

ARTICOL DE CERCETARE

Profilul hepatitei virale Delta în Republica Moldova – de la transmisia intrafamilială la evoluția clinică

Adela Țurcanu^{1,2†*}, Veronica Cumpătă^{2†},
Eugen Tcaciuc^{1†}, Pascal Pineau^{3†}

¹Disciplina de gastroenterologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

²Clinica de gastroenterologie și hepatologie Helpa, Chișinău, Republica Moldova;

³Unité „Organisation nucléaire et Oncogène”, Institut Pasteur, Paris, France.

Data primirii manuscrisului: 20.06.2019

Data acceptării spre publicare: 20.09.2019

Autor corespondent:

Adela Țurcanu, dr. șt. med., conf. univ.

Disciplina de gastroenterologie

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

bd. Ștefan cel Mare 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

e-mail: adela.turcanu@usmf.md

RESEARCH ARTICLE

Delta viral hepatitis profile in Republic of Moldova – between intra-familial transmission and clinical evolution

Adela Turcanu^{1,2†*}, Veronica Cumpata^{2†},
Eugen Tcaciuc^{1†} and Pascal Pineau^{3†}

¹Discipline of gastroenterology, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

²Gastroenterology and hepatology clinic Helpa, Chisinau, Republic of Moldova;

³Unit „Organisation nucléaire et Oncogène”, Institut Pasteur, Paris, France.

Manuscript received on: 20.06.2019

Accepted for publication on: 20.09.2019

Corresponding author:

Adela Turcanu, PhD, assoc. prof.

Discipline of gastroenterology

Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy

165, Ștefan cel Mare si Sfânt bd., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004

e-mail: adela.turcanu@usmf.md

Ce nu este, deocamdată, cunoscut la subiectul abordat

În unele țări din Europa de Vest, hepatita Delta este considerată o patologie rară, în timp ce în estul continentului, în special, în Republica Moldova, se întâlnește destul de frecvent. Absența unor date sau studii țintite pe această patologie, face dificilă aprecierea evoluției naturale a bolii și definitivarea unor caracteristici ce ar putea fi aplicate practic în tratamentul acestor pacienți.

Ipoteza de cercetare

Acest studiu a avut ca scop evaluarea prevalenței infecției cu virusul hepatic D în Republica Moldova și a trăsăturilor distinctive determinate de vârstă, originea regională a pacienților, modelului de transmiterea a bolii, asocierea cu factorii de risc, simptomele clinice diagnosticate la bolnavi.

Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Hepatita Delta este o patologie asociată cu o evoluție destul de agresivă, în special dacă a existat un contact de lungă durată în copilărie. Transmiterea intrafamilială a virusului hepatic D reprezintă un factor de risc destul de important, observat în sudul țării, în acest caz hepatita Delta fiind diagnosticată mai precoce și de obicei în stadii avansate.

What is not known yet, about the topic

In some Western European countries, Delta hepatitis is considered a rare disease, while in the eastern part of the continent, especially the Republic of Moldova, it is quite common. The absence of data or studies targeted on this pathology, makes it difficult to appreciate the natural evolution of the disease and to define some features that could be applied practically in the treatment of these patients.

Research hypothesis

The purpose of this study was to evaluate the prevalence of hepatic D infection in the Republic of Moldova and of the distinctive features determined by age, the regional origin of the patients, the model of the transmission of the disease, the association with the risk factors, the clinical symptoms diagnosed in the patients.

Article's added novelty on the scientific topic

Hepatitis Delta is a pathology associated with a rather aggressive evolution, especially if there has been long-term contact in childhood. Intra-family transmission of hepatic D virus is a very important risk factor, observed in the south of the country, in this case Delta hepatitis is diagnosed earlier and usually in advanced stages.

Rezumat

Introducere. Hepatita Delta, uneori, este considerată o boală dispărută în Europa de Vest, dar încă răspândită în anumite țări situate în estul continentului. Republica Moldova este o țară în care hepatita Delta este suspectată a fi responsabilă de o maladie cu o evoluție destul de agresivă. Cu toate acestea, până în prezent, în țară, nu a fost publicat niciun studiu care să descrie pacienții infectați cu virusul hepatitei delta.

Material și metode. În acest studiu transversal, am descris caracteristicile demografice, clinice și biologice ale 340 de pacienți infectați cu virusul hepatic D, care sunt supravegheați și îngrijiți în 4 instituții medicale din Moldova.

Rezultate. Vârsta medie a pacienților a fost de $48,3 \pm 7,6$ de ani, predominant fiind femeii (156 vs 184). Toți pacienții au avut forma anti-HBe negativă, dar ADN-ul virusului hepatitei B a fost detectat în 31,6% din cazuri. Încărcătura virală a ARN HDV a fost de $5,9 \pm 1,7 \log_{10}$ UI/ml. Principalul factor de risc al hepatitei a fost transmiterea intrafamilială (41,7%). O parte mare de pacienți au fost deja afectați de ciroză hepatică (58,4%) și dintre aceștia, 53,3% prezentau semne de decompensare. Durata de timp de la diagnosticul cirozei hepatice, a fost corelată cu durata infecției cu virusul hepatic D (Pearson $r = 0,470$, $p < 0,0001$), dar nu cu cea a infecției cu virusul hepatic B. În cazul transmiterii familiale, vârsta pacienților a fost semnificativ mai tânără ($46,0 \pm 9,1$ ani vs $50,6 \pm 9,2$ ani), la fel a fost și vârsta de diagnosticare a cirozei hepatice ($40,8 \pm 11,2$ ani vs $46,9 \pm 9,7$ ani, $p = 0,005$).

Concluzii. Hepatita Delta reprezintă o problemă importantă de sănătate în Moldova. Transmiterea intrafamilială a hepatitei, în special în sudul țării, este responsabilă de anticiparea complicațiilor. Aplicarea măsurilor de screening activ precum și disponibilitatea terapiei antivirale sunt măsurile urgente care necesită a fi aplicate în Republica Moldova.

Cuvinte cheie: hepatita, Delta, transmitere, intrafamilială, Moldova.

Introducere

Conform estimărilor recente (2019, CDC), la nivel mondial, aproximativ 62-74 de milioane de persoane sunt infectate cu VHD. În general, se consideră că VHD a fost descoperit în apogeul epidemiei sale, în deceniul anilor '70. De atunci, în majoritatea țărilor, care efectuează programe de supraveghere epidemiologică, a fost observat un reflux constant al prevalenței sale la purtătorii de antigen de suprafață a VHB (Ag HBs). Acest declin a fost atât de important, încât unii autori au considerat că VHD dispăre lent, cel puțin în Europa. Alți cercetători consideră, însă, că istoria VHD nu se termină, deoarece virusul revine în Europa prin intermediul migrației umane (Africa sub-Sahariană, Pakistan, estul Turciei), unde este extrem de endemic și, de fapt, prevalența sa s-a stabilizat în Europa de Vest în ultimul deceniu.

VHD este considerat a fi responsabil pentru cea mai severă formă de hepatită virală și reprezintă o problemă medicală gravă în domeniul bolilor hepatice. Se observă că mai des decât

Abstract

Introduction. Hepatitis delta is sometimes considered as a vanishing disease in Western Europe but is still widespread in selected countries located east of the continent. The Republic of Moldova is a country where Hepatitis Delta is suspected to be responsible for an important burden of diseases. However, so far, no first-hand study describing hepatitis delta virus (HDV)-infected patients has been published in the Republic of Moldova.

Material and methods. In the present cross-sectional study, we described demographic, clinical and biological features of 340 HDV-infected patients attending care in four Moldovan medical institutions.

Results. The mean age of the patients was 48.3 ± 7.6 years, men 184 vs 156 women. All were anti-HBe negative but hepatitis B virus (HBV) DNA was detectable in 31.6% of cases. The mean HDV RNA load was $5.9 \pm 1.7 \log_{10}$ IU/ml. The principal risk factor of hepatitis was intra-familial transmission (41.7%). A large subset of the patients was already affected by liver cirrhosis (58.4%) and among these 53.3% were presenting signs of decompensation. The time distance from the diagnosis of cirrhotic disease was correlated with the length of HDV infection (Pearson $r = 0.470$, $p < 0.0001$) but not with that of HBV infection. In case of familial transmission, the age of patients was significantly younger (46.0 ± 9.1 y.o. vs 50.6 ± 9.2 y.o., $p = 2.1E-04$) and likewise was the age at diagnostic of liver cirrhosis (40.8 ± 11.2 y.o. vs 46.9 ± 9.7 y.o., $p = 0.005$).

Conclusion. Hepatitis delta is a significant health problem in Moldova. Intrafamilial transmission of hepatitis, especially prevalent South of the country, is responsible of an anticipation of the complications. The application of active screening measures as well as the availability of antiviral therapy are the urgent measures that need to be applied in the Republic of Moldova.

Key words: hepatitis, Delta, VHD, transmission, intrafamilial, Moldova.

Introduction

According to new data (CDC, 2019) it is estimated around 62-74 million persons are co-infected with HDV worldwide. It is generally considered that HDV was discovered at the acme of its epidemics in the 1970's decade. Since then, a constant reflux of its prevalence in HBV surface antigen (HBsAg) carriers has been observed in most countries conducting epidemiological surveillance programs. This decline was so important that the threat represented by HDV is considered by some authors to be slowly vanishing at least in Europe. Other investigators consider, though, that HDV story is not finished as the virus is proven to re-enter in Europe through human migrations from regions (sub Saharan Africa, Pakistan, eastern Turkey) where it is highly endemic and as a matter of fact its prevalence stabilized in Western Europe during the in the last decade.

HDV is considered to be responsible for the most severe form of viral hepatitis and represents therefore a serious medical problem in the field of liver diseases. More often than

În cazul altor hepatite, pacienții infectați cronic cu VHD tind să progreseze spre ciroză hepatică cu decompensare rapidă, precum și spre carcinomul hepatocelular (HCC). În cele din urmă, tratamentele antivirale sunt recunoscute ineficiente împotriva acestui virus.

Bolile cronice hepatice, inclusiv hepatita B și C, sunt răspândite în Moldova, ceea ce duce la cele mai mari incidențe de ciroză hepatică și carcinom hepatocelular în regiunea europeană (OMS). În această privință și având în vedere dimensiunea relativ mică a populației, este remarcabil faptul că cetățenii moldoveni, apar frecvent în lucrările de cercetare despre VHD publicate de investigatorii vest-europeni sau nord-americani. În mod semnificativ, în Republica Moldova a fost efectuat recent un studiu clinic important în faza a II-a, care testează un nou tratament anti-VHD (REP 2139, un polimer cu acid nucleic). În cele din urmă, grupul nostru a raportat recent, că aproape jumătate dintre pacienții moldoveni diagnosticați cu carcinom hepatocelular sunt purtători de VHD. Cu toate acestea, până în prezent, nu există date locale despre caracteristicile clinice și biologice ale pacienților infectați cu VHD, în etapele precanceroase. În acest studiu transversal, am expus statutul a 244 de pacienți moldoveni infectați cu VHD și am descris modul în care transmiterea familială a hepatitei influențează foarte mult cursul bolii.

Material și metode

Recrutarea pacienților

Cei 244 de pacienți cu infecție cronică Delta au fost recrutați în perioada 2013-2019 în cadrul Disciplinei de gastroenterologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Chișinău (secția hepatologie, SCR Timofei Moșneaga, în Clinica Municipală a Medicilor de Familie (cabinetul infecționistului), din Bălți și din Cahul. Acest studiu a fost aprobat de comisia de revizuire instituțională a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova (Comisia de Bioetică, proces verbal nr. 35 din 12.02.2018).

Toți pacienții au fost informați despre scopul studiului și au semnat consimțământul informat. Acest studiu este parte a proiectului științific Hepatopatia cronică virală Delta – de la hepatită cronică la carcinom hepatocelular.

Diagnostic

Diagnosticul de ciroză hepatică a fost bazat pe simptomele clinice ale hipertensiunii portale, caracteristicile biochimice ale insuficienței hepatice și pe gradul de fibroză (F4). Rigiditatea hepatică a fost măsurată prin elastografie tranzitorie unidimensională cu echipament Fibroscan 502TOUCH (*EchoSens*, Paris, France). Dimensiunile ficatului și a splinei au fost determinate în timpul ecografiei transabdominale prin metoda Doppler (Siemens).

Metodele moleculare și serologice

Toți pacienții au fost evaluați pentru determinarea genomului viral circulant în sânge prin testul PCR TaqMan în real-time (*Cobas AmpliHep*, and *CobasTaqMan 48*, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

in other hepatitis, chronic HDV-infected patients tend to progress towards liver cirrhosis with rapid decompensation as well as towards hepatocellular carcinoma (HCC). Finally, antiviral treatments are notoriously inefficient against this virus.

Besides, chronic liver diseases, including hepatitis B and C, are widespread in Moldova leading to the highest incidences of liver cirrhosis and HCC in the European World Health Organization (WHO) region. To this regard, and considering the relatively small size of the population, it is remarkable that the Moldovan citizenship appears frequently in research papers about HDV published by Western European or North American investigators. Significantly, an important clinical phase II trial testing a novel anti-HDV therapeutics (REP 2139, a nucleic acid polymer) has been conducted recently in the Republic of Moldova. Finally, our group reported recently that almost half of Moldovan HBV-infected patients with HCC are also carriers of HDV. However, so far, there is a complete lack of locally produced data about the clinical and biological features of HDV-infected patients before the ultimate neoplastic steps. In the present cross-sectional work, we exposed the status of 244 HDV-infected Moldovan patients and describe how familial transmission of hepatitis greatly influences disease course.

Material and methods

Recruitment of patients

A series of 244 patients with a chronic Delta infection was recruited during 2013-2019 in the Department of gastroenterology, *Nicolae Testemitanu* State University of Medicine and Pharmacy in Chisinau, in the Gastroenterology and Hepatology Private Clinic (Helpa), Chisinau, and in the Municipal Infectious Clinic (Balti city) and in the Medical Family Center of Cahul city. This study was approved by the institutional review board of the *Nicolae Testemitanu* State University of Medicine and Pharmacy of the Republic of Moldova (Bioethics Commission, report no. 35 of 12.02.2018).

All patients were informed about the purpose of the study and signed the informed consent. This study is a part of project Hepatitis International Delta Network and National scientifically Project: Chronic viral hepatitis Delta – from hepatitis to hepatocellular carcinoma.

Diagnosis

The diagnosis of Liver cirrhosis was based on clinical symptoms of portal hypertension, biochemical features of hepatic insufficiency and the grade of fibrosis (F4). Liver stiffness was measured by uni-dimensional transient elastography with a Fibroscan 502TOUCH equipment (*EchoSens*, Paris, France). Liver and spleen dimension were measured through Doppler abdominal ultrasonography (Siemens).

Serological and molecular methods

All patients were screened for the presence of circulating viral genomes by real-time qPCR TaqMan assays (*Cobas AmpliHep*, and *CobasTaqMan 48*, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using a Prism 6.0d

Analiza statistică

Analiza datelor statistice a fost efectuată utilizând softul Prism 6.0d (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Variabilele numerice au fost rezumate după mediană, medie și intervalul lor în funcție de tipurile de distribuție (normale sau nu). Ele au fost comparate, fie printr-un test t-Student, fie cu un test Mann-Whitney, după caz. Variabilele categorice au fost rezumate ca frecvențe care au fost comparate fie prin teste Fisher exact, fie prin testul Chi². Nivelul de semnificație a fost stabilit la $p < 0,05$.

Rezultate

În acest studiu transversal, am colectat date despre 244 de pacienți infectați cu VHD, colectați din cadrul a trei centre comunitare de sănătate și la o instituție de îngrijire terțiară din Republica Moldova, între 2013 și 2019. Principalele caracteristici clinice și biologice ale pacienților sunt raportate în Tabelul 1.

Pacienții au fost de vârstă mijlocie (vârsta medie – 48,3 ± 7,6 ani, intervalul interquartil – 41,1-56,0 ani), femeile vs bărbații (raport F : B = 1,17). Conform fișelor medicale, pacienții au fost diagnosticați pentru infecția cu hepatită Delta la 10 ani după diagnosticul hepatitei B (38,6 ± 12,6 ani versus 28,8 ± 13,8 ani). Infecțiile cu virusul B și Delta au fost descoperite simultan în 31,7% din cazuri. Toți pacienții au fost pozitivi pentru anti-HBe. ADN-ul VHB a fost detectat în 28,1% din cazuri (încărcătura medie al ADN-ului VHB = 3,2 ± 1,4 log₁₀ UI/mL), în timp ce ARN VHD a fost detectat la 92,8% dintre pacienți. Încărcătura medie al ARN-ului HDV a fost de 5,9 ± 1,7 log₁₀ UI/mL (n = 257).

Măsurarea elastometrică a rigidității ficatului a indicat o valoare medie de 16,9 ± 10,1 kPa (n = 296). Ciroza hepatică a fost prezentă la 58,4% dintre pacienți și un subset de 28,8% dintre pacienți au prezentat deja semne de decompensare (ascită, encefalopatie, varice esofagiene). Distanța medie de timp pentru diagnosticul de ciroză hepatică a fost de 6,4 ± 4,3 ani.

Factorii de risc pentru infecția delta au fost identificați pentru aproape jumătate din cazuri. Transmiterea intrafamilială a fost principalul factor de risc suspectat la 41,7% dintre pacienți. În ceea ce privește tratamentul antiviral, un subset de 32,1% a primit, un tratament antiviral *bona fide* (interferon – în 29% și / sau nucleozide – în 9%). Pacienții cu ciroză hepatică au fost semnificativ mai puțini cu ARN HDV pozitiv decât cei non-cirofici (88,6% vs 99,0%, OR = 12,3; IC 95% = 1,5 – 95,6; $p = 0,002$) și la pacienții cirofici cu ARN HDV pozitiv, încărcătura virală a fost mai mică decât la cei non-cirofici (5,2 ± 0,18 vs 5,9 ± 0,18 log₁₀ UI / mL, $p = 0,004$).

De asemenea, am observat că distanța de timp care separă diagnosticul hepatitei Delta de hepatita B a fost mai mică la pacienții cu ADN VHB (+) decât la cei cu ADN VHB (-) (8,8 ± 6,9 ani versus 11,1 ± 7,5 ani, $p = 0,036$). În cele din urmă, am observat că distanța de timp de la diagnosticul de ciroză hepatică a fost corelată cu durata hepatitei Delta ($p < 0,0001$), dar nu cu durata hepatitei B ($p = 0,21$), subliniind rolul nociv jucat de VHD în evoluția cronică a bolilor hepatice ale pacienților.

Am observat, în primul rând, o suspjecție de transmitere

statistical package (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA). Numerical variables were summarized by their median, mean and range according to their types of distribution (normal or not). They were compared either by a t-Student's test or by a Mann-Whitney test as appropriate. Categorical variables were summarized as frequencies that were compared either by Fisher exact or Chi² tests. All tests were univariate and two-sided. Level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

In this cross-sectional study we collected data about 244 HDV-infected patients attending tree community health centers and a tertiary care institution in Moldova between 2013 and 2019. Main clinical and biological features of the patients are reported in Table 1.

Patients were middle-aged (mean age 48.3 ± 7.6 years, interquartile range: 41-56 years, and men more numerous than women (M : F ratio = 1.17). According to medical records, patients were diagnosed for hepatitis Delta infection 10 years after the diagnosis of hepatitis B (38.6 ± 12.6 years vs 28.8 ± 13.8 years). HBV DNA was detectable in 31.6% of cases (mean HBD DNA loads 3.2 ± 1.4 log₁₀ IU/mL) whereas HDV RNA was detected in 92.8% of patients. The mean HDV RNA load was 5.9 ± 1.7 log₁₀ IU/mL (n=257).

Elastometric measurement of liver stiffness indicated an average value of 16.9 ± 10.1 kPa (n = 296). Liver cirrhosis was present in 58.4% of patients and a subset of 28.8% of patients already showed signs of decompensation (ascites, encephalopathy, esophageal varices). The mean time to diagnosis of liver cirrhosis was 6.4 ± 4.3 years.

Risk factors for infection were retrieved for almost half cases. Intra-familial transmission was the principal risk factor suspected in 41.7% of patients. Concerning therapeutics, a subset of 32.1% received at some point a *bona fide* antiviral treatment (interferon in 29% and/or nucleosides in 9%). Patients with liver cirrhosis were significantly less often positive for HDV RNA than non-cirrhotic ones (88.6 vs 99.0%, OR = 12.3; 95% CI = 1.5 to 95.6; $p = 0.002$) and in cirrhotic patients positive for HDV RNA, viral loads were lower than in non-cirrhotic (5.2 ± 0.18 vs 5.9 ± 0.18 log₁₀ IU/mL, $p = 0.004$).

We observed as well that the time distance separating from hepatitis Delta diagnosis was smaller in HBV DNA(+) patients than in those HBV DNA(-) (8.8 ± 6.9 years vs 11.1 ± 7.5 years, $p = 0.036$). Finally, we observed that the time distance from liver cirrhosis diagnostic was correlated with the duration of hepatitis Delta ($p < 0.0001$) but not with the duration of hepatitis B ($p = 0.21$), emphasizing the deleterious role played by HDV in the chronic liver disease progression of patients.

We observed firstly than in the younger median for age (<48 years), a suspicion of intrafamilial transmission due to the presence of a contaminated household member was much more important than in the older median for age (59.3% vs 26.7%, OR = 3.1; 95% CI = 1.6 to 5.9; $p = 1.5E-04$). And the age at diagnosis for cirrhosis which was much younger in patients presently hepatitis virus-infected family members (40.8 ± 11.2 years vs 46.9 ± 9.7 years, $p = 0.005$).

Table 1. Characteristic of patients with hepatitis Delta.
Table 1. Caracteristica pacienților cu hepatita Delta.

Parameters <i>Parametri</i>	Values <i>Valori</i>
Age, years <i>Vârsta, ani</i>	48.3 ± 7.6
Sex ratio, M : F <i>Raportul pe sexe, B : F</i>	1.17 (184 : 156)
Age at HBV diagnosis, years <i>Vârsta stabilirii HBV, ani</i>	28.8 ± 13.8
Age at hepatitis Delta diagnosis, years <i>Vârsta stabilirii HDV, ani</i>	38.6 ± 12.6
Liver cirrhosis, % <i>Ciroza hepatică, %</i>	58.4
Decompensated cirrhosis, % <i>Ciroza hepatică decompensată, %</i>	28.8
Liver stiffness, kPa <i>Rigiditatea hepatică, kPa</i>	16.9 ± 10.1
Hepatitis B duration, monts <i>Durata hepatitei B, luni</i>	23.4 ± 12.7
Hepatitis Delta duration, monts <i>Durata hepatitei delta, luni</i>	10.5 ± 7.3
anti-HBe, % <i>AgHBe, %</i>	100.0
HBV DNA (+), % <i>ADN VHB (+), %</i>	31.6
HBV DNA loads (IU/mL, mean±SD) <i>Viremia ADN VHB (IU/ml, media ± SD)</i>	4.1E+06±29.8E+06
HDV RNA (+), % <i>ARN HDV (+), %</i>	92.8
HDV RNA loads (IU/mL, mean±SD) <i>Viremia ARN HBD (IU/ml, media ± SD)</i>	33.9E+06±110.1E+06
Ascites, % <i>Ascită, %</i>	12.2
Encephalopathy, % <i>Encefalopatie, %</i>	8.6
Esophageal varices, % <i>Varice esofagiene, %</i>	26.8
Transfusion mode of transmission, % <i>Transmiterea parenterală (transfuzională), %</i>	13.4
Tattoo-piercing mode of transmission, % <i>Transmitere prin tatuaj sau piercing, %</i>	5.2
Sexual transmission, % <i>Transmitere sexuală, %</i>	4.8
Intrafamilial infection, % <i>Infecție intrafamilială, %</i>	41.7
Lack of identified risk factor, % <i>Lipsa unui factor de risc, %</i>	44.6

intrafamilială cauzată de prezența unui membru de familie contaminat, a fost mult mai importantă pentru vârsta tânără (<48 ani) decât pentru cea mai înaintată (59,3% vs 26,7%, OR = 3,1; CI 95% = 1,6 – 5,9; p=1,5E-04). De asemenea, vârsta la care a fost diagnosticată ciroza, a fost mult mai tânără la pacienții ce au membri ai familiei infectați cu virusul hepatitei (40,8 ± 11,2 ani vs 46,9 ± 9,7 ani, p=0,005).

Aceste observații implică faptul că pacienții expuși la

These observations imply that patients exposed to intra-familial transmission are more at risk to develop complication of hepatitis delta due to an intrinsically longer exposure to the disease. Interestingly, familial transmission was a frequent hallmark of patients born in Southern Moldova (58.8% vs 36.1%, OR = 2.8; 95% CI = 1.4 to 5.7; p=0.002). Patients from this region were also more susceptible to be positive for HBV DNA in the blood (42.1% vs 22.2%, OR = 2.5; 95% CI: 1.3

transmiterea intrafamilială sunt mai pasibili de a dezvolta complicații ale hepatitei Delta din cauza unei expuneri intrinseci mai îndelungate la boală. Interesant este faptul că, transmiterea familială a fost un semn distinctiv frecvent al pacienților născuți în sudul Moldovei (58,8% vs 36,1%, OR = 2,8; IC 95% = 1,4 – 5,7; p=0,002). Pacienții din această regiune au fost, de asemenea, mai susceptibili de a fi pozitivi pentru ADN VHB în sânge (42,1% vs 22,2%, OR = 2,5; CI 95%: 1,3 – 5,0; p=0,004).

Atunci când stratificăm subșetul de pacienți contaminați în condiții casnice, pentru a identifica membrul familiei presupus la originea contaminării (părinți sau frați), au apărut diferite caracteristici care definesc modelul de transmitere. Când un frate era presupusul transmitător al virusului, pacienții erau mai des bărbați (64,0% vs 44,1%, OR = 2,3; CI 95% = 1,05 – 5,3; p=0,028). Acest model de transmitere virală între frați, a fost mai răspândit în sudul Moldovei (64,2% vs 20,0%, OR = 4,6; IC 95%: 2,0 – 10,7; p=6.2E-05). În cele din urmă, în cazul transmiterii hepatitei între frați, durata de timp din momentul diagnosticului hepatitei Delta tinde să fie mai lungă ($12,8 \pm 8,4$ ani vs $9,9 \pm 6,8$ ani; p=0,027), în timp ce, încărcătura virală de ARN HDV au fost scăzute ($4,9 \pm 1,5$ log₁₀IU / mL vs $5,7 \pm 1,6$ log₁₀IU / mL; p=0,026).

De asemenea, am fost interesați de interrelațiile dintre parametrii clinici și markerii biologici aplicabili contextului bolii. Am comparat sistematic pacienții infectați cu HDV și ciroză hepatică cu acei subiecți care nu au progresat către ciroză. Rigiditatea ficatului ($23,3 \pm 10,2$ kPa vs $10,2 \pm 3,8$ kPa, p=7,3E-16) și dimensiunea splinei (117 ± 42 cm² vs 69 ± 21 cm², p=4,7E-19) au fost cele mai semnificative diferențe observate între cirofici și non-cirofici.

Am testat, de asemenea, performanța diferiților predictori non-invazivi ai fibrozei hepatice (API, APRI, Scorul de discriminare a cirozei, raportul de Ritis, FIB-4, Fibro Q, indicele de fibroză, GPRI, GUCI, scorul King). În contextul prezentei cohorte, indicele de fibroză a fost sistemul de punctare cu cel mai bun nivel de discriminare între pacienții cirofici și necirofici ($3,6 \pm 0,1$ vs $2,6 \pm 0,1$; p=1,5E-13). Am continuat investigațiile noastre pentru a ne da seama dacă unii dintre acești factori ar putea indica decompensarea bolii hepatice. Astfel, am comparat cei 52 de pacienți cu semne de decompensări (ascita, encefalopatie, varice esofagiene) cu cei 42 de pacienți cu ciroză hepatică, dar niciunul dintre aceste semne de severitate. În aceste comparații, dimensiunea splinei, numărul de trombocite, INR, bilirubina totală și albumina au fost factorii capabili cu un nivel rezonabil de semnificație (p<0,01) să discrimineze între ciroza compensată și necompensată.

Dintre sistemele neinvazive de notare a fibrozei hepatice, indicele de fibroză rămâne cel mai performant ($4,1 \pm 1,0$ vs $3,1 \pm 0,9$; p=9,8E-08). Caracteristicile scorului GDNT și Indexului de Fibroză sunt prezentate în Figura 1.

Am încercat să ne construim propriul sistem de predicție a decompensării cirozei, folosind variabilele capabile să discrimineze între pacienții progresați sau neprogresați. Predictorul GDNT-ciroză include variabile de laborator precum albumina, trombocitele, bilirubina totală sau INR și o caracteristică

to 5.0; p=0.004).

When we stratify the subset of infected patients at home, in order to identify the family member presumed at the origin of the contamination (parents or siblings), different characteristics have emerged that define the transmission model. When a brother was the alleged transmitter of the virus, patients were more often male (64.0% vs 44.1%, OR = 2.3; 95% CI = 1.05 to 5.3; p=0.028). This pattern of viral transmission between siblings was more widespread in southern Moldova (64.2% vs 20.0%, OR = 4.6; 95% CI: 2.0 to 10.7; p=6.2E-05). Finally, in the case of hepatitis transmission between siblings, the time from the time of diagnosis of hepatitis Delta tends to be longer (12.8 ± 8.4 years vs 9.9 ± 6.8 years; p=0.027), in while, the viral load of HDV RNA was low (4.9 ± 1.5 log₁₀IU / mL vs 5.7 ± 1.6 log₁₀IU / mL; p=0.026).

Also, we get interested in the search for correlations between clinical settings and biological markers applicable to the Moldovan context of the disease. We systematically compared HDV-infected patients with liver cirrhosis with those subjects who did not progress yet. At the anatomical level, liver stiffness (23.3 ± 10.2 kPa vs 10.2 ± 3.8 kPa, p=7.3E-16) and spleen dimension (117 ± 42 cm² vs 69 ± 21 cm², p=4.7E-19) were the most significant difference observed between cirrhotics and non-cirrhotics.

We tested as well the performance of different non-invasive predictors of liver fibrosis (API, APRI, Cirrhosis Discriminating Score, de Ritis ratio, FIB-4, Fibro Q, Fibrosis index, GPRI, GUCI, King score). In the context of the present cohort, Fibrosis index was the scoring system with the best level of discrimination between cirrhotic and non-cirrhotic patients (3.6 ± 0.1 vs 2.6 ± 0.1 , p=1.5E-13). We carried on our investigations to figure out whether some of these factors could be indicative of the decompensation of the liver disease. We, thus, compared the 52 patients with signs of decompensations (ascites, encephalopathy, esophageal varices) with the 42 patients with liver cirrhosis but none of these signs of severity. In these comparisons, spleen dimension, platelets count, INR, total bilirubin and albumin were the factors capable with a reasonable level of significance (p<0.01) to discriminate between compensated and non-compensated cirrhosis.

Among the non-invasive liver fibrosis scoring systems, Fibrosis index remains the most performant (4.1 ± 1.0 vs 3.1 ± 0.9 , p=9.8E-08). The characteristics of the GDNT score and the Fibrosis Index are presented in Figure 1.

We tried to build our own system of cirrhosis decompensation prediction using the variables capable to discriminate between progressed or non-progressed patients. The GDNT-cirrhosis predictor includes laboratory variables such as albumin, platelets, total bilirubin or INR and a feature provided by ultrasound examination (spleen dimensions, see methods). Our scoring system was capable to differentiate correctly decompensated, compensated and non-cirrhosis patients. The Receiving Operator Curve (ROC) of GDNT score was more performant than all tested scoring systems (Figure 2).

Finally, we observed that the patients who benefited at a moment or another of a treatment by interferon of any kind

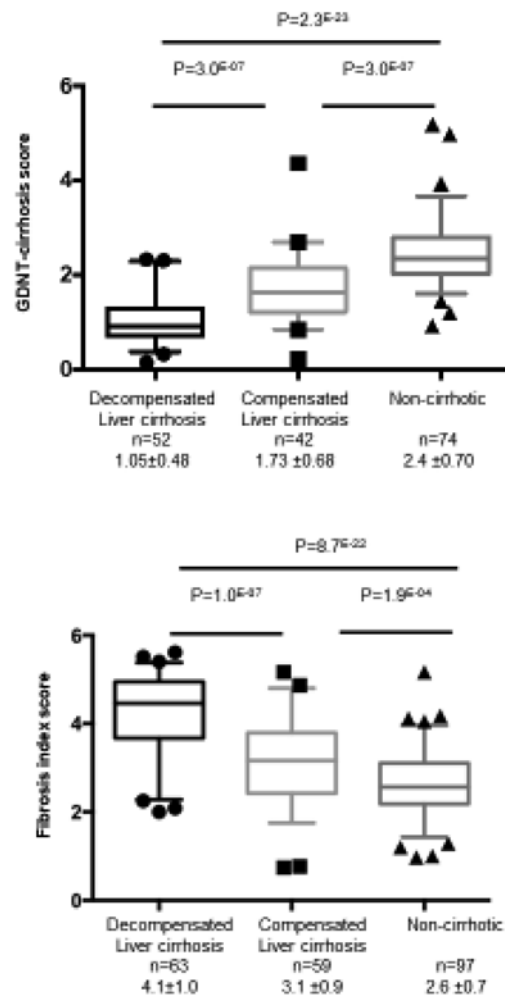


Fig. 1 Caracteristicile scorului GDNT și Indexului de Fibroză (conform Pascal Pineau, 2019).
Fig. 1 Characteristic of GDNT score and Fibrosis index score (according to Pascal Pineau, 2019).

$$\text{GDNT score} = \frac{\text{Albumin g/L} + (\text{Platelets} \times 0.1)}{(\text{INR} \times 10) + (\text{Total Bili} \times 0.25) + (\text{Spleen surface} \times 0.1)}$$

Fig. 2 GDNT score (according to Pascal Pineau, 2019).
Fig. 2 Scorul GDNT (conform Pascal Pineau, 2019).

oferită de examinarea cu ultrasunete (dimensiunile splinei). Sistemul nostru de notare a fost capabil să diferențieze corect pacienții decompensați, compensați și fără ciroză. Curba ROC a scorului GDNT a fost mai performantă decât toate sistemele de notare testate (Figura 2).

În cele din urmă, am observat că pacienții care au beneficiat la un moment sau altul de un tratament cu interferon de orice fel, au fost mult îmbunătățiți în comparație cu cei tratați doar cu compuși hepato-protectori. Ciroza hepatică (40,2% vs 61,7%, OR = 0,41; 95% CI = 0,22 – 0,77; p=0,003) și complicațiile acesteia (33% vs 57,4%, OR = 0,37; 95% CI: 0,15 – 0,87; p=0,034) au fost mai puțin prevalente la pacienții

were greatly improved by comparison with those treated only with hepato-protective compounds. Liver cirrhosis (40.2% vs 61.7%, OR = 0.41; 95% CI = 0.22 to 0.77, p=0.003) and its complications (33% vs 57.4%, OR=0.37; 95% CI: 0.15 to 0.87, p=0.034) were less prevalent in interferon-treated patients.

Discussion

The official evidence of chronic hepatitis in Moldova Republic dates back from 1966 (Lupasco I, 2017), when was initiated the registration of viral B hepatitis. The HBsAg seroprevalence in our country has been reported more frequently since the 1990s. Thus, in 1994 Kostrita S. and co-authors found

tratați cu interferon.

Discuții

Dovada oficială a hepatitei cronice din Republica Moldova datează din 1966 (Lupasco I., 2017), când a fost inițiată înregistrarea hepatitei virale B. Seroprevalența Ag HBs în țara noastră a fost raportată mai frecvent încă din anii 90. Astfel, în 1994, Kostrita S. și coautori au găsit Ag HBs în 12,5% (la donatori) în sudul Republicii Moldova, comparativ cu 4,5% în nordul țării. În 1998, J. A. Drobeniuc și coautorii au detectat Ag HBs în 13,2%, anti-HBsAg în 19,5% și anti-HBcor (asociate sau nu cu Ag HBs sau anti-HBsAg) în 71,5% din 1183 probe serice donatoare de sânge, precum și pe 145 de probe de sânge a copiilor de la 1 lună la 15 ani. S-a remarcat că zona de sud a țării este relevantă pentru o prevalență mai mare de Ag HBs, vârsta medie a persoanelor cercetate (în 24,6%) a fost de 18-29 ani. Aceste cercetări se numără printre primele publicații din anii 90, care descriu frecvența crescută a hepatitei cronice virale în Republica Moldova.

Este evidentă relația dintre prevalența ridicată a Ag HBs în anii 90, în special, la vârsta fragedă și evoluția bolilor hepatice B și D avansate astăzi la categoria de vârstă înaintată. În același timp, sugerăm că persoanele cu Ag HBs pozitiv, în anii 1980-1990 au servit atât ca surse de infecție intrafamilială, cât și comunitară, nu numai pentru transmiterea VHB, ci și pentru transmiterea VHD. Datele statistice privind seroprevalența VHD în perioada 1980-2000, sunt, practic, indisponibile în literatura de specialitate, ceea ce îngreunează viziunea noastră despre particularitățile epidemiologice ale acestei infecții în țara noastră.

Oficial, hepatita virală Delta este înregistrată în perioada 1990-1991 în Republica Moldova. Andriuța C. a remarcat în 1988 (*J. Zdravohranenie*, 1988) că prevalența infecției cu VHD în țara noastră este ridicată. Într-un studiu amplu, au remarcat donatori de sânge cu Ag HBs pozitiv: 17,6% din ei aveau anticorpi anti-HDV IgM pozitivi și 35,1% aveau anticorpi anti-VHD IgG pozitivi; diabetici cu Ag HBs pozitiv (38,8%) – 19% aveau anticorpi anti-HDV IgG, iar 12,5% – anticorpi anti-VHD IgM; pacienți cu hepatită cronică Ag HBs pozitivă (44,1%): anticorpi anti-HDV IgG – 46,7%, anticorpi anti-VHD IgM – 17,9%. Rezultatele acestui studiu a demonstrat prevalența ridicată a infecției virale cu VHB și VHD în țara noastră.

În același timp, se poate observa că distribuția acestor infecții este variată, fiind identificată în diferite grupuri. În 1989, Viazov S. și coautorii au publicat (*J. de Microbiologie, Epidemiologie și Immunobiologie, nr. 10*) date despre răspândirea infecției cu virusul Delta în țările Uniunii Sovietice. Rezultatele obținute au fost evidente și au relevat o serie de particularități epidemiologice ale infecției cu virusul Delta în țara noastră, când a fost înregistrată cea mai mare rată de VHD în rândul țărilor europene analizate – 17,6%.

După 2000, problema hepatitei cronice virale rămâne în atenția cercetătorilor din țara noastră. Datele statistice oficiale relevă o scădere continuă a incidenței hepatitei virale acute B, C și D. În pofida acestui fenomen pozitiv, este încă

HBs antigen of 12.5% (in donors) in the south of the Republic of Moldova compared to 4.5% in the north of the country. In 1998, Drobeniuc J.A. and co-authors detected HBsAg in 13.2%, anti-HBsAg in 19.5% and anti-HBcor (associated or not with HBsAg or antiHBsAg) in 71.5% from 1183 serum samples blood donors as well as on 145 blood samples of children from 1 month to 15 years. It was noted that the southern area of the country is relevant for a higher prevalence of HBsAg, the mean age of the investigated persons (in 24.6%) were 18-29 years. This research is among the first public in the 90s, which describes the increased frequency of chronic viral hepatitis in the Republic of Moldova.

It is evident the relationship between the high prevalence of HBsAg in the 90s, especially at the younger age and the evolution of advanced liver disease B and D today at the older age category. At the same time, we suggest that HBsAg positive individuals from the 1980-1990 served as both intrafamilial and community-based sources of infection not only for HBV transmission but also for transmission of HDV. Statistical data on the seroprevalence of HDV during the period 1980-2000 are practically not available in the literature, which makes difficult our vision about the epidemiological particularities of this infection in our country.

Official viral Delta hepatitis is registered from the 1990-1991 in the Republic of Moldova. Andriuța C. remarked in 1988 (*J. Zdravohranenie*, 1988) that the prevalence of viral delta infection in our country is high. In a large study, they remarked form HBsAg positive donors, 17.6% had anti-HDV IgM positive and 35.1% anti-VHD IgG positive; HBsAg positive diabetics (38.8%) – 19% anti-VHD IgG, 12.5% – anti-VHD IgM; HBsAg-positive chronic hepatitis patients (44.1%): anti-VHD IgG 46.7%, anti-VHD IgM 17.9%. The results of this study demonstrated the high prevalence of viral infection with HBV and HDV in our country.

At the same time, it can be noticed that the distribution of these infections is varied, being identified in different groups. In 1989 Viazov S. and coauthors published (*J. of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, no. 10) data about the spread of delta infection in the countries of the Soviet Union. The results obtained were obvious and revealed a number of epidemiological peculiarities of the delta virus infection in our country, when had the highest rate of HDV recorded among the European countries analyzed – 17.6%.

After 2000, the problem of chronic viral hepatitis remains in the attention of researchers in our country. The official statistical data reveal a continuous decrease in incidence of acute viral hepatitis B, C, and D. In spite of this positive phenomenon, it is still threatening that morbidity through severe forms of chronic viral hepatopathy increases, in other words, the high levels of cirrhosis caused by viral B and D infection, as well as hepatocellular carcinoma induced by these viruses. The prevalence of chronic viral hepatitis D during 2000-2011, which appears to be about 4.47% on a 58.19% background of chronic viral hepatitis B. At the same time, the dynamics of multi-year morbidity through chronic viral hepatitis Delta increased between 2000 and 2011 from 12.6% to 38.57%.

amenințător că morbiditatea prin forme severe de hepatopatie virală cronică crește; cu alte cuvinte, nivelurile ridicate de ciroză cauzată de infecția virală B și D, precum și de carcinomul hepatocelular indus de aceste virusuri. Prevalența hepatitei cronice virale D în perioada 2000-2011, care pare să fie de aproximativ 4,47% pe un fond de hepatită virală cronică de 58,19%, în același timp, dinamica morbidității multianuale prin hepatita virală cronică Delta a crescut între 2000 și 2011 de la 12,6% la 38,57%.

Prevalența cirozei hepatice cauzate de virusul Delta a fost dublată, astfel că în anul 2000 au existat 4,86 cazuri, iar în 2011 a ajuns la 10,22 cazuri la 100 mii de locuitori. Ciroza hepatică cauzată de VHB are, de asemenea, o prevalență crescută de la 16,41 în 2000 la 57,88 la 100.000 populație în anul 2011. În structura de vârstă a hepatitei virale cronice și a cirozei hepatice B cu sau fără antigen Delta, cei mai afectați sunt adulții, aceasta ar putea fi determinat de vaccinarea împotriva VHB a copiilor care a început în 1989, precum și de vaccinarea conform programului de imunizare, efectuată în toamna anului 1994. În același timp, a fost realizată vaccinarea copiilor născuți în 1988-1993, anterior nevaccinați.

Și chiar cu aceste măsuri profilactice, cum ar putea fi explicată creșterea morbidității prin hepatită virală cronică și ciroză hepatică cu VHB și VHD, în rândul adulților? Situația care se creează în țara noastră sugerează clar, că dobândirea de VHB are loc, în special, în copilărie, iar măsurile profilactice nu sunt aplicate în mod corespunzător sau sunt ineficiente. Aceste statistici oferă doar parțial peisajul hepatitei cronice Delta în Republica Moldova, bazându-se doar pe datele prezentate de instituțiile medicale, unde sunt înregistrați doar pacienți simptomatici, iar screening-ul VHD pentru purtătorii de Ag HBs este foarte scăzut. Adesea, pacienții diagnosticați cu ciroză hepatică virală B rămân la discreția medicului lor pentru a fi evaluați pentru VHD, un număr mare dintre ei nefiind testați pentru VHD, considerând că singurul tratament existent cu Interferon este contraindicat în acest stadiu de dezvoltare al bolii, deci o mare parte din acești oameni s-au pierdut din vedere. Majoritatea studiilor publicate sunt doar câteva cazuri cu diferite trăsături medicale. Prin urmare, informațiile sunt dispersate, știind că rata prevalenței este adesea inegală la nivel regional, unele zone fiind hiperendemice în infecția cu virusul Delta (în partea de sud a țării), în timp ce altele sunt mai mici, de exemplu, în nordul țării. Datele privind prevalența ar fi mai consistente, atunci când analizele vor fi efectuate pe anumite categorii medicale; sau se vor efectua studii clinice asupra infecției hepatice virale Delta la pacienții cu hepatită cronică Ag HBs pozitivă sau cu ciroză hepatică pozitivă cu Ag HBs. Lipsa studiilor multicentrice asupra infecției cronice virale Delta în țara noastră este un impediment pentru viziunea clară asupra acestei patologii. Cunoașterea prevalenței reale a infecției cronice cu VHD este esențială pentru înțelegerea gravității acestei probleme de sănătate, importantă pentru anticiparea impactului său viitor asupra sistemului de sănătate, precum și pentru asigurarea unei finanțări adecvate pentru această boală din partea sistemului de sănătate.

The prevalence of liver cirrhosis caused by delta virus was doubled, so in 2000 there were 4.86 cases and in 2011 it reached 10.22 cases per 100 thousand residents. Liver cirrhosis caused by VHB also has an increased prevalence from 16.41 in 2000 to 57.88 per 100,000 population in 2011. In the age structure of chronic viral hepatitis and liver cirrhosis B with or without Delta antigen the most affected are adults, which could be determined by the HBV vaccination of children that began in 1989 and vaccination according to the immunization program was carried out in the autumn of 1994. At the same time, vaccination of children born in 1988-1993 previously unvaccinated was realized.

And even by these prophylactic measures, how would be explained the increase of morbidity by chronic viral hepatitis and liver cirrhosis with HBV and HDV among adults? The situation that is created in our country clearly suggests that the acquisition of HBV occurs mostly in childhood, and the prophylactic measures are not properly applied or effective. These statistics provide only partially the landscape of chronic viral delta hepatitis in the Republic of Moldova, being based only on the data presented by the medical institutions, where only symptomatic patients are registered, and the HDV screening for HBsAg carriers is very low. Most published studies are only a few cases with different medical features. Therefore, the information is scattered, knowing that prevalence rates are often uneven at regional level, some areas being hyper endemic in delta virus infection (in the southern part of the country), while others are at a lower rate, for example the north of the country. Data on prevalence would be more consistent when analyzes will be performed on specific medical categories; or clinical trials will be performed on Delta viral hepatic infection in patients with HBsAg-positive chronic hepatitis or HBsAg-positive liver cirrhosis. The lack of multicenter studies on Delta's viral chronic infection in our country is an impediment to the clear view on this pathology. And knowing the real prevalence of chronic infection with HDV infection is essential to understanding the severity of this health problem, important for anticipating its future impact on the health system, and also for ensuring an adequate funding for this disease from the health system.

Conclusions

Hepatitis delta is a significant health problem in Moldova. Intra-familial transmission of hepatitis, especially prevalent the application of active screening measures as well as the availability of antiviral therapy are the urgent measures that need to be applied in the Republic of Moldova.

Authors' contribution

All authors contributed equally to the study and elaboration of the manuscript.

Declaration of conflicting interests

All authors declare no conflict of interest or any financial or non-financial support for the submitted work.

Concluzii

Hepatita Delta reprezintă o problemă importantă de sănătate în Moldova. Transmiterea intrafamilială a hepatitei, în special, în sudul țării, este responsabilă de anticiparea complicațiilor. Aplicarea măsurilor de screening activ precum și disponibilitatea terapiei antivirale sunt măsurile urgente care necesită a fi aplicate în Republica Moldova.

Contribuția autorilor

Toți autorii au contribuit în mod egal la realizarea studiului și la elaborarea manuscrisului.

Declarația de conflict de interese

Autorii declară lipsa oricărui conflict de interese, financiar sau nonfinanciar, asociat cu această lucrare.

Referințe / references

1. Abbas Z., Memon M., Umer M., Abbas M., Shazi L. Co-treatment with pegylated interferon alfa-2a and entecavir for hepatitis D: a randomized trial. *World J Hepatol*, 2016; 8 (14): 625-31.
2. El-Serag H. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2012; 142: 1264-1273.
3. Buti M., Esteban R., Roggendorf M., Fernandez J. *et al.* Hepatitis D virus RNA in acute delta infection: serological profile and correlation with other markers of hepatitis D virus infection. *Hepatology*, 1988; 8: 1125-2.
4. Negro F. Hepatitis D virus coinfection and superinfection. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014: ba021550.
5. Nicolau S., Cajal N. Explanation of the plurality of forms of inframicrobial epidemic hepatitis in the light of the spontaneous variability of the viruses. *Stud Cercet Inframicrobiol*, 1955; 6 (3-4): 325-40.
6. Rizzetto M., Canese M., 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. *Gut* 1977; 18: 997-1003.
7. Rizzetto M., Ciancio A. Epidemiology of hepatitis D. *Semin Liver Dis.*, 2012, 32: 211-219.
8. Romeo R., Foglieni B. *et.al.* High serum levels of HDV RNA are predictors of cirrhosis and liver cancer in patients with chronic hepatitis Delta. *Plos One*, 2014; 6 (3-4): 325-40.
9. Wranke A., Heidrich B., Ernst S., Calle Serrano B., Caruntu F., Curescu M. *et al.* Anti-HDV IgM as a marker of disease activity in hepatitis delta. *PLoS One*, 2014; 9 (7): e101002.