciroză hepatică și care au fost luați sub urmărire. A fost efectuată în mediu odată la 6,3 luni (21 săptămâni-24,6 saptam) cu valori normale considerate  $\leq 20$  ng/ml. Nivelele AFP au fost împărțite în: normală (<20 ng/ml), crescută (între 20 și 400 ng/ml), diagnostică (> 400 ng/ml). Astfel, grupul studiat a cuprins (67 de femei și 56 de bărbați) cu vârsta medie de 49,2 de ani. Dintre acești pacienți, pe durata supravegherii au dezvoltat carcinom hepatic 8 pacienți. Odată ce carcinomul hepatocelular a fost suspectat sonografic, pacienții au fost evaluați pentru confirmare pe baza criteriilor de - două tehnici imagistice (ultrasonografie abdominală și tomografie computerizată prin angiografie); sau 3) o tehnică imagistică

plus un nivel  $\alpha$ -fetoproteină serică mai mare de 20 ng / mL sau mai mare. Formațiunile tumorale identificate au fost stratificate în tumoare uni-focală (3 pacienți – 37.5%) și multi-focală (5 pacienți-62.5%). Nivele de AFP <20 ng/ml au fost depistate la majoritatea pacienților (la 76 dintre pacienți), nivel suspect (AFP 20-400 ng/ml) s-a obținut la 41 de pacienți, iar nivel de diagnostic de AFP (> 400 ng/ml) a fost identificat la cei opt pacienți, care au fost stabiliți cu tumoare hepatică malignă (2 pacienți au fost confirmați prin examen histopatologic și 6 pacienți au fost confirmați prin 2 metode imagistice).

Nivele diagnostice ale AFP (>400) au fost obținute la 1 pacient din cei cu tumoare unifocală și la 4 pacienți dintre cei 5 pacienți) dintre cei cu tumori multifocale ( $p=0,024$ ). Corelații ale alfa-fetoproteinei s-au obținut cu scorul OKUDA ( $p=0,007$ ) și cu metastazele extrahepatice ( $p=0,01$ ), precum și cu tromboza de venă portă ( $p=0,001$ ). Astfel, nivelul seric al alfa-fetoproteinei este dependent de numărul formațiunilor tumorale, fiind mai mare în special, în stadiul avansat de boala hepatică. Iar, pacienții care au prezentat tromboză de venă portă de origine malignă (4 pacienți) au fost identificați cu valori serice sporite (valori diagnostice) ale alfa-fetoproteinei.

Screeningul hepatocarcinomului la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta este foarte important și se referă la pacientul în stadiul de ciroză hepatică (astfel, la pacienții care au dezvoltat carcinom s-a observat prezența universală a cirozei hepatice). Totodată, de reținut că nivelul AFP poate varia de la valori normale până la valori diagnostice, adică acest biomarker nu este sensibil în 100% pentru detectarea hepatocarcinomului la pacientul hepatic.

## HDV și riscul pentru hepatocarcinom

Grupul de risc	Preclinică	Clinică
Ciroza hepatică B/D, Grad de fibroză >20 kPa ADN VHB detectabil GDNT < 0.8 Alfa-fetoproteina > 20 U/l	Tumoare hepatică d= 1-2 cm Alfa-fetoproteina > 400 U/l CT/ RMN	Tumoare > 4 cm CT/RMN
factorii de risc	asimptomatica	simptomatica
- Rata sporită de proliferare hepatocitara - Scurtarea telomerilor - Reexpresia telomerazei	- Alterări displastice și neoplastice ale hepatocitelor - Alterarea genomică	- Nodulare - Multinodulare - Infiltrative

Pacienții noștri HDV-pozitiv au avut dimensiuni hepatice scăzute și dovezi indirecte de hipertensiune portală mai severă și stadiu mai precoce de TNM în comparație cu monoinfecția cu VHB, ceea ce poate indica faptul că infecția cu HDV provoacă HCC, posibil indirect, prin inducerea inflamației și a cirozei. Pacienții cu infecții active atât din VHB cât și din VHD și inflamație hepatică activă dezvoltă HCC la o vârstă mai tânără decât cei infectați numai cu VHB.

**Figura 6.2 Infecția virală delta și riscul de carcinom hepatocelular** (ad. A.Țurcanu, 2018)

Astăzi, recomandările generale pentru detectarea precoce a carcinomului hepatic sunt direcționate spre metodele neinvazive în special la pacienții cu ciroză hepatică. Iar biopsia hepatică, de obicei este recomandată în prezența unei formațiuni hepatice uninodulare pe un ficat non-cirotic sau cirotic compensat. Astfel, conform Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) care în 2013 a dedicat „ Ziua mondială a sănătății” cancerului hepatic, pentru a atrage atenția asupra confruntării crescânde cu carcinom hepatocelular pe plan mondial. Prin prisma datelor actuale, CrH ar putea fi prevenit, diagnosticat și tratat. Recunoașterea strategii de prevenție primară și secundară al carcinomului hepatocelular, precum și ale metodelor de diagnostic și posibilități de tratament complexe, care includ transplantul de organ este primordială și esențială în țara noastră.

### 6.4. Concluzii la capitolul 6

1. Factorul de vârstă joacă un rol important în stabilirea și evoluția hepatopatiei cronice virale B și cei cu HDV. Vârsta diagnosticării infecției VHB la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta a fost cu o mediană de 25 ani versus pacienții mono-infectați, care au depistat VHB la o vârstă mediană de 18 ani. Pe când vârsta stabilirii cirozei hepatice a fost similară în cazul infecției duale și mono-infecției (44-45 de ani).

2. Factorii virali s-au comportat diferit în ambele grupe de pacienți, precum și au interacționat cu evoluția bolii hepatice. La pacienții cu hepatopatie cronică virală delta s-a identificat apariția de seroconversie anti-HBe, atât în stadiul de ciroză VHD vs ciroza VHB,  $P = 1,7 \times 10^{-6}$ , precum și în stadiul de hepatită VHD vs hepatită VHB ( $2.4 \times 10^{-17}$ ).
3. Încărcătura virală pentru ADN VHB în ser a fost mai redusă la pacienții cu infecție dublă versus cei cu monoinfecție ( $P = 0,0024$ ). Iar la pacienții cirofici pozitivi pentru ARN VHD, încărcăturile virale au fost mai mici decât în la pacienții non-cirofici ( $P = 0.002$ ).
4. Profilul biochimic a fost diferențiat în grupa pacienților cu hepatopatie cronică virală VHB versus pacienții cu dubla infecție. Pentru pacienții cu hepatită cronică virală delta versus pacienții cu hepatita VHB a fost caracteristică reducerea nivelului leucocite ( $p < 0.001$   $2.1 \times 10^{-5}$ ), trombocitelor ( $p < 0.001$   $1.6 \times 10^{-13}$ ), sporirea ALT ( $p < 0.05$   $2.4 \times 10^{-6}$ ), AST ( $1.7 \times 10^{-4}$ ), GTP ( $p = 0.0099$ ), bilirubina totală ( $5.0 \times 10^{-4}$ ), albumina ( $p = 0.0039$ ). Iar, în subgrupa pacienților cu ciroză hepatică delta versus ciroză hepatică HBV (monoinfecție) s-au înregistrat diferențe semnificative pe linia trombocitelor ( $p = 0.0006$ ) și nivelului GTP ( $p = 0.0105$ ).
5. Evaluarea fibrozei hepatice prin scorurile non-invazive a evidențiat o fibroză mai severă în cazul pacienților cu hepatopatie cronică virală delta. În ciroza hepatică delta se înregistrează diferențe semnificative ale indicilor și scorurilor de fibroză versus pacienții cu ciroză hepatică B (AgHBs+/anti-HDV-), și anume scorul FibroQ ( $3.0 \times 10^{-4}$ ), FIB4 ( $3.0 \times 10^{-4}$ ), APRI ( $p = 0.0038$ ), GPRI ( $p < 0.0001$ ), PLR ( $p < 0.0001$ ).
6. Pacientul cu hepatopatie cronică virală delta, cu achiziția intrafamilială de VHD (OR 2.09, CI95% 1.06-4.12), persistența infecției cu virusul hepatitic B activ, ADN VHB detectabil (OR 4.13, CI95%: 3.12-9.65) și infecție delta pozitivă ARN VHD detectabil, OR 3.13, CI95%: 1.42-6.21) este supus riscului de a progresa rapid spre ciroză hepatică pe o durată mediană de 2,5 ani.
7. Toți pacienții care au dezvoltat carcinom hepatic au fost inițial stabiliți cu ciroză hepatică. Astfel, din numărul pacienților cu ciroză hepatică delta (125 de pacienți) se identifică ca 6.4% dintre cazuri au dezvoltat carcinom pe durata de supraveghere de la 8 - la 61 de luni.
8. Nivelul AFP a crescut odată cu numărul formațiunilor și a fost semnificativ mai mare în stadiile avansate față de cele incipiente.

9. Astfel, în studiul nostru se înregistrează circa 10% dintre pacienții cu ciroză hepatică delta înrolați au decedat. 12 pacienți au decedat pe durata medie de 35.5 săptămâni, dintre care 8 pacienți de hemoragie digestivă superioară, 2 pacienți – cancer hepatic, 1 pacient pneumonie, 1 pacient – cauză necunoscută. Se observă că cea mai frecventă cauză de deces este hemoragia digestivă superioară

#### *Caz clinic.*

Pacient tânăr (bărbat, 42 ani), care suferă de hepatopatie cronică virală delta de 15 ani, nu a administrat tratament antiviral, este suspectat clinic pentru carcinom hepatic și este investigat prin tomografie computerizată cu modul de angiografie, ulterior fiind supus biopsiei hepatice. Menționăm că valoarea AFP este 45.2 ng/ml (valoare suspectă, dar nu și cu rol de diagnostic). Astfel, tabloul CT-Angiografie prezintă (2018): ficatul de dimensiuni relativ obișnuite, cu contur boselat, parenchimul cu densitate nativă +50 HU, structura neomogenă, contrastare neuniformă: a) formațiune hipervasculară cu contur regulat, localizată în S7, densitatea nativă +41 HU, faza arterială +112 HU, faza portală +127 HU, faza tardivă +86 HU, cu structură neomogenă – sectoare hipodense slab delimitate determinate în faza portală și tardivă – posibil necrotice, dimensiunile totale ale formațiunii =7.1x7.0x4.5, cu deformare locală a conturului hepatic – prin extindere extrahepatică; b) multiple formațiuni de volum hipervascularare, cu contur neregulat, localizate difuz în ambii lobi, dimensiuni de la 0.65 cm (S5 hotar cu S6), cu intensificare evidentă până la +12 HU postcontrast (faza portală) și aspect izo-hipodens în faza tardivă. Concluzie: Aspect CT caracteristic pentru leziune malignă primară hepatică în S7, cu multiple leziuni secundare în ambii lobi. Hipertensiune portală ușoară. Examen histopatologic: biopsie hepatică (2018) – proliferare tumorală malignă carcinomatoasă cu arhitectură pseudolobular/acinară. Examenul imunohistochimic relevă carcinom hepatocelular moderat diferențiat (G2) grad Edmonson 2. A fost inițiat tratamentul cu Nexavar (Sorafenib), 800 mg zilnic. În 2019 tabloul clinic – stabil, fără agravare. Imagistic se mențin metastazele hepatice și pulmonare, dar fără progrese. Continuie terapia cu Sorafenib. AFP 46.47 ng/ml. În 2020 starea clinică se agravează. Pacientul întrerupe tratamentul cu Sorafenib. Deces. Supravețuirea pacientului cu HDV și carcinom hepatocelular stabilit prin biopsie hepatică a fost de 2 ani. Acest pacient are o supraviețuire bună, din considerentele că a administrat terapie specifică cu Sorafenib. Și, totuși depistarea în stadiu tardiv al acestei boli, reduce drastic speranța de viață a pacientului.

## 7. SINTEZA REZULTATELOR OBTINUTE

Conform datelor statistice oficiale, în anul 2017, în Republica Moldova au fost înregistrate în total 86.791 cazuri de hepatită cronică, ciroze hepatice și cancer hepatic. În structura acestor patologii prevalează hepatitele cronice cu 76.581 cazuri (2017), alcătuind 88,2% din numărul total de cazuri. Asocierea diferitor factori de risc în evoluția hepatitelor cronice duce la cronicizarea acestora în ciroze hepatice și cancer hepatic. Astfel, în 2017 se înregistrează 9829 cazuri de ciroze hepatice sau 11,32% din numărul total, iar evoluția cirozelor în cancer hepatic a fost raportată la 381 de bolnavi, adică 3,8% din numărul total. În această ordine de idei se evidențiază un raport al hepatitelor cronice față de ciroze hepatice de 7:1, iar cirozele hepatice față de cancerul hepatic constituie 25:1. Totodată, s-a constatat o corelație directă puternică între morbiditatea prin hepatite cronice și ciroze hepatice ( $r=0,79$ ). Așadar, hepatitele virale cronice conduc în mod direct la sporirea morbidității prin ciroze hepatice (A. Paraschiv, Epidemiologie, 2017).

La aproape 40 de ani de la descoperire (descoperit în 1977 de Mario Rizzetto), VHD rămâne o provocare pentru clinicieni și cercetători. Virusul conține un genom mic ARN și o singură proteină, antigenul delta, are caracteristici unice, incluzând un mecanism de replicare ARN direcționat de ARN al genomului catalizat de ARN polimeraza. Activitățile enzimatice nu au fost identificate în antigene Delta, ceea ce face dificilă identificarea obiectivelor potențiale pentru terapii specifice și eficiente. Dezvoltarea unor astfel de terapii este crucială pentru reducerea numărului de pacienți cronici care progresează la ciroză și carcinom hepatocelular. Povara bolii cauzată de VHD este cel mai probabil subestimată, deoarece există o lipsă considerabilă de date epidemiologice din mai multe țări în care virusul VHB este foarte răspândit. Infecția cu VHD se identifică doar la pacienții AgHBs pozitivi (Rizzetto 1977, Wedemeyer 2010) totodată prezentând o evoluție mai severă și cu progresie mai rapidă a fibrozei hepatice decât VHB monoinfecție (Hughes, 2011, Manesis 2013). Prevalența infecției cu VHD a scăzut semnificativ în anii 1980-1990 în unele regiuni ale lumii, cum ar fi Italia, Spania, Taiwan și Turcia ca urmare a vaccinării împotriva VHB, screening-ului sistematic și aplicabilitatea protocoalelor naționale împotriva infecțiilor parenterale. Cu toate acestea, prevalența VHD a încetat să scadă spre sfârșitul anilor 1990 în Europa Centrală și de Vest. Recrudescența infecției cu VHD în țările dezvoltate din Europa, cum ar fi Italia, Marea Britanie, Germania sau Franța, este legată în principal de migrația crescândă a indivizilor din zone endemice din Europa de Est,

Africa, Turcia și Orientul Mijlociu. În centrele terțiare de referință din Europa, 10% - 16% dintre pacienții AgHBs pozitiv sunt pozitivi pentru anticorpii anti-VHD. România se prezintă ca o zonă hiperendemică pentru infecția cu VHD, însă prevalența reală în rândul indivizilor cu AgHBs pozitiv nu este cunoscută. Datele raportate de la centrele de referință românești de gastroenterologie și boli infecțioase indică o prevalență a anticorpilor anti-VHD între 20 și 28%. co-infecția cu Delta a fost raportată la 37,9% și 51,2% dintre pacienții cu hepatită cronică virală B, la 56% dintre pacienții cu boală hepatică avansată și la 48,7% dintre pacienți cu carcinom hepatocelular. O problemă reală astăzi o constituie că o mare parte dintre pacienții AgHBs pozitivi nu sunt testați pentru infecția cu VHD. Astfel, un studiu din Grecia, realizat de Manesis și echipa în 2013 concluzionează că testarea pentru VHD s-a redus evident în ultimul deceniu, menționând că doar 1/3 dintre subiecții cu AgHBs sunt testați pentru VHD. În SUA din 25000 de persoane AgHBs pozitive doar 8.5% au fost testate pentru anticorpii VHD, iar dintre cei testați 3.4% au fost diagnosticați cu VHD, care au prezentat de o rată 2.9 ori mai mare pentru cancerul hepatocelular (Kushner, 2015).

După cum observăm din analiza noastră pacientul cu hepatopatie cronică virală delta se identifică ca un bolnav de vârstă tânără (apt de muncă), care se prezintă la vizita primară (în 55,6% cazuri) deja cu stadii avansate de boală hepatică, cum ar ciroza hepatică, dintre care o jumătate sunt în clasa decompensată. Un alt indiciu care ar atrage atenția către pacientul cu hepatopatie cronică virală delta este prezenta acestei infecții la mai mulți membri ai familiei, iar o particularitate ar fi că vârsta medie a pacienților suspectați pentru a fi contaminați în cadrul familiei a fost semnificativ mai mică decât vârsta altor pacienți ( $46,0 \pm 9,1$  y vs  $50,6 \pm 9,2$  y,  $2,1 \text{ E-}04$ ). Același lucru a fost valabil și pentru vârsta când s-a diagnosticat ciroza hepatică, care a fost mult mai mică (adică vârsta mai tânără) la pacienți cu factor de risc intrafamiliar ( $40,8 \pm 11,2$  vs  $46,9 \pm 9,7$ ,  $P = 0,005$ ). Interesant, că pacienții cu modul de transmisie intrafamiliar au provenit în mare parte din regiunea sudică a țării. Am observat că pacienții din această regiune (de sud) au fost, de asemenea, mai frecvent pozitivi pentru ADN-ul VHB din sânge (42,1% față de 22,2%,  $OR = 2,5$ ,  $CI\ 95\%: 1,3-5,0$ ,  $P = 0,004$ ). Iar atunci, când stratificăm subgrupele de pacienți cu contaminare intra-familială în funcție de membrul familiei identificat la originea bolii (părinți sau frați), au fost evidente variații ale modelelor de transmitere. Astfel, modelul de transmisie VHD între frați a fost mult mai răspândit în sudul Moldovei (64,2% față de 20,0%,  $OR = 4,6$ ,  $CI\ 95\% = 2,0-10,7$ ,  $P = 6,2\text{E-}05$ ). Această observație sugerează că condițiile de trai în familie și nu numai circumstanțele de naștere a copiilor sunt propice pentru transmiterea virusului delta în această parte a țării. În plus, dacă un frate era transmițătorul virusului putativ,

pacienții contaminați erau mai des bărbați (64,0% față de 44,1%, OR = 2,3, CI 95% = 1,05-5,3, P = 0,028). În cazul transmiterii hepatitei între frați, se identifică o distanța de timp mai îndelungată până la diagnosticul hepatitei delta ( $12,8 \pm 8,4$  vs  $9,9 \pm 6,8$ , P = 0,027), în timp ce încărcătura virală ARN VHD a fost mai scăzută ( $4,9 \pm 1,5$  log<sub>10</sub>IU / ml față de  $5,7 \pm 1,6$  log<sub>10</sub> IU / ml, P = 0,026).

Deși cunoștințele despre patogenia infecției cu virusul delta sunt insuficiente, ultimele cercetări definesc un proces imunodependent în infecția cu VHD. Totodată a fost observat și un patern citopatic direct de afectare a tesutului hepatic, în special în prezența genotipului 3 VHD. Unele studii sugerează că viremia VHD nu se asociază cu gradul de inflamație hepatică (VHD genotip 1), ci severitatea procesului hepatic ar fi influențată de cantitatea AgHBs. În studiul efectuat de Rafaela Romeo și echipa (Italia, 2014) se relatează că hepatita cronică virală delta progresează la ciroză și cancer hepatocelular, iar această tendință este mai mare cu cât este mai mare nivelul viremiei VHD la momentul prezentării. Cu toate acestea, odată ce s-a dezvoltat ciroza, rolul nivelurilor ridicate de VHD ca predictor al unui rezultat negativ devine atenuat. VHD induce stimularea genelor interferonului precum și citochinelor proinflamatorii (mult mai evident decât în mono-VHB) contribuind la persistența și severitatea inflamației (Giersch 2015). Polimorfismul genei IL28B se asociază cu persistența HBsAg în VHD (Karatayli 2015). Frecvența și cantitatea sporită de CD4 (mai evidentă decât în mono-VHB) este detectată în hepatita cronică delta cu evoluție stabilă (moderată), iar răspunsul IFN gamma și IL2 este mai semnificativ în VHD cu viremie redusă (Aslan 2006, Grabowski 2011). Fagiuah S și coaut, 2002 relatează despre impactul clinic al infecției cronice virale delta în zonele endemice dependente evident de proporția persoanelor infectate cu VHB și care suportă transplant hepatic. Astfel, Fagiuah S publicând despre experiența italienilor în transplantarea hepatică prezintă că 36% dintre pacienții transplantați cu VHB au prezentat o infecție concomitentă cu virusul hepatic delta.

Până astăzi, încă nu sunt definiți factorii de prognostic în progresia bolii hepatice induse de virusul delta, dar totuși sunt dovezi care încriminează rolul unor determinanți în acest proces. Și acestui rol sunt atribuiți: genotipurile virusului hepatitic delta; nivelul replicării VHB și VHD; coinfecția cu alți viruși, cum ar fi VHC sau HIV.

În 1995 Wu IC, Chen TZ și Huang YS explică scenariul evoluției infecției virale delta, astfel că în faza inițială se determină o hepatită cronică cu activitate înaltă, ulterior se prezintă ca un proces cronic cu activitate moderată. Iar din acest punct, boala hepatică poate progresa spre ciroza hepatică or poate rămânea într-o remisie prelungită caracterizată prin descreșterea replicării VHB și VHD.



Saracco G., Rosina F. și Brunetto MR evidențiază încă în 1987 că dezvoltarea cirozei hepatice se determină la 70-80% dintre pacienții cronici infectați cu VHD, iar 15% dintre ei se dezvoltă în primii doi ani.

Evoluția fibrozei hepatice la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta poate fi în relație cu parametrii virusologici și biologici. Astfel, pentru conștientizarea acestor indici am evaluat cohorta de pacienți din două direcții: o direcție a fost evaluarea markerilor non-invazivi ai fibrozei hepatice și identificarea unui scor cel mai sensibil în prognozarea evoluției pentru aceasta categorie de pacienți. Iar altă direcție a fost identificarea unui scor național care ar putea fi utilizat și de pacienți.

Referindu-ne la profilul clinico-biologic al pacientului cu hepatopatie cronică virală delta identificat în cercetarea noastră, putem menționa un set de nouă parametri (*hemoglobină, leucocite, trombocite, albumină, INR, ALT, GGT, bilirubină totală și colinesterază*) care s-a prezentat diferit semnificativ între pacienții cu hepatită cronică virală delta și ciroză hepatică virală delta. Această baterie de teste poate fi recomandată la orice nivel de asistență medicală (primară sau specializată, ambulatorie sau spitalicească) pentru caracteristica pacientului și selectarea terapiei adecvate, astfel vom omite multitudine de investigații „fără efect”, neargumentate și costisitoare. Cei mai importanți factori (puterea de discriminare reprezentată prin:  $<1,0E-06$ ) au fost hemoglobina ( $122 \pm 15$  g / L față de  $133 \pm 16$  g / L,  $1,7E-07$ ), număr de trombocite ( $111 \pm 65$  G / L vs  $159 \pm 47$  G / L,  $5,3E-09$ ), valoarea de albumină ( $31,8 \pm 6,9$  g / L față de  $37,4 \pm 3,9$  g / L,  $3,3E-11$ ) și INR (INR,  $1,41 \pm 0,25$  față de  $1,18 \pm 0,16$ ,  $1,5E-11$ ). Cu scop de discriminare între ciroza compensată și cea decompensată, noi am creat un scor neinvaziv care poate fi aplicat la diferite etape de asistență medicală, precum și poate fi utilizată chiar de pacient! Am încercat să construim propriul nostru sistem de predicție de descompensare a cirozei hepatice folosind variabilele capabile să discrimineze între pacienții progresivi și non-progresivi. Și astfel, a fost creat scorul de ciroză GDNT (GDNT - Gastroenterology Department Nicolae Testemitanu). Scorul GDNT include variabile de laborator, cum ar fi valoarea albuminei, numărul de trombocite, nivelul de bilirubină totală și indicile INR, precum și o caracteristică oferită prin examinarea ecografică a determinării dimensiunilor splinei. Sistemul nostru de punctare a fost capabil să diferențieze corect pacienții cu *decompensare, compensare și non-ciroză*. Iar curba ROC a scorului GDNT a fost mai performantă decât toate sistemele de punctare testate. Scorul GDNT este primul și unicul scor elaborat în țara noastră, care este în măsură să prezică decompensarea hepatică la pacienții cu ciroză hepatică delta. Conform acestui scor noi vom putea stratifica pacienții pentru tratament farmacologic, de cei care necesită transplant hepatic.

În cele din urmă, tratamentul pacienților cu hepatopatie cronică virală delta a fost foarte variat, astfel au fost administrate tratament antiviral (interferon+/- analogi nucleozidici) și hepatoprotectoare. S-a obținut că, ciroza hepatică (40,2% față de 61,7%, OR = 0,41, IC 95% = 0,22-0,77, P = 0,003) și complicațiile sale (33% față de 57,4%, OR = 0,37, IC 95%: 0,15-0,87, P = 0,034) au fost mai puțin răspândite la pacienții tratați cu interferon. Interferonoterapia rămâne tratamentul de bază pentru VHD (această afirmație este valabilă în anul 2020, când a fost încheiată cercetarea), eficacitatea fiind de 20-25% sub o durată de terapie prelungită (mai mult de 1 an) (Farci 2004, Wranke 2017). Relaps-ul ARN HDV este frecvent întâlnit la pacienții cu răspuns virusologic postterapie (Heidrich 2014). Clearance-ul AgHBs este punctul final în terapia infecției cronice virale delta. Monitorizarea cantitativă a AgHBs este necesară la toți pacienții cu VHD pe IFN-terapie, care va fi stopată la pierderea AgHBs (cu sau fără apariția antiHBs). Astfel, viremia ARN VHD persistentă, precum și persistența unui nivel mai mare de 1000 ui/ml de AgHBs, gradul de fibroză avansat sunt factorii ce influențează dezvoltarea hepatocarcinomului. Sunt date care demonstrează că chiar dacă pe interferonoterapie s-a atins negativarea ARN VHD prelungirea tratamentului cu analogi nucleozidici pentru VHB ar reduce semnificativ riscul de hepatocarcinom.

Chiar și în veacul XXI, Republica Moldova rămâne una din cele mai săraci țări ai Europei (Produsul intern brut pe cap de locuitor, PIB, 1960 € în Moldova și 27660 € în Uniunea Europeană) și, prin urmare, trebuie să se confrunte cu o populație cu probleme de sănătate serioase. Printre acestea, bolile hepatice ocupă o poziție îngrijorătoare, deoarece țara afișează atât cele mai mari rate de cancer hepatic primar, cât și cea mai mare rată de deces provocată de ciroza hepatică în Europa. Această situație ne-a determinat să realizăm un studiu retrospectiv al cazurilor de carcinom hepatocelular, depistate în secțiile spitalului terțiar (republican) din Republica Moldova.

Unul din scopurile acestei analize a fost de a estima rata factorilor de risc ai carcinomului hepatic în Moldova pentru a oferi factorilor de decizie de sănătate publică națională și europeană mai multe informații despre situația locală îngrijorătoare.

În ceea ce privește factorii de risc ai carcinomului hepatic, cea mai importantă caracteristică a situației din Moldova a fost, desigur, captată de cei trei viruși responsabili de infecțiile hepatice persistente. Într-adevăr, cel puțin unul dintre acești viruși (HBV, HCV sau HDV) a fost prezent în mai mult de 80% din cazuri în analiza actuală. O astfel de situație care nu este frecvent întâlnită pe întregul continent european în care aportul greu de alcool și condițiile dismetabolice (diabet zaharat tip 2, obezitate) reprezintă adesea cauze importante ale hepatocarcinomului.

Într-un reviu recent, publicat de Martel și colab., s-a observat că Italia a fost țara europeană cu cea mai mare rată de cazuri de cancer hepatic asociat cu infecțiile hepatice virale (78,4%) (de Martel C și col., 2015). Deși rezultatele noastre merită o confirmare suplimentară, se pare că Moldova ar putea chiar să depășească această rată.

Mai mult, întrucât nu am avut ocazia să explorăm folosind metode moleculare pentru prezența infecției B oculte la pacienții non-B non-C (9 dintre ei au fost pozitivi pentru anti-HBc), avem astfel dreptul de a ipoteza că proporția reală dintre cazurile asociate virusului ar putea fi chiar mai mari decât cele raportate în prezent.

Situația moldovenească este, așadar, pentru hepatita cronică mai asemănătoare cu cele observate în Africa sub-sahariană sau în Asia de Orient Extrem decât în epidemiologia obișnuită europeană (Raza S și col., 2007). Mai mult, am observat că o pătrime din numărul pacienților cercetați, a fost co-infectată (fie HBV / HDV, fie HBV / HCV), situație aparent observată rar în cazurile de hepatocarcinom din Europa. Ca o ilustrație, rata de co-infecție cu VHB / VHC (13%) a fost mai mare decât cea ce se raportează în prezent din restul continentului european, unde cea mai mare prevalență a fost observată în Belgia (8,5%) [de Martel și col., 2015].

Problema hepatitei virale în Moldova este cunoscută de mult timp, deoarece a fost raportată încă din perioada Uniunii Sovietice (Kostrita S, 1994). Este interesant faptul că în dintre țările europene, situația din țara noastră poate fi comparată doar cu situația observată în România, cunoscută pentru endemiile ridicate atât pentru VHB, cât și pentru VHC, în ceea ce privește standardele Uniunii Europene. În general, distribuția factorilor de risc de infecție observată la pacienții cu hepatocarcinom din Chișinău este similară cu cea raportată recent de o mare instituție terțiară din București (Grigorie L., 2017). În această evaluare se raportează că practic 90% dintre cei 670 de pacienți cu evaluări serologice au fost infectați cu un virus hepatitic. La fel ca la Chișinău, VHC a fost predominant la București (54% față de 55%), în timp ce infecția cu VHB a fost puțin mai frecventă la pacienții din București (42% față de 36%). Dacă să ne referim la cercetările din țările învecinate se observă că infecția cu virusul hepatitic delta a fost, însă, ceva mai puțin depistat la pacienții AgHBs pozitivi din București decât în cei din Chișinău (34% față de 47%). De asemenea, infecțiile duale (16% față de 24%) sau triple (0,8% față de 7,2%) au fost mai puțin răspândite la pacienții din București decât în analiza noastră. Dincolo de epidemiologia carcinomului hepatocelular *sensu stricto*, infecțiile triple sunt considerate un semn distinctiv frecvent al pacienților din Europa Centrală.

O caracteristică interesantă a analizei noastre a fost prezența frecventă a hepatopatiei delta, deoarece acest agent era de obicei slab-prezent în cazurile de hepatocarcinom la pacienți europeni. Ca factor de risc, reprezintă fără îndoială un semn distinctiv al Republicii Moldova și României. După o fază inițială de controverse, se știe că infecția cu virusul hepatitic delta este asociată cu o progresie mai rapidă a bolii hepatice și cu o rată mai mare de conversie spre hepatocarcinom. Rolul său în tumorogeneză hepatică este cunoscut a fi în special în detrimentul populațiilor care trăiesc în Africa Centrală, Turcia de Est sau Mongolia, unde se găsește în 27-80% din toate cazurile de carcinom hepatocelular.

Unele cercetări menționează, că replicarea persistentă a virusului hepatitic Delta conduce la inflamația hepatică prelungită și severă și poate determina dezvoltarea precoce de ciroză hepatică și carcinom hepatocelular. VHD este implicat în selectarea formelor mutante de VHB, cu rol în capacitatea replicativă a ambilor virusi (Shirvani-Dastgerdi 2016). VHD, se pare că are un rol direct în carcinogeneza hepatică (prin alterarea ADN metilării). Carcinomul hepatic indus de VHD este mai frecvent întâlnit la pacienții tineri (Benegiamo 2013, Manesis (2013).

S-a raportat că virusul hepatitic B este responsabil pentru dezvoltarea carcinomului hepatocelular, iar virusul hepatitic delta pare să exercite un control epigenetic asupra transcripției și replicării VHB (Khokhar RH și colab. 2017).

Rezultatele studiului nostru relatează, despre apariția hepatocarcinomului la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta mai tineri cu 6 ani, decât cei cu VHB-monoinfecție sau VHC. Totodată se observă că tumoarea pare să fie mai mare ca diametru, iar severitatea bolii este mai înaltă, fiind exprimată prin scorul CLIP înalt. Un alt punct la care trebuie de atras atenția este rolul alfa-fetoproteinei în acest studiu. Se observă că doar la 48% dintre pacienți valoarea alfa-fetoproteinei este mai mare de 400 ng/ml (această valoare este promovată ca veridică pentru screeningul carcinomului hepatic), iar la fiecare al 4-lea pacient nivelul acestui biomarker este în limitele normalului. Alfa-fetoproteina (AFP) este unul din testele controversate cu utilitate în screeningul carcinomului hepatocelular. Astfel, AFP poate fi utilă în diagnosticul și urmărirea cazurilor de cancer hepatic primar, deși nivelurile crescute mai sunt asociate și cu alte afecțiuni maligne, altele decât cancerul hepatic primar.

Studiile sugerează, că la pacienții cu cancer hepatic manifestat clinic, nivelurile AFP > 400 ng / ml sunt confirmatoare pentru prezența acestui tip de cancer. Unii pacienți cu cancer hepatic primar pot prezenta valori normale sau o creștere moderată a AFP, dar această nu poate fi ca criteriu de

excludere pentru un diagnostic de cancer hepatic. Astfel, acest marker este considerat util pentru urmărirea evoluției clinice ale persoanelor cu cancer hepatic. S-a sugerat că valorile AFP sunt mai susceptibile să se majoreze odată cu creșterea stadiului bolii și sunt de prognostic pentru a verifica eficacitatea tratamentului anticanceros. Tot, din această analiză se desprinde faptul că cele mai frecvente semne clinice a pacienților cu hepatocarcinom indus de infecțiile virale B, C și Delta sunt: durerea în hipocondriul drept, urmată de pierderea ponderală, ascita și prezența varicilor esofagiene. Iar, supravețuirea acestor pacienți prezintă o dependență semnificativă de nivelul educațional, și prezența consumului de alcool.

Astfel, conform rezultatelor obținute am propus de introdus în protocolul clinic național criterii noi de spitalizare pentru pacienții cu hepatopatie cronică virală delta:

- Hepatita cronică virală B cu sau fără antigen Delta cu activitate maximală asociată cu manifestări extrahepatice (endocrine, reumatologice, hematologice, renale, alte boli hepatice) pentru aprecierea tacticii terapeutice.
- Hepatita cronică virală B cu sau fără antigen Delta, care au dezvoltat reacții adverse semnificative pe fondalul tratamentului antiviral (sau care au dezvoltat rezistență la TAV) pentru selectarea adecvată a tratamentului.
- Hepatita cronică (sau ciroză hepatică) virală B cu sau fără antigen Delta cu suspexție de carcinom hepatocelular (formațiune tumorală identificată prin metodă imagistică +/- nivel sporit al alfa-fetoproteinei) pentru evaluarea diagnosticului clinic și identificarea tacticii terapeutice.
- Ciroza hepatică virală B cu sau fără Delta cu progresarea rapidă a fibrozei hepatice/hpertensiunii portale/hipersplenismului pentru evaluarea indicațiilor pentru transplant hepatic sau splenectomie.
- Necesitatea intervențiilor și procedurilor de diagnostic, care nu pot fi executate în condiții de ambulatoriu (laparoscopia, biopsia ficatului, colangiografia endoscopică retrogradă etc.).

Revenind la cele expuse anterior cu privire la rezultatele obținute în cercetare o caracteristică remarcabilă este că toate cele trei virusuri responsabile pentru infecțiile hepatice persistente, adică HBV, HCV și HDV, sunt foarte răspândite și acționează adesea împreună prin asocieri duble sau triple. Deși rata infecțiilor multiple nu atinge nivelurile îngrozitoare observate în Mongolia, țara cu cea mai mare incidență a cancerului hepatic primar din lume, considerăm că această sarcină grea a infecțiilor hepatice multiple care afectează pacienții moldoveni cu carcinom hepatocelular este, probabil, responsabilă pentru incidența deosebit de mare a acestei boli în țară în raport cu standardele

europene actuale. Stabilirea endemicităților hepatitei virale la niveluri atât de ridicate este, desigur, o reminiscență a situației încă observată în prezent în România vecină și diferențiază ambele țări de vecinii din jur (Bulgaria, Ungaria, Serbia, Ucraina).

Deocamdată, în Republica Moldova ar trebui implementate măsuri de screening pentru a detecta pacienții infectați cu virusuri hepatice care încă nu știu de prezența lor. Disponibilitatea unor antivirale eficiente cu acțiune directă, în special a celor care vizează VHC, ar putea reduce numărul de cazuri de carcinom hepatic într-un viitor apropiat. Comportamentele la risc (tatuaj, consum de droguri intravenoase), în special responsabile de răspândirea infecției cu virusul hepatitei B, ar trebui să fie recunoscute în mod clar ca periculoase și descurajante în subgrupurile în cauză ale populațiilor. În sfârșit, ar trebui efectuate studii de teren în sud-vestul Moldovei pentru a înțelege mai bine modalitățile de circulație a VHB și HDV.

Astfel, studiul nostru atenționează două aspecte relevante pentru sistemul medical din Republica Moldova: unul din ele este că hepatocarcinomul este circa în 80% cazuri determinat de una din infecțiile hepatice: VHB, VHC, VHD, iar alt subiect este că pacienții cu hepatopatie delta formează grupul tînăr de pacienți, care se prezintă cu tumori mai mari și mai agresive, supraviețuirea fiind foarte mică, iar tratamentul existent este inefficient.

Deci, screeningul infecțiilor hepatice virale B, C și Delta rămâne actual în țara noastră. Astfel, screeningul activ al acestor infecții hepatice rămâne a fi prioritatea de bază pentru sistemul nostru de sănătate, iar implementarea acestei măsuri ar conduce într-un timp definit depistarea totală și, posibil eradicarea acestor infecții. De menționat că conform regulamentului OMS pentru screeningul HBV cu sau fără HDV se recomandă efectuarea a 5 indici (Pre- și Post-Test):

Consimțământ. Persoanele care sunt testate pentru hepatită virală B cu sau fără antigen delta trebuie să dea consimțământul informat pentru a fi testate și consiliate. Consimțământul verbal este suficient. Trebuie informați despre procesul de testare și despre dreptul lor de a refuza. Furnizarea de informații despre testare și necesitatea consimțământului poate fi livrată într-un cadru de grup, cum ar fi educația pentru sănătate în grup, dar pacienții ar trebui să dea consimțământul în mod individual și privat. Personalul medical trebuie să explice cu atenție modul în care o persoană poate refuza testarea și să se asigure că nimeni nu-i constrânge să fie testați și fiecare persoană are o oportunitate privată de a renunța la testare.

Confidențialitate - asigurarea unei condiții confidențiale. Testarea trebuie să fie confidențială, ceea ce înseamnă că rezultatele nu vor fi dezvăluite nimănui fără acordul expres al persoanei testate.

Confidențialitatea se aplică nu numai rezultatelor testelor și raportului privind starea hepatitei, ci și oricăror informații personale, cum ar fi informații privind comportamentul sexual și utilizarea drogurilor ilegale.

Consiliere. Informațiile pre-test pot fi furnizate într-un set de grup, dar toți oamenii ar trebui să aibă posibilitatea de a pune întrebări într-un cadru privat, dacă solicită acest lucru. Toate testele de hepatită B cu sau fără antigen delta trebuie să fie însoțite de consiliere adecvată post-test, pe baza rezultatului specific al testului de hepatită și a stării hepatitei raportate. Mecanismele de evaluare a calității, precum și supravegherea și sistemele de îndrumare ar trebui să fie instituite pentru a asigura furnizarea de calitate superioară.

Corectitudine. Oferirea unor servicii de testare de înaltă calitate, iar mecanismele de evaluare a calității ar trebui să asigure că oamenii primesc un diagnostic corect. Toate persoanele care primesc un diagnostic serologic pozitiv al VHB ar trebui să aibă un rtPCR pentru a confirma prezența infecției virale și a evalua indicațiile lor de îngrijire și tratament înainte de începerea terapiei antivirale. Conexiune. Legătura cu serviciile de prevenire, tratament și îngrijire ar trebui să includă urmărirea eficientă și adecvată, inclusiv prevenirea pe termen lung și sprijinul tratamentului persoanelor cu VHB cu sau fără antigen delta. Asigurarea testării hepatitei virale în cazul în care nu există acces la îngrijiri sau o legătură slabă la îngrijire și tratament, are un beneficiu limitat pentru cei cu hepatită. Este important să reținem grupul de risc care necesită a fi testat obligator pentru infecția cu VHB/ VHD (și VHC). Aceste persoane trebuie testate la orice nivel de asistență medicală (dacă anterior nu a fost testat). Categoria de persoane care trebuie testată obligator pentru infecția cronică cu virusul hepatitei B și ulterior HDV.

Toate aceste etape sunt necesare de a fi aplicate în populația din grupul de risc pentru hepatita cronică virală B cu sau fără antigen delta. Astfel, testarea pentru aceste tipuri de hepatită virală poate fi efectuată pe câteva dimensiuni: testarea în rândul populației generale și testarea bine-direcționată (testarea în grupul de risc). În localitățile cu o seroprevalență a HBsAg mai mare de 2% în rândul populației generale, se recomandă ca toți adulții să dispună de acces de rutină la testele serologice HBsAg (iar la pozitivitatea AgHBs, să fie testați pentru Ac.antiVHD) și să li se ofere astfel de testare, ca parte componentă al serviciilor de prevenire, asistență și tratament. În localitățile cu o seroprevalență >2% a AgHBs, în rândul populației generale, se recomandă ca testul serologic AgHBs ((iar la pozitivitatea AgHBs, să fie testați pentru Ac.antiVHD ) să fie oferit în mod de rutină tuturor

gravidelor în clinicile antenatale ca parte componentă a serviciilor de prevenire, asistență și tratare. Cuplurile și partenerii trebuie să beneficieze de testarea la VHB.

Testare bine-direcționată în rândul celor mai afectate populații:

- Adulți și adolescenți din populațiile cele mai afectate de infecția cu virusul hepatitic B (i.e. care fac parte fie din populația cu o seroprevalență înaltă de VHB sau care în trecut au fost expuși și/sau au parte de conduite cu risc înalt privind infecția HBV);
  - Adulții, adolescenții și copiii cu suspiciune clinică de hepatită virală cronică (i.e. simptome, semne, markeri de laborator);
  - Partenerii sexuali, copiii și alți membri de familie, a celor care sunt infectați cu VHB;
  - Lucrătorii medicali: în toate locațiile, se recomandă să fie oferit testul serologic AgHBs și vaccinarea împotriva hepatitei B să fie oferită tuturor lucrătorilor medicali care n-au fost vaccinați anterior
  - Persoanele din grupul de risc
- Persoanele care trebuie testate pentru infecția cu VHD vor fi din următoarele categorii:
  - În hepatita acută B (AgHBs pozitiv, antiHBcor IgM pozitiv) se recomandă de efectuat Ac. antiHDV IgM (ulterior la necesitate ARN HDV)
  - În cazul activării hepatitei (manifestată prin teste biochimice sporite) la purtătorii cronici de AgHBs (excluzindu-se replicarea HBV) se recomanda de exclus superinfecția cu HDV (se testează Ac antiHDV sum sau antiHDV IgM)

Evoluția clinică a infecției cronice cu VHD a fost descrisă ca fiind accelerată în comparație cu mono-infecția cu virusul hepatitei B (VHB) cu rate de progresie a fibrozei către ciroză în 2–6 ani (Fatovich g, 2000). Este interesantă subgrupa pacienților cu monoinfecție la care s-a determinat că HBV mai frecvent a fost achiziționat pe cale sexuală (cel puțin așa a fost expus de către pacienți) mai ales în subgrupul cu ciroză hepatică ( $p=0.0028$ ), și cale percutană (tattoo-piersing) la subgrupa cu hepatita. Evaluările serologice și virusologice privind VHB au fost drastic diferite între pacienții infectați dual și monoinfecțați. Fiecare pacient infectat cu delta a prezentat o seroconversie anti-HBe atât în cazurile de hepatită cât și în ciroză (de exemplu, în ciroză hepatică delta, 100,0% față de ciroza hepatică HBV - 72%,  $P = 1,7 E-06$ ). Astfel, 100% dintre pacienții cu AgHBs+/antiHDV+ au prezentat varianta AgHBe negativă. Pozitivitatea ADN-ului VHB în seric, a fost mai puțin frecvent în cazul infecției cu delta vs monoinfecție (28,1% față de 76,0-92,0%). Iar qADN VHB al pacienților cu



hepatopatie cronică delta era cu un log zecimal sub nivelul cazurilor mono-infectate VHB ( $2,8 \pm 1,2 \log_{10} \text{ UI / mL}$  vs  $3,7 \pm 1,2 \log_{10} \text{ UI / mL}$ ,  $P = 0,0024$ ). Această situație reflectă probabil pierderea mai importantă a hepatocitelor competente în replicare în cazul cirozei în contextul infecțiilor cu VHD. La pacienții cirofici pozitivi pentru ARN VHD, încărcăturile virale au fost mai mici decât în la pacienții non-cirofici ( $5.1 \pm 1.6$  față de  $6.0 \pm 1.6 \text{ Log}_{10} \text{ UI / mL}$ ,  $P = 0.002$ ).

Evoluția clinică a infecției cronice delta a fost marcată și de dinamica fibrozei hepatice. Fibroza hepatică este o consecință a bolilor cronice hepatice virale, care duc la modificări structurale și funcționale hepatice (Ghany Mg, 2003). Calea comună finală de progresie a fibrozei hepatice este dezvoltarea cirozei, a complicațiilor legate de ciroză și în cele din urmă decesul prin insuficiență hepatică. Deși biopsia hepatică este metoda standard de aur pentru evaluarea fibrozei hepatice, este costisitoare, invazivă și are riscuri procedurale. În hepatita virală cronică, identificarea fibrozei avansate și a cirozei rămâne importantă, în special pentru luarea de decizii clinice, cum ar fi terapia, screeningul pentru carcinomul hepatocelular, monitorizarea complicațiilor legate de ciroză și trimiterea pentru transplantul hepatic. În ultimele două decenii, s-au dezvoltat mai mulți markeri non-invazivi clinici utili pentru fibroza hepatică și s-au dovedit a fi corecți atât în bolile hepatice virale, cât și non-virale. În hepatita cronică B și C - indicele raportului AST-trombocite (APRI) (Sheth TG, 1998), Fibroza-4 (FIB-4) Test (Holmberg SD, 2013), Indicele de vârstă - trombocite (API) (Poynard T, 1997, Rosenberg WM, 2004) și scorul FibroQ au fost studiate pe larg în a prezice fibroza hepatică și au fost bine definite. În acest studiu efectuat pe 224 de pacienți cu hepatopatie cronică virală delta bine caracterizați cu a fost evaluat rolul mai multor modele de fibroză neinvazivă validate pentru a prezice spectrul bolii hepatice de la fibroza avansată la ciroză, cu accent pe performanța acestor modele în hepatita cronică D infecție. Toți acești biomarkeri au fost creați inițial pentru utilizare în hepatita C, dar au fost, de asemenea, evaluați în VHB (Shin WG, 2008). Deși există dovezi din ce în ce mai mari că aceste scoruri au o performanță mai slabă în VHB comparativ cu VHC, utilitatea în HDV este mai puțin bine definită (Lutterkort GL, 2007). Rezultatele acestui studiu nu se adaugă numai la creșterea dovezilor că acești biomarkeri au un comportament mai slab în VHB comparativ cu VHC, dar în identificarea fibrozei hepatice care se extinde dincolo de fibroza avansată, acești biomarkeri au cele mai severe rezultate în HDV. Un tablou aparte s-a evidențiat în ceea ce privește profilul fibrozei hepatice la pacienții cu monoinfecție HBV și dubla infecție HBV/HDV. Astfel, conform analizei noastre cei mai performanți indici de fibroză hepatică-noninvazivă la pacienții cu hepatită cronică virală delta versus hepatita cronică VHB (monoinfecție) au fost după cum urmează: scorul King ( $9.4E-$

08), Fibrosis index (2.8E-11), FibroQ (3.9E-0.4), API (6.1E-12), APRI (7.9E-07). În detectarea cirozei legate de HDV, performanțele acestor biomarkeri nu se potrivesc cu cele ale VHB. Un alt tablou de performanță a acestor indici se înregistrează la pacienții cu ciroză hepatică virală delta versus pacienții cu ciroză hepatică B (monoinfecție). La pacienții cu ciroză hepatică VHD față de cei cu VHB s-au dovedit detectabile diferențe semnificative între indicii de fibroză, cum ar fi FibrQ (3.0E-04), indicile FIB-4 (3.0E-04), GPRI ( $p < 0.0001$ ), PLR ( $p < 0.0001$ ). Există mai multe motive plauzibile care pot explica performanța slabă a acestor markeri în infecția cu VHD. În primul rând, s-a descris că această hepatopatie este adesea mai rapid-progresivă, are niveluri mai mari de transaminaze și trombocitopenie mai evidentă în comparație cu monoinfecția VHB. O mare parte din aceasta se datorează nivelului ridicat de activitate în HDV, care se manifestă ca inflamație hepatică și este identificat pe histologie. Similar cu alte descrieri, în cohorta noastră, pacienții cu HDV au demonstrat niveluri semnificativ mai mari de necroinflamare la biopsie (la cei 20 pacienți cu examen histopatologic). Prin urmare, având în vedere că toți biomarkerii evaluați utilizează fie o componentă a transaminazelor, fie a trombocitelor din modelul lor, acest lucru ar putea explica performanțele slabe în HDV în comparație cu HBV. În al doilea rând, acești biomarkeri au fost proiectați inițial pentru utilizare în infecții virale unice, cum ar fi VHB sau VHC, și nu infecții duale virale, cum ar fi VHB/VHD. Deși pare mai probabil că performanțele slabe ale acestor biomarkeri sunt rezultatul gravității bolii, componenta virală dublă în HDV/HBV poate avea o contribuție. Componentele majore utilizate în calcularea biomarkerilor examinați în acest studiu includ trombocitele, transaminazele și vârsta care pot oferi o justificare pentru aceste performanțe. S-a descris că numărul de trombocite scade odată cu creșterea fibrozei hepatice, a hipertensiunii portale și a diferitelor niveluri de sinteză de trombopoietină (Giannini E, 2003). În plus, transaminazele hepatice sunt adesea cu nivele sporite chiar și în stadiu final, deși prezintă un nivel mult mai scăzut în acest stadiu (Hoofnagle JH, 2012) și raportul ALT/AST se vor schimba odată cu boala hepatică avansată. În cele din urmă, s-a sugerat că vârsta înaintată este adesea asociată cu fibroză mai avansată datorită duratei expunerii virale (Westbrook RH, 2014).

Deși infecția cronică HDV a fost raportată la nivel mondial, prevalența cea mai mare a fost descrisă în zonele cu resurse limitate, ceea ce face deseori biopsia hepatică, testarea serologică a fibroză hepatică și elastografia tranzitorie inaccesibilă. Utilitatea unui biomarker de fibroză simplu non-invaziv pentru stadializarea bolii, luarea deciziilor clinice și educarea pacienților privind testele de laborator efectuate de rutină nu a fost explorată în hepatita cronică a delta. Astfel, am căutat să

evaluăm și să comparăm exactitatea performanței markerilor de fibroză non-invazivi ușor disponibili la subiecții cu infecție cronică cu HDV.

În concordanță cu evoluția naturală a infecției cronice virale delta decompensarea clinică, și nu carcinomul hepatocelular a fost prima complicație dominantă a bolii hepatice. În timpul unei perioade de observație de până la 5 ani, **27%** dintre pacienții din cohorta noastră au dezvoltat ciroză și circa 10% din toți pacienții au decedat de complicații hepatice (decompensare cirozei hepatice) și toate ca urmare a replicării hepatice persistente a VHD (OR 3.13, IC 95%: 1.42-6.21 și VHB (OR 4.13, CI 95%: 3.12-6.21), în special la pacienții cu achiziție intrafamilială OR 2.09, IC 95%: 1.06-4.12) a acestei infecții. Surprinzător, dar probabilitatea cumulată de a dezvolta hepatocarcinom a fost influențată de replicarea persistentă a VHB (OR 2,34; IC 95%: 1.41-3.87) și sexul masculin (2.1(1.12-3.87). Conform datelor literaturii în aproape toate zonele, prevalența cea mai mare a bolii o întâlnim la sexul masculin, cu un raport bărbați:femei între 2:1 și 4:1, cea mai mare discrepanță fiind întâlnită la populația europeană din zonele cu risc mediu. Iar, vârsta medie a debutului bolii la femei este cu 5 ani mai mare față de vârsta bărbaților. În țările cu incidență scăzută, această afecțiune este diagnosticată în jurul vârstei de 75 de ani, în contrast cu vârsta de debut în țările cu risc crescut, de 60-65 de ani la bărbați și 65-70 de ani la femei. O posibilă explicație ar fi virusul hepatitic dominant în populație, vârsta la care s-a produs infecția și existența altor factori carcinogeni. Diferența prevalenței la nivel regional este oglindită în principal de rata diferită a incidenței infecțiilor cronice cu virusurile hepatice B și C, în majoritatea zonelor cu incidență crescută factorul de risc dominant fiind infecția cu VHB. Se identifică și diferențe în privința etiologiei carcinomului hepatic în Europa, astfel în Europa de Sud etiologia virală este prezentă în aproximativ 76% din cazurile de hepatocarcinom, pe când în Europa Centrală și de Nord doar aproximativ 50% din pacienții diagnosticați cu hepatocarcinom sunt infectați cu VHB și/sau VHC. Cazurile de carcinom hepatocelular recent dezvoltat au fost verificate prin examene de monitorizare, inclusiv ultrasonografie și testare a alfa-fetoproteinei. Odată ce carcinomul hepatocelular a fost suspectat sonografic, pacienții au fost sesizați pentru confirmare pe baza criteriilor de 1) histopatologie; 2) două tehnici imagistice (ultrasonografie abdominală și tomografie computerizată prin angiografie); sau 3) o tehnică imagistică plus un nivel  $\alpha$ -fetoproteină serică mai mare de 200 ng / mL sau mai mare. Totodată în studiul nostru a fost identificată corelația dintre nivelul sporit de alfa-fetoproteină și gradul de fibroză hepatică.

Per total, concluziile noastre diferă cu cele mai severe cazuri de evoluție a infecției cronice virale delta prezentat de raportul inițial din Italia, care arată evoluția HDV la ciroză la 80% dintre pacienți în timpul unei observații de 6 ani (Rizzetto M., 1983).

Studiile retrospective-prospective ulterioare ale cohortelor ca ale noastre au arătat scenarii de caz mai bune pentru infecția cu VHD, oferind unele indicii care tind să releve rezultatelor severe timpurii ale infecției cu virusul hepatitic delta. Având în vedere că hepatita acută a fost raportată ocazional de către pacienții noștri, astfel ca modalitatea de infecție HDV a rămas obscură în mai mult de 70% din cazuri, iar majoritatea pacienților care au dezvoltat ciroză au făcut acest lucru ca urmare a unei infecții asimptomatice de lungă durată achiziționată în copilărie, intrafamiliar.

Rezultatul studiului a arătat, de asemenea, un istoric familial de hepatită delta, vârstă mai mare și sexul feminin, crește semnificativ riscul de dezvoltare a cirozei hepatice, iar aceste rezultate au fost fapte existente. Astfel, vârsta medie a pacienților cu ciroză hepatică VHB era de 48+/- 7,7 ani versus cei cu hepatita cronică HBV – 43,6+/- 10.9 ani ( $p < 0.05$ ). Este interesant că, în studiul nostru sexul feminin a predominat la pacienții care au dezvoltat ciroza hepatică, iar sexul masculin a predominat la pacienții care au dezvoltat carcinom hepatocelular. Dacă analizăm pe dimensiunea hepatopatiei cronice virale delta, atunci observăm că durata infecției delta corelează cu dezvoltarea cirozei hepatice, precum și transmisia intra-familială corelează cu decompensarea cirozei hepatice, și apariția de cancer hepatic.

Descoperirile noastre conform cărora decompensarea clinică și nu hepatocarcinomul a fost prima complicație dominantă care apare la pacienții cu ciroză hepatică poate avea consecințe clinice. Într-un studiu retrospectiv efectuat pe 200 de pacienți din Europa de Vest cu ciroză hepatică virală B, Fattovich și coautorii (Fattovich G, 2000) au demonstrat decompensarea la 12 din 39 (31%) pacienți infectați cu VHD versus 31 din 161 (19%) pacienți monoinfecțiați cu VHB, pe durata a 80 de luni de urmărire. În aceeași analiză, hepatocarcinomul s-a dezvoltat în 5 (13%) dintre pacienții cu ciroză hepatică delta și în 22 (36%) dintre cei cu monoinfecția VHB, cu un risc de decompensare și carcinom hepatic crescut de 2,2 și, respectiv, 3,2. Între 1984 și 2006, 46 de pacienți (15%) din cohorta lui Romeo et, (2009) au dezvoltat hepatocarcinom cu o incidență anuală de 2,8%, o rată similară prezentată într-un raport anterior din Grecia (Hadziyannis SJ, 1997). Cu toate acestea, descoperirile respective au fost contrazise de o analiză retrospectivă a 962 pacienți infectați cu VHB ( Iloeje UH, 2006) din Londra care a raportat rate similare de dezvoltare a hepatocarcinomului la cei 82 de pacienți

infecțati cu infecția cronică virală delta și la cei 880 de pacienți VHB- monoinfecțati. Constatarea noastră a unei asociații între replicarea VHB, ciroză și riscul de hepatocarcinom la pacienții infectați cu VHD a fost oarecum așteptat, deoarece observațiile epidemiologice, clinice și experimentale au legat replicarea VHB cu hepatocarcinomul la pacienții infectați cu VHB/VHD.

În raportul lui Romeo Raffaella și coautorii (2009) sunt relevante datele despre tratamentul anterior cu interferon și replicarea VHB fiind asociate cu un risc crescut de hepatocarcinom sugerând în continuare. În cohorta cercetată de această echipă dintre cei 90 de pacienți tratați cu interferon, 39% au obținut un răspuns virusologic, adică o rată de succes satisfăcătoare în comparație cu rapoartele anterioare la pacienții non-cirofici (Farci P.2004). Având în vedere acest lucru, a fost dezamăgitor să se observe progresia către ciroză la 20 dintre cei 35 de pacienți cu răspuns virosologic obținut (aviremie) și apariția de carcinom hepatic la 8 pacienți care au prezentat persistent un ARN VHD negativ. Pe când în observația făcută de Farci și colab., 2004 că niciunul dintre pacienții lor cu VHD care au primit doze mari de interferon nu a dezvoltat în cele din urmă hepatocarcinom, comparativ cu 2 pacienți din grupul pacienților cu HDV tratați cu doze mici de interferon și 2 pacienți netratați. În studiul nostru s-a observat că terapia antivirală nu a influențat evoluția progresivă a bolii hepatice, precum și nu a influențat dezvoltarea decompensării hepatice sau carcinom hepatic.

Astfel, realitatea și percepția problemei infecției cronice hepatice virale delta în țara noastră este diferită. Influența diversilor factori de nivel individual, de comunitate au contribuit la menținerea răspândirii largi a infecției cronice VHD în țara noastră, necătând la realitățile benigne care relevă scăderea semnificativă a hepatitei acute VHD. Formele cronice și avansate ale infecției virale delta nu sunt depistate și monitorizate adecvat. Este o situație influențată de realitatea economică, demografică și medicală a țării noastre, iar perioadele de tranziție de la un sistem medical (sovietic) la alt sistem, precum și declinul economic pe parcursul anilor de după declararea independenței a dus la o dezintegrare a sistemului de sănătate din Republica Moldova, ce a contribuit la pierderea controlului asupra acestei infecții hepatice progresive și nu numai. După anii 2000 problema hepatitelor cronice virale rămâne în atenția cercetătorilor din țara noastră. Iar datele statistice oficiale relatează despre o continuie descreștere a hepatitei acute virale B, C și D. Necătând la acest fenomen îmbucurător, totuși este amenințător faptul că morbiditatea prin formele grave de hepatopatie cronică virală sporește, altfel spus, se detectează indici înalți de ciroză hepatică virală B și D, precum și carcinomul hepatocelular indus de acești viruși.

Peste 13 milioane de adulți trăiesc cu hepatită B, dintre care 10-25% sunt suprainfectați cu VHD în regiunea europeană (OMS, 2014), ceea ce indică o povară uriașă de tratament și îngrijire. Majoritatea pacienților rămân nediagnosticsați, situație reflectată și în statisticile oficiale, care dețin numărul total de persoane diagnosticate în Europa. Tratamentele eficiente pentru VHB și VHD sunt în evoluție recentă cu un impact vizibil asupra posibilității de a trata persoanele cu VHB și VHD dacă sunt diagnosticate în timp util. Nu se știe dacă politicile și strategiile actuale de testare reușesc să testeze oamenii potriviți la momentul potrivit, iar legătura cu sistemul de sănătate capabil să asigure o îngrijire completă (adică să clasifice în mod fiabil gradul de boală hepatică și să furnizeze tratament atunci când este indicat) este necunoscut. În consecință, o proporție mare (dar nedeterminată) a populației infectate cronic intră în îngrijire numai după ce au dezvoltat simptome clinice. Alții care rămân asimptomatici se tratează după ce au trecut de fazele precoce ale infecției lor virale cronice, unde inițierea tratamentului le-ar fi oferit un răspuns optim.

Iar în final, hepatopatia cronică virală delta continue și astăzi să fie tratată cu PegIFN. O abordare individuală a tratamentului este recomandată atunci când se utilizează PegIFN în special în ceea ce privește durata tratamentului. În cazul pacienților care nu răspund la tratament cu IFN, administrarea analogilor pe termen lung pe termen lung pare a fi rațională. Noi tratamente sunt la orizont, care, sperăm, va schimba modul în care tratăm această boală hepatică, deși chiar și cu noi modalități de tratament interferonele ar putea fi în continuare necesare.

În concluzie, hepatita cronică virală delta este o infecție de lungă durată, cu o tendință relativ ridicată de a evolua către ciroză hepatică și progresie către complicații majore care sunt mai frecvente la pacienții cu replicare persistentă a VHD și VHB.

## CONCLUZII

1. Pacienții locuitori ai regiunii de sud al Republicii Moldova sunt mai frecvent diagnosticați cu hepatopatia cronică virală Delta și sunt mai tineri  $46.2 \pm 9.1$  ani vs cei de la nordul și centrul țării. Factorul de vârstă joacă un rol important în stabilirea și evoluția hepatopatiei cronice virale delta. Vârsta diagnosticării infecției VHB la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta a fost cu o mediană de 25 ani versus pacienții mono-infecțiați, care au depistat VHB la o vârstă mediană de 18 ani.
2. Transmiterea intra-familială a VHD a fost cea mai frecventă cale de transmitere, și a fost cea mai întâlnită cale de transmisie la pacienții care provin din sudul Moldovei vs pacienții din alte regiuni non-sudice (39,2% față de 17,7%,  $P = 0,0010$ ). Detectarea ARN VHD (pozitiv) a fost mai frecventă la pacienții cu familii contaminate decât la ceilalți pacienți non-intrafamiliali (98,7% față de 89,2%,  $P = 0,0094$ ). Dacă un frate era transmitătorul virusului putativ, pacienții contaminați erau mai des bărbați (64,0% față de 44,1%,  $OR = 2,3$ ,  $CI\ 95\% = 1,05-5,3$ ,  $P = 0,028$ ).
3. A fost definit pacientul cu prezentare tardivă și prezentare avansată, care a predominat în grupul pacienților cu hepatopatie cronică virală delta vs monoinfecția cu VHB. Prezentarea tardivă la pacienții cu hepatopatie cronică virală delta vs HBV înregistrează criteriile: ciroză decompensată 48.7% vs 29.7% ( $p < 0.05$ ), prin prezentarea a unui din următoarele simptome : encefalopatie 13.7% vs 8.6%, ( $p = 0.0451$ ), varice esofagiene 47.9% vs 30.7%, (ns), HDS 24.2% vs 11.5%, ( $p < 0.05$ ).
4. Profilul biologic a fost diferențiat în grupul pacienților cu hepatită cronică virală delta versus pacienții cu hepatita VHB, prin reducerea nivelului leucocite ( $p < 0.001\ 2.1E-05$ ), a trombocitelor ( $p < 0.001\ 1.6E-13$ ), sporirea ALT ( $p < 0.05\ 2.4E-06$ ), AST ( $1.7\ E-04$ ), GTP ( $p = 0.0099$ ), bilirubina totala ( $5.0\ E-04$ ), albumina ( $p = 0.0039$ ). Iar, în subgrupa pacienților cu ciroză hepatică delta versus ciroză hepatică HBV (monoinfecție) s-au înregistrat diferențe veridice pe linia trombocitelor ( $p = 0.0006$ ) și nivelului GTP ( $p = 0.0105$ ).
5. Evaluarea fibrozei hepatice prin scorurile neinvazive a evidențiat o fibroză mai severă în cazul pacienților cu hepatopatie cronică virală delta. În ciroza hepatică delta se înregistrează diferențe semnificative ale indicilor și scorurilor de fibroză versus pacienții cu ciroză hepatică

B (AgHBs+/anti-HDV-), și anume scorul FibroQ (3.0E-04), FIB4 (3.0E-04), APRI (p=0.0038), GPRI (p<0.0001), PLR (p<0.0001).

6. Scorul GDNT (sistemul de punctare creat de noi) a fost capabil să diferențieze corect pacienții cu decompensare, compensare și non-ciroză. Iar curba ROC a scorului GDNT a fost mai performantă decât toate sistemele de punctare testate. Scorul GDNT este primul și unicul scor elaborat în țara noastră, care este în măsură să prezică decompensarea hepatică la pacienții cu ciroză hepatică delta.
7. Evoluția hepatopatiei cronice virale delta spre ciroză hepatică reflectă un comportament deosebit și al replicării VHD, astfel dezvoltarea cirozei hepatice se asociază cu reducerea qARN VHD versus cazurile fără ciroză ( $5.1 \pm 1.6$  față de  $6.0 \pm 1.6$  Log10 UI / mL, P = 0.002).
8. Pacientul cu hepatopatie cronică virală delta, cu achiziția intafamilială de VHD (OR2.09, CI95% 1.06-4.12), persistența infecției cu virusul hepatitic B activ, ADN VHB detectabil (OR4.13, CI95%:3.12-9.65) și infecție delta pozitivă ARN VHD detectabil, OR3.13, CI95%: 1.42-6.21) este supus riscului de a progresa rapid spre ciroză hepatică pe o durată mediană de 2,5 ani.
9. Pacienții cu carcinom hepatocelular asociați cu VHD au prezentat un profil de pacient mai tânăr cu 6 ani decât pacienții infectați cu VHC și VHB (monoinfecție) ( $54,0 \pm 8,3$  vs  $60,5 \pm 10,1$  ani, P = 0,0041) și cu un ficat cirotic universal vs ceilalți pacienți (95,8 vs 79,2%, OR = 5,96, CI 95%: 0,87-256,95, P = 0,074).
10. Pacienții cu carcinom hepatocelular asociați cu VHD au prezentat un patern de tumoare hepatică mai mare ca diametru, decât pacienții cu VHC și VHB monoinfecție ( $75,7 \pm 9,6$  vs  $56,0 \pm 3,2$ , 0,0184) pe fondalul unui scor de stadializare- scorul CLIP semnificativ mai înalt, decât în cazul pacienților non-VHD. Nivelul AFP a crescut odată cu numărul formațiunilor și a fost semnificativ mai mare în stadiile avansate față de cele incipiente. Pacienții cu invazie portală malignă au prezentat valori mai crescute ale AFP, 100% din cazuri au prezentat valori diagnostice.



## RECOMANDARI PRACTICE

Pentru facilitarea soluționării problemelor evidențiate în cadrul studiului propunem următoarele recomandări:

1. Pacientul cu hepatopatie cronică virală delta, provenit din sudul țării cu achiziționarea intrafamiliară a infecției cronice virale delta, trebuie plasat în grupa de risc înalt pentru progresia rapidă a bolii hepatice.
2. Scorul de diagnostic GDNT este necesar de utilizat atât de specialist cât și de pacient, astfel doar la obținerea unui scor mai mic de 0.86, este necesară spitalizarea acestui pacient.
3. Includerea în protocolul național ca criteriu de spitalizare prezența unei formațiuni tumorale determinată ecografic, în asociere cu sau fără nivel de alfa-fetoproteina sporită.
4. Inițierea tratamentului cu analogi nucleozidici la pacienții cu infecția cronică virală delta indiferent de valoarea viremiei ADN VHB ( acesta fiind un factor de risc responsabil pentru decompensarea cirozei hepatice și apariția de cancer hepatocelular).
5. Crearea registrului pacienților cu hepatită cronică virală B cu sau fără antigen delta la nivel național și regional în baza informațiilor colectate prin monitorizare continuie, fiind un punct de inițiere pentru dezvoltarea unui sistem electronic integrat pentru supravegherea acestor pacienți în vederea detectării timpurii ale complicațiilor hepatice: decompensare hepatică și carcinom hepatocelular.
6. Pacientul cu hepatopatie cronică virală delta necesită o abordare complexă și o supraveghere frecventă pentru a evalua și gestiona o varietate de condiții care influențează evoluția bolii.

## REFERINTE BIBLIOGRAFICE

1. ALISON, A. E., COHEN, C., BLOCK, T.M. *Hepatitis Viruses: Hepatitis B and Hepatitis D*. In: R.A. Kaslow et al. (eds.), *Viral Infections of Humans*. New York: Springer Science+Business Media, 2014. 747-764p. ISBN 978-1-4899-7448-8.
2. ABBAS, Z., AFZAL, R. Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review. In: *World Journal of Hepatology*. 2013, vol. 5, nr. 12, pp. 666-675. ISSN 1948-5182.
3. ABBAS, Z., MEMON, M.S., MITHANI, H., JAFRI, W., HAMID, S. Treatment of chronic hepatitis D patients with pegylated interferon: a real-world experience. In: *Antiviral therapy*. 2014, vol. 19, nr. 5, pp. 463–468. ISSN 2040-2058.
4. ABBAS, Z., MEMON, M.S., UMER, M.A., Co-treatment with pegylated interferon alfa-2a and entecavir for hepatitis D: A randomized trial. In: *World Journal of Hepatology*. 2016, vol. 8, nr. 14, pp. 625-631. ISSN 1948-5182.
5. ABBAS, M., ABBAS, Z. Serum cholinesterase: A predictive biomarker of hepatic reserves in chronic hepatitis D. In: *World Journal of Hepatology*. 2017, vol. 9, pp. 967–972. ISSN 1948-5182.
6. AGUILERA, A., TRASTOY, R., RODRÍGUEZ-CALVIÑO J. Prevalence and incidence of hepatitis delta in patients with chronic hepatitis B in Spain. In: *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2018, vol. 30, pp. 1060–1062. ISSN 1473-5687.
7. *AJCC Cancer Staging Handbook*. 7th ed. Chicago: American Joint Committee on Cancer, 2010. ISBN 978-0-387-88440-0.
8. AMOUGOU, A. M., NOAH, N. D., FEWOU M. P., et.al. A prominent role of Hepatitis D Virus in liver cancers documented in Central Africa. In: *BMC Infectious Disease*. 2016, vol. 16, pp. 647. ISSN 1471-2334.
9. ANDRIEȘ, L., BARBA, D., CERNEȚKI, O., și coaut.. *Imunologie clinică*. Manual. Chișinău, 2014, 554 p.
10. ANTHONY, P.P., ISHAK, K.G., NAYAK, N.C., et.al The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. In: *BMJ Journal of Clinical Pathology*. 1978, vol. 31, pp. 395-341. ISSN 1472-4146.
11. BRAGA, W.S., DE OLIVEIRA, C.M., DE ARAUJO, J.R., et al. Chronic HDV/HBV co-infection: predictors of disease stage—a case series of HDV-3 patients. In: *Journal of Hepatology*. 2014, vol. 61. nr. 6, pp. 1205–1211. ISSN 0168-8278.
12. BAZINET, M., PÂNTEA, V., CEBOTARESCU, V. et al. Safety and efficacy of REP 2139 and pegylated interferon alfa-2a for treatment-naïve patients with chronic hepatitis B virus and hepatitis D virus co-infection (REP 301 and REP 301-LTF): a non-randomised, open-label, phase 2 trial. In: *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*. 2017, vol. 2, nr. 12, pp. 877-889. ISSN 2468-1253.
13. BAZINET, N., PANTEA, V., CEBOTARESCU, V., et.al. Establishment of persistent functional remission of HBV and HDV infection following REP 2139 and pegylated interferon alpha 2a therapy in patients with chronic HBV/HDV co-infection: 18 month follow-up results

- from the REP 301-LTF study. In: *Journal of Hepatology*. 2018, vol. 68, nr. 1. ISSN 0168-8278.
14. BAZINET, M., PANTEA, V., MOSCALU, I., et al. Interim follow-up analysis in the REP 401 protocol: functional control of HBeAg negative chronic HBV infection persists after withdrawal of combined therapy with REP 2139 or REP 2165, tenofovir disoproxil fumarate and pegylated interferon  $\alpha$ -2a. In: *Journal of Hepatology*. 2018. ISSN 0168-8278.
  15. BOGOMOLOV, P., ALEXANDROV, A., VORONKOVA, N. et al. Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor Myrcludex B: first results of a phase Ib/IIa study. In: *Journal of Hepatology*. 2016, vol. 65, nr. 3, pp. 490-498. ISSN 0168-8278.
  16. BELANI, H. et al. Integrated Prevention Services for HIV Infection, Viral Hepatitis, Sexually Transmitted Diseases, and Tuberculosis for Persons Who Use Drugs Illicitly: Summary Guidance from CDC and the US Department of Health and Human Services. In: *Recommendations and Reports*. 2012, vol. 61, nr. RR05, pp. 1-43.
  17. BULUT, Y. et al. High genetic diversity of hepatitis delta virus in eastern Turkey. In: *Journal of Infection in Developing Countries*. 2014, vol. 8, nr.1, pp. 74-78. ISSN 1972-2680.
  18. BAHCECIOGLU, I.H., AYGUN, C., GOZEL, N., et.al. Prevalence of hepatitis delta virus (HDV) infection in chronic hepatitis B patients in eastern Turkey: Still a serious problem to consider. In: *Journal Viral Hepatitis*. 2011, vol. 18, pp. 518–524. ISSN 1365-2893.
  19. BLUMBERG, B., ALTER, H.J., VISNICH, S. A “New” Antigen in Leukemic Sera. In: *Journal of the American Medical Association*. 1965, vol. 191, pp. 541-546. ISSN 1538-3598.
  20. BONINO, F., ROSINA, F., RIZZETTO, M. et al. Chronic hepatitis in HBsAg carriers with serum HBV-DNA and anti-HBe. In: *Gastroenterology*. 1986, vol.90, pp.1268 –1273. ISSN 0016-5085.
  21. BUENDIA, M.A., NEUVEUT, C. Hepatocellular carcinoma. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2015, vol. 5: a021444. ISSN 2157-1422.
  22. BURZA, M.A. et al. DEPDC5 variants increase fibrosis progression in Europeans with chronic hepatitis C virus infection. In: *Hepatology*. 2016, vol. 63, pp. 418–427. ISSN 1527-3350.
  23. BUTI, M., ESTEBAN, R., ROGGENDORF, M., et al. Hepatitis D virus RNA in acute delta infection: serological profile and correlation with other markers of hepatitis D virus infection. In: *Hepatology*. 1988, vol. 8, pp. 1125-1129. ISSN 1527-3350.
  24. BURNEVICH, E., MOISEEV, S., MUKHIN, N. Letter: cure of chronic hepatitis B and d after 12 years of treatment with low-dose standart interferon alfa-2b. In: *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2016, vol. 44, pp. 649-650. ISSN 1365-2036.
  25. COBÎLTEANU, L. *Dereglările hemostazei și tratamentul la pacienții cu ciroze hepatice*: autoreferat la tz. de doct. în științe medicale. Chișinău, 2016. 21 p.
  26. CONSTANTINESCU, I. et al. Hepatitis B Virus Core Promoter Mutations in Patients With Chronic Hepatitis B and Hepatocellular Carcinoma in Bucharest, Romania. In: *Hepatitis Monthly*. 2014, vol. 14, nr. 10, e22072, pp. 1-3. ISSN 1735-143X.
  27. CROAGH, C. et al. Genotypes and viral variants in chronic hepatitis B: A review of epidemiology and clinical relevance. In: *World Journal of Hepatology*. 2015, vol. 7, nr. 3, pp. 289-292. ISSN 1948-5182.

28. CARMAN, W.F., JACYNA, M.R., HADZIYANNIS, S. et al. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. In: *The Lancet*. 1989, vol. 2, pp. 588–589. ISSN 1474-547X.
29. CHANG, J.J., WIGHTMAN, F., BARTHOLOMEUSZ A. et al. Reduced HBV-specific CD4+ T-cell responses in HIV-1-HBV co-infected individuals receiving HBV-active antiretroviral therapy. In: *Journal of Virology*. 2005, vol. 79, pp. 3038–3051. ISSN 1098-5514.
30. CHEUNG, M.C. et al. Outcomes after successful direct-acting antiviral therapy for patients with chronic hepatitis C and decompensated cirrhosis. In: *Journal of Hepatology*. 2016, vol. 65, pp. 741–747. ISSN 0168-8278.
31. CHIRA, O., ACHALOVSCI, M., BADEA, R., et.al. Prevalence of hepatocellular carcinoma in chronic HBV infection. In: *Romanian Journal of Gastroenterology*. 1993, supl. 2, pp. 52-63. ISSN 1842-1121.
32. CIANCIO, A., RIZZETTO, M. Chronic hepatitis D at a standstill: where do we go from here? In: *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2014, vol. 11, pp. 68-71. ISSN 1759-5053.
33. DAVILA, J.A., EL-SERAG, H.B. The Rising Incidence of Hepatocellular Carcinoma in the United States: an Update. In: *Gastroenterology*. 2012, vol. 142, supl. 1, pp. S914–S914. ISSN 0016-5085.
34. CUROCICHIN, GH. *Complexul dereglărilor metabolice la pacienții hipertensivi: caracteristica clinico-genetică: autoreferat la tz. de doct. habilitat în științe medicale*. Chișinău, 2009. 46 p.
35. DEGERTEKIN, H., YALÇIN, K., YAKUT, M. The prevalence of hepatitis delta virus infection in acute and chronic liver diseases in Turkey: An analysis of clinical studies. In: *Turkish Journal of Gastroenterology*. 2006, vol. 17, pp. 25-34. ISSN 1300-4948.
36. DANE, D.S., CAMERON, C.H., BRIGGS, M. Virus-like Particles in Serum of Patients with Australia-Antigen-Associated Hepatitis. In: *The Lancet*. 1970, vol. 1, pp. 695-698. ISSN 1474-547X.
37. DÉNY, P. Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades? In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2006, vol. 307, pp. 151-171. ISSN 0070-217X.
38. DIAZ, G., ENGLE, R.E., TICE, A., et.al. Molecular Signature and Mechanisms of Hepatitis D Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma. In: *Molecular Cancer Research*. 2018, vol. 16, pp. 1406–1419. ISSN 1557-3125.
39. DURANTEL, D. New treatments to reach functional cure: Virological approaches. In: *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. 2017, vol. 31, pp. 329–336. ISSN 1521-6918.
40. DUMBRAVA, V.-T., PROCA, N., LUPAȘCO, IU. et.al. Patologia hepatică și cea gastrointestinală – probleme medico-sociale actuale în Republica Moldova. In: *Sănătate publică, economie și management în medicina*. 2013, vol. 5, nr. 50, pp. 7-12. ISSN 1729-8687.

41. GHEORGHE L., CSIKI I.E., IACOB S., et.al. Hepatitis Delta Virus Infection in Romania: Prevalence and Risk Factors. In: *Journal of Gastrointestinal and Liver Disease*. 2015, vol. 24, nr. 4, pp. 413-421. ISSN 1841-8724.
42. EASL. Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. In: *Journal of Hepatology*, 2012, vol. 57, pp. 167–185. ISSN 0168-8278.
43. ECDC. *Annual epidemiological report Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data* [online]. 2013, p. 45-47. ISBN 978-92-9193-543-7.
44. ECDC. *Hepatitis B and C surveillance in Europe 2012* [online]. 2014, p. 13-22. ISBN 978-92-9193-582-6. Disponibil:
45. ETZION, O., HAMID, S., YURIE, L. End of Study Results from LIMT HDV Study: 36% Durable Virologic Response at 24 Weeks Post-Treatment with Pegylated Interferon Lambda Monotherapy in Patients with Chronic hepatitis Delta Virus Infection. In: *Journal of Hepatology*. 2019, vol. 70, nr. 1, suppl. E32. ISSN 0168-8278.
46. *Ghid practic Siguranța injectiilor*. Chișinău, 2015, 38 p.
47. GISH, R.G., YI D.H., KANE, S., et.al. Coinfection with hepatitis B and D: Epidemiology, prevalence and disease in patients in Northern California. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2013, vol. 28, nr. 9, pp. 1521-1525. ISSN 1440-1746.
48. GRIGORIE, R., ALEXANDRESCU, S., SMIRA, G., et al. Curative Intent Treatment of Hepatocellular Carcinoma - 844 Cases Treated in a General Surgery and Liver Transplantation Center. In: *Chirurgia*. 2017, vol. 112 nr. 3, pp. 289-300. ISSN 1842 – 368X.
49. GRIB, L. *Sindromul metabolic: considerații patogenetice, clinice și diagnostic: Monografie*. Chișinău, 2010. 168 p. ISBN 978-9975-78-878-6.
50. GUDUMAC, V., NIGULEANU, V., CARAGIA, S., et.al. *Investigații biochimice (elaborare metodică)*. Chișinău: Elena-VI SRL, 2008. 71 p. ISBN 978-9975-9643-8-8.
51. JORS, S., JELIAZKOVA, P., RINGELHAN, M., et.al. Lineage fate of ductular reactions in liver injury and carcinogenesis. In: *Journal of Clinical Investigation*. 2015, vol. 125, pp. 2445–2457. ISSN 1558-8238.
52. HARLEY, G. *The Diseases of the Liver: With or Without Jaundice, With the Special Application of Physiological Chemistry to the Diagnosis and Treatment*. London: J & A Churchill, 1883. 571p. ISBN 978-0282-62-523-8.
53. HESS, G., ARNOLD, W., KOESTERS, W., Simultaneous presence of HBsAg and anti-HBs in the serum of different subtypes (serological and immunofluorescent studies). In: *Zeitschrift für Immunitätsforschung. Immunobiology*. 1977, vol. 153, pp. 143–151. ISSN 0340-904X.
54. HEIDRICH, B., YURDAYDIN, C., KABAÇAM, G., et al. Late HDV RNA relapse after peginterferon alpha-based therapy of chronic hepatitis delta. In: *Hepatology*. 2014, vol. 60, pp. 87-97. ISSN 1527-3350.
55. *Hepatita cronică și ciroza hepatică de etiologie virală B și D la adult* . PROTOCOL CLINIC NAȚIONAL/sub redacția Dumbrava V-T, Lupașcu Iu, Țurcanu A. Chișinău, 2016. 45 p.
56. HALL, N. et al. Prevalence of Hepatitis Delta Virus among Persons Who Inject Drugs, Vietnam. In: *Emerging Infectious Diseases*. 2015, vol. 21, nr. 3, pp. 541. ISSN 1080-6059.

57. HATZAKIS, A. et al. The State of Hepatitis B and C in the Mediterranean and Balkan Countries: Report from a Summit Conference. In: *Journal of Viral Hepatitis*. 2013, vol. 20, suppl. 2, pp. 1–20. ISSN 1365-2893.
58. HEAD, G.M. et al. UK investments in global infectious disease research 1997–2010: a case study. In: *The Lancet Infectious Diseases*. 2013, vol. 13, pp. 55–64. ISSN 1473-3099.
59. HONG, M., SANDALOVA, E., LOW, D. et al: Trained immunity in newborn infants of HBV-infected mothers. In: *Nature Communications*. 2015, vol. 6, pp. 65-88. ISSN 2041-1723.
60. KAO, J.H., CHEN, P.J., LAI, M.Y., et.al. Acute exacerbations of chronic hepatitis B are rarely associated with superinfection of hepatitis B virus. In: *Hepatology*. 2001, vol. 34, pp. 817–823. ISSN 1527-3350.
61. KALKAN, C., KARAKAYA, F., KESKIN, O., et.al., Value of non-invasive fibrosis markers in chronic hepatitis D. In: *Journal of Hepatology*. 2017, vol. 66, nr 1, supplement, pp. S473. ISSN 0168-8278.
62. KIMURA, K., KAKIMI, K., WIELAND, S., et.al. Activated intrahepatic antigen-presenting cells inhibit hepatitis B virus replication in the liver of transgenic mice. In: *Journal of Immunology*. 2002, vol.169, pp. 5188–5195. ISSN 1550-6606.
63. KOJIRO, M. Pathology of early hepatocellular carcinoma: progression from early to advanced. In: *Hepato-gastroenterology*. 1998, vol. 45, pp.1203-1205. ISSN 0172-6390.
64. KOSTRITSA, S., KUZIN, S., KHUKHLOVICH, P. et al. The detection of antibodies to the hepatitis C virus and to HBsAg in donors with viral hepatitis and cancerous diseases in the Republic of Moldova. In: *Voprosy Virusologii (Questions in Virology)*. 1994, vol. 39, nr. 2, pp. 93-94. ISSN 2411-2097.
65. KOH, C, CANINI, L, DAHARI, H. et al. Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial. In: *The Lancet Infectious Diseases*. 2015, vol. 15, nr. 10, pp. 1167-1174. ISSN 1473-3099.
66. KRUGMAN, S. Viral Hepatitis: Overview and Historical Perspectives. In: *Yale Journal of Biology and Medicine*. 1976, vol. 49, pp. 199-203. ISSN 1551-4056.
67. LOCARNINI, ST., HATZAKIS, A., CHEN, D.S. Strategies to control hepatitis B: Public policy, epidemiology, vaccine and drugs. In: *Journal of Hepatology*. 2015, vol. 62, pp. 577. ISSN 0168-8278.
68. LONDON, W.T., SUTNICK, A.I., BLUMBERG, B. Australia Antigen and Acute Viral Hepatitis. In: *Annals of Internal Medicine*. 1969, vol. 70, pp.55-59. ISSN 1539-3704.
69. LOSIKOFF, P.T., SELF, A.A., GREGORY, S.H. Dendritic cells, regulatory T cells and the pathogenesis of chronic hepatitis C. In: *Virulence*. 2012, vol. 3, pp. 610–620. ISSN 2150-5608.
70. LUAN, F., PINHEIRO M., VASCONCELOS, A, et.al. Hepatitis delta: virological and clinical aspects. In: *BMC Virology Journal*. 2017, vol. 14, nr. 177, pp. 1-15. ISSN 1743-422X.
71. LÜRMAN, A. Icterus Epidemic. In: *Klinische Wochenschrift (Berlin)*. 1885, vol. 22, pp.207. ISSN 0023-2513.

72. LITTLEJOHN, M., LOCARNINI, S., YUEN, L. Origins and Evolution of Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2016, vol. 6, nr. 1 (a021360), pp. 1-21. ISSN 2157-1422.
73. LLOVET, J.M., BRÚ, C., BRUIX, J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. In: *Seminars in Liver Disease*. 1999, vol. 19, pp. 329-338. ISSN 0272-8087.
74. LUTTERKORT, G.L, WRANKE, A., YURDAYDIN, C., et al. Non-Invasive Fibrosis Score for Hepatitis Delta. In: *Liver International*. 2017, vol. 37, nr. 2, pp. 196–204. ISSN 1478-3231.
75. LUPAȘCO, IU. Hepatitele cronice (factori de risc, aspect clinic metabolice de diagnostic) și eficacitatea tratamentului antiviral. In: *Sănătate publică, economie și management în medicină*. 2015, nr. 1(58), pp. 46-59. ISSN 1729-8687.
76. LUPAȘCO, IU. *Hepatitele cronice virale B și C - factorii de risc, particularitățile clinic-evolutive, hormonal-metabolice, imunologice și optimizarea metodelor de tratament*: tz. de doct. habilitat în științe medicale. Chișinău, 2017. 302 p.
77. LUPAȘCO, IU. *Hepatitele cronice și alte forme ale bolilor cronice difuze ale ficatului (screeningul profilactic, frecvența, factorii de risc, diagnosticul clinic-paraclinic și statutul hormonal, tratamentul)*. Chișinău: Editura „Ericon”, 2014. 328 p. ISBN 978-9975-3018-2-4.
78. MASON, W.S., GILL U.S., LITWIN S., et.al. HBV DNA integration and clonal hepatocyte expansion in chronic hepatitis B patients considered immune tolerant. In: *Gastroenterology*. 2016, vol.151 (e984), pp. 986–998. ISSN 0016-5085.
79. MACCALLUM, F.O., BRADLEY, W.H., VAN ROOYEN, C.E., et.al. *Chapter IX. Infective Hepatitis*. In: *Medical History of the Second World War. Medicine and Pathology.*, London: Cope YZ, HMSO, 1952. p. 252-267.
80. MAGNIUS, L., ESPMARK J. New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the ‘Le Bouvier’ determinants. In: *Journal of Immunology*. 1972, vol. 109, pp. 1017–1021. ISSN 1550-6606.
81. MOSCALU, IU. *Starea funcțională a ficatului la pacienții cu hepatite cronice ce contactează cu un complex de pesticide*: autoreferat al tz. de doct. în științe medicale. Chișinău, 2003. 22 p.
82. MC DONALD, S. Acute Yellow Atrophy. In: *Edinburgh Medical Journal (Scottish Medical Journal, din 1956)*. 1908, vol. 1 (NS), pp.83-88. ISSN 2045-6441.
83. MONRO, D. AN. *Account of Diseases Which Were Most Frequent in British Military Hospitals in Germany from January 1761 to the Return of the Troops in England in March 1764*. London: Millar and Cadell,1763. p. 206-215.
84. MARCON, C.E. et al. Trends in the Burden of Hepatitis B in a Southern Brazilian State. In: *Hepatitis Monthly*. 2015, vol. 15, nr. 11, pp. e31906. ISSN 1735-3408.
85. NEGRESKU, G., IASHINA, T., BURKOV, A. The clinical picture and outcome of acute delta infection. In: *Klinicheskaia Meditsina (Moskva)*. 1992, vol. 70, pp. 80-84. ISSN 0023-2149.
86. NEGRO, F. Hepatitis D Virus Coinfection and Superinfection. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2014, vol. 4, pp. a021550. ISSN 2157-1422.

87. NICOLAU, S.S., CAJAL, N. Explanation of the plurality of forms of inframicrobial epidemic hepatitis in the light of the spontaneous variability of the viruses. In: *Studii și Cercetări de Inframicrobiologie*. 1955, vol. 6, nr. 3-4, pp. 325-40. ISSN 0039-3975.
88. NI, Y., LEMPP, F.A., MEHRLE, S., et al. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. In: *Gastroenterology*. 2014, vol. 146, pp. 1070–1083. ISSN 0016-5085.
89. NOORDEEN, F., VAILLANT, A., JILBERT, A.R. Nucleic acid polymers inhibit duck hepatitis B virus infection in vitro. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013, vol. 57, pp. 5291–5298. ISSN 1098-6596.
90. NOORDEEN, F., VAILLANT, A., JILBERT, A.R. Nucleic acid polymers prevent the establishment of duck hepatitis B virus infection in vivo. In: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013, vol. 57, pp. 5299–5306. ISSN 1098-6596.
91. NOORDEEN, F., SCOUGALL, C.A., GROSSE, A., et.al. Therapeutic Antiviral Effect of the Nucleic Acid Polymer REP 2055 against Persistent Duck Hepatitis B Virus Infection. In: *PLOS One*. 2015, vol.10, pp. e0140909. ISSN 1932-6203.
92. FAVOROV, M.O., NEMECHEK, V., YASHINA, T.L., et.al. *Current epidemiological trends of viral hepatitis in Eastern Europe and the former Soviet Union*. In: *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Orasul, editura???1997, pp. 555±558.
93. FREY, R.S., BOLDANOVA, T., HEIM, M. Ultrasound surveillance for hepatocellular carcinoma: real-life performance in a hepatology outpatient clinic. In: *Swiss Medical Weekly*. 2015, eCollection. ISSN 1424-3997.
94. FUJIYAMA, S., TANAKA, M., MAEDA, S., et.al. Tumor markers in early diagnosis, follow-up and management of patients with hepatocellular carcinoma. In: *Oncology*. 2002, vol. 62, suppl. 1, pp. 57–63. ISSN 1423-1232.
95. OKA, H., SAITO, A., ITO, K., et.al.. Collaborative Hepato-Oncology Study Group of Japan: Multicenter prospective analysis of newly diagnosed hepatocellular carcinoma with respect to the percentage of Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2001, vol. 16, pp. 1378–1383. ISSN 1473-5687.
96. OLIVERO, A., SMEDILE, A. Hepatitis delta virus diagnosis. In: *Seminars in Liver Disease*. 2012, vol. 32, pp.220-227. ISSN 0272-8087.
97. OUZAN, D., PÉNARANDA, G., JOLY H., et.al. Optimized HBsAg titer monitoring improves interferon therapy in patients with chronic hepatitis delta. In: *Journal of Hepatology*. 2013, vol. 58, pp. 1258-1259. ISSN 1600-0641.
98. PASCARELLA, S., NEGRO, F. Hepatitis D virus: An update. In: *Liver International*. 2011, vol. 31, pp. 7–21. ISSN 1478-3231.
99. PAGE, A., ZUNIRAH, A., et.al. Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma: A Narrative Review, 2018. In: *J Clin Transl Hepatol*. 28; 6(1): 79–84.
100. PASQUETTO, V., GUIDOTTI, L.G., KAKIMI, K., et.al. Host-virus interactions during malaria infection in hepatitis B virus transgenic mice. In: *Journal of Experimental Medicine*. 2000, vol. 192, pp. 529–536. ISSN 1540-9538.



101. PERZ, J.F., ARMSTRONG, G.L., FARRINGTON, L.A, ET.AL. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide.2006, In: *J Hepatol.* 45:529–538. doi: 10.1016/j.jhep.2006.05.013.
102. POPESCU, G.A., OTELEA, D., GAVRILIU, L.C., et.al. Epidemiology of hepatitis D in patients infected with hepatitis B virus in Bucharest: A cross-sectional study. In: *Journal of Medical Virology.* 2013, vol. 85, pp. 769–774. ISSN 1096-9071.
103. PISI, E., ZAULI, D., CRESPIG, C. *Autoantibodies in chronic hepatitis delta.* In: *Hepatitis delta virus and infection.* Liss, 1987, p.249-256.
104. PLUMMER, M, de MARTEL, C, VIGNAT, J. et.al. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Health.* 2016;4:e609–e616. doi: 10.1016/S2214-109X(16)30143-7.
105. POL, S. ANRS collaborative study group on hepatocellular carcinoma. Lack of evidence of an effect of direct-acting antivirals on the recurrence of hepatocellular carcinoma: data from three ANRS cohorts. In: *Journal of Hepatology.* 2016, vol. 65, pp. 734–740. ISSN 0168-8278.
106. PÎNTEA, V. *Hepatitele virale acute și cronice (etiologie, epidemiologie, patogene, tabloul clinic, diagnostic, tratament și profilaxie).* Chișinău, 2014. 259 p. ISBN 978-9975-57-160-9.
107. POPESCU, G.A. et al. Epidemiology of Hepatitis D in Patients Infected With Hepatitis B Virus in Bucharest: A Cross-Sectional. In: *Journal of Medical Virology.* 2013, nr. 85, pp. 769–774. ISSN 1096-9071.
108. PRISACARI, V., PARASCHIV A., SPÎNU C., HOLBAN T. *Hepatitele virale parenterale și cirozele hepatice – epidemiologia, clinica, diagnosticul, tratamentul, prevenirea și controlul.* Chișinău, 2013. 160p.
109. RIZZETTO, M. HEPATITIS D. Virus: Introduction and Epidemiology. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2015, nr. 5, pp. a021576. ISSN 2157-1422.
110. RIZZETTO, M. The adventure of delta. In: *Liver International.* 2016, nr. 36, suppl. S1, pp. 135–140. ISSN 1478-3231.
111. RIZZETTO, M., CANESE M.G., ARICO S. et al. Immunofluorescence detection of a new antigen/antibody system (Delta/anti-Delta) associated with hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers. In: *Gut.* 1977, vol. 18, pp.997–1003. ISSN 1468-3288.
112. RIZZETTO, M., CIANCIO A. Epidemiology of hepatitis D. In: *Seminars of Liver Diseases.* 2012, vol. 32, pp. 211–219. ISSN 0272-8087.
113. ROMEO, R., FOGLIENI, B., CASAZZA, G., et.al. High Serum Levels of HDV RNA Are Predictors of Cirrhosis and Liver Cancer in Patients with Chronic Hepatitis Delta. In: *PLOS One.* 2014, vol. 9, nr. 3, pp. e92062. ISSN 1932-6203.
114. ROMANCIUC, I., LUPAȘCO, IU., DUMBRAVA, V. The influence of the emotional state and of the transaminases activity on quality of life in chronic viral hepatitis. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* Special Issue: Asian Pacific Digestive Week 2012. 2012, nr. 27, suppl. 5, p. 278. ISSN 1440-1746.

115. SAGNELLI, E. et al. Epidemiology of acute and chronic hepatitis B and delta over the last 5 decades in Italy. In: *World Journal of Gastroenterology*. 2014, vol. 20, nr. 24, pp. 7635-7638. ISSN 2219-2840.
116. SHEVELL, L., MERIKI, H. D., CHO-NGWA, F. Epidemiology of human immunodeficiency virus-1 and hepatitis B virus co-infection and risk factors for acquiring these infections in the Fako division of Southwest Cameroon. In: *BMC Public Health*. 2015, nr. 15, p. 2. ISSN 1471-2458.
117. SPÎNU, C., IAROVUI, P., HOLBAN, T., COJUHARI L. *Hepatita virală B: etiologie, epidemiologie, diagnostic, tratament și profilaxie*. Chișinău: Tipografia Centrală, 2008. 190 p.
118. SUPRAVEGHEREA DE STAT A SĂNĂTĂȚII PUBLICE ÎN REPUBLICA MOLDOVA. *Raport Național*. 2014. 84 p. AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ. *Raport Național "Supravegherea De Stat A Sănătății Publice În Republica Moldova"*. Chișinău, 2014. 84 p. ISBN 978- 9975-4027-2-9.
119. SAHIL, M., HASHEM, B. EL-SERAG. Epidemiology of HCC: Consider the Population. In: *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2013, vol. 47, nr. 0, pp. S2–S6. ISSN 1539-2031.
120. SĂNDULESCU, O., TAMER, S.A., STREINU-CERCEL, A. Liver Fibrosis and Progression of Liver Disease in Patients with Hepatitis Delta - Results from a Retrospective Study in Romania. In: *Journal of Translational Medicine*. 2017, vol. 22, nr. 1, pp. 53-55. ISSN 1479-5876.
121. SEO, S.I., HYOUNG, S.K., WON, J.K., et.al. Diagnostic value of PIVKA-II and alpha-fetoprotein in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. In: *World Journal of Gastroenterology*. 2015, vol. 21, pp. 3928–3935. ISSN 2219-2840.
122. SCHIRDEWAHN, T., GRABOWSKI, J., SEKYERE, S.O., et.al. The Third Signal Cytokine Interleukin 12 Rather Than Immune Checkpoint Inhibitors Contributes to the Functional Restoration of Hepatitis D Virus Specific T Cells. In: *The Journal of Infectious Diseases*. 2017, vol. 215, nr. 1, pp. 139-149. ISSN 1537-6613.
123. SHAKHGIL'DIAN, I., FARBER, N., KUZIN, S., et al. Perinatal infection with hepatitis B virus and the problem of its specific prevention. In: *Vestnik Akademii Meditsinskikh Nauk SSSR (The USSR Academy of Medical Sciences (Russian))*. 1990, vol. 7, pp. 29-32. ISSN 0002-3027.
124. SOMOVA, A., GOLOSOVA, T., MARGOLINA, A. The serodiagnosis of viral hepatitis C and B in different population groups. In: *Voprosy Virusologii (Questions in Virology)*. 1992, vol. 37, nr. 4, pp. 191-193. ISSN 2411-2097.
125. SPOREA, I., SIRLI, R., BOTA, S., et.al. Comparative study concerning the value of acoustic radiation force impulse elastography (ARFI) in comparison with transient elastography (TE) for the assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B and C. In: *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2012, vol. 38, pp. 1310–1316. ISSN 0301-5629.
126. SORIANO, V., VISPO, E., SIERRA-ENGUITA, R., et.al. Efficacy of prolonged tenofovir therapy on hepatitis delta in HIV-infected patients. In: *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (AIDS)*. 2014, vol. 28, pp. 2389–2394. ISSN 1473-5571.

127. SAFAIE, P., RAZEGHI, S., ROUSTER S.D., PRIVITERA I., SHERMAN K.E. Hepatitis D diagnostics: Utilization and testing in the United States. In: *Virus Research*. 2018, vol. 250, pp. 114–117. ISSN 0168-1702.
128. SARIN S.K., KUMAR M., LAU G.K., et.al. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update. In: *Hepatology International*. 2016, vol. 10, pp. 1–98. ISSN 1936-0533.
129. STOCKDALE, A. J, KREUELS, B., HENRION M.R.Y., et.al. Hepatitis D prevalence: problems with extrapolation to global population estimates. In: *Gut*, 2020, vol. 69, nr. 2, pp. 396-397. ISSN 1468-3288.
130. TRIFAN, A., STANCIU, C. Beta-blockers in decompensated cirrhosis: more questions than answers. In: *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 2016
131. TAHAEI, S.M.E. et al. Prevalence of hepatitis D virus in hepatitis B virus infected patients referred to Taleghani hospital, Tehran, Iran. In: *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*. 2014, vol. 7, nr. 3, pp. 144-150. ISSN 2008-4234.
132. TAKYAR, V., SURANA, P., KLEINER, D.E., et.al. Noninvasive markers for staging fibrosis in chronic delta hepatitis. In: *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2017, vol. 45, pp. 127–138. ISSN 1365-2036.
133. TOWNSEND, E.C., ZHANG, G.Y., ALI, R., et.al. The balance of type 1 and type 2 immune responses in the contexts of hepatitis B infection and hepatitis D infection. In: *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2019, vol. 34, pp. 764–775. ISSN 1440-1746.
134. TIEN, SY B. et al. High Prevalence and Significance of Hepatitis D Virus Infection among Treatment-Naïve HBsAg-Positive Patients. In: *Northern Vietnam*. 2013, vol. 8, nr. 10, pp. e78094. ISSN 1026-0862.
135. TCACIUC, E. Modificările hemodinamice în ciroza hepatică. Monografie. Chișinău: Tipografia Centrală, 2016. 264 p. ISBN 978-9975-53-668-4.
136. THIOLLAIS P., BUENDIA M.-A. Hepatitis B Virus. In: *Scientific American*. 1991, vol. 264, nr. 4, pp. 116-123. ISSN 0036-8733.
137. *The cancer of the liver italian program (clip) investigators*. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma. A retrospective study of 435 patients. In: *Hepatology*. 1998, vol. 28, pp. 751-755. ISSN 1527-3350.
138. TEH-IA, H., JAW-CHING, W, CHUNG-RU, L., et.al. Comparison of clinico-pathological features in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma with or without hepatitis D virus superinfection. In: *Journal of Hepatology*. 1996, vol. 25, nr. 4, pp. 439–444. ISSN 0168-8278.
139. TOYODA, H., KUMADA, T., KIRIYAMA, S., et.al. Prognostic significance of simultaneous measurement of three tumor markers in patients with hepatocellular carcinoma. In: *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2006, vol. 4, pp. 111–117. ISSN 1542-3565.
140. TRIANTOS, C., KALAFATELI, M., NIKOLOPOULOU, V., et.al. Meta-analysis: antiviral treatment for hepatitis D. In: *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2012, vol. 35, pp. 663-673. ISSN 1365-2036.
141. TROPBERGER, P., MERCIER, A., ROBINSON, M., et.al. Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization

- amenable to epigenetic manipulation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015, vol. 112, pp. E5715–E5724. ISSN 1091-6490.
142. TĂPĂLAGĂ, D., FORZANI, B., HELE, C., et.al. Prevalence of virus delta in Romania. In: *Hepato-gastroenterology*. 1986, vol. 33, pp. 238-239. ISSN 0172-6390.
  143. TSATSRALT-OD, B., TAKAHASHI, M., NISHIZAWA, T., et.al. High prevalence of dual or triple infection of hepatitis B, C, and delta viruses among patients with chronic liver disease in Mongolia. In: *Journal of Medical Virology*. 2005, vol. 77, pp. 491-499. ISSN 1096-9071.
  144. TURCANU, A., ANDRIES, L., GHERMAN, I. et al. Clinical and immunological aspects of patients with cronic hepatitis delta. In: *International Journal on Immunorehabilitation*. 2015, vol. 17, nr. 2, pp.74-78. ISSN 1562-3629.
  145. TURCANU, A., ANDRIES, L., DUMBRAVA, V.-T. et al. The immunological determinants of liver disease induced by chronic delta infection. In: *International Journal on Immunorehabilitation (Oficial Journal of the World Immunopathology Organization)*. 2016, vol. 18, nr. 2, pp.100-104. ISSN 1562 – 3629.
  146. TURCANU, A., ANDRIES, L., BARBA, D. *Impact of Il 10, Ifn Gamma and Tnf Alfa in Evolution of Patients Affected by Chronic Delta Viral Infection*. In: Allergy, Asthma, COPD, Immunophysiology, Norehabilitology: Innovative Technologies, Filodiritto International Proceedings. 2017, p. 211-219. ISBN 978-88-95922-83-6. Intr-o Carte sau articol?
  147. TURCANU, A., PINEAU, P., TCACIUC, E., DUMBRAVA, V.-T. In Moldova social situation is a primary modulator of survival in a hepatocellular carcinoma. In: *Journal of Hepatology*. 2018, vol. 68, suppl. 1, S442-S443. ISSN 0168-8278.
  148. TURCANU, A., PINEAU, P., PITEL, E., et.al. A heavy burden of multiple viral infections in Moldovan patients with hepatocellular carcinoma. In: *5thUpDate on Hepatology Course*. Bucharest: 2018, p.17.
  149. TURCANU, A. Role of spirulin derivate drug in the dynamics of chronic hepatitis B and C. In: *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2013, vol. 3, nr. 1, pp. S1-S124. ISSN 0973-6883.
  150. TURCANU, A., ANDRIES, L., DUMBRAVA, V.-T. et al. CD4/CD8, level of antiHDVAb and liver fibrosis in chronic hepatitis delta. In: *Programme GastroUpdate EASL Conference*. Cehia, 2016. eposter P0003.
  151. TURCANU, A., ANDRIES, L., DUMBRAVA, V.-T. et al. The platelet count and CD4/CD8 to interact with liver fibrosis in chronic hepatitis delta? In: *Programme of the 3rd Update Hepatology Course*, Romania: 2016, p.30.
  152. TURCANU, A., DUMBRAVA, V.-T., ANDRIES, L. et al. Liver fibrosis in correlation with CD4/CD8 and platelet count in patient with chronic hepatitis delta. In: *Programme EASL Monotematic Conference*. Portugalia: 2016, p.116.
  153. TURCANU, A., ANDRIES, L., GHERMAN, I. et al. Cellular immunity of patients with chronic viral delta hepatitis. In: *International Journal on Immunorehabilitation*. 2015, vol. 17, nr. 2, pp.56. ISSN 1562 – 3629.

154. TURCANU, A., DUMBRAVA, V.-T. The profile of patients with chronic hepatitis delta in Republic of Moldova. In: *Journal of Gastrointestinal and Liver Disease*. 2016, vol.25, suppl. 2, p. 191. ISSN 2457-3876.
155. TURCANU, G., DOMENTE, S., BUGA, M., RICHARDSON E. Republic of Moldova health system review. In: *Health systems in transition*. 2012, vol. 14, nr. 7, pp. 1-151. ISSN 1817-6127.
156. TUGUI, L., DUMITRU, M., IACOB, S., et al. The efficacy of the Peginterferon treatment in chronic hepatitis HDV and compensate liver cirrhosis. In: *Revista Medico-Chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști din Iasi*. 2014, vol. 118, pp. 368–375. ISSN 0300-8738.
157. ȚURCAN, S. I. *Particularitățile clinico-imunologice în hepatite cronice ale bolnavilor din diferite zone ecologice ale Moldovei*: autoreferat al tz. de doct. în științe medicale. Chișinău, 1995. 22 p.
158. VOICULESCU, M., ILIESCU, L., IONESCU, C., et al. A cross-sectional epidemiological study of HBV, HCV, HDV and HEV prevalence in the SubCarpathian and South-Eastern regions of Romania. In: *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*. 2010, vol. 19, pp. 43-48. ISSN 1842-1121.
159. VIRCHOW, R. Uber das Vorkommen und den Nachweiss des Hepatogenen, insbesondere des Katarrhalischen Icterus. In: *Virchows Archiv a Pathological Anatomy and Histology*. 1865, vol. 32, pp. 117-125. ISSN 1432-2307.
160. VIAZOV, C.O., PALADI, N.E., MHITAREA, A.L., et.al. Frequency of delta infection Union Sovietic. In: *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology (Moscow)*. 1989, nr. 10, pp. 97-101. ISSN 1684-1182.
161. VERME, G., ROSSANA, M., FILIPPO, B., et.al. Role of hepatitis delta virus infection in hepatocellular carcinoma. In: *Digestive Diseases and Science*. 1991, vol. 36, nr. 8, pp 1134–1136. ISSN 0163-2116.
162. VOGEL, C.L. International Symposium on Hepatocellular Carcinoma—Kampala, Uganda. In: *Journal of the National Cancer Institute*. 1972, vol. 48, pp.567. ISSN 1460-2105.
163. WEINER, A.J., CHOO, Q.L., WANG, K.S., et.al. Single antigenomic open reading frame of the hepatitis delta virus encodes the epitope(s) of both hepatitis delta antigen polypeptides p24 delta and p27 delta. In: *Journal of Virology*. 1988, vol. 62, pp. 594–599. ISSN 1098 – 5514.
164. WEDEMEYER, H., YURDAYDIN, C., HARDTKE, S., et.al. HIDIT-II study team. Peginterferon alfa-2a plus tenofovir disoproxil fumarate for hepatitis D (HIDIT-II): a randomised, placebo controlled, phase 2 trial. In: *The Lancet Infectious Diseases*. 2019, vol. 19, pp. 275–286. ISSN 1474-4457.
165. WRANKE, A., SERRANO, B.C., HEIDRICH, B., et.al.. Antiviral treatment and liver-related complications in hepatitis delta. In: *Hepatology*. 2017, vol. 65, pp. 414–425. ISSN 1527-3350.

166. WRANKE, A., HEIDRICH, B., ERNST, S., et.al. WEDEMEYER H. HIDIT-2 Study Group. Anti-HDV IgM as a marker of disease activity in hepatitis delta. In: PLOS One. 2014, vol. 9, pp. e101002. ISSN 1549-1676.
167. WEDEMEYER, H., YURDAYDIN, C., DALEKOS, G.N. et al. Peginterferon plus adefovir versus either drug alone for hepatitis delta. In: *The New England Journal of Medicine*. 2011, vol. 64, pp. 322–331. ISSN 0096-6762.
168. WEDEMEYER, H., YURDAYDIN, C., ERNST, S., et.al. HIDIT-2 Study Group. Prolonged therapy of hepatitis delta for 96 weeks with pegylated-interferon-a-2a plus tenofovir or Placebo does not prevent HDV RNA relapse after Treatment: the HIDIT-2 study. In: *Journal of Hepatology*. 2014, vol. 60, suppl 1, pp. S2–S3. ISSN 0168-8278.
169. WRANKE, A., HEIDRICH, B., ERNST, S., et al. Anti-HDV IgM as a marker of disease activity in hepatitis delta. In: *PLOS One*. 2014, vol. 9, nr. 7, pp. e101002. ISSN 1932-6203.
170. WRANKE, A., HARDTKE, S., BORZACOV, L.P., et al. Diversity of clinical presentation and virological characteristics of hepatitis delta: The hepatitis Delta International network (HDIN). In: *Zeitschrift fur Gastroenterologie*. 2016, vol. 54, nr. 12, pp. 1343-1404. ISSN 1439-7803.
171. WRANKE, A., PINHERIR, O., BORZAKOV, L.M., et al. Clinical and virological heterogeneity of hepatitis delta in different regions world-wide: The Hepatitis Delta International Network (HDIN). In: *Liver International*. 2018, vol. 38, nr. 5, pp.842–850. ISSN: 1478-3231
172. WRANKE, A., PINHEIRO, BORZACOV, L.M., et.al. Hepatitis Delta International Network. Clinical and virological heterogeneity of hepatitis delta in different regions world-wide: The Hepatitis Delta International Network (HDIN). In: *Liver International*. 2018, vol. 38, nr. 5, pp.842–850. ISSN: 1478-3231
173. WONG, G. L.-H., CHAN, H. L.-Y., TSE, Y.-K., et.al. On-Treatment Alpha-Fetoprotein Is a Specific Tumor Marker for Hepatocellular Carcinoma in Patients With Chronic Hepatitis B Receiving Entecavir. In: *Hepatology*. 2014, vol. 59, pp. 986–995. ISSN 1527-3350.
174. WONG, V.W., YU, J., CHENG, A.S., et.al.. High serum interleukin-6 level predicts future hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis B. In: *International Journal of Cancer*. 2009, vol. 124, pp. 2766-2770. ISSN 1097-0215.
175. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Age-standardized death rates of liver cirrhosis*. In: Global Health Observatory (GHO) data World Health Organization. 2017.
176. WORLD HEALTH ORGANIZATION, UNIT WHOMOSA. *Global status report on alcohol and health 2014*. Luxembourg: 2014. 392 p. ISBN 978-92-4-156-475-5
177. YOON JIN LEE, JEONG MIN LEE, JI SUNG LEE, HWA YOUNG LEE, BO HYUN PARK, YOUNG HOON KIM, JOON KOO HAN, BYUNG IHN CHOI. Hepatocellular Carcinoma: Diagnostic Performance of Multidetector CT and MR Imaging—A Systematic Review and Meta-Analysis. In: *Radiology*. 2015, vol. 275, nr. 1, pp. 97-109. ISSN 1527 – 1315.

178. YURDAYDIN C., KESKIN O., KALKAN Ç. et al. Optimizing lonafarnib treatment for the management of chronic delta hepatitis: the lowr HDV-1 study. In: *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2018, vol. 67, nr. 4, pp. 1224-1236. ISSN 1527-3350.
179. YURDAYDIN, C., KESKIN, O., KALKAN, C. et al. Interferon treatment duration in patients with chronic delta hepatitis and its effect on the natural course of the disease. In: *The Journal of Infectious Diseases*. 2018, vol. 217, nr. 8, pp. 1184-1192. ISSN 0022-1899.
180. YURDAYDIN, C., ABBAS, Z., BUTI, M., et.al. Hepatitis Delta International Network (HDIN) Treating chronic hepatitis delta: The need for surrogate markers of treatment efficacy. In: *The Journal of Hepatology*. 2019, vol. 70, pp. 1008–1015. ISSN 0168-8278.
181. XIA, Y.P., YEH, C.T., OU, J.H., LAI, M.M. Characterization of nuclear targeting signal of hepatitis Delta antigen: Nuclear transport as a protein complex. In: *Journal of Virology*. 1992, vol. 66, nr. 2, pp. 914–921. ISSN 1098-5514.
182. АБДУРАХМАНОВ, Д.Т. *Хронический гепатит В и D*. Россия: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 288 с. ISBN 978-5-9704-1548-1.
183. БАЗИН, И.С. Гепатоцеллюлярный рак – современное состояние проблемы. В: *Практическая онкология*. 2008, Т. 9, № 4, с. 216–228. ISSN 2663-3280.
184. БОГОМОЛОВ, П.О., ВОРОНКОВА Н.В., БУЕВЕРОВ А.О., et.al. Первый опыт применения препарата «Myrcludex В» при хроническом гепатите D (Предварительные результаты). В: *Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии*. 2015, № 2, с. 23-26. ISSN 2079-9667.
185. ДАДАШЕВА, А.Э. К вопросу о широте распространения инфекции, вызванной вирусом гепатита D в Азербайджане. В: *Биомедицина (Баку)*. 2017, № 1, с. 11–13. ISSN 2074-5982.
186. ДЕДОВ, А.В., ПАНОВ, А.А., ОРЛОВ, Ф.В. Распространенность маркеров дельта-инфекции и изменения клинической картины у больных хроническим гепатитом и циррозом печени дельта-вирусной этиологии по данным 20-летнего наблюдения (1990–2010 гг.) в Астраханской области. В: *Астраханский медицинский журнал*. 2014, № 4, с. 25–31. ISSN 1992-6499.
187. ЕСМЕМБЕТОВ, К.И., АБДУРАХМАНОВ, Д.Т., ОДИНЦОВ, А.В. Современные представления о патогенезе, естественном течении и лечении гепатита дельта (35 лет с момента открытия). В: *Клиническая медицина*. 2013, Т. 91, № 5, с. 22–26. ISSN 2412-1339.
188. ИСЛАМБЕКОВ, З.А. Сравнительная оценка методов лечения гепатоцеллюлярного рака. В: *Анналы хирургической гепатологии*. 2009, Т.14, №2, с. 59–63. ISSN 2408-9524.
189. ИЛЬЧЕНКО, Л.Ю., КОЖАНОВА, Т.В., САРЫГЛАР, А.А. и др. Клиническое течение и исходы хронической дельта-инфекции в эндемичном регионе. В: *Архив внутренней медицины*. 2012, Т. 7, № 5, с. 51–56. ISSN 2226-6704.
190. КОТИВ, Б.Н., ДЗИДЗАВА, И., АЛЕНТЬЕВ, С. Первичный рак печени, ассоциированный с хроническими вирусными заболеваниями печени. В: *Ж. Инфектологии*. 2009, Т. 1, № 4, с. 55-59. ISSN 2499-9865.

191. КУЗИН, С.Н., ПАВЛОВ, Н.Н., СЕМЕНОВ, С.И. и др. Вирусные гепатиты в различных популяционных группах в Республике Саха (Якутия). В: *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2004, № 1, с. 18–22. ISSN 0372-9311.
192. КОЖАНОВА, Т.В., ИЛЬЧЕНКО, Л.Ю., МИХАЙЛОВ, М.И. Вирусный гепатит дельта. Существует ли в Российской Федерации проблема дельта-инфекции? В: *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2014, Т. 112, № 12, с. 4–12. ISSN 1682-8658.
193. КУЗНЕЦОВ, П.Л. *Клинико-лабораторные особенности течения фульминантной формы вирусных гепатитов В и D с учетом связывающей способности свороточного альбумина*: автореф. дис. д-ра мед. наук. Екатеринбург, 2005.
194. МЕРАБИШВИЛИ, В.М. Эпидемиология рака печени. Заболеваемость, смертность, динамика гистологической структуры. В: *Сибирский онкологический журнал*. 2015, № 2, с.5–14. ISSN 2312-3168.
195. ЛЕВИТАН, Б.Н., ДЕДОВ, А.В. *Дельта-гепатит*. Астрахань: АГМА, 2001. 104 с. ISBN
196. ЛЕВИТАН, Б.Н., ДЕДОВ А.В. Гепатит дельта – 2019. Часть I: этиология, эпидемиология, особенности течения и исходы. В: *Эффективная фармакотерапия*. 2019, Т. 15, № 18, С. 42–50. ISSN 2307-3586.
197. РАХИМОВА, Х.К. *Хронические диффузные поражения печени дельта-вирусной этиологии (некоторые аспекты вирусологии и иммунопатологии)*: автореф. дис. д-ра мед. наук. Душанбе, 2007.
198. СЮТКИН, В.Е. *Клиническая характеристика хронических диффузных заболеваний печени, обусловленных сочетанной инфекцией вирусами гепатита В, С и/или дельта*: автореф. дис. д-ра мед. наук. Москва, 1999.
199. ШАХГИЛЬДЯН, И.В., МИХАЙЛОВ М.И., ОНИЩЕНКО Г.Г. *Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика)*. Россия: ФГОУ ВУНМЦ Роздрава, 2003. 384 с. ISBN ???
200. ЯШИНА, Т.Л., ФАВОРОВ, М.О., ШАХГИЛЬДЯН, И.В. и др. Распространение маркёров гепатита В и дельта среди населения регионов, контрастных по уровню заболеваемости. В: *Вопросы вирусологии*. 1992, № 4, с. 194–196. ISSN 0507-4088.
201. ШАЙН, А.А. *Первичный рак печени в Тюменской области*: автореф. дис. д-ра мед. наук. Москва, 1973.

#### **Анеха 1 Acordul informat.**



**Acord informat  
(formular de acceptare)**

1. Titlul studiului: \_\_\_\_\_
2. Numele și adresa centrului de desfășurare a studiului: \_\_\_\_\_
3. Numele/Prenumele participantului la studiu: \_\_\_\_\_
4. Data de naștere a participantului la studiu: \_\_\_\_\_
5. Când e cazul: Numele/Prenumele reprezentantului legal (martorul) al participantului la studiu: \_\_\_\_\_
6. Declarație:

Eu subsemnatul, (numele), confirm că:

- am citit și înțeles formularul de informare (numărul versiunii și data acestuia)
- știu că participarea mea în acest studiu este voluntară și că oricând mă pot retrage din studiu fără a explica motivele retragerii
- știu că retragerea mea din studiu nu-mi va afecta nici într-un fel dreptul la asistență medicală ulterioară
- înțeleg că datele mele personale (inclusiv cele medicale) pot fi examinate în regim de confidențialitate de către cei care monitorizează studiul, comitetul de etică a cercetării, de către autoritățile de reglementare din domeniu.

- ACCEPT SĂ PARTICIP LA STUDIU (titlul studiului)

\_\_\_\_\_  
Numele participantului la cercetare (sau a reprezentantului legal)

\_\_\_\_\_  
Semnătura participantului la cercetare (sau a reprezentantului legal)      Data: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Când e cazul: Tipul relației dintre reprezentantul legal și participantul la cercetare

\_\_\_\_\_  
Persoana care a obținut acordul informat

*Remarca CEC:*

*Compartimentul (nr.6) al acordului informat va fi completat și cu alți item în funcție de specificul studiului. De exemplu:*

- ✓ *acceptarea sau neacceptarea participantului la studiu a trimiterii în alte țări a datelor studiului*
- ✓ *acceptarea sau neacceptarea utilizării datelor studiului și în alte proiecte de cercetare consecutive (în cazul acceptării se specifică de asemenea tipul de studiu pentru care este obținut acceptul)*
- ✓ *acceptarea sau neacceptarea de a fi contactat pentru alte studii similare*
- ✓ *acordul sau dezacordul pentru înregistrările audio-video*
- ✓ *acordul sau dezacordul pentru chestionare separate privind anumite subiecte sensibile (infecție HIV, consum de droguri)*
- ✓ *acceptul folosirii sau distrugerii probelor biologice după retragerea prematură a participantului din studiu*
- ✓ *dorința de a cunoaște sau nu despre depistarea unor patologii grave în cazul screening-ului genetic etc.*

## **Anexa 2 Carta investigațională**

### CARTA INVESTIGĂRII COMPLEXE A PACIENTULUI CU HDV

#### *DATE GENERALE*

1. Numărul fișei de observație

2. Numărul cartelei

3. Denumirea IMSP

4. Secția (cabinet)

5. Numele, prenumele

6. Adresa(domiciliu,tel)

7. Diagnosticul de bază conform CIM 2010

---

8. Faza maladiei: 1 ARN VHD poz. 2. ARN VHD neg

9. Diagnosticul concomitent

10. Internat, data \_\_\_\_\_ externat, data \_\_\_\_\_

11. Consultatie data-----

11. Tratament ambulatoriu antecedent

---

12. Sex: 1-masculin; 2-feminin

13. Vârsta (ani)\_\_\_\_\_

14. Starea socială: casatorit-----, necasatorit-----, copii-----

16. Locul de trai: 1- urban ; 2-rural

17. Profesia:

19. Grupa de sange----- Rh factor-----

20. Status clinic subiectiv:

1.asimptomatic-----, 2.s-l astenic-----3.s-l dolor abdominal---,4.s-l icteric----,

5.s-l hemoragipar----, 6.s-l edematos-----

21. Anamneza bolii: debut bolii: 1.acut----, 2.treptat-----

22. Vechimea bolii: pina la 1 an---, 1-5 ani-- 5-10 ani-----, mai mult 10 ani----

23. Numarul spitalizarilor anterioare pe baza hepatitei tratamente anterioare: antiviral (Pegasis, PegIntron, Intron) or hepatoprotectoare

#### 24. Status social:

prezenta factorilor de risc pentru achizitionarea hepatitei parenterale:

- intrrventii chirurgicale da---nu-----
- tratament stomatologic da---nu-----
- hemotransfuzii da---nu-----
- tatuaje, pirsing da--nu-----
- contacte sexuale neprotejate cu posibili subiecti infectati da---nu-----
- aflare in inchisori, orfel--da---nu--
- utilizatori de droguri da-----nu-----
- lucratori medicali da-----nu-----
- infectati de HIV da-----nu-----
- membri ai familiei bolnav de patologie hepatica virala da---nu-----
- membrii ai familiei bilnavi de patologie hepatica neprecizata etiologic da-----nu----
- calatorie in tari endemice pentru hepatite: da-----nu-----

#### 22. Statut obiectiv:

prezenta icterului-----, lipsa icterului-----

normostenic-----, hiperstenic-----, astenic-----hepatomegalie-----,  
splenomegalie-----

#### 23. Statut biochimic:

s-l citolitic: ALT-----, AST-----

s-l colestatic: bilirubina totala---, directa----

s-l hepatopriv: proteina -----, albumina-----, protrombina-----

s/l hipersplenism: Hb----, leuc----, tromb-----

s-l imunoinflamator: leuc----, limf-----, VSH-----

IgA----, IgM----, IgG----, IgE-----

CD3----, CD4-----, CD8----- CD16----, IFN alfa-----, IFN gama-----

Autoanticorpii: ANA-----, antiLKM-----, antiDNA-----, AMA-----

#### 24. Marcherii serologici hepatici:

AgHBs-----, anti HBcor----, AgHBe----, anti HBe---Anti Hbcor IgM-----, anti HDV----, anti HDV  
IgM----, ARN HDV-----, ADN HBV-----

25. USG ficat: l.drept-----, l. sting-----, v.portae-----splina: d-ni-----, .lien-----

26. CT/ RMN hepatic: Concluzie-----

27. Fibroscan, kPa

28. Fibrotest-: F0----,F2----,F3----,F4-----

29. Biopsie hepatică. Rezultat.

30. Tratament a fost administrat-da----, nu-----

31. Terapia Antiviral: denumirea medicament-----, anul de initiere-----,  
dozaj-----, durata-----, efecte adverse-----

32. Dezvoltarea complicațiilor:

33. ciroză hepatică

34. decompensarea cirozei hepatice

35. carcinom hepatocelular

36. deces



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII  
AL REPUBLICII MOLDOVA  
Instituția Medico-Sanitară Publică  
**SPITALUL CLINIC REPUBLICAN**

MD0125, Chișinău, str. N. Ceșelnicu nr. 29, 1671 - 575 212 85-81, 40-30-02, 40-35-22 Fax: +373 22 72 9033, e-mail: scd@scrm.md  
http://www.scr.md

nr. 11/998  
din 20.05.2017



„Aprob”  
Director IMSP Spitalul Clinic Republican  
Anatol Ciubotaru

**ACT DE IMPLEMENTARE ÎN PRACTICĂ**

1. **Denumirea propunerii de implementare:** Utilizarea scorului BEA pentru evaluarea evoluției și pronosticului pacienților cu afecțiuni hepatice cronice induse de infecția delta
2. **De cine a fost propusă:** Țurcanu A., Tofan-Scutaru L., Pelteu A.
3. **Unde a fost implementată:** IMSP SCR, secția Hepatologie
4. **Anul implementării:** 2017.
5. **Numărul investigațiilor:** 100 pacienți.
6. **Rezultatele folosirii metodei:** Scorul BEA este un scor de prognostic, util în stratificarea pacienților cu infecția cronică delta și prognozarea evoluției acestor maladii. Aplicarea acestui scor în practica medicală va permite selectarea pacienților pentru terapia diferențiată adecvată (clasa A – monitorizarea pacienților; clasa B – tratamentul cu antivirale, clasa C – plasarea în lista de așteptare pentru transplant hepatic).
7. **Eficacitatea implementării:** Utilizarea scorului BEA în practica medicală permite individualizarea terapeutică a pacienților cu afecțiuni hepatice cronice induse de infecția cronică delta în funcție de clasa A,B,C.
8. **Este recomandată:** De a utiliza în practica medicală scorul BEA în evaluarea pacienților cu afecțiuni cronice hepatice induse de infecția delta pentru diferențierea intervenției diagnostice și terapeutice adecvate.

Șef secție Hepatologie  
IMSP SCR



Maria Cojuhari



MINISTERUL SĂNĂTĂȚII  
AL REPUBLICII MOLDOVA  
Instituția Medico-Sanitară Publică  
SPITALUL CLINIC REPUBLICAN

MD0275, Chișinău, str. N. Testemitanu, 28. Tel.: +373 2 72-85-83, 40-16-00, 40-33-55 Fax: +373 2 72-98-31, e-mail: sc@smc.md  
http://www.scr.md

nr. 4/996  
din 18.05.2014

„Aprob”  
Director IMSP Spitalul Clinic Republican  
Anatol Ciubotaru



ACT DE IMPLEMENTARE ÎN PRACTICĂ

1. **Denumirea propunerii de implementare:** Determinarea coeficientului de saturare a transferinei la pacienții cu hepatopatii cronice și nivel sporit de feritină serică.
2. **De cine a fost propusă:** Țurcanu A., Cobâllean L., Pelteș A., Proca N.
3. **Unde a fost implementată:** IMSP Spitalul Clinic Republican, secția Hepatologie.
4. **Anul implementării:** 2017.
5. **Numărul investigațiilor:** 50 pacienți.
6. **Rezultatele folosirii metodei:** Aprecierea coeficientului de saturare a transferinei în serul sanguin la pacienții cu hepatopatii cronice și nivel crescut de feritină serică permite identificarea persoanelor cu hemocromatoză primară ce necesită o abordare specifică terapeutică.
7. **Eficacitatea implementării:** Evaluarea coeficientului de saturare a transferinei în serul sanguin permite selectarea pacienților suspecți pentru hemocromatoza ereditară (cu  $CS1 > 45$ ) astfel asigurând managementul corect al pacientului și permițând *screening*-ul familial.
8. **Este recomandată:** De a fi utilizată în practica medicală determinarea concentrației coeficientului de saturare a transferinei la pacienții cu hepatopatii cronice și nivel sporit de feritină serică pentru stabilirea precoce a diagnosticului și abordarea corectă a unui pacient cu hemocromatoză.

Sef secție Hepatologie  
IMSP SCR



Maria Cojohari

## **DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII**

Subsemnata, declar pe raspundere personală că materialele prezentate în teză de postdoctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că în caz contrar, urmează su suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Adela Țurcanu

19 martie 2021

## Anexă 5. CV autorului

<b>Nume/ Prenume</b>	<b>ADELA ȚURCANU</b>
Data și locul nașterii	14 februarie 1974, s. Singureni, rl Râșcani, RM
Funcția deținută/ locul de muncă	Conferențiar universitar, Disciplina de gastroenterologie, Departamentul de medicină Internă, IP USMF Nicolae Testemițanu
Gradul științific/titlul științifico-didactic	Doctor în științe medicală (Diploma de Doctor, Nr 0259, 27.04.2006) Conferențiar universitar (Diploma seria CU Nr 1057, 02.04.2015)
Experiență profesională	
Prezent - 2015	Conferențiar universitar, Disciplina de Gastroenterologie, Departamentul Medicină Internă, IP USMF Nicolae Testemițanu
2020 – 2016	Conferențiar cercetător, Laboratorul de Alergologie și Imunologie Clinică, IP USMF Nicolae Testemițanu
2015 - 2006	Asistent universitar, Catedra de Medicină Internă Nr.4, IP USMF Nicolae Testemițanu
2005 - 2002	Studii postuniversitare de doctorantură, Scoala Doctorală, IP USMF Nicolae Testemițanu.
1998 - 2002	Studii postuniversitare de rezidențiat, specialitatea Medicină Internă. IP USMF Nicolae Testemițanu.
1991-1997	Studii universitare, Facultatea Medicină Generală 1, IP USMF Nicolae Testemițanu.
Stagii/ cursuri/conferințe	
	Stagiu de specializare, Gastroenterologie, UMF din Craiova, România, 2009 Stagiu de specializare, Gastroenterologie, UMF Gr.T.Popa din Iasi, România, 2014 The XXIV <sup>st</sup> Romanian Congress of Hepatology , Romanian Association for the Study of the Liver. Bucharest, România, 2014 Postgraduate Teaching Programme, 22nd United European Gastroenterology Week, Viena, Austria, 2014 Postgraduate Teaching Programme, 24th UEG Week, Vienna, Austria, 2016 The 3 European Update Congress in Gastroenterology, Prague, Cehia, 2016 The XXVI-th NATIONAL CONGRESS of HEPATOLOGY, Bucharest, Romania, 2016 Postgraduate Teaching Programme, 25th UEG Week, Barcelona, Spain, 2017



	<p>International Congress of Liver Disease (EASL), Paris, France, 2018</p> <p>Stagiu de specializare, Gastroenterologie, UMF Gr.T.Popa, Iași, 2019</p> <p>The 2nd Biannual International Conference of Armenian Hepatological Forum, Erevan Armenia, 2013</p>
Experiență de cercetare științifică	<p>-Cercetare în cadrul tezei de doctor habilitat în științe medicale (2016 – prezent), cu tema: <i>Evoluția infecției cronice virale delta – de la hepatită cronică la carcinom hepatocelular.</i></p> <p>-Cercetare în cadrul temei de doctor în medicină (2002-2005), cu tema: <i>Particularitățile clinico-imunologice ale hepatitei cronice virale C în asociere cu infecția Herpesviridae.</i></p>
Proiecte științifice	Investigator în 4 proiecte internaționale, 2 proiecte naționale, studii/trialuri clinice internaționale
Membru	<p>Asociația Europeană de Studiu al Ficatului</p> <p>Asociația Americană de Gastroenterologie</p> <p>Asociația Asia-Pacific de Studiu a ficatului</p> <p>Asociația Română de Studiu a Ficatului</p> <p>Asociația Română de Gastroenterologie, Endoscopie și Hepatologie</p> <p>Asociația de Studiu a Ficatului din Republica Moldova</p> <p>Asociația de Imunologie și Alergologie Clinică din republica Moldova</p>
Limbi cunoscute	Româna – nativă, l.rusă – C2, l.engleză – B2, l.franceză – B1
Publicații științifice	Mai mult de 100 de publicații științifice, dintre care 2 monografii (monoautor), coautor în 2 monografii, 5 manuale (coautor), 5 ghiduri, 11 protocoale clinice naționale și internaționale, articole cu impact factor și în reviste recunoscute internațional.
Date de contact	<p>Str.Ștefan cel Mare și Sfânt, 165</p> <p>Universitatea de Medicină și Farmacie Nicolae Testemițanu</p> <p>Chișinău, Republica Moldova</p> <p>adela.turcanu@usmf.md</p>