

# PARTICULARITĂȚI HISTOPATOLOGICE ALE HEPATITEI CRONICE VHB+VHD

*Carmen Ardeleanu\**, *Sabina Zurac\*\**, *Alexandra Vrabie\*\**, *Luciana Lavric\*\**, *Gianina Micu\*\**, *Eliza Gramada\*\**, *Anca Zaharia\*\**, *R. Andrei\*\**, *Florica Stăniceanu\**, *A. Streinu-Cercel\*\*\*\**

## REZUMAT

Hepatita cronică VHB+VHD (frecventă în România) nu prezintă modificări histopatologice specifice comparativ cu celelalte etiologii virale.

Am studiat 58 de cazuri de hepatită cronică cu infecție mixtă VHB+VHD comparativ cu un grup de 355 de cazuri de hepatită cronică VHB, folosind pentru analiza statistică testele CHITEST, FISCHER și STUDENT, cu un nivel de semnificație statistică P sub 0.05.

În hepatitele cronice HBV-HDV, comparativ cu hepatitele cronice VHB sunt semnificativ mai abundente: infiltratul inflamator intralobular (P=0.004), hepatita de interfață (P=0.002), necroza hepatocitară izolată (P=0.005), steatoza (P=0.025), hipertrofia și hiperplazia kupfferiană (P=0.007), activitatea necroinflamatorie (P=2,25428E-07) și fibroza (P=9,83716E-07); infiltratul inflamator portal și leziunile distrofice hidroprotidice au fost mai mari, dar cu P puțin peste 0.05 (P=0.052, respectiv P=0.057).

În concluzie, hepatitele cronice HBV-HDV au aspect histopatologic mai agresiv decât hepatitele cronice HBV – activitate necroinflamatorie mai mare (cu creșterea tuturor parametrilor de necroză și inflamație, mai puțin necroza confluentă), distrofiile hidroprotidice mai importante și fibroză mai mare.

**Cuvinte cheie:** infecție VHB-VHD, aspect histopatologic în hepatita cronică VHB-VHD

## ABSTRACT

### Histopathologic particularities of Hepatitis D virus chronic hepatitis

Hepatitis D virus (HDV) chronic hepatitis (which is frequent in Romania) shows no specific histopathologic lesions comparing with other viral etiologies.

We studied 58 cases of HBV-HDV chronic hepatitis; the results were compared with a group of 355 cases of HBV chronic hepatitis; a statistical analysis was performed – CHITEST, FISCHER and STUDENT tests were used with a level of statistical significance (P) of 0.05.

In HBV-HDV chronic hepatitis, comparing with HBV chronic hepatitis there were significant more important lobular inflammation (P=0.004), interface hepatitis (P=0.002), spotty necrosis (P=0.005), steatosis (P=0.025), Kupffer cells hyperplasia (P=0.007), necro-inflammatory activity (P=2,25428x10-07) and fibrosis (P=9,83716x10-07); the portal inflammatory infiltrate and ballooning degeneration were more prominent in HBV-HDV chronic hepatitis but P values were outside of the confidence range (P=0.052 and P=0.057).

We conclude that HBV-HDV chronic hepatitis have a more aggressive histopathologic appearance - higher necro-inflammatory activity (with an elevation of all histopathologic parameters of necrosis and inflammation except confluent necrosis), higher hepatocytic degeneration and higher fibrosis.

**Key words:** HBV-HDV infection, histopathologic appearance in HBV-HDV chronic hepatitis

## INTRODUCERE

VHD (agentul delta), identificat în 1977 este un virus defectiv a cărui replicare este legată de prezența VHB; particula virală (35-37 nm) este alcătuită dintr-un lanț unic de ARN cu o capsulă care include Ag HBs; aspectul în microscopia electronică este similar particulei Dane (4).

Distribuția geografică a VHD favorizează bazinul Mediteranean, Africa Centrală, America Centrală și de Sud. Frecvența infecției cu VHD în România este de asemenea mare (2). Incubația este de 30 - 50 zile (în suprainfecții); în coinfecții apariția bolii nu este posibilă decât după sfârșitul perioadei de incubație a VHB. Clinic, riscul cronicizării este foarte mare (80% din cazuri); hepatita cronică este severă, evoluția către ciroză hepatică este regula. Riscul dezvoltării unui carcinom hepatocelular în infecția VHB+VHD este similar celui din infecția VHB pură (7).

În coinfecții identificarea serică a ARH VHD se face înainte de creșterea ALT, instalarea simptomatologiei clinice sau creșterea Ig M anti VHD dar după pozitivarea Ag HBs. Ulterior Ac anti VHD scad în paralel cu creșterea nivelului seric al Ac anti VHB. În suprainfecții identificarea ARN-ului viral se face cam în aceeași perioadă cu instalarea simptomatologiei clinice și creșterea ALT; Ac anti VHD se mențin crescuți în platou mult timp de la expunere.

În hepatita cronică VHB,D nu există modificări histopatologice specifice; activitatea necro-inflamatorie este mai mare decât în cazul hepatitei cronice cu VHB, de regulă datorată unei activități intralobulare mai mari (mai multe focare de inflamație cronică și de necroză hepatocitară izolată) (1,6).

Ca și în hepatita cronică cu VHB, se poate remarca prezența de celule cu aspect "în sticlă mată" ("ground glass") și nuclei nisipoși. În plus față de antigenele virale VHB, imuno-histochimic se identifică nuclei pozitivi pentru AgHD (3).

\* Conf. Dr. Carmen Ardeleanu, prof. dr. Florica Stăniceanu - Departamentul de Anatomie Patologică, Institutul Victor Babeș

\*\*Sabina Zurac, Alexandra Vrabie, Luciana Lavric, Gianina Micu, Eliza Gramada, Anca Zaharia, Razvan Andrei - Serviciul de Anatomie Patologică, Spitalul Clinic Colentina

\*\*\*prof. dr. Adrian Streinu-Cercel - Clinica de Boli Infecțioase, Institutul de Boli Infecțioase „Matei Balș”

Hepatocitele „în sticlă mată“ Hadziyannis	
Aspect în microscopia optică	incluzii intracitoplasmice mari, omogene, slab eozinofile, cu halou clar la periferie și deplasarea excentrică a nucleului
Aspect electronomicroscopic	dilatarea cisternelor reticulului endoplasmic în care se acumulează mase filamentoase de AgHBs
Colorații speciale	orceină modificată Shikata, albastru Victoria, tricrom Masson
Imunohistochimie	pozitivitate pentru anticorpi anti AgHBs
Alte entități clinice în care pot fi identificate	· epilepsia mioclonică (boala Lafora) · glicogenoza de tip IV · administrarea de cianamid
Aspecte similare	· oncocitele, · hepatocitele la pacienții la care medicația include fenobarbital sau orice alte medicamente care induc hiperplazia sistemului reticular endoplasmic · hepatocitele care au incluzii de fibrinogen, alfa 1 antitripsină

Nucleii nisipoși	
Aspect în microscopia optică	nuclei hepatocitari de dimensiuni mai mari, fără nucleoli vizibili, cu cromatina fin pulverulentă
Imunohistochimie	pozitivitate pentru anticorpi anti AgHBc

## MATERIAL ȘI METODĂ

Am studiat 58 de cazuri de hepatită cronică cu infecție mixtă VHB+VHD diagnosticate în Secția de Anatomie Patologică a Spitalului Clinic Colentina în decursul a 14 luni (perioada 01.01.2004 – 28.02.2005).

Materialul analizat a fost în întregime țesut hepatic uman recoltat prin puncție biopsie hepatică, pacienții provenind din secțiile Institutului de Boli Infecțioase „Matei Balș” București.

Fragmentele hepatice recoltate au fost prelucrate clasic – au fost fixate în formaldehidă tamponată 10%, imersarea în fixator făcându-se imediat după recoltare; timpul de fixare a fost variabil între 18 și 22 de ore, în funcție de momentul recoltării.

Biopsiile au fost ulterior prelucrate după cum urmează: deshidratare într-o serie succesivă de alcooluri etilice de concentrații crescând până la alcool etilic absolut, toluen în trei băi succesive a câte 30 min, parafină în trei băi succesive a 30 min (la termostat 56°C). Fragmentele au fost incluse în parafină; s-au efectuat secțiuni de 3 micrometri grosime. Colorațiile de rutină pentru biopsiile hepatice au fost reprezentate de hematoxilina-eozină, van Gieson, tricrom Masson, Gomori și Perls; în cazuri particulare, în funcție de aspectul în colorațiile de rutină, s-au efectuat colorații PAS, D-PAS, Best, Giemsa și rodanină.

În studiul materialului recoltat au fost urmăritți mai mulți parametri:

- lungimea fragmentelor
- numărul de spații porte
- necroza hepatocitară periportală/ periseptală și intralobulară (focală și confluentă)

- infiltratul inflamator portal/ septal și intralobular
- apoptoza hepatocitară
- modificările sinusoidale
- distrofiile hepatocitare
- leziunile specifice unui anumit tip de virus
- activitatea necroinflamatorie și fibroza

Pentru aprecierea activității necroinflamatorii și a fibrozei am folosit scorul semicantitativ Ishak.

În paralel am evaluat de o manieră similară un lot alcătuit din 355 de pacienți cu infecție VHB; Am studiat corelații între acești parametri și etiologie folosind pentru evaluarea statistică testele  $\chi^2$  (CHITEST), FISCHER și STUDENT.

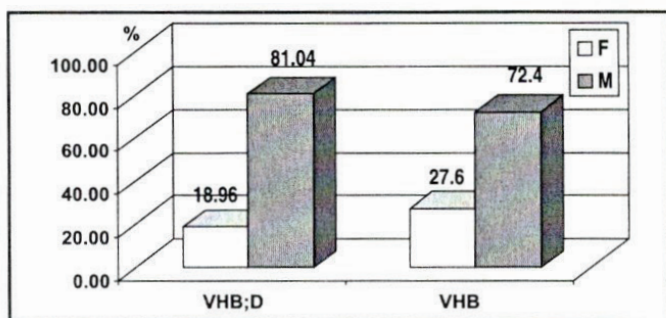
Limita de semnificație statistică luată în considerație a fost  $P < 0.05$ .

## REZULTATE

Am studiat repartiția pe sexe; se constată o mai mare predominanță masculină în grupul pacienților VHB,D+, fără a fi statistic semnificativă ( $P=0.28$ ) (tabel I, grafic 1).

**Tabel I** Repartiția pe sexe

	F	M	total
VHB;D	11	47	58
%	18.96	81.04	
VHB	98	257	355
%	27.6	72.4	
	P (FTEST)	0.283500715	

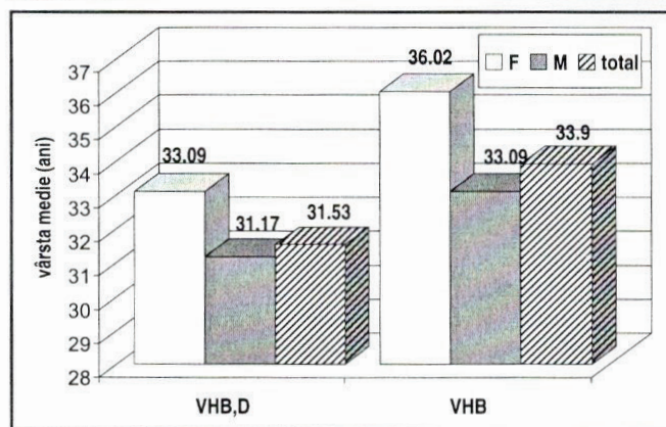


**Grafic 1** Repartiția pe sexe

Ca medie de vârstă, pacienții cu infecție VHB,D au fost cu câțiva ani mai tineri decât cei cu infecție VHB, diferențele nefiind statistic semnificative, nici când am încercat corelația între media de vârstă, sex și etiologie: Tabel II, grafic 2.

**Tabel II** Repartiția pe sexe a vârstei medii a pacienților VHB,D+

	VHB,D	VHB
F	33.09	36.02
M	31.17	33.09
total	31.53	33.9
P (FTEST)		0.738587

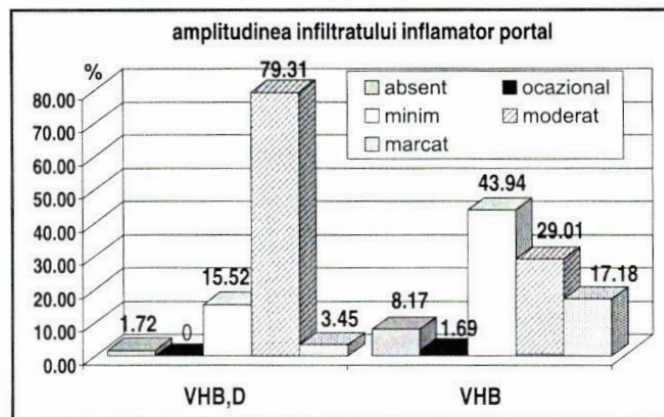


**Grafic 2** Repartiția pe sexe a vârstei medii a pacienților VHB,D+

Analiza infiltratului inflamator portal relevă o ușoară tendință de creștere a densității elementelor inflamatorii în infecția VHB,D, (P fiind foarte aproape de nivelul de semnificație statistică - 0.052) - tabel III, grafic 3.

**Tabel III** Repartiția infiltratului inflamator portal

inflamația portală	VHB,D	VHB,D (%)	VHB	VHB (%)
absent	1	1,72	29	8,17
ocazional	0	0,00	6	1,69
minim	9	15,52	156	43,94
moderat	46	79,31	103	29,01
marcat	2	3,45	61	17,18
P (FTEST)			0.052148	

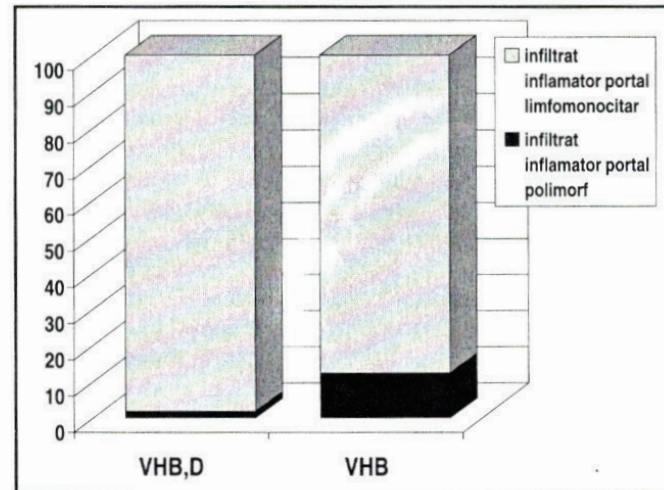


**Grafic 3** Repartiția infiltratului inflamator portal

În marea majoritate a cazurilor VHB,D, infiltratul inflamator portal a fost alcătuit din limfocite și monocite și numai rareori s-a observat un oarecare polimorfism (incluzând plasmocite, eozinofile, PMN) - mult mai puțin frecvent decât în infecția VHB: tabel IV.

**Tabel IV** Polimorfismul infiltratului inflamator

polimorfism	infiltrat inflamator portal polimorf	%
VHB,D	1	1.72
VHB	44	12.39
P(CHITEST)		0.001

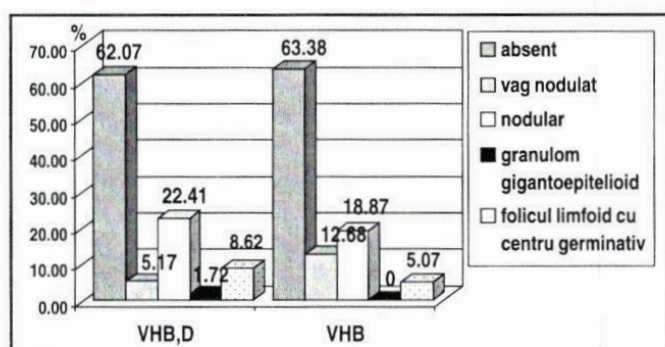


**Grafic 4** Polimorfismul infiltratului inflamator

Ca distribuție a infiltratului inflamator portal nu se observă diferențe semnificative între infecția VHB,D și respectiv VHB: tabel V, grafic 5. Deși caracteristic infecției VHC, aspectul nodular a fost observat în 1/3 din cazuri, atât în hepatita cronică VHB,D cât și hepatita cronică VHB, fiind mai degrabă legat de o mai mare densitate a infiltratului inflamator, decât o veritabilă dispoziție nodulară a acestuia.

**Tabel V Distribuția infiltratului inflamator portal**

	VHB,D (%)	VHB (%)
absent	62.07	63.38
vag nodular	5.17	12.68
nodular	22.41	18.87
granulom gigantoepitelioid	1.72	0.00
folicul limfoid cu centru germinativ	8.62	5.07
	P (FTEST)	0.969914

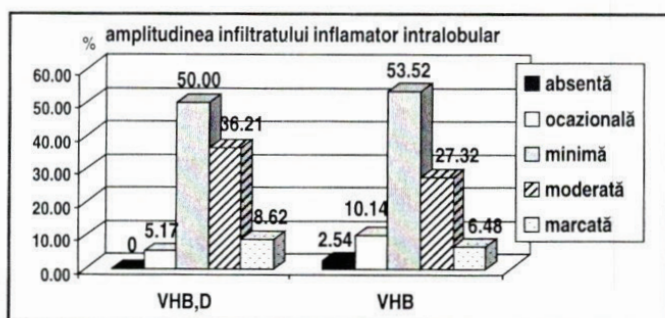


**Grafic 5 Distribuția infiltratului inflamator portal**

În ceea ce privește infiltratul inflamator lobular, acesta este mai abundent în infecția VHB,D (P=0.004) – tabel VI, grafic 6

**Tabel VI Infiltratul inflamator lobular**

inflamație lobulară	VHB,D (%)	VHB (%)
absentă	0.00	2.54
ocazională	5.17	10.14
minimă	50.00	53.52
moderată	36.21	27.32
marcată	8.62	6.48
	P (FTEST)	0.004663619

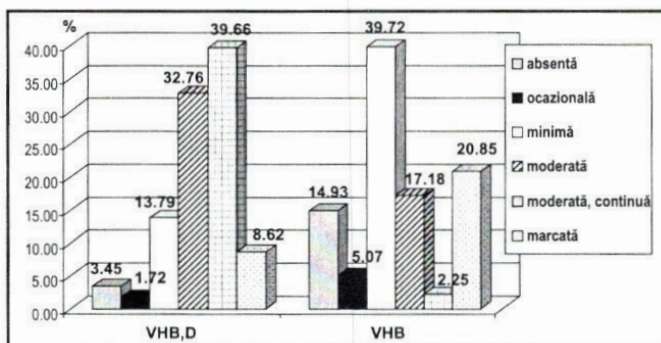


**Grafic 6 Infiltratul inflamator lobular**

Hepatita de interfață este considerabil mai mare în infecția VHB,D decât în infecția VHB (hepatita de interfață moderată – marcată 81.04% în hepatita cronică VHB,D față de 40,20% în hepatita cronică VHB – P=0,002) – tabel VII, grafic 7.

**Tabel VII Hepatita de interfață**

hepatita de interfață	VHB,D (%)	VHB (%)
absentă	3.45	14.93
ocazională	1.72	5.07
minimă	13.79	39.72
moderată	32.76	17.18
moderată, continuă	39.66	2.25
marcată	8.62	20.85
	P (FTEST)	0.002604688

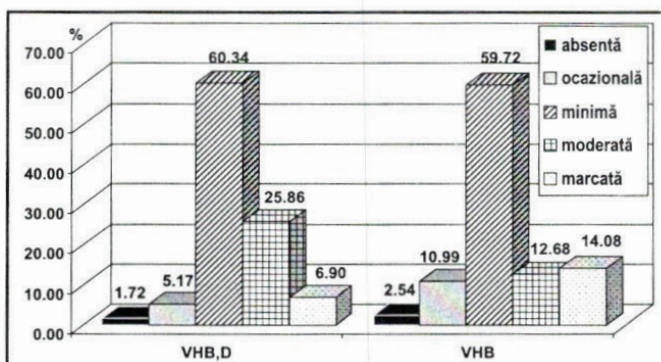


**Grafic 7 - hepatita de interfață**

De asemenea, necroza hepatocitară izolată intralobulară („spotty necrosis”) este mai mare în hepatita cronică VHB,D decât în hepatita cronică VHB (P=0,005) - tabel VIII, grafic 8.

**Tabel VIII Necroza hepatocitară izolată**

necroza izolată	VHB,D (%)	VHB (%)
absentă	1.72	2.54
ocazională	5.17	10.99
minimă	60.34	59.72
moderată	25.86	12.68
marcată	6.90	14.08
	P (FTEST)	0.005332982

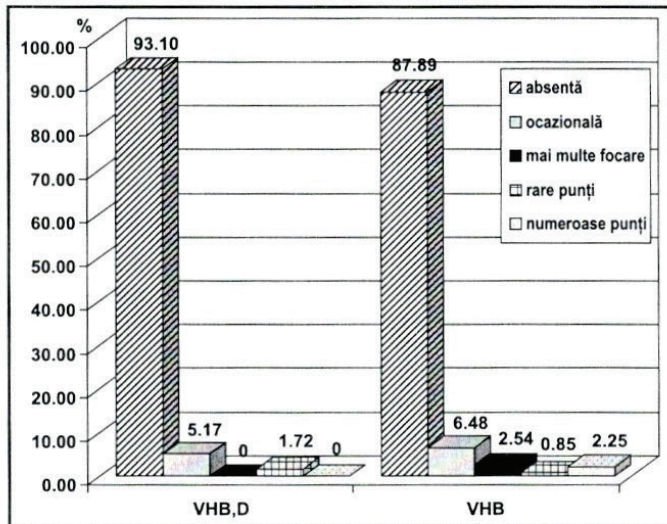


**Grafic 8 Necroza hepatocitară izolată**

În cazul necrozei confluențe nu există diferențe semnificative – tabel IX, grafic 9.

**Tabel IX Necroza confluentă**

necroza confluentă	VHB,D (%)	VHB (%)
absentă	93.10	87.89
ocazională	5.17	6.48
mai multe focare	0.00	2.54
rare punți	1.72	0.85
numeroase punți	0.00	2.25
P (FTEST)		0.889638934

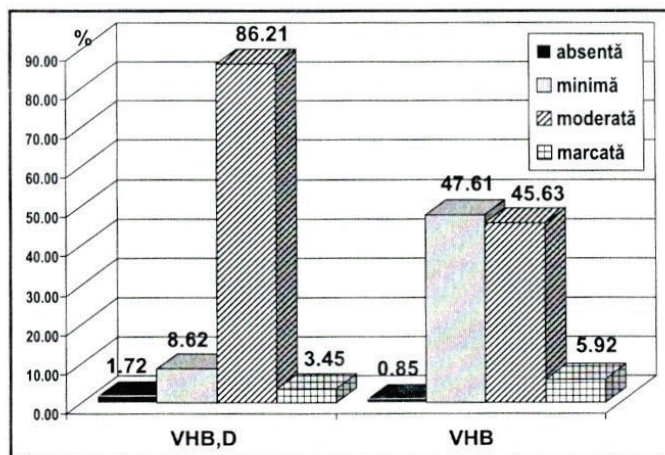


**Grafic 9 Necroza confluentă**

Leziunile distrofice hidroprotidice au fost mai importante în infecția VHB,D, decât în infecția VHB (P fiind foarte aproape de nivelul de semnificație statistică - 0.057) - tabel X, grafic 10.

**Tabel X Leziuni distrofice hidroprotidice**

distrofii hidroprotidice	VHB,D (%)	VHB (%)
Absente	1.72	0.85
Minime	8.62	47.61
Moderate	86.21	45.63
Marcate	3.45	5.92
P (FTEST)		0.056919319

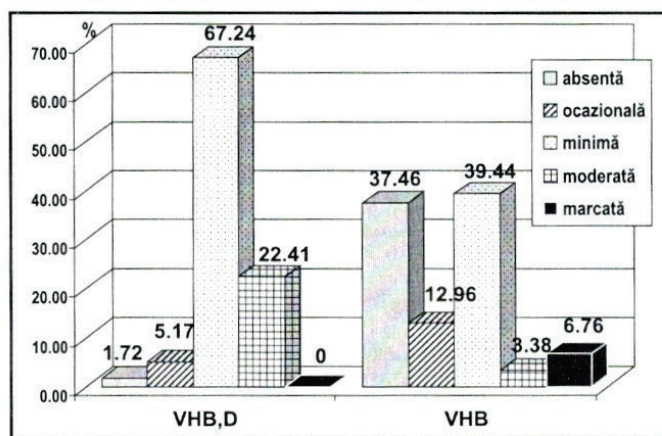


**Grafic 10 Leziuni distrofice hidroprotidice**

Am studiat frecvența steatozei în hepatitele cronice VHB,D față de hepatitele cronice VHB; se remarcă prezența mai frecventă și mai abundentă cantitativ în infecția VHB,D (steatoză moderată - marcată în 22.4% din cazuri în hepatita cronică VHB,D față de 10.14% în hepatita cronică VHB - P=0.025) - tabel XI, grafic 11

**Tabel XI Steatoza în hepatitele cronice VHB,D versus VHB**

Steatoza	VHB,D (%)	VHB (%)
Absentă	1,72	37,46
Ocazională	5,17	12,96
Minimă	67,24	39,44
Moderată	22,41	3,38
Marcată	0,00	6,76
P (FTEST)		0,025791132

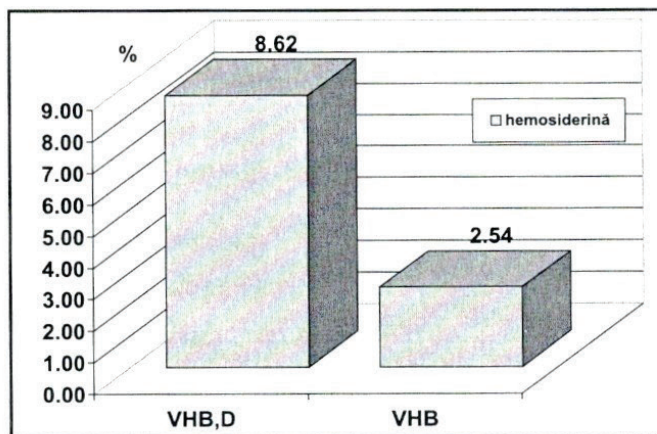


**Grafic 11 Steatoza în hepatitele cronice VHB,D versus VHB**

Încărcarea hepatocitară cu hemosiderină este mai mare în hepatitele cronice VHB,D versus VHB. (tabel XII)

**Tabel XII Pigmenții hepatocitari în hepatitele cronice VHB,D versus VHB**

	VHB,D (%)	VHB (%)	P (CHITEST)
hemosiderină	8,62	2,54	0.0001
lipofuscina	0,00	3,66	

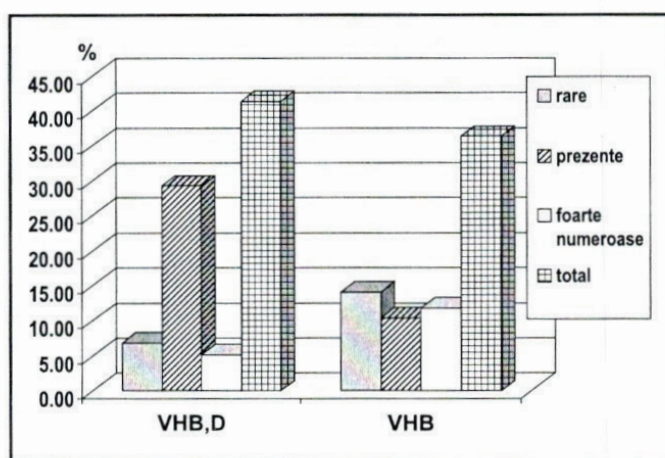


**Grafic 12 Hemosiderina în hepatitele cronice VHB,D versus VHB**

În ceea ce privește prezența hepatocitelor „în sticlă mată” în hepatitele cronice VHB,D versus hepatitele cronice VHB nu se observă diferențe semnificative statistic ( $P=0,826923$ ) – tabel XIII, grafic 13.

**Tabel XIII** Hepatocitele „în sticlă mată” în hepatitele cronice VHB,D versus VHB

hepatocite „în sticlă mată”	VHB,D (%)	VHB (%)
rare	6,90	14,08
prezente	29,31	10,42
foarte numeroase	5,17	11,83
total	41,38	36,34
	P (FTEST)	0,826923



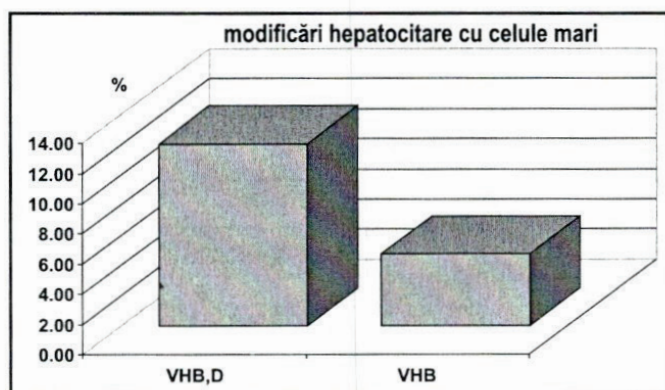
**Grafic 13** Hepatocitele în sticlă mată în hepatitele cronice VHB,D versus VHB

Modificările hepatocitare cu celule mari apar mai frecvent în hepatitele cronice VHB,D față de hepatitele cronice VHB; există o tendință mai mare de acumulare a modificărilor genetice în cazul infecției mixte VHB,D decât VHB.

**Tabel XIV** Modificările hepatocitare cu celule mari în hepatitele cronice VHB,D versus VHB

	VHB,D	VHB
Modificări hepatocitare cu celule mari	7 cazuri	17 cazuri
%	12,07	4,79
	P (CHITEST)	0.0006

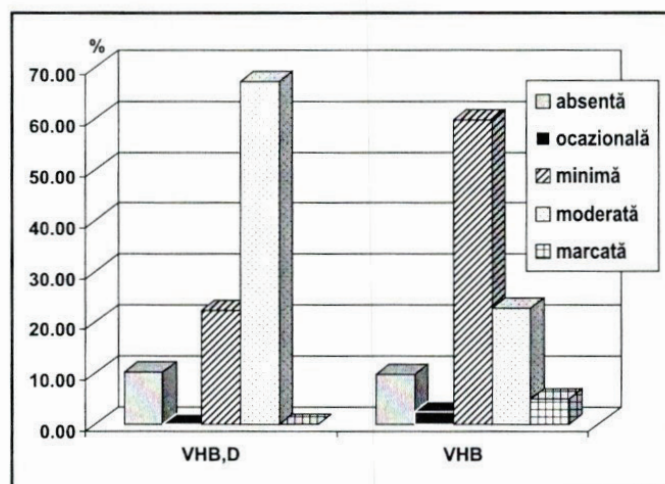
Hipertrofia și hiperplazia kupfferiană este semnificativ mai mare în hepatitele cronice VHB,D decât în hepatitele cronice VHB (hipertrofie și hiperplazie kupfferiană moderată – marcată în 67.24% din hepatitele cronice VHB,D față de 27.89% în hepatitele cronice VHB –  $P=0,0077$ ) – tabel XV, grafic 15.



**Grafic 14** Modificările hepatocitare cu celule mari în hepatitele cronice VHB,D versus VHB

**Tabel XV** Hipertrofia și hiperplazia kupfferiană în hepatitele cronice VHB,D versus VHB

hipertrofie și hiperplazie kupfferiană	VHB,D (%)	VHB (%)
absentă	10,34	9,86
ocazională	0,00	2,54
minimă	22,41	59,72
moderată	67,24	22,82
marcată	0,00	5,07
	P (FTEST)	0,007730894

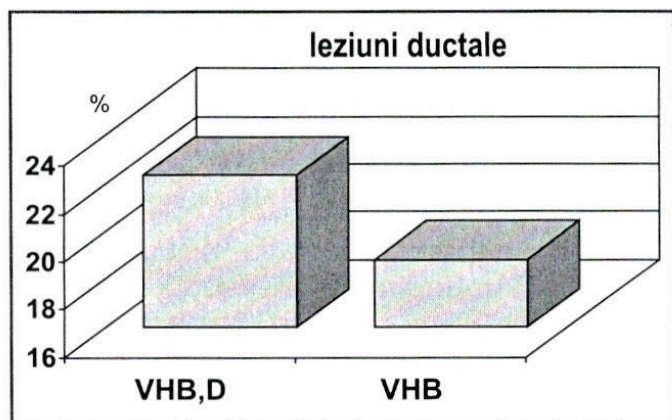


**Grafic 15** Hipertrofia și hiperplazia kupfferiană în hepatitele cronice VHB,D versus VHB

Leziunile ductale sunt mai frecvente în hepatitele cronice VHB,D decât în hepatitele cronice VHB, fără ca diferențele să fie semnificative – tabel XVI, grafic 16.

**Tabel XVI Leziunile ductale în hepatitele cronice VHB,D versus VHB**

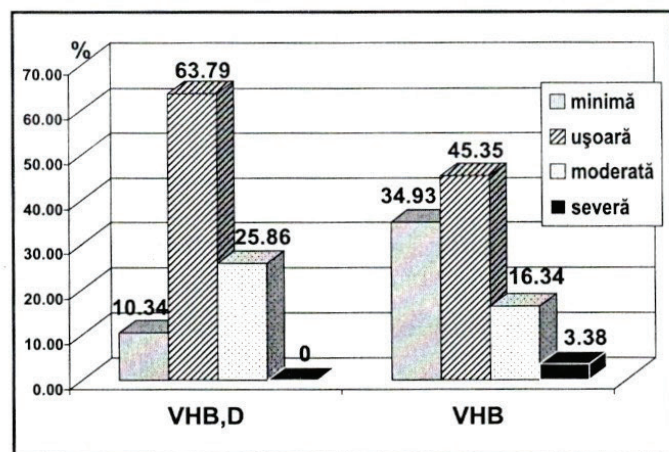
	VHB,D	VHB
leziuni ductale	13	67
%	22,41379	18,87323944
	P (CHITEST)	0,36

**Grafic 16 Leziunile ductale în hepatitele cronice VHB,D versus VHB**

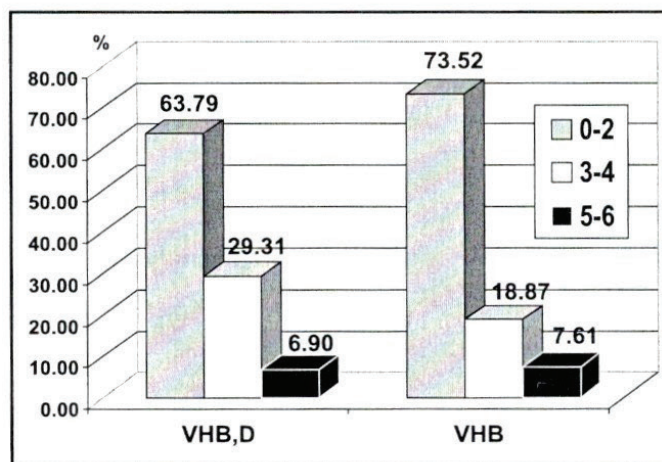
Studiul comparativ al activității necroinflamatorii (tabel XVII, grafic 17) și respectiv al fibrozei în hepatitele cronice VHB,D versus VHB (tabel XVIII, grafic 18) arată clar tendința de creștere a severității bolii odată cu suprapunerea infecției VHD (P mult sub 0.05).

**Tabel XVII Activitatea necroinflamatorie în hepatitele cronice VHB,D versus VHB**

ANI	VHB,D (%)	VHB (%)
minimă	10,34	34,93
ușoară	63,79	45,35
moderată	25,86	16,34
severă	0,00	3,38
	P (FTEST)	2,25428E-07

**Grafic 17 Activitatea necroinflamatorie în hepatitele cronice VHB,D versus VHB****Tabel XVIII Fibroza în hepatitele cronice VHB,D versus VHB**

Fibroza (scor Ishak)	VHB,D (%)	VHB (%)
0	12,07	10,70
1	5,17	32,68
2	46,55	30,14
3	24,14	15,49
4	5,17	3,38
5	1,72	2,54
6	5,17	5,07
	P (FTEST)	9,83716E-07

**Grafic 18 Fibroza în hepatitele cronice VHB,D versus VHB**

## CONCLUZII

În hepatitele cronice HBV-HDV, comparativ cu hepatitele cronice VHB infiltratul inflamator intralobular este semnificativ mai abundent ( $P=0.004$ ); de asemenea sunt mai importante hepatita de interfață ( $P=0.002$ ), necroza hepatocitară izolată ( $P=0.005$ ), steatoza ( $P=0.025$ ), hipertrofia și hiperplazia kupfferiană ( $P=0.007$ ), activitatea necroinflamatorie ( $P=2,25428E-07$ ) și fibroza ( $P=9,83716E-07$ ).

În ceea ce privește infiltratul inflamator portal și leziunile distrofice hidroprotidice, acestea au fost mai importante în hepatitele cronice HBV-HDV decât în hepatitele cronice VHB, dar, deși foarte apropiate de 0.05, valorile P au fost în afara intervalului de încredere ( $P=0.052$  și respectiv  $P=0.057$ ).

În hepatitele cronice HBV-HDV există o tendință ca depunerea de hemosiderină hepatocitară să fie mai mare ( $P=0.0001$ ), infiltratul inflamator mai puțin polimorf ( $P=0.001$ ) precum și displazia (modificările) hepatocitară cu celule mari mai des întâlnită ( $P=0.0006$ ).

Nu am înregistrat diferențe semnificative în materie de sexul pacienților, vârsta acestora, numărul de hepatocite "în sticlă mată", leziunile epitelului ductal, distribuția infiltratului inflamator portal sau prezența necrozei confluențe.

Pe baza datelor obținute care indică activitate necroinflamatorie mai mare (cu creșterea tuturor parametrilor de necroză și inflamație, mai puțin necroza confluentă), distrofiile hidroprotidice mai importante și fibroză mai mare,

putem conchide că hepatitele cronice HBV-HDV au aspect histopatologic mai agresiv decât hepatitele cronice HBV; mai mult, frecvența mai mare a modificărilor hepatocitare cu celule mari indică o tendință mai mare de acumulare a modificărilor genetice care, într-o populație hepatocitară diploidă, cu capacitate proliferativă conservată, ar putea conduce la dezvoltarea unui carcinom hepatocelular (martor de acumulare a modificărilor genetice în țesutul hepatic și nu leziune preneoplazică propriu-zisă) (5).

---

## BIBLIOGRAFIE

1. **Brunt EM.** Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology*. 2000 Jan;31(1):241-6.
2. **Grigorescu M, Pascu O, Acalovschi M et al.** What is the real prevalence of the D virus infection in chronic hepatitis and liver cirrhosis in Romania? *Rom J Gastroenterol*. 2003 Sep;12(3):179-82.
3. **Hsu SC, Syu WJ, Ting LT, Wu JC.** Immunohistochemical differentiation of hepatitis D virus genotypes. *Hepatology*. 2000;32:1111-6.
4. **Hsu SC, Wu JC, Sheen IJ et al.** Interaction and replication activation of genotype I and II hepatitis delta antigen. *J Virol*. 2004 2693-2700.
5. **Negro F, Papotti M, Taraglio S et al.** Relationship between hepatocyte proliferation and hepatitis delta virus replication in neoplastic and non-neoplastic liver tissues. *J Viral Hepat*. 1997 Mar;4(2):93-8.
6. **Rosina F, Conoscitore P, Cuppone R et al.** Changing pattern of chronic hepatitis D in Southern Europe. *Gastroenterology*. 1999 Jul;117(1):161-6.
7. **Watanabe H, Nagayama K, Enomoto N et al.** Chronic hepatitis delta virus infection with genotype IIB variant is correlated with progressive liver disease. *J of gen Virology*, 2003, 84, 3275/89